

О. Н. Чечина

СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ для СПО

2-е издание, переработанное и дополненное

Рекомендовано Учебно-методическим отделом среднего профессионального образования в качестве учебного пособия для студентов образовательных учреждений среднего профессионального образования

**Книга доступна в электронной библиотеке biblio-online.ru,
а также в мобильном приложении «Юрайт.Библиотека»**

Москва ■ Юрайт ■ 2019

УДК 663.11(075.32)

ББК 30.16я723

Ч-57

Автор:

Чечина Ольга Николаевна — доктор химических наук, профессор Самарского государственного технического университета.

Рецензент:

Макурина О. Н. — доктор биологических наук, профессор Самарского государственного университета.

Чечина, О. Н.

Ч-57 Сельскохозяйственная биотехнология : учеб. пособие для СПО / О. Н. Чечина. — 2-е изд., пер. и доп. — М. : Издательство Юрайт, 2019. — 231 с. — (Серия : Профессиональное образование).

ISBN 978-5-534-10466-0

Пособие оставлено в соответствии с государственным стандартом образования по направлению подготовки дипломированных специалистов «Биотехнология», специальности «Биотехнология». Включает общие теоретические основы дисциплины, вопросы практического осуществления биотехнологических процессов и прикладные аспекты по отраслям биотехнологии. В приложении дан словарь терминов.

Содержание учебного пособия соответствует актуальным требованиям Федерального государственного образовательного стандарта среднего профессионального образования и профессиональным требованиям.

Для студентов ссузов, обучающихся по инженерно-техническим специальностям. Книга будет полезна научным работникам, преподавателям и слушателям факультета повышения квалификации, а также специалистам в области биохимических производств.

УДК 663.11(075.32)

ББК 30.16я723



Все права защищены. Никакая часть данной книги не может быть воспроизведена в какой бы то ни было форме без письменного разрешения владельцев авторских прав. Правовую поддержку издательства обеспечивает юридическая компания «Дельфи».

ISBN 978-5-534-10466-0

© Чечина О. Н., 2010

© Чечина О. Н., 2019, с изменениями

© ООО «Издательство Юрайт», 2019

Оглавление

Список принятых сокращений.....	6
Предисловие	7
Введение ко второму изданию. Актуальные направления и перспективы развития биотехнологии....	11
1. Основные сведения.....	19
1.1. Предмет общей биотехнологии	19
1.2. История и современное состояние науки биотехнологии.....	20
1.2.1. Краткая история.....	20
1.2.2. Современное состояние и роль биотехнологии.....	20
2. Теоретические основы биотехнологии.	
Техническая биохимия и микробиология	28
2.1. Современная классификация биотехнологических методов и производств	28
2.2. Промышленная биотехнология: культивирование микроорганизмов	28
2.3. Типовые приемы и методы подготовки биообъектов.....	35
2.4. Иммобилизация ферментов и клеток.....	45
2.4.1. Приемы создания иммобилизованного состояния, или иммобилизованности.....	46
2.4.2. Методы и способы осуществления иммобилизации	48
2.4.3. Проблемы иммобилизованных биокаталитических систем разных типов	51
2.5. Генная инженерия.....	58
2.5.1. Техника генной инженерии.....	63
2.5.2. Ферменты генной инженерии	70
2.6. Использование генной инженерии в животноводстве и в растениеводстве.....	73
2.6.1. Генная инженерия в животноводстве	73
2.6.2. Генная инженерия растений	76
2.7. Клеточная инженерия растений	81

3. Промышленное осуществление	
микробиологических процессов. Оборудование	93
3.1. Технологические приемы и аппаратное оформление	
процессов культивирования на производстве	93
3.1.1. Системы перемешивания	93
3.1.2. Системы теплообмена, пеногашения и стерилизации..	97
3.1.3. Проблемы масштабирования	98
3.1.4. Периодическое и непрерывное действие	
установок (организация работы)	99
3.1.5. Специализированные процессы и реакторы	102
3.2. Отделение, очистка и модификация продуктов биосинтеза	104
3.2.1. Отделение биомассы от культуральной жидкости.....	105
3.2.2. Методы разрушения клеток.....	106
3.2.3. Отделение и очистка продукта	107
3.2.4. Масштабность методов разделения и очистки	110
3.2.5. Концентрирование продукта.....	111
3.2.6. Обезвоживание продукта	112
3.2.7. Модификация продукта	114
3.2.8. Стабилизация продукта	114
3.3. Социальные аспекты биотехнологических производств.....	115
3.3.1. Природоохранные мероприятия	116
3.3.2. Вредные вещества.....	117
3.3.3. Средства индивидуальной защиты	118
3.3.4. Экологические проблемы промышленной	
биотехнологии	119
3.3.5. Микробиологический контроль производства	120
4. Прикладные направления биотехнологии.	
Биохимические и бродильные производства	122
4.1. Производство кормового белка	122
4.2. Производство аминокислот	127
4.3. Производство ферментов.....	132
4.4. Получение антибиотиков	138
4.5. Технология бактериальных препаратов.....	143
4.5.1. Бактериальные энтомопатогенные препараты	144
4.5.2. Грибные энтомопатогенные препараты	146
4.5.3. Вирусные энтомопатологические препараты.....	147
4.5.4. Бактериальные удобрения	148
4.6. Пищевая биотехнология и биотехнология питания	150
4.7. Промышленная биотехнология	156
4.8. Экологическая биотехнология.....	160

4.8.1. Задачи экологической биотехнологии.....	160
4.8.2. Биотрансформация ксенобиотиков и загрязняющих окружающую среду веществ.....	161
4.8.3. Очистка сточных вод	163
4.8.4. Получение экологически чистой энергии.....	171
4.8.5. Сельскохозяйственная экобиотехнология	175
4.9. Сельскохозяйственная биотехнология	175
4.9.1. Силосование кормов.....	176
4.9.2. Селекция, размножение и сохранение ценных пород организмов	178
4.10. Медицинская биотехнология.....	181
4.10.1. Вакцины и вакцинация	181
4.10.2. Клеточная терапия (лечение стволовыми эмбриональными клетками)	183
4.10.3. Лечение генами.....	184
4.10.4. Применение ферментов.....	185
4.10.5. Экстракорпоральное оплодотворение и пересадка эмбрионов человека.....	186
Заключение.....	187
Список рекомендуемой литературы.....	189
Новые издания по дисциплине «Общая биотехнология» и смежным дисциплинам	192
Приложение. Терминологический словарь	193

Список принятых сокращений

а.к. — аминокислоты (аминокислота)

б.к.ж. — бесклеточная культуральная жидкость

о.к.ж. — обратная культуральная жидкость

в.м. (соединения) — высокомолекулярные соединения

Д — Дальтон — единица измерения массы, принятая в биологии; 1Д равен массе атома водорода $1,67 \cdot 10^{-27}$ кг и равен $1/12$ массы атома углерода

ИСО (ISO) — International organization for standardization — Международная организация по стандартизации

к.р.с. — крупный рогатый скот

к.ф. — ключевые ферменты

МКР — клональное микроразмножение растений (микрорепродукция и размножение растений)

м.о. — микроорганизм (микроорганизмы)

о.в. — органическое вещество

о.с. — окружающая среда

ПВ — питательные вещества (вещество)

п.в. — пищевые волокна

СВ — сухие вещества (вещество)

с.в. — сточные воды

с.о. — степень окисления

СП — свободное пространство

Ф — фермент

э.о. и п.э. — экстракорпоральное оплодотворение и пересадка эмбрионов

э.с.к. — эмбриональные стволовые клетки

Предисловие

Человек с незапамятных времен использовал методы микробиологического синтеза в повседневной переработке продуктов сельского хозяйства — выпечке хлеба, виноделии, приготовлении молочных продуктов, получении уксуса и других продуктов питания.

В 1665 г. было впервые описано микроскопическое исследование растений и введено в употребление слово «клетка» (физик Р. Гук). Тогда же впервые (в истории современной науки) были открыты бактерии (А. Левенгук). Но только в 1857 г. Л. Пастером была обоснована определяющая роль одноклеточных микроорганизмов в различных микробиологических процессах и в заболеваниях человека и животных.

В настоящее время с использованием микроорганизмов получают продукты, производство которых химическим путем связано со значительными трудностями либо экономически невыгодно, либо вообще невозможно. При этом в качестве исходных веществ используется дешевое сырье либо отходы производств. Накопление знаний по физиологии и закономерностям роста клетки и одноклеточных микроорганизмов позволило освоить многотоннажные промышленные производства антибиотиков, аминокислот, кормового белка. Разработаны методы культивирования клеток и тканей высших организмов — растений, животных.

Биотехнологией называются процессы с использованием микроорганизмов и культур клеток и тканей в различных областях — в промышленности, сельском хозяйстве, животноводстве. Биотехнологическим способом решаются задачи, связанные с производством различных химических веществ и лекарственных препаратов, восстанавливаемых энергетических ресурсов и с улучшением плодородия почв.

Методы генной инженерии и селекции позволяют повысить продуктивность животноводства и агрокультур. Экспрессия генов в живые клетки открывает перспективы в производстве

инсулина, интерферона и других лекарственных препаратов, в том числе для борьбы с инфекциями.

Производство кормовых дрожжей позволяет успешно решать проблемы расширения кормовой базы. Только одна тонна белково-витаминного концентрата сберегает до семи тонн зерна и дает дополнительно 400—600 кг свиного мяса и (по разным данным) от 15 000 до 25 000 или даже 30 000 штук яиц в птицеводстве [5].

Дальнейшее развитие биотехнологии связано с использованием достижений таких наук, как биология, химия, микробиология, физика, машиностроение, электроника и других.

Разработка биотехнологического процесса и его промышленное освоение складывается из следующих этапов:

- выбор штамма, обладающего наивысшей продуктивностью;
- подбор питательной среды, обеспечивающей оптимальный синтез целевого продукта;
- соблюдение технологии и условий для стерильности процесса (чистоты культуры);
- применение ЭВМ в процессе поддержания оптимальных условий культивирования клеток и тканей в биореакторе;
- выделение целевого продукта, его обработка и получение товарной формы.

Научно-технический прогресс общества сделал актуальными не только продовольственные, энергетические и медицинские проблемы. Возникли также экологические осложнения, решение которых требует комплексного подхода и не может обойтись без применения биотехнологических методов.

В данном пособии изложены теоретические основы биотехнологии, принципы организации биотехнологических процессов в производстве и описаны важнейшие прикладные области использования метода.

Для удобства пользования данным пособием и в целях закрепления знания необходимых терминов в конце пособия в приложении приведен терминологический словарь.

В результате изучения дисциплины «Общая биотехнология» студент должен освоить:

трудовые действия

- владения методами расчета основных техникоэкономических показателей типовых биотехнологических производств;

- современными технологиями хранения и подготовки продуцентов и сырья, а также готовой продукции;
- спецификой поддержания технологических параметров ферментаторов, стерилизаторов и другого оборудования;
- навыками системного анализа технологических схем биохимии;
- навыками поиска информации, необходимой для поддержания технологических показателей в изменяющихся экономических условиях;
- навыками работы с учебной и научной литературой о жизнедеятельности и технологических свойствах микроорганизмов-продуцентов;
- навыками разрешения проблем при осуществлении подготовительных и заключительных технологических операций, стерилизации и самой ферментации;

необходимые умения

- обобщать и систематизировать литературные источники по современному состоянию и перспективным направлениям биотехнологии;
- идентифицировать и классифицировать свойства продуцентов, а также источники сырья для питательных сред;
- анализировать и интерпретировать техноэкономические показатели, достоинства и недостатки разных биореакторов;
- разрабатывать и осуществлять технологические принципы получения продуктов биохимии;
- решать задачи, связанные с совершенствованием биотехнологических производств;
- применять теоретические знания к анализу производственных процессов и их трудностей;
- использовать полученные знания о теоретических основах производства;
- грамотно ориентироваться в техноэкономических, энергетических и природоохранных проблемах производства;
- выбирать необходимые методы для реализации поставленных задач анализа сырья и продуктов, давать самостоятельную оценку общему состоянию производства;

необходимые знания

- положений и теоретических основ подбора биологических объектов, селекции микроорганизмов;
- основ генной и клеточной инженерии;
- приемов иммобилизации биообъектов;

- значения компонентов питательных сред и источники их получения;
- особенностей и отличительных признаков биореакторов различного назначения, способов отделения, очистки и модификации продуктов ферментации;
- понятийного и категориального аппарата приложений биотехнологии к растениеводству, животноводству, энергетике, медицине, пищевой промышленности, добыче полезных ископаемых, охране окружающей среды;
- методологических принципов анализа процессов прироста биомассы, образования метаболитов и потребления субстрата;
- профессиональных требований к организации обслуживания биотехнологических установок;
- взглядов на механизм и подходов к регулированию деятельности ферментов в биосинтезе;
- современных представлений о биотехнологических принципах преобразования солнечной энергии, а также о вакцинации, клеточной терапии и пересадке эмбрионов животных и человека.

Введение ко второму изданию.

Актуальные направления и перспективы развития биотехнологии

Биотехнология в России остается одним из главных направлений научно-технического развития. Количество научной и учебно-методической литературы постоянно растет. Так, с 2000 по 2017 г. в Областной научно-технической библиотеке г. Самары появились 18 наименований новой научно-технической литературы по данному направлению. При этом половина из них — местные издания, выполненные в связи со служебной необходимостью по отдельным профессиональным областям знаний — биологии [11, 18], медицине [17], сельскому хозяйству [17], ветеринарии и зоотехнии [12, 26], для педагогических вузов [8, 17, 21, 31], а также для фармацевтических [1]. Все они, в основном, содержат известные положения общей биотехнологии применительно к конкретной отрасли знаний и толковые словари, составленные по этому же принципу¹.

В биотехнологии сосуществуют два взаимодействующие, но в то же время самостоятельные направления исследования, которые различаются методологией и логикой развития:

- теоретическое академическое (гуманитарное) — фундаментальное изучение микроорганизмов, растительных и животных клеток и их функционирования (как ферментации) в различных условиях; генное и клеточное модифицирование обычных (нативных) живых организмов и микробов [31]; На этой стадии научных разработок доминирует эмпирический научный подход;
- инженерно-технологическое — разработка, выбор и оценка социально значимых направлений и технических

¹ Тарантул В. З. Толковый биотехнологический словарь: рус.-англ. М.: Языки славянских культур, 2009 ; Первушкин С.В., Милехин А. В., Мизина П. Г. Словарь биотехнологических терминов. Самара : Федер. агентство по здравоохранению и социальному развитию РФ, Самар. гос. мед. ун-т, Рос. акад. с.-х. наук, Самар. НИИСХ им. Н. М. Тулайкова.

принципов полезного использования и совершенствования методик и техники преобразования биологической энергии для улучшения качества жизни человека [22, 26] в различных областях. К ним относятся, в том числе, сама биология, здравоохранение, сельское хозяйство, производство различных физиологически активных веществ, продуктов питания, химических реагентов, а также очистка, преобразование или выделения определенных компонентов природных и искусственных смесей. Эти научные разработки предполагают дедуктивный (креативный) стиль мышления.

Отдельно существует проблема объединения двух направлений в едином процессе подготовки кадров биотехнологов [15, 23—25, 27—29].

Здесь проанализируем направления биотехнологии, отраженные в новых литературных источниках и отметим наиболее актуальные, по нашему мнению, положения всеобщего (биологического) и технического значения в централизованных изданиях, а также в наиболее актуальных местных изданиях, которые не дублированы централизованными.

Новые свойства и применения ферментативных процессов. Ферментативные процессы в живом организме обеспечивают высочайший уровень упорядоченности живой материи на уровне макромолекул. Они способствуют тончайшей согласованности систем организма, тесной взаимосвязи метаболизма макромолекул на субстратном, энергетическом и генетическом уровнях, а также преобразованию, накоплению и использованию энергии в клетке [13]. Поэтому исследования деятельности простых и смешанных ферментов и ферментативных процессов не прекращаются. Это касается механизма ферментативного действия на трех уровнях: автономном, генетическом и нейрогуморальном. Продолжающиеся работы по генной модификации основаны на применении специфических ферментов (лигазы, рестриктазы, трансферазы и др.). Применительно к промышленной биотехнологии большое значение для пищевой промышленности имеют исследования чувствительности ферментов к процессам переработки молока [13, с. 170—171], а также исследования биоэнергетики митохондрии¹.

¹ Николс Д. Д. Биоэнергетика. Введение в хемиосмотическую теорию : пер. с англ. М. : Мир, 1985.

В последнее время возобновился интерес к исследованиям антиоксидантной роли ферментов (цитохром П-450, цитохром П-448) при возможном использовании перфторированных синтетических газопереносящих жидкостей вместо донорской крови [10]¹. В частности, в сборниках научных трудов российской академии естественных наук, отделение «Физико-химическая биология и инновации» под названием «Нетрадиционные природные ресурсы, инновационные технологии и продукты», вып. 21 и вып. 22 по данной проблеме опубликовано четыре статьи медико-биологического характера. При этом общий объем данных публикаций (авторы С. И. Воробьев, В. П. Кутушенко, Т. Г. Синельникова и А. А. Новиков) составил 10 % от объема сборников. Таким образом, проблему можно считать весьма серьезной. Очевидно, после длительного перерыва исследования по проблеме «голубой крови» будут продолжены, и можно надеяться на создание и широкое применение в лечебной практике искусственных заменителей крови, не имеющих групповой несовместимости и обладающих целым рядом ценных лечебно-оздоровительных качеств, в частности антиоксидантными свойствами.

Прогресс в эколого-биотехнологическом направлении. Большое значение для промышленной биотехнологии имеют работы по совершенствованию сырьевой базы биотехнологических производств — конверсии растительных субстратов [10, 18]. Эти работы направлены на использование возобновляемых источников сырья и на решение задач одной из главных сфер человеческой деятельности — поиск источников энергии.

Биомасса растений используется непосредственно как топливо либо путем превращения в этанол процессами брожения растительных пентоз и гексоз. Образующийся этанол имеет еще значительный запас биологической энергии и может использоваться как топливо, в частности, в двигателях внутреннего сгорания. Кроме того, экологическую направленность имеют исследования превращений основных компонентов растений. Комплексную переработку древесины организуют с переориентацией на деревья лиственных пород. Разрабатывают новые биоциды для борьбы с биологическими

¹ Иваницкий Г. Р. Биофизика на пороге нового тысячелетия: перфторуглеродные среды и газотранспортные кровезаменители // Биомедицинский журнал. 2000, декабрь. Т. 1. Ст. 1. С. 1—24.

повреждениями целлюлозосодержащих материалов, древесины и изделий на их основе.

Достижения биомембранной инженерии. Для инженерно-технологического направления биотехнологии (промышленная биотехнология) разработаны теоретические основы и инженерные принципы применения биомембранных систем, основанных на сочетании биологических и мембранных процессов [20]. К новому поколению биотехники относят мембранные биореакторы. В частности, в одном из вариантов биореактора бесклеточную культуральную жидкость отделяют прокачиванием культуральной жидкости через мембрану с сорбированными микроорганизмами. Микроорганизмы-продуценты скапливаются на фильтре, бесклеточную культуральную жидкость отделяют для дальнейшей переработки, а сконцентрированную культуральную жидкость возвращают в реактор.

Современный научно-технологический потенциал требует адекватного инженерно-технического оформления производства.

Возможности биоэлектрохимии и электробиотехнологии. Электрохимия аналогично биотехнологии устанавливает энергетическую связь разных форм движения материи и является междотраслевой наукой. К настоящему времени электрохимический метод достаточно развит, и его можно использовать на всех уровнях биотехнологического подхода — теоретическом, аналитическом, технологическом. Это позволяет в сфере жизненно важных биологических интересов и потребностей человека — производстве продуктов питания использовать в полной мере такие важные достоинства электрохимии, как: *универсальность* (возможность применения одинакового научного подхода в описании, расчетах, приборном оформлении), что расширяет возможности экстенсификации, в том числе и биотехнологического подхода, среди других областей науки и техники; *воспроизводимость и точность* контрольных измерений, особенно, в сочетании с методами математической статистики (по оформлению результатов эксперимента в электрохимии накоплен значительный опыт); *безреагентность* (неиспользование при производстве биотехнологической продукции различных потенциально опасных посторонних реактивов различного происхождения). С использованием электрохимического подхода — электроэкстракции и использования активированной электролизом воды возможны значительная

интенсификации производственных процессов и улучшение органолептических свойств, а также других показателей качества выпускаемой биотехнологической продукции¹.

Проблема подготовки кадров. Решение проблемы подготовки кадров для новой быстро развивающейся отрасли науки и техники как всегда актуально [22, с. 38—65]. Требования к специалисту в области естественнонаучных и технических знаний постоянно изменяются, так как зависят от состояния научно-технических знаний, представлений и производственных достижений [1]².

Однако несомненно, что всех специалистов-химиков любого направления (производство продуктов органического и неорганического синтеза, металлургия, электрохимия, производство нефтепродуктов и продуктов углехимии, пластмасс, новых материалов, животноводства и растениеводства, биотехнология и др.) можно разделить на две неравные по объему группы: исследователи и технологи. По сравнению с другими химическими профилями специальностей профессиональная деятельность химика-технолога имеет существенную специфику. Эта специфика связана с особенностями постановки целей и задач практической работы, обладает сравнительно большой долей элементов творчества и позволяет характеризовать ее в значительной мере как искусство. Так, дипломированные профессионалы-биотехнологи региона представляют *технический профиль* биотехнологии. По определению они призваны ответственно решать все технологические вопросы, включая снабжение сырьем и электроэнергией, капитальное строительство, ремонт и благоустройство, переработку отходов, контроль и регулирование. Они также должны руководить функционированием технологических схем промышленного производства продуктов питания из растительного сырья, к числу которых относятся, в основном, пивоварение, хлебопечение, производство спирта и кисломолочной продукции. Эти производства продуктов питания из растительного сырья представляют собой наиболее массовое и востребованное химико-техноло-

¹ Чечина О. Н. Электрохимический метод в учебном плане биотехнологов // Изв. Самарского научного центра РАН. Социальные, гуманитарные и медико-биологические науки. 2017. Т. 19. № 4. С. 135—139.

² Устинова Е. А., Челышева О. В. Понятие «средний специалист» в химии и биотехнологии. М. : Патент, 2006.

ческое направление полезного использования биологической энергии. Одновременно оно обеспечивает жизненно важные интересы человека. Во всех этих процессах специалист должен обеспечить качественно высокопродуктивную, экономичную и безопасную работу микроорганизмов-продуцентов.

Сформулируем требования, которым, как нам представляется, должны удовлетворять учебный процесс, практическую и научно-исследовательскую подготовку специалиста-биотехнолога промышленного пищевого производства.

1. Требование снижения себестоимости биотехнологического производства должно уступать по важности требованиям соблюдения стандартов качества, в том числе сроков хранения. Эти особенности предполагают целесообразность крупных предприятий взамен мелких кустарных, где практически трудно соблюдать оптимальные условия процессов, требования антисептики и санитарии, а также безопасности окружающей среды. Достаточно крупное сложное современное производство [2, 24], необходимость в полной мере отвечать за все его аспекты предполагает формирование личности специалиста-биотехнолога с высокой степенью экономической, экологической и социальной ответственности. Все виды учебной работы по подготовке специалиста должны быть направлены на формирование навыков творческой деятельности с достижением максимально полезного результата. В плане лекционного курса по любой дисциплине необходимо предусматривать, в первую очередь, изучение практической значимости дисциплины и затем — техническое оформление использования полученных знаний, включая государственные стандарты. Рубежный, промежуточный и заключительный контроль должны проверять наличие у обучающегося элементов *дедуктивного мышления* в рамках изученного на момент контроля учебного материала. Каждое лабораторное занятие должно включать сведения по практическому применению исследуемого вопроса с обязательным *инженерно-техническим расчетом*. Для специалиста, который призван в будущем обеспечить бесперебойную работу промышленного предприятия, получить результат в любом лабораторном исследовании, это означает получить конкретное число, конкретную цифру. В связи с данным требованием особое внимание необходимо уделять статистическим методам планирования и обработки результатов эксперимента [23].

2. На всех этапах подготовки специалиста должно уделять особое внимание всестороннему расширению инженерного кругозора, ознакомлению с максимально возможным широким кругом разных производств, которые при этом могут быть не связаны с конкретным специальным профилем подготовки. Специалист биотехнологического профиля пищевых производств *в обязательном порядке* должен изучить все функционирующие в регионе вуза соответствующие предприятия.

3. Наконец, нельзя упускать из виду то, что уровень развития технологий определяет уровень развития цивилизации в целом, все производственные процессы постоянно развиваются и совершенствуются в связи с внутренней логикой развития как самой химической специальности, так и смежных областей знаний в физике, механике, экологии, санитарии, медицины, этике, эстетике и др.

В настоящее время специфическими и наиболее актуальными для биотехнологии пищевых производств научными направлениями следует считать два приема.

3.1. Вовлечение в переработку нетрадиционных, но порой чрезвычайно технически, экономически и органолептически привлекательных видов сырья. Примером является использование для получения спирта такого нетрадиционного сырья, как топинамбур. Его возделывание, например, на территории Самарской области не представит значительных затрат: он неприхотлив и высокоурожаен. Возможность успешного получения спирта высокого качества из топинамбура доказана экспериментально [22, с. 78—79].

3.2. Развитие новых безреагентных методов процессов брожения, которые заключаются в активировании работы как продуцентов [22, с. 78—79, 83—88], так и основы реакционной жидкости — воды. Получение активированной электролизом воды успешно освоено, имеются работы по теоретическому обоснованию ее уникальных свойств. На кафедре технологии пищевых производств и биотехнологии Самарского государственного технического университета уже выполнены первые успешные эксперименты по применению электробиотехнологии в производстве молочной продукции и пива, а также в хлебопечении.

Постоянная нацеленность на достижение максимально полезного результата призвана формировать высокие волевые качества профессионала *биотехнолога пищевых производств*,

высокую требовательность к результатам своего труда, а также к уровню профессиональной компетентности и качеству труда коллег всех уровней.

Как показывают социологические исследования, в настоящее время в социуме нет людей, которые бы не интересовались социальными проблемами. Однако интерес к экологическим проблемам и здравоохранению преобладает над интересом к социальным проблемам¹. Поэтому растет интерес к биотехнологии, в плане как теоретических разработок, так ее практических приложений к решению задач здравоохранения, здорового питания, охраны окружающей среды и рациональной инженерии.

¹ Попова Т. Е., Попова Е. В. Биотехнология и социум. М. : Наука, 2000.

1. ОСНОВНЫЕ СВЕДЕНИЯ

1.1. Предмет общей биотехнологии

На современном уровне понимания биотехнология есть наука, создающая теоретические предпосылки разработки схем и способов получения практически ценных веществ и процессов на основе культивирования целых одноклеточных микроорганизмов или свободно растущих клеток многоклеточных организмов — растений и животных.

Наука является интегральной — она опирается на теорию и практику микробиологии, биохимии, молекулярной биологии и генетики, физиологии и цитологии. Она использует также прогрессивные химические технологии.

Биотехнологические процессы ведутся в искусственно созданных условиях, круглогодично и повсеместно. Это отличает их от сельскохозяйственной практики, где климатические, природные факторы существенно ограничивают возможности прогнозирования и управления.

До недавнего времени биотехнология включала только промышленную микробиологию, но сегодня ее возможности пополнились технологией культуры клеток растений и животных.

Новыми направлениями биотехнологии являются генная инженерия, позволяющая получить продукты клонированных генов и инженерная энзимология — реализующая возможности практического использования ферментов.

Общая биотехнология включает разработку, как лабораторных, так и промышленных способов осуществления биотехнологических процессов — методы подготовки биобъектов и сырья, методы ферментации, методы выделения и очистки, а также хранения продуцентов и продуктов биосинтеза.

1.2. История и современное состояние науки биотехнологии

1.2.1. Краткая история

Древнейшими областями человеческой деятельности являются такие биотехнологические процессы как хлебопечение, виноделие и пивоварение, основанные на жизнедеятельности хлебопекарных и винных дрожжей. Долгое время только с помощью биотехнологических методов получали кисломолочные продукты, сыры, пищевой уксус, а также различные органические кислоты и растворители.

В 1940—1950-е гг. бурное развитие биотехнологии связано с наступлением эры антибиотиков. В эти годы были созданы крупномасштабные биотехнологические производства, которые и сегодня являются самыми передовыми. Разработана теория селекции продуцентов, наука об антибиотиках.

В 1960-е гг. появились производства кормовых дрожжей и аминокислот.

В 1970-е гг. появилась генная инженерия, которая изменила саму методику поиска и селекции продуцентов нужных веществ.

Однако все это потребовало повышения профессионального уровня рабочего персонала. Первая такого рода коммерческая продукция — человеческий инсулин был получен в Японии в 1982 г.

В это же время начала энергично развиваться клеточная инженерия — новые методы получения эукариот, особенно методы микроклонального размножения растений.

В настоящее время биотехнология стала ведущей и бурно развивающейся отраслью хозяйства. Она используется практически во всех отраслях (медицина, сельское хозяйство, пищевая промышленность, химические производства, энергетика, экология) и определяет развитие мировой экономики в целом.

1.2.2. Современное состояние и роль биотехнологии

Прикладная биотехнология и ее законы

Отличительным признаком живых организмов является клеточное строение. Клетка является минимальной структурой, в которой происходят все необходимые для жизнедеятельности превращения органического вещества и энергии. Огромное

биологическое разнообразие живого вещества свидетельствует о неисчерпаемых возможностях биосинтеза.

Одноклеточные микроорганизмы — самые древние и разнообразные живые существа. Им примерно 3,5 млн лет, из них 2 млн лет они были единственными на Земле. Они прошли длительную эволюцию и «умеют делать» все, что «делают» высшие организмы и даже больше.

Бактерии сформировали окружающую среду — почву, атмосферу. Они могут существовать в различных экологических нишах и очень адаптивны. Разнообразие микроорганизмов позволяет широко использовать культивирование микроорганизмов. Огромные возможности дает также культивирование живых клеток и тканей различных растений и животных.

Культивирование микроорганизмов осуществляется в микробиологических производствах, которые условно делятся на три типа:

1) производящие живую или инактивированную биомассу м.о. — производство кормовых дрожжей и белково-витаминных концентратов (БВК), кормовые препараты, закваски, удобрения почвы и пестициды;

2) производящие продукты микробного биосинтеза — аминокислоты, антибиотики, ферменты, гормоны, витамины;

3) производящие продукты энергетического метаболизма — углеводы, биогаз, биоэтанол, спирты, органические кислоты.

Современные методы культивирования и селекции м.о. позволили повысить продуктивность продуцентов антибиотиков, например, в 1000 раз по сравнению с продуктивностью первых выделенных штаммов. Объем производства биотехнологической продукции вырос в 1981 г. в 1,5—2 раза по сравнению с уровнем до эры генетической инженерии (1975 г.) [19].

Культивирование растительных и животных клеток и тканей — более современное направление биотехнологии и также имеет огромные перспективы.

Значение генной инженерии

Генная инженерия изменила практику биотехнологии:

1) путем введения дополнительных генов, увеличения их количества или активности повысилась продуктивность промышленных м.о.;

2) удалось изменить питательные потребности м.о.;

3) появилась возможность синтезировать с помощью м.о. несвойственные им вещества и, таким образом, разнообразить продукцию;

4) изменилась стратегия создания биотехнологических производств. Сейчас берут любой пригодный для производства штамм и вводят в тело генную конструкцию, которая обеспечит синтез целевого продукта.

Большим успехом биотехнологии был синтез гормона роста в 1982 г. вслед за инсулином, в Японии, США, Великобритании. Его применяют не только для стимулирования роста, но и для заживления тяжелых ран.

Социальное значение биотехнологии

Неизменно актуальным является решение следующих задач биотехнологии:

- охрана здоровья;
- снабжение продовольствием и энергией;
- охрана окружающей среды.

Охрана здоровья — среди продукции фармацевтической промышленности первое место занимают антибиотики (по объему производства и широте применения). С их помощью лечат туберкулез, менингит, плеврит, пневмонию и даже онкологические заболевания. Сегодня известно более 6000 видов антибиотиков, из них применяются более 100. Они делятся на четыре группы:

- 1) пенициллины;
- 2) цефалоспорины;
- 3) тетрациклины;
- 4) эритромицины.

Продуцентами являются актиномицеты, миномицеты, спорообразующие бактерии и псевдомонады.

С середины 1960-х гг. появились химические технологии модификации природных антибиотиков. Появились новые лекарственные средства, эффективные против пенициллиноустойчивых бактерий.

Вторыми по значению лекарственными веществами — продуктами биотехнологии являются гормоны.

Стероидные гормоны синтезируются некоторыми видами актиномицетов. Кортизон и преднизолон применяются для лечения серьезных аллергических заболеваний, таких как бронхиальная астма, ревматоидный артрит и др. Методы

микробной трансформации позволяют сократить число этапов химического синтеза кортизона. В производстве стероидных гормонов широко применяются иммобилизованные микробные клетки. В 1980-е гг. методами генной инженерии получены пептидные гормоны (белковые). Это — белки, клонированные в кишечной палочке *E. coli*. Все эти вещества у самих микроорганизмов не обнаруживаются (табл. 1.1).

Таблица 1.1

Лекарственные вещества для медицины, синтезируемые биотехнологическим способом

Белок	Терапевтическое использование
Инсулин	Лечение диабета
Гормон роста	Лечение задержки роста и опасных ран
Тканевой активатор плазминогена	Лечение инфаркта миокарда
Интерфероны α , β , γ	Антивирусное и антиопухолевое действие
Интерлейкины 1, 2, 3	Антиопухолевое действие, лечение нарушений иммунитета
Урогастрон	Антязвенное действие
Урокиназа	Растворение тромбов
Лимфотоксин	Антиопухолевое действие
Фактор некроза опухолей	Антиопухолевое

Очень важным лекарственным веществом являются также ферменты. Их применяют при различных заболеваниях.

Так, при лечении заболеваний пищеварительных органов используются протеолитические ферменты. Их применяют также для лечения ожоговых поражений и различных ран (для удаления некротических тканей). Протеиназы с фибринолитическим действием применяют для растворения тромбов.

Ферменты стрептокиназа и урокиназа лечат тромбоз сосудов сердца, легких, конечностей.

Фермент аспарагиназа применяется для лечения лейкозов; липаза — при нарушении обмена веществ.

Биотехнологическим методом получают также профилактические препараты — вакцины.

Вакцинация снизила смертность от инфекционных заболеваний до 4—8 % против 30—50 % в развивающихся странах.

Благодаря вакцинации полностью искоренили оспу. В нашей стране заболеваемость полиомиелитом за последние 15 лет снизилась в 66 раз. С 1960-х гг. не зафиксировано ни одной массовой вспышки этого заболевания.

Снизилась заболеваемость корью, краснухой, дифтерией. Вакцинация стоит намного дешевле, чем лечение. В настоящее время генная инженерия позволила получить нужные антигены с помощью непатогенных м.о.

В перспективе биотехнологическим методом будут получены новые нейротропные препараты, вакцины, противоопухолевые и противовирусные средства, а также лекарства против генетических заболеваний.

Обеспечение населения продовольствием — в этой области актуальной является проблема недостатка белка животного происхождения, который богаче аминокислотами, чем растительный белок.

В 1986 г. мировое производство мяса составило 155 млн т, а молока — 521 млн т. Это удовлетворяет потребности населения только на 40 %. Годовой прирост производства мяса составляет только 2—3 %.

В настоящее время дефицит составляет 30—35 млн т в год. Поэтому необходимы нетрадиционные биотехнологии.

Биотехнология поставляет животноводству кормовой белок, белково-витаминные концентраты (БВК), незаменимые аминокислоты и кормовые антибиотики.

Получение биомассы дрожжей в нашей стране началось в 1930—1940-е гг. и в 1960-е гг. достигло крупных промышленных масштабов. Их получают на основе клетчатки, которая содержится в отходах деревообрабатывающей промышленности и сельского хозяйства. Гидролизная промышленность перерабатывает любые отходы сельского хозяйства с получением содержащих углеводы растворов для выращивания белковой биомассы кормовых и хлебопекарных дрожжей.

Белково-витаминные концентраты получают с помощью бактерий и грибов, растущих на метаноле, этаноле, метане и др. Эти продукты обеспечивают экономию зерна и увеличивают продуктивность мясного животноводства: 1 т БВК позволяет получить дополнительно до 0,8 т свинины или 1,5 т мяса птицы.

Улучшить состав пищи для человека и животных позволяют получаемые методом биотехнологии незаменимые аминокис-

лоты — лизин и метионин. Метионин получается методом химической технологии, а лизин — только биотехнологическим методом.

Незаменимые а.к. позволяют экономить корма и интенсифицировать производство мяса: на 1 т лизина высвобождается 40—50 т зерна и получается более 10 т мяса.

Для интенсификации производства мяса, молока и яиц в корма добавляются антибиотики.

В животноводстве и растениеводстве получила популярность биологическая система:

- применение энтомопатогенных препаратов (для борьбы с насекомыми-вредителями);
- применение бактериальных удобрений, таких как нитрагин, азобактерин, фосфобактерин и др.

В сочетании с применением стимуляторов роста эти приемы создают биологическую систему, которая снижает применение химических средств защиты растений. При этом снижается загрязнение почвы, повышается качество продукции, в том числе, кормов.

Глобальные изменения в растениеводстве достигаются методами генной инженерии по двум направлениям.

1. Использование симбиотических микроорганизмов для улучшения свойств растений. Так, клубеньковые бактерии фиксируют атмосферный азот. Молекулярным клонированием можно увеличить количество генов азотфиксации.

2. Улучшение свойств сельскохозяйственных растений возможно путем создания трансгенных растений. Они несут чужие гены, которыми заражаются посредством агробактерий. Эти гены модифицированы и таким путем получены растения, устойчивые к насекомым-вредителям, вирусам, к повреждениям и перезреванию.

Проблемы природоохранительного плана — таких проблем несколько.

Стоки химических предприятий содержат химические соединения, которые крайне медленно разлагаются в природе. Они называются ксенобиотиками. Однако всегда можно найти хотя бы один м.о., который утилизирует даже самый необычный антибиотик. Поэтому изучение путей катаболизма ксенобиотиков — их разложения и детоксикации позволяет создать биотехнологические способы очистки воды от бензола, толуола, ксенона и некоторых пестицидов.

Очистка земель и водоемов от загрязнения нефтью. Такие загрязнения создают вокруг нефтепромыслов безжизненные пространства. Аналогично при авариях на танкерах-перевозчиках нефти заливается акватория и берега рек. Штаммы-деструкторы, способные разлагать скопления нефти, получают методом генной инженерии.

Таким путем созданы микробные сообщества не только для очистки окружающей среды окружающей среды от нефти, но и для создания различных безотходных технологий.

Развитие цивилизации приводит к истощению энергетического потенциала Земли. При сегодняшнем уровне потребления нефти хватает всего на 100 лет, газа на 50, других ископаемых источников энергии — на 200 лет.

Однако мощным консервантом солнечной энергии является биомасса зеленых растений. Растительный покров земли сейчас энергетически эквивалентен $3 \cdot 10^{22}$ Дж и равноценен запасам всего ископаемого топлива. При этом возделываемые земли дают только 8 %, а из них только 2 % используется в пищу человеком и на корм животных. Энергетическая ценность всей остальной растительной биомассы в 20 раз превышает годовое потребление энергии, полученной от использования ископаемого топлива.

Принципиально существуют два варианта решения энергетических проблем с использованием биомассы растений.

Первый путь — непосредственное сжигание дров, навоза, древесного угля. Но при этом энергия используется лишь частично (на 10 %), и происходит загрязнение о.с. дымом и CO_2 .

Более полного использования энергии биомассы (на 50—80 %) можно достигнуть путем биологической конверсии биомассы в биогаз и этанол. Получаемые при этом отходы являются ценным удобрением.

Биогаз представляет собой смесь метан/ CO_2 в соотношении 2/1. Его продуцируют метаногенные бактерии. В Индии уже действует почти 1 млн установок биотехнологического получения газа для отопления домов, теплиц и др. Большое количество метантенков функционирует в Китае, они обеспечивают примерно 70 % крестьянских семей.

Производство биотоплива развивается в Бразилии, на Кубе, Филиппинах. В Бразилии из сахарного тростника получают в больших количествах биоэтанол — экологически чистое

жидкое топливо, заменитель бензина. Он позволяет сократить импорт нефти. К этому направлению биотехнологии проявляется значительный интерес в США, Великобритании, Франции.

Биотехнология не является панацеей для решения всех экологических проблем. Любая разработка сталкивается со значительными трудностями. Они связаны со сложностью живого организма. В живой системе нельзя изменить ничего, не задевая при этом других элементов. Нельзя придать организму только свойство синтезировать нужную аминокислоту или придать сельскохозяйственному растению устойчивость к грибкам. Одновременно возникают побочные дефекты, так как изменяются и другие свойства организма. Так, некоторые исследования показали снижение иммунитета у животных, питающихся БВК. При этом ген злокачественного перерождения одновременно необходим для нормального роста растений. Аналогично экосистема в целом сложным образом реагирует на ген, переданный культурному растению. Этот ген передастся и сорнякам. При этом в сорняк может превратиться само культурное растение.

Биотехнология пока делает успехи только на простейших объектах, и требуется накопление фундаментальных знаний для перехода к эукариотическим, более сложным организмам.

2. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ. ТЕХНИЧЕСКАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

2.1. Современная классификация биотехнологических методов и производств

Основные направления биотехнологии уже перечислены в кратком рассмотрении истории метода и могут быть представлены схемой на рис. 2.1.



Рис. 2.1. Классификация основных разделов биотехнологии

2.2. Промышленная биотехнология: культивирование микроорганизмов

Главной тенденцией развития биотехнологических производств является повышение их производительности, интенсификация процессов. Этому служит внедрение высокопродуктивных продуцентов и применение высокоэффективной технологии.

В целом разработка биотехнологического производства является довольно сложным процессом и складывается из ряда этапов:

- 1) выбор биообъекта (м.о. или изолированные клетки) и получение его чистой культуры;
- 2) подбор подходящего субстрата;

- 3) разработка конструкции аппарата;
- 4) оптимизация условий культивирования;
- 5) обеспечение автоматического контроля процесса;
- 6) разработка способов выделения и очистки готового продукта.

На этапе культивирования необходимо учитывать экономические факторы: экономичность метода в целом и его масштаб.

Конкурентом здесь может быть химический метод. Преимуществом биотехнологии в отдельных случаях может быть уникальность метода. Например, только этим методом можно получить один оптически активный изомер без примеси другого.

Необходимо правильно оценить масштаб производства и, соответственно, степень сложности и автоматизации аппаратуры (медицина и пиво). Очень важной особенностью биотехнологического производства является требование стерильности. Однако есть процессы, где это не имеет значения (получение биогаза).

Чем крупнее производство, тем тщательнее оно должно быть исследовано и обосновано. Это необходимо для получения возможности правильного расчета параметров режима и конструкции реактора.

После решения поставленных выше вопросов стремятся к максимальному удешевлению производства — использованию наиболее простых сред для культивирования м.о. (субстратов).

Необходимо иметь в виду, что первые три этапа организации производства отрабатываются параллельно и совместно — выбор объекта, субстрата и конструкции аппарата.

В методических целях можно начать с субстрата и аппаратуры. Поскольку конечный эффект возможен только при условии технической возможности процесса.

Субстраты для культивирования биообъектов

Для обеспечения жизнедеятельности, роста и развития биообъекта с синтезом целевого продукта необходима питательная среда. При этом требования различных м.о. очень разнообразны, как к условиям роста, так и к составу питательной среды. Питательная среда должна содержать все макро- и микроэлементы, необходимые для построения клетки.

Все жизненные процессы протекают в воде. В биотехнологии используется разная вода — артезианская, водопроводная

и из водоемов, после обработки. Вода должна быть биологически чистой, бесцветной, без вкуса и запаха. Имеются ограничения по жесткости — не более 7 мг-экв/л. Ограничивается содержание свинца, цинка, меди и фтора.

Компоненты питательной среды образуют либо истинные, либо коллоидные растворы. Они могут также присутствовать в виде отдельной фазы, в виде суспензий, эмульсий.

Истинные растворы образуют минеральные соли, сахара, аминокислоты, карбоновые кислоты, спирты, некоторые газы (NH_3 , H_2S , частично CO_2).

Коллоидные растворы образуются липидами, белками, некоторыми неорганическими веществами типа $\text{Fe}(\text{OH})_3$.

Взвеси — частицы угля, серы могут распределяться по объему или образовывать придонный слой.

Эмульсии образуются жидкими углеводородами.

Если требуется большое количество газа плохо растворимого в воде (N_2 , O_2 , H_2 , CH_4), целесообразным является метод твердофазного культивирования на твердом сорбенте, когда жидкость лишь смачивает поверхность.

Питательные среды могут быть естественными и иметь неопределенный состав. Это — биогенные вещества (мясной экстракт, кукурузная мука, морские водоросли). Их готовят на водопроводной воде.

Синтетические среды из чистых химических соединений в определенном соотношении готовят на дистиллированной воде или даже на бидистилляте.

Используют также полусинтетические среды.

Компонентный состав сред

Компонентный состав питательной среды зависит от биообъекта.

Автотрофы синтезируют вещества из CO_2 и H_2O с использованием энергии света (фотоавтотрофы) либо химических реакций (хемоавтотрофы). Поэтому они не требуют для своей жизнедеятельности органических веществ, достаточно минеральных солей. Так, для биотехнологического извлечения металлов из руды путем окисления их с помощью м.о. ее просто обливают водой.

Гетеротрофные м.о. разнообразны. Составы субстратов различаются в зависимости от того, к какому типу м.о. они относятся:

- органотрофы — используют органическое вещество (о.в.) как источник энергии;
- литогетеротрофы — используют о.в. как источник углерода;
- органоетеротрофы — используют о.в. как источник углерода и энергии.

Источниками углерода и энергии для продуцентов биотехнологии являются различные спирты и сахара, а также алканы.

В качестве источников азота служат аммонийные неорганические соли и мочевины.

Широко используются универсальные субстраты неопределенного состава — меласса, ячменное сусло, солод, гидролизаты древесины, соломы, сульфитные щелока (продукт сульфитной варки древесной целлюлозы, содержат лигносульфонаты, моносахариды, органические кислоты).

Спрос на мелассу превышает предложение. Поэтому используются другие субстраты. Дешевым и доступным субстратом являются углеводороды нефти. Если их используют для получения пищевого белка или медицинских препаратов, то требуется тщательная очистка от канцерогенных примесей.

Применяются также растительные масла, дрожжевой экстракт, соевая мука.

Большинство бактерий и дрожжевых грибов хорошо утилизируют *n*-алканы с числом *s*-атомов от 10 до 20, источниками которых являются нефть и природный газ.

Ограниченность ресурсов нефти и газа привлекает внимание к другим источникам органического углерода. Это — различные виды растительной массы, получаемой в качестве отходов. Применяются отходы сельского хозяйства, деревообрабатывающей промышленности и бумажной промышленности.

Существует ряд способов переработки растительной массы с получением различных продуктов.

Половину высушенной растительной массы составляет целлюлоза — полисахарид. Гидролиз целлюлозы до сахаров осложняется тем, что она образует комплекс с гемицеллюлозой и лигнином. Они препятствуют доступу реагентов и катализаторов к целлюлозе. Поэтому дополнительно требуется предгидролиз. Предгидролиз заключается в обработке малоконцентрированными растворами кислот (в том числе CO_2) или щелочей с целью удаления гемицеллюлозы. Для отделения лигнина

чаще всего применяют обработку с помощью SO_2 (делигнификация). При этом образуются сульфитные щелока и твердый остаток — предгидролизат.

Для последующего гидролиза целлюлозы применяют концентрированные кислоты и повышенные температуры и давления. Для интенсификации процесса применяют также радиационно-химическую обработку углекислым газом и ферментативный гидролиз целлюлозы. В твердом остатке — лигнин (если не проведена делигнификация).

Отходами предгидролиза являются лигнин с небольшим количеством целлюлозы (целлолигнин) и гемицеллюлозы. Твердый предгидролизат, содержащий лигнин сам используется как субстрат для м.о., разлагающих клетчатку. Лигнин используется для выращивания съедобных грибов (вешенки), а также в составе смесей с птичьим пометом и специальными м.о. для очистки поверхности воды и грунта от нефти и нефтепродуктов.

После дополнительной переработки используется также и растворимая в условиях предгидролиза гемицеллюлоза. Она является смесью, главным компонентом которой служит ксилан (полимер из остатков ксилозы, арабинозы и глюкуроновой кислоты). Он перерабатывается ферментативным гидролизом, а полученный гидролизат используется как источник углеводов при культивировании различных биообъектов. Находит самостоятельное применение в медицине и сама ксилоза.

В современных условиях технология переработки древесины продолжает совершенствоваться¹.

Существует тенденция создания биотехнологических цепочек, когда отходы или побочные продукты одного процесса используют в качестве сырья для другого. Так, на отходах производства этанола получают дрожжи, или биомассу одного вида используют как субстрат для другого.

Возрастает значение твердофазного культивирования, которое значительно упрощает и удешевляет технологию.

Разрабатываются газофазные реакторы с использованием в качестве субстратов нерастворимых в виде газов — H_2 , CH_4 , CO .

¹ Саловарова В. П., Козлов Ю. П. Эколого-биотехнологические основы конверсии растительных субстратов : учеб. пособие. — М. : Изд-во РУДН, 2001.

Процесс культивирования

Так же, как и для химических процессов, биореактор должен обеспечить удобную загрузку субстратов, условия для превращения субстратов, отделение и очистку продукта.

Химико-технологические принципы масштабирования и однородности физико-химических условий соблюдаются и в биотехнологии.

Однако есть и отличия.

Здесь в реакции участвуют живые организмы — клетки и субклеточные структуры, а также выделенные из клеток ферменты. Клетки имеют свой жизненный цикл, их участие в синтезе не может быть сведено к простому изменению концентрации реагирующего химического вещества.

Процессы массопередачи и теплообмена происходят между водной фазой и пузырьками газа или частицами твердого субстрата, между жидкостью и культивируемыми клетками, между слоями жидкости.

Клетки, соединенные в цепочки, нити грибов сильно увеличивают вязкость среды. Жидкость как бы армирована. Для создания перемешивания требуется создать определенное пороговое давление.

Особые требования предъявляются к аэрации — снабжению кислородом. Для этого используют воздух или смесь воздуха с кислородом, реже — чистый кислород. В метаболических процессах выделяется CO_2 , который требуется удалять.

Поэтому реактор снабжается надежными системами газоснабжения и газоотвода — аэраторами, которые должны работать экономично. Поскольку кислород плохо растворим в воде и его запас в жидкости быстро исчерпывается, системы аэрации и перемешивания должны работать слаженно.

Потребность в кислороде зависит от стадии развития культуры. Подачей кислорода можно регулировать скорость процесса.

Для описания процессов происходящих в биореакторе, вводится величина объемного коэффициента массопередачи между газом и жидкостью. Он зависит от характеристик среды культивирования и от конструкции и объема аппарата.

Этот коэффициент увеличивается в случаях:

- внесения в среду биообъекта, поглощающего O_2 ,
- повышения концентрации клеток (интенсифицированный режим),

- применения иммобилизации клеток и их компонентов на носителях.

Коэффициент массопередачи O_2 , необходимый для технических расчетов определяется только прямой регистрацией динамики поступления и поглощения кислорода.

Важной характеристикой процесса является теплообмен, так как биопроцессы идут в узком интервале температур. Причины этого следующие:

- резкий спад активности ферментов по мере снижения температуры;
- необратимая денатурация белков и нуклеиновых кислот при завышенной температуре.

Большинство освоенных процессов протекает при 30—50°C (мезофильная температура). Подогрев применяется редко. Обычно стоит задача удаления избыточной теплоты, выделяемой при жизнедеятельности клеток.

Теплообмен происходит с участием большого количества контактирующих поверхностей, особенно, в аппарате с рубашкой. Система теплообмена должна быть гибкой: на первых этапах роста культуры реактор прогревают, а затем требуется охлаждение.

Для поверхности теплообмена A и межфазной разности температур ΔT количество передаваемой теплоты Q определяется как

$$Q = UA\Delta T,$$

где U — суммарный коэффициент теплопередачи.

Коррозия стенок снижает коэффициент U . С целью повышения движущей силы теплопередачи ΔT целесообразно повысить температуру процесса. Но для этого нужно использовать термофильные м.о. и ферменты.

Серьезной проблемой для аэрируемых процессов является вспенивание или пенообразование. Оно связано с наличием в составе культуральных жидкостей таких ПАВ, у которых неполярные группы выталкиваются в газовую фазу и снижают поверхностное натяжение на межфазной границе.

Пенный слой имеет как положительное, так и отрицательное значение.

В этом слое, как в кислородном коктейле, хорошо растут аэробные м.о. Улучшается массопередача кислорода.

Однако избыточная пена сокращает полезный объем биореактора и создает угрозу заражения культуры посторонней микрофлорой. Поэтому аппараты снабжаются системой пеногашения.

В аппаратах химической технологии не имеет аналога система стерилизации — специфический элемент биореактора.

Принципы асептики биотехнологического производства:

- устранение посторонней микрофлоры из реактора до введения в него штамма-продуцента;
- поддержание чистоты культуры на всем протяжении процесса;
- надежная стерилизация питательных сред, компонентов, титрантов, пеногасителей;
- стерилизация подаваемого в реактор воздуха.

В реакторе должно быть также предусмотрена возможность дифференцировать режим культивирования — проводить разные этапы одного и того же процесса в разных условиях по температуре, давлению и пр.

Более подробно типовые приемы конструирования биореакторов будут рассмотрены ниже, после рассмотрения методики подготовки биообъектов и влияния различных факторов на особенности их жизнедеятельности.

2.3. Типовые приемы и методы подготовки биообъектов

Главным объектом, центром биотехнологического процесса является клетка. Именно в ней синтезируется целевой продукт. Клетка работает с огромной производительностью по конкретной заданной программе и синтезирует сложнейшие соединения, в первую очередь белки.

Независимо от природы объекта — клетки или ткани — на начальном этапе разработки получают чистую культуру клеток или тканей. Все дальнейшие манипуляции представляют собой единообразные классические методы микробиологии.

Выбор микроорганизмов

В настоящее время известно около 100 тыс. различных м.о. Поэтому правильный выбор продуцента конкретного вещества (витамин В₁₂, треонин, эритромицин или метан) – непростая задача.

Первый путь: вначале проводится выделение м.о. — путем отбора проб из тех мест, где их обитание наиболее вероятно.

Угледородоокисляющие м.о. можно найти возле бензоколоннок, целлюлозоразлагающие и метанобразующие — в рубце жвачных животных. Пробы вносят в жидкие питательные среды, называемые элективными. В них путем варьирования разных факторов создаются условия развития нужного продуцента: источники энергии, углерода, азота, значения рН, температуры, осмотическое давление и т. д. Если требуется получить холестериноксидазу, то единственным источником углерода в питательной среде должен быть холестерин, для угледородоокисляющих — среды с парафином, для продуцентов липолитических ферментов — липиды и т. д. Таким образом получают накопительные культуры м.о.

После этого выделяют чистые культуры. Для этого используют плотные питательные среды, на которые засевают образцы проб из накопительных культур.

На плотных питательных средах отдельные клетки м.о. образуют изолированные колонии. При последующем пересеве получают чистые культуры продуцента, которые состоят из популяций клеток одного вида.

Второй путь: подбор из имеющихся коллекций м.о. При этом пользуются имеющимся опытом: продуцентов антибиотиков находят среды актиномицетов; внеклеточные ферменты получают из грамположительных бактерий и т. д.

Кроме важнейшего свойства продуцировать заданное вещество м.о. должны удовлетворять следующим требованиям:

- обладать высокой скоростью роста,
- использовать недорогие субстраты,
- быть устойчивыми к заражению посторонней микрофлорой.

Все одноклеточные м.о. характеризуются высокой скоростью синтеза: корова массой 500 кг в сутки синтезирует 0,5 кг белка. Столько же можно получить с помощью 5 г дрожжей.

Есть только один вид малоизученных олиготрофных микроорганизмов, которые растут очень медленно. Но они представляют интерес как продуценты различных веществ.

Очень перспективными м.о. являются фотосинтезирующие — фототрофы. Они восстанавливают CO_2 и окисляют воду (цианобактерии и эукариоты) и способны усваивать атмосферный азот.

С помощью этих м.о. можно получать аммиак, водород, белки и различные биопрепараты. С применением методов генной инженерии в перспективе на основе фототрофов можно создать технологии биоконверсии солнечной энергии.

Выгодным объектом являются также термофильные м.о. Они растут при температуре 60—80°C, а некоторые — до 110°C и выше. Их можно найти в горячих выбросах сверхгорячих вод на больших океанических глубинах. При культивировании таких м.о. нет опасности развития посторонней микрофлоры. Термофилы могут продуцировать спирты, аминокислоты, ферменты, молекулярный H_2 . Дополнительно снижаются затраты на стерилизацию оборудования. Эти м.о. обладают высокой скоростью роста и синтеза продуктов. Получаемые ферменты также устойчивы к высокой температуре, но неактивны при 20—45°C. Низкие температуры оптимальной активности ферментов характерны для мезофилов.

Ферменты, синтезированные термофилами, устойчивы не только к нагреванию, но и к действию окислителей, детергентов, органических растворителей и др. Активность протеазы *Thermus caldophilus* при 20°C почти в 100 раз ниже, чем при 75°C.

Еще одно преимущество связано с затратами на охлаждение биореакторов. Большой перепад температур между рабочим пространством ферментера и теплоносителем в системе охлаждения способствует лучшей теплоотдаче. Это упрощает конструкцию, снижает габариты установки в целом при сохранении ее производительности. Упрощается обслуживание ферментера, организация барботажа, пеногашения и перемешивания.

Селекция

Селекция — это направленный отбор мутантов, т. е. организмов, у которых наследственность претерпела скачкообразное изменение. Эти изменения являются следствием структурной модификации последовательности нуклеотидов в ДНК.

Методика селекции развивается в направлении от слепого отбора к направленному конструированию геномов.

Тем не менее метод спонтанных мутаций сыграл большую роль: были отобраны для культивации производительные штаммы пивных и винных дрожжей, пекарских дрожжей, а также уксуснокислых, пропионовокислых бактерий и др.

Отбор проводится ступенчато: на каждом этапе выбираются самые высокопродуктивные клоны. Мутации происходят редко: одна происходит после того как ген удвоится $\sim 10^6$ — 10^8 раз. Таким образом, метод можно усовершенствовать.

Высокие плотности популяции $\sim 10^9$ клеток в 1 мл суспензии в большом объеме при непрерывном культивировании позволяет получить достаточное количество мутантов.

Разработан метод повышения устойчивости м.о. к самым различным факторам — кислотам, щелочам, ионам тяжелых металлов и др. Метод заключается в непрерывной подаче ингибирующего фактора в биореактор в процессе культивирования. При этом получают резистентные мутанты в концентрации до 10 %.

Увеличения числа мутаций можно добиться методом индуцированного мутагенеза. Он заключается в искусственном повреждении генов с помощью ультрафиолетового рентгеновского и γ -излучения, а также некоторых химических соединений — азотистой кислоты, алкилирующих веществ (этилметансульфонат, нитрозамины), некоторые красители и др.

После проведения мутагенной обработки, делают проверку (скрининг) полученных клонов и отбирают самые продуктивные. Затем процедуру повторяют ступенчато.

Этот метод очень трудоемок, процесс ведется вслепую, по конечному результату. Знание характера мутации позволяет усовершенствовать методику.

Рассмотрим сущность понятия «характер мутации».

В конкретном примере получения штаммов, устойчивых к тяжелым металлам, возможны такие виды мутации:

- подавление системы поглощения катионов металлов бактериальной клеткой;
- активация выброса поглощенных катионов из клетки;
- перестройка систем, чувствительных к ингибирующему действию тяжелых металлов.

Теоретическая база направленной селекции была разработана в рамках молекулярной генетики.

Молекулярная генетика явилась базой разработки методов отбора по устойчивости продуцента к структурным аналогам продукта.

Классификация микробиологических продуктов

Имеющие практическое значение продукты жизнедеятельности клеток очень разнообразны.

1. Целевым продуктом могут быть клетки. Их используют как биомассу для получения кормового белка.

2. Клетки микроорганизмов, особенно в иммобилизованном состоянии могут служить катализаторами процессов биотрансформации. Так называются реакции превращения исходных соединений (предшественников) в целевой продукт с помощью клеток живых организмов либо ферментов, выделенных из них (аминокислоты, антибиотики, стероиды и др.).

3. Продуктами могут быть макромолекулярные соединения — белки, ферменты, полисахариды, полиэферы, выделенные из культивированных м.о. и тканей.

4. Низкомолекулярные продукты метаболизма, выделенные в субстрат. Они делятся на первичные и вторичные. Первичные необходимы для роста и развития клеток — аминокислоты, нуклеотиды, моносахариды, витамины, коферменты и др.

Вторичные метаболиты не требуются для выживания и образуются по завершении фазы роста (рис. 2.2).

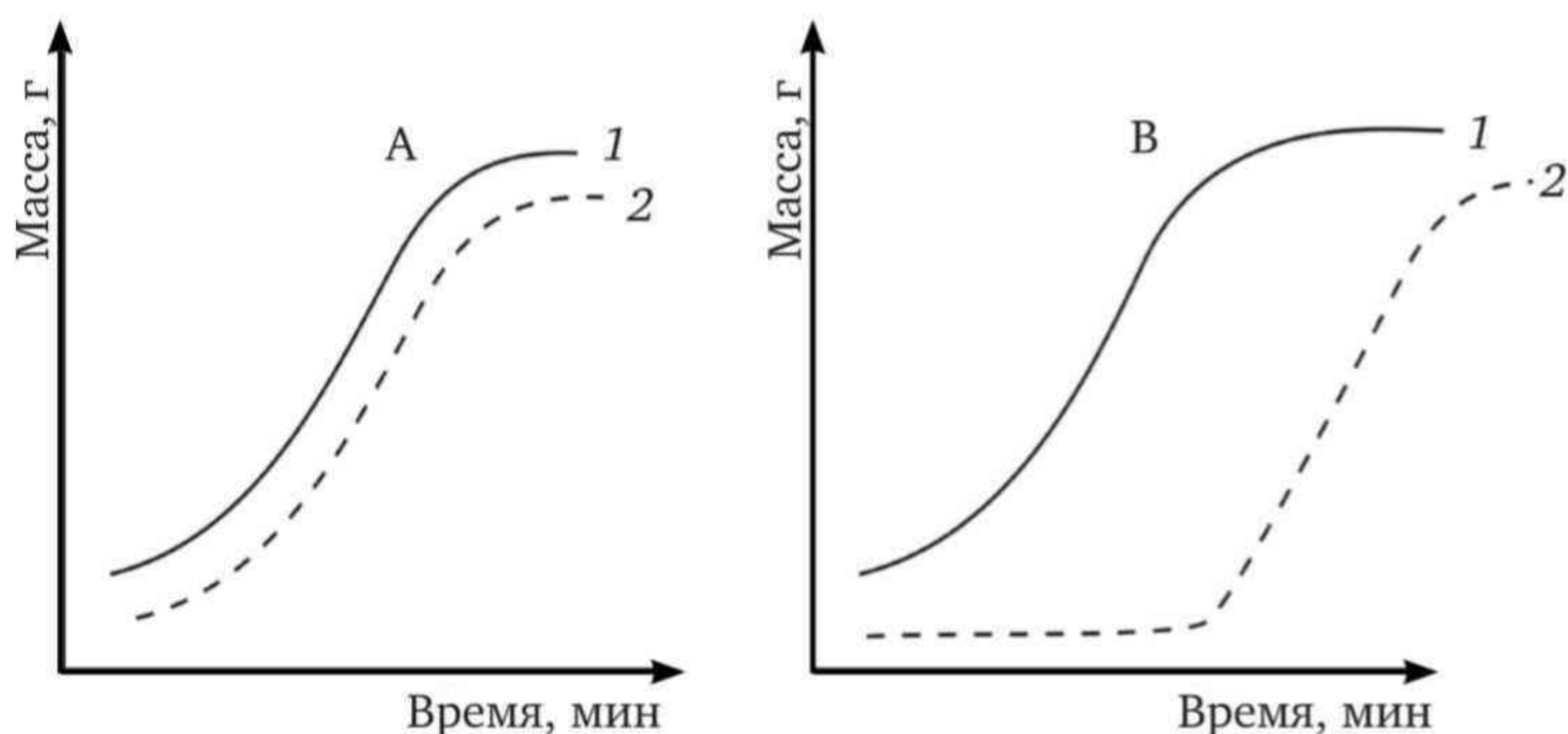


Рис. 2.2. Динамика изменения биомассы и образования первичных (А) и вторичных (Б) метаболитов в процессе роста организма:

1 — биомасса; 2 — продукт

Регулирование клеточного метаболизма

Принцип обратной связи. В 1984 г. В. Г. Дебабов сформулировал экспериментально установленный принцип *обратной связи* для регуляции деятельности ферментов в биосинтезе, как конечных, так и промежуточных продуктов метаболизма. Согласно этому принципу повышение концентрации какого-либо метаболита может иметь два последствия:

1) ингибирование активности энзима, который участвует в синтезе метаболита;

2) репрессия синтеза этого энзима (он перестает синтезироваться).

