

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ОБРАЗОВАНИЮ
Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования
«ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Л. В. Тимощенко, М. В. Чубик

ОСНОВЫ МИКРОБИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ

*Рекомендовано в качестве учебного пособия
Редакционно-издательским советом
Томского политехнического университета*

Издательство
Томского политехнического университета
2009

УДК 573(075.8)+579(075.8)

ББК 30.16.я73+28.4.я73

Т 417

Тимощенко Л.В., Чубик М. В.

Т417 Основы микробиологии и биотехнологии: учебное пособие / Л.В. Тимощенко, М.В. Чубик. – Томск: Изд-во Томского политехнического университета, 2009. – 194 с.

В учебном пособии представлен материал, включающий общие вопросы микробиологии, технологические основы биотехнологических производств с описанием объектов биотехнологии, аппаратурного оформления и продуктов биотехнологических производств. Отдельные главы посвящены основным разделам современной биотехнологии и получению разнообразных коммерческих биотехнологических продуктов.

Пособие предназначено для студентов, обучающихся по направлению 550800 «Химическая технология и биотехнология», и студентов других специальностей, изучающих дисциплину «Основы биотехнологии».

УДК 573(075.8)+579(075.8)

ББК 30.16.я73+28.4.я73

Рецензенты

Доктор медицинских наук, зам. заведующего ЦНИЛ СибГМУ

А. Э. Сазонов

Кандидат химических наук, доцент кафедры технологии
основного органического синтеза ТПУ

О. В. Ротарь

© Тимощенко Л.В., Чубик М.В., 2009

© Томский политехнический университет, 2009

© Оформление. Издательство Томского
политехнического университета, 2009

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ОСНОВЫ МИКРОБИОЛОГИИ	11
1.1. МОРФОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ.....	11
1.1.1. Систематика и номенклатура микроорганизмов	11
1.1.2. Формы бактерий	12
1.1.3. Структура бактериальной клетки и методы ее исследования....	15
1.1.4. Морфология микробов–эукариотов:	
дрожжевых и плесневых грибов.....	23
1.1.5. Методы микроскопического исследования микроорганизмов ..	25
1.2. ФИЗИОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ.....	30
1.2.1. Питание бактерий	30
1.2.2. Питательные среды.....	33
1.2.3. Условия культивирования бактерий.....	35
1.2.4. Дыхание бактерий	36
1.2.5. Ферменты бактерий	37
1.2.6. Культуральные свойства бактерий	39
1.2.7. Выделение чистых культур микроорганизмов	41
ГЛАВА 2. ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДСТВ	44
2.1. ПРОЦЕССЫ В БИОТЕХНОЛОГИИ.....	44
2.1.1. Предферментационная стадия	47
2.1.2. Ферментация.....	48
2.1.3. Постферментационная стадия.....	50
2.2. ЭЛЕМЕНТЫ, СЛАГАЮЩИЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ	62
2.2.1. Биологический агент	62
2.2.2. Субстраты и среды	64
2.2.3. Аппаратура.....	70
2.2.4. Продукты.....	76
2.3. КРИТЕРИИ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОЦЕССОВ.....	77
2.4. КОНТРОЛЬ И УПРАВЛЕНИЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИМИ...	

ПРОЦЕССАМИ; МОДЕЛИРОВАНИЕ И ОПТИМИЗАЦИЯ.....	79
2.5. СИСТЕМЫ GLP и GMP В СВЯЗИ С КАЧЕСТВОМ.....	81
БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОДУКТОВ.....	81
ГЛАВА 3. ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ.....	85
3.1. ДНК и РНК.....	86
3.1.1. Структурные элементы нуклеиновых кислот	87
3.1.2. Первичная структура нуклеиновых кислот.....	89
3.1.3. Вторичная структура ДНК	91
3.1.4. Вторичная структура РНК.....	93
3.1.5. Биосинтез нуклеиновых кислот и белков.....	94
(матричные биосинтезы).....	94
3.2. ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛ ДНК.....	104
3.3. МЕТОДЫ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ.....	105
3.4. ПОЛУЧЕНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ	108
С ПОМОЩЬЮ МЕТОДОВ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ	108
3.4.1. Биосинтез инсулина человека в клетках кишечной палочки ...	108
3.4.2. Биосинтез соматотропина и других гормонов человека	110
3.4.3. Получение интерферонов.....	112
3.4.4. Получение иммуногенных препаратов и вакцин	113
3.4.5. Другие области применения генной инженерии	114
3.5. ПРЕИМУЩЕСТВА И ОПАСНОСТЬ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ	119
.....	119
3.6. МЕРЫ БЕЗОПАСНОСТИ.....	120
ГЛАВА 4. ПРОМЫШЛЕННАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ.....	121
4.1. ПРОИЗВОДСТВО ПЕРВИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ	121
4.1.1. Производство аминокислот.....	121
4.1.2. Производство органических кислот	126
4.1.3. Получение витаминов	131
4.2. ПРОИЗВОДСТВО ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ	134

4.3. ПРОИЗВОДСТВО БЕЛКОВ ОДНОКЛЕТОЧНЫХ И МНОГОКЛЕТОЧНЫХ ОРГАНИЗМОВ.....	159
4.3.1. Производство белка одноклеточных организмов	161
4.3.2. Производство грибного белка (микопротеина).....	164
4.3.3. Производство цианобактерий	165
ГЛАВА 5. СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ....	168
5.1. БИОПЕСТИЦИДЫ	168
5.1.1. Технология получения бактериальных энтомопатогенных	169
препаратов	
5.1.2. Технология получения грибных энтомопатогенных	170
препаратов	
5.1.3. Технология получения вирусных энтомопатогенных препаратов	172
5.2. БИОЛОГИЧЕСКИЕ УДОБРЕНИЯ	173
5.2.1. Технология получения сухого нитрагина	174
5.2.2. Технология получения сухого азотобактерина.....	175
5.2.3. Технология получения фосфоробактерина	176
ГЛАВА 6. ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ	177
6.1. АЭРОБНАЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ ОЧИСТКА СТОЧНЫХ ВОД	177
6.1.1. Основные характеристики сточных вод.....	181
6.1.2. Процессы с участием активного ила	183
6.1.3. Аэробная обработка ила.....	186
6.1.4. Вторичная очистка сточных вод с помощью капельных	187
биологических фильтров.....	
6.2. АНАЭРОБНАЯ ПЕРЕРАБОТКА ОТХОДОВ.....	190
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	193

ВВЕДЕНИЕ

Биотехнология – это наука об использовании биологических процессов в технике и промышленном производстве. Название ее происходит от греческих слов *bios* – жизнь, *teken* – искусство, *logos* – слово, учение, наука.

В соответствии с определением Европейской федерации биотехнологов (ЕФБ, 1984) биотехнология базируется на интегральном использовании биохимии, микробиологии и инженерных наук в целях промышленной реализации способностей микроорганизмов, культур клеток тканей и их частей. Уже в самом определении предмета отражено его местоположение как пограничного, благодаря чему результаты фундаментальных исследований в области биологических, химических и технических дисциплин приобретают выраженное прикладное значение. Биотехнология непосредственно связана с общей биологией, микробиологией, ботаникой, зоологией, анатомией и физиологией, биологической, органической, физической и коллоидной химией, иммунологией, биоинженерией, электроникой, технологией лекарств, генетикой и другими научными дисциплинами.

Возникновение, становление и развитие биотехнологии можно условно разделить на четыре периода: эмпирический, этиологический, биотехнический и генотехнический. **Эмпирический** (от греч. *empirikos* – опытный) **период** – самый длительный, охватывающий примерно 8000 лет, из которых более 6000 лет – до нашей эры и около 2000 лет – нашей эры. Древние народы того времени интуитивно использовали приемы и способы изготовления хлеба, пива и некоторых других продуктов, которые теперь мы относим к разряду биотехнологических. Так, египтяне выпекали хлеб из кислого теста с 4000 годов до н. э., на востоке вино было известно с 2000 годов до н. э. В течение нескольких тысячелетий известен уксус, издревле приготавливавшийся в домашних условиях, хотя о микробах-индукторах этого процесса мир узнал в 1868 г. благодаря работам Луи Пастера, несмотря на существование с XIV в. «орлеанского способа» приготовления уксуса; первая дистилляция вина осуществлена в XII в.; водку из хлебных злаков впервые получили в XVI в.; шампанское известно с XVIII века, но получение абсолютного этанола впервые удалось в XIV в. испанцу Раймунду Луллию благодаря перегонке вина с негашеной известью.

К тому же эмпирическому периоду относятся получение кисломолочных продуктов и сыра, квашеной капусты, медовых алкогольных напитков, восточных продуктов (соевого соуса и темпеха), силосование кормов; мочка лубоволокнистых растений; культивирование грибов.

Таким образом, народы исстари пользовались на практике микробиологическими процессами, ничего не зная о микробах; эмпиризм также был характерен и в практике использования полезных растений и животных.

Второй, **этиологический** (от греч. *aitia* – причина), **период** в развитии биотехнологии охватывает вторую половину XIX в. и первую треть XX в. Он связан с выдающимися исследованиями великого французского ученого Луи Пастера (1822 – 1895) – основоположника научной микробиологии и ряда микробиологических дисциплин. Пастер вскрыл микробную природу брожений, доказал возможность жизни в бескислородных условиях, экспериментально опроверг представление о самопроизвольном зарождении живых существ, создал научные основы вакцинопрофилактики и вакцинотерапии; предложил метод стерилизации, называемый по его имени *пастеризацией* и т. д.

Этиологический период знаменателен тем, что удалось доказать индивидуальность микробов и получить их в чистых культурах. Более того, каждый вид мог быть размножен на питательных средах и использован в целях воспроизведения соответствующих процессов (бродильных, окислительных и др.). Например: масляно-кислые бактерии и вызываемое ими масляно-кислое брожение, лактобактерии и молочнокислое брожение, дрожжи – сахаромицеты и спиртовое брожение, уксуснокислые бактерии и окисление этанола до уксусной кислоты и т. д. В этот период было начато изготовление прессованных пищевых дрожжей, а также некоторых продуктов обмена (метаболизма) – ацетона, бутанола, лимонной и молочной кислот; во Франции приступили к созданию биоустановок для микробиологической очистки сточных вод.

Знание причин биологических процессов еще не исключало нестерильные операции, хотя и стремились к использованию чистых культур микроорганизмов.

Для всестороннего изучения морфолого-физиологических свойств и продуктов обмена микробов все ранее предложенные способы их выращивания оказались малопригодными. Более того, накопление однородной по возрасту большой массы клеток оставалось исключительно трудоемким процессом. Вот почему требовался принципиально иной подход для решения многих задач в области биотехнологии. В 1933 г. А. Клуйвер и Л. Х. Ц. Перкин опубликовали работу «Методы изучения обмена веществ у плесневых грибов», в которой изложили основные технические приемы, а также подходы к оценке и интерпретации получаемых результатов при глубинном культивировании грибов. С этого времени начинается третий период в развитии биологической технологии – **биотехнический**. Началось внедрение в биотехнологию крупно-

масштабного герметизированного оборудования, обеспечившего проведение процессов в стерильных условиях. Особенно мощный толчок в развитии промышленного биотехнологического оборудования был отмечен в период становления и развития производства антибиотиков – время Второй мировой войны (1939–1945 гг.), когда возникла острая необходимость в противомикробных препаратах для лечения больных с инфицированными ранами. Все прогрессивное в области биологических и технических дисциплин, достигнутое к тому времени, нашло свое отражение в биотехнологии. Следует отметить, что уже в 1969 г. Ф. Мишер получил «нуклеин» (ДНК) из лейкоцитов; В. Оствальд в 1893 г. установил каталитическую функцию ферментов; Г. Хаберланд в 1902 г. показал возможность культивирования клеток различных тканей растений в простых питательных растворах; Ц. Нейберг в 1912 г. раскрыл механизм процессов брожения; Л. Михаэлис и М. Л. Ментен в 1913 г. разработали кинетику ферментативных реакций; Г. А. Надсон и Г. С. Филиппов в 1925 г. доказали мутагенное действие рентгеновских лучей на дрожжи и т. д. Следовательно, накопленные научные факты стали побудительным мотивом для разработки способов крупномасштабного культивирования клеток различного происхождения. Это необходимо было для получения различных клеточных продуктов и самих клеток для нужд человека, и прежде всего в качестве (или в составе) лечебных и профилактических средств: пенициллина, стрептомицина, тетрациклинов, декстрана, ряда аминокислот и многих других веществ. К 1950 г. Ж. Моно (Франция) разработал теоретические основы непрерывного управляемого культивирования микробов.