Схема принципа обратной связи для синтеза конечного продукта метаболизма показана на рис. 2.3.



Рис. 2.3. Схема негативной регуляции биосинтетического пути конечным продуктом:

A, B, C, D — продукты реакций, катализируемых энзимами E_A , E_B , E_C , E_D .

Так, при наличии глюкозы и ионов NH_4^+ клетки синтезируют все необходимые азотосодержащие вещества. Однако если добавить в субстрат какую-либо аминокислоту, то синтез этой кислоты быстро прекращается в результате ингибирующего действия продукта.

Одновременно клетки нуждаются в целевом продукте. Поэтому желаемый эффект можно получить с применением аналогов конечного продукта.

Добавление в субстрат структурного аналога метаболита вызывает такой же эффект, как и повышение концентрации метаболита. Такой аналог не может заменить метаболит, например, войти в состав белка. Поэтому рост нормальных клеток подавляется из-за голода по целевому продукту.

Некоторые конечные метаболиты и их аналоги:

L-аргинин	D-аргинин
L-гистидин	L-тиазолаланин
L-лейцин	L-валин
L-триптофан	5-метилтриптофан

В обоих способах (повышение концентрации метаболита и добавление структурного аналога) выживают лишь некоторые мутанты с нарушенной регуляцией активности и синтеза фермента.

Для получения сверхпродуцентов, которые синтезируют продукт в аномально высокой концентрации, нужны мутанты со следующими свойствами:

1) энзим EA сохранил функциональную активность, но потерял по каким-либо причинам чувствительность к ингибирующему действию конечного продукта или его аналога;

2) синтез энзима EA устойчив к избытку продукта или его аналога.

Если требуется накапливать не конечный, а *промежуточный* продукт биосинтеза (см. рис. 2.2), то блокируется этап синтеза, следующий за интермедиатом. Схема блокирования показана на рис. 2.4.

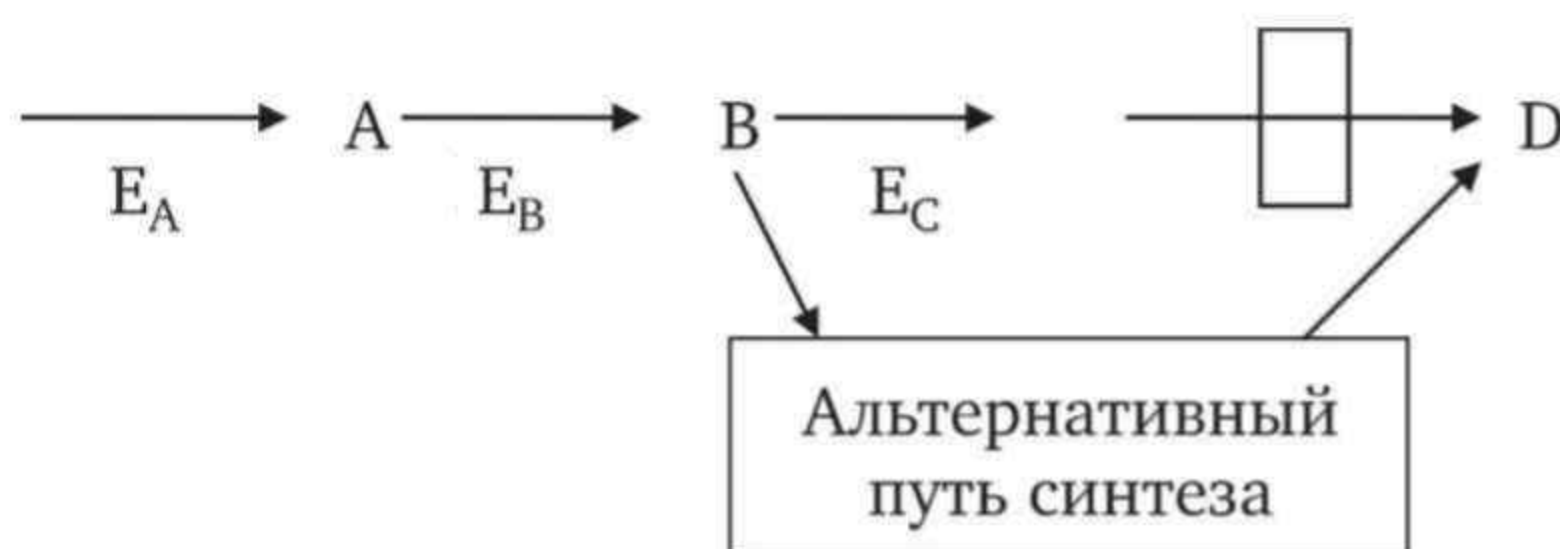


Рис. 2.4. Схема блокирования промежуточной реакции биосинтетического пути с целью получения сверхпродукта

Такой мутант *ауксотрофен*, он растет только при добавлении в субстрат такого вещества, которое служит продуктом блокированной реакции. Однако возможны компенсирующие (супрессорные) мутации, которые создают альтернативные пути синтеза нужных для м.о. соединений.

Обратная, или возвратная, мутация называется реверсией, а образовавшийся организм или клетка — ревертантом.

Ревертировавшие до дикого типа особи не нуждаются в добавлении вещества D (продукта блокированной реакции), но осуществляет сверхсинтез вещества C (которое уже не является необходимым интермедиатом).

В тех случаях синтеза промежуточных метаболитов, когда механизм обратной связи нарушается, и происходит «обход» механизма ретроингибирования (схема на рис. 2.4) эффективно используются аналоги метаболитов.

Если субстрат содержит аналог (метаболит, который не включается в обмен веществ и оказывает токсическое действие), рост организма на стадии обхода подавляется, и в среде накапливается еще большее количество промежуточного метаболита C (см. рис. 2.4).

Таким путем — добавлением токсичного структурного аналога метаболитов, участвующих в альтернативном пути био-

синтеза, была селекционирована морковь, клетки которой синтезировали в 20 раз больше метионина — незаменимой а.к.

При блокировании промежуточной реакции биосинтеза ауксотрофами становятся прототрофы — м.о., синтезирующие все вещества, необходимые для их развития.

В некоторых случаях решается обратная задача — переход от ауксотрофов к прототрофам.

Например, растительные клетки (эукариоты) не могут расти без фитогормонов (ауксины, цитокинины); эти клетки по существу являются ауксотрофами. Однако удалось выделить клоны, которые синтезируют природный гормон типа ауксина. Некоторые мутантные клетки синтезируют второй гормон роста — цитокинин. Такие (уже прототрофные) клетки размножаются бесконтрольно подобно раковым опухолям и являются источником очень ценных соединений.

Теория обратной связи в настоящее время дополнена рядом новых представлений о способах регулирования внутриклеточного метаболизма. Они появились в ходе исследований метаболических процессов на молекулярном и генном уровнях. Установлена роль веществ-индукторов, а также низкомолекулярных аффлекторов; развиты представления о катаболитной репрессии.

Общая теория регулирования процессов внутриклеточного метаболизма. Общая теория регулирования метаболизма включает объяснение, как процессов непосредственного ингибирования деятельности энзимов, так и других приемов воздействия.

В норме все процессы обмена веществ уравновешены, отрегулированы. Для обеспечения сверхсинтеза какого-либо продукта метаболизма требуется нарушение регуляторных систем либо изменение генетической программы.

Изучение механизмов обмена веществ позволяет создавать организмы-сверхпродуценты и сознательно управлять процессами биосинтеза.

Координация любых химических превращений, которые обеспечивают метаболизм, осуществляется следующими основными путями:

- регуляцией активности энзимов, в том числе, путем ингибирования по принципу обратной связи; для этого варианта ингибирования принят термин «ретроингибирование»;
- регуляцией объема синтеза ферментов методами индукции и репрессии биосинтеза и методом экспрессии;

- регуляцией объема синтеза ферментов с использованием катаболитной репрессии.

Регуляция *активности энзимов* по механизму ретроингибирования заключается в том, что низкомолекулярные метаболиты передают информацию об уровне своей концентрации и состоянии обмена веществ ключевым ферментам. Ключевые ферменты регулируют периодичность в процессе функционирования необходимого для синтеза энзима E_A (см. схему на рис. 2.3). Эти к.ф. являются *аллостерическими* белками, а конечные метаболиты в этом случае являются соответственно активаторами и ингибиторами (аффекторами). Таким образом, происходит саморегулирование биосинтеза. Таков же механизм действия аналогов метаболитов.

Регулирующими воздействиями на *объем синтеза* энзимов являются индукция (А), репрессия (Б), экспрессия (В), а также катаболитная репрессия.

А. Установлено, что не все энзимы синтезируются постоянно (т. е. не все являются конструктивными, необходимыми для жизнедеятельности м.о.). Некоторые появляются только при появлении в среде так называемых индукторов. Индукторами могут быть как субстраты, так и их аналоги. Например, при добавлении β -галактозида лактозы в раствор, где культивируется *E. coli*, происходит мгновенное появление нового энзима — β -галактозидазы.

Регуляция объема биосинтеза фермента происходит на оперонном (см. приложение) уровне путем изменения количества иРНК.

При *индукции* метаболит-индуктор соединяется с продуктом гена-регулятора (репрессорный белок) и инактивирует его, создавая препятствие для взаимодействия этого белка с соответствующей зоной оператора. В результате к промотору присоединяется ДНК-полимераза и происходит активация синтеза иРНК.

Активируется синтез продукта биосинтеза.

Б. Конечные метаболиты в ряде случаев *тормозят* биосинтез энзимов. В этом случае увеличивается количество многих первичных метаболитов. Этот феномен называется репрессией.

Ингибитор-репрессор (конечный метаболит) переводит репрессорный белок в активную форму, которая оккупирует оператор (зона первоначального связывания РНК-полимеразы).

Энзимы, синтез которых таким образом подавляется, называются репрессибельными.

Репрессия является более грубым методом по сравнению с ретроингибированием, так как при этом нарушается передача наследственной информации.

Если одновременно с репрессией синтеза энзима концентрация конечного продукта уменьшается до определенного достаточно низкого уровня, то происходит дерепрессия, скорость биосинтеза возрастает.

В. В ответ на изменение окружающей среды: стресс, голодание, действие фагов клетки могут синтезировать различные низкомолекулярные аффлекторы. Они взаимодействуют с определенными регуляторными белками, моделируя специфичность РНК-полимеразы. При этом запускается экспрессия определенного набора генов.

Катаболитная репрессия. Если в питательной среде имеется несколько источников углерода, клетка вырабатывает ферменты для предпочтительного усвоения одного из них, например, глюкозы. Только после полного расходования глюкозы происходит экспрессия ферментов метаболизма другого источника углерода, например лактозы. Это явление называется катаболитной репрессией (в данном случае репрессией ферментов усвоения лактозы глюкозой).

Белок-активатор катаболитных генов (БАК) формирует необходимый комплекс только в отсутствие глюкозы. Этот комплекс связывает РНК-полимеразу с соответствующей зоной промотора и начинается транскрипция генов трех ферментов, X, Y и A, контролирующих метаболизм лактозы в клетке.

В отсутствие комплекса ген-оператор связан с белком-репрессором.

Присутствие глюкозы подавляет образование необходимого комплекса.

Влияние регулирующих воздействий на результаты селекции

На основании сказанного выше можно заключить, что дефекты в регуляции обмена веществ обеспечивают синтез целевых продуктов тремя способами.

1. Изменение структуры аллостерического центра делает молекулу энзима нечувствительной к избытку целевого продукта. Идет сверхсинтез этого продукта.

2. Если изменяется нуклеотидная последовательность в зоне гена-регулятора, то его продукт — белок-репрессор

теряет способность связываться, либо с индуктором, либо с оператором. Исчезает эффект катаболитной экспрессии: способность усваивать данный субстрат уже не зависит от присутствия в питательной среде другого — мешающего и легче усваиваемого субстрата (индуцибельные ферменты становятся конститутивными).

Мутанты с дефектами регуляторной области оперона называются *регуляторными*. Они также обеспечивают сверхсинтез продукта.

3. Если в результате мутации происходит разрыв последовательности цепи биохимических реакций, в среде накапливается промежуточный целевой метаболит, использование которого заблокировано.

Такой мутант ауксотрофен, он растет только при добавлении в питательную среду такого вещества, которое служит продуктом заблокированной реакции.

Однако возможны компенсирующие (супрессорные) мутации, которые создают альтернативные пути синтеза нужных соединений.

Такая обратная мутация называется реверсией, а образовавшийся организм — ревертантом (см. выше).

К параграфу 2.3 см. приложение, термины «оперон», «оператор», «промотор».

2.4. Иммобилизация ферментов и клеток

Словом «иммобилизация фермента» обозначают как разновидность самого явления, или состояния, так и процесс получения или осуществления желаемого конечного состояния биокатализатора. Поэтому предлагается использовать, хотя и не принятое в литературе, но более понятное для восприятия слово «иммобилизованность».

Одним из ведущих направлений современной биотехнологии является производство ферментных препаратов — биологических катализаторов. Для получения ферментов используются разные природные объекты — проросшее зерно, сок зеленой массы растений, отдельные ткани и органы животных (поджелудочная железа, слизистая оболочка желудочно-кишечного тракта и пр.).

Технология ферментных препаратов микробного происхождения — наиболее сложная.

Без этих веществ невозможно решение ряда проблем по охране окружающей среды, в пищевой и медицинской промышленности. Однако развитие прикладной энзимологии долгое время сдерживалось дороговизной чистых ферментных препаратов, неустойчивостью при хранении и невозможностью многократного использования. В решении этих задач важную роль играет разработка способов получения и использования иммобилизованных ферментов.

Иммобилизованными ферментами называются ферменты, искусственно связанные с нерастворимым носителем, но сохраняющие свои каталитические свойства.

Первым достижением в этой области было связывание сахарозы, но уже в 1916 г. Дж. Нельсон и Е. Гриффин показали, что сахароза при этом сохраняет каталитическую активность.

В настоящее время под термином «иммобилизация» понимают все формы полного или частичного ограничения свободы движения белковых молекул.

Перечислим преимущества иммобилизованных ферментов:

1) являясь гетерогенными катализаторами, они легко отделяются от реакционной среды, могут использоваться многократно и обеспечивают непрерывность каталитического процесса;

2) появляются новые свойства фермента: субстратная специфичность, устойчивость, зависимость активности от параметров среды;

3) иммобилизованные ферменты долговечны и в тысячи и десятки тысяч раз стабильнее свободных энзимов. Замедлена термоинактивация.

Все это объясняет высокую эффективность и конкурентоспособность технологий, использующих иммобилизованные ферменты.

2.4.1. Приемы создания иммобилизованного состояния, или иммобилизованности

Принципы иммобилизации изолированного фермента распространяются на клетки и их органеллы как полиферментные системы.

Для иммобилизации ферментов (клеток, органелл) применяются носители, придающие состояние малоподвижности (рис. 2.5).

Идеальный носитель должен обладать такими свойствами, как:

- нерастворимость;
- высокая биологическая и химическая стойкость;
- значительная гидрофильность;
- достаточная проницаемость, как для ферментов, так и для коферментов, субстратов и продуктов реакции;
- способность носителя легко активироваться.

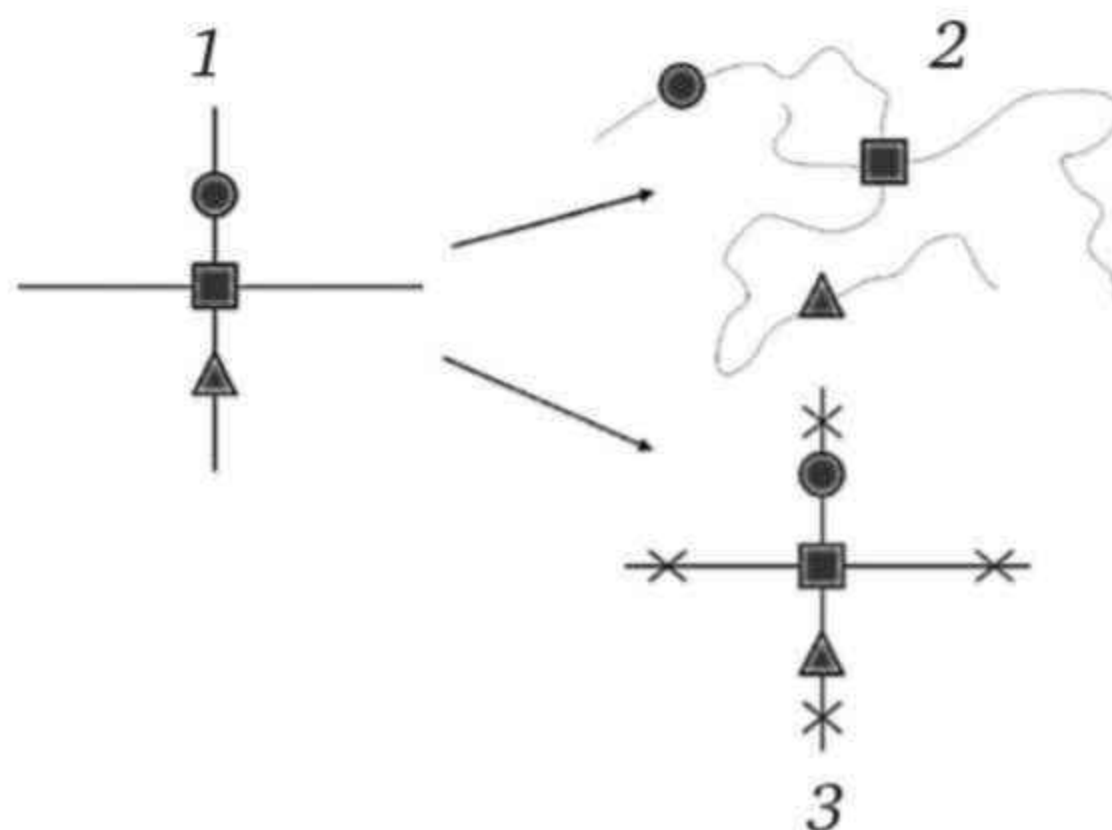


Рис. 2.5. Схема иммобилизации молекулы фермента:

1 — активный фермент; 2 — изменения, приводящие к потере активности; 3 — стабилизация фермента путем иммобилизации.

Носители по химической природе делят на органические и неорганические.

Органические носители можно разделить на два класса: природные и синтетические. Эти классы делятся на группы:

- природные полимеры — белковые, полисахаридные, липидные;
- синтетические — полиметиленовые, полиамидные и полиэфирные.

Преимуществами *природных* носителей являются доступность, полифункциональность, гидрофильность.

Недостатки — биodeградируемость и высокая стоимость.

Из полисахаридов чаще используют целлюлозу, декстран (полисахарид из 2-D-глюкопиранозы, содержащий 1—3, 1—6 и 1—2 связи), агарозу и их производные. Линейные цепи целлюлозы и декстрана сшивают эпихлоргидрином. В полученные ячейки вводят ионогенные группы.

Крахмал «сшивают» формальдегидом, глиоксалем, глутаровым альдегидом.

Из природных аминсахаридов применяются хитин — отход переработки крабов и креветок. Он химически стоек, обладает пористостью.

Белковыми носителями служат структурные протеины — кератин, фиброин, коллаген и желатин (продукт переработки коллагена).

Эти белки распространены, дешевы и доступны, очень функциональны (имеют большие возможности связывания). Они способны к биodeградации (для медицинских целей — это хорошо). Недостатком является высокая иммуногенность.

Синтетические полимеры очень разнообразны и доступны. Используются очень широко. Это — полимеры стирола, акриловой кислоты, поливинилового спирта, полиамидные и полиуретановые. Большинство — механически прочные, имеют регулируемую пористость, могут присоединять разные функциональные группы. Могут производиться в разных формах (трубы, волокна, гранулы).

Из *неорганических* носителей применяют материалы из стекла, глины, керамики, графитовой сажи, силикагеля, силухромов, оксидов металлов. Они химически модифицируются с помощью пленок оксидов Al, Ti, Hf, Zr, а также органическими полимерами.

2.4.2. Методы и способы осуществления иммобилизации

Существует два принципиально разных технологических метода придания ферменту состояния иммобилизованности — физический (без образования ковалентных связей) и химический (с образованием связей).

Перечисленные методы имеют разновидности.

Физические методы

К физическим методам относятся адсорбция фермента на нерастворимом носителе, включение энзимов в поры поперечно-сшитого геля, в полупроницаемые структуры и в двухфазные системы (рис. 2.6).

Адсорбция на нерастворимых носителях. При адсорбции молекула удерживается на поверхности электростатическими, гидрофобными и дисперсионными взаимодействиями и водородными связями. Это был первый метод, но он не потерял своего значения и широко используется.

Описана иммобилизация более 70 ферментов на кремнезем, активированном угле, графитовой саже, глине, пористом стекле, полисахаридах, синтетических полимерах, оксидах алюминия, титана и других металлов.

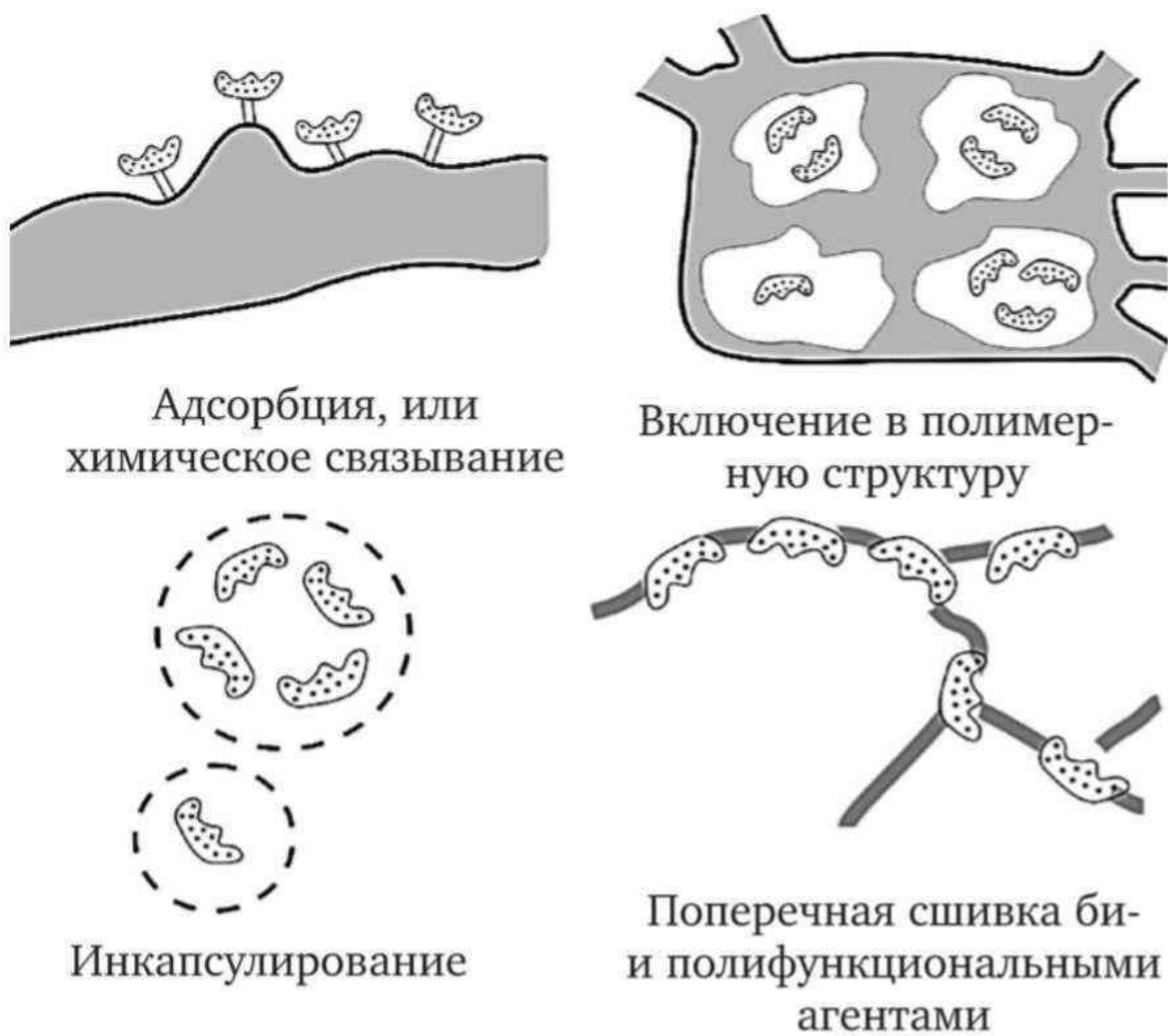


Рис. 2.6. Методы иммобилизации биокатализатора

Эффективность зависит от плотности центров сорбции и пористости носителя. Технология очень проста: раствор фермента смешивают со свежим осадком и высушивают. Активность фермента сохраняется на 100 %, а концентрация — до 64 г на 1 г носителя.

Недостатком является невысокая прочность связывания. Это приводит к потерям и загрязнению. Для улучшения адсорбции применяют обработку поверхности, например, полимерами, белками, липидами, и модификацию молекулы фермента.

Включение в гель. Этот способ прост и уникален. Пригоден, как для индивидуальных ферментов, так и для мультиэнзимных комплексов, а также для клеток.

Существует два приема осуществления метода.

1. Фермент вносят в водный раствор мономера, который затем полимеризуют. Образуется пространственная структура полимерного геля с включенными в его ячейки молекулами фермента (гели полиакриламида, поливинилового спирта, силикагеля и др.).

2. Фермент вносят в раствор готового полимера, который затем переводят в гель (крахмал, агар-агар, фосфат кальция, агароза и др.).

В этом методе происходит равномерное распределение энзима в объеме носителя. Полученные матрицы обладают прочностью, а также химической и биологической стойкостью.

Однако метод непригоден для воздействия на водонерастворимые субстраты.

Иммобилизация ферментов в полупроницаемые структуры.

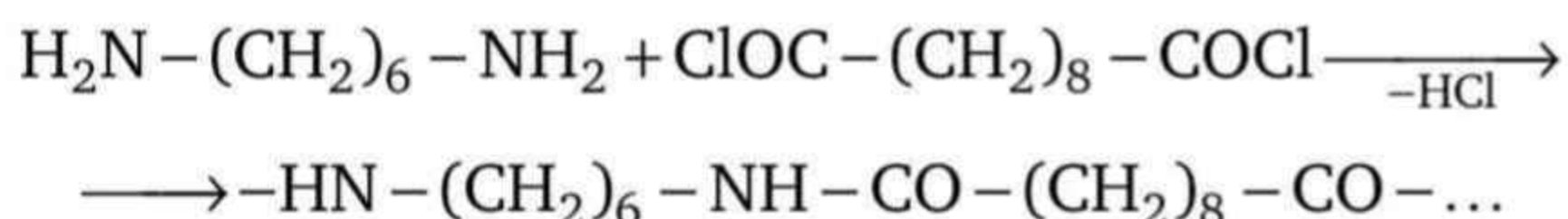
А. Метод заключается в разделении высокомолекулярного фермента и раствора низкомолекулярного субстрата и кофакторов с помощью полупроницаемой мембраны. Мембрана задерживает только крупные молекулы фермента.

Две разновидности:

- микрокапсулирование;
- включение фермента в липосомы.

Первый способ заключается в создании микрокапсул с полупроницаемыми стенками. Водный раствор фермента находится внутри.

Мембрана образуется из двух соединений: одно находится в водной фазе (например, водный раствор гексаметилендиамина — 1,6), а другое — в органической фазе (галогенангидрид себаценовой кислоты):



Толщина мембраны (δ) составляет сотые доли мкм, размеры капсулы — десятки и сотни мкм.

Метод непригоден для работы энзима с высокомолекулярными субстратами.

Б. Близким к инкапсулированию является метод включения водных растворов фермента в липосомы — системы двойных липидных слоев. Для этого раствор липида (лецитин) упаривают и получают пленку. Пленку диспергируют в водном растворе фермента.

Метод применяется для медицинских научных целей при изучении процессов, протекающих в клетке.

Химические способы иммобилизации

Это наиболее массовый способ получения промышленных биокатализаторов.

Носитель может обладать:

- гидроксильными группами,
- аминогруппами,
- карбоксильными,
- сульфгидрильными.

Схема метода показана на рис. 2.7.

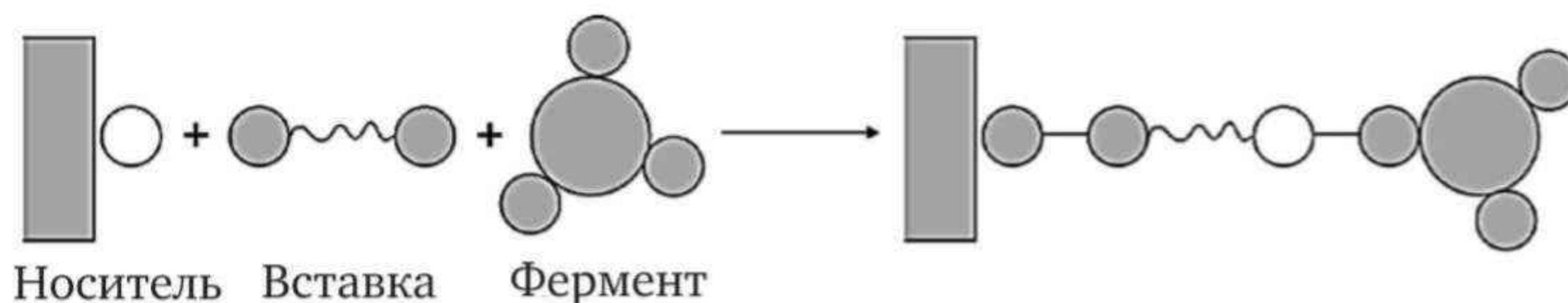
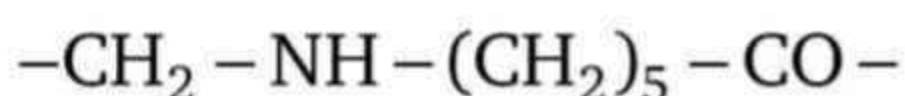


Рис. 2.7. **Схема химического метода иммобилизации**

Вставка (сшивка, спейсер) выводит фермент из микроокружения носителя.

Например, для выведения галактозилтрансферазы применяют последовательность



В иммобилизации фермента не должны участвовать группы, которые существенны для его каталитической функции.

Эти методы сложные, дорогие и не находят широкого промышленного применения. Используются, в основном, в лабораторных исследованиях.

2.4.3. Проблемы иммобилизованных биокаталитических систем разных типов

Изолированные ферменты

Использование иммобилизованных систем очень затрудняется правильным выбором способа иммобилизации, при котором биокатализатор не терял бы активность и был достаточно дешев. Проблем здесь несколько. Прежде всего, необходимо получить изолированные ферменты. Нужно выделить их из природного источника и очистить. Этот этап — самый трудный.

Самыми дешевыми получаются ферменты из микроорганизмов, культур животных, растительных и грибных клеток. Самые дорогие — из тканей крупного рогатого скота и сельскохозяйственных культур.

Полученный изолированный фермент стабилизируют путем соиммобилизации.

Во всех методах иммобилизации фермент закрепляют в рабочей конформации, препятствующей денатурационным перестройкам. Таким образом, обеспечивается стабильность фермента при хранении и функционировании, устойчивость к воздействиям повышенной температуры, экстремальных pH и органических растворителей. Известно, что ди-, три- и тетрамеры ферментов, полученные путем сшивок, более термостабильны, чем мономеры.

В случае денатурации иммобилизованный фермент возвращается в исходное состояние, т. е. ренатурирует очень быстро. Часто каталитическая активность после денатурации восстанавливается самопроизвольно, хотя и требует длительного лаг-периода (индукционного). В течение этого периода молекула принимает разные конформации до тех пор, пока не найдет кратчайший путь к функционально активному состоянию.

Высказано мнение [6], что синтезированные в клетке полипептиды быстро принимают рабочую конформацию благодаря естественной иммобилизации на рибосомах.

Иммобилизованные ферменты, каждый привязанный к своему месту, разобщены. Поэтому они не агрегируют и не теряют активность. Если ферменты включены в микрокапсулы, они не подвержены действию микроорганизмов. Поэтому иммобилизация является способом длительного хранения энзимов. Многочисленные исследования показали, что иммобилизованные ферменты сохраняют каталитическую активность лучше, чем в свободном состоянии [8].

Однако в случае неудачного выбора метода происходит не только дестабилизация, а разрушение структуры.

Перспективно применение комбинации методов. Например, связывание с водорастворимым полимером с последующим пришиванием к кремниевому носителю препарата целлобиозы.

Наряду со стабилизацией часто наблюдается снижение активности фермента. Случаи полного сохранения активности и тем более дополнительной активации крайне редки. Это объясняется искажением структуры и затруднением доступа кофакторов и субстратов.

Изменение функциональных свойств изолированного фермента при иммобилизации. На характеристики фермента при иммобилизации влияет микроокружение, определяемое

носителем. Поперечная сшивка молекул химотрипсина гидросукцинимидом приводит к сдвигу изоэлектрической точки от $pH = 8$ до $pH = 5$, и изменению других параметров.

Все эти изменения могут иметь как положительное, так и отрицательное значение.

Иммобилизацией фермента на анионном либо катионном полиэлектролите можно добиться сдвига оптимального pH либо в кислую либо в щелочную сторону. Для сахарофосфолипазы при ее иммобилизации происходит расширение оптимальной зоны pH .

Иммобилизация приводит к снижению активности ингибиторов. Причиной является затрудненный доступ ингибиторов к ферменту. Это касается высокомолекулярных ингибиторов.

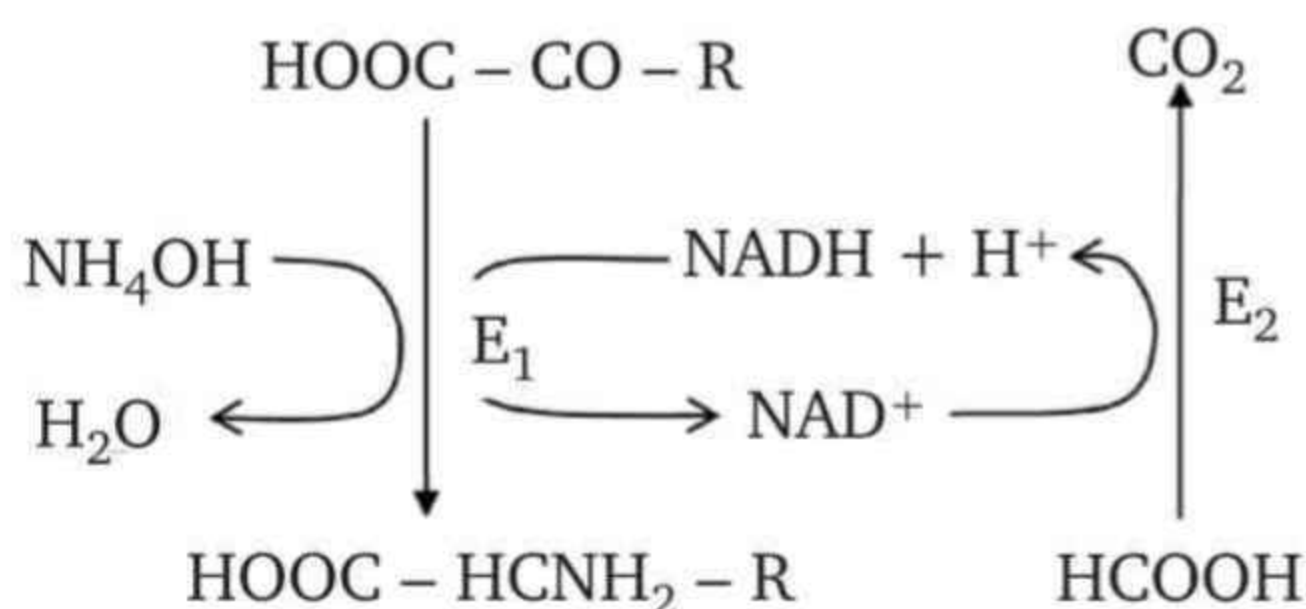
Известны даже случаи повышения устойчивости иммобилизованного фермента к низкомолекулярным ингибиторам. Иммобилизация L-аланинаминотрансферазы на коллагеновой мембране приводит к снижению ингибирующей активности двухвалентных ионов.

Практическое значение имеет тот факт, что водорастворимым ферментам при иммобилизации можно придать способность функционировать в неводной среде. Этому способствует способность носителя удерживать в себе воду.

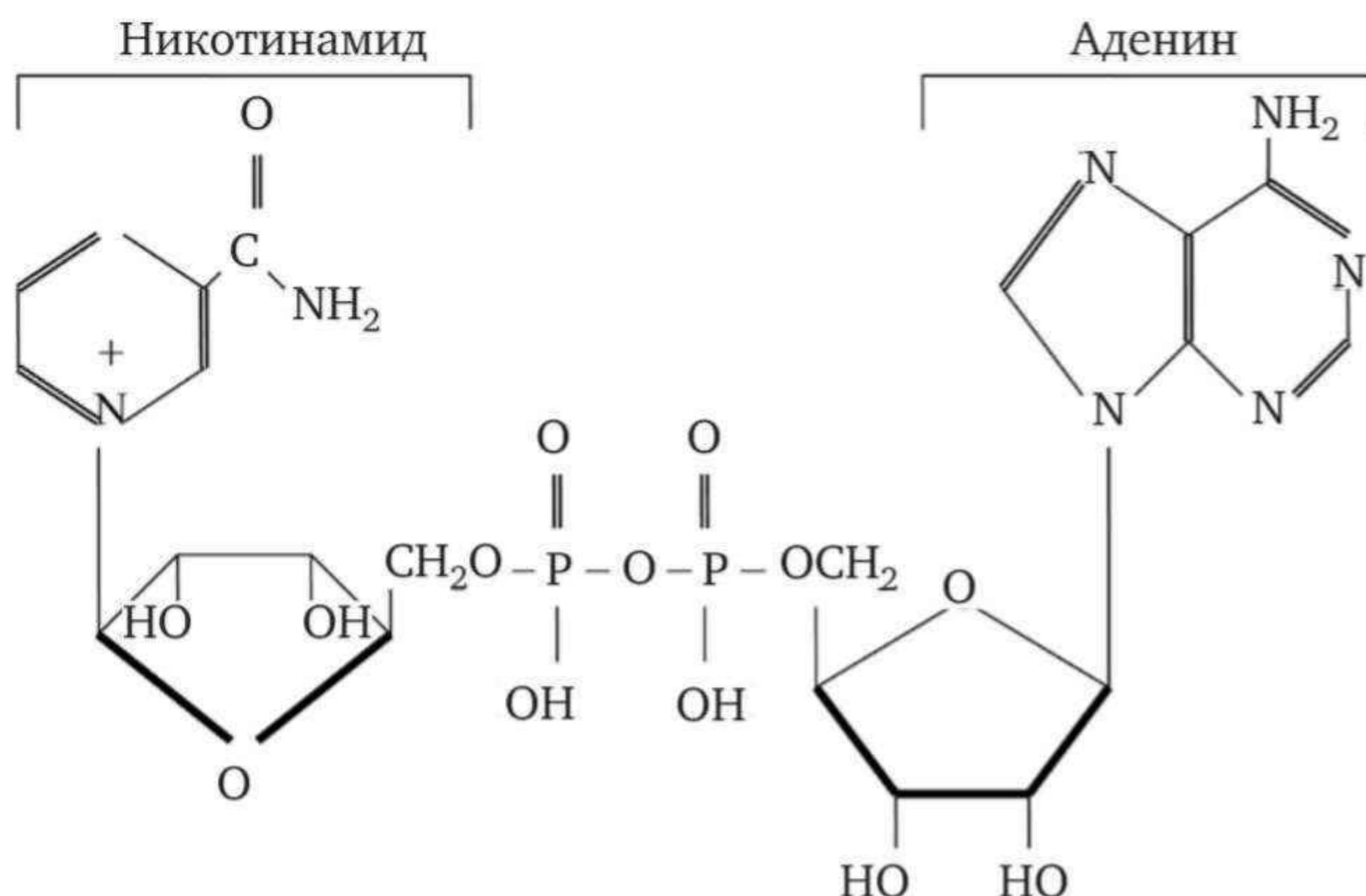
Проблема регенерации кофакторов. Одностадийные реакции, не требующие кофакторов, относятся к процессам первого поколения: превращение глюкозы во фруктозу, гидролиз лактозы и др.

Процессы второго поколения являются многостадийными. Они зависят от разных кофакторов.

Примером является получение L-аминокислот из кетокислот:



Протекание этой реакции зависит от участия в ней кофермента NADH (никотинамидадениндинуклеотид NAD^+) $\text{R}=\text{H}$:



Пополнение фонда NADH достигается окислением формата до CO_2 . Здесь E_1 и E_2 — соответственно дегидрогеназы кетокислот и формата.

Растворимые кофакторы уносятся током жидкости в проточном биореакторе. Но его простая иммобилизация недопустима — он совершает челночные движения.

Есть два подхода к решению проблемы.

1. Кофактор пришивается к ферменту или его носителю через длинную и гибкую пространственную ножку. Однако это дорого и малоэффективно.

2. Массу кофактора увеличивают присоединением к водорастворимым полимерам — декстрану, полиэтиленгликолю. Разбухший кофактор легко удерживается фильтром.

Иммобилизованные клетки

Преимущества иммобилизованных клеток:

- 1) не требуется проводить отделение и очистку фермента;
- 2) клетки имеют необходимые кофакторы и могут осуществлять как одно-, так и многостадийные процессы.

Поэтому там, где это возможно, используют клетки.

Иммобилизованные клетки являются эквивалентом инкапсулированных ферментов.

В этом случае из клеток вымывают все нежелательные вещества, которые могут инактивировать фермент, например, протеазы.

Живые клетки более капризны, но более перспективны. Однако их свойства непостоянны, они варьируются от одного

поколения к другому. В ряде случаев иммобилизация стабилизирует клетку, останавливает ее развитие.

Покоящиеся клетки выигрышнее, чем делящиеся. Однако достижение такого состояния зависит от условий и метода стабилизации, подготовки биообъекта, предыстории культуры, состава питательной среды, фазы роста.

Рост клеток приводит к растрескиванию геля, к разрушению капсул. Но если продуктом служит клеточная масса, освободившиеся дочерние клетки уносятся из реактора в сепаратор, а материнские продолжают делиться.

В некоторых растительных клетках — продуцентах витаминов, пигментов и лекарственных соединений рост и синтез целевого продукта взаимно ингибируются.

Существуют методы получения покоящихся клеток. Их рост зависит от фитогормонов. Иммобилизованные, они более полно реализуют свой генетический потенциал (иногда в 10 раз больше, чем свободные).

Для подавления роста клеток применяют антибиотики.

Однако имеются случаи, когда синтез нужного продукта происходит только в условиях роста клетки и подавляется при прекращении роста.

Повышение проницаемости и стабильности иммобилизованных клеток. Повышение проницаемости клетки называется пермеабиллизацией. Это помогает выделить в культуральную жидкость максимальное количество продукта, не накапливая его внутри.

Внутриклеточными являются немногие инженерные продукты и метаболиты растительных клеток.

Сама по себе иммобилизация повышает проницаемость клеточной мембраны. Но иногда применяется дополнительная обработка клеток органическими растворителями, изменением pH и др. Так клетки растения *Morinda citrifolia* обрабатывают диметилсульфоксидом для того, чтобы повысить выход антрахинона. К повышению проницаемости приводит добавление фитогормонов и индукция роста корней. Можно радикально устранить клеточную стенку и использовать иммобилизованные протопласты.

Полезным приемом в работе с иммобилизованными клетками в составе гранул или других частиц является периодическая смена условий питания — перенесение клеток в богатую питательную среду. Это увеличивает активность и сроки

полезного функционирования клеток. Таким приемом в 6 раз увеличивается продуктивность клеток *Arthrobacter globiformis* проявляющих 3-кетостероид- Δ' -дегидрогеназную активность. При этом одновременно минимизируется рост и деление клеток в рабочих условиях.

Клеточные органеллы

Изолированные хлоропласты, митохондрии, микросомы, лизосомы, пероксисомы и другие органеллы содержат полезные ферменты и одновременно свободны от других компонентов клетки. Выделение органеллы или группы органелл — более простая процедура, чем получение очищенного фермента. Они не растут и не делятся. Обладая собственной ДНК, они размножаются только в составе целой клетки. Активность клеток, например, пурпурных бактерий меняется от одной фазы развития к другой, но активность выделенных из этих бактерий фотосинтетических мембран длительно поддерживается на постоянном уровне, если не произойдет инактивация.

Так, существует способ синтеза за счет световой энергии такого ценного кофермента, как АТФ на основе АДФ и неорганического фосфата. Процесс осуществлен с использованием иммобилизованного и включенного в полиакриламидный гель хроматофора *Rhodospirillum rubrum*.

Другим важным примером использования органелл является преобразование световой энергии в электрическую энергию разности потенциалов на цитоплазматической мембране пурпурных бактерий. Они обитают в засоленных водах, например, Мертвого моря. Мембраны можно иммобилизовать на различных носителях и создать биотехнологические аналоги солнечных бактерий. Носителем может служить билипидная мембрана.

Соиммобилизованные каталитические системы

Возможна совместная иммобилизация двух и более ферментов, видов клеток, комбинаций ферментов и клеток. Это позволяет осуществить ряд процессов в культуральной жидкости (*in vitro*). Например, можно превратить кетокислоты в аминокислоты с одновременной регенерацией кофактора.

Можно осуществить многостадийные процессы с применением смешанных культур м.о. В частности, аскорбиновую кислоту получают действием соиммобилизованных клеток *Gluconobacter melanogenes* и *Pseudomonas syringae*.

При соиммобилизации ферментов и клеток возможны два варианта:

1) клетки имеют ту же каталитическую активность, что и соиммобилизованный фермент. Это позволяет ускорить реакцию;

2) клетки и фермент катализируют разные этапы сложной реакции.

Рассмотрим два примера соиммобилизации.

1. Смесь раствора фермента и клеток включают в полимерную структуру (схема на рис. 2.8).



Рис. 2.8. Схема соиммобилизации клеток и молекул в полимерной структуре

2. Соиммобилизация *Asp. niger* и β -глюкозидазы предотвращает накопление промежуточного продукта — глюкозы при сбраживании целлобиозы до этанола. Таким образом предотвращается ингибирование процесса.

Схема метода показана на рис. 2.9.

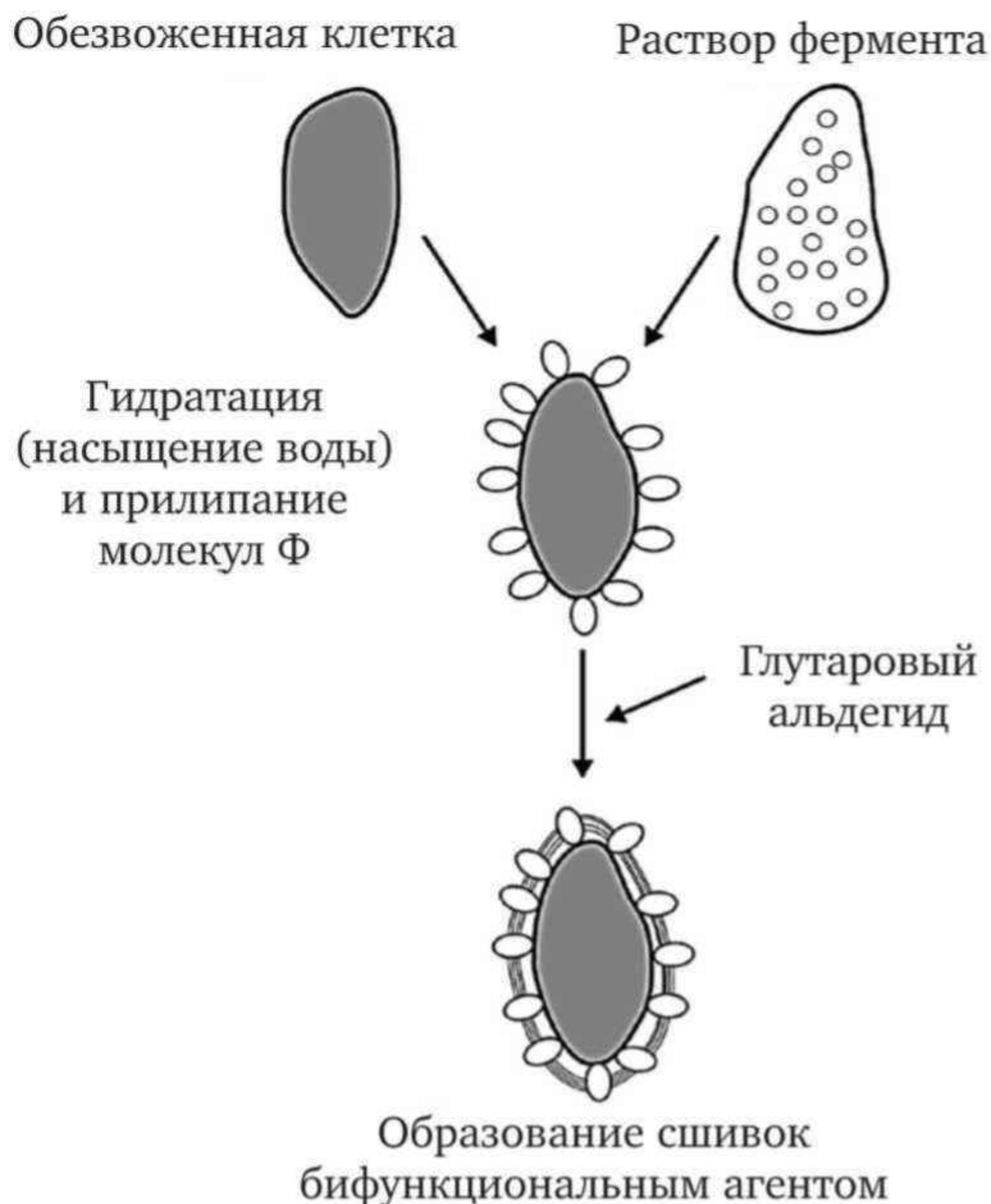
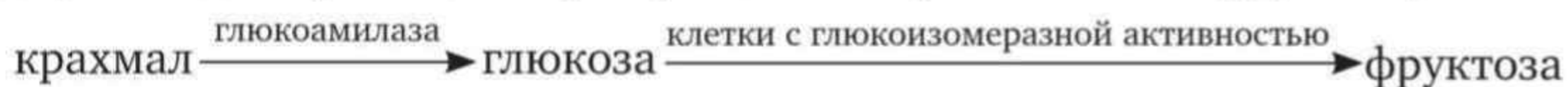


Рис. 2.9. **Схема соиммобилизации клеток и молекул методом сшивки**

При соиммобилизации клетки и ферменты должны быть функционально совместимыми.

Например, несовпадение оптимумов pH для катализаторов двух стадий реакции превращения крахмала во фруктозу:



не позволяет осуществить такой процесс.

2.5. Генная инженерия

Вся современная биотехнология основана на генной инженерии.

Генная инженерия — направленная модификация биообъектов в результате введения искусственных генетических программ. Генная инженерия — это техника рекомбинантных ДНК.

Задачи генной инженерии:

- преодоление межвидовых барьеров и передача отдельных наследственных признаков от одних организмов к другим;
- изменение и интенсификация функций отдельных генов и улучшение, тем самым, эффективности штаммов;
- создание штаммов м.о., способных осуществлять принципиально новые процессы — утилизировать продукты переработки нефти и различные биологически активные вещества, которые являются загрязнителями окружающей среды;
- улучшение свойств штаммов путем переноса плазмиды (для прокариотов) в неспаривающиеся м.о.;
- конструирование новых генов и получение новых белковых соединений.

История генетической инженерии

В развитии генетической инженерии можно выделить этапы, перечисленные ниже.

1. В 1944 г. О. Т. Эйвери (с соавторами) доказал, что носителем генетической информации служит ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота. Д. Уотсон и Ф. Крик в 1953 г. открыли структуру ДНК.

2. Экспериментально подтверждена универсальность генетического кода.

3. Развитие молекулярной генетики на примере *Escherichia coli*, ее вируса и плазмиды.

4. Отработка простых методов введения в чужеродные клетки молекул ДНК вирусов и плазмид в активной форме, которая обеспечивает репликацию молекул ДНК и экспрессию кодируемых ими генов.

5. Открытие ферментов, использующих ДНК в качестве субстрата катализируемых реакций. Особое значение имеют рестриктазы и лигазы.

Стратегия генной инженерии:

1) в небольшую молекулу ДНК, способную реплицироваться автономно от хромосомы ферментативно встраивают молекулы ДНК любого изучаемого организма или искусственные сегменты ДНК;

2) образующиеся молекулы вводят в чувствительные прокариотические или эукариотические клетки;

3) в клетках гибридные молекулы ДНК реплицируются, размножая в своем составе встроенные фрагменты ДНК;

4) с помощью специальных методов отбирают клоны клеток или вирусов, содержащие индивидуальные типы молекул гибридных ДНК;

5) выявленные гибридные ДНК подвергают разностороннему изучению.

Уровни генной инженерии. Терминология

Различают три уровня генетической инженерии:

1) генный — прямое манипулирование рекомбинантными ДНК, включающими отдельные гены;

2) хромосомный — манипуляции с большими группами генов или целыми хромосомами;

3) геномный — перенос всего или части генетического материала из одной клетки в другую.

Собственно генная инженерия играет как метод модификации биообъектов ведущую роль.

2-й и 3-й уровень (хромосомная и геномная инженерия) у прокариотов совпадают.

Прежде чем рассмотреть работу по этапам, дадим определения основных терминов.

Репликация — процесс удвоения двухветьевой ДНК обусловленный строением молекулы. При удвоении с каждым основанием спаривается комплементарное ему основание: тимин с аденином (Т-А) и цитозин с гуанином (Ц-Г). В результате образуются две новые двойные спирали. Одна из составных частей каждой двойной спирали является родительской, а вторая — синтезированной. Это обеспечивает сохранность генетической информации родительской ДНК (как сохранение комплементарности родительской ДНК).

В процессе репликации участвуют различные ферменты (ДНК-полимеразы) и регуляторные белки.

Транскрипция ДНК является составляющей частью процесса биосинтеза РНК в клетке. РНК — переносит генетическую информацию от ДНК к рибосомам, где происходит синтез белков. Таким образом, рибосома не контактирует с ДНК.

В контакте с ДНК синтезируется матричная РНК (мРНК), называемая также информационной РНК (иРНК). Этот биосинтез осуществляется ферментами РНК-полимеразами.

Трансляция — многоступенчатый процесс синтеза белков согласно информации, заключенной в мРНК. Трансляция осуществляется на рибосомах. В этом синтезе участвуют раз-

личные белковые соединения (белковые факторы, ферменты) и молекулы транспортной РНК (тРНК), несущие активированные аминокислоты. Считывание нуклеотидной последовательности мРНК происходит по законам генетического кода, согласно которому каждой аминокислоте соответствует триплет нуклеотидов (*кодон*). Последовательность кодонов определяет аминокислотную последовательность синтезируемого белка. Молекула тРНК содержит антикодоны — последовательности нуклеотидов, комплиментарные кодонам. Таким образом, тРНК является *адаптором*, который обеспечивает соответствие между кодоном и кодируемой аминокислотой. Наличие адаптора — главное отличие трансляции от транскрипции и репликации.

Транспортная РНК растворима, содержит всего в среднем 80 нуклеотидов.

Наследственная информация о строении белков организма (генетический код) передается с помощью 64 кодонов (нуклеотидных триплетов). Из всех возможных 64 триплетов 61 — смысловые, они соответствуют определенным аминокислотам, а три — не кодируются (стоп-кодоны).

Ниже дано толкование терминов, которые используются в генной инженерии.

Плазмиды — двухцепочечные кольцевые молекулы ДНК, которые содержат гены, придающие клеткам прокариотов определенные свойства.

Бактериофаги — вирусы, поражающие и уничтожающие бактерии. Они очень малы, не имеют собственного обмена веществ. Содержат только один вид нуклеиновой кислоты — либо ДНК, либо РНК, либо даже одноцепочечную ДНК.

ДНК фага, проникшая в клетку (пробиванием дырки, растворением) синтезирует ферменты, которую делают возможным синтез фаговой ДНК, а затем и самой ДНК. Наконец, внутри клетки-хозяина происходит сборка комплектных фаговых частиц. Если фаг перенести из солевого раствора в дистиллированную воду оболочка головки разрывается и высвобождается белок (ДНК).

Конъюгация — перенос некоторых плазмид (конъюгативных) из одной клетки бактерии (донорной мужской) в другую (женскую реципиентную) по половым ворсинкам (белковым трубочкам). Неконъюгативные плазмиды тоже могут передаваться с помощью плазмид — помощников.

Трансфекция — передача всего набора генов вируса или фага.

Трансдукция — передача ДНК от клетки донора клетке реципиента при участии бактериофага, который переносит небольшие фрагменты ДНК. Встречается трансдукция общая (неспецифическая) — перенос любого фрагмента ДНК хозяина и специфическая — перенос строго определенного фрагмента (у *Salmonella*, *Escherichia* и др.).

Трансформация — передача генов из клетки в клетку без переносчиков и межклеточных контактов. Осуществляется с помощью свободной растворимой ДНК, выделенной из клетки донора.

Компетенция — способность клеток поглощать ДНК. Обмен участками хромосомной ДНК в основном ограничен пределами одного вида или рода.

Вектор, или векторная молекула — молекула ДНК, способная акцентировать чужеродную ДНК и автономно реплицироваться. Вектором может служить плазмида, бактериофаг, вирус животного.

Вектор в молекуле рекомбинантной ДНК обеспечивает механизм репликации и экспрессии.

Репликон — фрагмент клонируемой (чужеродной) ДНК, содержащий интересующие исследователя генетические элементы, которые могут реплицироваться в клетке автономно от хромосомы.

Рекомбинантная ДНК (химерная) — молекула ДНК, полученные вне живой клетке (*in vitro*) путем соединения природных или синтетических фрагментов ДНК с молекулами, способными реплицироваться в клетке.

Экспрессия — синтез продуктов по информации введенного гена.

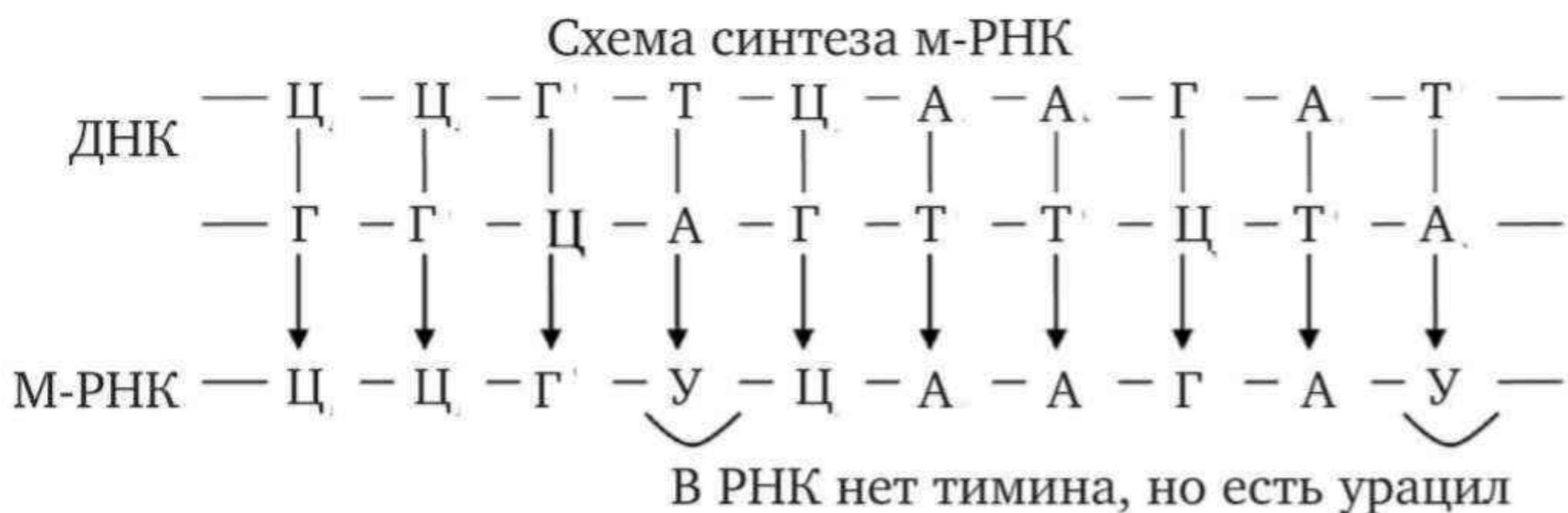
Самый распространенный метод получения рекомбинантных ДНК — рестриктазно-лигазный (ферменты).

Рестриктазы — ферменты, которые разрезают двухнитевую ДНК в определенном участке.

Метилазы — ферменты, которые метилируют основания и защищают их.

Химерные белки — составные белки, детерминируемые гибридными генами. Они состоят из ковалентно связанных аминокислотных последовательностей разных видов белков.

Ниже показана схема синтеза матричной РНК (мРНК) в контакте с ДНК.



2.5.1. Техника генной инженерии

А. Получение генов

Получить нужный ген можно следующими способами:

- выделение из ДНК;
- воссоздание ферментативным синтезом на основе изолированной матричной мРНК с помощью РНК-зависимой ДНК-полимеразы (ревертазы).

Выделение генов из ДНК. Изолированную ДНК подвергают фрагментации. Для этого используют упомянутые выше ферменты рестриктазы.

При этом образуются фрагменты с тупыми или липкими концами. При необходимости тупые концы превращают в липкие, присоединяя двухцепочечные последовательности (линкеры) с участками узнавания рестриктазы, дающей липкие концы. Нуклеотидная последовательность с липкими концами может быть:

- а) присоединена к вектору, обработанному той же рестриктазой;
- б) превращена из линейной молекулы в кольцевую путем сшивания взаимно комплиментарных концов.

Этот метод имеет недостатки:

- 1) трудность подобрать рестриктазы, для выделения именно нужного участка ДНК;
- 2) полученные фрагменты, наряду с нужной структурой содержат лишние нуклеотидные последовательности, создающие помехи. Кроме того, рестриктаза может отцепить нужную нуклеотидную последовательность, из-за чего ген теряет полноценность. Гены эукариотов имеют сложное строение. Они имеют функциональные участки, синтезирующие белок (экзоны) и незначащие участки (интроны). Зрелая матричная РНК включает только экзоны. Однако трансплантированные гены имеют зоны обоих типов, и это является затруднением для их работы.

После обработки рестриктазами очень трудно бывает выделить из полученной смеси нужные фрагменты.

Хими́ко-ферментативный синтез генов. Метод включает химический синтез коротких одноцепочечных фрагментов ДНК (олигонуклеотидов) за счет поэтапного образования эфирных связей между нуклеотидами и сшивку олигонуклеотидов посредством ДНК-лигазы с образованием двухцепочечных полинуклеотидов.

Это позволяет избежать липких последовательностей в ДНК, а также получать разнообразные участки узнавания, регуляторные последовательности и т. д.

Применимость метода ограничена недостатком информации о нуклеотидной последовательности генов. Такая последовательность воссоздается на основе знания о цепочке аминокислотных остатков в кодируемом белке.