Примерно за 40 лет третьего периода были решены основные задачи по конструированию, созданию и внедрению в практику необходимого оборудования, в том числе главного из них – биореакторов. Это оборудование используют и в настоящее время.

Четвертый период в биотехнологии – **генотехнический** (от греч. *genesis* – происхождение, возникновение, рождение) – начался с 1972 г. В этом году П. Берг со своими сотрудниками в США создали первую рекомбинантную молекулу ДНК.

Естественно, что без фундаментальной работы Ф. Крика и Дж. Уотсона (1953) по установлению структуры ДНК было невозможно достигнуть современных результатов в области биотехнологии. Выяснение механизмов функционирования и регуляции ДНК, выделение и изучение специфических ферментов привело к формированию строго научного подхода к разработке биотехнологических процессов на основе генно-инженерных работ. В этом суть генотехнического периода.

Для генотехнического периода характерны: разработка интенсивных процессов (вместо экстенсивных) на основе направленных фундаментальных исследований (с продуцентами антибиотиков, ферментов, аминокислот, витаминов); получение суперпродуцентов; создание продуцентов, несущих в себе бессмысленную генетическую информацию (например, генов интерферона человека в клетках *Pseudomonas aeruginosa*); создание необычных организмов, ранее не существовавших в природе (например, создание не клубеньковых организмов, несущих гены азотобактерий, ответственных за способность фиксировать молекулярный азот из воздуха); разработка и внедрение экологически чистых и по возможности безотходных технологий; разработка и внедрение в практику специальной аппаратуры блочного (сменного) типа для различных биотехнологических схем; автоматизация и компьютеризация биотехнологических процессов; создание экономически оптимальных производственных процессов при максимальном использовании сырья и минимальном потреблении энергии.

В настоящее время биотехнология представляет собой биоиндустрию, которая включает в себя, с одной стороны, отрасли, в которых биотехнологические методы могут с успехом заменить широко используемые традиционные методы, а с другой – отрасли, в которых биотехнология играет ведущую роль. Среди первых в области химической промышленности относятся синтез искусственных приправ, полимеров и сырья для текстильной промышленности, в области энергетики – получение метанола, биогаза и водорода, в области биометаллургии – извлечение некоторых металлов из бедных руд. Во второй группе отраслей биотехнология охватывает производство продовольствия (широкомасштабное выращивание дрожжей, водорослей и бактерий для получения белков, аминокислот, витаминов и ферментов); увеличение продуктивности сельского хозяйства (клонирование и селекцию сортов растений, исходя из тканевых и клеточных культур, производство биопестицидов и биоинсектицидов); фармацевтическую промышленность (разработку вакцин, синтез гормонов, интерферонов и антибиотиков); защиту окружающей среды и уменьшение ее загрязнения (очистку сточных вод, переработку хозяйственных отходов, изготовление компоста, производство соединений, поддающихся расщеплению микроорганизмами).

В современной биотехнологии в соответствии со спецификой сфер ее применения, можно выделить следующие разделы. Это:

1. Промышленная микробиология.
2. Инженерная энзимология.
3. Сельскохозяйственная биотехнология.

4. Технологическая биоэнергетика.
5. Биоготехнология металлов.
6. Клеточная и генная инженерия.
7. Экологическая биотехнология.

ГЛАВА 1. ОСНОВЫ МИКРОБИОЛОГИИ

1.1. МОРФОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

1.1.1. Систематика и номенклатура микроорганизмов

Многочисленные микроорганизмы (бактерии, грибы, простейшие, вирусы) строго систематизированы в определенном порядке по их сходству, различиям и взаимоотношениям между собой. Этим занимается специальная наука, называемая *систематикой микроорганизмов*. Раздел систематики, изучающий принципы классификации, называется *таксономией*. *Таксон* – группа организмов, объединенная по определенным однородным свойствам в рамках той или иной таксономической категории. Самой крупной таксономической категорией является *царство*, более мелкими – *подцарство, отдел, класс, порядок, семейство, род, вид, подвид* и др.

В основу таксономии микроорганизмов положены их морфологические, физиологические, биохимические, молекулярно-биологические свойства. Весь мир микробов подразделяется на три царства:

- царство эукариотов (грибы и простейшие);
- царство прокариотов (бактерии, риккетсии, микоплазмы);
- царство вирусов.

Эукариоты подобны клеткам растений и животных. Они имеют поверхностную мембрану и внутриклеточную систему элементарных мембран, составляющих эндоплазматическую ретикулярную сеть и комплекс Гольджи. В цитоплазме эукариотов содержится оформленное ядро, митохондрии, рибосомы и ряд других органелл. Размножаются простые эукариоты половым и бесполом путями.

Прокариоты – организмы, не имеющие отграниченного ядра, внутриклеточной системы элементарных мембран и митохондрий, а некоторые лишены также клеточной стенки. Размножаются простым поперечным делением или почкованием.

Вирусы – микроорганизмы неклеточной структуры, являющиеся абсолютными паразитами, репродукция которых внутри клеток происходит с помощью энергообменных систем клетки-хозяина.

Одной из основных таксономических категорий является *вид* (*species*) – совокупность особей, имеющих общий корень происхождения, сходный генотип и максимально близкие фенотипические признаки и свойства.

Совокупность однородных микроорганизмов, выделенных на питательной среде, характеризующаяся сходными морфологическими, тинк-

ториальными (отношение к красителям), культуральными, биохимическими и антигенными свойствами, называется *чистой культурой*.

Чистая культура микроорганизмов, выделенных из определенного источника и отличающихся от других представителей вида, называется *штаммом*. Штамм – более узкое понятие, чем вид или подвид. Близким к штамму является понятие клона; *клон* – это совокупность потомков, выращенных из одной микробной клетки.

Решением Международного конгресса для микроорганизмов рекомендованы следующие таксономические категории: царство, отдел, класс, порядок, семейство, род, вид.

Название вида соответствует бинарной номенклатуре, т. е. состоит из двух слов. Например, кишечная палочка пишется как *Escherichia coli*. Первое слово – название рода, которое начинается с прописной буквы, второе слово обозначает вид и пишется со строчной буквы. При повторном написании вида родовое название сокращается до начальной буквы, например *E. coli*.

1.1.2. Формы бактерий

Всем бактериям присущи определенные морфологические свойства (форма, размер, характер их расположения в мазке) и тинкториальные свойства (способность окрашиваться).

Различают 4 основные формы бактерий (рис. 1.1): шаровидные (сферические), или кокковидные (от греч. *kokkos* – зерно); палочковидные (цилиндрические); извитые (спиралевидные); нитевидные. Кроме того, существуют бактерии, имеющие треугольную, звездообразную, тарелкообразную форму. Обнаружены так называемые квадратные бактерии, которые образуют скопления из 8-ми или 16-ти клеток в виде пласта.

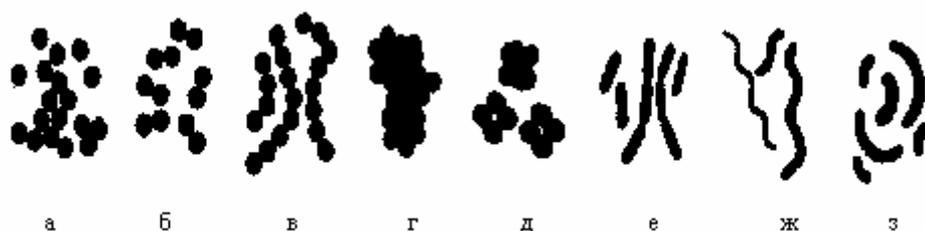


Рис. 1.1. Формы одноклеточных бактерий:

а – микрококки; б – диплококки; в – стрептококки; г – стафилококки; д – сарцины; е – палочковидные бактерии; ж – спириллы; з – вибрионы

Кокковидные бактерии обычно имеют форму правильного шара диаметром 1,0–1,5 мкм; некоторые – бобовидную, ланцетовидную, эл-

липсовидную форму. По характеру взаиморасположения образующихся после деления клеток кокки подразделяют на следующие группы:

1. Микрококки (от лат. *micros* – малый). Клетки делятся в одной плоскости и чаще всего сразу же отделяются от материнской. Располагаются поодиночке, беспорядочно (рис. 1.1.а).

2. Диплококки (от лат. *diplos* – двойной). Деление происходит в одной плоскости с образованием пар клеток, имеющих либо бобовидную, либо ланцетовидную форму (рис. 1.1.б).

3. Стрептококки (от лат. *streptos* – цепочка). Деление клеток происходит в одной плоскости, но размножающиеся клетки сохраняют между собой связь и образуют различной длины цепочки, напоминающие нити бус. Многие стрептококки являются вредными для человека и вызывают различные заболевания: скарлатину, ангину, гнойные воспаления и др. Например *Streptococcus pyogenes* (рис. 1.1.в).

4. Стафилококки (от лат. *staphyle* – гроздь винограда). Клетки делятся в нескольких плоскостях, а образующиеся клетки располагаются скоплениями, напоминающими гроздь винограда (рис. 1.1.г).

5. Тетракокки (от лат. *tetra* – четыре). Деление происходит в двух взаимно перпендикулярных плоскостях с образованием тетрад.

6. Сарцины (от лат. *sarcina* – связка, тюк). Деление происходит в трех взаимно перпендикулярных плоскостях с образованием пакетов (тюков) из 8-ми, 16-ти, 32-х и большего числа особей. Особенно часто встречаются в воздухе (рис. 1.1.д).

Палочковидные (цилиндрические формы) (рис. 1.1.е).

По расположению палочки подразделяют:

– на одиночные или беспорядочно расположенные – монобактерии. Например, *Escherihia coli*;

– располагающиеся попарно (по одной линии) – диплобациллы, диплобактерии. Например, *Pseudomonas*;

– располагающиеся цепочкой – стрептобациллы, стрептобактерии. Например, *Bacillus*.

Палочки, образующие споры, подразделяют:

– на бациллы – аэробные спорообразующие бактерии. Спора у таких палочек располагается, как правило, центрально, и её диаметр не превышает ширины бактерии.

– клостридии – анаэробные спорообразующие бактерии. Спора у них располагается терминально или субтерминально. Она крупная, что растягивает оболочку бактерий, и они внешне напоминают веретено или теннисную ракетку.

Извитые (спиралевидные) формы

По количеству и характеру завитков, а также по диаметру клеток они подразделяются на три группы:

1. Вибрионы (от греч. *vibrio* – извиваюсь, изгибаюсь) имеют один изгиб, не превышающий четверти оборота спирали. Например, *Vibrio* (рис. 1.1.з).

2. Спириллы (от греч. *speira* – завиток) – клетки, имеющие большой диаметр и малое (2–3) количество завитков. Например – *Spirillum minor* (рис. 1.1.ж).

3. Спирохеты (от греч. *speira* – завиток, *chaita* – волос) – спиралевидной формы подвижные бактерии.

Нитевидные формы

Различают два типа нитевидных бактерий: образующие временные нити и постоянные.