Ферментативный синтез генов на основе выделенной клетки матричной ДНК. Метод применяется для переноса информации, которую несет ДНК клетки растения, животного или человека в клетку микроорганизма-продуцента. В этом случае исходная ДНК принимается за матричную (мДНК).

Фермент обратная транскриптаза (ревертаза) катализирует синтез нити ДНК, которая комплементарна мДНК. Полученную одноцепочечную ДНК называют комплементарной ДНК (кДНК). Ее используют в качестве матрицы для синтеза второй нити ДНК с помощью ДНК-полимеразы или ревертазы.

В этом методе получаемый ген не содержит лишних участков (интронов).

Создать условия для аккумуляции клеткой нужного гена легче, чем отбирать ген из смеси фрагментов.

Так был создан гормон роста человека — соматотропин.

Б. Введение гена в вектор

Сам по себе полученный ген не может синтезировать белок. Синтез осуществляется в клетке с помощью рекомбинантной ДНК. Ген переносится в клетку в составе вектора. Чаще всего в качестве вектора служит кольцевая молекула, способная к самостоятельной репликации. Такая ДНК называется плазмидой.

Конструирование рек-ДНК осуществляется *in vitro*. Кольцевая молекула вектора размыкается рестриктазой с образованием липких концов. Они комплементарны вводимой ДНК.

Комплементарные участки вектора и вводимого гена сшивают ДНК-лигазой и вновь получают кольцевую молекулу.

Векторами могут служить как плазмиды, так и вирусы (фаги). У некоторых фагов значительная часть ДНК не нужна для размножения в клетке. Выделив ДНК фага и расщепив ее в области несущественного участка, можно с помощью лигазы в место разрыва вставить чужеродную ДНК (или ее фрагмент). Но используемые вирусы должны иметь ослабленную патогенность, чтобы клетки выживали и сохраняли информацию. Это свойство называется аттенуацией.

Вирусы быстро передаются из клетки в клетку. Появляется возможность лечения наследственных заболеваний введением вирусов во все клетки тела.

Кольцевые генетические самореплицирующиеся единицы найдены у грибов, бактерий, некоторых растений и животных.

Они могут быть конъюгативными и неконъюгативными.

При конструировании вектора в него вводят участки узнавания рестриктаз и гены-маркеры, кодирующие нужные признаки организма.

Разновидностью плазмид являются *космиды*. Так называются плазмиды, в которые введены участки, отвечающие за упаковку ДНК в фаговую частицу. Космиды обладают очень большим объемом информации. Они содержат *cos*-участок ДНК фага *E. coli*, отвечающие за упаковку.

Перспективны плазмиды м.о. бактерий *Risobium* и *Agrobacterium*. Они содержат опухолеродные *Ti*-плазмиды содержащие по три ростовых гена. Эти гены вызывают образование опухолей. Онкоген убирают, а взамен вводят полезный вектор (синтез производных аргинина).

В. Перенос генов в клетки–реципиенты

Передача встроенных генов осуществляется путем трансформации и конъюгации.

При *трансформации* происходит перенос свободной ДНК в реципиентную клетку. При этом происходит рекомбинация и интегрирование одноветьевого фрагмента ДНК в генетическую единицу.

Для проникновения ДНК в клетку она должна быть компетентной. Выделены и очищены факторы компетентности — особые белки.

Генетический материал, попавший в клетку, может быть остановлен нуклеазами. Для успешной трансформации необхо-

димо подавить активность либо синтез нуклеаз. Второй путь — включение трансформирующей ДНК в липосомы (искусственные мембраны).

Трансформация — универсальный путь передачи информации.

Конъюгация и трансфекция по существу являются вариантами трансформации. Конъюгация осложнена необходимостью приспособлений для переноса генов. Методом конъюгации переносятся лишь некоторые (конъюгативные) плазмиды.

При трансфекции в клетке развиваются вирусные частицы. Методика осуществления трансфекции для бактерий включает:

- получение сферопластов,
- очистку среды инкубации от внеклеточных нуклеаз,
- добавление очищенной ДНК того или иного фага вместе с протамином сульфатом для повышения эффективности трансфекции.

Для стабилизации сферопластов добавляют спермин и другие полиамины.

Трансфекция может быть осуществлена как в виде использования очищенной ДНК и протопластов, так и в виде заражения целых многоклеточных организмов вирусными частицами либо их ДНК.

Сконструированы челночные векторы, которые способны к репликации в животной и бактериальной клетке и поддерживают клонируемого гена в живой клетке.

Г. Идентификация клеток-реципиентов, которые приобрели желаемый ген

Успех генно-инженерной работы часто зависит от эффективности метода отбора клетки, несущей ген-мишень.

Часто его содержит лишь небольшая часть клеток.

Отбор проводят в два этапа.

Первая стадия. Отбор клеток, несущих данный вектор. Обычно это делают по генетическим маркерам. Так, высев на среду с антибиотиками позволяет обогатить бактериальную популяцию клетками, которые содержат векторы устойчивости к антибиотикам.

Вторая стадия. Поиск клеток, несущих ген-мишень.

Используют две группы методов.

Методы, основанные на непосредственном анализе ДНК клеток-реципиентов:

1) определение нуклеотидной последовательности: из клеток, предположительно содержащих искомый ген, выделяют ДНК вектора, в которой проводят поиск участков, несущих этот ген, а затем проводят секвенирование (обычно части) нуклеотидной последовательности гена;

2) гибридизация выделенной клетки с зондом, который может быть или интересующим геном или соответствующей ему мРНК. Для этого предварительно изолированную ДНК переводят в одноцепочечное состояние и вводят ее во взаимодействие с одноцепочечным ДНК- (или РНК-) зондом. Далее определяют присутствие гибридных двухцепочечных молекул ДНК.

Методы, основанные на идентификации признака, кодируемого геном:

1) непосредственный отбор клеток, синтезирующих белок — продукт гена-мишени или клеток, образующих соединение, в синтезе которого участвуют ферменты, кодированные геном (дрожжи, синтезирующие гистидин).

2) использование селективных сред, поддерживающих рост только нужных клеток (для отбора клеток с ферментом для утилизации лактозы клетки выращивают на среде с лактозой как единственным источником углерода).

3) иммунологическая детекция возможна в случае, если ген не влияет на фенотип организма. Примером может служить синтез α -интерферона, когда в среде имеются антитела к интерферону. Тогда, с целью бактериальные клетки лизируют, а затем проводят реакцию связывания антигена с антителами к α -интерферону.

К подпараграфу 2.5.4, п. Г см. приложение, термины «антидот», «гепарин», «протаминсульфат», «протопласт», «сферопласт».

Д. Конструирование новых организмов–продуцентов

Методами генной инженерии можно создать новые формы м.о., которые способны продуцировать самые разнообразные вещества, в том числе, синтезировать белки человека — интерфероны, инсулин, гормон роста и другие.

Основные проблемы при конструировании микроорганизмов-продуцентов описаны ниже.

1. Продукты новых генов попадают в чуждую для них внутриклеточную среду и быстро разрушаются протеазами. Осо-

бенно быстро гидролизуются короткие пептиды. Из этой ситуации предложены различные выходы:

- использование ингибитора протеаз — в той же плазмиде ген *pin* (фрагмент ДНК фага T4);
- получение нужного пептида в составе гибридной белковой молекулы (сшивание с белком реципиента). Для этого используют, например, ген *E. coli*;
- амплификация — увеличение числа копий генов (например, синтеза инсулина). Мультимер белка стабильнее мономера.

2. Обычно продукт нового гена не высвобождается в культуральную среду, остается в клетке. Это затрудняет их выделение. Поэтому трансплантируют гены, ответственные за экскрецию белков в культуральную среду. Перспективен переход от излюбленной модели *E. coli* к другим микроорганизмам (роды *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Streptomyces*).

3. Большинство признаков кодируется несколькими генами. Поэтому предусматривается последовательная трансплантация каждого гена. Примером является штамм *Pseudomonas sp.*, способный утилизировать сырую нефть. Фиксация азота определяется 17 различными генами.

Кроме биотехнологии м.о. развивается генная инженерия растений. Работы ведутся в направлениях:

- обогащение культурных растений дополнительными запасными веществами с помощью генов, взятых от других растений;
- повышение эффективности фотосинтеза растений, например, на основе белков, связывающих хлорофилл;
- изменение азотного метаболизма, например, с использованием генов, кодирующих запасание и транспорт азота;
- придание устойчивости к гербицидам, засолению почв, повышению и понижению температуры и другим факторам.

Генетическая инженерия растений манипулирует как с ядерными геномами клеток, так и с геномами хлоропластов и митохондрий. Так, в хлоропластный геном вводят ген азотфиксации для устранения потребности в азотных удобрениях.

Важной проблемой генетической инженерии растений является тканевая специфичность гена. Для того чтобы ген был выражен в определенных тканях или фазах развития, его ставят под контроль промотора, который функционирует только в определенной ткани (например, листья на свету) или в определенной фазе развития (в прорастающих семенах).

На первых порах генно-инженерные манипуляции с растениями вызвали тревогу общественности:

- возможная опасность превращения кишечной палочки и других м.о. в монстров, которые выйдут из-под контроля и вызовут массовые заболевания. Были приняты меры по охране мутантов в лаборатории. Однако эти опасения не оправдались. Рассмотрим их по отдельности;

- возможность выхода из-под контроля генно-инженерных культурных растений и превращения их в сорняки. Но один ген не может дать растению таких преимуществ. Только устойчивость к гербицидам при севообороте может сделать растение сорняком;

- опасность утраты пищевой ценности и приобретения токсичности. Но такая опасность присуща всем методам селекции. Нужно лишь тщательно тестировать генно-инженерные растения.

В генной инженерии животных клонированы многие гены, например, тирозиновый тРНК *E. coli*. Испытываются все новые культуры клеток, в том числе клетки человека и насекомых. Для непарного шелкопряда удалось добиться экспрессии гена β -интерферона человека. Это создает перспективу для производства важного лекарственного средства, укрепляющего иммунитет.

Клетки млекопитающих растут медленно на дорогих средах, легко повреждаются, но при условии снижения вредоносности вирусов их можно использовать для доставки желаемого гена в каждую клетку человека.

Решения проблемы тканеспецифического действия генов у животных и человека еще не достигнуто. Добиться того, чтобы инсулин стал синтезироваться именно в поджелудочной железе больных диабетом можно только мечтать.

Пока не выяснена генетика полезных признаков сельскохозяйственных животных (плодовитость, выход молока, качество мяса и пр.). Это мешает проникновению генной инженерии в эту сферу.

Е. Улучшение продуцентов, используемых в производстве

Генная инженерия, наряду с селекцией, позволяет повышать эффективность организмов, используемых в производстве.

Для повышения выхода полезного продукта используется амплификация — увеличение числа копий генов. Первая

работа в этом направлении была выполнена в 1974 г.: в составе плазмиды клонирован триптофановый оперон.

Если продукт образуется длинными и сложными путями биосинтеза и нужные гены не скомпонованы в один оперон, то клонируют ген, который соответствует узким местам биосинтеза. У многих бактерий узким местом является не синтез продукта, а его экскреция из клетки.

Часто одна и та же транспортная система отвечает за экскрецию нескольких типов соединений. Примером являются стрептомицеты, у которых введение гена устойчивости к канамицину одновременно способствует повышению уровня синтеза окситетрациклина.

Для повышения эффективности традиционных методов сочетают с локализованным мутагенезом *in vitro*. Химическими мутагенами обрабатывают только фрагмент генома, полученный с помощью рестриктазы.

В настоящее время уровень генной инженерии позволяет вносить заранее определенные изменения в нуклеотидную последовательность ДНК для достижения изменений в соответствующем белке.

Усовершенствование продуцентов биологически активных белков является важной задачей белковой инженерии.

Важным направлением генной инженерии является изменение питательных потребностей продуцентов. Это позволяет увеличить эффективность конверсии субстрата. Таким приемом удалось добиться, чтобы клетки *E. coli*, синтезирующие треонин, утилизировали сахарозу.

2.5.2. Ферменты генной инженерии

В генной инженерии разработана определенная схема создания новой (химерной) клетки, показанная ниже (рис. 2.10, а также см. термин «трансформация» в приложении).

Из рисунка ясно, что схема включает операции расщепления плазмиды и затем — лигирования. При лигировании в плазмиду включается новый геном.

Все эти операции осуществляются с помощью специальных ферментов генной инженерии.

Перечислим главные ферменты генной инженерии:

- 1) рестриктазы;
- 2) ДНК-лигазы;
- 3) ДНК-полимеразы;

- 4) обратная рестриктаза;
- 5) концевая дезоксинуклеотидная-трансфераза и др.

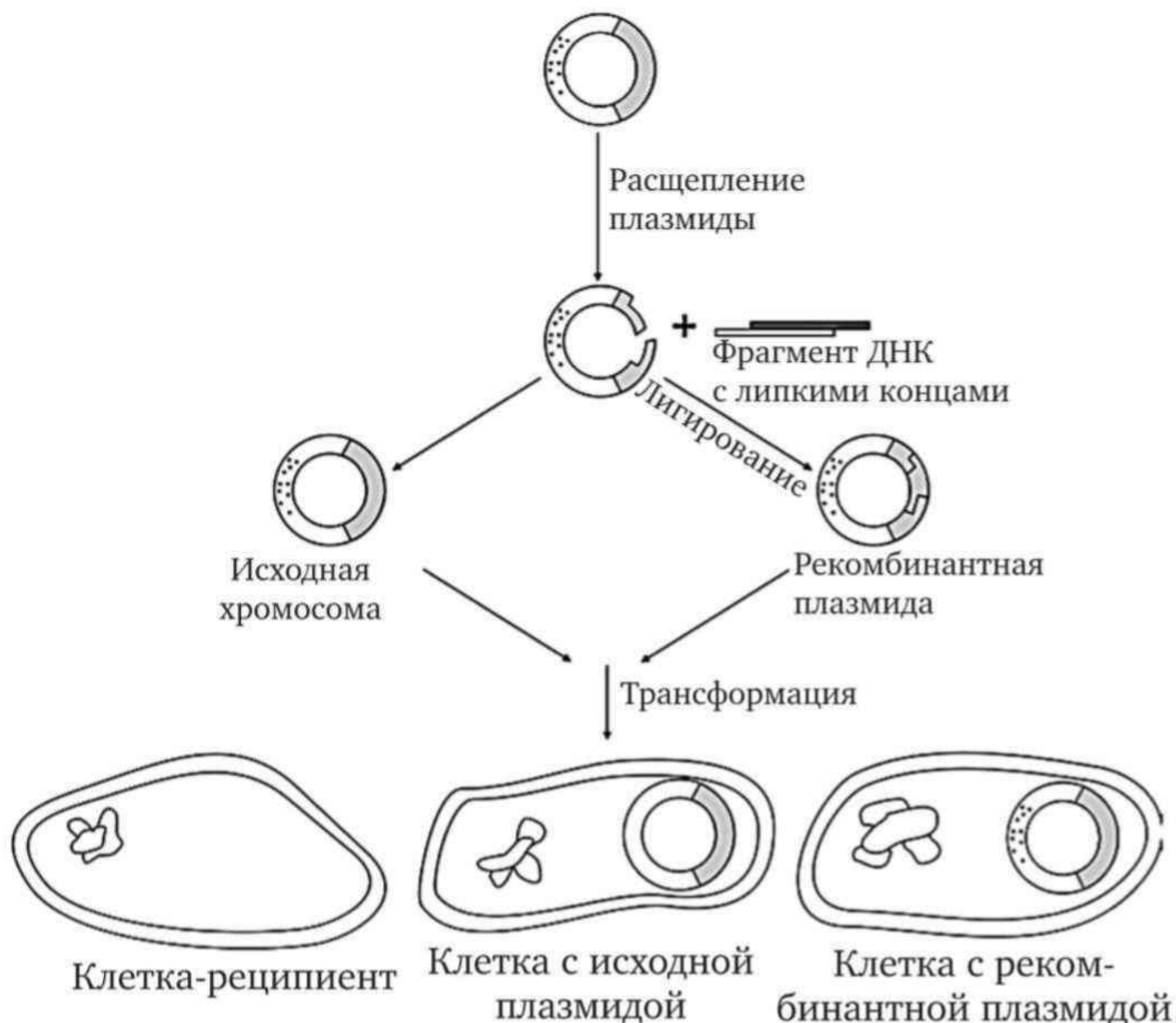


Рис. 2.10. Схема получения гибридной ДНК с использованием чужеродных и плазмидных ДНК, расщепленных по методу *in vitro*

Рассмотрим функции этих ферментов.

1. Термины «рестриктаза», «эндонуклеаза рестрикции», «сайтспецифическая эндодезоксирибонуклеаза» являются синонимами.

Эти ферменты узнают определенные последовательности нуклеотидов и разрезают двунитьевую ДНК на фрагменты. При этом в клетке обязательно имеется фермент (метилаза), которая катализирует метилирование определенных оснований в последовательности, узнаваемой сопряженной рестриктазой. Тем самым осуществляется защита данного участка ДНК.

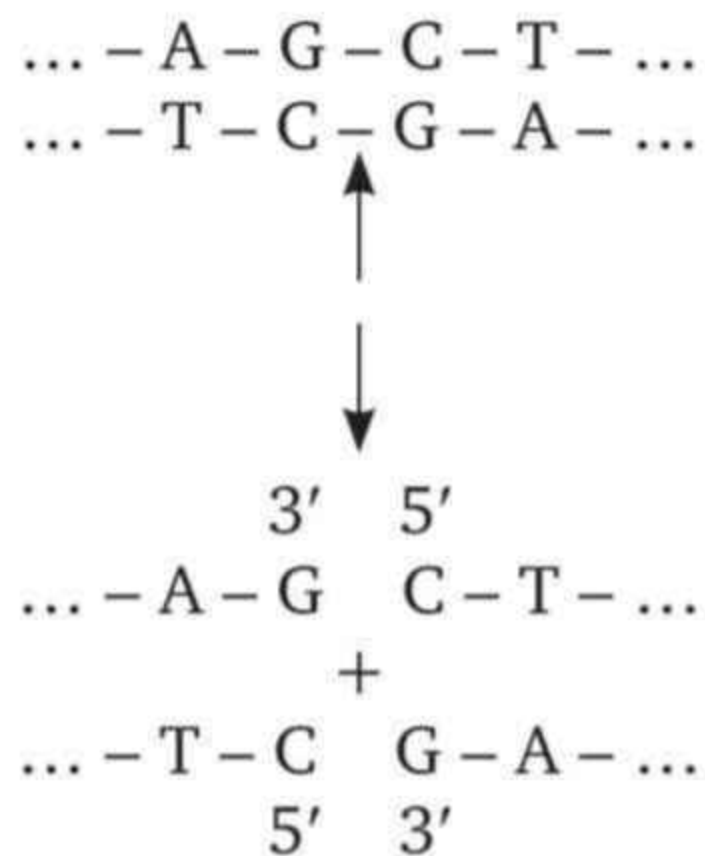
Одновременное наличие двух ферментных активностей (R-M система) препятствует гидролизу собственной нуклеиновой кислоты. Однако чужеродная ДНК, проникшая в клетку, служит субстратом для действия обоих ферментов.

Название рестриктаз отражает название типа микроорганизма, из которого они выделены.

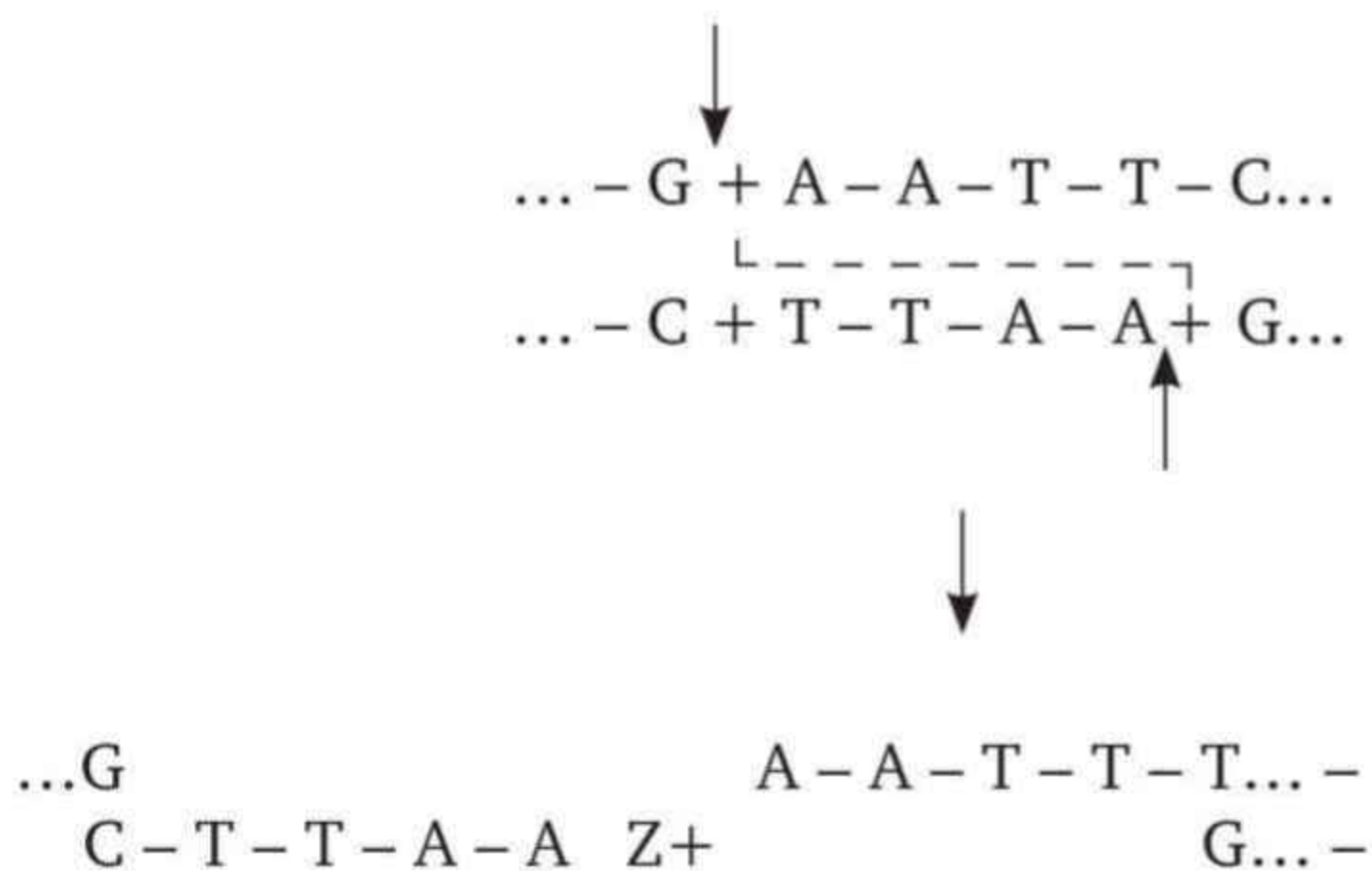
Например, EcoR I и EcoR II — выделены из *Escherichia coli*.

Открыты сотни рестриктаз.

Самые простые — рестриктазы класса II. Это — белки из субъединиц одного типа со сравнительно небольшой молекулярной массой. Эти рестриктазы работают, когда в растворе присутствуют ионы Mg^{2+} . Они узнают последовательности двухцепочечной ДНК длиной от четырех до восьми пар нуклеотидов, и имеющие ось симметрии II порядка (палиндромы). При этом ряд рестриктаз расщепляет ДНК строго по оси симметрии. Это приводит к образованию фрагментов с «тупыми» концами, не имеющими одноцепочечных участков:



Другой фермент EcoR I расщепляет гексануклеотидную последовательность с образованием 5' — выступающих взаимнокомплементарных липких концов:



Если таким образом гидролизовать молекулы ДНК разного происхождения, то в каждом случае образуется специфический набор фрагментов ДНК с одинаковыми липкими концами.

Для случайной последовательности ДНК бесконечной длины с равным содержанием четырех нуклеотидов ($U = 4$) вероятность наличия определенной последовательности длиной N составляет $P_N = U^{-N}$.

Существуют рестриктазы, которые обладают разной специфичностью, но образуют одинаковые липкие концы.

Если, узнавая одинаковую последовательность нуклеотидов, рестриктазы одинаково их расщепляют, они называются истинными *изошизомерами*. Но если они в этом случае расщепляют ДНК разным образом, их называют ложными изошизомерами.

2. ДНК-лигаза. Воссоединение разорванных молекул ДНК осуществляется с помощью ферментов, которые катализируют синтез фосфодиэфирной связи в двухцепочечной ДНК. Они называются ДНК-лигазами.

Удалось обнаружить два типа ДНК-лигаз: оба появляются в клетках *E. coli*, инфицированных фагом Т4. Лигаза синтезируемая в клетке *E. coli* в качестве кофактора требует дифосфопиридиннуклеотид, а лигаза фага Т4 — аденозинтрифосфат. Лигаза фага Т4 является более универсальной и воссоединяет как тупые, так и липкие концы.

3. ДНК-полимераза *E. coli*. Этот фермент состоит из мономерной полипептидной цепи с молекулярной массой 103 кД и имеет трехдоменную структуру, которую можно разделить. Меньший фрагмент обладает 5'—3' экзонуклеазной активностью, а больший — 5'—3' и 3'—5' активностью.

ДНК-полимеразу используют для достройки одноцепочечных 5' концов на двухцепочечной ДНК до двухцепочечных тупых; для гидролиза одноцепочечных 3'-концов на двухцепочечных ДНК, а также для синтеза второй цепи на одноцепочечной ДНК.

2.6. Использование генной инженерии в животноводстве и в растениеводстве

2.6.1. Генная инженерия в животноводстве

Применительно к животноводству генная инженерия позволяет изменять свойства организмов:

- повышать продуктивность;
- повышать сопротивляемость болезням;
- увеличивать скорость роста;
- улучшать качество продукции;
- создавать животных, которые являются биореакторами, продуцентами ценных биологически активных веществ.

Животное, несущее рекомбинантный ген, называется трансгенным; ген, интегрированный в геном реципиента, называется *трансгеном*; продукт этого гена — трансгенным. Селекция позволяет закрепить новый ген в потомстве и создать трансгенные линии.

Этапы получения трансгенного животного методом микроинъекции новой ДНК в эмбрион:

- приготовление раствора ДНК для инъекции;
- извлечение эмбрионов из донорных организмов;
- пересадка инъецированных эмбрионов в яйцеводы или после культивирования — в матку реципиентов.

У родившихся потомков исследуют экспрессию трансгена и затем традиционными методами разведения животных получают трансгенное потомство (линии).

Эффективность методики в целом зависит от успеха приготовления раствора ДНК для инъекции (чистота, концентрация).

Обычно гены транспортируют на самых ранних стадиях развития животного.

Для микроинъекции ДНК в эмбрион используют специальные пипетки с внутренним диаметром 1 мкм.

Инъецированные эмбрионы переносят в яйцеводы хирургическим путем, каждому реципиенту по 20—30 зигот в один яйцевод или отдельно в каждый. Доказательства интеграции и экспрессии ДНК получают анализом ядродержащих клеток тканей либо внутренних жидкостей реципиента на качество и количество экзогенных белков.

Трансген не передается потомству по законам Менделя с частотой 50 %. После инъекций новые линии животных, содержащие трансгенные клетки, появляются в виде «мозаики».

Продуктивность и скорость роста животных

Увеличения продуктивности и скорости роста удалось достигнуть с помощью применения гормона роста микробного происхождения. Он оказывает стимулирующее действие на лактацию и рост животного. Этот гормон применяют в виде инъекций. При ежедневной инъекции молодняку КРС удалось увеличить суточные привесы на 20—30 % при значительном сокращении расхода кормов и росте содержания белка в тканях. У свиней менее значительный эффект наблюдался

при одновременном кормлении модифицированным кормом с повышенным содержанием белка. У овец применение гормона не вызвало увеличение привеса, хотя привело к снижению содержания жира.

В данном направлении животноводства (повышение продуктивности) сейчас рассматривается возможность уменьшения содержания лактозы в молоке путем создания животных, у которых в молочной железе присутствует ген, катализирующий распад лактозы. Это позволит получать натуральное молоко с пониженным содержанием лактозы для людей, не переносящих молочный сахар.

Устойчивость к заболеваниям

Потери животных от болезней очень велики. Успехи селекции на устойчивость к болезням, которые вызывают м.о., вирусы, различные паразиты и токсины, пока невелики.

Выведены линии КРС с примесью крови зебу, устойчивые к некоторым кровепаразитарным заболеваниям.

В целом работы ведутся в двух направлениях: препятствие вторжению возбудителя и изменение рецепторов. Вторжению возбудителя препятствуют иммунная система и экспрессия генов гистосовместимости. Имеются определенные успехи в изучении и создании резистентности к таким возбудителям болезней, как вирус гриппа А, аденовирус H⁵ (Ad₅), вирусу лейкоза.

Достигнута внутриклеточная иммунизация против инфекционных вирусов с участием мутационных форм соответствующих эндогенных вирусных белков.

Трансгенные животные как продуценты биологически активных белков

В линиях трансгенных животных можно получать трансгенные белки. Такие животные легко размножаются, содержание их недорого.

Большой интерес представляет трансгенная экспрессия в эпителиальные клетки молочной железы с целью выхода новых белков с молоком. В настоящее время уже идентифицированы участки ДНК, которые являются промоторами синтеза α S1-казеина, β -казеина, α -лактоальбумина, β -лактоглобулина и др.

Из молока трансгенных животных путем использования промоторов уже получают ряд рекомбинантных белков, кото-

рые являются биологически активными, важными для человека.

2.6.2. Генная инженерия растений

Генная инженерия позволяет получать новые типы растений намного быстрее, чем обычная селекция. Благодаря введению определенных генов (трансформации) происходит изменение генотипа.

С помощью генной инженерии растений решаются такие задачи:

- повышение устойчивости к стрессовым факторам, фитопатогенам, гербицидам и пестицидам;
- ввод генов скороспелости;
- ввод генов симбиотической фиксации азота.

В клетках растений возможна экспрессия генов, перенесенных не только от других растений, но и от микроорганизмов и от животных. Благодаря свойству тотипотентности, из трансформированных клеток развивается целое растение с новыми свойствами.

Возможности генной инженерии растений ограничены плохой изученностью их генов. Кроме того, трудно выбрать условия регенерации растения из клеток. Пока успешно эта задача решена для картофеля, люцерны, томатов, моркови, табака и капусты. Вводить в геном растения пока удается не более 35 кб ДНК (1 байт — это одна тройка азотистых оснований).

Большие перспективы открываются благодаря новым удачным идеям использовать при трансформации в качестве вектора искусственные бактериальные хромосомы, а также пыльцу.

Новые большие возможности заставляют более строго думать о возможных последствиях эксперимента.

Получение трансгенных растений

Получение трансгенных растений возможно с помощью векторов — специфических структур для переноса генов и для встраивания их в геном растения.

Векторы на основе Ti-плазмид. Большая внехромосомная Ti-плазида индуцирует образование опухолей у двудольных растений. Эта плазида содержится в клетках почвенной бактерии *Agrobacterium tumefaciens* (A. t.).

При заражении эта плазмида встраивается в ДНК хозяина и заставляет его изменять метаболизм, а именно — синтезировать белки опины, необходимые для бактерий в качестве источников азота и углерода. Есть два типа опинов — октопин (его синтез стимулируется октопиновой плазмидой) и нопалин (ему соответствует нопалиновая плазмида).

Эти плазмиды являются идеальными векторами. Они содержат Т-область (10 % Ti-плазмиды), которой соответствует Т-ДНК в клетках. Т-область определяет функциональные свойства плазмиды — индукцию опухоли, синтез опинов и подавление роста клеток. Гены, ответственные за перенос и интеграцию генов Т-области, находятся в рядом расположенной *vir*-области (рис. 2.11).

Любая ДНК, вставленная между повторяющимися элементами Т-области, будет принята за Т-область и перенесена в новую клетку.

Однако главным недостатком Ti-плазмид является то, что они подавляют гормоны роста и регенерировать из химерной клетки растение — трудно. Кроме того, Ti-плазмида слишком велика.

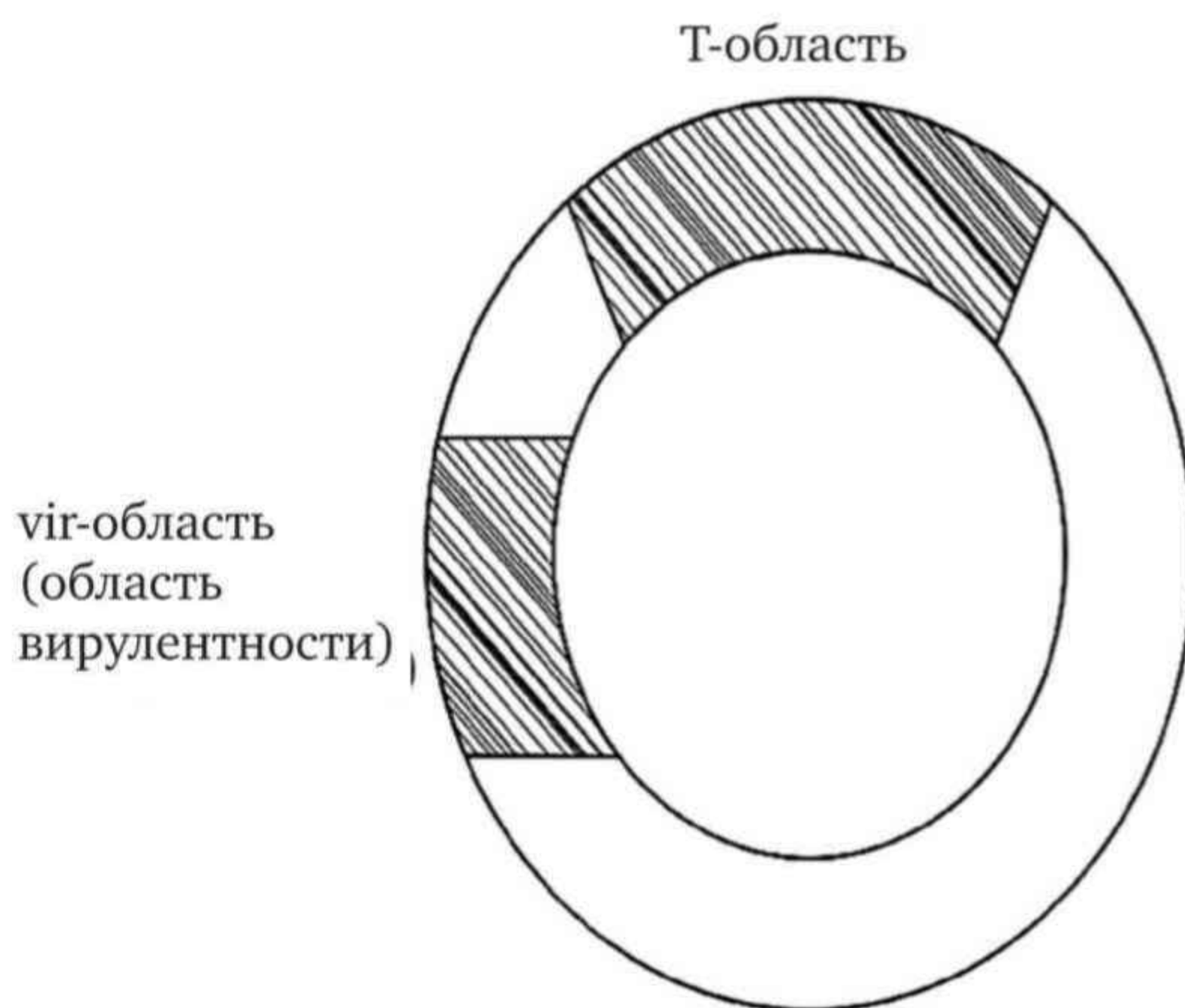


Рис. 2.11. Схема строения плазмиды, содержащей Т-область

В настоящее время конструируются производные Ti-плазмиды меньшего размера. Есть также работы по использованию в качестве векторов других плазмид — Ri (*Rhizogenes*).

Ri-плазмиды индуцируют образование корней и безвредны для растений.

Промежуточный и бинарный векторы. Эти векторы конструируются на основе Ti-плазмид клеток *A. t.* Для «выращивания» промежуточного вектора используют м.о. *E. coli*.

Получение промежуточного вектора:

- Т-область с помощью рестриктаз вырезают из плазмиды;
- вставляют вырезанную Т-область в вектор для клонирования в клетке *E. coli*, там эти векторы размножаются;
- внутрь Т-области вставляют чужеродный ген и плазмиду вновь размножают;
- рекомбинантную Ti-плазмиду вводят в клетки *A. t.*, несущие полную Ti-плазмиду;
- в результате двойного кроссинговера между гомологичными участками новая Т-область рекомбинантной плазмиды включается в Ti-плазмиду клетки хозяина, заменив нормальную Т-область;
- бактериями, несущими Ti-плазмиду со встроенными генами, заражают растения, где этот ген встраивается в геном клетки.

Бинарным вектором называются бактерии с плазмидами двух типов: в одних есть *vir*-область, в других — Т-область с любыми генами.

Как при введении промежуточного вектора, так и при введении бинарного вектора, растительные клетки не способны к регенерации. Для восстановления способности к регенерации вводят мутации или вырезают из химерной плазмиды Т-ДНК.

Векторы на основе ДНК-содержащих вирусов. Возможности этого метода ограничены, так как лишь немногие вирусы имеют ДНК. Тем не менее, метод перспективен, поскольку ДНК вирусов обладают высокой копийностью, малыми размерами и эффективно воспроизводят чужеродные гены.

Недостатками метода являются небольшая информационная емкость, патогенность и неспособность вирусной ДНК встраиваться в сомы хозяина. Но если инфицировать вирусом не клетки, а растительные протопласты, емкость увеличивается.

Для некоторых случаев разработаны приемы, которые позволяют обойти неспособность вирусной ДНК встраиваться. Таким приемом является использование Ti-плазмиды: вначале ДНК вируса встраивают в Ti-плазмиду, а затем заражают ею нового хозяина.

Прямой перенос генов в растение. Благодаря появлению таких объектов как изолированные протопласты (клетки, лишенные целлюлозной стенки) появились многочисленные методы прямого переноса генов: микроинъекция ДНК, упаковка в липосомы, электропорация (получение пор импульсами высокого напряжения) и проникновение ДНК в клетки через поры и другие методы.

Биологическая баллистика. Прием заключается в бомбардировке материала частицами вольфрама с нанесенными на них ДНК-векторами. Метод апробирован на однодольных растениях.

Улучшение аминокислотного состава запасных белков

Получить растение с измененным аминокислотным составом запасных белков методом селекции на практике невозможно, так как соответствующие гены сцеплены с другими, нежелательными признаками. Поэтому разрабатываются способы получения трансгенных растений (с измененными генами).

Получение трансгенных растений в данном случае делится на этапы:

- клонирование генов запасных белков;
- изучение механизма экспрессии белков и выявление соответствующей последовательности ДНК;
- целенаправленное изменение последовательностей генов;
- создание векторов с измененным геном;
- введение модифицированных генов в растения.

Повышение эффективности процесса фотосинтеза

Повышение эффективности фотосинтеза достигается клонированием хлоропластных генов и их переносом в растения.

Хлоропласты и клетки прокариотов сходны по ряду признаков. Гены хлоропластов клонируются в клетках *E. coli*.

Для экспрессии генов *E. coli* и хлоропластных генов в клетках *E. coli* наиболее эффективным приемом является установка промотора рядом с участком связывания рибосом, который узнается полимеразой *E. coli*.

Решение проблемы усвоения азота

Производство азотных удобрений очень дорого обходится. Целесообразно снабжать растение азотом путем его биологической фиксации. Это свойство — diaзотрофность присуще прокариотам. При этом целесообразно обратить внимание

не на свободноживущие, а на симбиотические азотфиксирующие м.о. (с бобовыми, деревьями, рисом и травами). Фиксация происходит с помощью фермента нитрогеназы. К 1981 г. она выделена из 36 м.о. Она работает лишь в отсутствие кислорода. В настоящее время созданы карты генов азотфиксации. Они образуют единый оперон. Но введение этих генов в растительную клетку с помощью плазмиды не решает проблемы: нитрогеназа разрушается кислородом.

Более перспективно совершенствовать уже существующие природные системы фиксации азота путем воздействия на гены, контролирующие этот процесс, увеличения мощности корневой системы бобовых растений, создание новых систем методами клеточной инженерии.

Устойчивость к фитопатогенам

Фитопатогенами являются некоторые грибы, вирусы, бактерии. В растениях существуют защитные механизмы против патогенов: синтез соединений, вызывающих гибель (разрушение клеточных стенок, ферменты); создание структурных барьеров, препятствующих распространению инфекции (лигнизация клеточных стенок); присутствие в стенках белков-экстенсинов и олигосахаридов.

Генная инженерия позволяет получить устойчивые трансгенные растения, содержащие одиночные гены синтеза защитных соединений, которые имеются у табака, турнепса, редьки. Проводятся исследования возможности переноса генов, содержащихся в семенах многих растений и защищающих эти семена от развития бактериальных и грибных инфекций.

Другой подход заключается во введении в геном исходных растений гена оболочки вируса — при этом размножение вируса подавляется.

Третьим направлением придания устойчивости к фитопатогенам является введение и экспрессия генов антивирусных антител, например, гена человеческого интерферона. Таким путем удалось повысить устойчивость к вирусным заболеваниям у ряда растений — турнепса, табака, картофеля.

Устойчивость к гербицидам

Гербициды могут подавлять рост культурных растений. Генно-инженерный метод решения проблемы состоит во введении в растения генов гербицид-резистентности.

Для этого:

- выявляют мишени действия гербицидов в клетке растений;
- отбирают в качестве источника генов резистентности те растения, которые устойчивы к гербициду;
- идентифицируют и клонируют эти гены;
- изучают экспрессию генов.

Однако иногда в тканях полученных трансгенных растений наблюдается накапливание гербицида.

Устойчивость к насекомым

Было обнаружено, что бактерии *Bacillus thuringiensis* синтезируют прототоксин, токсичный для насекомых. Он активизируется в кишечнике насекомого, и оно погибает. Ген экспрессии прототоксина удалось обнаружить, выделить и ввести в геном растений табака. В итоге получены устойчивые трансгенные растения.

Устойчивость к абиотическим стрессам

Выживание в неблагоприятных условиях обеспечивается тремя способами:

- физиологические механизмы (например, период покоя);
- морфологические приспособления (слой кутикулы на листьях препятствует уменьшению поверхности и ее опущению);
- изменение метаболизма.

Последний путь доступен для генной инженерии.

Например, вводят гены экспрессии осмопротекторов. Осмопротектор пролин устанавливает осмотический баланс клетки с окружающей средой, стабилизирует белковые молекулы.

Примером выживания растений является также адаптация к низким температурам, которая заключается в накапливании растворимых веществ, уменьшающих образование кристаллов льда.

Необходимо осторожно относиться к достижениям генной инженерии в растениеводстве, так как уничтожение природных штаммов может привести к экологической катастрофе.

2.7. Клеточная инженерия растений

Краткая история предмета

Объектом клеточной инженерии является изолированная клетка или ткань эукариотического организма. Инженерия

клетки основана на свойстве тотипотентности растительных клеток.

Данный объект инженерной деятельности позволяет решать глобальные задачи — селекция, получение биологически ценных метаболитов (например, дешевых лекарств), выращивание безвирусных растений, клональное размножение и др.

Изолированные кусочки растительных тканей были выращены еще в конце XIX в. (немецкие ученые Х. Фехтинг, С. Рехингер, Дж. Хаберлендт). Были высказаны ценные идеи о том, что клетке присуща полярность (как и организму). Было также установлено, что минимальный размер сегмента из тела растения, взятого для эксперимента, равен 1,5—2 мм. Сформулировано свойство тотипотентности клетки — способности давать начало целому организму растения.

Уже в 1922 г. В. Роббинсон и В. Коттс (США) доказали возможность культивирования изолированных корней растений.

Массовые исследования в этой области начались с 1932 г. (Р. Готре и Ф. Уайт — Франция, США). Они разработали методы культивирования разных объектов тканей древесных растений и растительных опухолей. К 1959 г. в стерильной среде выращено 142 вида высших растений. Вскоре были открыты гормоны роста (Скут Ф, Миллер С.), предложены методы выращивания больших масс клеточных суспензий, получения изолированных протопластов, гибридов, введения в протопласты вирусных РНК, клеточных органелл, клеток прокариот. Разработан метод клонального микроразмножения (Дж. Морел, Р. Г. Бутенко), метод культивирования с тканью-нянькой.

В настоящее время в данной области достигнуты серьезные успехи.

Методы и условия культивирования изолированных тканей и клеток растений

Выращивание изолированных клеток и тканей на искусственных питательных средах в стерильных условиях называется методом культуры изолированных тканей.

Методы и условия культивирования разработаны в наибольшей степени для практически важных семенных растений. Установлены общие требования к выращиванию объектов в культуре *in vitro* и влияние различных факторов на эффективность процесса культивирования.

Асептика. Выращивание фрагментов ткани и отдельных клеток требует полной асептики. Микроорганизмы, попавшие

в питательную среду, выделяют токсины и приводят к гибели культуры. Правилами асептики предусмотрены стерилизация воздуха, всего помещения, одежды, инструментов, а также стерилизация поверхности растительных тканей. Для стерилизации применяют сулему, перекись водорода, диацид, антибиотики. Убирают наружный слой клеток.

Питательные среды. Для культивирования изолированных клеток и тканей применяются многокомпонентные среды. Состав этих сред разнообразен, он включает все необходимые для растений компоненты — макро- и микроэлементы, углеводы, витамины и фитогормоны. Из углеводов применяются глюкоза или сахароза, они обязательны, так как ткани лишенные хлорофилла не способны их синтезировать.

Обязательными компонентами являются также гормоны роста ауксины, вызывающие дедифференцировку клеток, и цитокинины, индуцирующие деление клеток.

Быстрому росту способствует высокое содержание нитратов, ионов аммония, калия и фосфатов. Изначально низкое содержание фосфатов индуцирует синтез вторичных метаболитов.

Изучены эффекты, вызываемые изменением концентрации азота и фосфора, введением компонентов эндоспермы зародышей, различных экстрактов.

Для питательных сред используют очищенный агар-агар — полисахарид из морских водорослей.

К настоящему времени разработан ряд культуральных сред. Многие из них — специфические, пригодные для культивирования отдельных растений; есть и универсальная.

Влияние физических факторов (свет, температура, аэрация, влажность). Освещение в большинстве случаев не требуется. В некоторых случаях оно обеспечивает процессы вторичного синтеза, например, в культурах чайного дерева. Используются люминесцентные лампы для создания освещенности примерно 1000 люкс.

Для разных культур и метаболитов освещенность может иметь различное значение — как позитивное, так и негативное. Имеет особенности влияние качества света (длины волны).

Температура. Для большинства культур оптимальная температура 26°C. Описан случай с оптимальными значениями 32; 18—20 и 25°C. При изменении температуры резко изменяется содержание отдельных метаболитов.

Аэрация имеет очень большое значение. Особенно важно снабжать кислородом клетки в больших объемах ферментеров. При этом подавать воздух нужно снизу.

В емкостях небольших по объему (колбы) требуется постоянное *перемешивание*.

Влажность в помещении, где выращиваются культуры, должна иметь значения от 60 до 70 %.

Значение дедифференцировки тканей

Дедифференцировка есть утрата характерных черт исходной ткани. Дифференцированные клетки конкретных тканей, органов растения не обладают способностью к делению.

Дедифференцированные клетки образуют первичный каллус. Каллусная ткань возникает при неорганизованном делении дедифференцированных клеток. Она образуется на поврежденных растениях и в стерильных условиях на эксплантах — фрагментах ткани или органа.

Дедифференцировка и индукция каллусогенеза возникают под действием раковых гормонов (травматиновая кислота) при повреждении тканей. Вторым обязательным условием является наличие гормонов роста — ауксинов и цитокининов.

Ауксины вызывают дедифференцировку клеток, готовят ее к делению. Цитокинины инициируют деление.

Примерами *ауксинов* являются: 2,4-D (2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота), ИУК (индолилуксусная кислота).

Пример *цитокинина* — кинетин 6-БАП (6-бензиламинопурин).

При дедифференциации в клетках разрушаются клеточные органеллы, в частности хлоропласты, разрушается аппарат Гольджи и происходят некоторые другие изменения. Через несколько часов в условиях *in vitro* начинается новый синтез белка. Но когда израсходуются остаточные гормоны, то, при наличии в среде гормонов роста начинается каллусогенез.

Типы культур клеток или тканей

На агаризованной питательной среде при поверхностном культивировании образуется каллусная ткань. Она не имеет структуры, но может иметь разную плотность (рис. 2.12).

Клеточные суспензии образуются как при глубинном культивировании, так и непосредственно из экспланта. Разрыхлить плотную ткань можно, исключив ионы Ca^{2+} из питательной среды либо введением ферментов.

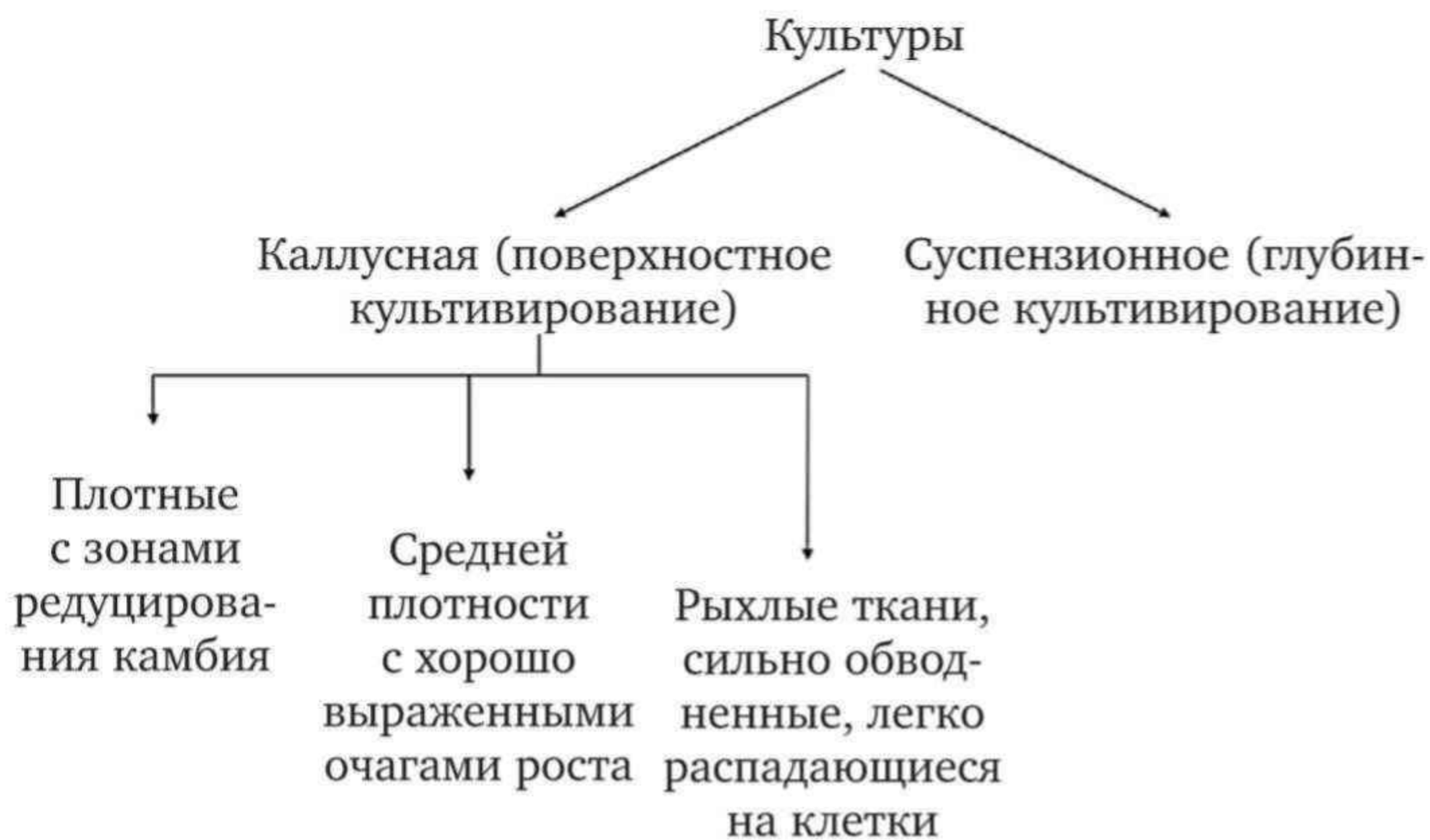


Рис. 2.12. Типы каллусных культур

Получить суспензию из плотной ткани можно при автоматическом перемешивании. Клеточные суспензии используют при введении чужеродных ДНК и при синтезе вторичных метаболитов.

Культура одиночной клетки дает клон — потомство, которое используется в генетических исследованиях.

Для культивирования одиночной клетки нужно в питательной среде создать достаточную концентрацию кондиционирующего (К) фактора, выделяемого делящимися клетками. Для этого используют следующие приемы.

1. Метод ткани-няньки — К. фактор выделяется находящимися рядом с одиночной клеткой кусочком ткани-няньки.
2. Метод «кормящего слоя» — К. фактор выделяют клетки суспензионной культуры того же растения.
3. Кондиционирование среды — добавление среды отфильтрованной от делящихся клеток.
4. Метод культивирования одиночной клетки в микрокапле (20 мкл) богатой питательной среды.

Характеристика каллусных клеток

Каллусная клетка имеет такой же цикл развития, как и другие: деление, растяжение, дифференцировка, старение и отмирание. Рост имеет S-образный характер и включает пять фаз (рис. 2.13).

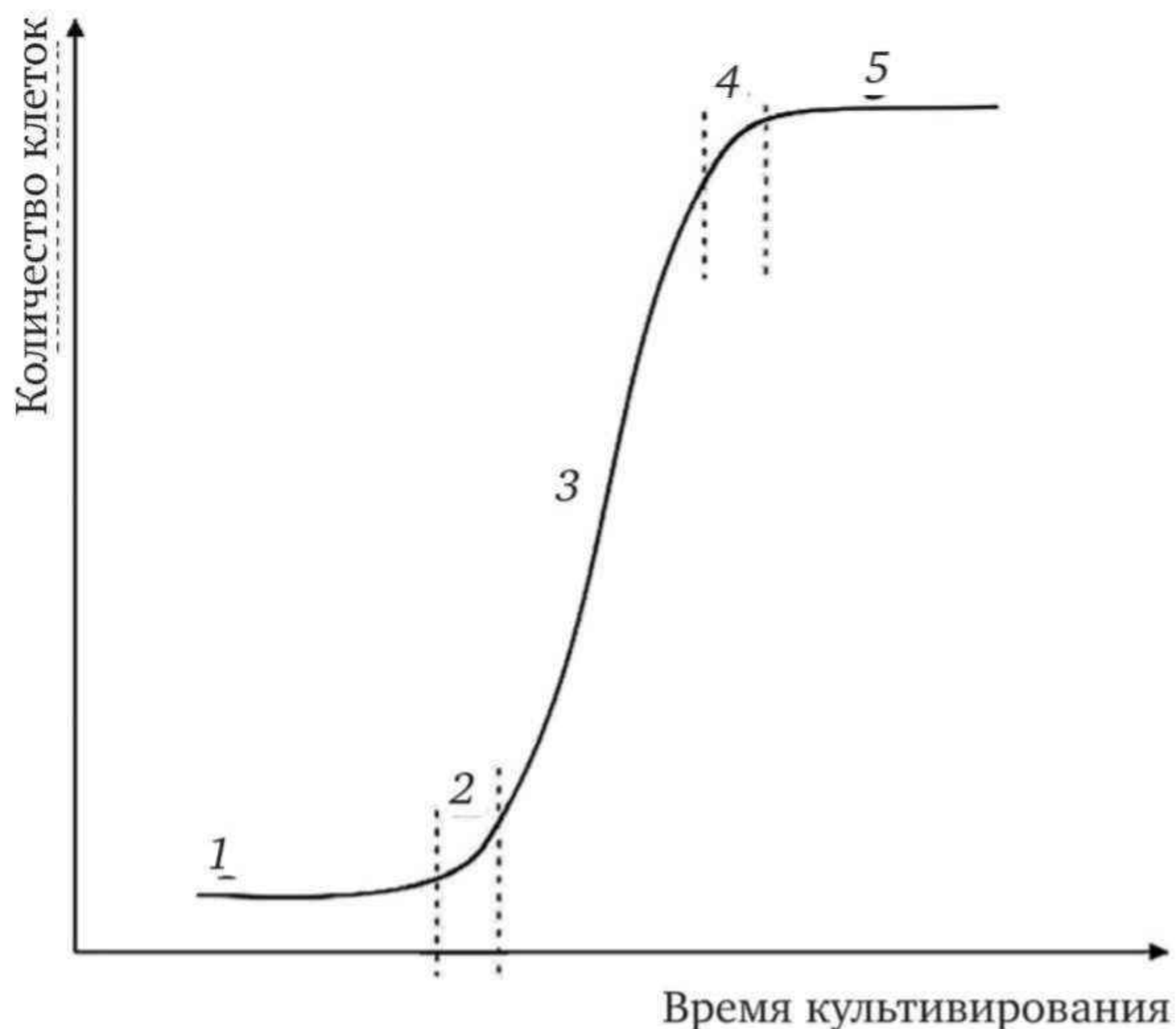


Рис. 2.13. Кинетика развития микроорганизмов

На рис. 2.13:

1 — латентная (лаг-фаза) — подготовка к делению;

2 — фаза экспоненциального роста (log-фаза), масса растет;

3 — линейная (постоянная скорость роста);

4 — замедление роста;

5 — стационарная, когда начавшееся отмирание еще компенсируется делением.

Далее — происходит отмирание.

Каллусные клетки и ткани сохраняют свойства растения, из которого они получены (морозостойкость и др.). Но есть и специфические качества, проявляемые при длительном культивировании — они образуют популяцию соматических клеток (типа неполовых). Свойствами этой популяции являются физиологическая асинхронность, генетическая гетерогенность и гормоннезависимость.

Физиологическая асинхронность — в каждый момент времени разные клетки популяции находятся в разных стадиях роста. Общее состояние оценивается по большинству. Причины разнообразны — генотип, стрессы, физические факторы.

Генетическая гетерогенность — возможна полиплоидия, анеуплоидия, генные мутации. Это очень важно в селекцион-

ной работе, поскольку позволяет отбирать штаммы с измененным генотипом.

После пяти — шести пересадок кариотип стабилизируется.

Гормоннезависимость — каллусные ткани образуются только в присутствии гормонов роста двух типов. Но есть исключения — незрелые зародыши пшеницы (без цитокининов) и семядоли подсолнечника — без ауксинов. Но при длительном культивировании все ткани становятся гормоннезависимыми, «привыкшими». Причина — выработка эндогенных гормонов. Подобно опухолевым клеткам они не способны к нормальной регенерации и образуют уродливые органоподобные структуры.

Морфогенез в каллусных тканях как проявление тотипотентности

Развитие многоклеточных организмов — сложная проблема биологии.

В культуре каллусных тканей из неорганизованной массы клеток возникают организованные структуры, т. е. происходят морфогенные процессы.

Через какое-то время, в зависимости от генотипа растения — донора и условий культивирования образуются «клетки-инициали» с утолщенной стенкой и более крупным ядром. В них начинается синтез определенных белков, интенсифицируется углеводный обмен. Между клетками восстанавливаются связи — плазмодесмы.

Установлено, что существует минимальная масса каллусных клеток, при которой уже детерминированные клетки способны к дальнейшему морфогенезу.

Гистогенез. Образование новых тканей происходит под действием фитогормонов, например, ауксина. Так, сосудистые элементы в каллусной ткани появлялись вблизи места прививки меристемы побега (место синтеза ауксинов).

Органогенез. Регенерация целого растения зависит от соотношения фитогормонов. Так, преобладание ауксина приводит к образованию корневой системы, а цитокинина — стеблей и побегов. Если такой каллус пересадить на свежую питательную среду с преобладанием ауксина, регенерируется целое растение.

Для начала морфогенеза необходим аммонийный азот, а для развития структур — нитратный.

Все морфологические изменения контролируются и активируются специальными генами.

Соматический эмбриогенез. Клетка-инициаль дает начало зиготе. Соматические эмбрионы воспроизводят генотип исходного растения. Они используются для получения искусственных семян.

Установлено, что на эмбриональном пути развития клетка приобретает свойство полярности. Полярность (биоэлектрический потенциал) связан с активным транспортом ауксина и ионов кальция.

Слабый постоянный электрический ток (2 мкА) может быть индуктором эмбриогенеза. Установлено также, что на синем свете морфогенный каллус образуется чаще, чем на красном или белом. Есть предположение также о существовании белков развития. Уделяется внимание и генетическому аспекту: в критические периоды развития активируются гены, контролирующие соматический эмбриогенез.

См. приложение, термин «морфогенез».

Изолированные протопласты

Изолированный протопласт — это содержимое растительной клетки, окруженное плазмалеммой. Целлюлозная стенка отсутствует. Этот объект представляет большой интерес. Он позволяет исследовать транспорт веществ через плазмалемму. В изолированные протопласты легко вводится генетическая информация из органелл и клеток других растений, прокариотических организмов и клеток животных. Установлено, что изолированный протопласт способен поглощать из окружающей среды как низкомолекулярные вещества, так и крупные молекулы, а также частицы (вирусы) и изолированные органеллы.

Для клеточной инженерии большое значение имеет способность изолированных протопластов к слиянию с образованием гибридных клеток. Это дает возможность получать новые растения как гибриды, обладающие новыми ценными качествами.

Небольшое количество протопластов некоторых растений (телорез, *Stratiotes aloides*) можно получить механическим повреждением ткани. Но этот метод малоэффективен. Современный ферментативный метод заключается в поэтапной обработке разными ферментами — целлюлаза, гемицеллюлаза, пектилаза. Ферментативный метод позволяет легко

и быстро выделять большое количество протопластов, не подвергая их сильному осмотическому шоку. Полученную смесь пропускают через фильтр и центрифугируют для удаления осколков.

Выделить протопласты можно из любых клеток. В любом случае требуется кропотливая подготовительная работа по подбору концентрации ферментов, их соотношения и времени обработки. Очень важным условием является правильный выбор осмотического стабилизатора (сахара и ионные соединения CaCl_2 , Na_2HPO_4 , KCl). Эти вещества называются осмотиками. Их концентрация должна быть несколько выше, чем концентрация в клетке (гипертонична). Тогда протопласты находятся в состоянии слабого плазмолиза, тормозится метаболизм и регенерация клеточной стенки.

Изолированные протопласты культивируются на тех же средах, что и клетки, и ткани. После удаления ферментов на протопласте начинается образование клеточной стенки. После регенерации стенки протопласт начинают делиться, т. е. ведет себя как клетка. Но регенерация целого растения из протопласта затруднительна. Успехи невелики — морковь, табак, петуния и некоторые другие. Лучше всего происходит регенерация из генетически стабильной клеточной культуры.

Использование метода культуры изолированных клеток и тканей

Метод используется в массовом клональном микроразмножении декоративных и плодовоовощных растений, а также в оздоровлении от вирусных и других инфекций. Расширяются возможности селекционной работы: получают клоны клеток и растения с запрограммированными свойствами. Клетки могут синтезировать в культуре такие вторичные метаболиты, которые необходимы для человека. Поэтому возникла целая промышленная отрасль получения таких веществ.

В настоящее время уже известно примерно $2 \cdot 10^4$ веществ, которые синтезируются растениями и используются человеком. Это — пищевые вещества, эфирные масла, красители и лекарства.

Из лекарств можно назвать:

- кодеин — болеутоляющее средство из *Papaver somniferum*;
- дигоксин — тонизирующий сердечную деятельность алкалоид из наперстянки (*Digitalis lanata*);

- хинин — антималярийное средство из хинного дерева (*Cinchona ledgeriana*).

Ряд таких веществ, если их употреблять систематически, могут вызвать привыкание и стремление к увеличению дозы. Высокие концентрации физиологически активных веществ (ФАВ) убивают человека. Самыми известными из таких веществ являются опиум и героин из мака, кокаин — из *Erythroxylon*, никотин — из различных сортов табака.

Из цветков растения *Chrysanthemum cinerariaefolium* получены мощные инсектициды — пиретрины. Они не вызывают у насекомых привыкания и не проявляют кумулятивного токсического эффекта.

В свое время было сделано предположение, что в стерильных условиях клетки и ткани растений, синтезирующих важные соединения, будут обладать такими же свойствами. В некоторых случаях это предположение оправдалось. Но в других оказалось, что клетки либо не синтезировали таких веществ вообще, либо синтезировали в минимальных количествах. Понадобились длительные эксперименты по подбору питательных сред, условий культивирования, исследованию новых штаммов. При исследованиях использовалась генетическая гетерогенность каллусных клеток, применялись мутагенные факторы.

В настоящее время многие вторичные метаболиты растений синтезируются в промышленных масштабах. Для синтеза используют суспензионную культуру клеток в регулируемых условиях. Этот процесс не зависит от климатических факторов и от повреждений вредителями. Не требуются большие массивы плантаций.

Культуры растительных клеток синтезируют практически все классы соединений вторичного обмена. Количества получаемых веществ в несколько раз превышают эффективность синтеза в целых растениях. Так, диосгенин в методе культуры изолированных тканей синтезируется в количестве 26 мг на 1 г сухой массы, а в клубнях целых растений только 20 мг.

В культурах клеток может начаться синтез веществ, не характерных для данного растения. Могут также синтезироваться вещества, которые образуются в растении только на ранних стадиях развития. Наконец, в отдельных случаях не образуется вещество, характерное для данного растения

(у мака соответственно сангвирин и тебаин). В культуре живокости (*Delphinium*) синтезируются стеринны, которые встречаются только в архаичных растениях.

Синтез вторичных метаболитов может коррелировать с процессом дифференцировки каллусных клеток (мак). Для табака и морковки синтез никотина и антоцианина не связан с дифференцировкой клеток.

С ростовыми процессами синтез вторичных метаболитов связан по-разному.

В большинстве случаев они синтезируются и накапливаются либо во время экспоненциальной фазы, когда ростовые процессы очень активны, либо в период стационарной фазы, когда рост клеточной массы прекращается. Но отмечены случаи, когда вторичные метаболиты сопровождают весь период роста.

Культивируемые популяции клеток часто проявляют большую стабильность в синтезе и накоплении продуктов. Так, штамм-сверхпродуцент ИФРДМ-0,5 стабильно синтезировал фураностаноловые гликозиды в течение 26 лет.

Большинство клеток в культуре не транспортируют метаболиты в питательную среду или в другие клетки. Исключение составляют клетки мака, которые выделяют алкалоиды в млечники. Вторичные метаболиты обычно синтезируются в клеточных органеллах — пластидах и в эндоплазматическом ретикулуме. Накапливание происходит в вакуолях и в свободном пространстве (СП) клеток.

На синтез вторичных метаболитов влияют различные факторы. Прежде всего, это — генотип растения-донора. Клетки высокопродуктивного растения также являются высокопродуктивными.

Важным фактором является состав питательной среды и концентрация ее компонентов. Эти компоненты должны способствовать увеличению количества клеток-продуцентов и, одновременно, стимулировать процесс синтеза. Первая цель достигается применением соединений азота и фосфора. Вторая — природой и концентрацией фитогормонов.

Большое значение имеет непрерывное перемешивание культуры в биореакторе.

Эффективным современным приемом является применение иммобилизации клеток, когда они помещены в носитель или адсорбированы на нем. Клетки остаются живыми, но не растут, а продолжают синтез метаболитов и их выделение в среду.

Часто синтез вторичных метаболитов останавливается на промежуточных соединениях. Конечный продукт удается получить биотрансформацией. Так называется изменение промежуточных метаболитов с помощью культур других растений или бактериальных клеток.

Бактериальные клетки могут подвергать полупродукты таким превращениям как гидроксилирование, эпоксидирование, глюкозирование, этерификация и присоединение к аминокислотам.

Например, культура клеток корня женьшеня может гликозировать фенольные соединения, продуцируемые культурой клеток корня *Panax ginseng*. Клетки лебеды и картофеля биотрансформируют индолил-3-уксусную кислоту в индолин-3-ацетил-L-аспарагиновую.

Суспензионные культуры клеток в промышленных масштабах дают большую экономическую выгоду, позволяя получать дешевую продукцию в запланированных количествах. При этом спасаются от уничтожения тысячи дикорастущих растений, ставших редкими.

Увеличение выхода, эффективности этих производств связано с развитием селекционной работы и исследований по оптимизации условий культивирования. Большие перспективы имеет применение методов биотрансформации и иммобилизации культивируемых клеток.

3. ПРОМЫШЛЕННОЕ ОСУЩЕСТВЛЕНИЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ. ОБОРУДОВАНИЕ

3.1. Технологические приемы и аппаратное оформление процессов культивирования на производстве

Промышленные биореакторы являются сложными многопараметровыми аппаратами. Они классифицируются по разным признакам:

- по размеру и целевому назначению (лабораторные, опытно-промышленные или пилотные и промышленные);
- по режиму работы (периодические и непрерывно действующие);
- по условиям культивирования (аэробные и анаэробные; мезофильные и термофильные; для поверхностного и глубинного культивирования; аппараты для жидких сред, твердофазные и газофазные).

Рассмотрим сначала наиболее распространенные промышленные установки периодического действия для глубинного культивирования биообъекта в жидкой питательной среде по всему объему реактора.

3.1.1. Системы перемешивания

Эти аппараты в первую очередь классифицируются по способу перемешивания:

- 1) на аппараты с механическим перемешиванием;
- 2) аппараты с пневматическим перемешиванием;
- 3) аппараты с циркуляционным перемешиванием.

Эти же аппараты классифицируют по принципу подвода энергии к той или иной фазе. Различают аппараты с подводом энергии к жидкой фазе, к твердой фазе и к газовой фазе.

Аппараты с механическим перемешиванием

Это — наиболее распространенные аппараты. Используются различные конструкции лопастей на центральном валу. В больших объемах мешалки многоярусные. Перегородки, приваренные к внутренней поверхности реактора, делают движение жидкости вихревым равномерным. Но перегородки могут обрастать грибами. Мешалка не должна разрушать мицелий грибов, суспензии клеток перемешиваются особенно нежно. Воронка сверху способствует аэрации, подаче кислорода. Для этого же используют полые мешалки, в них подают воздух. Рядом устанавливают вибратор-разбрызгиватель с барботером.

Такие аппараты широко применяются для культивирования дрожжей и получения продуктов с применением дрожжей.

Главным принципом конструкции является минимальное травмирование культуры.

Аппараты с пневматическим перемешиванием

Перемешивание осуществляется пузырьками газа.

Простейшее устройство для перемешивания — это барботер, подающий воздух в нижнюю часть. Для лучшего распределения над барботером ставят вращающиеся диски с отверстиями. Часто применяется также диффузор — широкая труба над барботером. Внутри диффузора создается эффективный поток жидкости вверх. Снаружи жидкость спускается вниз. Можно организовать циркуляцию и в обратном направлении.

Циркуляционные биореакторы

Применение циркуляционных контуров. Пневматическое перемешивание применяют в колоночных реакторах, разделенных на «этажи» горизонтальными перегородками с отверстиями. Это способствует интенсификации процесса аэрации и перемешивания. Перегородки препятствуют укрупнению пузырьков, снижают угрозу избыточного пенообразования.

Такие «тихоходные» установки хорошо работают при культивировании клеток животных и тканей. Часто в этих условиях пробуждаются синтетические возможности свойственные целым растениям (*Digitalis lanata*, синтез β -метилдигоксина). Барботажные колонны применяют при обработке промышленных отходов плесневыми грибами. Метод прост в исполнении, не требует больших затрат. Но он неприменим в системах с вязкими средами (грибы актиномицеты).

Но в соплоконусных реакторах струя воздуха врывается через узкое сопло на дне реактора в форме конуса. Биосинтез идет в пенном слое.

Аппараты с циркуляционным перемешиванием. Циркуляционный биореактор (по принципу падающей струи) с твердой насадкой для получения биогаза показан на рис. 3.1.

Циркуляция организована по замкнутому контуру. Жидкость увлекает за собой пузырьки газа. Насос может сочетаться с барботером.

В аппаратах типа «погруженной струи» насос перекачивает жидкость сверху вниз по внешней трубе, и она врывается в реактор снизу. Через эжекторы в стенках внешней трубы подсасывается воздух.

Многие циркуляционные биореакторы, подобно пневматическим, делятся перфорированными перегородками на горизонтальные секции. Это удобно в анаэробных процессах.

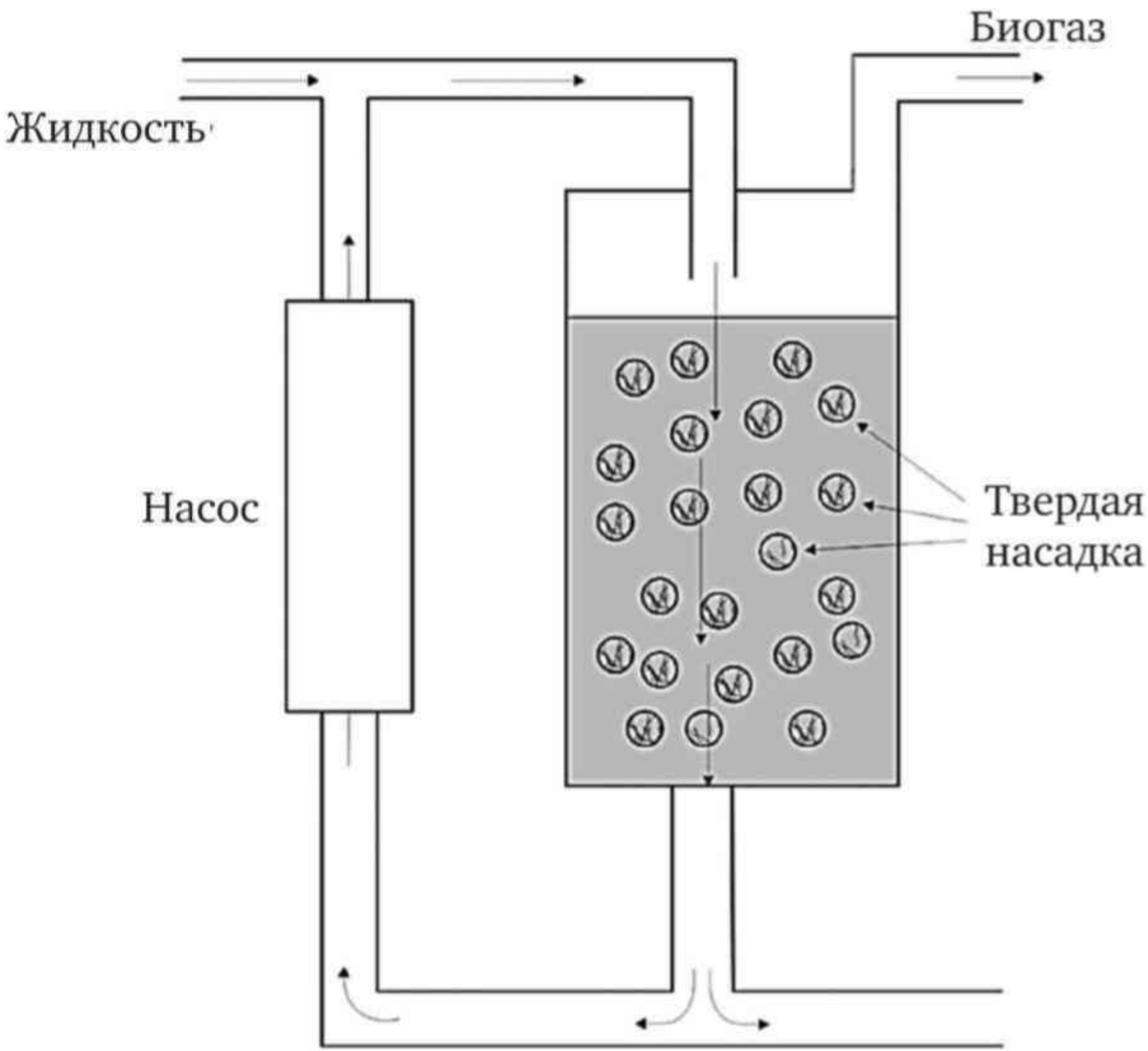


Рис. 3.1. Схема ферментера с внешней принудительной циркуляцией

Циркуляционные аппараты часто заполняются насадкой (твердые частицы). Это улучшает условия циркуляции. Для культивирования клеток используют песок, куски обожженной

глины, гранулы полимеров. Часто прикрепление к поверхности стимулирует развитие м.о. Если упругие частицы насадки содержат полости, где скапливается биомасса, то по окончании процесса биомассу выдавливают из насадки, а частицы вновь загружают в реактор.

Пока еще теоретические положения о связи между типом процесса и типом аппарата — в стадии разработки.

Одна такая система предложена Т. Адлером (1985 г.), который сопоставляет характеристики питательных сред и технологико-экономические параметры процессов в реакторах разных типов на основе трехмерной диаграммы, приведенной на рис. 3.2.



Рис. 3.2. Принципы классификации типов биореакторов

Например, механическое перемешивание не обеспечивает большой скорости массопередачи. Наиболее эффективный массообмен между газом и жидкостью достигается в реакторе циркуляционного типа.

Конструкции биореакторов постоянно совершенствуются.

Эффективность аэрации повышается с применением переносчиков кислорода, добавленных в среду для выращивания клеток. Эти добавки действуют по разному механизму:

а) переносчик принимает кислород из газа и передает в жидкость;

б) переносчик принимает кислород в жидкости и передает его клетке;

в) переносчик принимает кислород из газовой фазы и отдает его клетке.

3.1.2. Системы теплообмена, пеногашения и стерилизации

Эти системы нужны в реакторах всех типов.

Теплообмен. Теплообмен достигается с помощью труб с нагревающим или охлаждающим агентом, которые пропускают через полость реактора или оплетают его снаружи, образуя «рубашку».

При конструировании биореакторов стремятся к увеличению площади теплопередачи и к увеличению коэффициента теплопередачи. В качестве охлаждающего агента применяют холодную воду (артезианскую или охлажденную), а также специальные теплоносители — этиленгликоль, жидкий аммиак и др. Для нагрева используют горячую воду и пар.

Пеногашение. Борьбу с пенообразованием ведут химическим, механическим и акустическим методами.

Наиболее распространенные — химические методы с применением поверхностно-активных веществ (ПАВ). Эти вещества внедряются в стенки пузырьков и делают их неустойчивыми. Но полное пеногашение невозможно и нецелесообразно, так как в пене хорошо «приживаются» некоторые м.о. Эффективными пеногасителями являются жиры — растительные и животные, а также силиконовые масла, полиэфиры и спирты.

Разработаны различные механические устройства, сбивающие пену: лопасти, диски, барабаны.

Применяют и комбинированные методы.

Стерилизация. Наибольшее значение имеет термический метод для стерилизации оборудования и сред и фильтрационный для стерилизации воздуха или другого газа, подаваемого в реактор.

Для оборудования и сред лучший эффект дает влаготермический способ — пар или горячая вода. Высокая температура и давление обеспечивают быструю гибель бактериальных спор, которые часто попадают в островки теплоизоляции — глыбки субстратов, густые суспензии. Но сильное повышение температуры требует значительных финансовых затрат и может при-

вести к порче сред (особенно, их белковых компонентов). При повышенной температуре карбонильные группы сахаров реагируют с другими веществами, и переходят в неусваиваемую микроорганизмами форму. Кроме того, разлагаются витамины.

Поэтому при стерилизации сред используют отдельную стерилизацию компонентов либо химические методы и механическую фильтрацию. Здесь нужно иметь в виду, что фильтры быстро забиваются микроорганизмами.

Иногда химические изменения субстратов при термообработке положительно влияют на развитие м.о.

Из фильтров для воздуха (с низким содержанием м.о.) хорошо зарекомендовали себя фильтры из тефлона (диаметр пор $\sim 0,2$ мкм, но задерживающие частицы даже в 100 раз меньше вследствие физической адсорбции).

На втором месте — фильтры других видов: активированный уголь, стекловата, вискоза, целлюлоза.

Таким образом, эффективность систем теплообмена, пеногашения и стерилизации зависит от ряда факторов, рассмотренных выше — технологических (состав среды, особенности продуцента, температура, pH) и конструктивных (размеры аппарата, требуемая интенсивность перемешивания и барботаж, необходимость использования тех или иных средств контроля и автоматизации). Для оптимизации условий культивирования режим отрабатывается последовательно в реакторах меньшего масштаба — лабораторных и пилотных, и только затем — в промышленных аппаратах.

3.1.3. Проблемы масштабирования

Технология производственного процесса отрабатывается в следующем порядке:

- лабораторная установка объемом от 0,5 до 100 л;
- пилотная (опытно-промышленная) — от 100 л до 5 м³;
- промышленная — от 5 до 1000 м³ и более.

У лабораторных реакторов аэрация и перемешивание — как у промышленных, но чаще — механическое перемешивание и барботаж.

Теплообмен и стерилизация могут быть самостоятельными и несамостоятельными (баня, автоклав).

На лабораторных реакторах решаются следующие задачи:

1) измерение скорости роста клеток, утилизации субстратов и образования продукта;

2) расчет коэффициентов массопередачи (переноса кислорода);

3) расчет стехиометрических коэффициентов и брутто уравнений реакций.

Пилотные установки — «указывают путь». Они дублируют промышленный аппарат, позволяют исследовать потоки газов, жидкостей, теплоты. На этой стадии окончательно выбирается тип реактора. Переход от лабораторных установок к биореакторам пилотного типа позволяет уточнить масштабную модель.

В крупномасштабном производстве скорости перемешивания и синтеза могут отличаться от пилотной установки вследствие отличия гидродинамических, массо- и теплообменных процессов. При увеличении объема в реакторе появляются зоны неоднородности — слабого перемешивания и аэрации. Большой реактор можно представить как два сообщающихся малых, из которых только один — хорошо перемешивается и аэрируется.

Поэтому иногда приходится менять конструкцию.

Меняются также условия теплообмена. При увеличении масштаба отказываются от механической мешалки, которая привносит теплоту. Изменяется соотношение между объемом и поверхностью теплообмена. Приходится добавлять внутренние элементы. При увеличении объема становится более существенным вклад теплопродукции при диспергировании газа в жидкость (пневматическая энергия).

В целом масштабирование является сложной и дискуссионной проблемой. Есть мнение, что в большинстве случаев важнейшим является сохранение объемного коэффициента передачи O_2 . Вопрос сложен. Дополнительно возникает еще и проблема брызгоуноса.

Выбор надежных критериев масштабирования является важной проблемой.

3.1.4. Периодическое и непрерывное действие установок (организация работы)

Периодический процесс подобен естественному ходу сельскохозяйственных работ от весеннего засева до сбора урожая. Непрерывный процесс подобен работе оранжерей, где растения растут, цветут и плодоносят круглый год.

Периодический процесс включает стадии:

а) стерилизация сред, биореактора и вспомогательного оборудования;

- б) загрузка аппарата питательной средой;
 - в) внесение посевного материала (клетки, споры);
 - г) рост культуры, который может совпадать с синтезом;
 - д) синтез продукта (может совпадать с ростом);
 - е) отделение и очистка продукта;
 - ж) мойка биореактора и его подготовка к новому циклу.
- В экспоненциальной фазе прирост биомассы

$$\frac{dC}{dt} = \mu C, \quad (3.1)$$

где μ — удельная скорость роста (коэффициент пропорциональности); C — концентрация; t — время.

В интегральной форме:

$$\ln C - \ln C_0 = \mu(t - t_0). \quad (3.2)$$

Ценные продукты синтезируются либо в экспоненциальной фазе (нуклеотиды, многие ферменты, витамины — первичные метаболиты), либо в стационарной фазе (антибиотики, красящие вещества — вторичные метаболиты или идиолиты).

Так, анаэробная бактерия *Clostridium acetobutylicum* вначале образует кислоты (в основном, масляную), а уже при пониженном pH — нейтральные продукты ацетон и бутанол. Этот процесс — двухфазный.

На практике организуют дифференцированные режимы культивирования, т. е. проводят ступенчатое изменение режима аэрации и перемешивания.

Применяется также периодическое культивирование с подпиткой, когда помимо внесения питательных веществ до введения объекта, питательные вещества добавляют еще порциями или «по каплям». Иногда добавляют биообъект.

При объемно-доливочном культивировании культуру регулярно «омолаживают», изымая часть объема и добавляя такой же объем среды (полунепрерывный метод).

Периодическое культивирование иногда сочетают с диализом. В этом методе субстрат непрерывно подают в культуральную жидкость через специальную мембрану. Диализ уменьшает концентрацию ингибиторов жизнедеятельности, которые непрерывно накапливаются. Одновременно удаляется часть жидкости, и урожай биомассы концентрируется.

Непрерывные процессы. В непрерывных процессах биообъект постоянно поддерживается в наиболее активной экспо-

ненциальной фазе роста. Для этого в биореактор непрерывно подают свежую питательную среду и так же непрерывно выводят культуральную жидкость, содержащую биообъект (обычно клетки) и продукты его жизнедеятельности.

Главным принципом здесь является равновесие между приростом биомассы за счет деления клеток и их убылью за счет разбавления содержимого реактора свежей питательной средой:

$$\mu = D, \quad (3.3)$$

где μ — удельная скорость роста клеток (см. уравнения (3.1) и (3.2)); D — коэффициент разбавления (скорость убыли концентрации).

В непрерывном режиме культивирования различают *хемостатный* и *турбидистатный* метод.

В хемостатном режиме в биореактор с постоянной скоростью подается питательная среда, один из компонентов которой (например, O_2) содержится либо в избытке, либо в недостатке. В саморегулирующейся системе биореактора равновесие (3.3) между поступлением (П) и оттоком (О) устанавливается автоматически:

- если $C_{(П)}^{O_2} < C_{(О)}^{O_2}$, рост м.о. замедляется
- если $C_{(П)}^{O_2} > C_{(О)}^{O_2}$, рост м.о. активизируется и начинает концентрироваться биомасса.

Такой биореактор называется *хемостатом*. Он состоит из следующих частей:

- устройство для вливания питательной среды;
- выпускное приспособление для оттока;
- система контроля скорости потока.

В простейших вариантах насос подает жидкость с постоянной скоростью, а отток происходит через вертикальную трубу, как только уровень жидкости поднимется до верхнего края трубы.

Есть и более дорогостоящие методы, но более точные, в которых контролируется масса реактора либо используются радиоактивные и фотоэлектронные датчики.

Турбидистатный режим основан на прямом контроле концентрации биомассы. С помощью датчика (например, фотоэлемента) контролируется концентрация биомассы. Повышение концентрации служит сигналом к увеличению скорости потока и наоборот.

Турбидистат отличается от хемостата только системой контроля скорости потока.

Хемостаты успешно применяются при малом протоке, низкой скорости процесса. Турбидистаты применяются при высокой скорости роста, когда концентрация резко изменяется при изменении скорости потока и датчик срабатывает. Этот метод используется в основном при культивировании клеток. В турбидистате автоматически «приживается» наиболее быстро-растущий штамм. Затруднением является налипание клеток на фотоэлемент.

Существуют также одностадийное культивирование в одном реакторе и многостадийное одновременно в нескольких реакторах, расположенных последовательно или каскадом. При многостадийном культивировании режим в аппаратах дифференцирован.

В самом простом случае свежая среда подается в первый аппарат. В более сложных случаях ее вводят и на других стадиях. В этой схеме отдельные порции биомассы возвращают с более «поздних» стадий к более «ранним» (система рециркуляции). При этом увеличивается общий выход биомассы за счет возрастания скорости деления на ранней стадии.

При разработке новых процессов начинают с периодического культивирования. Переход к непрерывному методу целесообразен для больших масштабов производства. Он позволяет сократить время на погрузку и разгрузку реакторов, чистку и мойку.

Недостатки непрерывного метода: сложная конструкция аппаратов и система контроля, высокие требования к надежности аппаратов, так как выход из строя только одного приводит к нарушению работы всех других. Выход продукта на единицу объема аппарата здесь выше, но концентрация всегда ниже. Длительная эксплуатация аппаратов приводит к обрастанию труб и стенок. Мутантные или генно-инженерные штаммы продуцентов часто теряют свои свойства.

3.1.5. Специализированные процессы и реакторы

Анаэробные процессы

Эти реакторы не имеют системы аэрации. Но в некоторых случаях нуждаются в подаче водорода, метана или других газов. В этом случае они снабжаются барботером и другими необходимыми приспособлениями.

Перемешивание осуществляется тихоходной механической мешалкой либо созданием тока жидкости по контуру циркуляции.

Иногда добавляют детали для предохранения от контакта с воздухом (кислородом воздуха).

Эти реакторы более дешевые, поэтому есть стимул разрабатывать именно анаэробные процессы, например, для очистки сточных вод.

Твердофазные и газофазные процессы

В некоторых случаях роль жидкой фазы сводится к минимуму, она лишь увлажняет поверхность или газ, но большое значение имеет контакт объекта с газом.

Для культивирования мицелиальных грибов или дрожжей разрабатываются твердофазные процессы трех видов.

1. *Поверхностные* процессы. Слой субстрата (например, соломы) имеет толщину лишь 3—7 см («тонкий слой»). Размещается на подносах из алюминия или в специальных культивационных камерах.

2. *Глубинные твердофазные* процессы в *неперемешиваемой* жидкости («высокий слой»). Используются глубокие открытые сосуды, иногда с приспособлениями для конвекции.

3. В *перемешиваемой и аэрируемой* массе субстрата, которая может быть и гомогенной (жидкий навоз) и гетерогенной (частицы твердого субстрата взвешенные в жидкости). Для того, чтобы не травмировать биообъект, применяют механические мешалки с низкой скоростью вращения либо мешалки шнекового типа (микробиологическое выщелачивания сернистых соединений из каменного угля).

Преимущества твердофазных процессов:

- меньшие затраты на оборудование и эксплуатацию;
- более простое отделение и очистка продукта;
- нет опасности заражения посторонней микрофлорой, так как содержание воды низкое;
- нет сточных вод, которые загрязняют окружающую среду.

Проблемы *твердофазного* культивирования связаны с отсутствием перемешивания и местным, зональным распределением объекта. Вырастают отдельные колонии, которые исчерпывают питательные вещества субстрата, в то время как рядом оно в избытке. Чтобы смягчить эту проблему практикуют многократный отъем массы субстрата с биомассой и внесение экви-

валентного количества свежего перемешиваемого субстрата. Получается полунепрерывный режим.

Проблемой является также контроль эффективности аэрации, температуры и влажности разных участков.

Газофазный процесс осуществляют в камерах, где твердый наполнитель с мелкими агрегатами клеток «парят» в токе газа, который поступает из сопла на дне аппарата. Газ, покидающий аппарат несет летучие продукты жизнедеятельности, например, спирт.

Поверхностные процессы включают культивирование в жидкой питательной среде вблизи раздела фаз «газ — жидкость». Этот метод по эффективности уступает глубинному методу. Однако он необходим в случае накопления продуктов во внеклеточной культуральной среде или требуется контакт м.о. с воздушной средой. Он применяется на определенных стадиях развития мицелиальных грибов.

Метод экономичен вследствие простоты изготовления и эксплуатации биореакторов.

3.2. Отделение, очистка и модификация продуктов биосинтеза

Выделение целевого продукта является завершающей стадией биотехнологического процесса. Возможны три варианта образования продукта, которые влияют на выбор способа его выделения:

- продукт биосинтеза накапливается в клетке;
- продукт биосинтеза выделяется в культуральную жидкость;
- продуктом является сама биомасса.

В первом случае клетки отделяют от жидкости, клетки дезинтегрируют (разрушают), а затем очищают продукт от массы разрушенных клеток.

Во втором случае выделение очень облегчается, когда продукт выделяется (экскретируется) в культуральную жидкость.

Для выделения и очистки индивидуального химического продукта применяют разные методы в зависимости от природы вещества.

Например, ферменты протеазу, целлюлазу и другие выделяют путем осаждения органическими растворителями или

сульфатом аммония. Эти ферменты по характеру их применения не требуют полной очистки. Но зато эндо- и экзонуклеазы, а также лигазы для генной инженерии требуют тончайшей поэтапной очистки и разделения.

Традиционные процессы третьего типа вообще не требуют отделения продукта.

3.2.1. Отделение биомассы от культуральной жидкости

Разделение жидкости и биомассы называется сепарацией. Предварительно может потребоваться изменение рН, нагревание, добавление коагулятов белков и др. Методы сепарации различны.

1. Флотация. Метод используется, когда клетки не смачиваются жидкостью и собираются (концентрируются) в пене. Во флотаторах жидкость вспенивают и собирают верхний слой пузырьков газа с прилипшими клетками путем сцеживания, откачивания или соскребыванием.

Метод экономичен, производителен, пригоден для непрерывных процессов.

2. Фильтрация. Все известные на сегодня фильтры действуют по единому принципу — задержание биомассы на пористой фильтрующей перегородке. При этом размер пор не играет особой роли. Если поры больше размера клетки отделение идет плохо только в начале. Затем клетки прилипают к стенкам пор, образуют скопления, которые утолщаются и скорость потока падает.

Слой биомассы, забивающий поры, можно удалять автоматически. Биомассу сдувают сжатым воздухом либо срезают ножом (на барабанном вакуум-фильтре, рис. 3.3).

Существуют фильтры однократного и многократного периодического использования. Мембранные, например, тефлоновые фильтры позволяют фильтровать очень разбавленные суспензии. Чтобы они не повреждались при срезании или сдувании, их покрывают гидрофильным слоем, который предотвращает прилипание белков (коллоидов) к мембране.

3. Центрифугирование. Метод основан на осаждении взвешенных в жидкости частиц действием центробежной силы.

Это оборудование дорогостоящее. Оно может окупаться в следующих случаях:

- суспензия фильтруется медленно;
- необходимо максимально освободить жидкость;
- необходимо наладить непрерывный процесс.

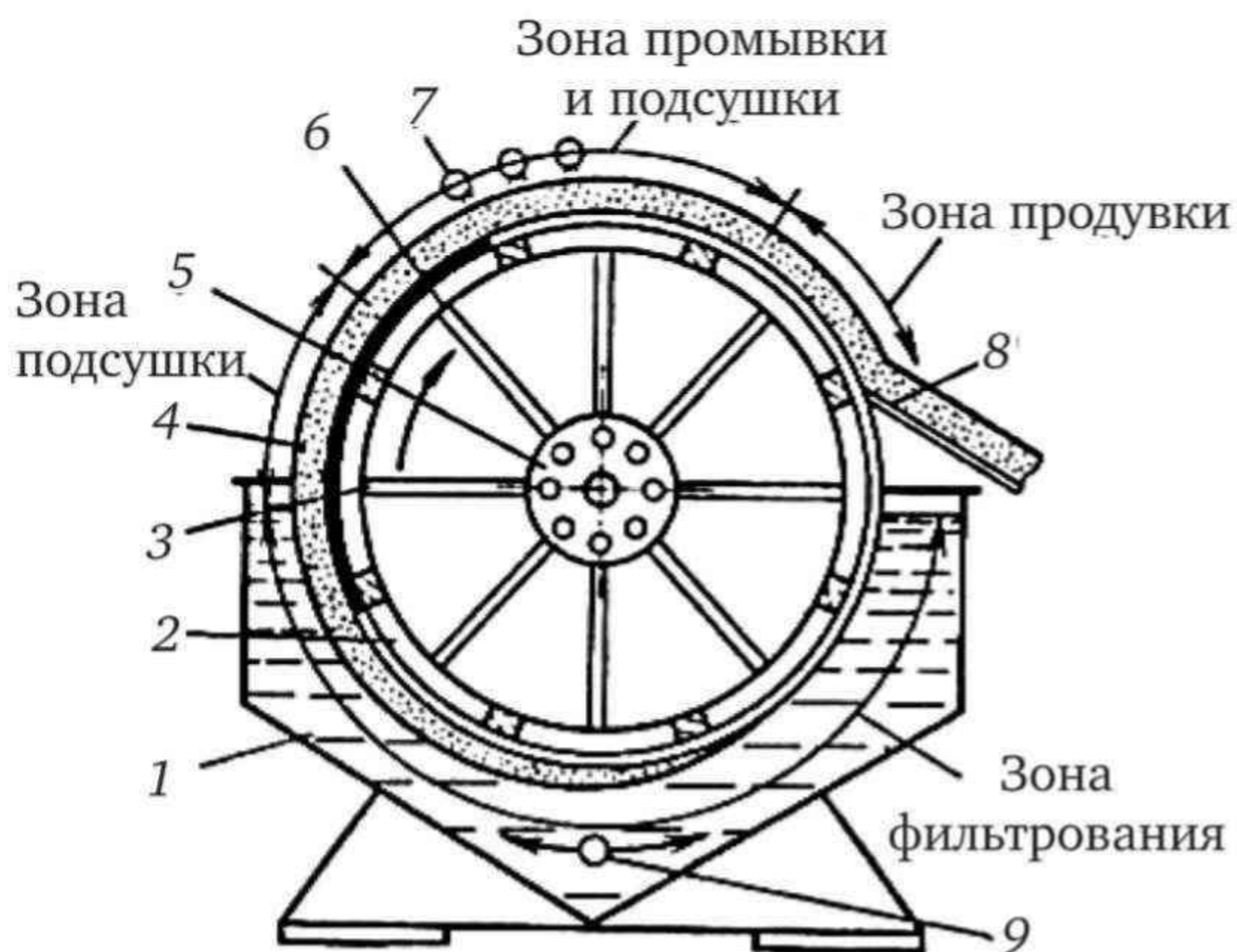


Рис. 3.3. Принципиальная схема фильтрации суспензии на барабанном вакуум-филт্রে:

1 — корпус; 2 — барабан; 3 — перегородка; 4 — осадок; 5 — трубка для соединения секций с поверхностью головки; 6 — подвижная головка филтра, на которой натянуты сетка и фильтровальная ткань; 7 — форсунки для разбрызгивания воды; 8 — нож для снятия осадка; 9 — мешалка для взмучивания суспензии

Иногда применяют фильтрационные центрифуги, где филтрование сочетается с центрифугированием. Широко используются центрифуги без филтрации. Применяются различные конструкции. Наиболее перспективны центрифуги-сепараторы, где биомасса оседает, например, на стенках вращаемого цилиндра.

3.2.2. Методы разрушения клеток

Разрушение (дезинтеграция) клеток проводится физическими, химическими и химико-ферментативными методами.

Промышленное значение имеют, в основном, физические методы:

- 1) ультразвук;
- 2) вращающиеся лопасти и вибраторы (используются в пилотных и промышленных установках);
- 3) встряхивание со стеклянными бусами;
- 4) продавливание через узкое отверстие под высоким давлением;
- 5) раздавливание замороженной массы;

- 6) растирание в ступке;
- 7) осмотический шок;
- 8) замораживание — оттаивание;
- 9) сжатие клеточной суспензии с последующим резким снижением давления (декомпрессия).

Физические способы наиболее экономичны. Они не требуют дорогостоящих и дефицитных реактивов и ферментных препаратов.

Однако эти методы не избирательны. Лишь в отдельных случаях тонкая регулировка позволяет выделить конкретный индивидуальный продукт.

Химические и химико-ферментативные методы являются осторожными и избирательными. Так, клетки грамотрицательных бактерий обрабатывают лизоцимом в присутствии этилендиамина тетрауксусной кислоты, а клетки дрожжей — зимолиазой улитки или ферментами грибов. Для получения дрожжевого автолизата и ряда ферментов клеточные стенки м.о. разрушают обработкой толуолом или бутанолом. Так же действуют антибиотики, некоторые ПАВ и глицин.

Можно использовать автолиз клеток при лимитированном по определенному компоненту субстрата росте или лизис при заражении бактериофагом.

После дезинтеграции необходимо отделить фрагменты клеточных стенок. Для этого используют сепарирование и фильтрацию. Применяют более скоростные центрифуги и фильтры с меньшим диаметром пор, чем при отделении клеток, так как здесь частицы меньше.

Клеточные стенки отбрасывают как балласт, но иногда используют именно их.

3.2.3. Отделение и очистка продукта

Из культуральной жидкости или из гомогената разрушенных клеток продукт выделяется методами осаждения, экстракции и адсорбции.

Осаждение проводят физическими методами (нагревание, охлаждение, концентрирование) и химическим переводом в малорастворимое соединение. Так, белки осаждаются добавлением $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и органических растворителей — этанола, ацетона.

Экстракция подразделяется на твердо-жидкофазную (перевод из твердого в жидкое) и жидко-жидкофазную (перевод из жидкого в жидкое).

Пример первого процесса — обливание руды водой после бактериальной обработки с извлечением растворимых солей.

Пример второго — экстракция витамина B_{12} фенолом или бензиновым спиртом.

Эффект экстракции повышается разными приемами — многократной обработкой свежими порциями растворителя, правильным выбором растворителя, нагреванием, понижением давления.

Разработан метод криоэкстракции (на холоде), в этом случае нивелируется различие между фазами. Таким образом, органические кислоты извлекают аммиаком в виде солей аммония. Неполярные соединения извлекают пропаном или бутаном. При последующем осторожном подогревании они улетучиваются.

Адсорбция — это частный случай извлечения растворенного вещества в другую фазу, когда извлекателем является твердое тело. Так, для выделения антибиотиков и витаминов применяют древесный уголь и глины.

Современные методы разделения — хроматография, электрофорез, изотахофорез, электрофокусировка основаны на принципах экстракции и адсорбции.

Хроматография основана на распределении вещества между несмешивающимися фазами.

Различают хроматографию на бумаге, пластинках, колонках.

Одна из фаз — неподвижная (бумага, силикагель, гранулированный гель). Вторая — подвижная (движущийся растворитель).

Колоночная хроматография чаще используется в промышленных способах разделения. Она имеет разновидности — ионообменная, молекулярная, аффинная.

1. *Ионообменная* основана на том, что гранулы адсорбента (карбоксиметилцеллюлоза) несут заряженные группы: либо катионные ($-NH_3^+$), либо анионные ($-SO_3^-$). Они захватывают ионы противоположного знака (например, цеолит смягчает воду, задерживая Ca^{2+} и Mg^{2+}).

2. *Молекулярная* основана на разделении по принципу разной молекулярной массы или диаметра (метод молекулярных сит, гель-хроматография, гель-флотация). Адсорбент захватывает и удерживает молекулы определенного размера. На рис. 3.4 показано, что задерживание компонента раствора

в этом случае происходит за счет пространственного соответствия размера задерживаемой частицы и диаметра каналов между частицами, наполняющими колонну.

3. *Аффинная хроматография* — это способ, в котором задерживается компонент, образующий комплекс с лигандом, фиксированном на носителе. Например, фермент очищают путем связывания на колонке, несущей субстрат или специфический ингибитор. На рис. 3.4 показано, что задерживание компонента раствора в этом случае происходит за счет пространственного соответствия формы задерживаемой частицы и параметров микрорельефа у наполнителя колонны.

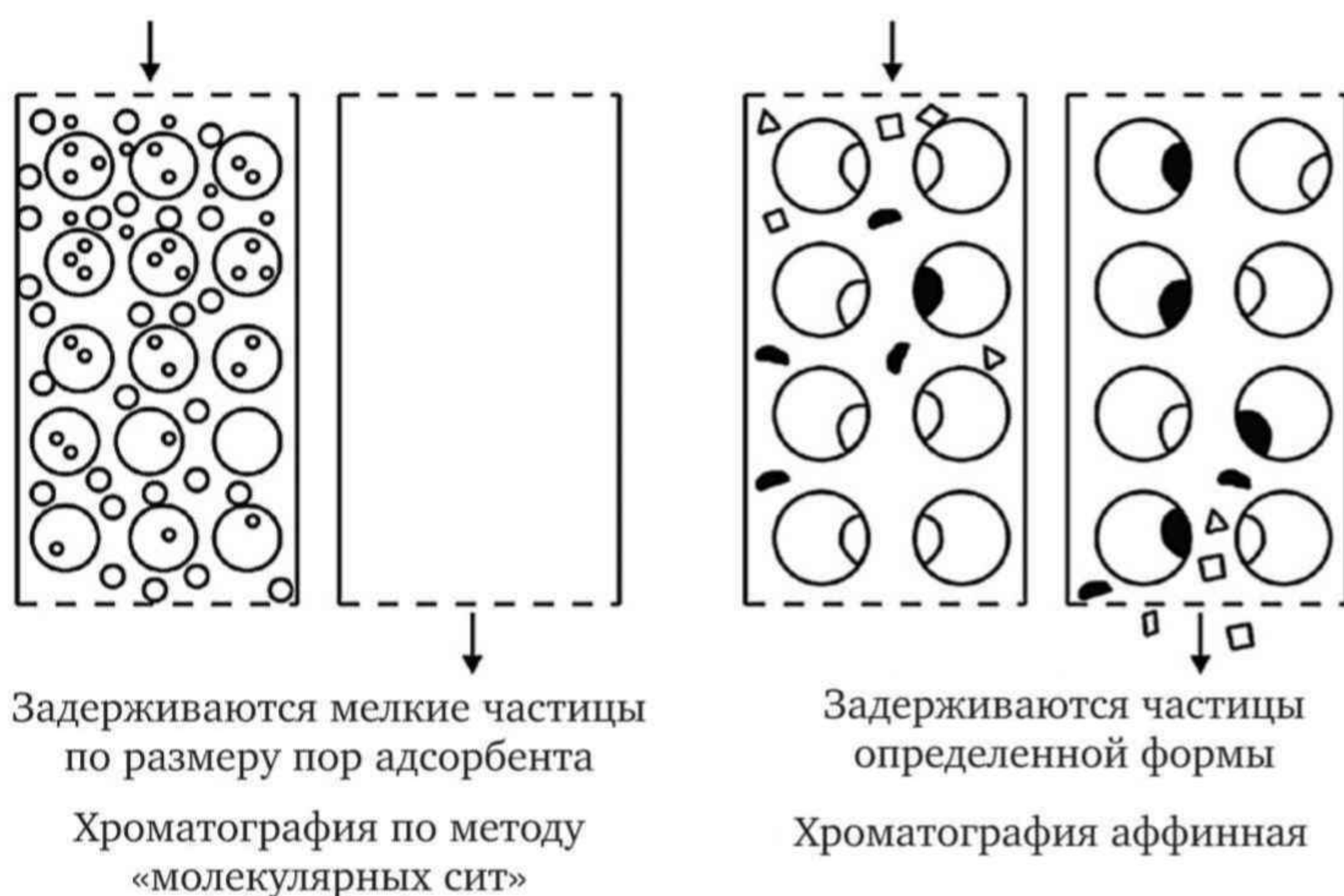


Рис. 3.4. Хроматографические методы очистки ферментов

Хроматография, основанная на взаимодействии антигенов и антител, называется иммуноаффинной. Этот метод позволил за один этап провести 500-кратную очистку человеческого интерферона.

В аффинной хроматографии используются также групповые лиганды, связывающие сходные по структуре ферменты или лиганды, связывающие определенные классы веществ, например, красители.

Сложные многокомпонентные смеси — культуральные жидкости, экстракты клеток методом аффинной хроматографии полностью очищаются за одну стадию с небольшими затратами

труда и времени. Недостатком являются дороговизна материалов-лигандов и необходимость их очистки, регенерации.

После пропускания через колонку порции культуральной жидкости частицы геля должны быть очищены.

Методы очистки основаны на эффектах:

1) плотность частиц геля должна быть выше плотности частиц, которые закупоривают колонку, тогда гель легко промывается;

2) гель и загрязняющие частицы должны отличаться магнитными свойствами, это позволяет разделить их в магнитном поле;

3) частицы геля упаковываются на ленте, имеющей вид ячеистой оболочки; лента, вращаясь, проходит то через раствор с продуктом, то через буферный раствор, куда и переходят загрязнения.

Очищающий гель изготавливается из агарозы. Это — непрочный материал, он не позволяет делать колонку высокой и широкой, так как при этом нижние слои раздавливаются, а центральные не поддерживаются стенкой. Мелкие частицы геля, наиболее эффективные для очистки, уносятся потоком жидкости.

Поэтому стоит задача укреплять этот гель.

В крупномасштабном разделении и очистке продуктов биотехнологии используются также приемы аффинной преципитации и аффинного разделения.

Аффинная преципитация заключается в том, что лиганд прикрепляется к растворимому носителю. При добавлении в раствор смеси, содержащей выделяемый белок, он присоединяется к лиганду и образует нерастворимый осадок.

*Биомембранные системы*¹ — можно использовать для создания высокоэффективных биореакторов. При этом сочетаются биологические и мембранные процессы. В одном из вариантов такого реактора культуральная жидкость фильтруется через мембранный биофильтр и освобождается, таким образом, от клеток. Бесклеточная жидкость б.к.ж. возвращается в биореактор.

3.2.4. Масштабность методов разделения и очистки

Из числа рассмотренных методов разделения и очистки, в крупномасштабном производстве внедрены только ионооб-

¹ Федоренко Б. Н. Промышленная биоинженерия: инженерное сопровождение биотехнологических производств : учебник для студентов вузов. СПб. : Профессия, 2016.

менная хроматография и аффинная. Применение остальных ограничено лабораторными масштабами.

Однако среди практически важных биотехнологических продуктов многие производятся именно в лабораторных масштабах с лабораторными биореакторами. Для них используются тонкие препаративные методы разделения. Таковы технологии получения целлюлазы, глюкоаминазы. Спрос на эти продукты полностью удовлетворяется лабораторными биореакторами.

Испытанные методы очистки совершенствуются. Например, режим многократной специальной термообработки для очистки α -амино- ϵ -капроновой кислоты при 68°C при $\text{pH} = 6,3$ в течение 15 мин позволил повысить чистоту (в 9 раз). Для этого в среду был добавлен пиридоксальфосфат.

3.2.5. Концентрирование продукта

Методы концентрирования: обратный осмос, ультрафильтрация, выпаривание.

Если мембрана задерживает растворенные в воде вещества, а воду пропускает в раствор с более высокой концентрацией, процесс называется *обратным осмосом* (рис. 3.5).

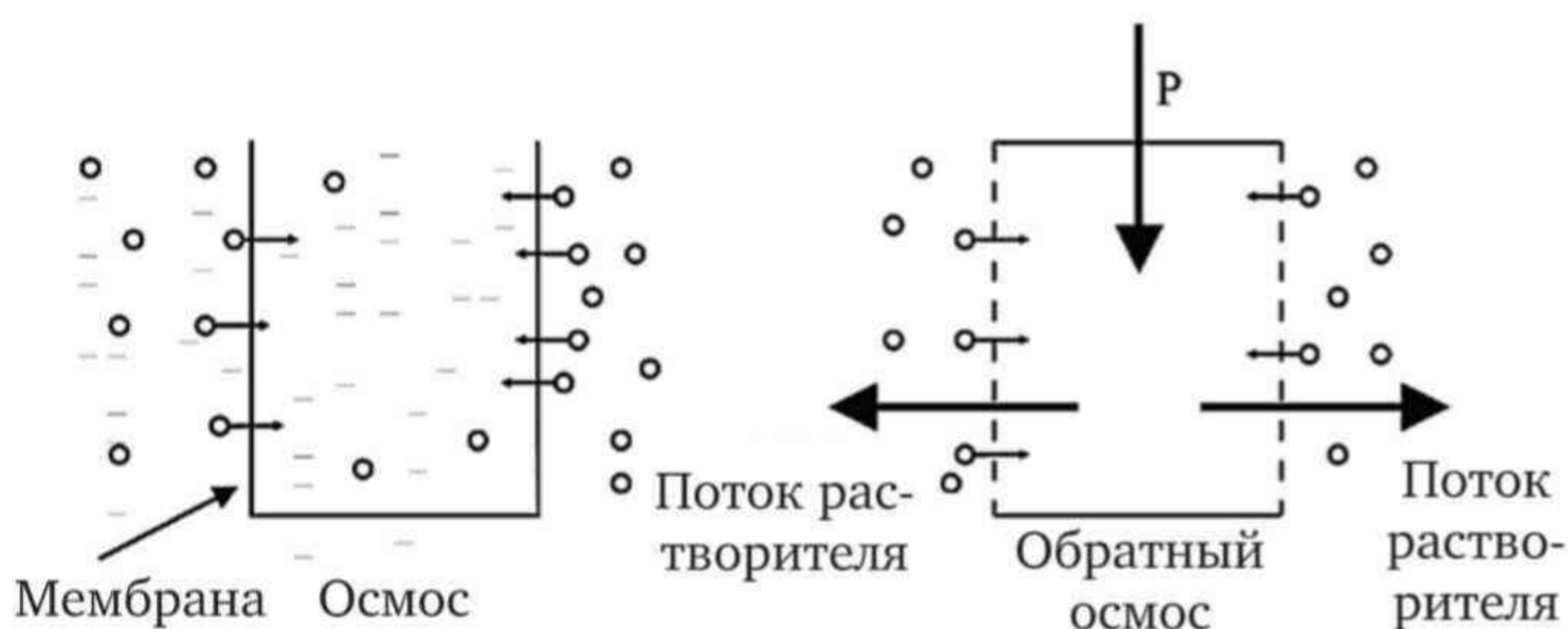


Рис. 3.5. Схема действия осмотической очистки

Ультрафильтрация — способ очистки раствора, при котором он под давлением прогоняется сквозь мембранный фильтр с величиной пор $0,002\text{—}0,1\text{ мкм}$.

При давлении $200\text{—}400\text{ кПа}$ скорость протока через фильтр достаточно высока.

Технология ультрафильтрации простая, экономичная, не разрушает продукты, не требует химического воздействия (изменение pH , ионной силы раствора, перевода в другую фазу). Типы мембранных фильтров сформулированы на рис. 3.6.



Рис. 3.6. Типы мембранных фильтров

Этот метод применяется для выделения малостабильных продуктов — молочной и глутаминовой кислоты, антибиотиков, ферменты.

Выпаривание — очень простой и старый способ. Но для удаления воды раствор нужно греть. При этом термолабильные вещества разрушаются. В настоящее время используются вакуум-выпарные установки с низкой температурой выпаривания и неразрушающими условиями.

Нагревающим агентом являются чаще всего водяной пар, хотя используют и другие варианты. Пар имеет большую теплоту конденсации, процесс выпаривания легко регулируется.

Выпарные аппараты бывают периодически и непрерывно действующими, с однократной и многократной циркуляцией кипящего раствора. Выпариваемый раствор получает теплоту от нагревающего агента через систему труб, змеевиков или паровую рубашку.

Раствор должен кипеть равномерно без местных перегревов. В современных конструкциях для улучшения испарения раствор растекается тонкой пленкой по нагретой поверхности.

При упаривании получают сиропообразный жидкий продукт.

Исчерпывающее удаление влаги и получение «сухого продукта» выделяется в особую стадию обезвоживания (сушку).

3.2.6. Обезвоживание продукта

В зависимости от физико-химических свойств обезвоживаемого продукта, вязкости раствора, от стабильности продукта или его жизнеспособности применяются различные методы обезвоживания.

Наиболее старым методом является сушка на *подносах*.

Термостабильные антибиотики и аминокислоты сушат методом ленточной сушки, когда поднос заменяется подогреваемым ленточным конвейером.

Более современным методом является сушка в *кипящем слое*. Пар, воздух, CO_2 , топочные газы могут служить нагревательным агентом. Они подаются в сушильный аппарат снизу, а частицы продукта парят в газовом потоке. Аппарат аналогичен газофазовому реактору.

В этом методе можно регулировать в широких пределах интенсивность массопередачи и теплообмена. Непрерывный процесс организуется в аппарате простой конструкции. Ограничением метода является прилипание продукта к стенкам аппарата.

Метод используют для сушки антибиотиков, аминокислот, крахмала, но не суспензий клеток.

Для обезвоживания микробных суспензий *используют барабанные сушилки*. В этих установках вращающиеся подогреваемые изнутри барабаны частично погружены в сосуд с суспензией. На поверхности барабана суспензия обезвоживается, образует пленку и соскребается с него ножом.

Вакуум-сушильные шкафы служат для обезвоживания материалов, наиболее чувствительных к нагреву. Процесс идет при пониженной температуре и давлении. Но эти аппараты трудно обслуживать, они часто выходят из строя.

Распылительные сушилки превращают раствор или суспензию в аэрозоль путем пропускания раствора через форсунку под давлением.

В сушильной камере аэрозоль встречается с нагретым газом — теплоносителем при 110—150°C.

Для термолабильных веществ и живых клеток метод использовать нельзя. После этой обработки выход жизнеспособных клеток не превышает 20—30 %.

Распылительная сушка совершенствуется в направлении понижения температуры путем более тонкодисперсного распыления.

Другим недостатком метода является налипание недосушенного продукта на стенки сушильной камеры.

Налипание влажных частиц на стенки снижает стабильность работы аппарата. С целью уменьшения размеров частиц и ускорения высыхания требуется понизить вязкость раствора

(суспензии). Этого можно достичь путем нагревания раствора и путем его разбавления и создания оптимального pH.

Однако оба эти способа не лишены побочных отрицательных эффектов.

Полученный сухой продукт поступает на хранение либо подвергается химической модификации.

3.2.7. Модификация продукта

В ряде случаев биореактор выдает не готовый продукт, а его «заготовку». Например, биосинтезированный антибиотик (пенициллин G) можно модифицировать с получением ампициллина, метициллина и других полусинтетических пенициллинов.

Иногда биотехнологическим методом синтезируют некую структуру, в которую затем вводят различные функциональные группы.

Иногда биообъект участвует лишь на одном каком-либо этапе в цепи процессов, ведущих к конечному продукту. Биотехнология позволяет, например, получать избирательно вещества с определенным типом оптической асимметрии. Так, дрожжи употребляют в своей жизнедеятельности только L-аминокислоты, в растворе остаются их антиподы.

Ряд ферментов, гормонов, других медицинских препаратов получают модификацией биотехнологических продуктов.

Так, у бычьего инсулина химическими способами убирают аминокислотные остатки, после чего инсулин становится идентичным человеческому.

Другим примером является химическая модификация генно-инженерных белков. Наряду с нужными для человека, эти белки часто несут балластные аминокислотные последовательности. В состав химерных белков включается аминокислотная последовательность β -галактозидазы *E. coli* или белка другой бактерии. Химическая модификация в этом случае сводится к отщеплению лишних аминокислотных последовательностей.

3.2.8. Стабилизация продукта

Для сохранения свойств продукта в период его хранения и использования применяют различные физико-химические методы.

Так, сушка значительно повышает устойчивость к внешним воздействиям. Обезвоживание ряда ферментов не только снижает их активность, но ведет к повышению устойчивости

к нагреванию. Один из ферментов свиньи (панкреатическая липаза) сразу теряла активность в воде при нагреве до 100°C, однако продолжала функционировать в безводной среде.

Для стабилизации кормового микробного белка добавляют наполнители из грибного мицелия и кукурузной муки, которые сами имеют питательную ценность.

Для стабилизации ферментов добавляют глицерин или углеводы, которые образуют многочисленные водородные связи с аминокислотными остатками. Это препятствует денатурации ферментов, которое возможно как спонтанно, при длительном хранении может индуцироваться нагреванием.

Стабильность ферментов возрастает также при добавлении неорганических ионов Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^{+} и др.

Иногда стабилизации добиваются путем особой биотехнологической обработки. Так, меланж яичных желтков через несколько месяцев хранения темнеет, теряет свои органолептические свойства. Данный процесс можно предотвратить, если удалить из меланжа углеводы. Этому способствуют пропионовые бактерии, которые «выедают» углеводы. При этом не только удлиняется срок хранения меланжа, но он приобретает дополнительную питательность за счет обогащения органическими кислотами и витамином B_{12} .

Методы белковой инженерии способствуют стабилизации белковых продуктов при длительном хранении и устойчивости к нагреванию.

Термостабильность белков тесно связана с расширением области использования термофильных процессов в биотехнологии.

Термостабильность лизоцима фага T4 *E. coli* повысилась при замене изолейцина на цистеин в положении 3 полипептидной цепи с образованием новой дисульфидной связи с цистеином в положении 97.

Новые возможности в направлении повышения термостабильности продуктов биотехнологии дает иммобилизация.

3.3. Социальные аспекты биотехнологических производств

Микробиологические производства очень разнообразны по используемому сырью и химикатам, а также по номенклатуре и форме продукции.

Компоненты сырья и продукции попадают в атмосферу и в определенной концентрации отрицательно влияют на здоровье сотрудников, на взрыво- и пожаробезопасность. Технологические выбросы загрязняют атмосферу и литосферу, нарушают ландшафт.

Кроме химических веществ на микробиологических производствах добавляются специфические вредности — живая микрофлора и биологически активные вещества.

Все это делает необходимым уделять особое внимание промышленной санитарии и охране труда.

Существует соответствующее законодательство и правовые документы по труду, проектированию, строительству и эксплуатации предприятий.

На каждом предприятии разработана внутренняя система документов по технике безопасности.

3.3.1. Природоохранные мероприятия

Каждое предприятие вызывает различные нарушения природной обстановки:

- изъятие или уничтожение существующего плодородного слоя почвы и древесной растительности;
- нарушение режима грунтовых и подпочвенных вод (обычно их уровень повышается);
- изменение естественного рельефа;
- изменение воздушной среды;
- изменение гидрологического режима водоемов — источников водоснабжения и тех, куда сбрасывают стоки;
- проявление шумов.

Поэтому при проектировании, строительстве и эксплуатации предприятий предусматриваются работы по уменьшению вредного воздействия на окружающую среду. При строительстве завода плодородный слой почвы срезают, складывают, а затем используют. При планировке предусматривают ливневую канализацию, пропускные трубы.

Наиболее важной и трудной задачей является очистка технологических вредных выбросов.

В биотехнологии они имеются в следующих местах:

- распылительные сушильные установки;
- выхлопы от ферментаторов и гидролизаторов;
- от вентиляции и установок аспирации;
- от пропаривания оборудования и материалопроводов;
- от котельных.

Очистку выбросов после сушки проводят в несколько этапов: циклоны, рукавные фильтры, мокрая очистка.

Выбросы от ферментаторов содержат живую микрофлору. Очистка осуществляется в фильтрах с предварительным охлаждением теплоносителя, снижением влажности на влагоотбойниках и последующим подогревом во избежание замачивания фильтров.

При очистке воздуха после вентиляционных систем используют фильтры из волокнистых материалов.

Если нельзя полностью удалить нежелательные запахи и снизить до предельно допустимой концентрации вредных примесей, применяют каталитическое дожигание. Очищенный воздух выбрасывается через трубу рассеивания.

Микробиологические предприятия потребляют много воды — питьевой и технической. Сюда относится вода для ферментации, хоть ее и немного.

С целью снижения количества потребляемой воды организуют оборотное водоснабжение, используют фугат и другие стоки.

Производственные стоки очищают по полному биологическому циклу. При этом необходимо разделять производственные и фекальные канализационные стоки и направлять их на разные блоки очистных сооружений. Это позволяет использовать активный ил из очистных сооружений в качестве вторичного продукта — компонента питательной среды, кормовой добавки и др.

После очистки стоки направляют на озонаторные установки для снижения цветности.

3.3.2. Вредные вещества

По характеру воздействия вредные вещества микробиологической промышленности подразделяются на группы:

- общетоксические;
- раздражающие;
- мутагенные;
- влияющие на репродуктивную функцию;
- биологические.

Предельно допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воздухе населенных мест и в воздухе рабочей зоны установлены санитарными нормами и правилами. Такая концентрация не вызывает в организме человека болезненного состояния даже при длительном воздействии.

При оценке вредности выбросов веществ как качественный показатель имеет значение токсичность вещества. Чем вещество токсичнее, тем вероятнее образование опасных концентраций этого вещества в аварийных ситуациях и при различных отклонениях технологических режимов.

По степени опасности токсичные вещества делятся на чрезвычайно опасные, высокоопасные, умеренно опасные и малоопасные.

Сильнодействующие ядовитые вещества (по устаревшей, но укоренившейся терминологии СДЯВ) делятся на пять групп. В микробиологической промышленности, согласно СП № 534—65 от 24.06.1965 встречаются СДЯВ 3-й и 5-й групп, показанные в табл. 3.1.

Таблица 3.1

Сильнодействующие вещества в микробиологической промышленности

3-я группа	Жидкие летучие вещества в емкостях под давлением (жидкости и сжатые газы)	Аммиак и аммиачная вода с концентрацией 25 % и более
5-я группа	Дымящиеся кислые вещества и кислоты	Хлор, серная кислота плотностью 1,87 кг/л и более Азотная кислота плотностью 1,4 кг/л и более HCl, $\rho = 1,15$ и более

В соответствии ГОСТ 22.9.05—95 Российской Федерации СДЯВ переименованы в АХОВ (аварийно химические опасные вещества).

Для того чтобы исключить контакт производственного персонала с токсичными веществами, на соответствующих опасных технологических участках в системе аварийной вентиляции устанавливают газоанализаторы.

Все оборудование, где перерабатываются и транспортируются пылящие вещества, должно быть герметичным.

У фасовочных устройств устанавливают местные отсосы, а подачу пылящих продуктов в жидкость организуют ниже верхнего уровня этой жидкости.

С целью предотвращения пылеобразования желательно выпускать продукцию в гранулированном виде.

3.3.3. Средства индивидуальной защиты

Для защиты персонала от вредностей или снижения их воздействия применяют специальные средства защиты.

Специальную одежду (фартуки, перчатки, головные уборы и пр.) изготавливают из разных материалов. Предусмотрены помещения для обработки спецодежды — обеспыливания, стирки, чистки, обезвреживания живой микрофлоры.

Защитные мази и пасты служат для защиты кожи рук в случаях, когда применять перчатки или рукавицы невозможно или неудобно.

Там, где возможны подтеки жидкостей, падение инструментов с высоты и т. п. — используют защитные *головные уборы*.

Для *защиты ушей и глаз* применяют наушники, заглушки, очки.

Там, где возможна высокая концентрация токсичных газов применяют различные противогазы — общего назначения универсальные, а также респираторы. В микробиологической промышленности применяют противогазы разных типов и пользуются респиратором ШБ-1 «лепесток» для защиты от аэрозолей.

3.3.4. Экологические проблемы промышленной биотехнологии

Промышленная биотехнология — одна из наиболее экологически безопасных отраслей. Специалисты считают, что она имеет все шансы стать практически безотходной областью.

Особенностью этих производств являются большие объемы используемого воздуха и воды. Возвращенные в окружающую среду эти отходы могут содержать различные м.о. Даже в случае, когда эти м.о. непатогенные, они могут вызывать в о.с. нежелательные изменения. Выброс культивируемых клеток также вызывает изменения в почвенных и водных экологических нишах.

Возможно прямое и косвенное воздействие на организм человека в форме аллергии или сенсибилизации к факторам внешней среды.

Поэтому в микробиологических производствах постоянно проводится жесткий контроль микробиологического состава воздуха, почвы и воды в окружающей местности.

Отходы биотехнологии родственны отходам агропромышленного комплекса. В очистке сточных вод используются специфические биологические сообщества — *активный ил*. Это — живой консорциум бактерий, водорослей и простейших, который на каждом очистном сооружении имеет индивидуальный состав.

На предприятиях биотехнологической промышленности поставлена и практически решена задача замкнутого водоиспользования, полного возврата воды в цикл после биоочистки.

Но задачу можно решить еще эффективнее, если создать замкнутые технологические циклы на основе симбиоза и кометаболизма. Остаточную культуральную жидкость можно использовать как питательную среду для других организмов и применять, пока она вновь не станет подходить для первой стадии. На каждой стадии при этом можно получать полезные продукты.

Создание экологически замкнутого производства предполагает также решение проблемы воздушных выбросов — абгазов. Отработанный воздух содержит микроорганизмы и пары воды.

Самым прогрессивным решением является сжигание газовых отходов в печах, обеспечивающих сушилki горячими дымовыми газами. Правда, при этом часть энергии расходуется на нагрев водяного пара, который содержится в газовых отходах.

3.3.5. Микробиологический контроль производства

Контроль и учет работы микробиологического производства возложен на ЦЗЛ. Ее масштабы зависят от мощности предприятия и ассортимента продукции.

На предприятии предусматриваются объекты анализа, места отбора проб, периодичность, методики и допустимые нормы показателей.