Временные нити (иногда с ветвлениями) образуют палочковидные бактерии при нарушении условий их роста или регуляции клеточного деления (микобактерии, коринебактерии, а также риккетсии, микоплазмы, многие грамотрицательные и грамположительные бактерии). При восстановлении механизма регуляции деления и нормальных условий роста эти бактерии восстанавливают обычные для них размеры.

Постоянные нитевидные формы образуются из палочковидных клеток, соединяющихся в длинные цепочки либо с помощью слизи, либо чехлами, либо мостиками (серобактерии, железобактерии).

Для изучения **тинкториальных свойств** микроорганизмов и их морфологии используют анилиновые красители (основные, кислые и нейтральные).

Наибольшее применение имеют основные краски: метиленовый синий, основной фуксин, генцианвиолет, везувин, хризоидин и др. Реже применяются нейтральные (нейтральный красный) и кислые (эозин) краски. Из названных красок готовят спиртовые, водно-спиртовые и водные растворы. В некоторых случаях для повышения красящей силы раствора к нему добавляют протравы, например карболовую кислоту, щелочь и др.

Для определения формы бактерий и их взаимного расположения в мазке используют *простые методы окраски*, т. е. окраска осуществляется одним красителем и мазок получается окрашенным одним цветом. Например, метиленовый синий. Эта окраска позволяет лучше выявить бобовидную форму и парное расположение кокков.

Для изучения структуры бактериальной клетки и выявления особенностей её строения применяют *сложные методы окраски*, которые включают в себя целый ряд красящих веществ, протравы и дифферен-

цирующие вещества. К сложным методам окраски относятся методы Грама, Нессера, Ожешко и др.

1.1.3. Структура бактериальной клетки и методы ее исследования

Бактерии являются прокариотами (рис. 1.2) и существенно отличаются от клеток растений и животных (эукариотов). Они относятся к одноклеточным организмам и состоят из клеточной стенки, цитоплазматической мембраны, цитоплазмы, нуклеоида (обязательных компонентов бактериальной клетки). Некоторые бактерии могут иметь жгутики, капсулы, споры (необязательные компоненты бактериальной клетки).

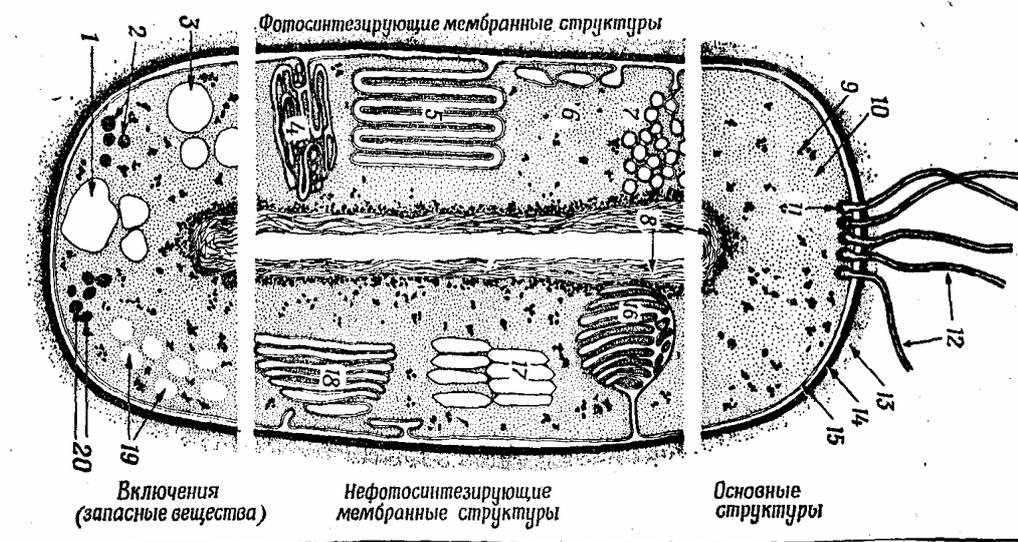


Рис. 1.2. Комбинированное схематическое изображение прокариотической (бактериальной) клетки со жгутиками.

1 – гранулы полиоксимасляной кислоты; 2 – жировые капельки; 3 – включения серы; 4 – трубочатые тилакоиды; 5 – пластинчатые тилакоиды; 6 – пузырьки; 7 – хроматофоры; 8 – ядро (нуклеоид); 9 – рибосомы; 10 – цитоплазма; 11 – базальное тельце; 12 – жгутики; 13 – капсула; 14 – клеточная стенка; 15 – цитоплазматическая мембрана; 16 – мезосома; 17 – газополные вакуоли; 18 – ламеллярные структуры; 19 – гранулы полисахарида; 20 – гранулы полифосфата

Клеточная стенка

Клеточная стенка представляет собой внешнюю структуру бактерий толщиной 30–35 нм, главным компонентом которой является пептидогликан (муреин). Пептидогликан является структурным полимером, состоящим из чередующихся субъединиц N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты, соединенных гликозидными связями (рис. 1.3).

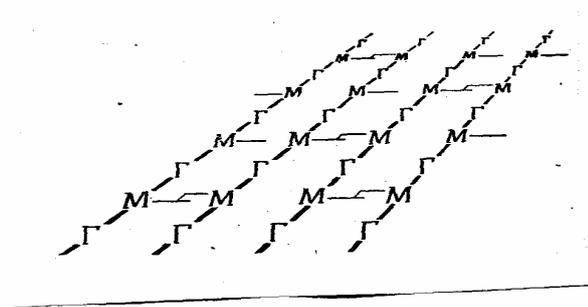


Рис. 1.3. Схематическое изображение однослойной структуры пептидогликана

Параллельно расположенные полисахаридные (гликановые) цепи скреплены между собой поперечными пептидными мостиками (рис. 1.4).

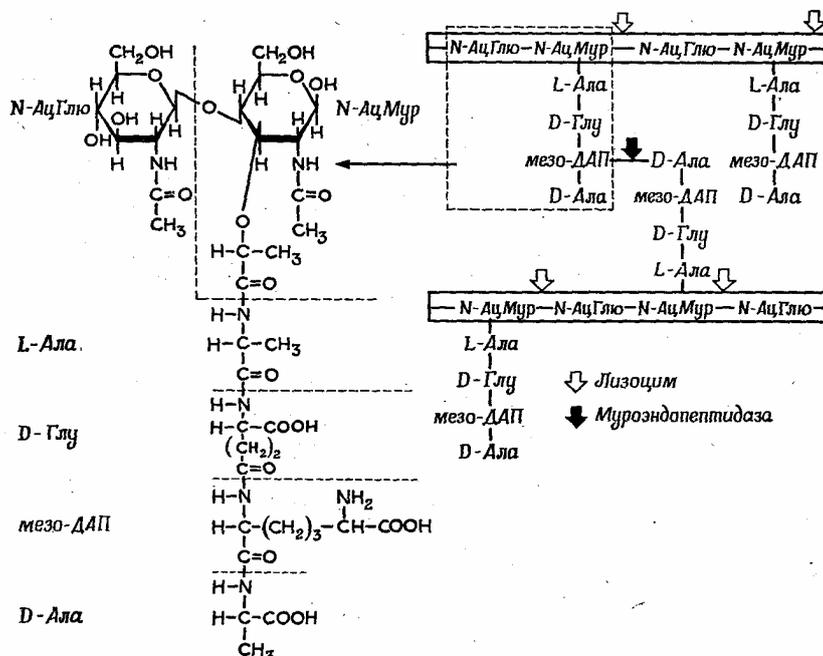


Рис. 1.4. Детальное строение структуры пептидогликана
Светлые и черные короткие стрелки указывают связи, расщепляемые соответственно лизоцимом (мурамидазой) и специфической муроэндопептидазой

Полисахаридный каркас легко разрушается лизоцимом – антибиотиком животного происхождения. Пептидные связи являются мишенью для пенициллина, который ингибирует их синтез и препятствует формированию клеточной стенки. Количественное содержание пептидогликана влияет на способность бактерий окрашиваться по Граму. Бактерии, имеющие значительную толщину муреинового слоя (90–95%), стойко окрашиваются генцианвиолетом в сине-фиолетовый цвет и носят название *грамположительных бактерий*. *Грамотрицательные бактерии* с

тонким слоем пептидогликана (5–10%) в клеточной стенке после действия спирта утрачивают генцианвиолет и дополнительно окрашиваются фуксином в розовый цвет. Клеточные стенки у грамположительных и грамотрицательных прокариот резко различаются как по химическому составу (табл. 1.1), так и по ультраструктуре (рис. 1.5).

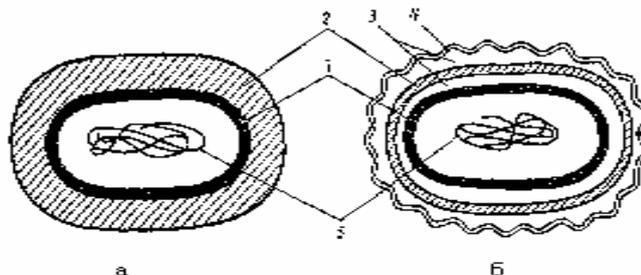


Рис. 1.5. Схематическое изображение клеточной стенки у грамположительных (а) и грамотрицательных (б) прокариот:

1 – цитоплазматическая мембрана; 2 – пептидогликан; 3 – периплазматическое пространство; 4 – наружная мембрана; 5 – ДНК

Кроме пептидогликана, в клеточной стенке грамположительных бактерий содержатся тейхоевые кислоты (полифосфатные соединения), в меньшем количестве – липиды, полисахариды, белки.

Таблица 1.1

Химический состав клеточных стенок грамположительных и грамотрицательных прокариот

Компоненты клеточной стенки	Грамположительные прокариоты	Грамотрицательные прокариоты	
		внутренний слой (пептидогликановый)	внешний слой (наружная клеточная мембрана)
Пептидогликан	+	+	–
Тейхоевые кислоты	+	–	–
Полисахариды	+	–	+
Белки	±	–	+
Липиды	±	–	+
Липополисахариды	–	–	+
Липопротеины	–	±	+

Грамотрицательные прокариоты имеют наружную мембрану, в состав которой входят липиды (22 %), белки, полисахариды, липопротеины.

Клеточная стенка у бактерий выполняет в основном формообразующую и защитную функции, обеспечивает ригидность, формирует капсулу, определяет способность клеток к адсорбции фагов.

Все бактерии, в зависимости от их отношения к окраске по Граму, делятся на грамположительные и грамотрицательные.

Методика окраски по Граму

1. На мазок кладут фильтровальную бумагу и наливают карболовый раствор генцианового фиолетового на 1–2 мин.

2. Снимают бумагу, сливают краситель и, не промывая мазок водой, наливают раствор Люголя на 1 мин.

3. Сливают раствор Люголя и обесцвечивают препарат в 96 %-м спирте в течение 30 сек.

4. Промывают водой.

5. Красят 1–2 мин водным раствором фуксина.

6. Промывают водой и высушивают.

В результате окраски грамположительные бактерии окрашиваются в фиолетовый цвет, грамотрицательные – в красный.

Причину различного отношения бактерий к окраске по Граму объясняют тем, что после обработки раствором Люголя образуется нерастворимый в спирте комплекс йода с генциановым фиолетовым. Этот комплекс у грамположительных бактерий, в связи со слабой проницаемостью их стенки, не может диффундировать, в то время как у грамотрицательных – легко удаляется при промывании их этанолом, а затем водой.

Бактерии, полностью лишенные клеточной стенки, называются **протопластами**, они имеют шаровидную форму, обладают способностью к делению, дыханию, синтезу белков, нуклеиновых кислот, ферментов. Протопласты являются неустойчивыми структурами, очень чувствительными к изменениям осмотического давления, механических воздействий и аэрации, не обладают способностью синтезировать составные части клеточной стенки, не подвергаются инфицированию вирусами бактерий (бактериофагами) и не обладают активной подвижностью.