Целью работы ЦЗЛ является гарантия выпуска высококачественной продукции. Поэтому лаборатории оснащаются необходимым оборудованием, аппаратами, посудой, приборами, мебелью. Уровень контроля определяется точностью и достоверностью экспресс-методов.

На качество влияют:

- правильность отбора проб;
- точность методов;
- уровень подготовки сотрудников.

Отбор проб производится с соблюдением правил стерильности. Из пробоотборной системы предварительно удаляются антисептики и вода, которые влияют на результаты анализа.

Если подготовка пробы длительная, в ней происходят биохимические процессы, испарение отдельных компонентов, поглощение влаги, отделение пузырьков газа. Эти изменения про-

исходят при одновременном влиянии процессов фильтрации, охлаждения.

Главными задачами микробиологической службы являются:

- использование высокопродуктивных штаммов м.о.;
- ведение чистой культуры, контроль ее качества на всех этапах производства;
- контроль над развитием культуры в ферментаторе;
- исследование проб в процессе обработки культуральной жидкости и готового продукта на наличие контаминантов.

4. ПРИКЛАДНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ БИОТЕХНОЛОГИИ. БИОХИМИЧЕСКИЕ И БРОДИЛЬНЫЕ ПРОИЗВОДСТВА

4.1. Производство кормового белка

Для нормального функционирования организма, построения клеток и тканей, необходимы белковые соединения. Человек и животные не могут сами синтезировать ряд аминокислот — валин, лейцин, изолейцин, лизин, метионин, треонин, триптофан, фенилаланин.

Если содержание белков в пище ниже нормы, этот дефицит компенсируется белковыми добавками, например, сои, риса, гороха.

Для животных готовят специальные комбикорма с добавлением отходов рыбной, мясной и молочной промышленности, а также шротов и жмыхов от получения растительных масел.

Но особый интерес представляет использование микроорганизмов. Перечислим преимущества этого направления в технологии производства пищевых продуктов и кормов.

1. Для культивирования м.о. можно использовать самые разнообразные отходы производства.

2. Прирост микробной биомассы происходит намного интенсивней, чем прирост белковой биомассы в животноводстве.

3. Технология несложная и не имеет сезонных ограничений.

4. Продукт содержит не только белки, но также много витаминов, углеводов, липидов и минеральных веществ (Р, Са, К, Fe, Mg, Na, S, Cu, Со и др.).

5. Микробные белки по сравнению с растительными белками и белками животного происхождения имеют повышенное содержание незаменимых аминокислот.

6. Возможность направленного генетического влияния на химический состав и ценность продукта.

Использование кормовых дрожжей дает существенную экономию и пользу. Но для промышленного производства и использования продуктов на основе м.о. необходимы тщательные исследования их действия на организм человека и животных. Основными критериями являются токсикология и усвояемость.

В натуральном виде кормовые дрожжи использовать не рекомендуется. Их применяют как добавку из расчета 1 г сухих дрожжей на 1 кг живой массы животного в сутки.

Для получения кормового белка применяют дрожжи из рода *Candida* и *Torulopsis*.

Дрожжевая клетка имеет размер в диаметре 5—7 мкм, что существенно меньше, чем у спиртовых и пекарских.

В дрожжевых клетках происходят сложные химические процессы. Для нормального роста они нуждаются в углероде, азоте, а также в неорганических элементах и специальных дрожжевых витаминах.

В качестве источника углерода они усваивают глюкозу, ксилозу, мальтозу, сахарозу, маннозу, арабинозу, уксусную кислоту, этиловый спирт и другие вещества.

Достаточное количество таких питательных веществ содержат различные отходы пищевой промышленности:

- барда со спиртовых заводов;
- соковые воды крахмальных заводов;
- отходы гидролизной и целлюлозной промышленности, древесные остатки хвойных и лиственных пород, остатки переработки продуктов сельского хозяйства (подсолнечная лузга, кукурузные кочерыжки, рисовая шелуха, солома хлебных злаков, шелуха их хлопковых семян).

Для выработки дрожжей необходимы содержащиеся в этом сырье гексозы.

Технология производства включает следующие стадии:

- подготовка чистой культуры и засевных дрожжей;
- подготовка субстрата гидролизата — питательной среды;
- выращивание дрожжей;
- выделение дрожжей из культуральной жидкости сгущением путем флотации и сепарированием;
- плазмолизирование и упаривание;
- сушка и витаминизирование.

Подготовка чистой культуры и засевных дрожжей

Чистой культурой считают 100 % биомассу дрожжей, рекомендованных производству для культивирования на данном сырье.

Процесс выращивания делится на стадии:

- 1) выращивание чистой культуры в лабораторных условиях;
- 2) выращивание засевных дрожжей в малой и большой дрожжанках;
- 3) выращивание засевных дрожжей в малом дрожжерастительном аппарате.

Питательной средой на всех стадиях является нейтрализованный гидролизат или сульфитный щелок с $\text{pH} = 5,5\text{—}5,8$. К раствору добавляют питательные вещества:

Сульфат аммония из расчета 0,056 кг азота на 1 кг питательных веществ (ПВ), водная вытяжка суперфосфата 0,031 кг P_2O_5 на 1 кг ПВ и хлористый калий 0,015 кг на 1 кг АВ. Добавляется дрожжевой гидролизат 10 л на 1 м³.

Выращивание в лабораторных условиях проводится в несколько стадий в колбах или бутылках на 0,25; 3 и 20—25 л.

Далее выращивание дрожжей в несколько этапов продолжается в дрожжерастительных аппаратах.

Процесс ведется в специальном аппарате ферментаторе. Он может работать в периодическом и в непрерывном режиме, по потребности.

За весь период подготовки накапливается 6 м³ среды с содержанием 90—100 кг биомассы. Из этого объема порциями по 1—1,5 м³ засевные дрожжи отбираются в производственный дрожжерастительный аппарат, где выращивают товарные дрожжи. Осуществляют постоянный контроль чистоты культуры. В качестве питательной добавки используют также дрожжевой гидролизат.

Гидролиз растительного сырья

При гидролизе отходов растительного сырья полисахариды переходят в моносахариды.

Для гидролиза используют серную, сернистую и соляную кислоты, концентрированные или разбавленные до концентрации 0,5—5 %.

При гидролизе разбавленными кислотами применяют серную кислоту, так как соляная очень агрессивная, а ее активность ниже. Для гидролиза концентрированными кислотами применяют и серную и соляную, но в промышленности этот способ не применяется.

Условиями гидролиза разбавленной серной кислотой 0,4—0,6 % являются: температура 175—190° и повышенное дав-

ление. Начальное давление в гидролизаторе устанавливается на уровне 0,5 МПа.

Гидролизаторы изготавливают из титана, емкость до 160 м³. Температуру повышают подачей горячей воды.

Гидролизат отводится через фильтрующие трубы. По технологическим условиям процесса соотношение т:ж в аппарате имеет малую величину. Поэтому отбирается масса гидролизата в 15—17 раз больше, чем масса перерабатываемого сырья, например, древесины.

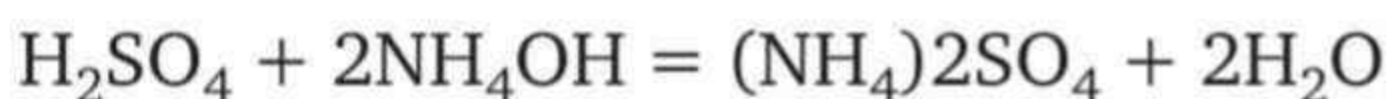
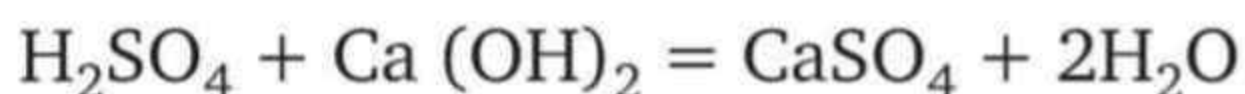
Остаток древесины после гидролиза — это лигнин, его удаляют под давлением 0,7—0,8 МПа.

В гидролизате, кроме сахаров содержатся вещества, которые негативно влияют на выращивание дрожжей — фурфурол, фенол, левулиновая кислота и другие. Их содержание регламентируется.

Гидролизат освобождают от вредных веществ и нейтрализуют известковым молоком или раствором аммиака.

Для освобождения от фурфурола гидролизат продувают паром.

Реакции при нейтрализации:



Одновременно нейтрализуются органические кислоты.

Температуру после нейтрализации снижают до 28—32°С.

Выращивание дрожжей

Скорость накопления биомассы зависит от концентрации сахара в субстрате, количества взятых дрожжей и интенсивности дыхания дрожжевых клеток.

При выращивании дрожжей на упаренных гидролизатах с содержанием ПВ 3 % и при содержании фурфурола не выше 0,01 % за 4,5 ч получается выход 57,9 %. Дрожжевая суспензия содержит от 20 до 40 г биомассы на 1 л.

Выход дрожжей рассчитывают по сухой массе на 100 кг ПВ. Он связан со степенью использования сахара и повышается за счет использования содержащихся в гидролизатах таких веществ как этиловый спирт, уксусная, молочная и лимонная кислоты.

При добавлении отработанной (оборотной) культуральной жидкости о.к.ж. и при уменьшении содержания фурфурола выход дрожжей повышается.

Выделение биомассы дрожжей из культуральной жидкости

Для выделения биомассы применяются методы отстаивания, фильтрации, центрифугирования, сепарирования и выпаривания.

Широкое применение имеет флотационный метод. Благодаря наличию полисахарида хитина дрожжи обладают флотационной способностью.

Флотационный способ организуют как непрерывный. По сравнению с сепарированием (центрифугированием) он более экономный, использует более простое оборудование.

При центрифугировании процесс ускоряется в 5000—6000 раз. Под действием центробежной силы дрожжевые клетки отбрасываются к стенкам.

Дрожжевой концентрат за 2—5 с сгущается до 10—15 % от начального объема.

Упаривание дрожжевой суспензии проводится на вакуумных установках. Витаминный состав белкового вещества сохраняется при условии, если температура не превышает 80—85°C.

Упаривание проводят в однокорпусных и многокорпусных установках до содержания 20—25 % СВ.

Сушка и витаминизация

Это заключительная стадия получения товарного продукта. Товарные дрожжи должны содержать не более 10 % влаги.

Такой продукт можно длительно хранить и транспортировать.

Сушка на вальцовых сушилках проводится при температуре 150°C. Такие условия — достаточно жесткие, и продукт частично разлагается.

Более мягкой является распылительная сушка, при которой подается горячий воздух (300—400°C). В процессе сушки температура в рабочем пространстве сушилki снижается до 80°C.

Для повышения кормовой ценности дрожжей их витаминизируют.

Используют три способа:

- 1) в процессе выращивания дрожжей;
- 2) облучением УФ лучами;
- 3) добавлением витаминов в готовый продукт.

Витаминация в процессе выращивания достигается подбором культуры.

Содержащийся в дрожжах эргостерин при облучении УФ-лучами переводится в витамин D₁.

Добавление готовых витаминов производится в случае их нехватки в выпускаемом продукте. Витамины в дозированном количестве подаются в дрожжевой концентрат перед сушкой. Они сорбируются из растворов и в дальнейшем сохраняются в сухих дрожжах.

4.2. Производство аминокислот

Среди биотехнологических продуктов по объему производства аминокислоты занимают первое место, а по стоимости второе (после антибиотиков).

Объем мирового производства более 500 тыс. т.

Однако это не удовлетворяет потребность человечества. Потребность (млн т):

- в лизине — 5;
- в метионине — 4;
- в треонине — 3,7;
- в триптофане — 2.

В организме человека и животных аминокислоты участвуют в биосинтезе ферментов, гормонов, витаминов. Они являются структурными элементами белков. Но почти половина из них в организме не синтезируется и поступает с пищей.

Наиболее ценными белками являются белки яиц и молока. Растительные белки обеднены по разным аминокислотам.

Поэтому целесообразно вводить а.к. в корм животных. Это сокращает расход кормов и увеличивает выход животноводческой продукции.

А.к. используются не только как пищевые добавки, приправы и усилители вкуса, но и для других целей: как подсластители, антиоксиданты, лекарство от психических заболеваний, воспалений, а также как сырье для производства других веществ.

В промышленности белковые аминокислоты получают разными методами:

- гидролиз природных белков;
- химический синтез;
- биотехнология:

- микробный синтез;
- биотрансформация предшественников аминокислот (химико-микробиологический метод).

Методом гидролиза получают не все незаменимые а.к. Кроме того, в процессе гидролиза они подвергаются разрушению и рацемизации.

В химическом способе также получают рацематы. Нестереоизбирательным является лишь метионин.

Поэтому биотехнологический способ — самый перспективный.

Продуценты а.к. Каждая а.к. продуцируется определенным микроорганизмом. Перспективные штаммы постоянно улучшают путем селекции. Продуцентами являются м.о. родов *Brevibacterium*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter*.

Для разработки технологии получения отдельной а.к. необходимо знать пути и механизмы регуляции биосинтеза этой кислоты.

Методы производства аминокислот

Лизин. Белки злаковых культур по лизину несбалансированны приблизительно на 50 %. Для потребностей животноводства производство лизина было налажено вначале в России, а затем в Испании, Франции, Японии и США.

Лизин синтезируется в микроорганизмах из аспарагиновой кислоты и является конечным продуктом разветвленного пути биосинтеза, общего для трех а.к. — лизина, метионина и треонина.

Для того чтобы накопить лизин, необходимо блокировать пути синтеза двух других а.к. — метионина и треонина (рис. 4.1).

Метаболический путь синтеза L-лизина открывает фермент аспартаткиназа. Он чувствителен к ингибированию по принципу обратной связи при совместном действии треонина и лизина. Накапливание этих а.к. останавливает их синтез. При пониженной концентрации любой из них процесс активизируется.

Для биосинтеза лизина используют мутанты двух типов.

Мутанты *первого* типа являются ауксотрофами по гомосерину, т. е. синтезируют самостоятельно треонин и метионин. Поэтому если культуральная среда содержит лимитирующие концентрации метионина и треонина, они способны образовывать избыточные количества лизина.

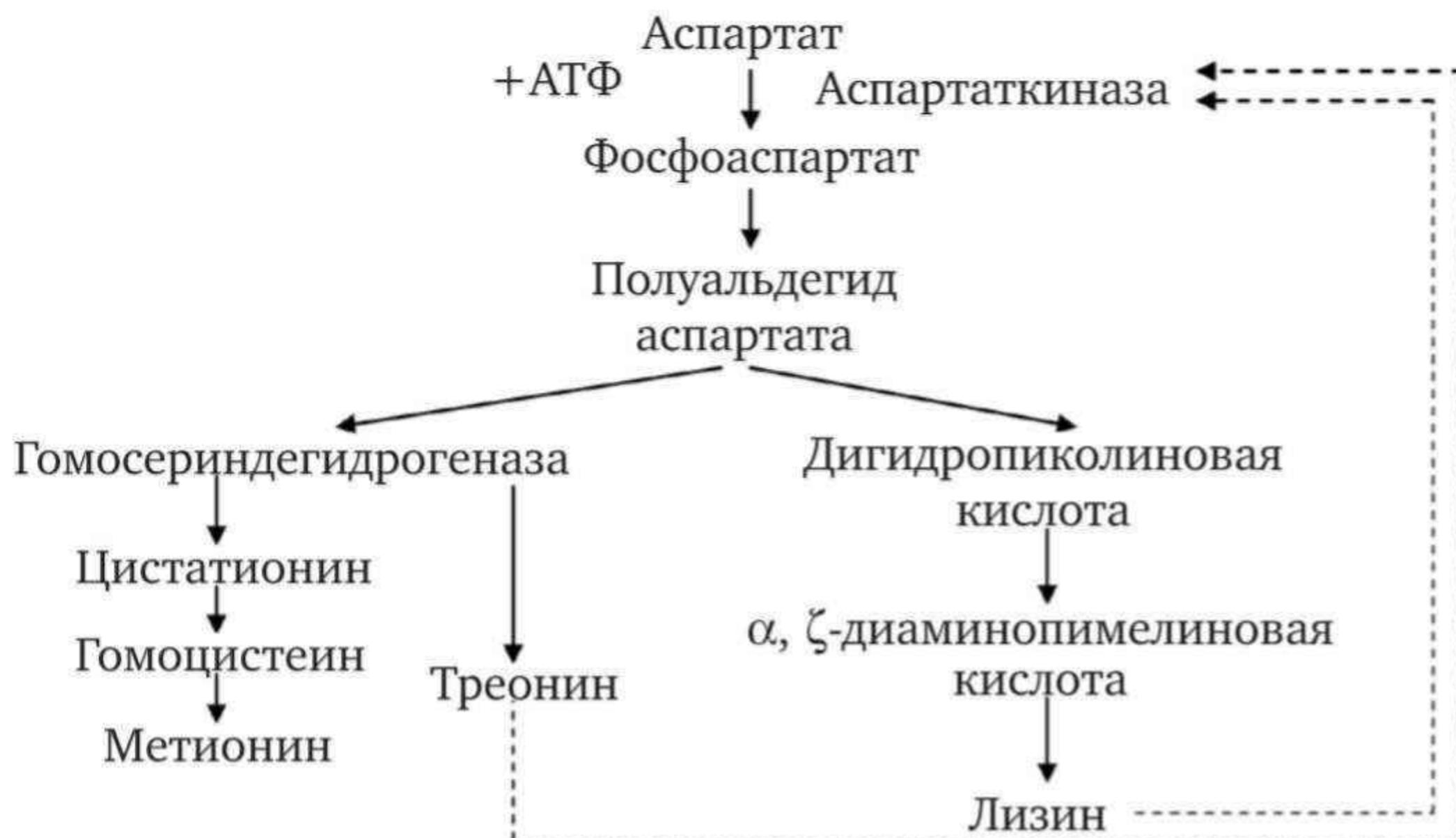


Рис. 4.1. **Схема микробиологического синтеза незаменимых аминокислот**

Мутанты *второго* типа дефектны по гену, который определяет конформацию аспартаткиназы. Этот фермент теряет чувствительность к высоким концентрациям лизина, и он может накапливаться в значительных количествах.

Большое значение в данном синтезе имеет проницаемость клеточных мембран. Она должна быть достаточно большой. Для ее увеличения используются мутанты или соответствующий состав питательной среды.

В культуральной среде создают дефицит биотина (1—5 мкл/л), добавляют пенициллин (2—4 мкг/л), детергенты (твин-40 и твин-6), а также производные высших жирных кислот (пальмитаты, стеараты). Биотин влияет на проницаемость мембран, контролируя содержание липидов, а пенициллин нарушает синтез клеточных стенок бактерий.

Для производства лизина в состав культуральной жидкости вводят, в качестве источников углерода, глюкозу, сахарозу, иногда фруктозу и мальтозу. С целью экономии применяются свекловичная меласса, молочная сыворотка, гидролизаты крахмала, сульфитные щелока.

Разработаны дешевые среды на основе уксусной кислоты, пропионовой, метанола, этанола и *n*-парафинов. В качестве источников азота применяют мочевины и соли аммония.

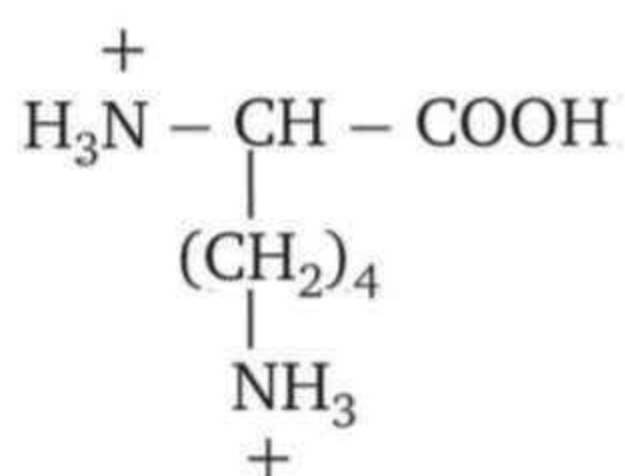
Для стимулирования роста используют экстракты кукурузы, дрожжей и солодовых ростков, гидролизаты отрубей и дрож-

жей, витамины группы В. В питательную среду добавляют микроэлементы — Р, Са, Mg, Mn, Fe и др.

Большое значение имеет снабжение кислородом воздуха, индивидуальное для каждой аминокислоты.

Необходимо учитывать кинетику процесса. Лизин появляется в культуральной жидкости с середины экспоненциальной фазы роста культуры. Поэтому вначале в специальных посевных аппаратах выращивают биомассу в течение суток (рН 7,0—7,2; температура 28—30°C), а затем массу передают в ферментер с питательной средой. Через 25—30 ч после начала ферментации в культуральную жидкость начинает поступать лизин. По окончании ферментации жидкую фазу отделяют фильтрованием, затем фракционируют методом ионообменной хроматографии на катионите.

Для этого с помощью обработки соляной кислотой лизин переводится в катион:



Сорбированный на катионитной смоле лизин затем элюируется раствором гидроксида аммония 0,5—5 % после выхода других катионов.

Элюат концентрируют в вакууме при 60°C; аминокислоту переводят в монохлоргидрат, высушивают и перекристаллизовывают. Кроме высокоочищенного лизина, выпускают и другие товарные формы лизина: жидкий концентрат лизина ЖКЛ, кормовой ККЛ и высококонцентрированные препараты с малой степенью очистки.

Метионин. Получают химическим способом. По значимости среди получаемых аминокислот он занимает второе место.

Триптофан. Содержание триптофана в стандартных продуктах — молоко, рыба, дрожжи в три раза ниже нормы. Его получают микробиологическим способом. Подобно лизину триптофан получают многоступенчатым синтезом вместе с тирозином и фенилаланином. Однако в данном случае две сопутствующие аминокислоты на синтез триптофана не оказывают ингибирующего действия.

Образование всех трех аминокислот идет через шикимовую и хоризмовую кислоты. Из хоризмовой кислоты триптофан получается под действием антранилатсинтетазы. При этом вначале, в качестве предшественника получается антраниловая кислота.

Поэтому на первом этапе в производстве триптофана получают антраниловую кислоту химическим способом. А затем с помощью энзиматической системы мутантных дрожжей *Candida utilis* эту кислоту переводят в триптофан.

При выращивании в культуральной жидкости, содержащей свекловичную мелассу, мочевины и минеральные компоненты получают концентрацию триптофана до 6 г/л.

Аналогично, с помощью предшественников получают гистидин, изолейцин, метионин, серин, треонин.

Выпускаемой кормовой концентрат, кроме триптофана, содержит белки и витамины. После ионообменной очистки и кристаллизации получают чистый триптофан с содержанием 99 % основного вещества.

Производство безотходное: все осадки и промывные воды после выпаривания и высушивания используют для кормовых целей.

Аргинин, глутаминовая кислота, глутамин, треонин, пролин — эти аминокислоты являются конечными продуктами неразветвленных метаболических путей. Ауксотрофные мутанты здесь не используются. Применяются мутанты с дефектами регуляции биосинтеза кислоты, т. е. регуляторные мутанты.

Успешный синтез стимулируется условиями внешней среды — содержание биотина, солей аммония, ионов цинка.

Методом генетической инженерии получен очень высокопродуктивный штамм *E. coli* с амплификацией оперонов треонина для синтеза треонина на свекловичной мелассе.

Химико-ферментативные способы получения аминокислот

В этом способе используются энзимы, получаемые разными методами.

Процессы могут быть одностадийными и многостадийными. Источником ферментов могут быть энзимы интактных (не растущих), высушенных и лизированных клеток, клеточные экстракты, препараты иммобилизованных клеток и ферментов.

L-лизин получают стереоспецифическим ферментативным гидролизом (конверсией) D, L- α -амино- ϵ -капролактама, который получают химическим путем из циклогексена. С помощью фермента лактамазы рацемат лактама превращается в *L*-лизин.

Оставшаяся непрореагировавшая часть (D-форма лактама) переводится под действием рацемазы в смесь антиподов лактама.

Фермент лактамаза найдена у некоторых дрожжей, например, у *Candida laurentii*. Фермент рацемаза — у бактерий *Alcaligenes obae*. Для получения неочищенных ферментов целые клетки обрабатывают с помощью ПАВ. Разработаны иммобилизованные формы, созданы высокопродуктивные мутанты.

Триптофан получают методом прямой конденсации индола, аммиака и пировиноградной кислоты.

Реакцию катализирует фермент триптофаназа. Выход 63 г/л.

Химико-энзиматическим способом получают многие аминокислоты. Метод специфичен, не требует сложной очистки продукта и стоков. Но по себестоимости продукта он уступает микробиологическому способу.

4.3. Производство ферментов

Ферменты, синтезированные в клетке, сохраняют свои уникальные каталитические свойства и после выделения из клетки. Поэтому их используют широко. Как катализаторы они работают в мягких условиях, нетоксичны и доступны.

По объему это производство в биотехнологии занимает третье место. В различных отраслях промышленности применяют около 30 ферментов. Они используются в текстильном, целлюлозно-бумажном и кожевенном производстве, в медицинской и химической промышленности, а также в качестве детергентов, в производстве кондитерских изделий и соков.

Основным потребителем является пищевая промышленность. Наиболее используемыми ферментами являются глюкооксидаза и глюкоизомераза, которые применяются для приготовления сиропов, содержащих фруктозу.

Ферменты, коферменты участвуют во многих технологических процессах. В качестве примеров назовем:

- ферментные мембранные реакторы для осуществления непрерывных процессов восстановительного аминирования кетокислот и др.;

- разделение рацематов стереоспецифически активным транспортом, например, для прокачивания D-глюкозы;
- высокоэффективное окисление метанола в муравьиную кислоту под действием сопряженных ферментативных систем дрожжей *Hansenula polymorpha* и бактерий *Pseudomonas putida*.

Большое будущее имеют процессы с участием панкреатического фермента свиньи липазы. Этот фермент сохраняет активность даже при влажности всего лишь 0,015 % и при 100°C. С его помощью синтезируют оптически чистые сложные эфиры и феромоны для парфюмерии и медицины.

Ферменты разных классов используются для осуществления деградации и модификации антропогенных загрязнений окружающей среды.

Так, в 1886 г. А. Я. Данилевский доказал возможность обращения протеолиза и возможность синтеза белковых веществ с помощью синтеза белковых соединений при участии протеолитических ферментов. В сточных водах очень велика концентрация аминокислот и пептидов, которые образуются при гидролизе белковых отходов под действием пептидогидролаз микроорганизмов. Во Франции уже действует производство кормовых белков из сточных вод.

Широко применяются ферменты в медицине в составе лечебных препаратов:

- при пероральном введении фенилаланин-аммиак-лиазы, резко снижается уровень содержания фенилаланина в крови при фенилкетонурии;
- для лечения злокачественных новообразований применяются гидролитические ферменты протеиназы (препарат «папайотин»);
- для растворения тромбов в кровеносных сосудах также применяют протеолитические ферменты плазмин и активирующие его стрептокиназу и урокиназу;
- для рассасывания рубцовых образований используют коллагеназу;
- для задержки развития атеросклероза используют эластазу;
- для лечения конъюнктивитов применяют лизоцим;
- для лечения заболеваний дыхательных путей и роговицы глаз используют дезоксирибонуклеазу из стрептококка.

Важнейшей областью медицины является также энзимодиагностика — тестирование патологии по уровню активности

ферментов, а также для блокировки отторжения органов и других целей.

Производство ферментных препаратов растет. В этой области доминирует Западная Европа, а также США и Япония.

Источники ферментов

Содержание искомого энзима в природном объекте для производства должно составлять не менее 1 %. Для крупномасштабного производства сырьем служит очень ограниченное количество растительных организмов на определенной стадии развития и отдельные ткани и органы животных.

В частности пригодны проросшее зерно некоторых злаков и бобовых, латекс и сок зеленой массы некоторых растений.

Животным сырьем служат поджелудочная железа, слизистая оболочка желудочно-кишечного тракта, сычуг к.р.с., семенники.

Неограниченным источником ферментов являются многие м.о. — бактерии, грибы, дрожжи.

Технология культивирования м.о. — продуцентов ферментов

Технология зависит от источника энзима:

- при извлечении фермента из растительных или животных тканей энзимы экстрагируют, а затем очищают от балластных веществ;
- для получения препаратов микробного происхождения технология включает этапы культивирования м.о. — продуцентов, в том числе получение посевного материала.

Для получения посевного материала используют лабораторный штамм чистой культуры, выращенный на твердой или жидкой питательной среде до определенного возраста.

Такой материал консервируют высушиванием или хранением при низкой температуре. Производственные культуры продуцента получают из посевного материала выращиванием на поверхности твердых или жидких сред либо методом глубинного культивирования.

Поверхностный метод состоит в культивировании на поверхности увлажненных стерилизованных отрубей в специальных кюветах с добавлением солодовых ростков, опилок или свекловичного жома.

Для глубинного культивирования применяют ферментеры из нержавеющей стали с перемешиванием и подачей воздуха.

ферментов, а также для блокировки отторжения органов и других целей.

Производство ферментных препаратов растет. В этой области доминирует Западная Европа, а также США и Япония.

Источники ферментов

Содержание искомого энзима в природном объекте для производства должно составлять не менее 1 %. Для крупномасштабного производства сырьем служит очень ограниченное количество растительных организмов на определенной стадии развития и отдельные ткани и органы животных.

В частности пригодны проросшее зерно некоторых злаков и бобовых, латекс и сок зеленой массы некоторых растений.

Животным сырьем служат поджелудочная железа, слизистая оболочка желудочно-кишечного тракта, сычуг к.р.с., семенники.

Неограниченным источником ферментов являются многие м.о. — бактерии, грибы, дрожжи.

Технология культивирования м.о. — продуцентов ферментов

Технология зависит от источника энзима:

- при извлечении фермента из растительных или животных тканей энзимы экстрагируют, а затем очищают от балластных веществ;
- для получения препаратов микробного происхождения технология включает этапы культивирования м.о. — продуцентов, в том числе получение посевного материала.

Для получения посевного материала используют лабораторный штамм чистой культуры, выращенный на твердой или жидкой питательной среде до определенного возраста.

Такой материал консервируют высушиванием или хранением при низкой температуре. Производственные культуры продуцента получают из посевного материала выращиванием на поверхности твердых или жидких сред либо методом глубинного культивирования.

Поверхностный метод состоит в культивировании на поверхности увлажненных стерилизованных отрубей в специальных кюветах с добавлением солодовых ростков, опилок или свекловичного жома.

Для глубинного культивирования применяют ферментеры из нержавеющей стали с перемешиванием и подачей воздуха.

Вначале ферментер заполняют питательной средой, автоклавируют, а затем засевают. Принимают меры для предотвращения инфекции — повышенное давление, оптимальный рН, температура, редокс-потенциал.

Проточный метод культивирования заключается в том, что питательная среда и посевной материал подаются в ферментер непрерывно. Ферментером служит вращающийся трубчатый реактор. В один его конец поступает питательная среда и культура м.о., а из другого непрерывно выводятся ферменты, бактериальная масса и продукты жизнедеятельности. Здесь можно создать условия, когда культура нормально размножается до 200 суток.

Важным фактором является качество питательной среды. Используются как синтетические, так и комплексные среды. Синтетические среды представляют собой определенный набор питательных веществ. В состав комплексных входят различные отходы пищевых производств — жмыхи, спиртовая барда, картофельная мезга, отруби, меласса и др. Эти среды доступны, дешевы и обеспечивают безотходность производства.

Типовая технологическая схема глубинного культивирования м.о. приведена на рис. 4.2.

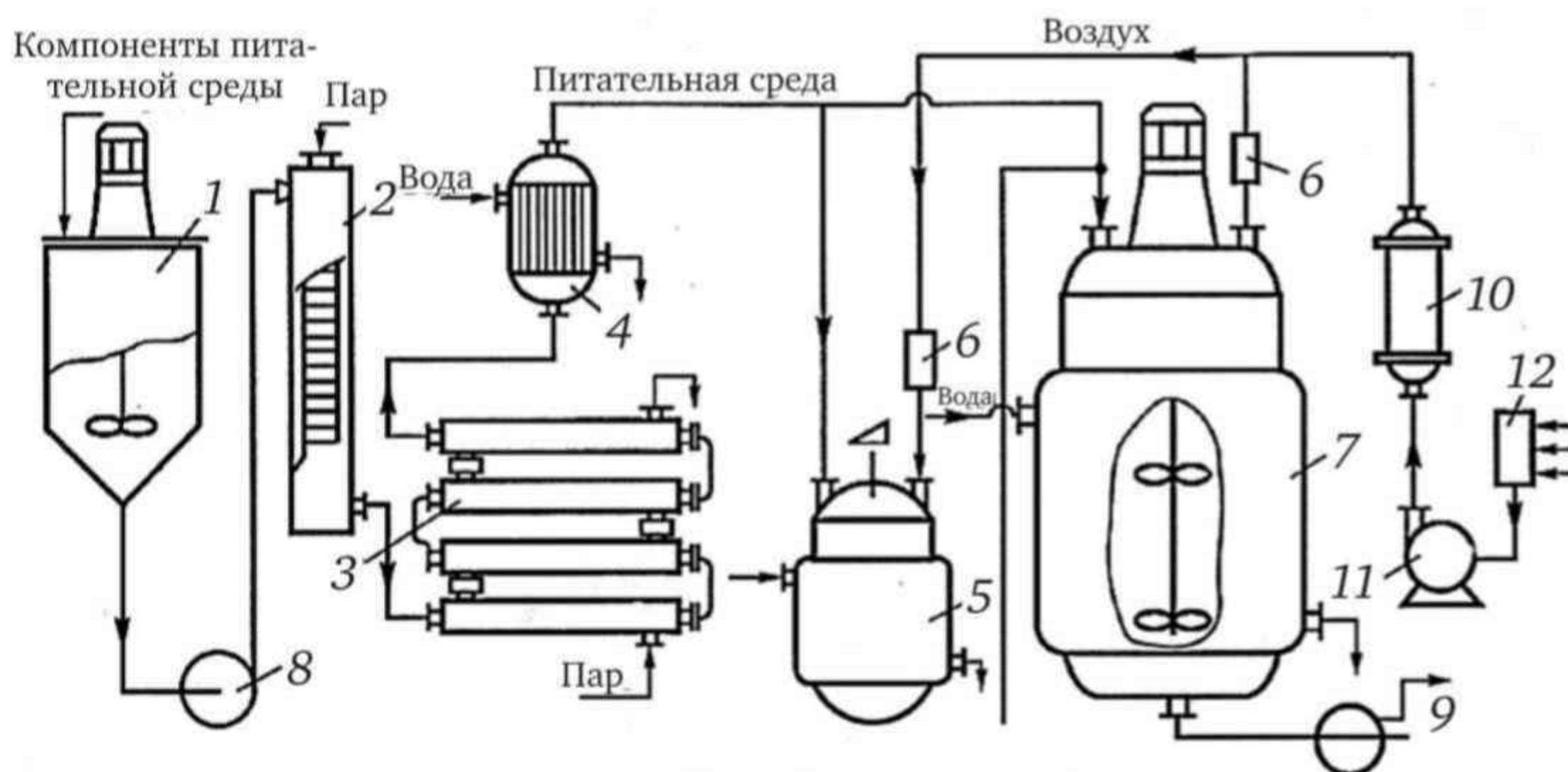


Рис. 4.2. Принципиальная технологическая схема глубинного культивирования микроорганизмов (по А. А. Свитцову и др., 1986):

- 1 — смеситель питательной среды; 2 — стерилизатор в непрерывном режиме потока питательной среды; 3, 4 — теплообменники; 5 — посевные аппараты; 6, 10, 12 — фильтры для очистки воздуха; 7 — ферментер; 8, 9 — насосы; 11 — компрессор

Технология очистки и выделения ферментных препаратов

Выделение и очистка — трудоемкая и дорогостоящая операция. Хорошо, если очищать продукт нет необходимости. Так, спиртовая, кожевенная, текстильная промышленность, сельское хозяйство и предприятия бытовой химии не требуют чистоту фермента выше 0,1 % (примеси 99,9 %).

Но научные исследования и медицина требуют полной очистки от балласта. Тогда выбирают метод очистки в зависимости от исходного для очистки материала:

- биомасса продуцента;
- фильтрат культуральной жидкости;
- экстракт из тканей и органов растений и животных.

Для получения неочищенного препарата культуру м.о. вместе с остатками культуральной жидкости высушивают в мягких условиях. Применяют также упаривание экстракта или фильтрата культуральной жидкости.

Применяют метод ацетоновых порошков: осаждение и быстрое обезвоживание ацетоном при температуре не выше, чем -10°C . Получаются порошки либо жидкие концентраты.

Для выделения фермента из клеточного содержимого его тонко измельчают до разрушения внутриклеточных структур — лизосом, митохондрий, ядер и др.

Для этого применяют мельницы и гомогенизаторы; ультразвук; попеременное оттаивание и замораживание. Для высвобождения ферментов добавляют небольшие количества детергентов или обрабатывают энзимами — лизоцимом, целлюлазой и др. Необходимо исключить денатурацию белка.

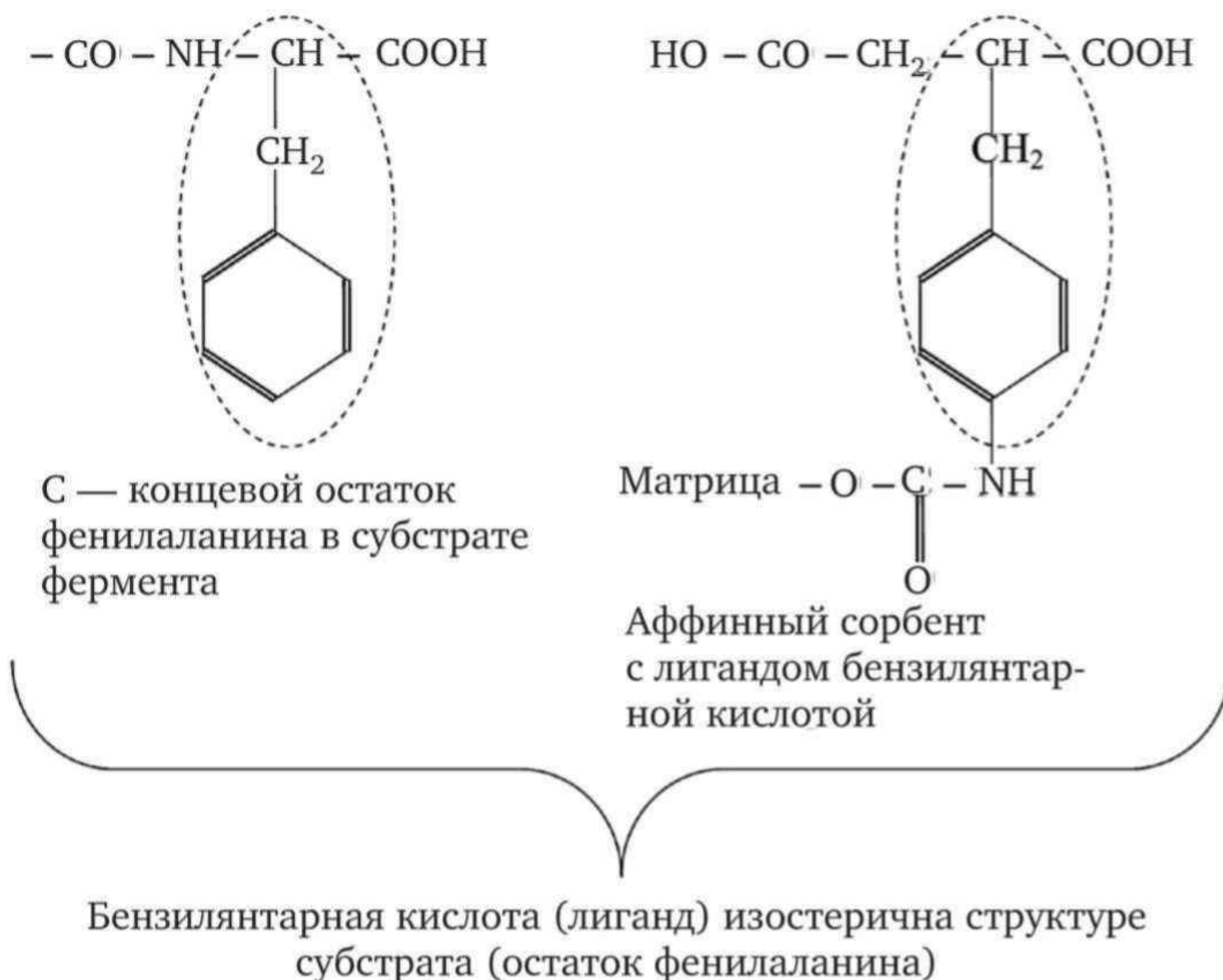
При получении очищенных препаратов и ферментов комбинируют различные методы и приемы: термическое фракционирование, осаждение органическими растворителями, электролитами и солями тяжелых металлов, фильтрацию, электрофорез, ионообменную хроматографию и др.

Для заключительных этапов тонкой очистки применяют аффинную хроматографию, в которой избирательно связываются те или иные лиганды. Этот метод позволяет выделить энзим из множества других белков.

Для синтеза сорбента в этом методе лиганд присоединяют к инертной матрице (гидрофильные гели, синтетические полимеры, неорганические носители). Для уменьшения пространственных затруднений лиганд присоединяют к носителю через промежуточное звено (ножка, спейсер, вставка), как описано выше.

Для адсорбции на сефарозе (вид агарозы) в качестве активатора применяют бромциан.

Активированный сорбент взаимодействует с каталитическим центром фермента только благодаря сходству лиганда с субстратом (ферментом). Такой пример показан на приведенной здесь схеме.



Для протеолитических ферментов в качестве лиганда используют циклопептидный антибиотик грамицидин.

В процессе выделения фермента повышается его массовая доля, и, следовательно, повышается активность.

В производственных условиях активность ферментного препарата оценивается количеством субстрата, преобразованного 1 мг (1 кг) препарата при оптимальных условиях за 1 мин и измеряется в Е/мг (например, протеолитических единиц), моль/мг или катал/кг белка (1 международная единица в системе СИ равна 16,6 нанокатал, katal).

Очищенные препараты хранят при низкой температуре (-80°C). Добавляются различные стабилизаторы — коферменты, глицерин, моносахариды, аминокислоты, желатина и др.

В настоящее время выделено и очищено 1500 ферментов из 2003 известных.

В 1960-е гг. на стыке химии и биологии появилась новая отрасль — энзимология. Ее задачами являются развитие прогрессивных методов выделения ферментов, их стабилизация и иммобилизация; конструирование ферментов методами генной инженерии и разработка научных основ их применения.

4.4. Получение антибиотиков

Мировое производство антибиотиков очень велико (~ на 20 млрд долл.). Они являются противоопухолевыми и противомикробными препаратами. Они сделали излечимыми ранее безнадежные заболевания: туберкулез, сепсис, сифилис. Даже более широко, чем в медицине, антибиотики применяются в растениеводстве, животноводстве, ветеринарии и в пищевой промышленности.

Производство антибиотиков сыграло большую роль в становлении биотехнологии.

Антибиотики изначально имеют природное происхождение. Они подавляют рост живых клеток и, по предположению, возникли в борьбе за существование почвенных биоценозов.

Многие из них являются «химическим оружием» и служат для нападения и защиты. Кроме этого они участвуют в процессах детоксикации вредных метаболитов, контролируют обмен веществ, дифференцировку клеток и т. д. Есть теория, что они являются реликтовыми молекулами, которые в ходе эволюции были вытеснены другими продуктами рибосомального синтеза, но сохранили способность вмешиваться в обмен веществ. Англичанин Флеминг в 1928 г. обнаружил способность гриба зеленой плесени *Penicillium notatum* вызывать гибель м.о. Лечебные свойства плесени описал в 1871 г. русский дерматолог А. Г. Полотебнов.

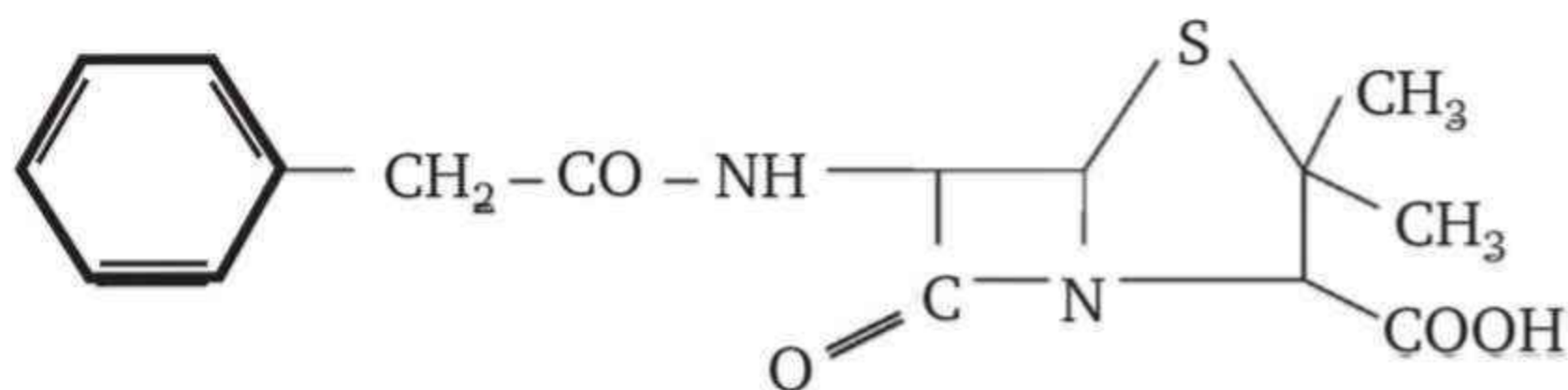
В настоящее время известно 12 000 соединений этого класса, из которых в клинической практике используются ~200. Некоторые токсичны и не используются.

Антибиотики классифицируют по разным признакам — по происхождению (из грибов, бактерий, актиномицетов и др.), химической природе и механизму действия.

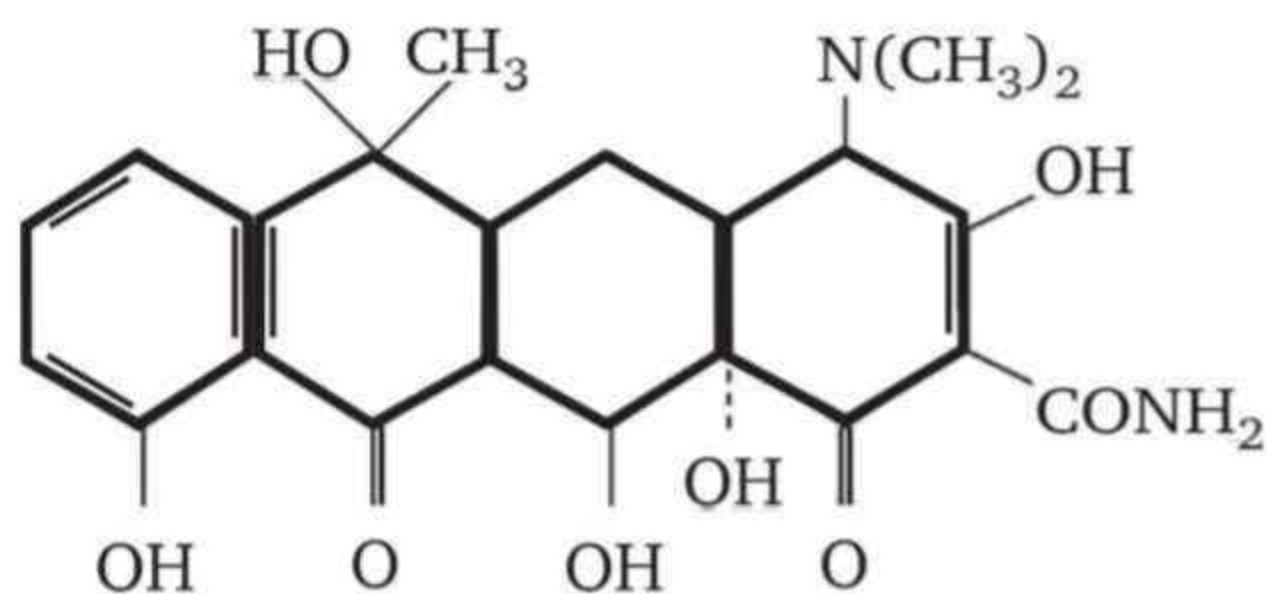
Антибиотики относятся к разным классам химических соединений. Их делят на ряд классов: ациклические (полиены, нистатин, леворин), алициклические, ароматические, хиноны,

кислородсодержащие гетероциклы (гризеофульвин), макролиды (эритромицин, олеандомицин), азотсодержащие гетероциклы (пенициллин), полипептиды или белки, декапептиды.

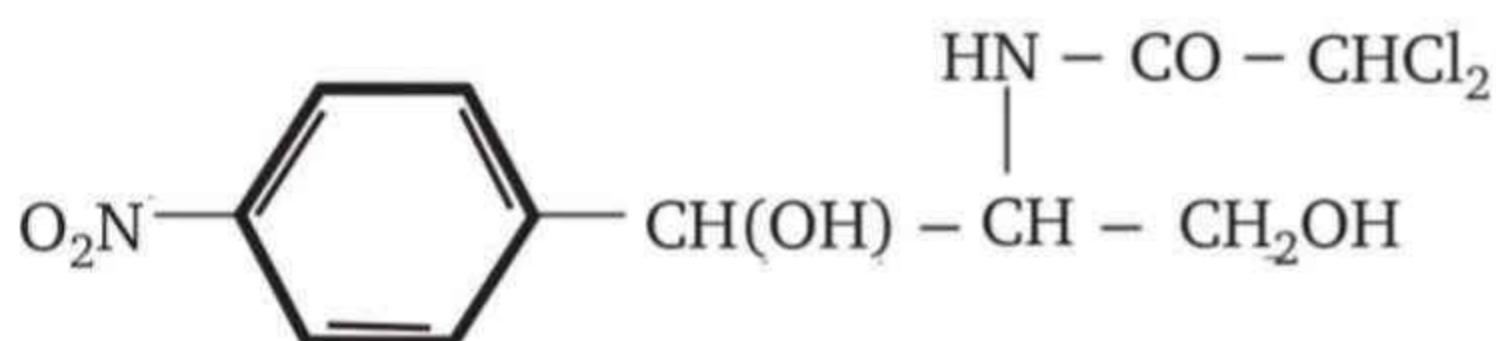
Химические формулы наиболее распространенных антибиотиков:



Бензилпенициллин



Тетрациклин



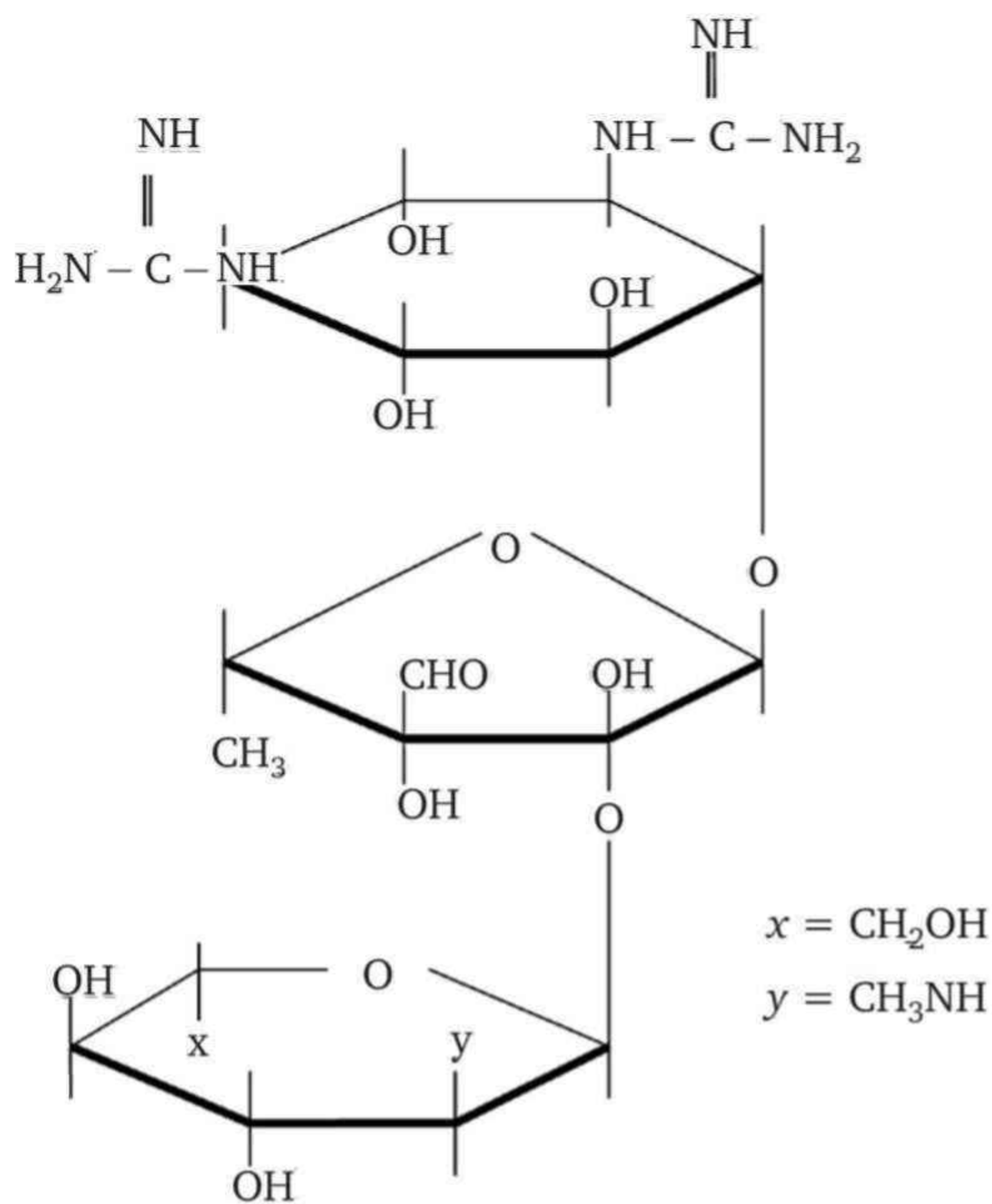
Левомецетин

По типу действия антибиотики делятся на бактерицидные, вызывающие гибель м.о., и бактериостатические, нарушающие способность м.о. к делению. По спектру действия — узкого и широкого действия. К антибиотикам широкого действия относится, в частности, тетрациклин и аминогликозиды, которые применяются против неидентифицированных возбудителей болезни, но могут вызвать дисбактериоз.

Для антибиотиков характерна специфичность действия, они избирательно подавляют один или несколько процессов лишь в некоторых м.о.

По принципу специфики действия различают группы антибиотиков, которые вызывают следующие нарушения:

- нарушение биосинтеза пептидогликанов клеточной стенки (в том числе пенициллины);



Стрептомицин

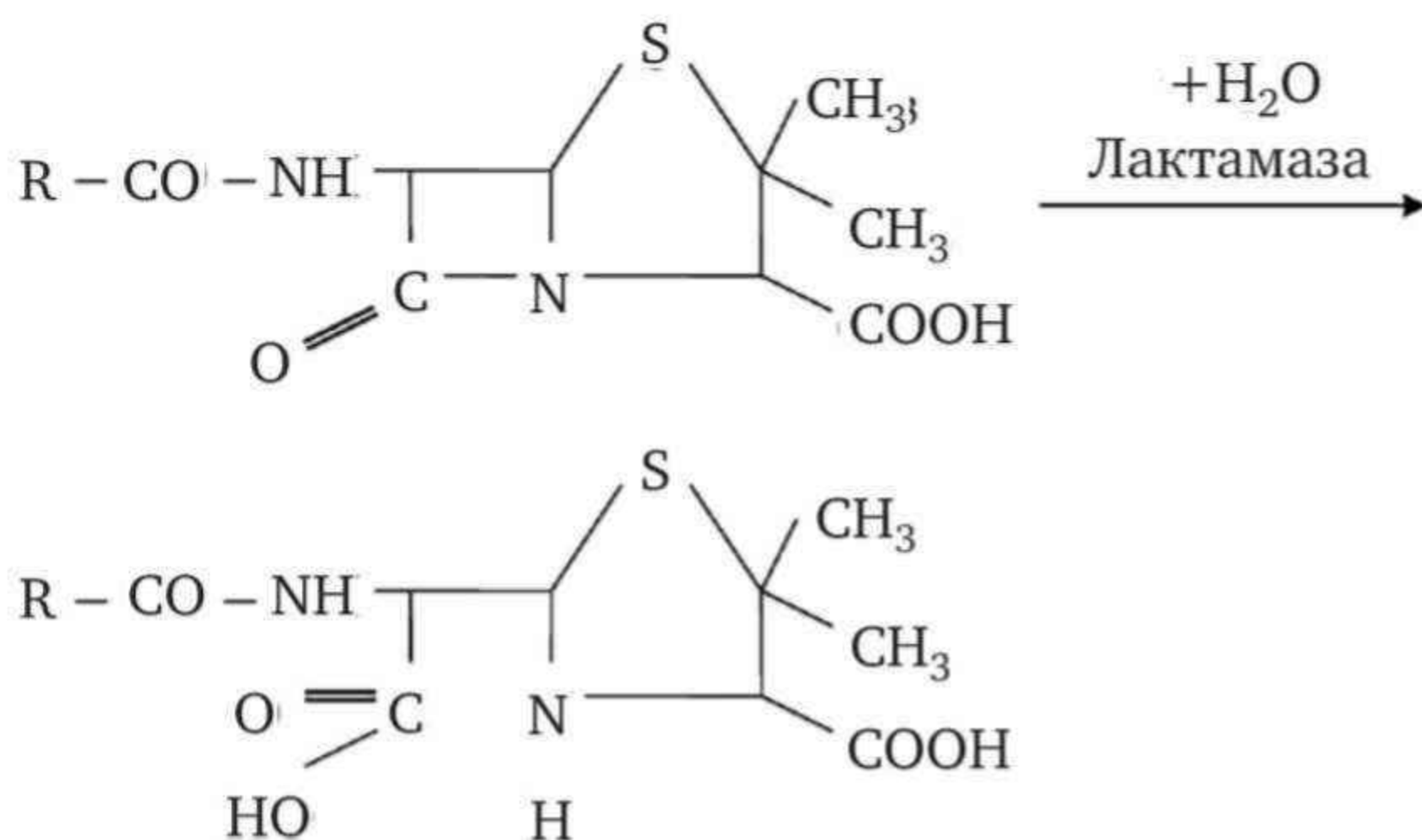
- нарушение отдельных этапов процессов трансляции;
- повреждения цитоплазматической мембраны (например, грамицидин);
- нарушение биосинтеза нуклеиновых кислот (противоопухолевые антибиотики);
- нарушение энергетического обмена.

В научных исследованиях антибиотики широко используются для расшифровки механизмов биосинтеза белка, нуклеиновых кислот и клеточных стенок бактерий, изучения транспорта ионов через мембраны и др. целей.

Постоянно изыскиваются новые антибиотики для лечения более широкого круга заболеваний, а также по причине накопления резистентных к антибиотикам новых форм м.о.

Так, присутствующий в клетках бактерий фермент лактамаза (пенициллиназа) гидролизует в молекуле пенициллина амидную связь лактамного кольца цикла с образованием пеницил-

линовой кислоты. Эта кислота лишена противомикробной активности.



Устойчивость микроорганизмов к антибиотикам имеет всеобщий характер. Она характеризуется разнообразием типов и стабильностью воспроизводимости. Поэтому главным направлением получения новых антибиотиков является не открытие новых соединений, а в химической трансформации уже известных природных молекул. Целью такой работы является уменьшение резистентности м.о. и снижение токсичности антибиотиков и, одновременно, более широким спектром действия, большим временем жизни, химической и биологической устойчивостью.

Важным подходом является использование природных ингибиторов лактамаз.

Химический синтез антибиотиков очень сложен. В данном случае биотехнология является оптимальным вариантом.

Есть несколько биотехнологических способов получения природных и полусинтетических антибиотиков.

Направленный биосинтез осуществляется прямой ферментацией микроорганизма — продуцента с подходящим предшественником. При этом индуцируется синтез вторичных метаболитов в фазе несбалансированного роста, голодания, когда м.о. прекратили рост, перед образованием покоящихся клеток (идиофаза).

Антибиотик в неблагоприятных условиях подавляет рост м.о. (трофофаза), обеспечивая благоприятные условия для выживания микроба.

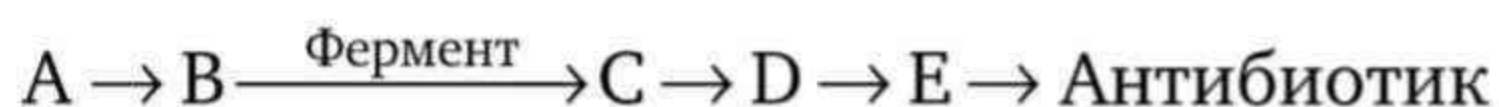
Вводимый предшественник должен лимитировать скорость биосинтеза антибиотика. Например, синтез бензилпеницил-

лина, контролируется добавкой его метаболитического предшественника — фенилуксусной кислоты.

Другой способ интенсификации биосинтеза состоит в *использовании блокированных мутантов*, у которых отсутствует определенное звено для синтеза антибиотика.

В культуральную жидкость вводят аналог предшественника антибиотика и переводят его в аналог самого антибиотика в ходе синтеза, который называется мутационным биосинтезом или мутасинтезом. Такой аналог используется для получения многих синтетических антибиотиков.

Предполагаемая последовательность стадий:



Отсутствие синтеза у мутанта:



Синтез модифицированного антибиотика после аналога предшественника D^* :



Таким путем получают полусинтетические пенициллины. Антибиотики продуцируются плесневыми грибами, актиномицетами, эубактериями и др. м.о.

Каждый из активных видов синтезирует ряд антибиотиков.

В образовании антибиотиков задействовано много генов — до 2 %. Это обеспечивает для м.о. большие возможности адаптации. С другой стороны это затрудняет анализ путей биосинтеза и идентификацию отдельных мутаций, которые бы способствовали повышению выхода антибиотика.

Биосинтез антибиотиков, как и других идиолитов, происходит в фазе замедленного роста популяции (конец трофофазы) и достигает максимума в стационарной идиофазе.

В этот период изменяется статус клеток, освобождаются гены вторичного метаболизма.

В этот период все механизмы, тормозящие активный рост, стрессовые ситуации стимулируют синтез антибиотика.

Культивирование идиолитов происходит в два этапа.

На *первом* этапе накапливается достаточное количество биомассы на среде для роста. На *втором* этапе происходит запуск

и активный синтез антибиотика. При этом ферментацию ведут на продуктивной среде.

Оптимизация состава среды при этом имеет очень большое значение. Быстро усваиваемые компоненты снижают выход.

Некоторые антибиотики происходят от промежуточных соединений обмена первичных метаболитов. Их биосинтез регулируется путем ретроингибирования. Кроме этого биосинтез ряда антибиотиков контролируется высокими концентрациями самих антибиотиков.

В процессе эволюции многие м.о. выработали механизмы защиты от своих антибиотиков.

Большинство антибиотиков получают методом глубинной ферментации в асептических условиях. Период ферментации длится 7—10 суток.

Технология завершающих стадий определяется природой антибиотика. Антибиотики выпускают как в очищенном, так и в неочищенном виде.

Выход обычно составляет несколько десятков грамм на 1 л.

4.5. Технология бактериальных препаратов

В земледелии широко используются химические вещества — удобрения и химические средства защиты растений. При неправильном или неумеренном потреблении эти вещества представляют опасность для окружающей среды и для человека.

Альтернативой таким веществам являются биотехнологические бактериальные препараты. Они менее опасны, отличаются высокой избирательностью действия и очень эффективны. Таким образом, биотехнология здесь представляет собой принципиально новый подход к проблеме повышения урожайности растений за счет обогащения почвы азотом и фосфором, а также устранения вредителей.

Сочетание химических и биологических методов позволяет усилить суммарный результат.

Микробиологическая промышленность для борьбы с вредными насекомыми освоила выпуск препаратов на основе патогенных бактерий, микроскопических грибов и других м.о.

Убытки сельского и лесного хозяйства от насекомых-вредителей составляют до 100 млрд долл. в год. Эти вредители выра-

батывают устойчивость к ядохимикатам. В отличие от химических средств биологические энтомопатогенные препараты обладают высокой специфичностью и почти полной безвредностью для человека, теплокровных животных, птиц и полезных насекомых. Они не изменяют естественных биоценозов, не нарушают экологического равновесия.

Отечественная промышленность выпускает три вида таких препаратов:

- 1) на основе бактерий *Bacillus thuringiensis* — четыре препарата;
- 2) на основе гриба *Beauveria bassiana*;
- 3) на основе вирусов ядерного полиэдроза.

Формы выпуска: смачивающиеся порошки, пасты, дусты, гранулы, инкапсулированные порошки, эмульсии спор, кристаллы. Для удобства применения и повышения эффективности вводят различные добавки.

4.5.1. Бактериальные энтомопатогенные препараты

К настоящему времени разработаны препараты для борьбы с более чем 160 видами вредных насекомых.

Наиболее исследована бактерия *Bac. thuringiensis*, которая образует споры, а при попадании в организм насекомого вызывает отравление, так как вырабатывает четыре токсичных продукта:

- 1) α -экзотоксин или фосфолипаза С-продукт растущих клеток, вызывает распад незаменимых фосфолипидов;
- 2) β -экзотоксин — накапливается в культуральной жидкости симбатно росту клеток. В составе его — аденин, рибоза, фосфор. Действие обусловлено ингибированием некоторых ферментов, что приводит к прекращению синтеза РНК.

Токсин действует медленно и, в основном, при переходе от одного цикла развития насекомого — к другому (яйцо — личинка — гусеница — куколка — бабочка). В-экзотоксин является мутагеном, вызывает появление уродливых особей;

- 3) γ -экзотоксин — мало изучен;
- 4) ζ -эндотоксин — кристаллическое вещество. Образуется в процессе споруляции бактерий в стационарной фазе развития культуры. Растворяется в сильнощелочной среде. При нагревании до 100°C разрушается и теряет токсичность. Представляет собой белок, но, кроме традиционных элементов белка, включает еще 19 элементов — Zn, Al, Ti, Ni, Cr, Cu, Mn, Si и др. Является протоксином.

В организме насекомого (пищеварительный тракт) протоксин расщепляется на токсичные ферменты под действием кишечных протеиназ. Но не все насекомые обладают такими протеиназами. По проявлению токсичности выделяют три группы насекомых:

- 1) с общим параличом;
- 2) с параличом среднего отдела кишечника;
- 3) гибель от прорастания спор и последующего размножения бактерий.

Наибольшую активность препараты данной группы проявляют по отношению к листогрызущим вредителям. При этом имеет место септицемия (сепсис) — форма инфекционного процесса, при которой возбудитель через кровь попадает во все органы и ткани.

Промышленное производство бактериальных энтомогенных препаратов

Промышленное производство энтомопатогенных бактерий осуществляется методом глубинного культивирования. Промышленные штаммы должны удовлетворять высоким требованиям, в том числе, фагоустойчивость.

Фаголизис производственной культуры — труднопреодолимое явление.

На предприятии, кроме традиционных приемов асептики, постоянно используют все новые варианты фагоустойчивых штаммов.

Технология включает все стадии, типичные для метода глубинного культивирования — выращивание посевного материала в лаборатории и в посевном аппарате, промышленное культивирование в ферментере, концентрирование культуральной жидкости, сушка, стандартизация и фасовка готового препарата.

Выпускается препарат преимущественно в виде пасты. Она содержит ряд дополнительных ингредиентов: антииспарители, смачиватели, прижигатели, средства против воздействия солнечной радиации и различные приманки для насекомых.

Препарат применяют для опрыскивания растений в период активного питания вредителя. Чем выше температура в момент применения, тем выше эффективность препарата. Расход составляет от 1 до 5 кг на 1 га.

4.5.2. Грибные энтомопатогенные препараты

Эти препараты вызывают у вредителей специфическое заболевание — микоз.

Отличия грибов от бактерий и вирусов:

- 1) поражение происходит не через пищеварительный тракт, а непосредственно (через кутикулу — верхний слой волоса);
- 2) насекомые поражаются в стадии развития куколки и имаго;
- 3) огромная скорость роста и репродуктивная способность; грибы могут в виде спор сохраняться очень долго;
- 4) высокая специфичность поражения отдельных видов насекомых и в значительной степени, определяемая штаммом.

Воздействие начинается с проникновения споры в полость тела через кожные покровы, особенно, в промежутках между сегментами.

В теле насекомого спора начинает развиваться и разрастается в мицелий, от которого отчленяются конидии. В ряде случаев конидии образуются на поверхности кожного покрова. Конидии на концах ростовых трубок имеют апрессории — вздутия. Эти апрессории прикрепляются к кутикуле и пускают ростки в тело насекомого. Летальный исход наблюдается от нарушения циркуляции гемолимфы и от выделения токсичных веществ.

В отсутствие или при недостатке токсина гриб постепенно (2—8 суток) заполняет все тело насекомого: вначале мышцы, затем другие органы. Наконец, конидиеносцы прорывают кутикулу и обволакивают мертвую личинку.

Препараты безвредны для теплокровных животных и человека, не вызывают ожога у растений.

В России производится препарат боверин, содержащий споры гриба из рода *Beauveria* и его токсин боверицин. Промышленный штамм гриба может выращиваться как методом глубинного культивирования, так и методом поверхностного.

Промышленное производство грибных энтомогенных препаратов

Условия ферментации направлены на получение максимального количества конидиоспор. В оптимальных по составу среды и методу ферментации условиях до 90—92 % клеток превращаются в конидиоспоры.

Производство осуществляют в строго асептических условиях. Особое влияние уделяется выращиванию посевного мате-

риала. Большое влияние оказывает концентрация аминного азота: его дефицит вызывает снижение скорости роста, а избыток — к развитию гонидий.

Готовые высушенные споры стандартизуют небольшим количеством каолина до получения заданного ЛД₅₀.

Поверхностное культивирование проводят по трем методам:

- 1) культивирование на жидких средах, без автоклавирования, перемешивания, аэрации;
- 2) культивирование на твердых и жидких автоклавированных средах без перемешивания и принудительной аэрации;
- 3) комбинированный способ выращивания пленки гриба.

Наиболее высокопроизводительным способом является комбинированный способ выращивания пленки гриба:

- 1) получение маточных культур на зерне;
- 2) выращивание инокулята (проращивание спор) в колбах;
- 3) выращивание и накопление вегетативной культуры в ферментере с принудительной аэрацией и перемешиванием;
- 4) разлив культуральной жидкости по кюветам и выращивание спороносных пленок;
- 5) съем, созревание и сушка спороносных пленок;
- 6) стандартизация препарата каолином.

Питательная среда содержит мелассу, кукурузный экстракт, $MgSO_4$ и KH_2PO_4 (фосфат однозамещенный).

Готовый препарат содержит не менее чем 1,5 млрд конидиоспор в 1 г.

Применяется против листогрызущих вредителей, яблонной и восточной плодовой, а также против личинок колорадского жука на картофеле.

Растения обрабатывают путем опрыскивания. Расход (с добавками химических инсектицидов) 1—2 кг на 1 га.

4.5.3. Вирусные энтомопатологические препараты

Эти препараты наиболее специфичны. Поражают не более одного вида. Полностью безвредны для человека, флоры и фауны. Обладают высокой устойчивостью к неблагоприятным факторам внешней среды: температура, влажность. Вне насекомого сохраняют активность 10—15 лет.

Заражение происходит при питании насекомого. Тельца — включения попадают в кишечник и там разрушаются, а освобожденные вирионы проникают в восприимчивые клетки.

В их ядрах осуществляется репликация вирусов. Вирусы попадают из клетки в клетку и личинка насекомого погибает.

Вирус размножается только в живой ткани, т. е. необходимо использовать живых насекомых-хозяев:

- капустная совка (препарат вирин-ЭКС);
- непарный шелкопряд (вирин-ЭНШ);
- американская белая бабочка (АББ).

Вначале на искусственных питательных средах разводят насекомого-хозяина. На определенной стадии развития (обычно гусеница) насекомых заражают, добавляя вирусную суспензию к корму. Инокулят получают от нескольких больных личинок.

Зараженных насекомых выдерживают в строго определенных условиях до максимального накопления вируса в тканях. Через 7—9 суток собирают мертвые и отмирающие личинки, сушат, измельчают, добавляют физраствор или воду, взвесь фильтруют.

Из фильтра готовый препарат вирин-ЭКС отделяют центрифугированием. Осадок суспендируют, добавляют глицерин и разливают во флаконы.

При получении препарата вирин-ЭНШ в фильтрат добавляют лактозу и ацетон. Отстаивают. Осадок высушивают. Смешивают с наполнителем — каолином или бентонитом.

Готовят и масляные формы (на основе солярового масла).

Применяют путем опрыскивания плотных популяций насекомых в период рождения личинок или на ранних стадиях их развития.

4.5.4. Бактериальные удобрения

Почвенные микроорганизмы влияют на плодородие почв, повышают урожайность. Они улучшают структуру почвы, переводят органические и неорганические соединения в легкоусвояемые компоненты питания.

Применяются бактериальные удобрения нитрагин, азотобактерин и фосфобактерин.

Сухой нитрагин

Это бактериальное удобрение на основе жизнеспособных клубеньковых бактерий рода *Rhizobium*. Его применяют для повышения урожайности гороха, фасоли, сои, кормовых бобов, клевера, люцерны, люпина и др.

Строгие аэробы, бактерии вызывают в корневой системе растения-хозяина образование клубеньков. Бактерии прорастают внутри молодых корневых волосков до самого основания. Инфекционная нить проникает в корень, разрастается. Она индуцирует деление клеток, образование клубеньков, где бактерии быстро размножаются, увеличиваются в объеме. Клубеньки приобретают розовую окраску, благодаря специальному пигменту.

Ни растения, ни бактерии сами по себе азот не фиксируют. Но они образуют симбиотический комплекс. Растение обеспечивает бактерии питанием, а те — снабжают растение легкоусвояемым аммиачным азотом.

Бактерии специфичны, сосуществуют с конкретным хозяином.

Удобрение выпускается в виде сухого порошка с наполнителем каолином. Выращиваются клубеньковые бактерии методом глубинного культивирования. Самой ответственной стадией является высушивание. Клетки должны сохранить жизнеспособность. Каждый новый штамм исследуется на термоустойчивость. Применяют совместно с фосфорно-калиевыми и органическими удобрениями. Вносят путем опудривания семян перед посевом.

Сухой азотобактерин

Удобрение готовится на основе культуры свободноживущего почвенного м.о. *Azotobacter chroococcum*. Он фиксирует до 20 мг азота на 1 г использованного сахара. Обогащает почву биологически активными веществами, которые стимулируют развитие растений. Продуцирует фунгициды, которые угнетают развитие нежелательных микроскопических грибов.

Эти микроорганизмы — строгие аэробы. Они чувствительны к наличию фосфора, развиваются только при большом его содержании.

Азотофиксирующая способность подавляется связанным азотом и аммиаком, но стимулируется молибденом и ванадием.

Азот фиксируется с помощью нитрогеназной системы — мультиферментного комплекса.

Технология аналогична технологии получения сухого нитрагина.

Выпускается также азотобактерии почвенный или торфяной — культура, размноженная на твердой питательной среде, предварительно стерилизованной.

Фосфобактерин

Бактерии превращают сложные фосфорорганические соединения и трудноусвояемые неорганические фосфаты в доступную для растений форму. Они также вырабатывают фосфорсодержащие биологически активные вещества (БАВ).

В производстве фосфобактерина используется спорообразующая культура м.о., получают его споры. Технология не отличается от таковой для сухого нитрагина и для азотобактерина.

4.6. Пищевая биотехнология и биотехнология питания

Биотехнологические методы используют в производстве и в организации потребления пищевых продуктов¹.

В производстве многих пищевых продуктов применяют процессы микробиологического брожения — в хлебопекарном производстве, производстве молочнокислых продуктов, спирта, вина, пива и других.

Биотехнологический подход в теории питания живого организма проявляется учетом роли и свойств компонентов пищи в обеспечении надежности биологических систем организма.

Пищевые продукты включают питательные вещества (пищевые и вкусовые), антипитательные (стереоантиподы), а также вредные чужеродные примеси. Главными питательными веществами являются белки, липиды и углеводы.

Белки обладают различными специфическими функциями. Они являются строительным материалом для образования живых тканей, проявляют каталитические свойства. Некоторые обладают способностью сокращаться или запасать важные для организма вещества. Некоторые обладают токсичностью. Им свойственна и энергетическая функция.

Липиды участвуют в терморегуляции, являются источниками энергии и участвуют в нервной деятельности (мозг).

Углеводы — основной состав рациона, они удовлетворяют энергетические потребности организма и образуют волокна.

Важную роль играют витамины и минеральные вещества.

Научные основы рационального сбалансированного питания (сформулированы А. А. Покровским) позволяют нормиро-

¹ Неверова О. А., Гореликова Г. А., Позняковский В. М. Пищевая биотехнология продуктов из сырья растительного происхождения : учебник. М. : ИНФРА-М, 2014.

вать поступление пищевых веществ в организм для поддержания их содержания в пределах физиологического интервала.

Основные постулаты теории сбалансированного питания:

- питание поддерживает молекулярный состав и возмещает все расходы организма;
- нормальное питание обеспечивается несколькими потоками нутритивных и регуляторных веществ;
- необходимыми компонентами пищи являются балластные вещества;
- ассимилирующий организм является надорганизменной системой;
- эндоэкология организма включает взаимоотношения с микрофлорой кишечника;
- баланс питания поддерживается как за счет компонентов пищи, так и за счет бактериального синтеза микрофлорой кишечника.

Пищевой рацион характеризуется пищевой ценностью (комплекс полезных свойств), энергетической ценностью, биологической ценностью (аминокислотный состав) и биологической эффективностью (содержанием незаменимых ненасыщенных жирных кислот).

Для поддержания структур организма он нуждается в биополимерах. Они содержатся в пище, а также изготавливаются самим организмом.

Содержащиеся в пище биополимеры называются пищевыми волокнами (п.в.). К п.в. относятся целлюлоза, гемицеллюлоза, лигнин, пектин, камеди, слизи, а также сопутствующие им вещества.

Поступающие извне сложные полимеры частично расщепляются на более простые фрагменты, содержащие по два — три углеродных атома. Затем из простых фрагментов синтезируются организменные полимеры. В организме постоянно протекают процессы деградации и синтеза.

Пища обеспечивает связь внешней и внутренней среды организма. Она перерабатывается под действием системы пищеварения (слюна, желудочный сок, поджелудочный сок, желчь и сок кишечника). Продукты расхода пищевых веществ разносятся по всему организму, клеткам, тканям, где и выполняют свою функцию.

Набор пищевых веществ в составе пищи должен соответствовать действию ферментов в пищеварительном тракте.

В желудке биологической трансформации подвергается часть белков. Остальные поступают в тонкий кишечник и под действием гормонов поджелудочной железы перевариваются с очень высокой эффективностью.

Образовавшиеся свободные а.к. поступают в кровь и в печень. В печени и других органах а.к. используются для синтеза белков.

Организм человека нуждается во взаимно сбалансированном количестве так называемых аминокислот, которые содержатся главным образом в продуктах животного происхождения, и при этом, в соотношении, близком к соотношению в белках человека.

Жиры характеризуются показателем перевариваемости. Процесс переваривания заключается в расщеплении на глицерин и жирные кислоты. Процесс происходит под действием нескольких ферментов-липаз, а также желчи и желчных кислот. Желчь и желчные кислоты способствуют переводу жиров в эмульсии и в комплексные соединения. Затем происходит их расщепление под действием липаз.

Чем выше температура плавления жира, тем труднее он переваривается.

Нормируется как количества, так и соотношение количеств твердых и жидких жиров в пище.

Углеводы начинают расщепляться уже во рту человека, здесь они набухают. Затем расщепляются ферментами поджелудочной железы и гликозидами кишечника.

Сахара быстро и легко усваиваются организмом, при этом сахар предварительно распадается на глюкозу и фруктозу.

Желудочно-кишечный тракт не только переваривает биополимерные системы, но и участвует в обмене веществ. Так, если пища содержит недостаточное количество какой-либо незаменимой а.к., желудочно-кишечный тракт пополняет их содержание выделением соответствующих секретов.

Пополнение веществ, экскретируемых в кишечнике, происходит за счет деятельности м.о. Они выделяют вещества, которые действуют на нервные окончания и оказывают регулирующее действие.

За счет суммарного действия различных биологических организмов формируется гомеостаз. Это — динамичное постоянство состава и свойств внутренней среды и устойчивость основных физиологических функций организма.

В формировании гомеостаза важная роль принадлежит депонированию — накоплению резервов в периоды активного пищеварения.

Надежность биологических систем

При функционировании биологической системы в ней происходят непрерывные изменения. Под надежностью понимается репродуктивное качество системы.

По сравнению с механическими системами — системы биологические, живые функционируют в наиболее «мягких» условиях и при высоком КПД. Они миниатюрны, характеризуются высокой концентрацией энергии. Все системы самовосстанавливаются и дублируются.

Однако, давление внешних факторов, особенно, химических усиливает процессы деградации. Чужеродные загрязнения поступают в организм в большом количестве с пищей: они неблагоприятно влияют на пищеварение и усвоение пищевых веществ, понижают иммунитет, сенсibiliзируют и отравляют организм, оказывают тератогенный, канцерогенный, эмбриотоксический эффект. Ускоряют старение и нарушают воспроизводство.

Вредное влияние могут оказывать некоторые пищевые добавки. Основную опасность представляют токсичные элементы — F, Ag, Al, Cr, Cd, Ni, Cu, Pb, Zn, Hg.

Канцерогенное действие оказывают три группы веществ:

- с достоверно установленным действием (As и его соединения, бензол, бензидин, винилхлорид, 2-нафтиламин, 4-аминобифенил, смола, сажа, нефтепродукты);
- с канцерогенностью, доказанной лишь экспериментально (полициклические углеводороды, афлатоксины, некоторые металлы, хлорированные углеводороды, гербициды и т. д.);
- с недостаточными и противоречивыми данными — Pb.

Канцерогены могут иметь природное и антропогенное (техногенное) происхождение. Природные канцерогены могут быть метаболитами живых организмов, либо возникать абиогенно. Вещества антропогенного происхождения существенно усиливает онкологическую нагрузку на человека: диоксины и диоксиноподобные соединения; ДДТ и другие пестициды; нитраты, нитриты и нитросоединения; полициклические ароматические углеводороды.

Компоненты пищи, выполняющие защитные функции

Преимущественным фактором, который способствует проявлению негативного действия повреждающих факторов внешней среды, является неправильное питание, особенно, в сочетании с неправильным образом жизни. Между тем, применение профилактических средств обходится намного дешевле, чем лечение.

Действие профилактических препаратов проявляется медленно, поэтому их необходимо систематически включать в рацион.

Печень и иммунная система человека на макро- и микроорганизменном уровне разрушают токсические соединения, связывают их в нейтральные комплексы и удаляют из организма.

Некоторые компоненты пищи, которые не являются источниками энергии или пластическими ресурсами, обладают защитным действием:

- обеспечивают барьерные функции тканей;
- улучшают обезвреживающую функцию печени, борются против микроорганизмов, вирусов и различных чужеродных веществ;
- проявляют антиканцерогенный эффект.

Защитное действие проявляют витамины, ион K^+ , полиненасыщенные жирные кислоты, большинство фитонцидов — летучих ароматических соединений. Хлорофилл также обладает антибактериальной активностью.

Пектиновые вещества и другие балластные соединения связывают м.о. и образуемые ими токсины и способствуют удалению из организма.

Компоненты, обладающие защитными действиями, содержатся во многих продуктах. Это — в основном:

- молоко;
- творог;
- молочнокислые продукты;
- нежирное мясо и рыба;
- яичный белок;
- морские продукты;
- мука грубого помола;
- отруби;
- овсяная и гречневая крупа;
- морковь;
- тыква;

- капуста;
- ягоды (особенно шиповник);
- сухофрукты.

Рацион питания должен быть разнообразным, так как наблюдается взаимоусиливающееся действие защитных веществ.

Однако некоторые пищевые источники могут содержать вещества, которые противодействуют влиянию защитных веществ, например, холестерин, пуриновые основания.

Рекомендуется использовать в диетах защитные вещества в виде порошкообразных, гранулированных и жидких препаратов.

Здоровье населения связано не только с экологией, но и со структурой питания. В настоящее время наблюдается опасное падение производства животноводческой продукции, ее высокая стоимость и малая обеспеченность населения.

В общегосударственном масштабе целесообразно обогащать продукты питания витаминами и минеральными веществами. При этом должно уделяться внимание выбору обогащаемого продукта и обогащающей добавки, уровню содержания добавки, безопасности и эффективности. Возникают также чисто технологические проблемы и проблемы спроса. В процессе производства и хранения следует учитывать возможность взаимодействия обогащающих добавок между собой и с компонентами продукта. Существует несколько технологий обогащения — сухое смешивание, растворение (в воде или масле), напыление, налипание, нанесение покрытий.

К пищевой биотехнологии относится оценка безвредности технологичности в производстве полноценных и обогащенных продуктов, а также генетически модифицированных продуктов.

Важным аспектом пищевой биотехнологии является решение задач максимального использования пищевых ресурсов путем привлечения вторичных продуктов и отходов, внедрение безотходных и малоотходных технологий переработки растительного и животного сырья.

Переработка вторичных продуктов пищевой промышленности

Комплексная переработка сырья с использованием всех компонентов и энергии в замкнутом цикле без нарушений в экологии является основой безотходных производств.

В малоотходных производствах вредное воздействие на окружающую среду не превышает допустимого уровня. Био-

технологические методы заключаются в целенаправленном использовании ферментов и живых клеток м.о.

Вторичные продукты молочной промышленности

В производстве сливочного масла, сыра, творога и казеина образуются вторичные продукты:

- обезжиренное молоко;
- пахта;
- молочная сыворотка.

Из них получают напитки, белковые концентраты и добавки, сгущенные продукты, плавленые сыры, заменители цельного молока (ЗЦМ), творог и другие. Однако проблема рационального использования вторичных продуктов молочной промышленности еще решена не совсем.

Так, в производстве молочного сахара — лактозы предстоит совершенствовать методы очистки от высокомолекулярных белков.

В стадии разработки находятся многие процессы с применением гидролизованной молочной сыворотки: получение напитков, обогащенных сред и ингредиентов для приготовления теста и улучшения качества хлеба, для активации хлебопекарных дрожжей, для совершенствования качества и технологии кондитерских изделий.

При концентрировании молока применяется гидролиз лактозы. Его используют также в производстве кисломолочных продуктов и сыров с целью улучшения жизнедеятельности молочнокислых бактерий и дрожжей заквасок.

Используются ферментные препараты, например, β -галактозидаза для производства кефира.

Ферментные гидролизаты вторичных молочных продуктов применяют при изготовлении мороженого.

Большое значение имеет технология ферментативной коагуляции обезжиренного молока и пахты для получения творога.

Биотехнологические методы успешно используются для переработки малоценных отходов мясоперерабатывающей промышленности.

4.7. Промышленная биотехнология

Органические кислоты

Более пятидесяти органических кислот получают биотехнологическим синтезом: молочную, масляную, пропионовую,

глюконовую, винную, уксусную, лимонную, янтарную, яблочную, фумаровую и другие.

Продуцентами являются мицелиальные грибы разных родов, особенно, *Aspergillus* и *Penicillium*, которые широко распространены.

В качестве сырья и источника углерода используются углеводы: сахар, глюкоза, свекловичная и тростниковая мелассы, различные гидролизаты, этиловый спирт, жидкие парафины нефти.

Лимонная кислота $C_6H_8O_7$ — трехосновная: оксикислота, широко распространена в плодах и растениях. Применяется в пищевой и фармацевтической промышленности, в косметике.

Технические области применения — гальванотехника, дубление и окраска кож, мехов, изготовление СМС и алкидных смол.

Мировое производство биотехнологическим методом составляет 400 тыс. т. в год.

Лимонную кислоту продуцируют различные штаммы *Aspergillus niger*, которые имеют разную скорость роста, легкость культивирования и дают разный выход кислоты.

Механизм химических превращений, при которых глюкоза превращается в лимонную кислоту, хорошо изучен (рис. 4.3). Под действием ферментов *A. niger* из глюкозы вначале образуется две молекулы пирувата. Затем под действием пируват-дегидрогеназы одна молекула пирувата декарбоксилируется, образуя ацетил — КоА, а вторая при декарбоксилировании переходит в оксалоацетат. Далее под контролем цитратсинтазы оксалоацетат и ацетил-КоА сливаются, образуя молекулу лимонной кислоты.

При подавлении процесса размножения *A. niger* выход близок к теоретическому.

Условия культивирования:

- содержание углеводов в питательной среде 5—20 % (поверхностный способ 12—16 %, глубинный 4 %);
- лучший субстрат — сахароза или меласса;
- источники азота, фосфора (калий фосфат), макро- и микроэлементы (Zn, Mg, K и др.);
- избавляться от Fe и других тяжелых металлов осаждением желтой кровяной солью.

Выход до 1,25 кг лимонной кислоты в сутки с 1 м² при поверхностном культивировании и до 12 кг/м³ — при глубинном.

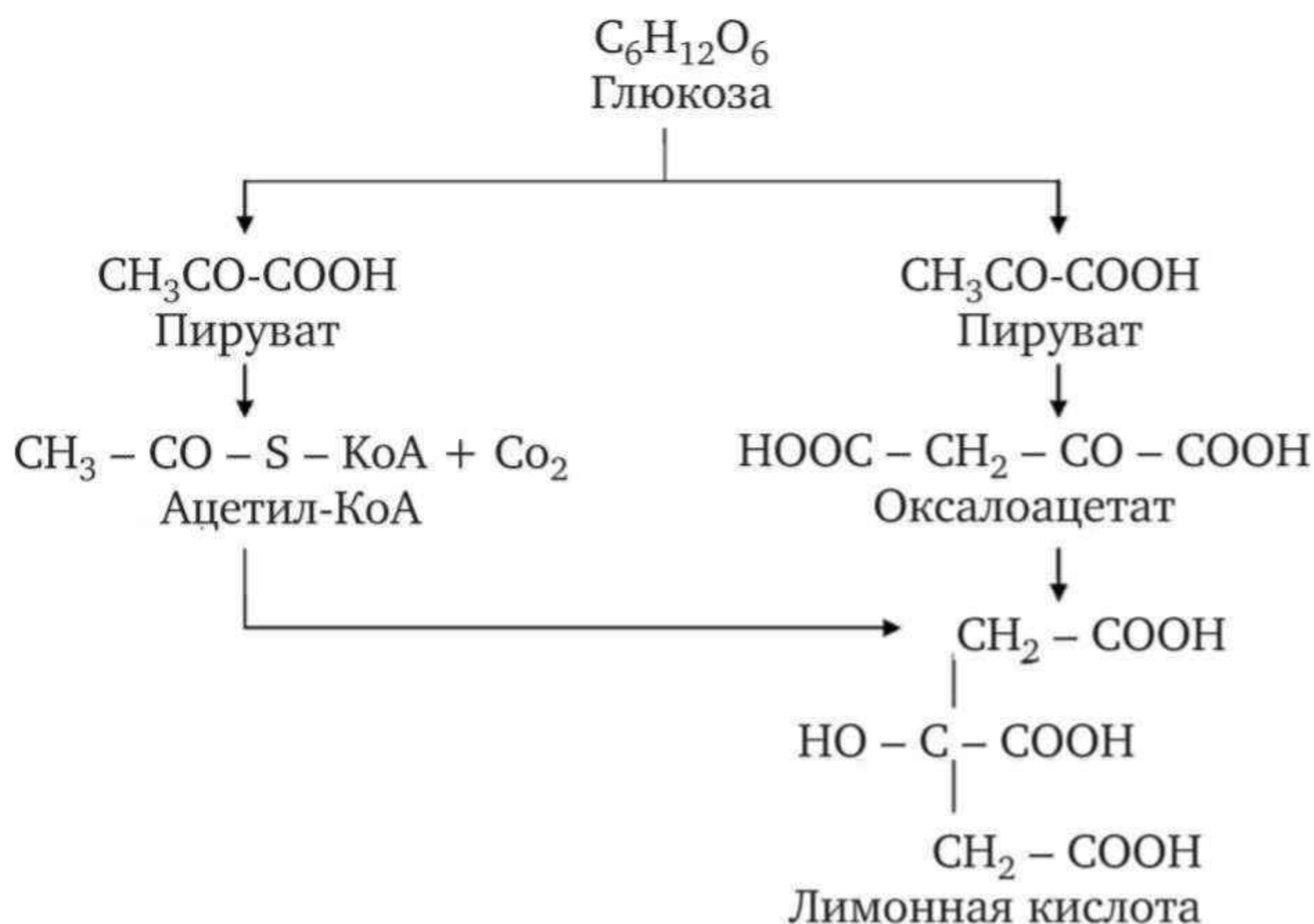


Рис. 4.3. Схема биосинтеза лимонной кислоты

Кофермент А — пантотеновая кислота — $KoASH$ действует как промежуточный акцептор и переносчик различных кислотных остатков, которые подвергаются в составе ацетил КоА различным превращениям или передаются в неизменном виде на определенные метаболиты. Во всех случаях $KoASH$ связан с ацильными остатками тиоэфирной связью.

Культивирование

Культивирование на поверхности твердой фазы осуществляется в неглубоких лотках на поверхности влажных отрубей, риса или пшеницы. По окончании процесса кислота вымывается водой, а затем осаждается в виде кальциевой соли.

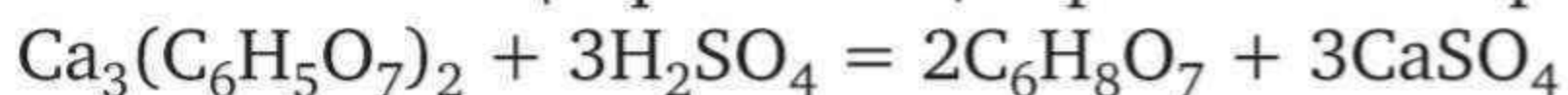
Поверхностное культивирование в жидкой среде осуществляется в бродильных камерах со стеллажами для кювет.

Слив и заполнение кювет производится через штуцеры на дне кювет. Камера имеет устройства для подачи нагретого стерильного воздуха. Стерилизованные кюветы заливаются культуральной жидкостью, засеиваются спорами гриба. Растущий мицелий покрывает пленкой поверхность ($t = 34-36^\circ C$ и затем $32-34^\circ C$). Через 4 суток подачу воздуха увеличивают (интенсивный рост), а затем опять снижают.

По окончании процесса жидкость сливают и извлекают из нее кислоту.

Из пленки гриба извлекают фермент пектиназу или используют на корм животным.

Лимонную кислоту извлекают в виде Са-соли путем обработки известью. Цитрат кальция разлагают серной кислотой:



После очистки раствор упаривают в две стадии до концентрации 80 %.

Кристаллизацию и сушку проводят при $t \leq 35^\circ\text{C}$. Товарный продукт содержит 99,5 % лимонной кислоты.

Крупное промышленное производство лимонной кислоты методом поверхностного культивирования организовано в Японии.

Производство уксусной кислоты

Уксусная кислота образуется при жизнедеятельности бактерий рода *Acetobacter*, которые окисляют этиловый спирт в уксусную кислоту действием фермента алкогольоксидазы:



Применяется способ глубинного культивирования в ферментаторах.

Продуцентами являются бактерии *Bacterium Schutzenbachii* и *Bacterium curvum*, а сырьем — этиловый спирт, очищенный от сивушных масел.

Процесс ведут в ферментаторах, соединенных по пять штук в батарею. Посевной материал подается только в первый, а затем перекачиваются воздухом в другие. Спирт этиловый 40 % подают во все аппараты.

Выходящий из пятого аппарата раствор содержит уксусную кислоту с концентрацией 9,0—9,3 %.

После перемешивания, осветления и фильтрования получают 9 % раствор — столовый уксус.

Бактериальное выщелачивание металлов из руд

В промышленности этот метод применяется для извлечения меди и других металлов из бедных руд, моечных вод, отвалов.

Объектом обработки являются сульфидные руды, например пирит FeS_2 , халькопирит CuFeS_2 , галенит PbS_2 , аргенит Ag_2S и другие аналогичные соединения.

Для этого используют бактерии-хемолиты рода *Thiobacteri-oseae*.

М.о. окисляют серу до более высоких с.о. и выделяющуюся энергию используют для своей жизнедеятельности.

Хемолиты бывают трех видов:

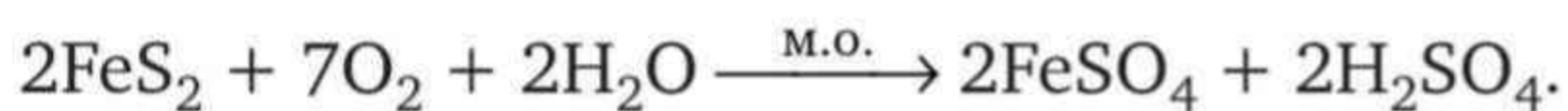
- 1) автотрофы, использующие углерод из CO_2 ;
- 2) миксотрофы, использующие углерод из CO_2 и органических веществ;
- 3) гетеротрофы, использующие углерод из только органических веществ.

Из полученных растворов металлы извлекают методом цементации или электроэкстракции.

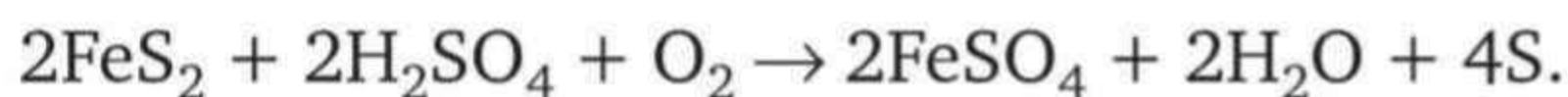
Бактериальное выщелачивание используют непосредственно в шахтах, без извлечения руды на поверхность. Руда измельчается взрывом; раствор распыляется по ее поверхности. Из нижнего горизонта жидкость выкачивают и потом возвращают в шахту. Некоторые бактерии окисляют не только сульфиды, но и элементарную серу.

М.о. действуют избирательно; одни штаммы концентрируют Fe, Cu, Zn и Ni, другие — Co, U, Cr, As.

Пример:



Далее «работает» H_2SO_4 :



Метод бактериального выщелачивания обладает важными преимуществами:

- применим, как для отдельных руд, так и для смесей;
- технологическая простота — применяются простое фильтрование и реакторы;
- низкие температуры;
- не образуются газы, а жидкие стоки легко концентрируются;
- процесс саморегулирующийся, возможен переход по типу



Недостатками способа являются необходимость тщательного контроля, а также низкая скорость процессов.

4.8. Экологическая биотехнология

4.8.1. Задачи экологической биотехнологии

В задачу экологической биотехнологии входит решение проблем защиты окружающей среды:

- переработка отходов;
- очистка воды;
- устранение загрязнений.

Экобиотехнология решает весь круг проблем, связанный с этой задачей. Сюда относятся все вопросы от разработки и совершенствования методологии комплексного исследования экосистем¹, особенно, вблизи источников загрязнения о.с. — до разработки технологий и рекомендаций по рекультивированию почвы, биологической очистке воды и воздуха. К числу важных задач экобиотехнологии относят и биосинтез лекарственных препаратов. Они компенсируют влияние на людей и животных неблагоприятных изменений в о.с.

В круговороте веществ, загрязняющих экосистемы, огромную роль играют м.о. Их широко используют для переработки отходов жизнедеятельности человека — ядовитых веществ, бытового мусора, различных отходов, которые, в том числе, загрязняют водоемы и воздух. Многие из таких веществ очень устойчивы и требуется разработка усовершенствованных технологий.

Биологической активностью обладают многие созданные человеком вещества, особенно галогенсодержащие углеводороды. О.с. загрязняют также многие вещества природного происхождения, например, ароматические.

4.8.2. Биотрансформация ксенобиотиков и загрязняющих окружающую среду веществ

Чужеродные вещества (ксенобиотики), попадая в организм человека и животных подвергается различным биотрансформациям.

В окислении чужеродных веществ участвуют микросомальные (микроорганизменные) монооксигеназы и комплексы мембранно-связанных ферментов.

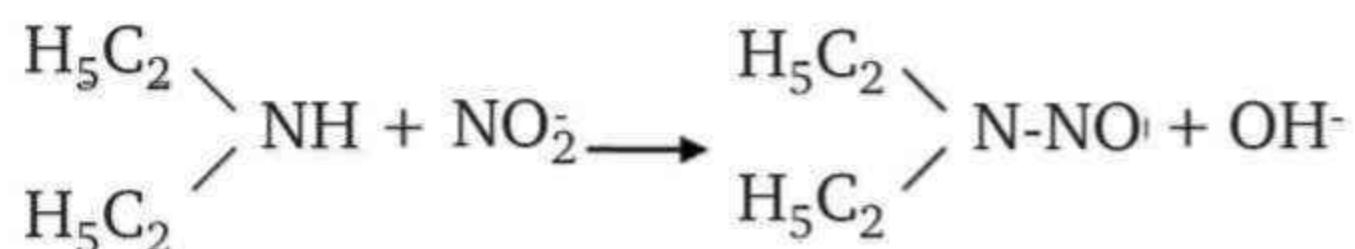
Эти процессы протекают в воде и в почвах. Их изучение в почве очень затруднено из-за явлений адсорбций в гетерогенной среде.

Устойчивость многих ксенобиотиков в биосфере очень высока.

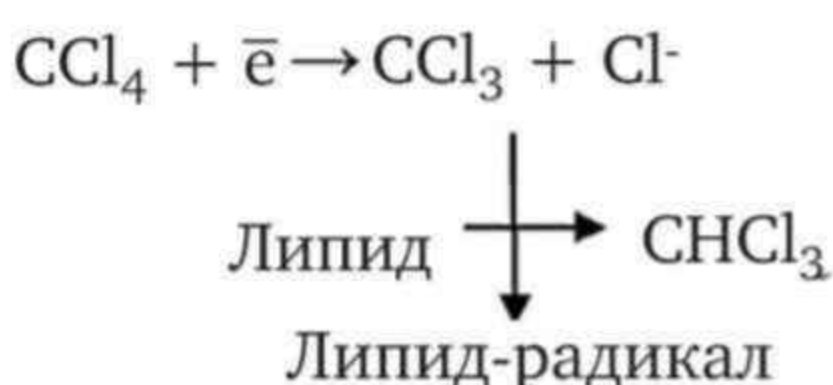
¹ Кузнецов А. Е., Градова Н. Б. Научные основы экобиотехнологии: учеб. пособие для вузов. М. : Мир, 2006.

Примеры биотрансформации ксенобиотиков и загрязняющих веществ

1. Окисление диэтиламина с образованием канцерогенного нитросоединения в желудке млекопитающих:



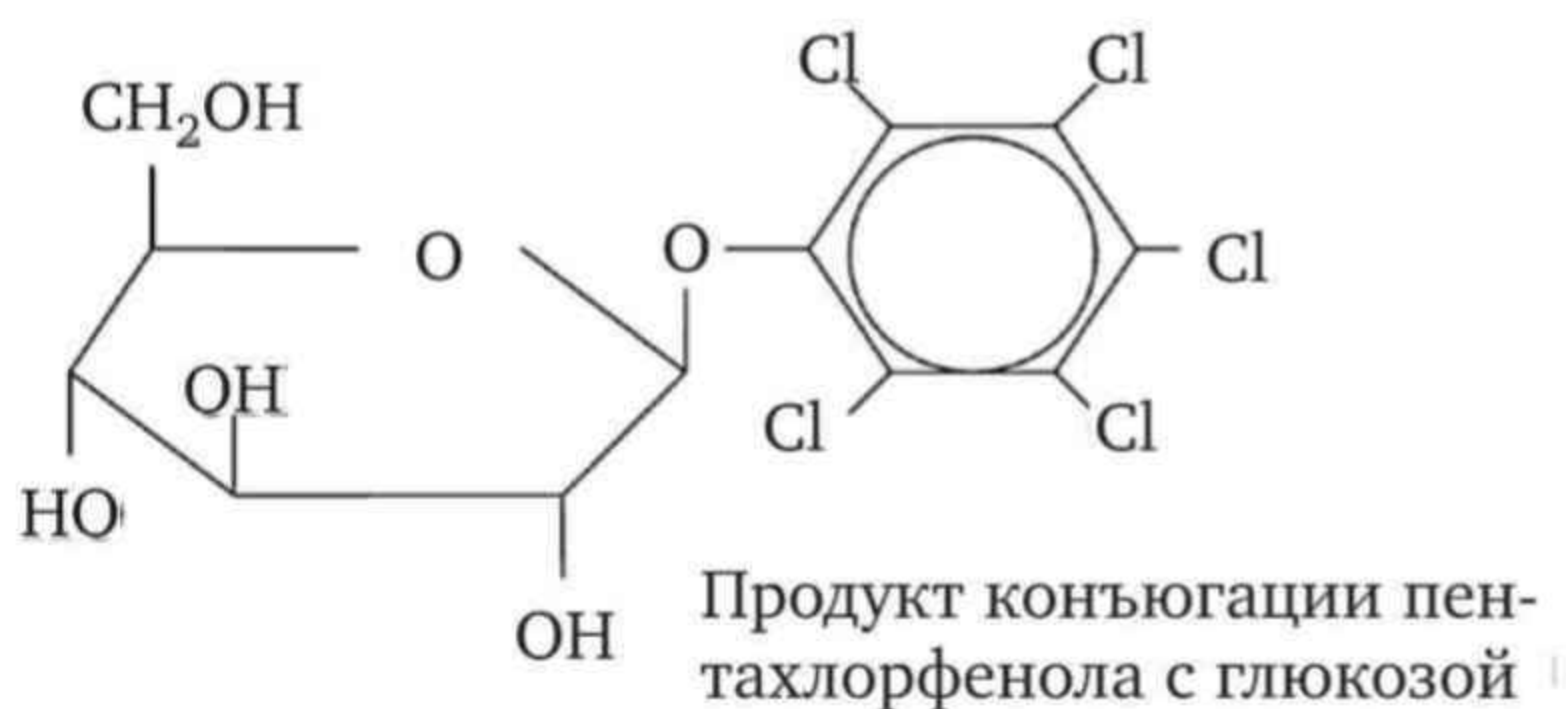
2. Восстановление четыреххлористого углерода в печени с образованием промежуточного трихлорметильного радикала, способного вступать в реакции окисления и переводить другие молекулы в перекисные соединения, вызывающие повреждение печени:



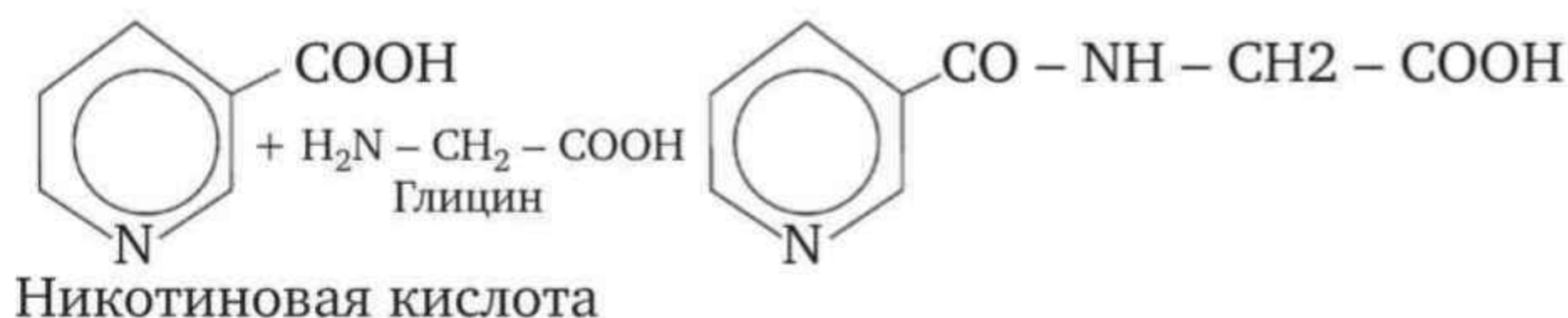
3. Трансформация оксида мышьяка с образованием триметилированного производного:



4. Пример конъюгата чужеродного вещества с биомолекулой растения:



5. Пример конъюгации у животных:



4.8.3. Очистка сточных вод

Общая характеристика сточных вод

Состояние сточных вод определяется совокупностью ряда показателей, среди которых:

- органолептические свойства;
- физико-химические свойства;
- содержание нерастворимых примесей (взвешенные частицы или зольность);
- концентрация растворимых веществ неорганических и органических (органический «углерод»);
- перманганатная и дихроматная окисляемость;
- химическое потребление кислорода ХПК;
- биохимическое потребление кислорода БПК.

Некоторые компоненты даже в минимальных количествах влияют, как на свойства воды, так и на возможность ее очистки.

Из всех показателей наиболее трудно определяется содержание органических веществ, хотя этот показатель необходимо знать для контроля степени очистки, возможности повторного использования или сброса воды в водоемы.

Химическое потребление кислорода основано на окислении органических веществ 0,25 %-м раствором дихромата калия при кипячении пробы в 50 % (по объему) растворе серной кислоты в течение 2 ч.

Метод прост в исполнении, но при этом окисляются не все соединения.

Биохимическое потребление кислорода измеряется количеством кислорода, которое расходуется при аэробном биологическом разложении веществ, содержащихся в сточных водах в заданный интервал времени. В герметичный ферментер помещается определенное количество сточной воды, засеваются м.о., затем регистрируется количество потребляемого при окислении кислорода. Способы испытания различны. Различают потребление за 5, за 20 суток и полное. Перед анализом сточную воду нейтрализуют, слишком концентрированную разбавляют.

Важно правильно выбрать микрофлору, адаптированную к конкретным условиям эксперимента.

Для определения возможности очистки необходимо знать, как ХПК, так и БПК, поскольку они не идентичны.

Аэробные процессы очистки сточных вод

Аэробные процессы биоочистки делятся на экстенсивные (поля орошения, поля фильтрации, биопруды) и интенсив-

ные, с помощью активного ила или биопленки — естественно возникшего биоценоза в конкретных условиях производства. Активный ил состоит из хлопьев — зооглей. Зооглеи являются симбиотическими сообществами разных популяций, покрытыми слизистой оболочкой.

Из м.о. образующих зооглеи наиболее многочисленны бактерии рода *Pseudomonas*, а также *Bacterium* и *Bacillus*. Все они окисляют разные группы органических соединений.

Формирование активного ила — процесс достаточно сложный и невоспроизводимый. На него влияют состав сточной воды, сезонные колебания температуры, обеспеченность кислородом и микроэлементами.

Существенная роль в создании консорциума принадлежит простейшим. Доля количества простейших называется коэффициентом протозойности.

Скорость биохимического окисления увеличивается с ростом зооглейности и протозойности.

Простейшие поглощают старые ослабленные бактерии и выделяют экзоферменты, способствующие очистке. Инфузории, жгутиковые, амёбы и коловратки и др. мельчайшие животные пожирают бактерии и омолаживают ил.

В биофильтрах имеет место особый случай биоценоза. Здесь возникает биопленка, прикрепленная к носителю. Она практически полностью извлекает из воды все органические примеси, так как по высоте и толщине фильтра ее состав очень неоднороден, в каждый момент в биодеградации загрязнений участвуют различные м.о.

Ценозы м.о. активного ила и биопленки на фильтрах постоянно обновляются, адаптируются к меняющимся условиям.

Некоторые химические вещества, компоненты сточных вод оказывают токсичное действие на м.о. активного ила, нарушая их жизнедеятельность. Это — фенол, формальдегид, другие антисептики. Ряд тяжелых металлов по степени токсичности:



Основными параметрами, влияющими на биологическую очистку в аэробных условиях под открытым небом, являются температура, рН, концентрация растворенного кислорода, степень перемешивания, концентрация и возраст циркулирующего в очистных системах активного ила, наличие в воде токсичных примесей.

Температура. Большинство очистных сооружений работают под открытым небом и испытывают сезонные колебания температуры. В холодное время, уже при падении температуры от 20 до 6°C скорость очистки падает в 2 раза, вымывается активный ил, снижается зооглейность.

Однако при слишком высокой температуре уменьшается аэрация.

Значение pH. Большинство бактерий хорошо развиваются в нейтральной и слабощелочной среде ($\text{pH} = 5,0\text{—}6,5$). В системе очистки оптимальное значение $\text{pH} = 5,5\text{—}8,5$. Оно поддерживается почти автоматически. Все стараются смешивать разные стоки для получения оптимального значения pH.

Концентрация растворенного кислорода. Скорость растворения O_2 должна быть не ниже, чем скорость его потребления. В среднем концентрация O_2 не должна быть ниже, чем 0,5 мг/л. При недостаточной аэрации не только уменьшается скорость очистки, но еще накапливаются продукты жизнедеятельности м.о. и развиваются нежелательные виды — нитчатые формы *Sphaerotilus natans*, которые препятствуют отстаиванию.

Перемешивание сточной воды и активного ила. Поддержание активного ила во взвешенном состоянии улучшает условия для массопереноса, разрушает слишком крупные хлопья ила, улучшает контакт м.о. со средой.

Биогенные элементы. Кроме углерода м.о. нуждаются в азоте и фосфоре. Они являются строительным материалом клетки и обеспечивают энергообмен. Другие важные элементы — K, Na, Mg и др. всегда имеются в достаточном количестве. Но азот и фосфор при их недостатке нужно добавлять в виде сульфатов и нитратов аммония, мочевины, аммофоса, суперфосфата и др. Синтетические добавки могут ингибировать рост активного ила. Поэтому лучше использовать фекальные сточные воды.

Доза и возраст активного ила. В обычных сооружениях очистки концентрация активного ила составляет 2—4 г/л. Увеличение концентрации требует усиления аэрации, но увеличивает скорость очистки. Повысить концентрацию ила можно путем его возврата из вторичных отстойников или флотацией.

Время рециркуляции активного ила в системе очистных сооружений называется его возрастом. Чем «моложе» ил, тем менее эффективен — он содержит меньше простейших, более

рыхлый, более мелкие частицы. Но его осаждаемость более высокая.

Техническая реализация аэробных способов очистки

Используется система аппаратов аэротенк-отстойник. Аэротенк — это открытое (удлиненное, неглубокое) железобетонное сооружение, через которое пропускается сточная вода, содержащая органические загрязнения и активный ил.

В аэротенках вытеснения (рис. 4.4) свежая порция ила и вода подаются одновременно, вместе движутся по аппарату, в конце осадок ила с водой отводится снизу и поступает в отстойник.

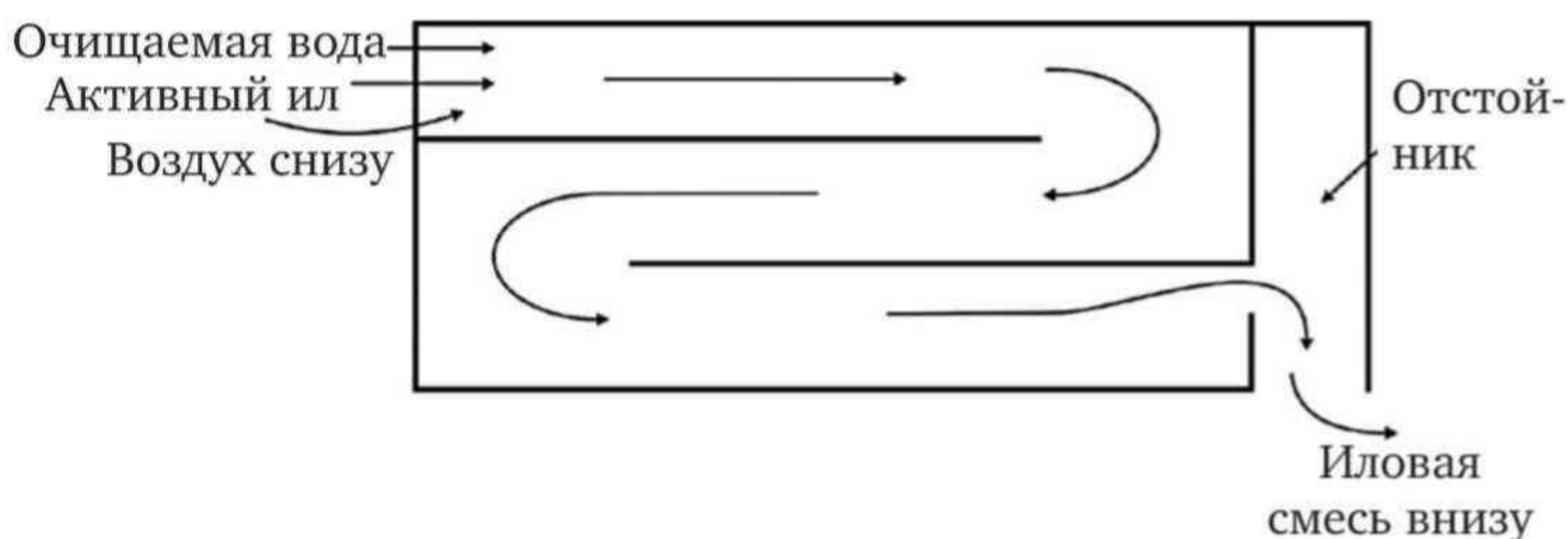


Рис. 4.4. Принципиальная схема функционирования аэротенка в режиме вытеснения

В аэротенке-смесителе активный ил и сточная вода поступает в аппарат по всей длине одновременно. Создается режим полного смешения (рис. 4.5).

Существуют и более сложные конструкции.

В аппарате первого типа в каждой точке аппарата скорость развития конгломерата микроорганизмов определяется составом культуральной среды, которая образовалась к этому моменту. В каждый момент преимущественно развивается тот тип м.о., для которого создана оптимальная концентрация питательных веществ. По завершении очистки на выходе состав ила возвращается к исходному. Система очень чувствительна к колебаниям начальной концентрации (загрязнений). Полная очистка достаточно длительна.

В аэротенке-смесителе развитие м.о. происходит по тем же законам, что и в хемостате. Ил (его отдельные м.о.) не ингибируется повышенными концентрациями загрязнений, но и остаточная концентрация остается на постоянном уровне. Все м.о. активного ила находятся в стадии лимитированного роста.

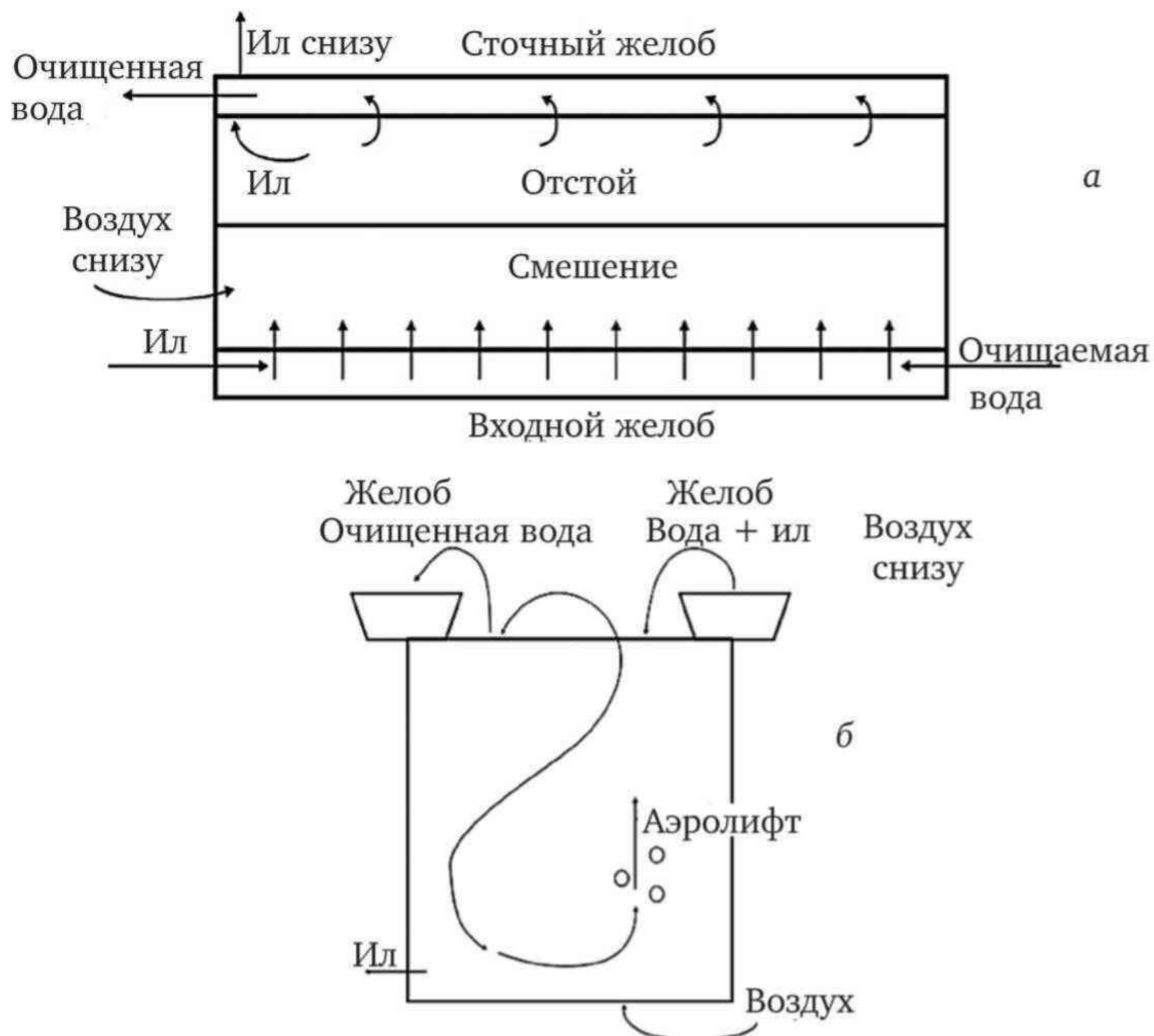


Рис. 4.5. Принципиальная схема функционирования аэротенка в режиме смешения: вид сверху (а) и сбоку (б)

Как правило, схема аэробной очистки включает следующие стадии:

- усреднение и осветление сточных вод от механических примесей;
- аэробная биологическая очистка (аэротенки, регенераторы активного ила, вторичные отстойники);
- доочистка сточных вод (биологические пруды, фильтровальные станции);
- обработка осадков (иловые площадки, сушилки, печи и т. д.).

Регенерация активного ила происходит в отделении аэротенка, куда не подается вода, но подается воздух. Здесь происходит восстановление способности ила сорбировать все примеси.

Очищенная вода и активный ил из аэротенка подаются во вторичный отстойник, где происходит отделение ила

от воды. Часть активного ила возвращается в систему очистки, а часть поступает на иловые площадки, а после обезвоживания — на поля.

На биологических прудах очищенная вода проходит дальнейшее осветление и насыщение кислородом.

В общую схему очистки включаются механические (фильтрование) и химические методы.

Вместо воздуха можно использовать кислород. Такой аппарат называют окситенком. Он герметично закрыт. Избыточное количество образовавшегося CO_2 периодически отдувают.

Окситенки — более сложные аппараты, но занимают меньшую площадь, более эффективны и производительны.

Очистка с использованием биофильтров. В биофильтрах (рис. 4.6) клетки микроорганизмов находятся в неподвижном состоянии, так как прикреплены к поверхности пористого носителя. Образуется иммобилизованная биопленка. Этот способ не является полностью аэробным. Здесь практически полностью удаляются все примеси.

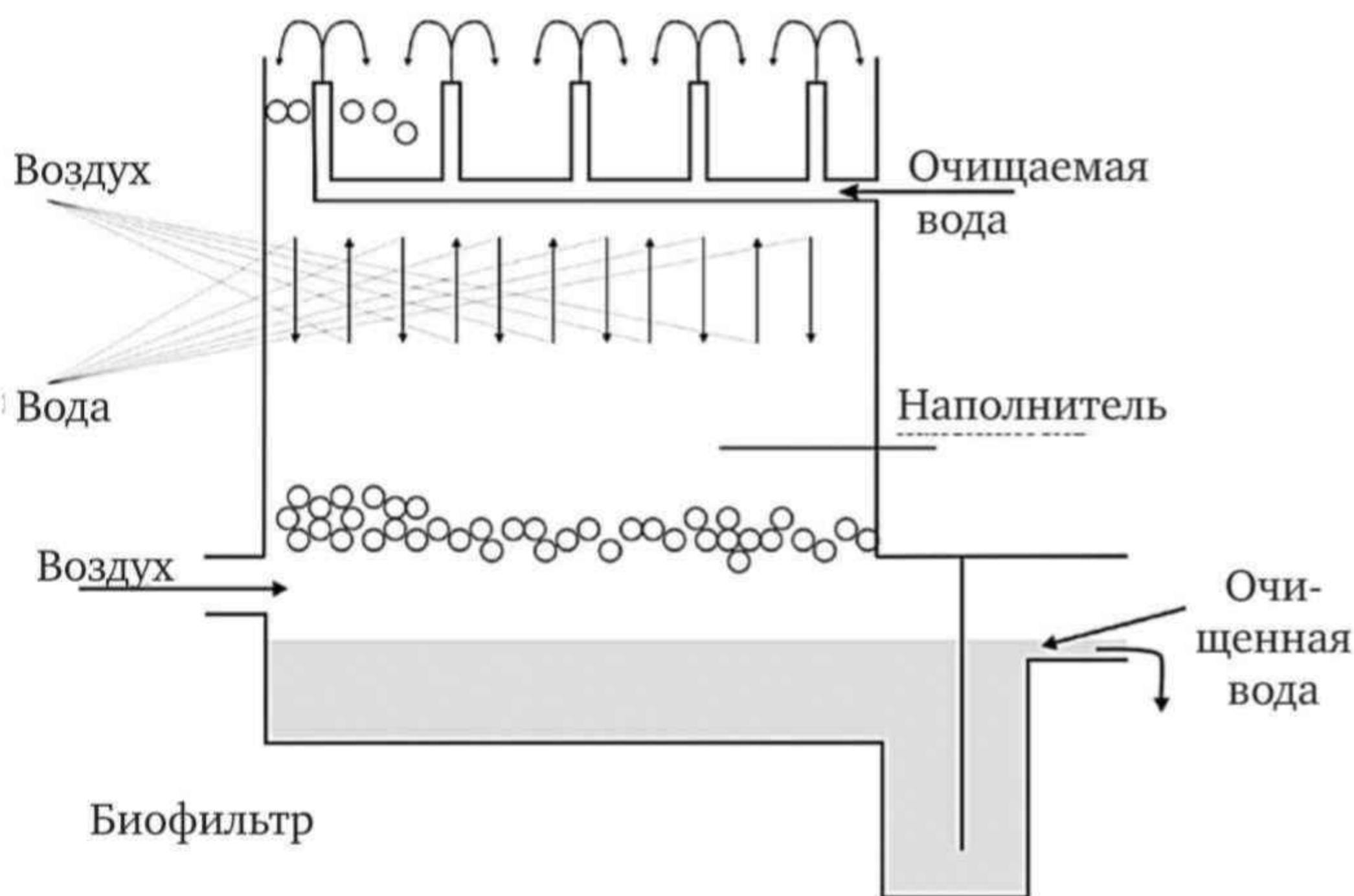


Рис. 4.6. Биофильтр с неподвижной насадкой

Недостатки: содержание загрязнений не должно быть большим, они повреждают пленку; поверхность биофильтра должна орошаться равномерно с постоянной скоростью. Сточные воды необходимо предварительно фильтровать от механических загрязнений.

Можно загружать разный твердый материал — керамику, щебень, гравий, керамзит, полимерные материалы.

Противоток воды и воздуха не способствует развитию наиболее легко развивающихся м.о. Это является недостатком метода. Оторвавшиеся частицы пленки в биофильтр не возвращаются, а отводятся на иловые площадки.

Применяют также аэротенки-вытеснители со стеклоформами, на которых образуется пленка.

Экстенсивные методы очистки водных выбросов

К этим методам относятся биологические пруды, поля орошения, поля фильтрации.