Если под влиянием лизоцима и других факторов происходит частичное растворение клеточной стенки, то бактериальные клетки превращаются в сферические тела, получившие название **сферопластов**.

Под воздействием некоторых внешних факторов бактерии способны терять клеточную стенку, образуя L-формы (названы в честь института им. Д. Листера, где были впервые выделены); подобная трансформация может быть спонтанной (например, у хламидий) или индуцированной, например, под воздействием антибиотиков. Выделяют стабильные и нестабильные L-формы. Первые не способны к реверсии, а вторые реверсируют в исходные формы после удаления причинного фактора.

Цитоплазматическая мембрана

Цитоплазма бактериальной клетки ограничена от клеточной стенки тонкой полупроницаемой структурой толщиной 5–10 нм, называемой цитоплазматической мембраной (ЦПМ). ЦПМ состоит из двойного слоя фосфолипидов, пронизанных белковыми молекулами (рис. 1.6).

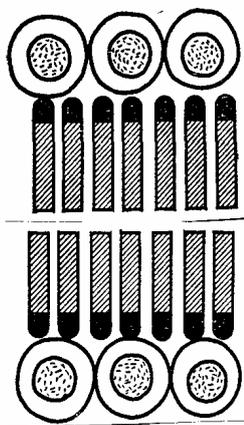


Рис.1.6. Строение плазматической мембраны

Два слоя фосфолипидных молекул, обращенных гидрофобными полюсами друг к другу и покрытых двумя слоями молекул глобулярного белка.

С ЦПМ связаны многие ферменты и белки, участвующие в переносе питательных веществ, а также ферменты и переносчики электронов конечных стадий биологического окисления (дегидрогеназы, цитохромная система, АТФ-аза). На ЦПМ локализуются ферменты, катализирующие синтез пептидогликана, белков клеточной стенки, собственных структур. Мембрана является также местом превращения энергии при фотосинтезе.

Периплазматическое пространство

Периплазматическое пространство (периплазма) представляет собой зону между клеточной стенкой и ЦПМ. Толщина периплазмы составляет около 10 нм, объем зависит от условий среды и прежде всего

от осмотических свойств раствора. Периплазма может включать до 20 % всей находящейся в клетке воды, в ней локализуются некоторые ферменты (фосфатазы, пермеазы, нуклеазы и др.) и транспортные белки – переносчики соответствующих субстратов.

Цитоплазма

Содержимое клетки, окруженное ЦПМ, составляет цитоплазму бактерий. Та часть цитоплазмы, которая имеет гомогенную коллоидную консистенцию и содержит растворимые РНК, ферменты, субстраты и продукты обмена веществ, обозначается как **цитозоль**. Другая часть цитоплазмы представлена различными структурными элементами: мезосомами, рибосомами, включениями, нуклеоидом, плазмидами.

Рибосомы – субмикроскопические рибонуклеопротеиновые гранулы диаметром 15–20 нм. В рибосомах находится примерно 80–85 % всей бактериальной РНК. Рибосомы прокариот имеют константу седиментации 70 S. Они построены из двух частиц: 30 S (малая субъединица) и 50 S (большая субъединица) (рис. 1.7).

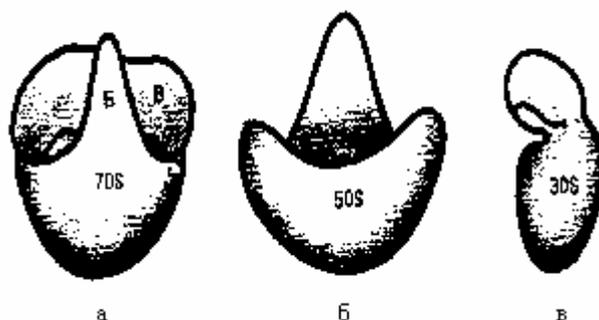


Рис. 1.7. Рибосома (а) и ее субчастицы – большая (б) и малая (в) Рибосомы служат местом синтеза белка.

Цитоплазматические включения

Нередко в цитоплазме бактерий обнаруживаются различные включения, которые образуются в процессе жизнедеятельности: капельки нейтральных липидов, воска, серы, гранулы гликогена, β -гидроксимасляной кислоты (особенно у рода *Bacillus*). Гликоген и β -гидроксимасляная кислота служат для бактерий запасным источником энергии. У некоторых бактерий в цитоплазме находятся кристаллы белковой природы, обладающие ядовитым действием на насекомых.

Некоторые бактерии способны накапливать фосфорную кислоту в виде гранул полифосфата (зерна волютина, метахроматические зерна). Они играют роль фосфатных депо и выявляются в виде плотных обра-

зований в форме шара или эллипса, располагающихся в основном у полюсов клетки. Обычно на полюсах бывает по одной грануле.

Нуклеоид

Нуклеоид – ядерный аппарат бактерий. Представлен молекулой ДНК, соответствующей одной хромосоме. Она замкнута, располагается в ядерной вакуоле, не имеет ограничивающей от цитоплазмы мембраны.

С ДНК связано небольшое количество РНК и РНК-полимеразы. ДНК свернута вокруг центрального стержня, состоящего из РНК, и представляет собой высокоупорядоченную компактную структуру. Хромосомы большинства прокариот имеют молекулярную массу в пределах $1-3 \times 10^9$, константу седиментации 1300-2000 S. Молекула ДНК включает $1,6 \times 10^7$ нуклеотидных пар. Различия в генетическом аппарате прокариотических и эукариотических клеток обуславливают его название: у первых – нуклеоид (образование, подобное ядру), в отличие от ядра у вторых.

В нуклеоиде бактерий содержится основная наследственная информация, которая реализуется в синтезе специфических белковых молекул. С ДНК бактериальной клетки связаны системы репликации, репарации, транскрипции и трансляции.

Нуклеоид в прокариотической клетке может быть выявлен в окрашенных препаратах с помощью светового или фазово-контрастного микроскопа.

У многих бактерий в цитоплазме обнаружены внехромосомные генетические элементы – плазмиды. Они представляют собой замкнутые в кольца двухцепочечные ДНК, состоящие из 1500–40000 пар нуклеотидов и содержащие до 100 генов.

Капсула

Капсула – слизистый слой клеточной стенки бактерий, состоящий из полисахаридов или полипептидов. Микрокапсулу (толщиной менее 0,2 мкм) способны формировать большинство бактерий.

Жгутики

Жгутики выполняют роль органа движения, позволяющего бактериям передвигаться со скоростью 20–60 мкм/сек. Бактерии могут иметь один или несколько жгутиков, располагающихся по всей поверхности тела либо собранных в пучки у одного полюса, у разных полюсов. Толщина жгутиков в среднем составляет 10–30 нм, а длина достигает 10–20 мкм.

Основу жгутика составляет длинная спиральная нить (фибрилла), которая у поверхности клеточной стенки переходит в утолщенную изогнутую структуру – крючок и прикрепляется к базальной грануле, вмонтированной в клеточную стенку и ЦПМ (рис. 1.8).

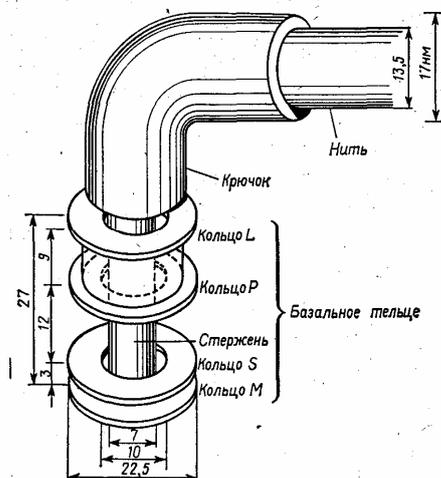


Рис. 1.8. Схематическая модель базального конца жгутика *E. coli*, основанная на электронных микрофотографиях выделенной органеллы

Базальные гранулы имеют диаметр около 40 нм и состоят из нескольких колец (одна пара – у грамположительных бактерий, четыре – у грамотрицательных прокариот). Удаление пептидогликанового слоя клеточной стенки ведет к потере способности бактерий к движению, хотя жгутики при этом остаются неповрежденными.

Жгутики почти полностью состоят из белка флагеллина с некоторым содержанием углеводов и РНК.

Споры

Некоторые бактерии в конце периода активного роста способны образовывать споры. Этому предшествует обеднение среды питательными веществами, изменение ее рН, накопление ядовитых продуктов метаболизма. Как правило, одна бактериальная клетка образует одну спору – локализация спор различна (центральная, терминальная, субтерминальная – рис. 1.9).

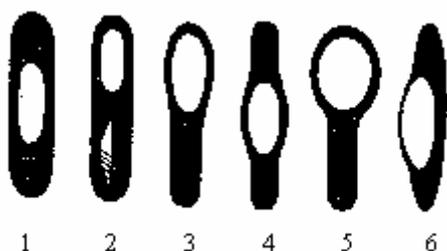


Рис. 1.9. Типичные формы спорообразующих клеток.

Если размеры спор не превышают поперечного размера палочковидной бактерии, то последняя называется **бациллой**. Когда диаметр споры больше – бактерии имеют форму веретена и носят название **кlostридий**.

По химическому составу различие спор от вегетативных клеток состоит лишь в количественном содержании химических соединений. Споры содержат меньше воды и больше липидов.

В состоянии споры микроорганизмы метаболически неактивны, выдерживают высокую температуру (140–150°C) и воздействие химических дезинфицирующих веществ, длительно сохраняются в окружающей среде.

Попадая в питательную среду, споры прорастают в вегетативные клетки. Процесс прорастания спор включает три стадии: активации, начальной стадии и стадии роста. К активирующим агентам, нарушающим состояние покоя, относят повышенную температуру, кислую реакцию среды, механические повреждения и др. Спора начинает поглощать воду и с помощью гидролитических ферментов разрушает многие собственные структурные компоненты. После разрушения наружных слоев наступает период формирования вегетативной клетки с активацией биосинтеза, заканчивающейся делением клетки.

1.1.4. Морфология микробов–эукариотов: дрожжевых и плесневых грибов

Грибы (тип *Mycota*, *Mycetes*, *Fungi*) представлены одноклеточными или многоклеточными эукариотами, которые по наличию хитина в оболочке, стероидов в цитоплазматической мембране и гликогена в цитоплазме напоминают клетки животного происхождения, а по наличию клеточной стенки, состоящей из полисахаридов, близких к целлюлозе; по способности к неограниченному росту, размножению спорами и неподвижностью в вегетативном состоянии – растения.

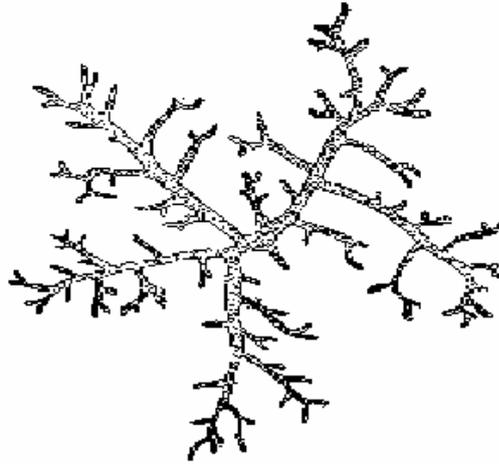


Рис. 1.10. Структура мицелия плесеней.

У грибов существует 2 типа роста: гифальный рост (гифомицеты) и дрожжевой рост (бластомицеты). Обычно вегетативное тело гифомицетов состоит из нитей толщиной около 5 мкм, сильно разветвленных и называемых **гифами**. Гифы либо не имеют поперечных перегородок (у низших грибов), либо разделены перегородками на клетки (у высших грибов). Совокупность гифов образует мицелий – грибницу (рис.1.10).

Мицелий может быть субстратный, образующийся в результате вставания гифов в питательную среду и воздушный, растущий на поверхности среды. Мицелий представляет ветвящиеся трубки, ветвление осуществляется боковыми выростами гиф. Переплетающиеся гифы с толстыми оболочками образуют склероции – округлые или неправильной формы образования размером от долей мм до нескольких см, предназначенные для выживания в неблагоприятных условиях (рис. 1.11).

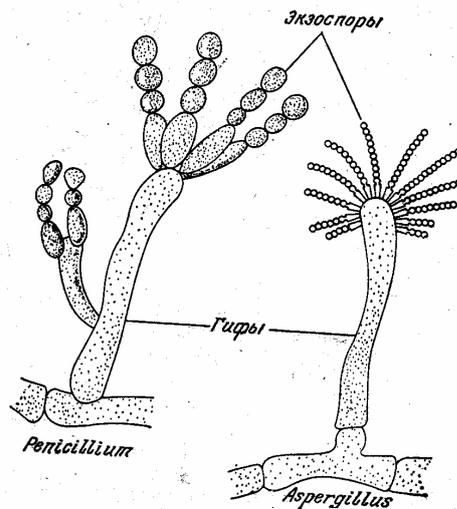


Рис. 1.11. Гифы *Aspergillus* и *Penicillium* двух промышленно важных плесеней

Кроме гифальных форм грибов, существуют и бластомицеты (дрожжевые и дрожжеподобные грибы). Они представляют собой сферические или грушевидные формы размером 3–15 мкм. Эти клетки содержат включения гликогена и липиды, они способны к почкованию, делению, в результате которого клетки не распадаются, а образуют псевдомицелий.

Для многих видов грибов может быть характерен диморфизм, т. е. гифальная форма роста может переходить в дрожжеподобную.

Ни один из вышеописанных морфологических элементов не является характерным для того или иного гриба. Комплексом разнообразных клеточных элементов определяется большой полиморфизм грибов в культурах на различных питательных средах. Тканевые формы грибов обычно представлены довольно однообразными спорами или мицелием, совсем не похожими на культуральные элементы грибов.

В биотехнологии грибы используются как продуценты органических кислот (лимонной – *Aspergillus niger*), ферментов (амилаз – *Aspergillus oryzae*; пектиназ – *Aspergillus awanori*; каталазы – *Penicillium vitale* и др.), липидов, антибиотиков (пенициллина – *Penicillium notatum*; гризеофульвина – *Penicillium griseofulvum*), а также используются в пищевой промышленности (например, для созревания сыров рокфор и камамбер, получения вина, спирта, при хлебопечении и т. д.).

1.1.5. Методы микроскопического исследования микроорганизмов

Мельчайшие размеры микроорганизмов обуславливают использование для изучения морфологии бактерий точных оптических приборов – микроскопов. Наиболее часто применяются светлорольная микроскопия, микроскопия в темном поле, фазово-контрастная и люминесцентная микроскопия. Для специальных микробиологических исследований используется электронная микроскопия.

Светлорольная микроскопия

Светлорольная микроскопия осуществляется с помощью обычного светового микроскопа, основной частью которого является объектив. На оправе объективов обозначается увеличение: 8, 10, 20, 40, 90.

При исследовании микробов применяется иммерсионная система (объектив). Иммерсионный объектив погружают в каплю кедрового масла, нанесенного на препарат. Кедровое масло имеет такой же коэффициент преломления, как и стекло, и этим достигается наименьшее рассеивание световых лучей (рис. 1.12).

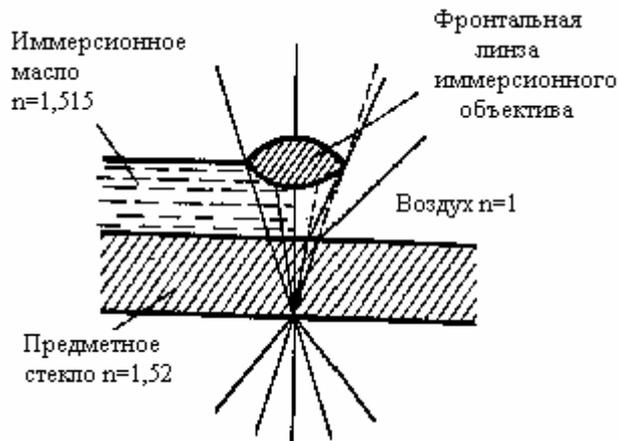


Рис. 1.12. Ход лучей в иммерсионном объективе

Изображение, получаемое в объективе, увеличивает окуляр, состоящий из двух линз. В отечественных микроскопах применяются окуляры с увеличением 7, 10, 15 (рис. 1.13). Общее увеличение микроскопа определяется произведением увеличения объектива на увеличение окуляра. В микробиологии обычно используются увеличения в 900–1000 раз. Качество микроскопа зависит не от степени увеличения, а от его разрешающей способности.

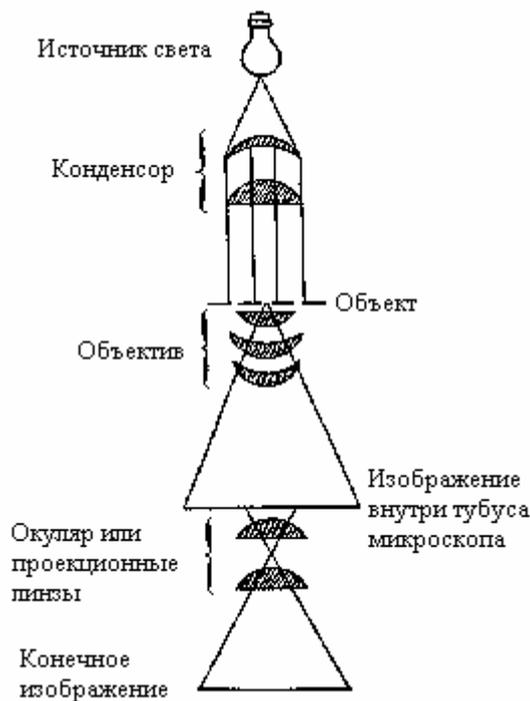


Рис. 1.13. Схема сложного светового микроскопа для наблюдения в светлом поле, отрегулированного для освещения по Келеру

Под этим надо понимать наименьшее расстояние между двумя точками препарата, при котором они еще четко различимы под микроскопом. Разрешающая способность обычных световых микроскопов с иммерсионной системой равна 0,2 мкм.

Темнопольная микроскопия

Микроскопия в темном поле зрения основана на следующем принципе (рис. 1.14). Лучи освещают объект не снизу, а сбоку и не попадают в глаза наблюдателя: поле зрения остается темным, а объект на его фоне оказывается светящимся. Это достигается с помощью специального конденсора (параболоид) или обычного конденсора, прикрытого в центре кружком черной бумаги.

Препараты для темнопольной микроскопии готовят по типу «висячей» и «раздавленной» капли. При приготовлении препарата «раздавленная» капля исследуемый материал (бактериальную культуру в физиологическом растворе) наносят на предметное стекло, которое покрывают покровным стеклом. Капля материала заполняет все пространство между покровным и предметным стеклом, образуя ровный слой. Для приготовления «висячей» капли необходимо использовать специальные предметные стекла с углублением в центре и покровные стекла. На середину покровного стекла наносят исследуемый материал. Края углубления на предметном стекле смазывают вазелином, и им накрывают покровное стекло так, чтобы капля находилась против центра углубления. Затем переворачивают препарат покровным стеклом вверх. Темнопольная микроскопия используется для изучения живых неокрашенных микроорганизмов.

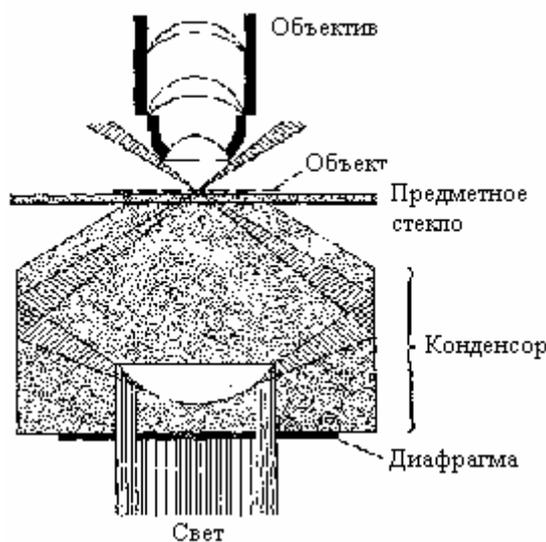


Рис. 1.14. Схема микроскопа для наблюдения в темном поле.

Фазово-контрастная микроскопия

При прохождении пучка света через неокрашенный объект изменяется лишь фаза колебания световой волны, что не воспринимается человеческим глазом. Чтобы изображение стало контрастным, необходимо превратить фазовые изменения световой волны в видимые амплитудные. Это достигается с помощью фазово-контрастного конденсора и фазового объектива (рис. 1.15).

Фазово-контрастный конденсор представляет собой обычный объектив с револьвером и набором кольцевых диафрагм для каждого объектива. Фазовый объектив снабжен фазовой пластинкой, которую получают нанесением солей редкоземельных элементов на объектив. Изображение кольцевой диафрагмы совпадает с кольцом фазовой пластинки соответствующего объектива.

Фазово-контрастная микроскопия значительно повышает контрастность объекта и используется для изучения нативных препаратов.

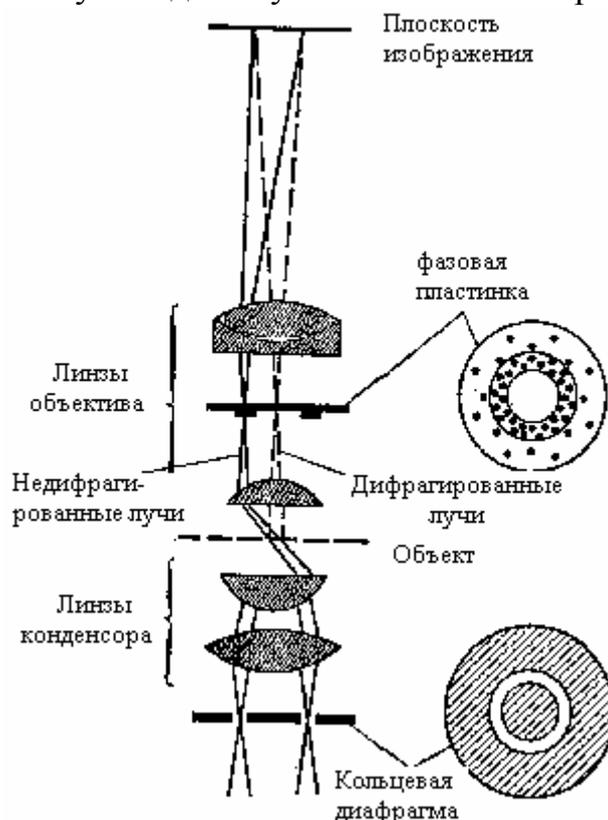


Рис. 1.15. Схема фазово-контрастного микроскопа.

Люминесцентная микроскопия

Люминесцентная микроскопия основана на способности некоторых веществ под влиянием падающего на них света испускать лучи с другой (обычно большей) длиной волны (флюоресцировать). Такие вещества

называют флюорохромами (акридиновый желтый, родамин и др.). Объект, обработанный флюорохромом, при освещении ультрафиолетовыми лучами приобретает яркий цвет в темном поле зрения.

Основной частью люминесцентного микроскопа является осветитель, имеющий лампу ультрафиолетового цвета и систему фильтров к нему (рис. 1.16). Очень важно использование нефлуоресцентного иммерсионного масла.