Пруды с искусственной или естественной аэрацией — сооружения, где под воздействием биоценоза активного ила окисляются органические примеси. Состав биоценозов зависит от глубины. В верхних слоях воды размножаются аэробы, в нижних слоях — анаэробы.

Насыщение воды кислородом происходит за счет фотосинтеза, осуществляемого водорослями. В прудах есть также микрофауна.

Пруды используют для удаления остаточных количеств нефтепродуктов, фенолов и т. д.

Процесс очистки в прудах неуправляем, и скорость его незначительна.

Поля фильтрации служат только для очистки, на них подается максимальное количество жидкости. Здесь сточные воды очищаются путем фильтрации через почвенные горизонты — глину, песок.

Поля орошения предназначены для выращивания сельскохозяйственных растений, в основном, кормовых. Сточная вода удобряет почву за счет содержащихся в ней микроорганизмов и примесей. Вода подается по мере надобности.

На тех и других полях самоочищение воды происходит за счет почвенных организмов. На степень очищения влияет структура почвы: она должна быть оптимальной. Процессы окисления идут на поверхности комочков, из которых состоит почва. Но если комочки очень мелкие, то к ним затрудняется доступ кислорода.

Большую роль играют нитрифицирующие бактерии. В верхних слоях почвы они образуют нитраты, поступающие в нижние слои. Там нитраты используются для доокисления сохра-

нившихся органических соединений денитрифицирующими бактериями.

Анаэробные процессы переработки отходов

Эти процессы применяются для сбраживания высококонцентрированных стоков и осадков с большим количеством органических веществ. Используются специальные аппараты *метантенки*.

По схеме Баркера процесс брожения состоит из двух стадий — кислой и метановой. Первая стадия осуществляется органотрофами, метановая — литотрофами. Обе группы работают параллельно.

Микрофлора метантенка формируется сточными водами или осадком. Этот биоценоз беднее, чем аэробные биоценозы. Выделено лишь 50 видов бактерий, способных осуществлять кислотобразование. Это облигатные анаэробы — бациллы и псевдомонады, а также некоторые факультативные анаэробы. Конечные продукты брожения на первой стадии — низшие жирные кислоты, диоксид углерода, ионы аммония, сероводород. На второй стадии образуются диоксид углерода и метан. Метанобразующие бактерии являются строгими анаэробами.

В метантенке происходит очистка сточных вод и одновременно образуется биогаз.

Ряд токсичных веществ ингибируют брожение.

Большое значение имеет интенсивность перемешивания. При отключении перемешивания, оседании осадка выход биогаза снижается в 3 раза.

Большое значение имеет температурный режим — мезофильный (30—35°C) или термофильный (50—60°C). Во втором случае этот неуправляемый и медленный процесс идет более интенсивно.

Метантенк (рис. 4.7) в общем случае — это герметичный ферментер с перемешиванием и обогревом (рубашка). Реактор снабжен газоотделителем и противополаменными устройствами (на рисунке не показаны).

Тенки работают в периодическом режиме загрузки отходов и выгрузки твердого осадка и с постоянным отбором биогаза.

Метантенки применяются не только для сбраживания осадков и избыточного активного ила, но также в качестве первой степени очистки концентрированных стоков с последующей аэробной доочисткой.

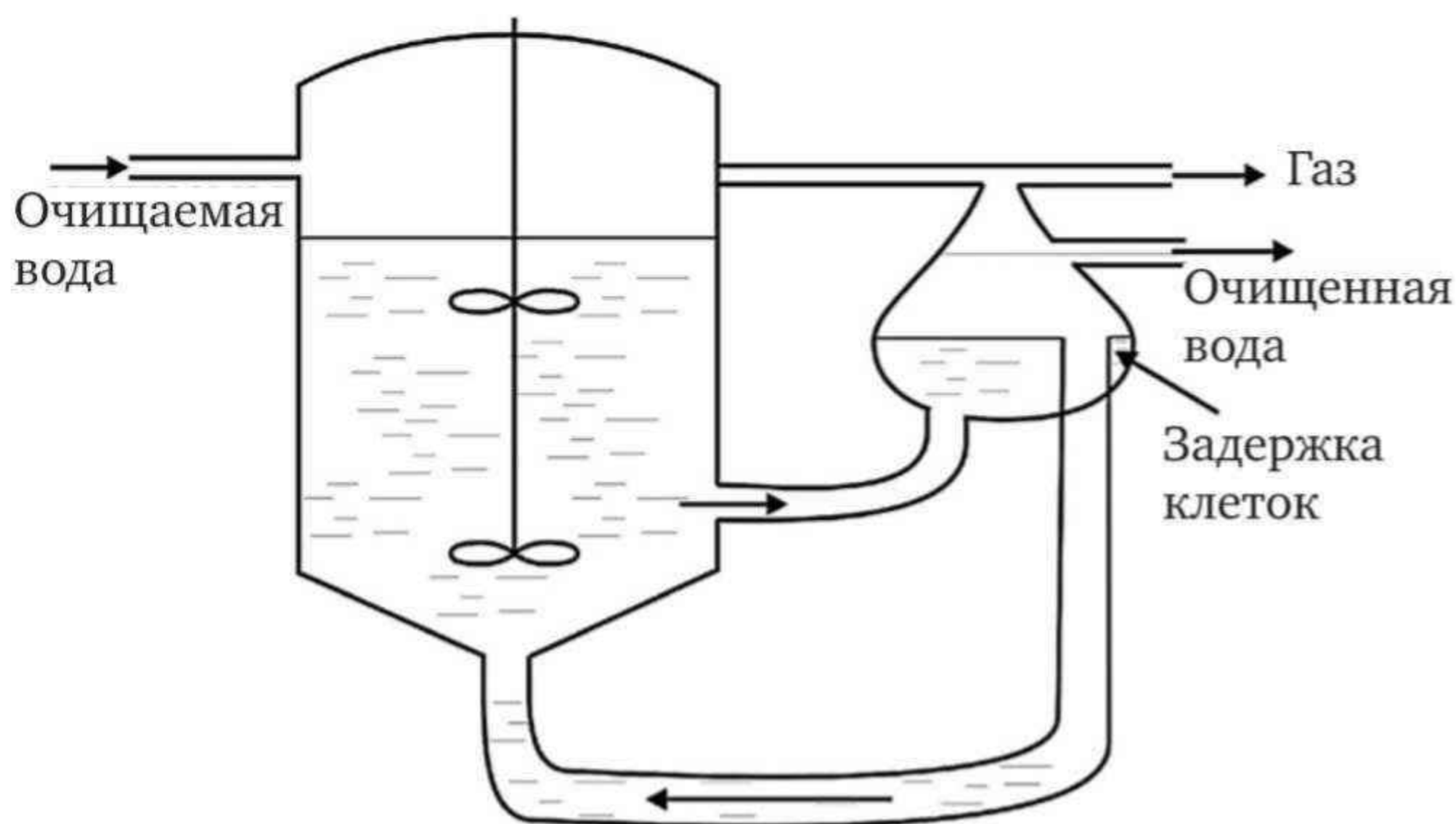


Рис. 4.7. **Метантенк**

Метаногенез — это комплексное решение экологических и энергетических проблем.

4.8.4. Получение экологически чистой энергии

Биогаз

Экологически чистую энергию можно получить путем преобразования солнечной энергии в электрическую с помощью солнечных батарей, а также из биогаза и микробного этанола.

Биогаз представляет собой смесь 65 % метана, 30 % CO_2 , 1 % H_2S и небольших примесей азота, кислорода, водорода и CO . По запасу энергии 28 м³ биогаза эквивалентны энергии 20,8 л нефти.

Биогаз образуется при метановом брожении, или биометаногенезе.

При биометаногенезе органическое вещество в анаэробном процессе разлагается под действием м.о. до диоксида углерода и метана. Этому процессу подвергаются все природные соединения и многие ксенобиотики органической природы.

В этом процессе участвуют почти 190 разных м.о. Он делится на стадии.

Первая стадия. Ферментативному гидролизу подвергаются сложные многоуглеродные соединения — белки, липиды, полисахариды.

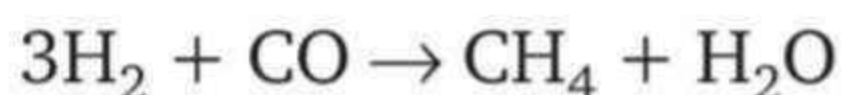
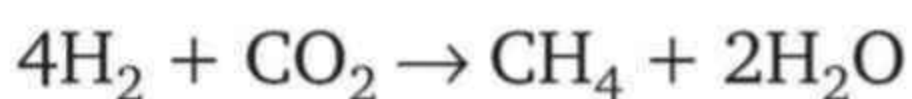
В процессе участвуют гидролитические бактерии и м.о. — бродильщики, которые ферментируют моносахариды и органические кислоты.

Вторая стадия (ацидогенез). Участвуют две группы м.о. — ацетогенные и гомоацетогенные. Ацетогенные продуцируют водород. Они ферментируют продукты первой стадии — моносахариды, спирты и органические кислоты до H_2 , CO_2 , низших жирных кислот, спиртов и др. Совместное действие H_2 — продуцирующих и H_2 — утилизирующих м.о. вызывает деградацию бутирата, лактата и пропионата до ацетата.

Гомоацетогенные м.о. усваивают H_2 и CO_2 и некоторые одноуглеродные соединения через стадию образования ацетил-КоА и его превращения в низкомолекулярные кислоты.

Третья стадия (заключительная). На этой стадии образуется метан. Это происходит разными путями:

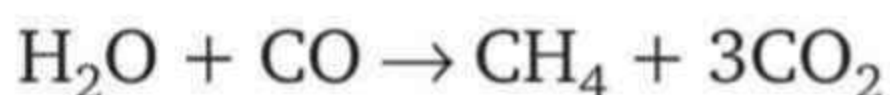
1) синтез через стадию восстановления оксидов углерода молекулярным водородом



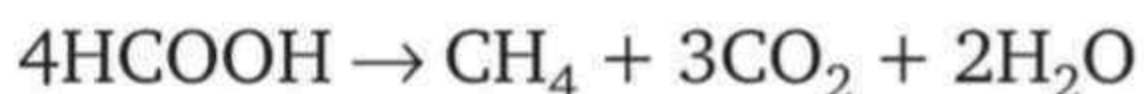
2) синтез из метильной группы ацетата:



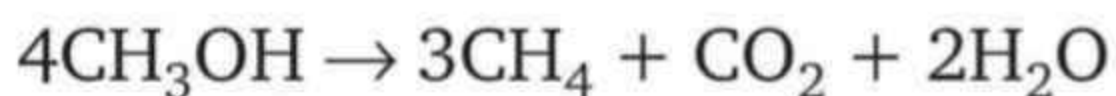
3) восстановление CO водой:



4) деградация формиата:



5) деградация метанола:



Возможен также синтез из метиламина и ароматических соединений.

Получение биогаза из местного сырья (рис. 4.8) является локальным источником энергии. Оно также улучшает качество органических удобрений. Оно защищает окружающую среду, так как заменяет ГЭС, ТЭС и АЭС.

Очень важно и то, что данный источник энергии является возобновляемым.

В термофильном процессе ($50\text{—}60^\circ\text{C}$) субстрат дополнительно обеззараживается.

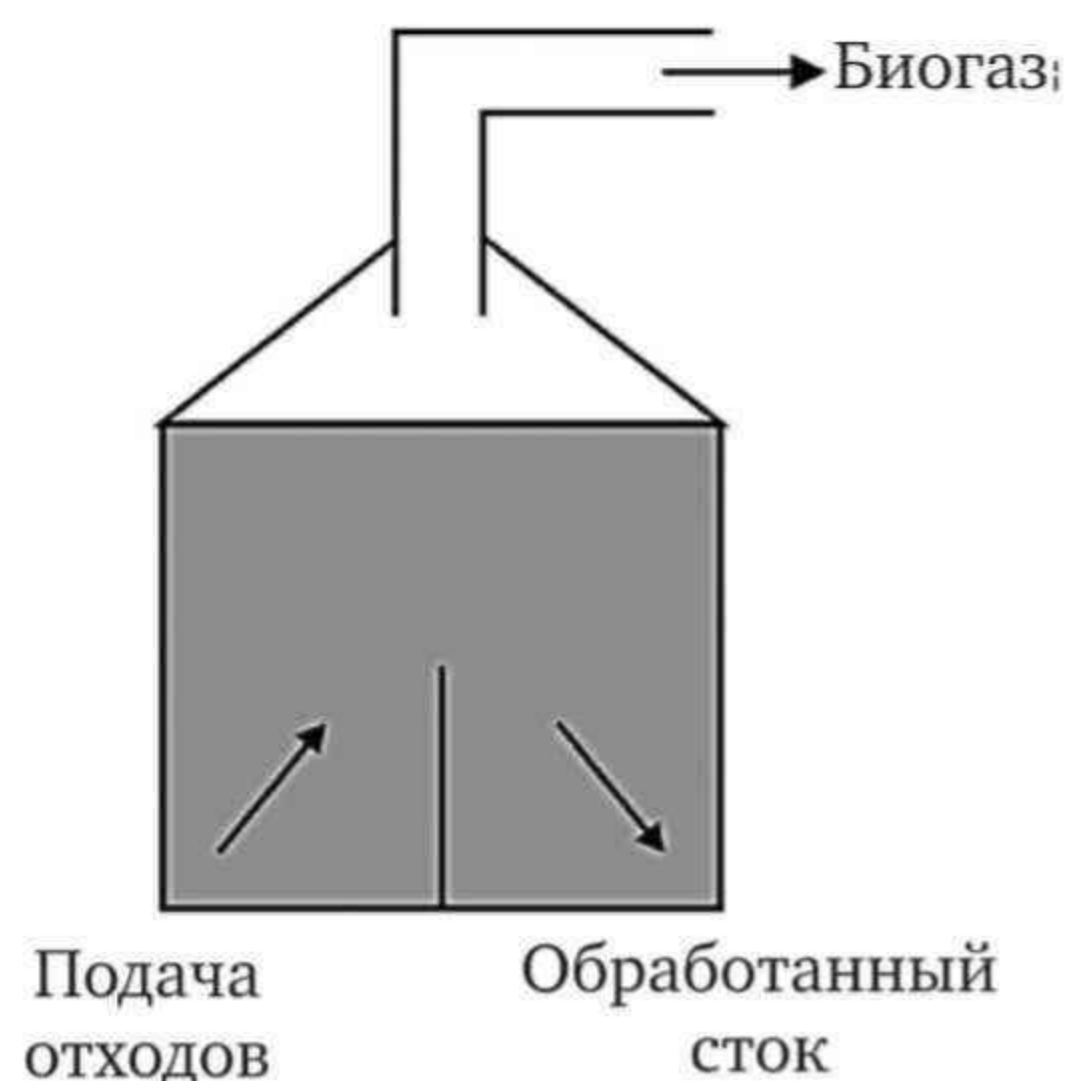


Рис. 4.8. **Схема метантенка для обработки сельскохозяйственных отходов**

Производство этанола

Путем превращения углеводов в спирт можно из растений получать энергию, которую они запасли в процессе фотосинтеза. К перспективным растениям относят: свеклу (точнее, отход ее переработки — мелассу), картофель, маниок, стебли кукурузы, злаки, топинамбур (земляная груша), а также сахарный тростник, ананас, сорго.

Хорошие результаты получаются также с использованием древесины лиственных пород или сульфитных щелоков — отходов бумажных фабрик.

Рассмотрим примеры использования разного вида сырья в таком производстве.

Сахарный тростник. Его тщательно давят, отжимают сок. Жом (целлюлоза) сжигают, а сладкий сок концентрируют, стерилизуют, подвергают брожению. Раствор отстаивают, фильтруют и подвергают перегонке с получением этанола (из 8—10 %-го раствора).

Кубовый остаток (барда) после перегонки используется как корм для животных.

Крахмал. Его сначала гидролизуют в сбраживаемые сахара.

Меласса. Одна или с добавлением других отходов пищевых производств (жом сахарного тростника, молочная сыворотка и др.), она позволяет при современных ценах на нефть создать очень выгодную биотехнологию производства этанола.

Производство этанола постоянно растет. Его применяют для многих целей: как субстрат для синтеза различных растворите-

лей, смазочных материалов, клеев, моющих средств, синтетических волокон и др.

Прежде чем заправлять этанолом машины, его смешивают с бензином в соотношении 1:9 (или даже 1:4). В США для заправки автомобилей в 28 штатах на 800 заправочных станциях используют подобные смеси.

Биотехнология преобразования солнечной энергии

Многие биосистемы — растения и фототрофные микроорганизмы с высокой эффективностью превращают солнечную энергию в энергию химических связей. Всего за год на поверхность земного шара попадает $21 \cdot 10^{20}$ кДж энергии. Это в 10 000 раз превосходит современный уровень энергообеспечения за счет ископаемого топлива. Если использовать солнечную энергию хотя бы на 5 %, то количество доступной человеку энергии возрастает более чем в 200 раз. При этом можно использовать даже ту солнечную энергию, которая приходится на поверхность акватории Земли.

Солнце может обеспечить энергией и современное и будущее человечество, даже если оно достигнет 10 млрд человек.

Получение кислорода. Основными направлениями исследований в этой области является разработка технологии с применением высокой интенсивности света (обогащение биологического материала реакционными центрами), а также с повышенной скоростью лимитирующей стадии транспорта электронов (высокие температуры, термофильные м.о.).

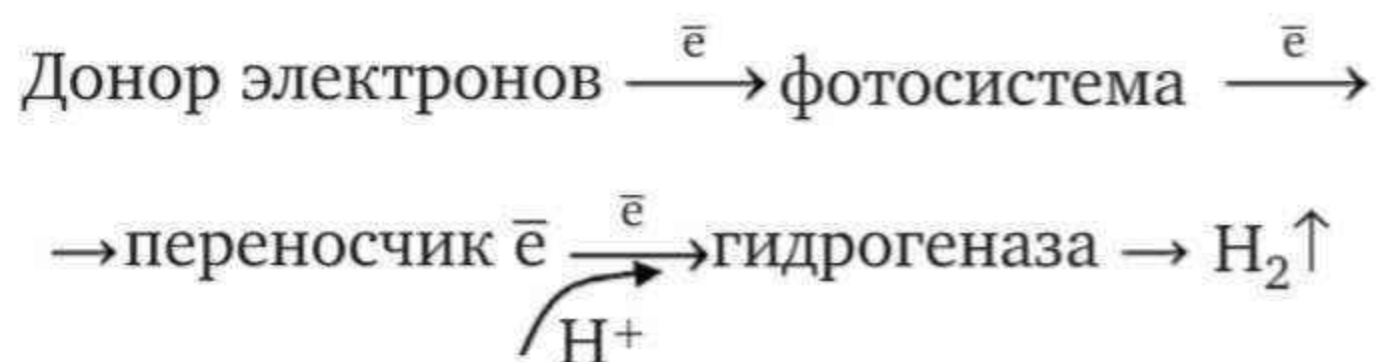
Для биотрансформации солнечной энергии используется фотосинтез. В частности, с помощью водоросли хлореллы фоторазложением воды получается 130—140 л газа с 1 м² освещаемой поверхности в сутки.

Полученный кислород затем направляется в топливные гальванические элементы, где он с выделением энергии реагирует с водородом:



Получение водорода. Водород биотехнологическим способом продуцируется хлоропластами. Процесс идет в присутствии донора электронов и бактериального экстракта, содержащего фермент гидрогеназу. Процесс в целом происходит по схеме

Гидрогеназа получает электроны от ферредоксина. Донорами электронов служат различные органические соединения. Процесс идет при облучении видимым светом.



Донором электронов могут служить вода или искусственные компоненты.

Роль фотосистемы, поглощающей свет, играет мембрана хлоропласта либо поглощающие свет пигменты.

Возможность реализации указанной схемы выявлена у микроорганизмов. В качестве примера служат цианобактерии — аэробные фототрофы. Они размножаются на средах, в состав которых входят углеводы (крахмал, целлюлоза), а также аминокислоты.

4.8.5. Сельскохозяйственная экобиотехнология

Отходами интенсивного животноводства и производства зерна являются навоз и солома.

Все эти отходы, а также городской мусор, отходы растениеводства, ил, нечистоты подвергают компостированию. Это — один из путей решения экологических проблем.

Компостированием называется экзотермический процесс биологического окисления. Органический субстрат подвергается аэробному микробному воздействию при повышенной температуре и влажности.

Происходит деградация с образованием гумифицированного продукта. Одновременно образуется CO_2 , H_2O и выделяется энергия.

В процессе участвуют более 2000 бактерий и 50 видов грибов. Грибы разрушают целлюлозу. Каждый м.о. активен в определенном интервале температур.

4.9. Сельскохозяйственная биотехнология

Биотехнология широко используется в сельском хозяйстве. Отдельные направления использования уже рассматривались попутно в других разделах:

- генная инженерия растений и животных;
- биоорганические удобрения и средства улучшения почв и борьбы с заболеваниями растений и животных;

- приготовление кормов;
- вакцинация животных;
- селекция и сохранение ценных пород растений и животных.

Отдельно целесообразно рассмотреть заготовку кормов — силосование.

4.9.1. Силосование кормов

Силос — сочный корм, приготовленный без доступа воздуха. Его готовят из кукурузы, картофеля, подсолнечника, вики, овса и других растений. Питательность силоса близка к питательности силосуемой массы. Она зависит от вида растения, стадии его развития в момент уборки, технологии приготовления и условий хранения. Силос содержит такие ценные компоненты, как протеин, кальций, фосфор, каротин.

Силос представляет собой массу от светло-оливкового цвета до темно-коричневого. Он имеет запах квашеной капусты, моченых яблок. Перегретый силос имеет запах хлеба или меда, а при порче — гнилой селедки, навоза.

Процесс приготовления силоса, заквашивание производится без доступа воздуха.

Силос известен в Европе с XVIII в. В России применяется с конца XIX в. Сначала — для консервирования ботвы сахарной свеклы и жома, затем клевера, люцерны, луговых трав, кукурузы, корнеплодов и т. д.

Последовательность операций:

- скашивание растительной массы или уборка корнеплодов и др. культур;
- транспортирование;
- измельчение;
- загрузка в силосные сооружения, уплотнение и укрытие.

Без доступа воздуха в силосуемой массе прекращается развитие аэробных бактерий и плесневых грибов. Анаэробные процессы гниения и маслянокислого брожения подавляются в результате жизнедеятельности молочнокислых бактерий. Молочная кислота подкисляет массу примерно до $pH = 4,2$.

Источником питания молочнокислых бактерий является, в основном, сахар.

Чем больше сахара, тем легче происходит процесс силосования.

Легкосилосуемыми растениями являются кукуруза, подсолнечник, однолетние и многолетние травы (злаковые и их смеси с бобовыми), а также кормовая капуста, корнеплоды и бахчевые и их ботва.

Трудносилосуемые растения — бобовые, ботва картофеля.

Несилосуемые — крапива, ботва помидоров и тыквы и др.

Процесс силосования регулируется подбором сырья и добавлением специальных веществ, предотвращающих развитие гнилостных процессов, когда сырье трудносилосуемое. Избыточный сахар сбраживается до спирта и углекислоты. Влажность не должна превышать 75 %, температура 35—37°C. При сильном разогревании силосуемой массы теряется часть питательных веществ, разрушаются витамины.

Большое значение имеет измельчение сырья. Выделение клеточного сока улучшает условия жизнедеятельности молочнокислых бактерий. В результате более интенсивно накапливается молочная кислота.

Измельчение облегчает перемешивание, уплотнение, раздачу животным.

Силосные сооружения для закладки и хранения силоса защищают силосную массу от доступа воздуха, проникновения воды и промерзания. Обычно они имеют форму траншеи. Их устраивают на возвышенном месте, на площадках с уклонами для стока поверхностных вод и для подъезда транспорта.

Различают наземные, полузаглубленные и заглубленные траншеи.

Наземные траншеи сооружают на площадках с ровным рельефом и высоким уровнем грунтовых вод.

Заглубленные и полузаглубленные траншеи устраивают на участках со связными грунтами (глины, суглинки). Пригодны только площадки с низким уровнем грунтовых вод. Размеры и конструкция зависят от конкретных условий — средств механизации и поголовья животных: ширина не менее двух длин машин (транспорт, трамбовка и т. д.). Высота наземного не более 3 м, заглубленного и полузаглубленного — не менее 3 м.

Длина — не менее, чем две ширины. Материалы для стен и днища — бетон, железобетон, кирпич, бутовый камень. Применяют и сборные железобетонные элементы. Сооружения утепляют деревянными щитами, тюками соломы. Стены обваловывают вынутым грунтом.

Устраивают канавы для стока вод, подводят дороги с твердым покрытием.

Механическое оборудование:

- силосопогрузчики для отбора силоса и сенажа из наземных хранилищ;
- силосоуборочный комбайн — машина для одновременного скашивания, измельчения и погрузки силосуемых сельскохозяйственных культур.

4.9.2. Селекция, размножение и сохранение ценных пород организмов

С этой целью разрабатываются методы клонирования (в основном для растений), а также экстракорпоральное оплодотворение и трансплантация эмбрионов (для животных).

Клонирование

Клонирование — это тиражирование организма или других объектов в биотехнологии; так называют саму технологию получения организмов, идентичных данному объекту, и являющихся его потомками.

Клон — группа организмов, полученных от одного производителя или дата (современный термин) — отдельное растение (животное) в группе. Термин означает черенок, побег. Термин впервые предложил талантливый теософ, масон Ледбитер Чарлз Уэбстер (1903).

Микроклонирование растений

Существует два способа размножения растений — половой (семенной) и вегетативный.

Недостатком семенного способа является генетическая пестрота и длительность ювенильного периода.

При вегетативном способе сохраняется генотип производителя, сокращается ювенильный период. Но очень многие растения плохо размножаются таким методом, особенно, древесные (дуб, сосна, ель и др.). Кроме того, вегетативное размножение невозможно для растений старше, чем 10—15 лет. Причиной является накопление химических соединений, которые подавляют деление клеток.

Недостатком вегетативного метода является также трудность получения стандартного посадочного материала и опасность накопления и передачи инфекций. Операции прививок сложны и трудоемки.

Клональное микроразмножение растений МКР — это получение *in vitro*, неполовым путем генетически идентичных исходному экземпляров растений.

В основе метода лежит способность растительной клетки реализовать присущую ей тотипотентность.

Достоинства метода:

- получение генетически однородного материала;
- освобождение растений от вирусов за счет использования меристемной культуры;
- высокий коэффициент размножения;
- сокращение длительности селекционного процесса;
- ускорение периода от ювенильной фазы к репродуктивной;
- размножение растений, которые трудно размножаются традиционными способами;
- возможность проводить работу в течение всего года;
- возможность автоматизации.

Первые регенераты орхидеи получил француз Жан Морель в 1950-х гг. В СССР работы были начаты в 1930-х гг. в лаборатории культуры тканей и морфогенеза ИФР под руководством Р. Т. Бутенко. Сейчас осуществлено успешное МКР не только для сахарной свеклы, гвоздик, герберы, но и для древесных растений.

Первые регенераты осины получены в середине 1960-х гг. Принято считать, что их создателем является Матес (Матест Менделевич Агрест).

Древесные растения медленно растут, укореняются и накапливают вещества, которые ингибируют деление клеток.

Для МКР используют молодые слабодифференцированные ткани растений с соблюдением ряда ограничений:

- по размеру эксплантат (малый медленно делится, большой — заражен вирусами и др.);
- по длительности культивирования;
- по выбору питательной среды — жидкой или агаризованной (для розы — два слоя);
- по расположению эксплантата (вертикальный, горизонтальный);
- по типу пробки (вата, пластмасса и пр.);
- по соотношению объемов эксплантата и питательной среды;
- по составу питательной среды (минералы, витамины);

- по интенсивности освещения и его составу;
- по температуре и влажности воздуха.

Последовательность технологических операций:

- выбор растения-донора;
- собственно микроразмножение, когда достигается получение максимального количества меристематических клонов (происходит рост тканей, формирование побегов);
- укоренение размножающихся побегов с последующей адаптацией к почвенным условиям; при необходимости — выдержка при пониженной температуре (на этой стадии получения мериклонов возможно образование мутантов);
- выращивание в условиях теплицы и подготовка к реализации или к посадке в поле.

Эти стадии (две последние) — очень трудоемки, требуют подбора состава среды, концентрации солей и пр.

Клонирование животных

Идентичные животные организмы получают методом «замены ядра». Так была получена и овца Долли.

Вмешиваясь в структуру ядра эмбриона, специалисты заставляют его развиваться в нужную ткань или даже организм. При этом можно воспроизвести даже умерший организм.

Различают полное и частичное клонирование.

Экстракорпоральное оплодотворение и трансплантация эмбрионов животных

Метод применяется для размножения животных тех пород, которые находятся на грани исчезновения.

Проблема в том, что корова, например, может родить только одного теленка в год, а в ее яичнике находятся сотни тысяч незрелых половых клеток — ооцитов.

Биотехнология является нетрадиционным методом увеличения плодовитости животных. Она является основой ускоренного воспроизводства высокопродуктивных животных и целых популяций. Это — метод ускоренного размножения племенных животных.

Стадии технологии:

- отбор доноров: существует целый ряд требований к физиологическим показателям;
- суперовуляция — имеет целью вывести с помощью гормонов в яйцевод сразу 10—20 яйцеклеток;

- искусственное осеменение коров-доноров;
- извлечение и оценка эмбрионов (раньше — оперативным методом, а сейчас — вымыванием);
- пересадка эмбрионов реципиентам;
- криоконсервация эмбрионов — делается при необходимости; позволяет сохранять материал десятки и сотни лет.

Метод позволяет усилить прогресс селекции матерей быков.

От одной генетически ценной коровы можно получить много телят с неценными реципиентами. Организм реципиента не оказывает влияния на генную структуру. Могут наблюдаться только негенетические модификации.

4.10. Медицинская биотехнология

Биотехнология активно участвует в создании новых методов лечения. Медицинская биотехнология охватывает широкий круг вопросов исследовательского и прикладного характера.

Новые медицинские препараты и новые технологии решают важнейшие задачи увеличения продолжительности и повышения качества жизни человека.

Новые терапевтические средства включают:

- новые вакцины против острых и хронических заболеваний;
- новые антибиотики;
- препараты для лечения аутоиммунных заболеваний (стероидные гормоны, генная инженерия);
- применение ферментов (терапевтическая и диагностическая энзимология).

Новой биотехнологической методикой является клеточная терапия с использованием эмбриональных стволовых клеток. Она называется также технологией нацеленного воздействия на гены.

Спасением от наследственных заболеваний может стать генная терапия — лечение генами.

Важным достижением является появление новых биотехнологических устройств хранения и переработки информации с применением иммобилизованных ферментов.

4.10.1. Вакцины и вакцинация

Вакциной называется препарат, получаемый из микроорганизмов (бактерий, вирусов) или продуктов их жизнедеятельно-

сти и используемый для иммунизации людей и животных с профилактическими и лечебными целями. Впервые вакцинация людей была применена в 1798 г. английским врачом Э. Дженнером для предохранения от заболевания натуральной оспой. Он применял вакцину коровьей оспы.

Различают вакцины живые, убитые, химические и анатоксины.

Живые вакцины готовят из ослабленных культур м.о., лишенных способности вызывать заболевание, но сохраняющих свойства размножаться и вызывать иммунитет. Такие вакцины применяют для профилактики сибирской язвы, бешенства, туберкулеза, сыпного тифа, гриппа, бруцеллеза, оспы и др.

В ряде случаев живые вакцины являются единственно эффективными средствами, создавая длительный иммунитет.

Убитые вакцины используют в тех случаях, когда не получены живые (брюшной тиф, паратиф В, коклюш, холера, пищевой энцефалит). Их готовят из м.о., убитых физическим методом (нагреванием) либо химическим методом (с использованием фенола, формалина, ацетона).

Развитие иммунитета в этом случае происходит после проведения курса вакцинации.

Химические вакцины представляют собой вещества, выделенные из бактериальных клеток различными методами и содержащие вещества, вызывающие иммунитет. Применяется в основном против кишечных инфекций.

Анатоксины (вещества, вызывающие иммунитет) способствуют появлению антител, нейтрализующих определенный токсин. Их применяют для профилактики дифтерии, столбняка, ботулизма, газовой гангрены и стафилококковых инфекций.

Различают *моновакцины* и *поливакцины* — из возбудителя одной или нескольких инфекций.

Способы применения различны (через рот, нос, подкожно и т. д.).

Для лечения некоторых хронических воспалительных заболеваний применяют *аутовакцины*. Они готовятся из бактерий, взятых у того же больного, которому вакцина предназначена.

Под влиянием вакцины снижается чувствительность организма к специфическому возбудителю, происходит десенсибилизация, увеличивается фагоцитоз возбудителя, усиливаются обменные процессы; в первичном очаге усиливаются восстановительные процессы, повышается проницаемость сосудов.

Антигены — вещества, которые при введении в организм вызывает образование специфически реагирующих с ним антител. Условием антигенности является отличие от веществ, которые в норме имеются в организме.

4.10.2. Клеточная терапия (лечение стволовыми эмбриональными клетками)

Первооткрыватель метода Мартин Эванс стал нобелевским лауреатом 2007 г.

Стволовые клетки усиливают собственную регенеративную деятельность организма, которая с возрастом слабеет.

Стволовые клетки содержатся в эмбрионах раннего срока развития и обнаруживаются также во взрослых тканях, но их потенциал ограничен. Исследованы пока только стволовые клетки мышей. Они размножаются быстрее, чем человеческие.

Эмбриональные стволовые клетки собирают после пяти дней деления оплодотворенной яйцеклетки на стадии формирования зародышевого пузыря. Если их заморозить, а впоследствии разморозить, большинство сохраняет жизнеспособность и дифференцируется *in vitro* в ткани различных типов.

Уже сейчас ясно, что клетки различных линий могут вести себя по-разному вследствие генетических различий между индивидуумами — биологическими родителями клеточных линий.

Описана способность эмбриональных стволовых клеток человека дифференцироваться сразу во многих направлениях, порождая смешение клеток нервных тканей, крови, сердечной мышцы и пр.

Поэтому ведутся исследования потенциала дифференциации с использованием молекулярных маркеров, выявленных на мышинном материале.

Проблемой является также несовместимость э.с.к. с иммунной системой больного. Исследуется технология переноса ядра, которая позволит обойти проблему. Методика заключается во введении ядра собственной клетки больного в яйцеклетку донора, из которой ее собственное ядро удалено. Развивается эмбрион, из которого можно получить стволовые клетки, генетически идентичные изначальной клетке больного. Но эмбриональная среда перепрограммирует их, и они превращаются практически в любую ткань, будучи введенными в организм больного.

Общество категорически не одобряет эти идеи.

В США представлен к рассмотрению проект закона, запрещающий клонирование человеческих эмбрионов — выращивание зародышей с возрастом несколько дней. Клонирование названо преступлением и жестоко карается.

Полным ходом идет разработка методов получения стволовых клеток из клеток тела (соматических). Возможности метода:

- стволовые клетки костного мозга помогают восстановить сердечную мышцу после инфаркта у мышей и крыс;
- из клеток кожи получены стволовые клетки, из которых вырастили клетки сердца;
- клеточные трансплантаты помогают восстановить нормальную деятельность мозга у крыс после травмы и инсульта.

Для получения лечебного субстрата выбирают необходимые клетки, тестируют их для исключения бактериального и вирусного заражения. Специальным образом обработанные клетки хранятся в криобанке при -197°C (жидкий азот).

Особенностью стволовых клеток является тропность к патологически измененным тканям. Они сразу попадают в те органы и ткани, которые нуждаются в омоложении. Использование стволовых клеток позволяет не вникать в особенности патологического процесса для продления срока службы органа.

Успехи клеточной терапии человека скромнее, чем у мышей, но:

- введение онкологическому больному небольшого количества клеток (1—2 шт.) позволяет увеличить дозу химиопрепарата или лучевой терапии;
- улучшается состояние больных с патологиями сердечно-сосудистой системы, невротическими заболеваниями, болезнями суставов, желудочно-кишечного тракта, иммунной системы;
- коррекция для замедления процессов старения, для омолаживания организма.

Врач должен правильно подобрать параметры биоимплантанта.

4.10.3. Лечение генами

Сейчас каждый сотый ребенок рождается с врожденными дефектами.

Мутации искажают информацию, заключенную в генах. Мутации в половых клетках организмов, которые размножа-

ются половым путем, передаются по наследству. Такие отклонения приводят к физическим и умственным недостаткам и преждевременной смерти.

Спасением является введение в организм больного неповрежденной копии мутантного участка ДНК. Достижения в области генетической инженерии позволяют выделять индивидуальные гены и последовательности ДНК, затем в пробирке создается рекомбинантная ДНК — новое сочетание последовательности нуклеотидов. Молекулы такой рекомбинантной ДНК конструируются таким образом, чтобы их можно было ввести в клетки нового хозяина. Они заменяют поврежденный ген, направляя синтез недостающего продукта, либо заставляют работать имеющийся у хозяина, но выключенный ген. Происходит изменение генотипа и, как следствие, исправление врожденной ошибки обмена веществ. Таким образом, генотерапия излечивает наследственное заболевание.

Аналогично можно привнести в организм новое свойство чтобы, например, излечить инфекционное или аутоиммунное заболевание. Запрещено только вводить новые гены в половые клетки или их предшественники.

4.10.4. Применение ферментов

Учение о ферментах — энзимология превратилась в самостоятельную науку. Ферменты контролируют скорость реакций и жизнь организма в целом, поддерживая гомеостаз.

Ферменты выполняют защитные функции, обезвреживая экзогенные и эндогенные токсины (ксенобиохимия).

Возможности использования ферментов в медицине безграничны. Определены три основных направления исследований:

- энзимопатология;
- энзимодиагностика;
- энзимотерапия.

Энзимопатология изучает молекулярные основы развития патологического процесса на основании данных о нарушениях механизмов регуляций активности или синтеза индивидуального фермента или группы ферментов.

Ферменты обладают высокой специфичностью действия и могут использоваться для направленного действия на патологический процесс (энзимотерапия).

Энзимодиагностика занимается разработкой ферментных тестов по определению уровня ферментов и изоферментов

в биологических жидкостях организма. Успех складывается из двух составляющих:

- поиск ферментов, специфических для данного органа;
- совершенствование методов определения активности ферментов в биосредах.

4.10.5. Экстракорпоральное оплодотворение и пересадка эмбрионов человека

Экстракорпоральное оплодотворение — оплодотворение яйцеклетки вне организма и пересадка дробящихся эмбрионов в полость матки (э.о. и п.э.). Во многих странах такую операцию проводят для лечения бесплодия человека. Это не только способ борьбы с бесплодием, но и путь избегания ряда генетических аномалий, а также изучения репродукции и контрацепции.

Уже более 1000 детей родились благодаря данному методу. Для этого потребовались дорогостоящее оборудование и аппаратура, лекарственные препараты.

В нашей стране метод практикуется только в крупных НИИ. Этапы:

- отбор пациенток;
- контроль созревания фолликулов;
- получение ооцитов (яйцеклетки для оплодотворения);
- прединкубация, оплодотворение, культивирование, криоконсервация;
- эмбриотрансплантация;
- контроль развития беременности.

Существует ряд ограничений по подбору больных.

С этической и научной точки зрения такая медицинская помощь оправдана в случаях:

- 1) иммунологической несовместимости;
- 2) непреодолимых препятствий для слияния мужской и женской половых гамет;
- 3) бесплодия по неизвестным причинам.

Врач действует только при условии добровольного, информированного и осознанного согласия донора и реципиента. Приоритетом являются интересы ребенка, который родится.

Врач действует в соответствии со всеми законами и подзаконными актами, соответствующими этическими и профессиональными нормами с соблюдением тайны и невмешательства в личную жизнь.

Заключение

В современном мире, обеспокоенном растущими экологическими проблемами, биотехнология — наука о практическом применении микроорганизмов — становится все более популярной. Действительно, микроорганизмы могут в любое время года делать все известные вещества, а после специальной тренировки — даже новые, ранее неизвестные.

С использованием жизнедеятельности микроорганизмов создаются экологически чистые производства ферментов, растворителей, органических кислот и аминокислот, антибиотиков и других продуктов. В виде вакцин микроорганизмы помогают человеку формировать иммунитет к самым опасным инфекционным заболеваниям. Сельскохозяйственным животным и растениям — нашему главному источнику питания — полученные методами биотехнологии вакцины, витамины, профилактические средства, средства защиты от болезней и вредителей — нужны не меньше, чем человеку.

Древнейшие и необходимейшие для человека молочнокислые продукты, хлеб, напитки (пиво, квас, вино, ликеро-водочные изделия) также создаются при участии микроорганизмов.

Биотехнология является единственным приемлемым способом очистки бытовых и производственных отходов методами аэробного и анаэробного брожения.

Развитие биотехнологии в ближайшее время будет происходить в соответствии с национальной программой Российской Федерации по развитию биотехнологии на 2006—2015 годы.

Изучение дисциплины не мыслится без освоения лабораторных методов изготовления важнейших продуктов биотехнологической промышленности, отдельных приемов культивирования микроорганизмов и способов микробиологического и теххимического контроля производств пива, выпечки хлеба, приготовления кисломолочных продуктов, получения этилового спирта и других.

В Самаре и в самарском регионе имеется достаточное количество предприятий, которые используют биотехнологический

способ производства, в основном, пищевых продуктов. Все эти предприятия нуждаются в дальнейшем повышении научного и практического уровня создания продукции. Наряду с этим предстоит создавать производства, продукцию которых Россия пока закупает за рубежом — витамины, вакцины, антибиотики и другие лекарства, ферментные препараты.

Только биотехнологическими способами можно сделать окружающую среду более чистой и уютной для человека. Для этого необходимо разрабатывать и внедрять новые технологии очистки, делать свалки доходными предприятиями по утилизации и уничтожению различных бытовых и производственных отходов.

Медицинская и сельскохозяйственная биотехнология, которые используют генную инженерию и различные биотехнологические приемы для создания новых методов лечения и даже для модификации организмов, будет способствовать повышению качества жизни человека и преодолению современного экологического кризиса.

Список рекомендуемой литературы

1. Биотехнология : учебник для вузов по спец. 310700 «Зоотехния», 310800 «Ветеринария» / И. В. Тихонов [и др.] ; под ред. Е. С. Воронина. — СПб. : ГИОРД, 2005.

2. Бирюков, В. В. Основы промышленной биотехнологии : учеб. пособие / В. В. Бирюков. — М.: КолосС, 2004.

3. Боброва, Н. Г. Биотехнология: вопросы теории и практики : учеб. пособие для студентов педагогических вузов / Н. Г. Боброва. — Самара : Поволж. гос. социал.-гуманит. акад., 2010.

4. Быков, В. А. Биотехнология : учеб. пособие для вузов. В 8 кн. Кн. 6. Микробиологическое производство биологически активных веществ и препаратов / В. А. Быков и др. ; под ред. Н. С. Егорова, В. Д. Самуилова. — М. : Высшая школа, 1987.

5. Быков, В. А. Биотехнология : учеб. пособие для вузов. В 8 кн. Кн. 5. Производство белковых веществ / В. А. Быков и др. ; под ред. Н. С. Егорова, В. Д. Самуилова. — М. : Высшая школа, 1987.

6. Быков, В. А. Биотехнология : учеб. пособие для вузов. В 8 кн. Кн. 7. Иммобилизованные ферменты / В. А. Быков и др. ; под ред. Н. С. Егорова, В. Д. Самуилова. — М. : Высшая школа, 1987.

7. Егоров, Н. С. Биотехнология : учеб. пособие для вузов. В 8 кн. Кн. 1. Проблемы и перспективы / Н. С. Егоров, А. В. Олескин, В. Д. Самуилов ; под ред. Н. С. Егорова, В. Д. Самуилова. — М. : Высшая школа, 1987.

8. Егорова, Т. А. Основы биотехнологии : учеб. пособие для высших педагогических учебных заведений / Т. А. Егорова, С. М. Клунова, Е. А. Живухина. — 3-е изд. стер. — М. : Издательский центр «Академия», 2006.

9. Загоскина, Н. В. Биотехнология: теория и практика : учеб. пособие / Н. В. Загоскина, Л. В. Назаренко, Е. А. Калашникова, Е. А. Живухина; под ред. Н. В. Загоскиной, Л. В. Назаренко. — М. : Оникс, 2009.

10. Квеситадзе, Г. И. Введение в биотехнологию / Г. И. Квеситадзе, А. М. Безбородов. — М. : Наука, 2002.
11. Клунова, С. М. Биотехнология: учебник для высш. пед. образования / С. М. Клунова, Т. А. Егорова, Е. А. Живухина. — М. : Академия, 2010. — 256 с.
12. Неверова, О. А. Пищевая биотехнология продуктов из сырья растительного происхождения : учебник / О. А. Неверова, Г. А. Гореликова, В. М. Позняковский. — М. : ИНФРА-М, 2014.
13. Новокшанова, А. Л. Биохимия для технологов : учебник и практикум для академического бакалавриата / А. Л. Новокшанова. — М. : Издательство Юрайт, 2015.
14. Плаксин, Ю. М. Процессы и аппараты пищевых производств / Ю. М. Плаксин, Н. Н. Малахов, В. А. Ларин. — 2-е изд., перераб. и доп. — М. : КолосС, 2006.
15. Промышленная ферментация: практикум / сост. О. Н. Чечина. — Самара : Сам. гос. техн. ун-т, 2018. — 125 с.
16. Рогов, И. А. Пищевая Биотехнология. В 4 кн. Кн. 1. Основы пищевой биотехнологии / И. А. Рогов, Л. В. Антипова, Г. П. Шуваева. — М. : КолосС, 2004.
17. Сазыкин, Ю. О. Биотехнология : учеб. пособие по спец. 060108 (040500) «Фармация» / Ю. О. Сазыкин, С. Н. Орехов, И. И. Чекалёва ; под ред. А. В. Катлинского — М. : Академия, 2006.
18. Саловарова, В. П. Эколого-биотехнологические основы конверсии растительных субстратов : учеб. пособие / В. П. Саловарова, Ю. П. Козлов. — М. : Изд-во РУДН, 2001.
19. Сойфер, В. Н. Современное естествознание : энциклопедия. В 10 т. Т. 10. Современные технологии / Гл. ред. В. Н. Сойфер ; ред. С. Д. Варфоломеев, Р. Н. Кузьмин, Г. В. Лисичкин. — М. : Магистр-пресс, 2001.
20. Федоренко, Б. Н. Промышленная биоинженерия: инженерное сопровождение биотехнологических производств: учебник для студентов вузов / Б. Н. Федоренко. — СПб. : Профессия, 2016.
21. Фролов, Ю. П. Биотехнология и биологическая нанотехнология. Краткий курс : учеб. пособие / Ю. П. Фролов. — Самара : Сам НЦРАН, 2010.
22. Чечина О. Н. Биотехнологии в самарском регионе : монография. В 2 ч. / О. Н. Чечина. — Самара : Изд-во Сам ГТУ, 2014. — С. 31—38.

23. Чечина, О. Н. Научно-методические основы применения математических методов в биотехнологии: монография / О. Н. Чечина. — Самара: Самар. гос. техн. ун-т, 2018.

24. Чечина, О. Н. Научно-методические основы проектирования биохимических предприятий / О. Н. Чечина. — Самара: Сам. гос. техн. ун-т, 2018. — 101с.

25. Чечина, О. Н. Общая биология и микробиология: лаборатор. практикум / О. Н. Чечина, Л. П. Кривова. — Самара : Самар. гос. техн. ун-т, 2010.

26. Чечина, О. Н. Общая биотехнология: учеб. пособ / О. Н. Чечина. — Самара : Самар. гос. техн. ун-т, 2010.

27. Чечина, О. Н. Общие основы биотехнологии: лаборатор. практикум / О. Н. Чечина. А. В. Зимичев. — Самара : Самар. гос. техн. ун-т, 2012.

28. Чечина, О. Н. Технологическое оборудование предприятий биотехнологии: сб. задач к практ. занятиям / О. Н. Чечина. — 2-е изд., испр. и доп. — Самара : Самар. гос. техн. ун-т, 2015.

29. Чечина, О. Н. Экологическая биотехнология: лаборатор. практикум / О. Н. Чечина, А. В. Зимичев. — Самара: Самар. гос. техн. ун-т, 2012. — 55 с.

30. Чхенкели, В. А. Биотехнология : учеб. пособие / В. А. Чхенкели. — СПб. : Проспект науки. 2014.

31. Шмид, Р. Наглядная биотехнология и генетическая инженерия / Р. Шмид. — М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2014. — 325 с.

Новые издания по дисциплине «Общая биотехнология» и смежным дисциплинам

1. Биотехнология. В 2 ч. Ч. 1 : учебник и практикум для академического бакалавриата / под общ. ред. Н. В. Загоскиной, Л. В. Назаренко. — 2-е изд., испр. и доп. — М. : Издательство Юрайт, 2018.

2. Биотехнология. В 2 ч. Ч. 2 : учебник и практикум для академического бакалавриата / Н. В. Загоскина [и др.]; под общ. ред. Н. В. Загоскиной, Л. В. Назаренко. — 2-е изд., испр. и доп. — М. : Издательство Юрайт, 2018.

3. Ершов, Ю. А. Биохимия: учебник и практикум для академического бакалавриата / Ю. А. Ершов, Н. И. Зайцева ; под ред. С. И. Щукина. — 2-е изд., испр. и доп. — М. : Издательство Юрайт, 2018.

4. Емцев, В. Т. Микробиология: учебник для академического бакалавриата / В. Т. Емцев, Е. Н. Мишустин. — 8-е изд., испр. и доп. — М. : Издательство Юрайт, 2018.

Приложение.

Терминологический словарь

А

Автоклав — аппарат для стерилизации паром, под давлением, большинства питательных сред для выращивания м.о., обеззараживания инфицированного материала и т. д.

Автолиз — самораспад клеток м.о. под действием внутриклеточных гидролитических ферментов.

Автотрофы — автотрофные организмы; они синтезируют из неорганических веществ необходимые для жизни органические вещества. К автотрофам относятся высшие растения (кроме сапрофитных и паразитных), водоросли и некоторые бактерии. А. делятся на *фотосинтетики* (синтезирующие за счет солнечной энергии) и *хемосинтетики* (синтезирующие за счет химических реакций, например, некоторые почвенные бактерии).

Агар-агар — продукт, получаемый из красных и бурых морских водорослей, обладающий способностью образовывать плотные гели. Применяется в составе питательных сред культивирования м.о.

Адаптация — процесс приспособления м.о. к изменяющимся условиям внешней среды.

АДФ и АТФ — аденозиндифосфат и аденозинтрифосфат — соединения, которые при взаимном превращении обеспечивают энергетический баланс живого организма.

Азотобактерин — бактериальный препарат, содержащий жизнеспособные клетки бактерий рода *Azotobacter*, способные усваивать атмосферный азот и переводить его в доступную для растений форму.

Азотфиксация — процесс связывания молекулярного азота и перевода его в азотсодержащие соединения. Постоянно осуществляется в природе азотфиксирующими м.о. (клубеньковыми бактериями и др.).

Активный ил — хлопьевидная масса (флокулы), которая содержит консорциум м.о. (бактерий, простейших, водорослей и др.), осуществляющих в аэротенках биохимическое окисление органических загрязнений до простых соединений и обеспечивающих очистку с.в.

Актиномицеты — группа м.о., соединяющих свойства бактерий и свойства грибов. Имеют нитевидное, палочковидное или кокковое строение с боковыми выростами. Имеется ряд разновидностей А. Широко распространены. Патогенные формы вызывают заболевания. Многие А. продуцируют антибиотики, витамины, ферменты, аминокислоты и др. БАВ.

Аллели (аллельные гены) — гены, расположенные в одних и тех же локусах гомологичных хромосом и определяющие развитие одного и того же признака. Каждый ген может находиться в двух аллельных состояниях, одно из которых обеспечивает максимальное развитие признака (доминантная А.), а другое — приводит к частичной или полной утрате его проявления (рецессивная А.).

Аллеломорфизм (множественный аллелизм) — появление нескольких вариантов одного признака вследствие неоднократного мутирования одного гена.

Аллостерический белок — белок, который меняет конформацию, когда к нему присоединяется другая (малая) молекула, например, АТФ. Изменение конформации меняет активность или свойства белка.

Альбумины — простые белки, входят в состав животных и растительных тканей.

Амилолитическая способность — способность расщеплять крахмал на простые сахара.

Аминокислоты — класс органических соединений, содержащих наряду с карбоксильными группами —COOH, одну или несколько аминогрупп —NH₂. Играют очень большую роль в жизни организмов, так как все белковые вещества состоят из аминокислот. В чистом виде — бесцветные кристаллические вещества, многие растворимы в воде. Некоторые а.к. относятся к числу незаменимых, так как организм не может синтезировать их самостоятельно и получает с пищей. Синтезируются химическим и микробиологическим способами.

Амплификация — использование однородных элементов.

Анабиоз — состояние организма, характеризующееся почти полным, но обратимым прекращением жизнедеятельности.

Одна из форм приспособления м.о. к крайне неблагоприятным условиям внешней среды.

Анаболизм — биохимические реакции, в результате которых из более простых веществ получаются более сложные, что приводит к запасанию энергии. *Другое определение:* совокупность химических процессов в организме, направленных на обновление структурных частиц и тканей. *Еще одно:* совокупность химических процессов в организме, направленных на усвоение им питательных веществ и создание из них собственного тела.

Анафаза — 3-я фаза митоза (митотического деления), когда составляющие каждую хромосому хроматиды (или сестринские хромосомы) разъединяются и расходятся к противоположным полюсам клетки (синхронно).

Анаэробы (анаэробии, аноксифильные) — организмы, способные жить и развиваться при отсутствии свободного кислорода. Энергию для жизнедеятельности получают расщеплением органических и неорганических веществ. Делятся на облигатные и факультативные. *Облигатные* — хорошо развиваются при полном отсутствии кислорода, одноклеточные (некоторые стрептококки, бактерии столбняка и гангрены, а также бифидобактерии и маслянокислые). *Факультативные* (условные): могут развиваться, как с кислородом, так и без него: дрожжи, гноеродные кокки, палочки тифа и сибирской язвы, инфузории, черви (паразиты кишечника).

Анеуплоидия — см. **гетероплоидия**.

Антагонизм (антибиоз) — характерный для ассоциаций м.о. тип взаимоотношений, при котором один м.о. частично или полностью подавляет жизнедеятельность другого.

Антибиотики — вещества микробного, животного или растительного происхождения, способные подавлять рост м.о. или вызывать их гибель.

Антигены — высокомолекулярные коллоидные вещества, которые при введении в организм человека вызывают образование специфически реагирующих с ним антител. Условием антигенности является отличие антигена от веществ организма реципиента, это — чужеродные белки, полисахариды и пр.

Антидот гепарина — соединение, которое несет «+» заряд и способствует образованию фибрин-агрегата. См. **гепарин**.

Антисептики — химические вещества, обладающие противомикробным действием — бактерицидным (полная гибель) или бактериостатическим (задержка роста).

Антисептические условия — стерильные условия.

Ароморфоз — усложнение организации, поднятие ее на более высокий уровень.

Архебактерии — бактерии древнего происхождения.

Ассимиляция, или **пластический обмен** — поглощение из окружающей среды различных веществ, например, питательных веществ, кислорода воздуха.

АТФ (аденозинтрифосфорная кислота) — одно из основных соединений живой клетки. Имеет две макроэргических связи, энергия расщепления которых используется в метаболизме.

Ауксоавтотрофы — организмы, синтезирующие ростовые вещества.

Ауксотрофы — бактерии, грибы или водоросли, утратившие в результате мутаций способность к синтезу из более простых веществ — предшественников одного из веществ, необходимых для их роста. А. приобретают черты ауксогетеротрофов — организмов, неспособных синтезировать ростовые вещества (генетически). Они нуждаются в аминокислотах, витаминах и пр.

Аутосомы — хромосомы, одинаковые у обоих полов (22 из 23 пар).

Ахроматин — слабо окрашивающееся красителями вещество клеточного ядра.

Ахроматиновое веретено (митотическое В.) — нити, соединяющие центромеры хромосом с полюсами.

Аэрация — насыщение воды кислородом воздуха; введение атмосферного воздуха в культуральную жидкость с целью обеспечения м.о. кислородом.

Аэробы — м.о., способные жить и развиваться только при наличии свободного кислорода.

Аэротенк — проточный аэрируемый резервуар открытого типа, предназначенный для непрерывной очистки сточных вод с помощью активного ила.

Б

Бактериальные удобрения — препараты бактерий, вносимые в почву для повышения ее плодородия (азотобактерин, нитрагин, фосфобактерин и др.).

Бактерии молочнокислые — группа бактерий, сбраживающих углеводы с образованием молочной кислоты и некоторого количества побочных продуктов.

Бактериофаги — вирусы, поражающие и уничтожающие бактерии. Называют фаги обычно по наименованию бактерии-

хозяина. Б. обычно очень малы, не имеют собственного обмена веществ. Содержат только один вид нуклеиновой кислоты — либо ДНК, либо РНК, либо даже одноветьевую ДНК.

ДНК фага, проникшая в клетку (пробиванием дырки, растворением), синтезирует ферменты, которые делают возможным синтез фаговой ДНК, а затем и самой ДНК. Наконец, внутри клетки-хозяина происходит сборка комплектных фаговых частиц. Если фаг перенести из солевого раствора в дистиллированную воду, оболочка головки разрывается и высвобождается белок (ДНК).

Бактерицидное действие — воздействие на бактерии ингибиторами, например, антисептиками, в результате чего происходит полное угнетение жизнедеятельности и гибель бактерий.

Банк генов — совокупность генов данного организма, полученная в виде клонированных фрагментов ДНК в составе вектора.

Барда — отход спиртового производства при переработке зерна, картофеля, патоки. Содержит 6—8 % СВ. Применяется в качестве сырья для производства кормовых дрожжей.

Белки (см. **протеины**) — в.м. природные о.в., построенные из а.к. и играющие важнейшую роль в структуре и жизнедеятельности организмов. Белки подразделяют на простые, состоящие из а.к., и сложные, в состав молекул которых, кроме а.к., входят и другие соединения.

Белково-витаминный концентрат (БВК) — продукт микробиологической промышленности, высушенная биомасса дрожжей, получаемых, в том числе на н-парафинах. Богат белком, а.к. и другими БАВ.

Биологическая очистка — способ очистки бытовых и промышленных с.в., заключающийся в биохимическом разрушении (минерализации) с помощью м.о. (активным илом или биопленкой) растворенных и эмульгированных в с.в. органических загрязнений.

Биомасса — общая масса микроорганизмов, приходящаяся на единицу поверхности или объема культуральной среды. Выражается в массе СВ или сырого вещества (г/л, г/м³ и т. д.).

Биопрепарат — препарат, действующим началом которого являются м.о. или продукты их жизнедеятельности.

Биосинтез — синтез о.в. из более простых соединений, протекающий под действием биокатализаторов — ферментов в живых организмах или вне их.

Биотехнология — технология получения ценных продуктов или организмов с использованием м.о., растительных и животных клеток, а также продуктов их жизнедеятельности.

Биофильтр — устройство для биологической очистки с.в., в котором действующим началом является биопленка — аэробные м.о., закрепленные на твердом носителе.

Биохимический реактор — одно из названий аппарата, в котором проводится культивирование м.о.

Биоценоз — совокупность (сообщество) всех живых организмов, населяющих конкретный участок среды с более или менее однородными условиями.

Бластомеры — клетки, образованные в результате дробления бластулы.

Бластула — многоклеточный зародыш, образовавшийся при дроблении оплодотворенной яйцеклетки.

Блефаробласт = блефаропласт — парабазальное тельце, кинетопласт. Клеточная органелла, расположенная у жгутиковых м.о. около основания жгутика. Б. содержит ДНК.

БПК — биохимическое потребление кислорода (биохимическая потребность в кислороде); количество кислорода, необходимое для полного разложения присутствующих в сточных водах органических веществ путем биохимического окисления. Показатель выражают в миллиграммах кислорода на литр ($\text{мг O}_2/\text{л}$).

Брожение — процесс окислительно-восстановительных превращений органических веществ, преимущественно углеводов, под действием самих м.о. или выделенных из них ферментов с образованием продуктов неполного окисления.

В

Вакуоли — полости, большей частью шаровидные внутри клеток. У простейших В. наполнены пищеварительным соком. У одноклеточных м.о — сократительные вакуоли. Вещества, растворенные в клеточном соке В., вызывают осмос питательных веществ и воды и *тургор* клетки. В стареющей клетке вакуоли сливаются.

Вектор или **векторная молекула** — молекула ДНК, способная акцептировать чужеродную ДНК и автономно реплицироваться. Служит инструментом для переноса чужеродной генетической информации (ДНК) в клетку. Вектором может служить плазида, бактериофаг, вирус животного. В молекуле

рекомбинантной ДНК В. обеспечивает механизм репликации и экспрессии.

Вид — совокупность особей, сходных по строению, имеющих общее происхождение, свободно скрещивающихся и дающих плодovitое потомство.

Вирусы — автономные генетические структуры, не способные, однако, развиваться вне клетки.

Витамины — группа низкомолекулярных органических соединений различной химической природы, необходимых для нормальной жизнедеятельности организма. Обладают высокой биологической активностью и оказывают действие при введении в организм в ничтожно малых количествах.

Волютин — внутриклеточные включения у м.о., аналогичные жировым включениям и гранулам гликогена у животных, запасное вещество для питания и энергетических потребностей. У бактерий и актиномицетов В. локализован в цитоплазме, у грибов и водорослей — в вакуолях. В состав В. обычно входят высокомолекулярные полифосфаты, реже — поли- β -оксимасляная кислота.

Время генерации — интервал времени, в течение которого происходит удвоение количества клеток в среде.

Вторичные метаболиты — в.м. соединения, не требующиеся для роста м.о. — антибиотики, алкалоиды, гормоны роста, токсины. На ранних стадиях роста В. М. оказывают негативное воздействие, затем организм адаптируется. Как правило, эти вещества не служат для образования клеточных структур. Их синтез возрастает при нарушении питания, после того, как завершается быстрая стадия роста. Чтобы уберечь м.о. от самоуничтожения, стадию быстрого роста нужно поддерживать искусственно.

Вымораживание — метод концентрирования вещества, основанный на превращении воды в кристаллы льда и механическом отделении их от жидкости.

Высаливание — выделение растворенного вещества (белков, ферментов, полисахаридов, РНК, ДНК и т. п.) из раствора прибавлением другого вещества (обычно соли), обладающего большей растворимостью.

Г

Гамета — половая клетка.

Гаметогенез — развитие половых клеток.

Гаплоидный набор хромосом — одинарный хромосомный набор гамет.

Гаструляция — этап эмбрионального развития, на котором происходит образование двухслойного зародыша.

Ген — участок молекулы ДНК или участок хромосомы, определяющий возможность развития отдельного элементарного признака.

Генеративная мутация — М. в половых клетках, которая проявляется только в следующем поколении.

Генная (генетическая инженерия) — направление молекулярной биологии, изучающее возможности целенаправленного изменения генетических структур живых организмов (в том числе м.о.) для создания высокопродуктивных культур.

Геном — совокупность генов или хромосом данного организма.

Генотип — совокупность всех генов одного организма или система взаимодействующих генов.

Ген-регулятор — ген, регулирующий активность другого гена.

Гепарин — противосвертывающее средство.

Гетерогаметный — пол, который образует гаметы, неодинаковые по половой хромосоме.

Гетерозиготный организм — организм, в котором из пары аллельных генов один доминантный, а другой рецессивный (Аа).

Гетерозис — повышенная жизнеспособность и особенно мощное развитие в первом поколении гибридов.

Гетероплоидия — изменение генома (набора хромосом), связанное с добавлением к набору одной или более хромосом или с их утратой; то же, что **анеуплоидия**.

Гетеротрофы — организмы, использующие для своего питания готовые органические соединения: сахара, спирты, органические кислоты, а иногда даже целлюлозу, лигнин, хитин, углеводороды, фенол и др. К Г. относятся также хищники.

Гетерохроматин — участки хромосом, остающиеся в интерфазе уплотненными (в отличие от эухроматина). Г. тесно связан с ядрышком, образуя вокруг него кольцо или оболочку. Во время митоза окрашивается сильнее или слабее, чем эухроматин. Г. характерен для половых хромосом. Полагают, что он не содержит генов, контролирующих развитие животных.