Люминесцентная микроскопия в практической микробиологии используется для индикации и идентификации возбудителей инфекционных заболеваний.

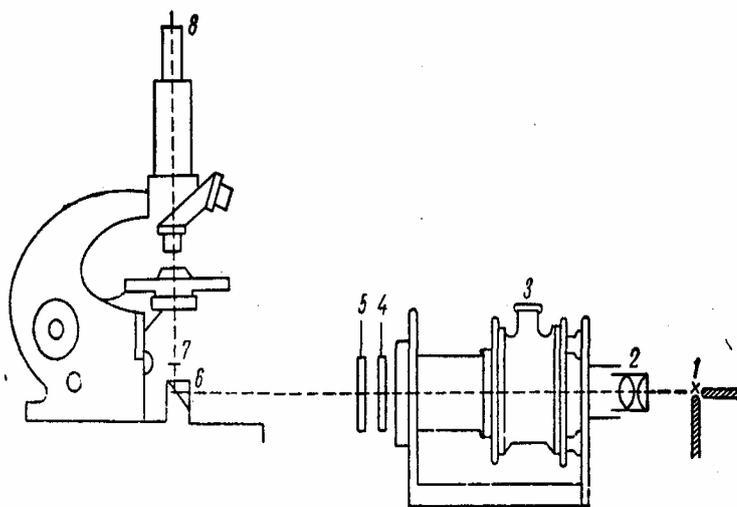


Рис. 1.16. Схематическое изображение флуоресцентного микроскопа:
1 – дуговая лампа; 2 – кварцевый коллектор; 3 – кювета, заполненная раствором сернокислой меди; 4 – передняя часть коллектора; 5 – ультрафиолетовый фильтр; 6 – призма; 7 – пластинка из уранового стекла; 8 – окулярный фильтр, поглощающий ультрафиолетовые лучи.

Электронная микроскопия

Возможности оптических микроскопов ограничены слишком большой длиной волны видимого света (6000 А). Объекты, размеры которых меньше этой величины, находятся за пределами разрешающей способности светового микроскопа. В электронном микроскопе вместо световых волн используются электронные лучи, обладающие чрезвычайно малой длиной волны и высокой разрешающей способностью (рис. 1.17).

В качестве источника электронных лучей применяют электронную пушку, основой которой служит вольфрамовая нить, нагретая электрическим током. Между вольфрамовой нитью и анодом на пути электронов находится электрическое поле высокого напряжения. Электронный

поток вызывает свечение фосфоресцирующего экрана. Проходя через объект, части которого имеют различную толщину, электроны будут соответственно задерживаться, что проявится на экране участками затемнения. Объект приобретает контрастность.

Препараты для электронной микроскопии готовят на тончайших коллоидных пленках, исследуют объекты после их высушивания («нативные препараты»), напыления при помощи тяжелых металлов, ультратонких срезов метода реплик и др.

С помощью электронной микроскопии можно обнаружить самые мелкие структуры, получить увеличение до 200 000 и увидеть объекты размером 0,002 мкм.

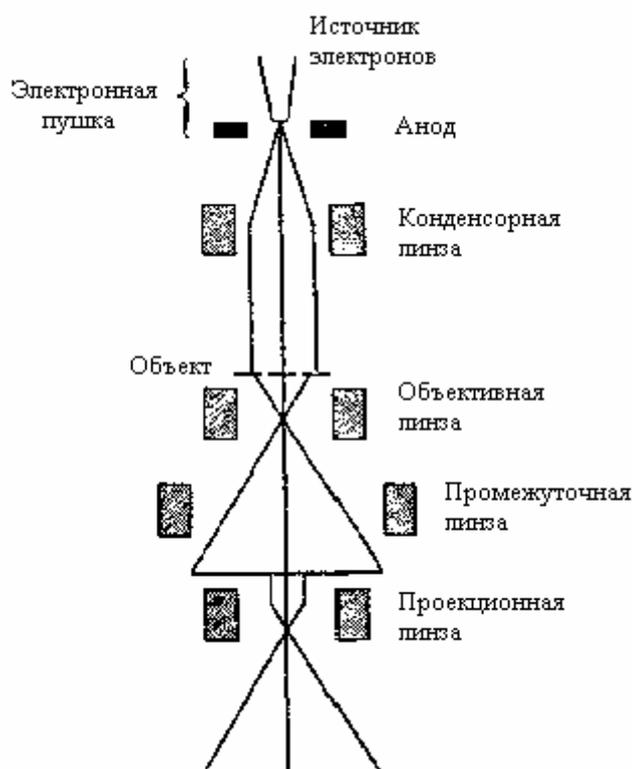


Рис. 1.17. Схема трансмиссионного электронного микроскопа.

1.2. ФИЗИОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

1.2.1. Питание бактерий

Бактерии, как и все другие организмы, для существования и воспроизводства себе подобных нуждаются в постоянном обмене веществ с окружающей средой. Превращения веществ в клетке (**метаболизм**) представлены противоположными, но и взаимосвязанными процессами, направленными, во-первых, на распад сложных питательных веществ на более простые, это звено метаболизма называется **катаболизмом**, а, во-

вторых, на превращения простых веществ в ходе реакций промежуточного обмена в более сложные низкомолекулярные соединения, из которых далее синтезируются полимерные макромолекулы. Это, второе, звено метаболизма называется **анаболизмом**.

Для осуществления процессов метаболизма питательные вещества проникают в бактериальную клетку извне через цитоплазматическую мембрану, при этом клеточная стенка не служит препятствием для прохождения ионов и мелких молекул. Мембранные белки – **пермеазы** или **транслоказы** – обладают ферментативными свойствами и помогают осуществлять транспорт веществ в клетку. Различают три механизма транспорта, два из них обеспечивают только передачу, но не накопление веществ в клетке. Это простая или **пассивная** диффузия и **облегченная** диффузия. Простая диффузия не специфична, для нее имеет значение только величина молекул. Путем простой диффузии в клетку проникают чужеродные для нее вещества – яды, ингибиторы, лекарственные препараты. При облегченной диффузии в клетку проникают те молекулы, концентрация которых в цитоплазме ниже, чем в окружающей среде. Этот процесс осуществляется благодаря субстрат-специфической пермеазе. Затрат энергии при этом не происходит. Третий механизм питания клетки – **активный транспорт**. Он тоже происходит с участием субстратных белков ферментов, но при этом затрачивается энергия, а проникшие в клетку вещества накапливаются в ней. Молекулы, проникшие в клетку путем активного транспорта через мембрану, претерпевают химические превращения, например фосфорилирование.

Выход продуктов метаболизма из бактериальной клетки в окружающую среду также осуществляется путем неконтролируемой диффузии или при участии транспортных систем – в тех случаях, когда в результате процессов брожения, неполного окисления или нарушений метаболизма вещества накапливаются в клетке в количествах, превышающих физиологическую норму.

Для роста и размножения бактерий, а следовательно и для их питания необходимы различные химические соединения, растворенные в воде. По количественному вкладу в построение клетки различают макро- и микроэлементы. К макроэлементам относят 10 элементов таблицы Менделеева: углерод, водород, кислород, азот, серу, калий, кальций, фосфор, магний, железо. Микроэлементы нужны бактериям в очень малых, следовых, количествах: они представлены марганцем, молибденом, цинком, медью, кобальтом, никелем, хлором, бромом и некоторыми другими металлами и неметаллами. Большинство из них содержится в виде примесей в макроэлементах или может попадать в питательные

среды из стеклянной посуды, воды или воздуха. Некоторые бактерии могут обходиться и без микроэлементов.

По потребности в углеводе бактерии делятся на две большие группы: **автотрофы** (или **литотрофы**) и **гетеротрофы** (или **органотрофы**).

Бактерии-автотрофы способны получать энергию путем окисления неорганических соединений. Они, как правило, используют CO_2 как основной источник, содержащий углерод в наиболее окисленной форме. Поэтому при культивировании автотрофов необходимо обеспечить клетки углекислотой, так как концентрация CO_2 в воздухе не превышает 0,03 % и ее поступление в среду за счет диффузии недостаточно для роста микроорганизмов. В питательные среды для культивирования автотрофов вносят карбонат кальция (CaCO_3) или бикарбонат натрия (NaHCO_3). Иногда через питательную среду продувают воздух, обогащенный 1–5 % CO_2 .

Бактерии-гетеротрофы получают углерод из органических соединений. В зависимости от индивидуальных особенностей микроорганизмов источником углерода могут быть разные органические соединения – спирты, углеводы, ароматические соединения, органические кислоты.

Гетеротрофы, в свою очередь, разделяются на **сапрофитов**, живущих за счет органических соединений, поступающих в бактериальную клетку из внешней среды, и **паразитов**, способных утилизировать только продукты метаболизма внутри живой клетки. Паразитизм может быть факультативным и абсолютным (или облигатным).

Для роста микроорганизмов также необходим азот, который входит в состав органических соединений или солей в разной степени восстановления. Это могут быть соли аммония, нитраты или отдельные аминокислоты. Для удовлетворения потребности бактерий в азоте используют также продукты неполного расщепления белков животного происхождения – гидролизаты, пептоны и сложные белковые смеси – нативную сыворотку животных, асцитическую жидкость и др.

Кроме углерода, азота и других химических элементов, многие бактерии нуждаются в факторах роста, к которым относятся витамины, основания нуклеиновых кислот и другие биологически активные вещества. По этому признаку микроорганизмы можно разделить на две группы: **ауксотрофы**, для которых в среде необходимо наличие одного или нескольких факторов роста, и **прототрофы**, они в факторах роста не нуждаются.

В среде обитания бактерий кроме биосинтетического должен находиться и энергетический материал. По способу получения энергии бактерии также принято делить на две группы: **хемотрофы** и **фототрофы**. Хемотрофы используют энергию окисления различных соединений. В

зависимости от окисляемого субстрата среди хемотрофных организмов выделяют **хемолитотрофы** и **хемоорганотрофы**. Фототрофы для удовлетворения энергетических потребностей используют энергию света.

1.2.2. Питательные среды

В лабораторных или производственных условиях бактерии выращивают (культивируют) на средах, которые должны удовлетворять потребности бактерий в питательных веществах, иметь адекватное значение величины рН, изотоничность и быть стерильными, а по возможности и прозрачными. Специфичность большинства питательных сред определяют соединения углерода и азота, но так как конструктивные и энергетические процессы микроорганизмов разнообразны, неодинаковы и их потребности в питательных веществах.

Питательные среды принято делить на несколько групп: среды, которые отличаются по составу и происхождению, физическому состоянию (или консистенции) и функциональному (или целевому) назначению.

По происхождению среды бывают **естественными** (натуральными) и искусственными (синтетическими). К естественным средам относят те, в состав которых входят продукты растительного или животного происхождения. Они содержат все компоненты, необходимые для роста и развития бактерий, но имеют непостоянный химический состав, т. е. они нестабильны. Поэтому такие питательные среды не пригодны для изучения метаболизма бактерий, а используются, в основном, для накопления биомассы, поддержания культур бактерий в жизнеспособном состоянии и для диагностических целей, например, для выделений чистых культур бактерий. К естественным средам относятся молоко, кровь и сыворотка крови, отвары и экстракты из природных субстратов, пептонная и мясная вода, мясо-пептонные бульон и агар, дрожжевые экстракты, картофельные и яичные среды.

Синтетические (искусственные) среды имеют определенный химический состав и точное количественное содержание питательных веществ. Их используют для изучения метаболизма бактерий, исследования физиологии и биохимии микроорганизмов. Примером синтетической среды могут служить среды Козера и Симмонса, используемые для изучения способности бактерий утилизировать цитраты. В состав этих сред, наряду с другими солями, входят цитрат натрия и индикатор.