Гетерохромосомы — одна из 23 пар хромосом кариотипа человека, по которым отличается мужской и женский пол.

Гибридизация — скрещивание двух организмов с разной наследственностью.

Гибридизация молекулярная — образование комплексов между цепями нуклеиновых кислот в результате взаимодействия комплементарных нуклеотидов.

Гибридное потомство — потомство от скрещивания особей с разной наследственностью.

Гибридома — клеточный гибрид, полученный слиянием лимфоцита и опухолевой клетки и синтезирующий моноклональные антитела.

Гидратация — присоединение молекул воды к химическому соединению без его разложения.

Гидролиз — химическая реакция присоединения воды, например, к полисахаридам, с образованием моносахаридов, протекающая в присутствии катализатора (серной или соляной кислоты).

Гидролизно-дрожжевое производство — отрасль микробиологической промышленности, целью которой является получение на гидролизатах растительного сырья и сульфитных щелоках кормового белка, этилового спирта и других ценных продуктов.

Гистоны — основные белки, входящие в комплекс с ДНК в хромосоме эукариот.

Гликопротеиды — сложные белки, содержащие углеводы. Встречаются почти во всех тканях и жидкостях.

Глубинное культивирование — способ выращивания м.о. в объеме жидкой питательной среды. В случае аэробных м.о. применяют аэрирование культуральной жидкости.

Гольджи аппарат — пакеты уплотненных цистерн, вакуолей, пузырьков, куда транспортируются (упаковываются) в виде секрета готового к выведению или для использования в клетке белки, полисахариды, жиры, синтезированные на мембранах эндоплазматической цепи.

Гомозиготный организм — организм, в котором два одинаковых аллельных гена оба доминантные или оба рецессивные (AA или aa).

Гоны — четыре клетки (тетрада), образовавшиеся по завершении митоза.

Грамотрицательный/грамположительный — две группы м.о., отличающиеся строением клеточной стенки, выявляемым при окрашивании клеток по Граму.

Д

Даутерм — смесь 26,6 % дифенила и 73,5 % дифенилового эфира. Применяется как теплоноситель при температуре не выше, чем 400 °С

Делеция — утрата части генетического материала, находящегося в хромосоме (молекуле ДНК). Размер Д. может варьировать от одного нуклеотида до участка, содержащего несколько генов.

Денатурация белков — характерное для белковых веществ изменение их строения и свойств под действием физических или химических факторов (повышенная температура, сильные кислоты, щелочи и др.), приводящее к ослаблению или к полной утрате их биологических функций и свойств.

Деплазмолиз — см. **плазмолиз**.

Десмосомы — структуры на поверхности животных клеток, соединяющие их между собой.

Деструкция — нарушение или разрушение нормальной структуры вещества, организма, клетки, молекул и др.

Диакинез — стадия отталкивания гомологичных хромосом в конце *профазы мейоза*. Хромосомы максимально коротки и толсты.

Диализ — метод разделения и фракционирования растворов на полупроницаемых мембранах, заключающийся в удалении низкомолекулярных соединений; основан на свободной диффузии.

Диплоидный — двойной хромосомный набор соматической клетки.

Дисгенез — повышение количества неблагоприятных или летальных мутаций в потомстве.

Диссимиляция, или энергетический обмен — распадание сложных органических веществ на простые.

Диплонема — стадия мейоза: хромосомы, располагавшиеся попарно, расходятся. Одновременно, они еще сильнее укорачиваются. Теперь, как только распадется еще и клеточная мембрана, наступит стадия диакинеза (см.) и профаза закончена.

ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота) — биополимер, содержащийся в ядрах клеток живых организмов; вместе с белками гистонами образует вещество хромосом. ДНК — носитель генетической информации. См. **нуклеотиды**.

Доминантная аллель — гены, определяющие признаки первого поколения и подавляющие развитие альтернативного признака.

Дрожжерастильный аппарат — одно из названий аппарата для культивирования м.о., в частности, дрожжей. Обычно — цилиндрическая емкость с устройствами для подачи воздуха и циркуляции жидкости.

Дрожжи (сахаромицеты) — одноклеточные немицелиальные грибы, относящиеся к классу актиномицетов. Размножаются почкованием, реже — спорами; отдельные виды — простым делением клетки. У некоторых видов установлен половой процесс. Типичные сапрофиты и факультативные анаэробы.

Дыхание микроорганизмов — совокупность биохимических окислительно-восстановительных процессов, приводящих к окислению органических и минеральных соединений до более простых и сопровождающихся выделением тепловой энергии, необходимой для поддержания жизнедеятельности м.о.

З

Зигота — оплодотворенная половая клетка.

Зиготена (зигонема) — вторая стадия профазы мейоза, стадия начала попарного соединения хромосом. В З. гомологичные *хромомеры* (см. лептотена) взаимно притягиваются и выстраиваются строго друг против друга.

Зооглеи — симбиотические сообщества м.о. в очистных сооружениях.

И

Идентификация микроорганизмов — установление тождества неизвестного м.о. с известным: определение вида, рода и других характеристик обнаруживаемых или изучаемых м.о., проводимое с использованием систематики м.о. и на основе изучения морфологических, культуральных и физиологических признаков чистой культуры.

Идиоадаптация — приспособление к специальным условиям среды, полезное в борьбе за существование, но не изменяющее уровня организации. Пример — колючки растения.

Изменчивость — изменение наследственных задатков (генов) и изменение их проявления в процессе развития организма.

Имаго (состояние, вид) — окончательная (дефинитивная) стадия индивидуального развития животных; взрослое животное. Термин для насекомых.

Иммобилизация биообъекта — процесс реализации иммобилизованного состояния биообъекта созданием препятствий для его свободного перемещения.

Иммобилизованность биообъекта — состояние, при котором биообъект (фермент, клетка) лишены возможности свободного перемещения в жидкости.

Иммобилизованные ферменты — новые формы препаратов, в которых ферменты в активной форме неподвижно связаны с водонерастворимой матрицей, что позволяет использовать их многократно.

Инактивирование (инаktivация) фермента — потеря ферментными белками каталитических свойств под влиянием физико-химических воздействий (нагревание, радиация и др.).

Инверсия — процесс, применяемый в гидролизно-дрожжевом производстве для дополнительного гидролиза олигосахаридов в гидролизатах растительного сырья под действием минеральных кислот при температуре 90°C в аппарате инверторе.

Ингибиторы биосинтеза — природные и синтетические вещества, подавляющие активность ферментов, что приводит к торможению сложных биологических процессов.

Инокулятор — аппарат для стерильного выращивания посевного материала (инокулята). Обычно герметичная емкость с барботером, мешалкой и паровой рубашкой.

Инсерция — вставка, встраивание.

Интеркинез — короткая фаза мейоза без редупликации ДНК, после которой начинается второе деление мейоза (в области центромер) — метафаза II. См. **интерфаза**.

Интерфаза — стадия жизненного цикла клетки между двумя последовательными митотическими делениями. Различают гетеросинтетическую И.; когда клетка растет, дифференцируется, осуществляет свойственные ей функции и автосинтетическую И., в течение которой происходит подготовка клетки к следующему делению. В зависимости от интенсивности синтеза ДНК различают три периода автосинтетической интерфазы:

- G1 — предсинтетическая, или постмитотическая;
- S — синтетическая;
- G2 — предмитотическая, или постсинтетическая.

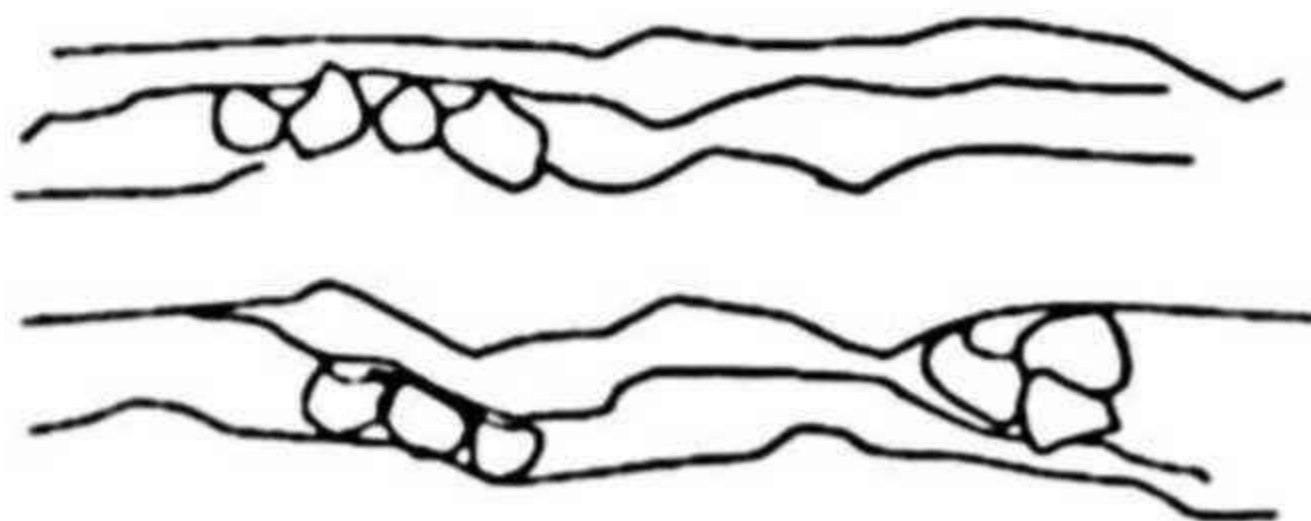
Интрон — последовательность нуклеотидов ДНК эукариотов, не несущая генетической информации. И. — часть гена,

переписывающаяся в РНК, но затем из нее удаляемая ферментативным путем при образовании мРНК.

К

Каллус — растительная ткань, вырастающая в ответ на повреждение (раны, заражение вредителями и т. п.); легко поддается культивированию на искусственных средах.

Камбий — образовательная ткань в корнях и стеблях растений. К. расположен однорядным цилиндрическим слоем.



Капсида — белковая оболочка вируса.

Кариосома — см. **хромоцентр**.

Кариоплазма — ядерный сок, содержащий в том числе ферменты, нуклеотиды, аминокислоты, продукты деятельности ядрышка и хроматина.

Кариотип — совокупность количественных (число, размер) и качественных (форма) признаков хромосомного набора соматической клетки.

Карта сцепления (генетическая карта) — схематическое изображение хромосомы (линейной или кольцевой) с указанием относительного расположения генетических локусов по ее длине.

Катаболизм — расщепление, разрушение.

Катализаторы — вещества, изменяющие скорость химической реакции; могут образовывать с реагирующими веществами промежуточные соединения, не входя в состав конечных продуктов. Используются обычно как ускорители реакций.

Килобаза (КВ) — единица измерения длины молекулы ДНК, равная тысяче пар оснований (нуклеотидов).

Клетка — элементарная живая система, способная к самостоятельному существованию, самовоспроизведению и развитию; основа строения и жизнедеятельности всех живых организмов.

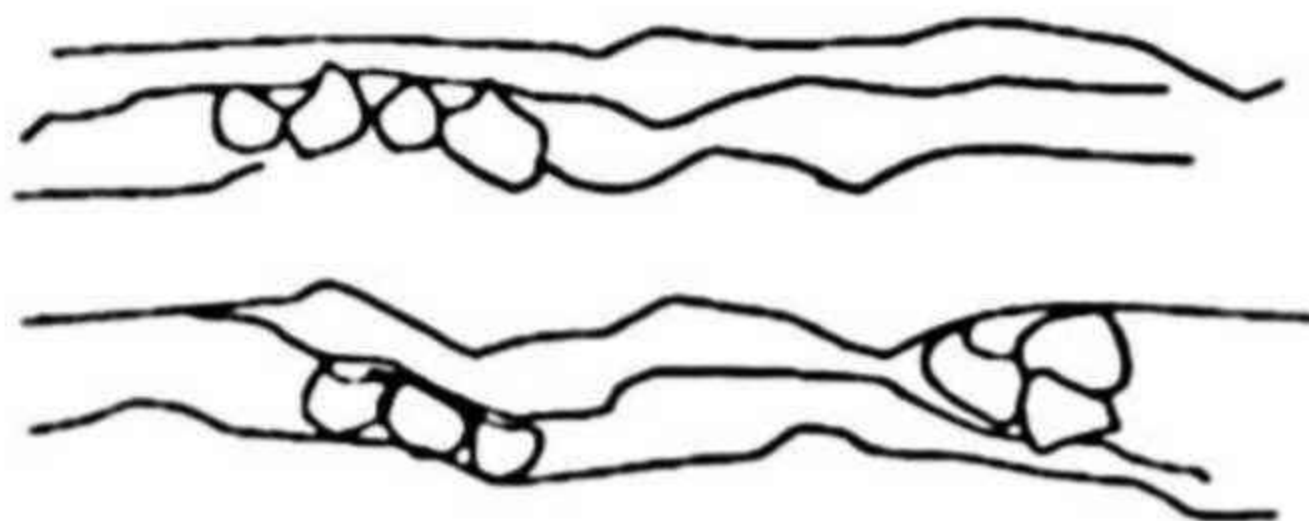
Клон — ряд следующих друг за другом поколений наследственно однородных организмов (или отдельных клеток), обра-

переписываемая в РНК, но затем из нее удаляемая ферментативным путем при образовании мРНК.

К

Каллус — растительная ткань, вырастающая в ответ на повреждение (раны, заражение вредителями и т. п.); легко поддается культивированию на искусственных средах.

Камбий — образовательная ткань в корнях и стеблях растений. К. расположен однорядным цилиндрическим слоем.



Капсида — белковая оболочка вируса.

Кариосома — см. **хромоцентр**.

Кариоплазма — ядерный сок, содержащий в том числе ферменты, нуклеотиды, аминокислоты, продукты деятельности ядрышка и хроматина.

Кариотип — совокупность количественных (число, размер) и качественных (форма) признаков хромосомного набора соматической клетки.

Карта сцепления (генетическая карта) — схематическое изображение хромосомы (линейной или кольцевой) с указанием относительного расположения генетических локусов по ее длине.

Катаболизм — расщепление, разрушение.

Катализаторы — вещества, изменяющие скорость химической реакции; могут образовывать с реагирующими веществами промежуточные соединения, не входя в состав конечных продуктов. Используются обычно как ускорители реакций.

Килобаза (КВ) — единица измерения длины молекулы ДНК, равная тысяче пар оснований (нуклеотидов).

Клетка — элементарная живая система, способная к самостоятельному существованию, самовоспроизведению и развитию; основа строения и жизнедеятельности всех живых организмов.

Клон — ряд следующих друг за другом поколений наследственно однородных организмов (или отдельных клеток), обра-

зующихся от одного предка. Их генотипическая однородность относительна.

Клонирование — метод разделения смеси молекул ДНК (например, рекомбинантных плазмид), несущих в составе молекулы вектора фрагменты чужеродной ДНК. Это осуществляется путем посева на питательном агаре клеток бактерий, в которые ДНК введена посредством трансформации. Одна бактериальная колония представляет собой клон, все клетки которого содержат одну и ту же молекулу рекомбинантной ДНК.

Коагуляция — слипание мелких частиц в дисперсных системах при их столкновении в процессе теплового движения, перемешивания или под действием флокулянтов. Приводит обычно к выпадению хлопьевидного осадка или к застудневанию коллоидных растворов.

Код, генетический код — определенные сочетания нуклеотидов и последовательность их расположения в молекуле ДНК.

Кодон — тройка нуклеотидов ДНК или РНК, кодирующая определенную аминокислоту, начало и конец трансляции.

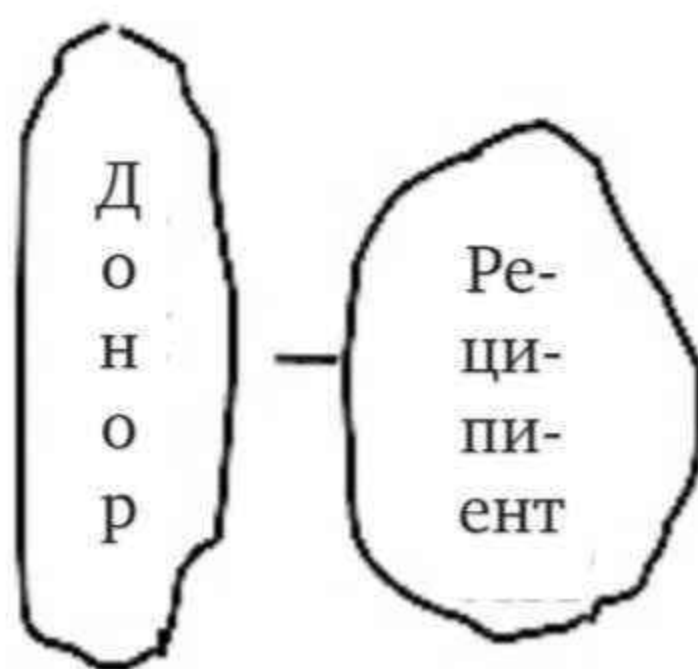
Комплементарность — избирательное взаимодействие нуклеотидов ДНК в соответствии с азотистыми основаниями в их составе:

- аденозин-нуклеотид — тимин-нуклеотид: А ::::: Т;
- гуанидин-нуклеотид — цитозин-нуклеотид: Г ::::: Ц;
- цитозин-нуклеотид — тимин-нуклеотид: Ц ::::: Т;
- тимин-нуклеотид — аденозин-нуклеотид: Т ::::: А.

Комплементарная ДНК — искусственно синтезированная с помощью ферментов копия мРНК.

Конидии — споры мицелиальных грибов, образующиеся на особых ветвях грибницы — конидиеносцах; служат для бесполого размножения.

Конъюгация: 1) у бактерий перенос генетического материала от одной бактериальной клетки (донорной мужской) к другой (женской реципиентной). При этом две бактерии соединяются тонким мостиком (половой ворсинкой, белковой трубочкой), через который из одной клетки (донора) в другую (реципиент) переходит отрезок нити ДНК. Неконъюгированные плазмиды тоже могут передаваться с помощью плазмид-помощников). Наследственные свойства реципиента изменяются в соответствии с количеством информации, заключенной в переданном кусочке ДНК.



2) процесс тесного и точного сближения хромосом в мейозе (во время профазы). Во время К. может произойти обмен гомологичными участками.

Кормовые дрожжи — продукт микробиологической промышленности, получаемый путем аэробного культивирования дрожжей на гидролизатах растительного сырья (гиприн) или на жидких парафинах нефти (паприн).

Кофермент — органическое соединение небелковой природы с небольшой молекулярной массой, являющееся активной группой двухкомпонентного фермента.

Критическая температура — в микробиологии определенное для каждого вида м.о. значение температуры, при достижении которого наступает тепловая гибель этих м.о.

Кроссинговер — обмен гомологичными участками между конъюгированными хромосомами во время профазы мейотического деления.

Ксилоза — моносахарид, одна из четырех изомерных альдопентоз, $C_5H_{10}O_5$.

Культивирование микроорганизмов — выращивание определенного вида м.о. на питательных средах в искусственно созданных условиях, необходимых для активного роста и размножения м.о.

Культивирование непрерывное — способ выращивания м.о. в аппаратах в условиях, обеспечивающих постоянный приток питательной среды и непрерывный отбор такого же количества культуральной жидкости с выращенной культурой.

Культивирование периодическое — способ выращивания м.о. в условиях, когда питательные вещества в среду не добавляются. Процесс прекращается тогда, когда содержание целевого продукта достигает максимума.

Культура микроорганизмов — клетки м.о. (бактерии, дрожжи, плесневые грибы и т. п.), выращенные в жидкой или на твердой питательной среде.

Культура ткани — клетки тканей растений, животных, выращиваемые изолированно и независимо от организма на искусственных питательных средах, преимущественно в стерильных условиях.

Культуральная жидкость — жидкая питательная среда, в которой содержится культура м.о.

Л

Ламеллярные структуры — плоские складчатые или диско-видные образования. Мембраны, образованные билипидными и другими подобными слоями. Обладают анизотропностью. Элемент структуры хлоропластов.

Лейкопласты — бесцветные пластиды в растительной клетке, где происходит синтез крахмала из моносахаридов и дисахаридов.

Лептотена — первая стадия *профазы мейоза*, стадия тонких нитей, когда хромосомы слабо спирализованы и наиболее удлинены, видны утолщения — *хромомеры*, которые взаимно притягиваются.

Лигирование — соединение, склеивание участков и фрагментов ДНК в генной инженерии.

Лигнин — сложное полимерное соединение в клетках сосудистых растений. Молекула Л. состоит из продуктов полимеризации ароматических спиртов; основной мономер — конифериловый спирт.

Лизис м.о. — растворение, вызываемое различными причинами: под действием собственных ферментов (автолиз), под действием специально вводимых в среду ферментов или под действием фагов (фаголизис).

Лизосома — овальное тельце (0,4 мкм), окруженное трехслойной мембраной. Содержит примерно 30 фрагментов, которые расщепляют (вызывают лизис) белки, нуклеиновые кислоты, липиды и другие вещества.

Лимфоциты — разновидность лейкоцитов. Л. имеют шарообразную форму, овальное ядро, окруженное цитоплазмой, богатой рибосомами. Бывают большие, малые и средние. Малые неспособны к митозу. Функции: гемолитическая, трофоцитарная, иммунологическая.

Липиды — жироподобные вещества: компоненты биологических мембран, энергетический резерв, защитные покровы. Простые Л. включают только остатки жирных кислот или аль-

дегидов. Сложные Л. включают остатки фосфорной кислоты (фосфолипиды) и остатки сахаров (гликолипиды).

Липоиды — жироподобные гидрофобные вещества, например, холестерин. Наряду с липидами (жирами) выполняют, в основном, строительную функцию (образуют клеточные мембраны).

Липосомы — искусственно получаемые замкнутые сферические частицы, образованные бимолекулярными липидными слоями (чаще всего фосфолипидами) в пространстве между которыми содержатся гидрофильные (в водном пространстве) или гидрофобные (в липидных бислоях) лекарственные вещества.

Локус — определенное место строго определенной хромосомы, где расположен конкретный ген.

М

Макрофаги — клетки, способные к активному захвату и перевариванию бактерий, остатков погибших клеток и др.

Макроэлементы (МАЭ) — химические элементы, необходимые клеткам м.о. для нормального обмена веществ. В число МАЭ входят 10 элементов, находящихся во всех организмах — С, О, Н, N, S, Р, К, Са, Mg, Fe.

Макроэргические соединения — органические соединения живых клеток, содержащие макроэргические (богатые энергией) химические связи.

Мезосома — плотно упакованные складки наружной цитоплазматической мембраны *прокариотической* клетки. Участвует в энергетическом обмене и выполняет другие функции. Встречается главным образом у Грам + м.о (Грамположительных).

Мезодерма — третий зародышевый листок (между эктодермой и энтодермой).

Мезотелий — соединительная ткань, выстилающая серозные оболочки тела (брюшина, плевра, перикард). Образуется из мезодермы. Состоит из одного слоя плоских многоугольных клеток, плотно сомкнутых краями.

Мезофилы — наиболее широко распространенные м.о., оптимальная температура развития которых около 30°C, минимальная — около 0°C. а максимальная — 42°C.

Мейоз — процесс созревания половых клеток, при котором клетки двукратно делятся. Мейотическое деление клеток явля-

ется редукционным. Происходит редукция (уменьшение в два раза) числа хромосом, и одна диплоидная клетка после двух быстро следующих друг за другом делений дает начало четырех гаплоидным. Восстановление диплоидного набора происходит при оплодотворении.

Меласса — сиропообразный отход сахарного производства, содержащий около 50 % сахаров, широко используемый в качестве источника углерода в микробиологическом синтезе.

Меприн — кормовой белковый продукт, получаемый путем аэробного культивирования м.о. на метиловом спирте.

Меристема — образовательная ткань. Обеспечивает нарастание массы, способна к делению и образованию новых клеток (зародыш семени, кончик корня и пр.).

Метаболизм — совокупность химических реакций синтеза и деструкции.

Метаболит — вещество, образующееся в процессе обмена и участвующее в дальнейших процессах ассимиляции и диссимиляции.

Метантенк (метантанк) — железобетонный резервуар значительной емкости (до нескольких тыс. м³) для биологической переработки (сбраживания) с помощью бактерий и др. м.о. в анаэробных условиях (без доступа воздуха) органической части осадка сточных вод.

Метафаза мейотического деления — включает расположение по экватору клетки пары конъюгированных хромосом.

Микроаэрофилы — м.о., растущие при пониженном парциальном давлении кислорода. Не являются строгими анаэробами.

Микробиологический синтез — синтез структурных элементов или продуктов обмена веществ за счет присущих клетке м.о. ферментных систем.

Микробиология — биологическая наука, изучающая м.о.: бактерии, актиномицеты, микроскопические грибы и т. д. В зависимости от поставленных задач в микробиологии выделяют ряд самостоятельных специализированных дисциплин: техническую (промышленную), почвенную, медицинскую, ветеринарную, космическую, вирусологию и др.

Микрофлора — совокупность м.о., находящихся в той или иной среде (в почве, воде, воздухе, пищевых продуктах, в организме человека и животных и т. п.).

Микроэлементы (МИЭ) — химические элементы (бор, марганец, медь, цинк, молибден, иод, кобальт, фтор, селен, воль-

фрам и некоторые другие), потребность живых организмов в которых невелика. МИЭ по физиологическому значению равноценны макроэлементам. Входят в состав многих ферментов.

Митоз — способ деления клеток. Заключается в точном распределении генетического материала между дочерними клетками.

Митохондрия — органелла, основной функцией которой является синтез универсального источника энергии — АТФ. Митохондрии связаны с мембранами эндоплазматической сети. Делятся.

Мицелиальные грибы — грибы, растущие в виде тонких ветвящихся, переплетающихся гиф (нитей).

Мицелий — биомасса мицелиальных грибов.

Молекулярная биология — раздел биологической науки, изучающий свойства и структурные особенности соединений, главным образом, макромолекулярных, в связи с их биологическими функциями, а также природу физических процессов и механизм химических реакций, лежащих в основе жизнедеятельности.

Молекулярные сита — сорбенты, имеющие поры и полости определенного размера и способные поэтому поглощать все соединения, размер молекул которых меньше диаметра этих пор.

Моносахариды — одна из основных групп углеводов, представляющих собой альдегидоспирты или кетоспирты и содержащих от трех до девяти атомов углерода в цепи.

Морфогенез — возникновение и развитие органов, систем и частей тела, как в индивидуальном (онтогенез), так и в историческом, эволюционном развитии (филогенез).

Морфологические признаки — характеристики, определяемые путем микроскопического изучения препаратов живых м.о. и окрашенных мазков: форма и размеры м.о., его расположение, способность к перемещению, внутреннее строение, наличие спор и капсул, отношение к методам окрашивания и т. д. Необходимы для идентификации и классификации м.о.

Мутагены — физические или химические агенты, увеличивающие частоту возникновения мутаций.

Мутанты — наследственно измененные формы м.о., отличающиеся от исходного типа отклонением, возникающим в результате мутации.

Мутации — наследственные изменения признаков организма, которые определяются генотипом. Возникают есте-

ственным путем либо искусственно в результате перестроек и нарушений в генетическом материале — хромосомах и генах.

Н

Нативное состояние — природное состояние, сохраняющее такую же структуру, что и в живой клетке.

Нитрагин — биопрепарат, содержащий жизнеспособные клубеньковые бактерии и предназначенный для повышения симбиотической фиксации азота бобовыми культурами.

Нуклеотид — мономер цепи ДНК — сложное органическое соединение, включающее одно из четырех азотистых оснований (аденин А, тимин Т, Цитозин Ц или гуанин Г), пятиатомный сахар пентозу — дезоксирибозу, а также остаток фосфорной кислоты.



В РНК вместо тимина — урацил, а вместо дезоксирибозы — другая пентоза — рибоза. В цепочке РНК нуклеотиды соединяются ковалентными связями между рибозой одного нуклеотида и остатком фосфорной кислоты — другого.

О

Обмен веществ микроорганизмов (метаболизм) — превращения веществ в клетках, в результате которых из простых питательных веществ образуется новое клеточное вещество. Включает два основных процесса: получение энергии (энергетический обмен) и биосинтез веществ клетки (конструктивный обмен).

Овогенез — развитие женской половой яйцеклетки.

Овоцит — незрелая женская половая клетка в периоде роста — до деления (овоцит I порядка) и после деления (овоцит II порядка). Овоцит I порядка содержит диплоидный набор хромосом. После деления овоцита I порядка образуется овоцит II порядка с гаплоидным набором хромосом.

Олигонуклеотиды — природные или синтетические олигомерные соединения из немногих остатков нуклеотидов, соединенных фосфодиэфирной связью. О. — продукты неполного

химического или ферментативного гидролиза нуклеиновых кислот (полинуклеотидов). Верхнее значение массы олигонуклеотида соответствует границе эластичности цепи (так же, как у полимеров).

Олигосахариды — углеводы, молекулы которых содержат от 2 до 10 остатков моносахаридов, соединенных гликозидными связями; различают дисахариды, трисахариды и т. д.

Онтогенез — индивидуальное развитие каждой особи — есть краткое и быстрое повторение *филогенеза* — исторического развития вида.

Оператор — структурная единица оперона, к которой присоединяются регуляторы транскрипции.

Оперон — упорядоченная совокупность структурных генов, управляющая процессом транскрипции, включает **оператор** и **промотор**.

Органелла (органойд) — определенный структурный элемент живой клетки, выполняющий специфические функции. К О. относятся митохондрии, мезосомы и др.

Оптимальные условия — наиболее благоприятные условия для жизнедеятельности какого-либо организма или осуществления какого-либо процесса.

Осмоз — диффузия вещества через полупроницаемую мембрану, разъединяющую два раствора различной концентрации.

Осмотическое давление — диффузионное давление, равное избыточному внешнему давлению, которое следует приложить со стороны раствора с меньшей концентрацией, чтобы остановить осмос; важный фактор обмена растворенными веществами между м.о. и окружающей средой.

П

Палиндром — последовательность нуклеотидов, читаемая одинаково по комплементарным цепям ДНК в противоположных направлениях.

Паренхима — совокупность клеточных элементов органа (печень, почки и пр.), которая осуществляет специфическую функцию.

Партогенез — девственное развитие яйцеклетки без оплодотворения. Образуются особи только одного пола.

Пастеризация — способ тепловой обработки жидкостей, заключающийся в однократном их прогреве при температуре ниже 100°C. Предназначена, в основном, для уничтожения бес-

споровых м.о. и проводится обычно при 55—80°C с выдержкой примерно 15 мин; вещества, разлагающиеся при более высокой температуре, сохраняются.

Патогенность — способность м.о. вызывать инфекционное заболевание.

Пахитена (пахинема) — третья стадия профазы, стадия *толстых нитей*. Гомологичные хромосомы стабильно соединены в пары — биваленты, число которых равно гаплоидному числу хромосом. В месте контакта, внутри бивалента так называемый *синаптонемальный комплекс*. В каждой хромосоме бивалента по две хроматиды. Таким образом, бивалент однозначен, равен тетраде (см. **гоны**).

ПДК — предельно допустимая концентрация токсичного вещества (в воздухе) при которой в организме человека не происходит болезненных изменений даже при длительном воздействии.

Пептиды (полипептиды) — сложные органические вещества, состоящие из двух и более остатков а.к., связанных пептидной цепью CO-NH.

Первичные метаболиты — низкомолекулярные вещества, необходимые для роста. Участвуют в строительстве блоков макромолекул, синтезе коферментов. В анаэробных условиях их синтез идет до образования продуктов брожения.

Перколяция — способ гидролиза растительного сырья, заключающийся в фильтровании нагретой варочной кислоты через слой измельченного растительного сырья.

Пермеазы — внутриклеточные транспортные белки, участвующие в переносе веществ из среды в клетку.

Пестициды — общее название препаратов, используемых для защиты травянистых и древесно-кустарниковых растений от насекомых-вредителей (инсектициды), возбудителей болезней (фунгициды), сорных травянистых (гербициды) и сорных древесно-кустарниковых растений (арборициды), для борьбы с водорослями (альгициды) и т. п.

Пиноцитоз — захватывание жидкости, окружающей клетку, путем «выпячивания».

Питательная среда — источник питательных веществ (твердый, жидкий или газообразный), используемый для выращивания м.о. в лабораторных и промышленных условиях.

Плазмалемма — см. цитоплазматическая мембрана.

Плазмиды — факторы наследственности, расположенные в клетках вне хромосом, генетические факторы клеточных органелл и факторы, не являющиеся обязательным компонентом клеток (см. эписомы). Многие плазмиды состоят из кольцевых молекул двухнитевой ДНК.

Плазмодесма — цитоплазматические нити, соединяющие соседние растительные клетки. Посредством П. осуществляется связь между протопластами. П. передают раздражение и движение вещества от клетки к клетке (см. десмосомы).

Плазмолиз — отставание протопласта от оболочки при погружении клетки в *гипертонический* раствор. Характерен для растительных клеток, имеющих прочную целлюлозную оболочку (бывает выпуклый, вогнутый, судорожный и колпачковый). При погружении в *гипотонический* раствор происходит *деплазмолиз*.

Пластиды — внутриклеточные органеллы цитоплазмы автотрофных растений, содержащие пигменты и осуществляющие синтез органических веществ. Различают виды П.: хлоропласты, хромопласты, лейкопласты.

Плоидность — число, показывающее, сколько раз в ядре клетки повторяется хромосомный набор половой клетки организма (гаметы). Большинство организмов диплоидны — содержат два набора (по одному из каждой гаплоидной половой клетки).

«Пляшущие тельца» — структурный компонент клетки. Метахроматиновые гранулы волютина, служат дополнительными питательными веществами. Временный резерв на ранних стадиях развития культур. В гранулах находится РНК, а на более поздних стадиях — полифосфаты. Волютин — необязательный элемент клеток актиномицетов.

Поверхностное культивирование — способ выращивания м.о. на поверхности тонкого слоя твердой сыпучей (рыхлой) или жидкой питательной среды.

Полиплоидия — мутация, при которой происходит кратное увеличение числа хромосом в кариотипе.

Полирибосомы — комплексы рибосом, в которых рибосомы связаны между собой длинной цепочкой молекулы иРНК.

Полисахариды — в.м. углеводы, молекулы которых построены из большого числа остатков молекул моносахаридов (целлюлоза, крахмал и т. п.), основной материал построения клеточной стенки.

Полупроницаемые мембраны — пористые перегородки, свободно пропускающие ионы и некоторые некрупные молекулы и не пропускающие коллоидных частиц.

Популяция — совокупность особей данного вида, занимающих определенный участок территории внутри ареала вида, свободно скрещивающихся между собой и частично или полностью изолированных от других популяций.

Популяция микроорганизмов — совокупность м.о. в данном объеме. В природе численность популяции м.о. зависит от условий среды., а при искусственном культивировании отражает динамику роста и размножения м.о.

Посев — внесение клеток м.о. или какого-либо исследуемого материала с м.о. в стерильную питательную среду для получения чистой или накопительной культуры.

Постэмбриональное развитие организма — с момента рождения (или выхода из яйцевых оболочек) и до смерти.

Премиксы — смеси биологически активных веществ (витаминов, микроэлементов, антибиотиков и др.) с наполнителями, используемые в качестве добавок в комбикорма для сельскохозяйственных животных и птицы.

Прокариоты (прокариотические клетки) — примитивные сохраняющие черты глубокой древности организмы — царство дробянки. Клетки не имеют ядра. Примеры: бактерии, сине-зеленые водоросли.

Проксимальный конец оперона — начало оперона, где находятся регуляторные области ДНК: промотор и оператор.

Промотор — место в **операторе** для присоединения ДНК-полимеразы и начала синтеза иРНК.

Протаминсульфат — производное адреналина.

Протамины — низкомолекулярные белки в ядрах сперматозоидов рыб и птиц. Они ассоциируются с ДНК, образуют соли и комплексы.

Протеиды — сложные белки, содержащие небелковый компонент — простетическую группу. В зависимости от химической природы последней различают липопротеиды, гликопротеиды, нуклеопротеиды, хромопротеиды и фосфопротеиды.

Протеины — простые белки, в молекулы которых входят только остатки а.к. По растворимости в воде и солевых растворах различают семь групп П.: протамины, гистоны, альбумины, глобулины, глутелины, склеропротеины, проламины. К П. относятся и протеолитические ферменты.

Протеолиз — расщепление белков с помощью протеиназ.

Протеолитическая активность — показатель, характеризующий способность ферментов катализировать реакцию гидролиза белка до пептидов и а.к.

Протометаболия — тип постэмбрионального развития у большинства первичнобескрылых насекомых. П. характеризуется личиночной организацией на ранних стадиях онтогенеза, постепенным изменением организации, линькой во взрослом состоянии.

Протоплазма — содержимое живой клетки, включая ядро и цитоплазму.

Протопласт — содержимое растительной клетки — состоит из клеточной мембраны, цитоплазмы и ядра. Не включает клеточную оболочку.

Прототрофы — организмы, способные синтезировать все вещества, необходимые для развития.

Профаг — ДНК бактериофага, встроенная в бактериальную хромосому.

Профаза мейотического деления — включает конъюгацию и кроссинговер.

Р

Размер ДНК выражают в числе пар нуклеотидов: одна пара — 1 байт, 1000 пар — Килобаза (КВ). Размер может достигать нескольких миллионов пар. Один виток спирали ДНК имеет размер 34 Å и включает 10 пар оснований.

Растильная камера — устройство для выращивания культуры м.о., например, плесневых грибов, поверхностным способом (в кюветах).

Ревертант (особь с чертами атавизма) — трансформированные особи, проявляющие черты исходного организма. Примеры атавизма:

1) у растений — появление побегов, соответствующих одному из компонентов гибридного растения;

2) в генетике — переход мутировавшего гена в ген исходного или дикого типа (обратная или возвратная мутация).

Процессы образования ревертантов могут быть спонтанными или индуцированы мутагенами.

Регенерация — восстановление организмом поврежденных органов и тканей либо целого организма из его части.

Редупликация — полное или частичное повторение.

Редуцирующие вещества (РВ) — показатель, характеризующий содержание моносахаридов в гидролизатах и выражаемый в процентах от массы абсолютно сухого сырья. Метод определения РВ основан на способности моносахаридов восстанавливать в щелочной среде оксид меди (II) в оксид меди (I). Но, поскольку в гидролизатах содержатся и другие соединения, обладающие восстанавливающей способностью, то аналитические данные соответствуют содержанию не только моносахаридов, а всех редуцирующих веществ. (Обычно содержание моносахаридов на 6—10 % ниже содержания РВ).

Резистентный — стойкий, устойчивый, невосприимчивый к какому-либо фактору.

Рекомбинантная ДНК (химерная ДНК) — ДНК, полученная в результате объединения (методами генной инженерии) *in vitro* чужеродных, в природе никогда вместе не сосуществующих фрагментов.

Рекомбинация — обмен генетическим материалом между двумя родительскими молекулами ДНК, приводящий к образованию гибридной (рекомбинантной) молекулы ДНК.

Репарация ДНК — синтез ДНК в местах повреждения матричной молекулы ДНК.

Репликация (редупликация, аутопродукция, аутосинтез) — самовоспроизведение, самокопирование нуклеиновых кислот, генов, хромосом. В основе механизма лежит ферментативный синтез ДНК или РНК по матричному принципу. Строгая специфичность спаривания азотистых оснований в молекуле ДНК обуславливает комплементарность последовательностей оснований в двух цепях и обеспечивает высокую точность Р. Многоэтапный генетически контролируемый процесс с участием ферментов. Р. двухцепочечной ДНК имеет фиксированные начало и конец, ориентированное направление. Синтез прерывистый, из кусков и с «затравками». Начинается в том месте, где расплетаются комплементарные цепи родительской ДНК. С участием РНК и ДНК-полимеразы наращиваются отдельные фрагменты, которые затем соединяются в длинные нити при помощи полинуклеотидлигазы.

Репликон — единица репликации, т. е. участок ДНК, удвоение которого начинается с одной точки и распространяется в определенном направлении.

Репрессия — торможение биосинтеза фермента, последних его этапов.

Рестрикция ДНК — разрушение чужеродной ДНК под воздействием эндонуклеаз клетки.

Ретровирусы — РНК-содержащие вирусы животных, имеющие в своем составе фермент (ревертазу), копирующий РНК в ДНК.

Рецессивный признак — признак, подавляемый доминантным.

Рибосома — органоид клетки, осуществляющий синтез белков. Прикрепляется к шероховатой эндоплазматической сети. Наибольшее количество — в железах, нервных клетках.

РНК — рибонуклеиновая кислота. Двухцепочечные РНК служат для хранения и воспроизведения наследственной информации о последовательности аминокислот в белках от хромосомы к месту синтеза и участия в синтезе (см. **нуклеоид**). По химическому составу молекулы РНК незначительно отличаются от молекул ДНК, хотя и выполняют совершенно иные функции. В зависимости от выполняемых функций различают четыре вида РНК:

- 1) генетические;
- 2) рибосомальная рРНК;
- 3) информационная иРНК;
- 4) транспортная тРНК.

См. **ДНК**.

Рост микроорганизмов — изменение (увеличение) размеров и массы отдельных живых м.о. или их числа (размножение). Динамика роста популяции м.о. характеризуется фазами развития или кривыми роста.

С

Сайт — участок (нуклеотидной последовательности, молекулы белка и т. п.).

Селекция — понятие включает отбор и гибридизацию штаммов м.о. с целью получения нужных продуцентов.

Симбиоз — длительное сожительство организмов разных видов, обычно приносящее им взаимную пользу. Тип ассоциативных взаимоотношений, когда два или несколько видов м.о., используя продукты обмена веществ один другого, создают взаимовыгодные условия существования.

Сингамия — основное направление эволюции полового размножения, т. е. оплодотворение, при котором обязательно слияние двух половых клеток, происходящих от разных особей.

Синергизм — комбинированное действие факторов, при котором общий эффект превышает результат, получающийся от действия каждого фактора по отдельности.

Синтез — получение сложных химических соединений на базе простых.

Скорость роста — показатель интенсивности роста культуры, равный отношению прироста биомассы в экспоненциальной фазе к соответствующему интервалу времени.

Соматические клетки — неспециализированные неполовые клетки тела.

Сорбция — поглощение одним веществом другого. Различают адсорбцию, абсорбцию и хемосорбцию. Применяется для очистки и разделения различных веществ.

Сперматогенез — процесс развития сперматозоида (мужская половая клетка).

Специализация — крайняя степень приспособления к очень ограниченным условиям существования. Примеры: птица колибри, муравьеды.

Сплайсинг — посттранскрипционная модификация РНК, заключающаяся в вырезании незначащих участков РНК (интронов) и соединении значащих участков (экзонов) в конечную молекулу иРНК.

Спонтанный — самопроизвольный, вызванный не внешними воздействиями.

Средства защиты растений микробиологические — препараты, выпускаемые микробиологической промышленностью для защиты растений от насекомых-вредителей и от болезней.

Среды жидкие — питательные среды, применяемые для выявления физиолого-биохимических особенностей микроорганизмов, а также для накопления их биомассы и продуктов метаболизма.

Среды культуральные — питательные среды для наращивания микробной биомассы (культивирования)

Среды натуральные — питательные среды, приготовленные в виде экстрактов и настоев из продуктов растительного или животного происхождения. Используются, главным образом, для поддержания культур и накопления биомассы м.о.

Среды растительные — питательные среды на основе жидкостей природного происхождения (соки, молоко, сусло).

Среды синтетические — питательные среды, в состав которых входят только определенные химически чистые соедине-

ния (неорганические и органические), взятые в точно указанных концентрациях, установленных на основании изучения потребностей м.о. в питательных веществах.

Среды сыпучие — питательные среды, получаемые из твердых сыпучих веществ, например, разваренного пшена, отрубей, пропитанных питательным раствором.

Стерилизация — обработка материала, в результате которой достигается полное уничтожение вегетативных форм м.о. и их спор. Осуществляется физическими (нагревание, облучение), механическими (фильтрование) и химическими (обработка дезинфицирующими или антисептическими веществами) методами.

Стимуляторы роста — вещества, способные в малых концентрациях заметно ускорять физиологические и биохимические процессы, рост организмов. В более высоких дозах оказывают угнетающее действие.

Структурный ген — участок нуклеотидной последовательности, содержащий информацию о структуре другого биополимера (белка, РНК); в это понятие не включаются нуклеотидные последовательности, содержащие регуляторные сигналы для экспрессии гена.

Сублимация (возгонка) — переход вещества при нагревании непосредственно из твердого состояния в газообразное, минуя жидкое.

Субстрат: 1) питательная среда или один из ее основных компонентов, чаще всего источник углерода; 2) химическое вещество, подвергающееся превращению под действием фермента.

Сульфитный щелок — раствор, получающийся при сульфитной варке целлюлозы и служащий сырьем для микробиологического синтеза этилового спирта, кормовых дрожжей, антибиотиков и др.

Сусло — водный раствор экстрактивных веществ растительного сырья и солода, предназначенный для сбраживания; промежуточный продукт пиво- и квасоварения.

Суспензии — дисперсные системы, состоящие из частиц твердой дисперсной фазы, распределенных в жидкой дисперсионной среде.

Сухой остаток — вещества, остающиеся после выпаривания воды и высушивания остатка при 103—105°C.

Сферопласт — бактериальная клетка с частично разрушенной (редуцированной) клеточной стенкой.

Т

Тандем — элементы, расположенные друг за другом.

Телофаза митоза и мейоза — фаза, когда хромосомы, собравшиеся у полюсов, деспирализуются, становятся плохо видимыми, образуется ядерная оболочка (деспирализация и образование дочерних ядер и клеток).

Термолиз дрожжей — процесс тепловой обработки дрожжевой суспензии выдерживанием ее при температурах от 75 до 92°C (преимущественно при 75°C) в течение 40 мин для биологического обезвреживания. В процессе термолиза убиваются дрожжевые клетки и сопутствующая им посторонняя микрофлора.

Термофилы — теплолюбивые м.о.; оптимальная температура их развития — 50—70°C, минимальная — 35°C, максимальная — около 75°C.

Тилакоиды — трубчатые, пластинчатые и мешкоподобные структуры хлоропластов, включающие хлорофилл.

Токсины — яды.

Трансдукция — передача фрагментов ДНК от клетки донора к клетке реципиента при участии бактериофага. Т. бывает специфической и неспецифической. Обнаружена у бактерий типа *Salmonella* и *Escherichia*.

Транскрипция ДНК — составляющая часть процесса биосинтеза РНК в клетке. РНК переносит генетическую информацию от ДНК к рибосомам, где происходит синтез белков. Таким образом, рибосома не контактирует с ДНК.

В контакте с ДНК синтезируется матричная РНК (мРНК), называемая также информационной РНК (иРНК). Этот биосинтез осуществляется ферментами РНК — полимеразам.

В процессе Т. происходит переписывание информации путем синтеза на одной из цепей молекулы ДНК одноцепочечной молекулой РНК последовательности нуклеотидов матрицы — полинуклеотидной цепи ДНК.

Трансляция — перевод последовательности нуклеотидов в молекуле иРНК (мРНК) в последовательность аминокислот полипептидной цепочки белков. Т. осуществляется на рибосомах. В этом синтезе участвуют различные белковые соединения (белковые факторы, ферменты) и молекулы транспортной РНК (тРНК), несущие активированные аминокислоты. Считывание нуклеотидной последовательности мРНК происходит по законам генетического кода, согласно которому каждой

аминокислоте соответствует триплет нуклеотидов (*кодон*). Последовательность кодонов определяет аминокислотную последовательность синтезируемого белка. Молекула тРНК содержит антикодоны — последовательности нуклеотидов, комплементарные кодонам. Таким образом, тРНК является адаптором, который обеспечивает соответствие между кодоном и кодируемой аминокислотой. Наличие адаптора — главное отличие трансляции от транскрипции и репликации.

Молекула тРНК растворима, содержит всего в среднем 80 нуклеотидов.

Наследственная информация о строении белков организма (генетический код) передается с помощью 64 кодонов (нуклеотидных триплетов). Из всех возможных 64 триплетов 61 — смысловые, они соответствуют определенным аминокислотам, а три — не кодируются (стоп-кодона).

Транспозон — подвижный генетический элемент, содержащий гены (например, гены устойчивости к антибиотикам) и способный внедряться в разные участки хромосомы или разные участки внехромосомной ДНК.

Трансформация в генетике — внесение в клетку генетической информации при помощи изолированной ДНК. Т. приводит к появлению у трансформированной клетки (трансформанта) и ее потомства новых признаков, характерных для объекта — источника ДНК.

Т. — сложный процесс, включающий такие стадии, как:

- фиксация молекул ДНК клеткой-реципиентом;
- проникновение ДНК внутрь клетки;
- включение фрагментов трансформирующей ДНК в хромосому клетки-хозяина;
- формирование «чистых» трансформированных вариантов.

Фиксация ДНК происходит на особых участках клеточной поверхности (рецепторах), число которых ограничено. Связанная с рецепторами ДНК сохраняет чувствительность к действию добавленного в среду фермента дезоксирибонуклеазы, вызывающего ее распад. Однако спустя очень короткий срок (~ 1 мин) после фиксации часть ДНК проникает в клетку. Бактериальные клетки одного и того же штамма резко различаются по проницаемости для ДНК. Клетки данной бактериальной популяции, способные включать чужеродную ДНК, называются *компетентными*. Число компетентных клеток

в популяции незначительно и зависит от генетических особенностей бактерий и фазы роста бактериальной культуры. Развитие компетентии связывают с синтезом особого белка, обеспечивающего проникновение ДНК в клетку.

Средние размеры фрагментов ДНК, проникающих в клетку, составляют $5 \cdot 10^6$ Дальтон. Поскольку в компетентную клетку может одновременно проникнуть ряд таких фрагментов, суммарная величина поглощенной ДНК может быть примерно равна размерам хромосомы клетки-хозяина. После проникновения в клетку двунитевой ДНК одна нить распадается до моно- и олигонуклеотидов, вторая — встраивается в хромосому клетки-хозяина путем ее разрывав и воссоединений. Последующая репликация такой гибридной структуры приводит к выщеплению «чистых» клонов трансформантов, в потомстве которых закреплен признак, кодируемый включившейся ДНК.

Применение Т. позволило провести генетический анализ бактерий, у которых не описано иных форм генетического обмена (конъюгации, трансдукции). Кроме того, Т. — удобный метод для выяснения влияний на биологическую активность ДНК физических или химических изменений ее структуры.

Для Т. используются не только фрагменты бактериальной хромосомы, но и ДНК бактериальных плазмид и бактериофагов.

Триплет — сочетание трех нуклеотидов. Генетическая информация записывается кодом из 64 триплетов — сочетаний четырех типов нуклеотидов. Один триплет соответствует одной а.к.

Турбидистат (турбидостат) — способ непрерывного культивирования м.о., при котором поддерживается постоянная концентрация клеток путем регулирования скорости подачи свежей питательной среды.

У

Углеводы — обширный класс органических соединений общей формулы $C_nH_{2n}O_n$, участвующих в обмене веществ у всех живых организмов, являясь главным источником энергии. Служат сырьем в некоторых процессах микробиологического синтеза. В зависимости от числа остатков моносахаридов подразделяются на три группы: моносахариды (монозы), не способные гидролизироваться, олигосахариды и полисахариды (полиозы), способные гидролизироваться и образовывать простые углеводы.

Ультрафильтрация — метод концентрирования и очистки растворов, заключающийся в продавливании под высоким давлением через полупроницаемые мембраны низкомолекулярных соединений и воды, в результате чего в концентрате накапливаются высокомолекулярные вещества (например, ферменты, вирусы и др.).

Ультрафиолетовое облучение — физический способ воздействия УФ-лучами (длина волны от 400 до 10 нм) на различные биообъекты.

Ультрацентрифугирование — центрифугирование при высоких строго контролируемых частотах вращения. Применяется для разделения веществ по размеру их молекул и определения размеров коллоидных частиц и крупных молекул белка, клетчатки и других веществ.

Утилизация — использование отходов производств, например, в качестве дополнительного сырья.

Ф

Фаг (бактериофаг) — вирус бактерий; как правило, содержит только ДНК или РНК, упакованную в белковую оболочку.

Фагоцитоз — захватывание твердых частиц из окружения клетки ее выпячиваниями.

Фазы развития — характерные этапы (периоды) роста популяции м.о., характеризующиеся обычно зависимостью числа клеток от времени.

Факторы внешней среды — условия среды, в которой происходит развитие м.о. Для наиболее полного проявления его жизнедеятельности требуется оптимизация всех основных факторов.

Факторы роста — биологически активные вещества (ряд а.к., витамины, стероиды), которые дополнительно к питательным веществам необходимы данному м.о. или мутанту для нормального роста и не могут им синтезироваться.

Фенотип — совокупность всех признаков организма.

Фермент (энзим) — вещество белковой природы, катализатор биохимических превращений субстрата, с которыми Ф образует активированный комплекс.

Ферментативная активность — величина, характеризующая эффективность каталитического действия фермента или ферментного препарата на соответствующий субстрат за единицу времени.

Ферментативный катализ (биокатализ) — ускорение химических (биохимических) реакций под влиянием ферментов.

Ферментатор (ферментер) — аппарат для глубинного выращивания (культивирования) м.о. в питательной среде в условиях стерильности, интенсивного перемешивания, непрерывного продувания воздуха и поддержания температуры.

Ферментация — биохимический процесс переработки органического сырья под действием ферментов; химическая реакция, катализатором в которой является фермент, а носителем катализатора — внутриклеточные вещества м.о.

Ферментный препарат — комплекс веществ, содержащих помимо активного белка (фермента) различные балластные вещества.

Фибриноген — растворимый белок плазмы крови; фактор свертывания. Под действием фермента *тромбина* а Ф. превращается в фибрин. Тромбин отторгает от фибриногена 2 пептида. При недостатке Ф. в организме возникает кровоточивость.

Фибробласты — основная клеточная форма соединительной ткани организма. Ф. вырабатывают волокна и основное вещество соединительной ткани.

Физиологические признаки — комплекс свойств м.о., проявляющийся в процессах их жизнедеятельности: питания, дыхания, движения и т. п.

Физические факторы внешней среды — физические условия среды, в которой развивается организм (температура, свет и иные формы лучистой энергии, давление, влажность, электрическое и магнитное поля и т. п.). Имеют наибольшее значение среди факторов внешней среды.

Фиксация азота биологическая — ассимиляция молекулярного азота атмосферы клетками м.о.

Филогенез — историческое развитие живой формы существования материи.

Фильтрование — процесс разделения неоднородных систем (суспензий, аэрозолей) при помощи пористых перегородок, задерживающих твердые частицы, но пропускающих жидкость или газ.

Фильтры бактериальные — мелкопористые фильтровальные элементы, предназначенные для очистки (холодной стерилизации) жидкости от м.о. Изготавливаются из различных материалов и имеют разную форму и размер пор.

Флокуляция — вид коагуляции, при которой мелкие частицы, находящиеся во взвешенном состоянии в жидкой или газовой среде, образуют рыхлые хлопьевидные скопления — флоккулы.

Флотирование — технологический прием выделения клеток из микробной (дрожжевой) суспензии, основанный на свойстве клеток концентрироваться на поверхности раздела жидкой и газовой фаз эмульсии, получаемой непрерывным продуванием воздуха через суспензию.

Фосфорбактерин — бактериальный препарат, содержащий споры бактерий, способных переводить фосфорорганические соединения в усвояемую для растений форму. Предназначен для повышения урожая зерновых, картофеля, сахарной свеклы и других культур путем предварительной обработки семян и клубней.

Фосфорилирование — замещение любого атома или группы атомов на остаток фосфорсодержащей кислоты, ее производного; введение такого атома любыми способами.

Фотосинтез — образование высшими растениями и др. сложных органических веществ, необходимых для жизнедеятельности растений и др. организмов из простых соединений за счет энергии света, поглощаемого хлорофиллами и другими фотосинтезирующими пигментами.

Фракционирование — разделение смеси на фракции по массе, растворимости, размерам молекул, осуществляемое соответственно центрифугированием, сменой растворителей, адсорбцией и другими способами.

Х

Хеостат — способ непрерывного культивирования м.о., при котором рост м.о. регулируется ограничением концентрации одного из необходимых веществ, при этом в аппарате поддерживается динамически устойчивая концентрация клеток м.о.

Хиазмы — перекресты хроматид, цитологическое проявление кроссинговера.

Химера — искусственно созданный м.о., состоящий из разнородного генетического материала. Молекулярно-генетическая химера — соединенные фрагменты молекул ДНК, выделенных из неродственных организмов.

Химерная молекула — искусственно созданная гибридная молекула ДНК, не встречающаяся в природе.

Химические факторы внешней среды — химические условия водной среды, в которой происходит развитие м.о. (состав среды, концентрация питательных веществ, наличие или отсутствие бактерицидных и физиологически активных веществ, концентрация водородных ионов, окислительно-восстановительный потенциал).

Хлоропласты — пластиды растительной клетки, содержащие пигмент хлорофилл, где происходит фотосинтез.

ХПК — химическая потребность в кислороде; количество кислорода, необходимое для окисления органических соединений химическим путем в определенных условиях.

Хроматида — продольная половина хромосомы.

Хроматин — хромосомный материал клеточного ядра. Глыбки, гранулы, сетевидные структуры ядра, окрашивающиеся некоторыми красителями. Содержит ДНК и белки и представляет собой спирализованные и уплотненные участки хромосом.

Хромомеры — плотноупакованные неактивные участки хромосом. В участках хромосом, активно синтезирующих РНК, хромомеры раскручиваются и образуют боковые петли.

Хромонема — нитевидная структура в основе хромосомы. По мнению большинства исследователей — это элементарная ДНК (диаметр 100—2000 Å). Мнения о количестве таких молекул ДНК расходятся. Некоторые рассматривают Х. как особую степень упаковки нуклеопротеидных цепей в хромосомах в период деления клетки и в гетерохроматических участках покоящегося клеточного ядра. См. хромосомы.

Хромопласты — пластиды растительной клетки, содержащие пигмент хлорофилл, в котором происходит фотосинтез.

Хромосомные мутации — утрата части хромосомы, нарушение ее строения.

Хромосомы — органоиды ядра, определяющие наследственные свойства клеток и организмов. Плотные тельца, окрашиваемые основными красителями. Основу составляют *хромонемы* — нитевидные структуры. В Х. содержится ~99 % ДНК клетки (остальные — в цитоплазме). У экариот Х. содержат *гистоны*.

Хромоцентр — **кариосома** — гетерохроматиновый участок хромосомы, сохраняющий в интерфазе клетки плотно спирализованную структуру хромонемы.

Ц, ч, ш

Целлюлоза — клетчатка; один из самых распространенных природных полимеров (полисахарид), являющийся главной составной частью оболочек растительных клеток.

Центриоль — клеточный центр из двух очень маленьких телец цилиндрической формы, расположенных под прямым углом д.д. Стенка Ц. состоит из девяти пар микротрубочек, образующих *веретено деления*.

Центромера — область первичной перетяжки на хромосоме, куда во время митоза прикрепляются нити *ахроматинового веретена*.

Цитология — наука о строении и жизнедеятельности клеток. Изучает общие свойства и микроструктуру клеток.

Цитоплазма — внутренняя часть клетки, комплекс структур, органелл.

Цитоплазматическая мембрана (клеточная мембрана, цитолемма, плазмалемма, плазматическая мембрана) — тонкая эластичная мембрана, окружающая протопласт. Прилипает к внутренней поверхности клеточной стенки. Как и многие другие биологические мембраны, состоит из билипидных слоев с включениями белков. Регулирует водно-солевой обмен, обеспечивает питание бактерий.

Чистая линия — группа генетически однородных (гомозиготных) особей.

Штамм — чистая культура определенного вида м.о., у которого изучены морфологические и физиологические особенности.

Штамп бактерий (фага) — совокупность бактериальных клеток (фагов), имеющих общее происхождение и характеризующихся одинаковыми устойчивыми признаками.

Э

Экзон — информативная последовательность нуклеотидов.

Экзоферменты — внеклеточные ферменты. Не связанные со структурой клеточной протоплазмы, легко выделяющиеся из клетки наружу в среду и проявляющие активность вне клетки (в основном гидролитические). Обеспечивают доступность питательных веществ, переводя их в более растворимую и простую форму.

Экспрессия гена — проявление гена; путь реализации генетической информации; состоит из двух основных стадий — транскрипции и трансляции.

Экстракция — разделение смеси жидких или твердых веществ с помощью селективных (избирательных) растворителей (экстрагентов), основанное на различной растворимости компонентов смеси в используемом растворителе.

Эктодерма — наружный зародышевый листок.

Электрофорез — перемещение заряженных частиц (коллоидных, молекул белка, микроорганизмов) в жидкой (реже газообразной) среде под действием внешнего электрического поля. В зависимости от природы разделяемой смеси электрофорез осуществляют в различных средах — в растворе, в различных гелях, в пористых слоях и т. п.

Эмбрион (зародыш) — стадия развития организма с момента образования *зиготы* до рождения или выхода из яйцевых оболочек.

Эмульсия — жидкость, в которой во взвешенном состоянии находятся микроскопические частицы другой жидкости.

Эндоплазматическая сеть — разветвленная сеть каналов и полостей в цитоплазме клетки, образованная мембранами. Различают гладкую и шероховатую Э. С. На мембранах гладкой Э. С. находятся ферменты жирового и углеводного обмена.

Эндоферменты — внутриклеточные ферменты, накапливающиеся в клетке и тесно связанные со структурой клеточной протоплазмы (например, дегидрогеназы, оксидазы). Большая часть ферментов, участвующих в метаболизме, находятся только внутри клеток, хотя их можно различными способами экстрагировать из клеток.

Энзим — то же самое, что *фермент*.

Энзимология — наука, изучающая ферменты. Процессы, катализируемые ферментами, называются как ферментативными, так и энзиматическими.

Энтобактерин — микробиологическое средство защиты растений от насекомых-вредителей, полученное на основе спорового микроорганизма. Предназначен для борьбы с вредителями садовых и огородных растений.

Энтодерма — внутренний зародышевый листок.

Энтомопатогенные препараты — препараты, выпускаемые микробиологической промышленностью на основе бактерий, грибов, вирусов и предназначенные для защиты растений от вредителей и болезней. Обеспечивают гибель и подавляют массовое размножение многих вредных насекомых.

Эписомы — генетические факторы (молекулы ДНК), способные находиться в клетке, либо в автономном (цитоплазма), либо в интегрированном (хромосома) состоянии (в зависимости от вида клетки).

Эприн — кормовой белковый продукт, получаемый путем аэробного культивирования м.о. на этиловом спирте.

Эукариотические клетки — сложные клетки млекопитающих и растений — состоят из цитоплазмы и ядра.

Эукариоты — организмы, обладающие, в отличие от прокариот, оформленным клеточным ядром, ограниченным от цитоплазмы ядерной оболочкой.

Эухроматин — рыхло спирализованный хромосомный материал. Окрашивается обычно слабее, чем гетерохроматин. см. Гетерохроматин.

Я

Ядро — важнейшая часть клетки (эукариотической). Содержит ДНК, гены. Окружено оболочкой из двух мембран, обычно трехслойного строения. Наружная мембрана покрыта рибосомами.

Ядрышко — плотное округлое тельце в ядерном соке — скопление рРНК и рибосом на разных этапах формирования.

Наши книги можно приобрести:

Учебным заведениям и библиотекам:

в отделе по работе с вузами

тел.: (495) 744-00-12, e-mail: vuz@urait.ru

Частным лицам:

список магазинов смотрите на сайте urait.ru

в разделе «Частным лицам»

Магазинам и корпоративным клиентам:

в отделе продаж

тел.: (495) 744-00-12, e-mail: sales@urait.ru

Отзывы об издании присылайте в редакцию

e-mail: gred@urait.ru

**Новые издания и дополнительные материалы доступны
в электронной библиотеке biblio-online.ru,
а также в мобильном приложении «Юрайт.Библиотека»**

Учебное издание

Чечина Ольга Николаевна

СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

Учебное пособие для СПО

Формат 60×90^{1/16}.

Гарнитура «Charter». Печать цифровая.

Усл. печ. л. 14,44.

ООО «Издательство Юрайт»

111123, г. Москва, ул. Плеханова, д. 4а.

Тел.: (495) 744-00-12. E-mail: izdat@urait.ru, www.urait.ru