В практике микробиологии, как правило, используются комбинированные питательные среды, в которых сочетаются естественные ком-

поненты с неорганическими солями. Примерами таких сред являются агар Цейсслера, в состав которого входит МПА, кровь и сахар, среды Гисса, содержащие пептон, агар, один из сахаров и индикатор, среда Раппопорта, состоящая из желчного бульона, глюкозы и индикатора.

Среды можно по составу разделить также на **простые** и **сложные**. К простым относятся мясная и пептонная вода, мясо-пептонные бульон и агар. Добавление к таким средам одного или нескольких ингредиентов – углеводов, крови, сыворотки и других составляющих делают их сложными.

По физическому состоянию питательные среды могут быть **жидкими, полужидкими, плотными** или **твердыми, сыпучими** или **сухими**. Жидкие среды представлены, как правило, водными растворами необходимых для жизни веществ. Их используют для накопления биомассы, обогащения культур бактерий, изучения метаболизма. Полужидкие и плотные питательные среды получают из жидких, добавляя к ним агар или желатин. Концентрация агара для полужидких сред – 0,5–0,7 %, а для плотных – 1,5–2 %. Полисахарид агар получают из некоторых видов морских водорослей, его высушивают и хранят в виде пластин или порошка. Бактерии не используют агар в качестве субстрата и поэтому состав плотной питательной среды зависит от состава жидкой среды, к которой добавлен агар. Агар плавится примерно при температуре 100 °С и застывает при 40 °С. Агаризированные среды разливают в пробирки или чашки Петри в расплавленном состоянии, а затем охлаждают. Для уплотнения сред иногда используют желатин, добавляя его к жидким средам в 10–20-ой % концентрации. Применение желатина ограничено тем, что он разжижается протеолитическими ферментами бактерий и его применяют, в основном, в питательных средах для диагностических целей. Для уплотнения сред используют, кроме того, силикагель и каррагенан, получаемый из красных морских водорослей. Пластины геля, пропитанные питательной средой, используют для культивирования бактерий-автотрофов.

Сухие питательные среды представляют смеси составляющих питательных сред определенного состава. Перед использованием их растворяют в воде в соответствии с инструкцией, указанной на этикетке, устанавливают необходимое значение рН и стерилизуют. Применение сухих питательных сред облегчает работу по приготовлению сложных сред в лабораториях.

По целевому назначению питательные среды делят на несколько групп:

1) **основные**, или **универсальные простые среды**, например, МПА, МПБ; на них могут расти многие виды неприхотливых микроорганизмов;

2) **специальные**, или **сложные среды**, их используют для культивирования тех бактерий, которые не могут расти на основных простых средах; в состав специальных сред вводят, например, углеводы.

Среди сложных сред можно выделить **избирательные** (или **элективные**) среды. Они предназначены для выделения и культивирования определенного вида бактерий из материала, содержащего большое количество разных видов микроорганизмов. В сложном составе таких сред содержатся вещества, ингибирующие рост посторонней микрофлоры, но не влияющие на жизнедеятельность искомого вида бактерий. Такими веществами могут быть анилиновые красители, желчь, хлористый натрий в концентрации выше 1%.

Разновидность элективных – **селективные питательные среды**. В их состав входят не только вещества, подавляющие рост отдельных групп микроорганизмов, но и стимуляторы роста отдельных видов бактерий.

Питательные среды стерилизуют в автоклавах при разных режимах, которые зависят от состава среды или, если питательные среды содержат термолабильные компоненты, путем стерилизующей фильтрации.

1.2.3. Условия культивирования бактерий

Для роста бактерий, кроме состава питательной среды, имеют значение кислотность среды, аэрация, температура, свет и влажность. Большинство бактерий растет при рН 6,8–8,0, т. е. в нейтральной среде. Поддержание нейтрального значения рН, особенно важно для кислотопродуцирующих бактерий. В процессе промышленного культивирования бактерий в больших объемах рН среды регулируется автоматически добавлением растворов бикарбоната натрия или щелочей.

Газовый состав среды также важен для бактерий. Значительная часть из них нуждается в постоянном притоке молекулярного кислорода. Такие микроорганизмы объединены в группу облигатных аэробов. Меньшая часть бактерий – облигатные анаэробы – способны развиваться только в отсутствие кислорода. Однако большинство бактерий – факультативные анаэробы, они растут как в присутствии кислорода, так и без него. Для бактерий, культивируемых на плотных питательных средах или в небольших объемах жидких сред, достаточно кислорода, при-

сутствующего в атмосфере. Для культивирования бактерий-аэробов в промышленных масштабах требуется принудительная аэрация путем продувания кислорода в реактор или ферментатор с культурой, а для культивирования анаэробов – создание бескислородных условий.

Большинство известных микроорганизмов относится к мезофилам, температурный оптимум для которых лежит в интервале 25–37°C. Термофилы способны расти при 45–90°C, а психрофилы остаются жизнеспособными при 5–10°C. Отклонение температурного режима от оптимального неблагоприятно сказывается на жизнедеятельности бактерий. Поэтому культивирование их осуществляют в специальных шкафах-термостатах или термостатированных комнатах, где поддерживается оптимальная заданная температура.

При культивировании бактерий в лабораторных и производственных условиях, для получения больших количеств биотехнологического продукта – вакцин, диагностикумов, биологически активных веществ, используют две различные технологические системы: **постоянное** (или **периодическое**) и **непрерывное** (или **проточное**) культивирование.

В первом случае размножение бактерий происходит в закрытом сосуде до тех пор, пока плотность клеточной популяции не достигнет критической концентрации и не будут исчерпаны запасы питательной среды, а продукты метаболизма не начнут проявлять токсические свойства. В такой культуре размножение бактерий ограничено определенным числом популяций. В промышленных условиях часто используют второй вариант – проточное (или непрерывное) культивирование. При этом в реактор или ферментатор непрерывно, при перемешивании, поступает свежая питательная среда, а продукты метаболизма и накопившаяся бактериальная масса автоматически удаляются. Такое культивирование можно осуществлять в специальных аппаратах: хемостате и турбидостате, где необходимый объем питательной среды поступает автоматически, в зависимости от концентрации бактериальных клеток.

Изотоничность питательной среды зависит от содержания неорганических солей. Для большинства бактерий изотоничной считается среда, концентрация натрия хлорида в которой составляет 0,5–0,6 %.

Время выращивания (культивирования) бактерий зависит от времени очередного деления клеток данной популяции.

1.2.4. Дыхание бактерий

Для осуществления биологических синтезов, помимо питательных веществ, бактерии нуждаются в определенном количестве энергии.

Универсальным аккумулятором химической энергии в клетке является аденозинтрифосфорная кислота (АТФ), которая образуется в результате дыхания, биологического окисления, основанного на окислительно-восстановительных реакциях или брожении. Молекулы АТФ синтезируются в результате переноса электрона от первичного донора к конечному акцептору. Конечным акцептором электронов чаще всего выступает молекулярный кислород O_2 , и тогда осуществляется аэробное дыхание. Если в качестве акцептора электронов выступают неорганические соединения (NO_2 , SO_4 , SO_3), возникает анаэробное дыхание.

В том случае, когда продукты органического субстрата служат одновременно и донорами и акцепторами водорода, метаболический процесс называется *брожением* (ферментацией).

По потребности в кислороде бактерии можно разделить на 5 групп:

1. Строгие (облигатные) аэробы, рост этих микроорганизмов прекращается в отсутствие O_2 .

2. Строгие (облигатные) анаэробы не переносят доступа воздуха, так как образующиеся токсические производные кислорода (перекись водорода, супероксидный и гидроксильный радикалы, синглетный кислород) губительны для самих же бактерий из-за отсутствия у них ферментов (каталазы, пероксидазы, супероксиддисмутазы), разрушающих эти токсические продукты.

3. Факультативные анаэробы – наиболее обширная группа патогенных микроорганизмов, которые способны использовать в качестве акцепторов электронов как молекулярный кислород, так и органические соединения, а так же переключатся на процесс брожения в отсутствие молекулярного кислорода.

4. Микроаэрофильные бактерии хорошо растут при сниженном парциальном давлении кислорода, но при повышенном содержании CO_2 .

5. Аэрофилы нуждаются в повышенном содержании кислорода.

1.2.5. Ферменты бактерий

Питание микроорганизмов осуществляется благодаря наличию в клетке различных ферментов, катализирующих все жизненно необходимые реакции. Ферменты – это биологические катализаторы белковой природы. Микробная клетка, подобно клеткам высших организмов, оснащена достаточно активным ферментативным аппаратом. Ферменты микроорганизмов обладают теми же свойствами и функциями, что и

ферменты высших организмов. В соответствии с катализирующими реакциями все ферменты разделяют на шесть классов:

1. Оксидоредуктазы – катализируют реакции окисления-восстановления.

2. Трансферазы – катализируют реакции переноса различных групп от донора к акцептору.

3. Гидролазы – катализируют разрыв связей в субстратах с присоединением воды.

4. Лиазы – катализируют реакции разрыва связей в субстрате без присоединения воды или окисления.

5. Изомеразы – катализируют превращения в пределах одной молекулы (внутримолекулярные перестройки).

6. Лигазы (синтетазы) – катализируют присоединение двух молекул с использованием энергии фосфатных связей.

Несмотря на малые размеры микробной клетки, распределение в ней ферментов строго упорядочено. Ферменты энергетического обмена и транспорта питательных веществ локализованы в цитоплазматической мембране и ее производных. Ферменты белкового синтеза связаны с рибосомами. Многие ферменты не связаны с определенными структурами клетки, а находятся в цитоплазме в растворенном виде.

Ферменты бактерий подразделяются на экзо- и эндоферменты. Эндоферменты функционируют только внутри клетки. Они катализируют реакции биосинтеза и энергетического обмена. Экзоферменты выделяются клеткой в среду и катализируют реакции гидролиза сложных органических соединений на более простые, доступные для ассимиляции микробной клеткой. К ним относятся гидролитические ферменты, играющие исключительно важную роль в питании микроорганизмов.

Известны ферменты, которые получили название *аллостерических*. Кроме активного центра, у них имеется регуляторный, или аллостерический центр, который в молекуле фермента пространственно разделен с активным центром. Аллостерическим (от греч. *allos* – иной, чужой) он называется потому, что молекулы, связывающиеся с этим центром, по строению (стерически) не похожи на субстрат, но оказывают влияние на связывание и превращение субстрата в активном центре, изменяя его конфигурацию. Молекула фермента может иметь несколько аллостерических центров. Вещества, связывающиеся с аллостерическим центром, называют *аллостерическими эффекторами*. Они влияют через аллостерический центр на функцию активного центра: или облегчают ее, или затрудняют. Соответственно аллостерические эффекторы называются *положительными* (активаторы) или *отрицательными* (ингибиторы). Аллостерические ферменты играют важную роль в тонкой регуляции

метаболизма бактерий. Поскольку практически все реакции в клетке катализируются ферментами, регуляция метаболизма сводится к регуляции интенсивности ферментативных реакций.

Ферменты микроорганизмов, такие, как лигазы и рестриктазы, нашли широкое применение в биотехнологии, в том числе в генетической инженерии, для получения различных биологически активных веществ, гибридом, продуцирующих моноклональные антитела, а также ряда продуктов в легкой и пищевой промышленности.

Ферменты микроорганизмов характеризуют их биологические свойства и поэтому их исследуют с целью идентификации бактерий. В зависимости от субстрата гидролитические ферменты принято делить на две большие группы:

1 – гидролитические (или сахаролитические) ферменты, субстратом для которых являются различные сахара, а продуктами их расщепления – кислоты, спирты, альдегиды, H_2O и CO_2 ;

2 – протеолитические ферменты, расщепляющие белки с образованием полипептидов, аминокислот, аммиака, индола, сероводорода.

Для изучения активности ферментов при идентификации микроорганизмов широко используют дифференциально-диагностические среды, в состав которых входят определенные субстраты – сахара или белки.

1.2.6. Культуральные свойства бактерий

К культуральным (или макроморфологическим) свойствам относятся характерные особенности роста микроорганизмов на плотных и жидких питательных средах. На поверхности плотных питательных сред, в зависимости от посева, микроорганизмы могут расти в виде колоний, штриха или сплошного газона.

Колонией называют изолированное скопление клеток одного вида, выросших из одной клетки (клон клеток). В зависимости от того, где растет микроорганизм (на поверхности плотной питательной среды или в толще ее), различают поверхностные, глубинные и донные колонии.

Колонии, выросшие на поверхности среды, отличаются разнообразием: они видоспецифичны и их изучение используется для определения видовой принадлежности исследуемой культуры.

При описании колоний учитывают следующие признаки:

1) форму колонии – округлая, амебовидная, ризоидная, неправильная и т. д.;

2) размер (диаметр) колонии – очень мелкие (точечные) (0,1–0,5 мм), мелкие (0,5–3 мм), средних размеров (3–5 мм) и крупные (более 5 мм в диаметре);

3) поверхность колонии – гладкая, шероховатая, складчатая, морщинистая, с концентрическими кругами или радиально исчерченная;

4) профиль колонии – плоский, выпуклый, конусовидный, кратерообразный и т. д.;

5) прозрачность – тусклая, матовая, блестящая, прозрачная, мучнистая;

6) цвет колонии (пигмент) – бесцветная или пигментированная (белая, желтая, золотистая, красная, черная), особо отмечают выделение пигмента в среду с ее окрашиванием;

7) край колонии – ровный, волнистый, зубчатый, бахромчатый и т. д.;

8) структуру колонии – однородная, мелко- или крупнозернистая, струйчатая; край и структуру колонии определяют с помощью лупы или на малом увеличении микроскопа, поместив чашку Петри с посевом на столик микроскопа крышкой вниз;

9) консистенцию колонии; определяют прикасаясь к поверхности петлей: колония может быть плотной, мягкой, врастающей в агар, слизистой (тянется за петлей), хрупкой (легко ломается при соприкосновении с петлей).

Глубинные колонии чаще всего похожи на более или менее сплюснутые чечевички (форма овалов с заостренными концами), иногда комочки ваты с нитевидными выростами в питательную среду. Образование глубинных колоний часто сопровождается разрывом плотной среды, если микроорганизмы выделяют газ.

Донные колонии имеют обычно вид тонких прозрачных пленок, стелющихся по дну.

Особенности колонии могут изменяться с возрастом, они зависят от состава среды и температуры культивирования.

Рост микроорганизмов на жидких питательных средах учитывают, используя четырех–семисуточные культуры, выращенные в стационарных условиях.

В жидких питательных средах при росте микроорганизмов наблюдается помутнение среды, образование пленки или осадка.

При росте на полужидких (0,5–0,7 % агара) питательных средах подвижные микробы вызывают выраженное помутнение, неподвижные формы растут только по ходу посева уколом в среду.

Нередко рост микробов сопровождается появлением запаха, пигментацией среды, выделением газа. Характерный запах культур некото-

рых видов бактерий связан с образованием различных эфиров (уксусно-этилового, уксусноамилового и др.), индола, меркаптана, сероводорода, скатола, аммиака, масляной кислоты.

Способность образовывать пигменты присуща многим видам микроорганизмов. Химическая природа пигментов разнообразна: каротиноиды, антоцианы, меланины. Если пигмент нерастворим в воде, окрашивается только культуральный налет; если же он растворим, окрашивается и питательная среда. Считается, что пигменты защищают бактерии от губительного действия солнечных лучей, поэтому в воздухе так много пигментированных бактерий, кроме того, пигменты участвуют в обмене веществ этих микроорганизмов.

В природе существуют так называемые фосфоресцирующие бактерии, культуры которых светятся в темноте зеленовато-голубоватым или желтоватым светом. Такие бактерии встречаются главным образом в речной или морской воде. К светящимся бактериям – фотобактериям – относятся аэробные бактерии (вибрионы, кокки, палочки).

1.2.7. Выделение чистых культур микроорганизмов

Чистой культурой называют такую культуру, которая содержит микроорганизмы одного вида. Выделение чистых культур бактерий – обязательный этап бактериологического исследования в лабораторной практике, в изучении микробной загрязненности различных объектов окружающей среды, и в целом при любой работе с микроорганизмами. Исследуемый материал (вода, почва, воздух, пищевые продукты или другие объекты) обычно содержит ассоциации микробов.

Выделение чистой культуры позволяет изучить морфологические, культуральные, биохимические, антигенные и другие признаки, по совокупности которых определяется видовая и типовая принадлежность возбудителя, т. е. производится его идентификация.

Для выделения чистых культур микроорганизмов используют методы, которые можно разделить на несколько групп:

1. Метод Пастера – последовательное разведение исследуемого материала в жидкой питательной среде до концентрации одной клетки в объеме (имеет историческое значение).

2. Метод Коха («пластинчатые разводки») – последовательное разведение исследуемого материала в расплавленном агаре (температура 48–50 °С), с последующим разливом в чашки Петри, где агар застывает. Высевы делают, как правило, из трех-четырех последних разведений, где бактерий становится мало и в дальнейшем при росте на чашках

Петри появляются изолированные колонии, образующиеся из одной исходной материнской клетки. Из изолированных колоний в глубине агар получают чистую культуру бактерий пересевом на свежие среды.

3. Метод Шукевича – применяется для получения чистой культуры протей и других микроорганизмов, обладающих «ползущим» ростом. Посев исследуемого материала производят в конденсационную воду у основания скошенного агара. Подвижные микробы (протей) способны подниматься вверх по скошенному агару, неподвижные формы остаются расти внизу, на месте посева. Пересевая верхние края культуры, можно получить чистую культуру.

4. Метод Дригальского – широко применяется в бактериологической практике, при этом исследуемый материал разводят в пробирке стерильным физиологическим раствором или бульоном. Одну каплю материала вносят в первую чашку и стерильным стеклянным шпателем распределяют по поверхности среды. Затем этим же шпателем (не прожигая его в пламени горелки) делают такой же посев во второй и третьей чашках. С каждым посевом бактерий на шпателе остается все меньше и меньше и, при посеве на третью чашку, бактерии будут распределяться по поверхности питательной среды отдельно друг от друга. Через 1–7 суток выдерживания чашек в термостате (в зависимости от скорости роста микроорганизмов) на третьей чашке каждая бактерия дает клон клеток, образуя изолированную колонию, которую пересевают на скошенный агар с целью накопления чистой культуры.

5. Метод Вейнберга. Особые трудности возникают при выделении чистых культур облигатных анаэробов. Если контакт с молекулярным кислородом не вызывает сразу же гибели клеток, то посев производят по методу Дригальского, но после этого чашки сразу помещают в анаэрогат. Однако чаще пользуются методом разведения. Сущность его заключается в том, что разведение исследуемого материала проводят в расплавленной и охлажденной до 45–50 °С агаризированной питательной среде. Делают 6–10 последовательных разведений, затем среду в пробирках быстро охлаждают и заливают поверхность слоем смеси парафина и вазелинового масла, чтобы помешать проникновению воздуха в толщу питательной среды. Иногда питательную среду после посева и перемешивания переносят в стерильные трубки Бурри или капиллярные пипетки Пастера, концы которых запаивают. При удачном разведении в пробирках, трубках Бурри, пипетках Пастера вырастают изолированные колонии анаэробов. Чтобы изолированные колонии хорошо были видны, используют осветленные питательные среды. Для извлечения изолированных колоний анаэробов пробирку слегка нагревают, вращая ее над пламенем, при этом агар, прилегающий к стенкам,

плавится и содержимое пробирки в виде агарового столбика выскользывает в стерильную чашку Петри. Столбик агара разрезают стерильным пинцетом и извлекают колонии петлей. Извлеченные колонии помещают в жидкую среду, благоприятную для развития выделяемых микроорганизмов. Агаризированную среду из трубки Бурри выдувают, пропуская газ через ватную пробку.

6. Метод Хангейта. Когда хотят получить изолированные колонии бактерий с особенно высокой чувствительностью к кислороду (строгие аэробы) используют метод вращающихся пробирок Хангейта. Для этого расплавленную агаризированную среду засевают бактериями при постоянном токе через пробирку инертного газа, освобожденного от примеси кислорода. Затем пробирку закрывают резиновой пробкой и помещают горизонтально в зажим, вращающий пробирку; среда при этом равномерно распределяется по стенкам пробирки и застывает тонким слоем. Применение тонкого слоя в пробирке, заполненной газовой смесью, позволяет получить изолированные колонии, хорошо видимые невооруженным глазом.

7. Выделение отдельных клеток с помощью микроманипулятора. Микроманипулятор – прибор, позволяющий с помощью специальной микропипетки или микропетли извлекать одну клетку из суспензии. Эту операцию контролируют под микроскопом. На предметном столике микроскопа устанавливают влажную камеру, в которую помещают препарат «висячая капля». В держателях операционных штативов закрепляют микропипетки (микропетли), перемещение которых в поле зрения микроскопа осуществляется с микронной точностью благодаря системе винтов и рычагов. Исследователь, глядя в микроскоп, извлекает отдельные клетки микропипетками и переносит их в пробирки со стерильной жидкой средой для получения клона клеток.

ГЛАВА 2. ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДСТВ

2.1. ПРОЦЕССЫ В БИОТЕХНОЛОГИИ

Важной задачей в создании любого биотехнологического процесса является разработка и оптимизация научно-обоснованной технологии и аппаратуры для него.

При организации биотехнологических производств частично был заимствован опыт развитой к тому времени химической технологии. Однако биотехнологические процессы имеют существенные отличия от химических, поскольку в биотехнологии используют более сложную организацию материи – биологическую. Каждый биологический объект (клетка, фермент и т. д.) – это автономная саморегулирующаяся система. Природа биологических процессов сложна и далеко не выяснена окончательно. Для микробных популяций, например, характерна существенная гетерогенность по ряду признаков – возрасту, физиологической активности, устойчивости к воздействию неблагоприятных факторов среды. Они также подвержены случайным мутациям, частота которых составляет 10^{-4} – 10^{-8} . Гетерогенность также может быть обусловлена наличием поверхностей раздела фаз и неоднородностью среды.

В основу подразделения биотехнологических процессов могут быть положены различные принципы, например, оценка принадлежности объектов к надцарствам живых существ, функциональной активности биообъекта, возможности вычленения отдельных этапов из биотехнологических схем производства в виде самостоятельных процессов: выделение, очистка и упаковка готового продукта и т.д. (табл. 2.1).

Классификационные схемы подобного рода оправданы и ими можно пользоваться как равноправными.

Биотехнологические процессы условно можно подразделить на биологические, биохимические и биоаналогичные. К первым относят те из них, которые основываются на использовании акариот, прокариот и эукариот, вторые – на использовании ферментов и третьи – на химическом синтезе или полусинтезе веществ, функционально близких или эквивалентных первичным (получение аминокислот и др.) или вторичным метаболитам живых организмов (получение производных пенициллина и цефалоспорины, тетрациклина, нуклеиновых оснований и др.).

В общем виде любой биотехнологический процесс включает 3 основные стадии: предферментационную, ферментационную и постферментационную. Принципиальная схема реализации биотехнологических

процессов в общем виде может быть представлена схемой, в которой сделана попытка отразить все варианты ферментационных процессов (рис. 2.1).



Рис. 2.1. Обобщенная схема процессов в биотехнологии

Таблица 2.1

Систематизация биотехнологических процессов

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

2.1.1. Предферментационная стадия

На этой стадии осуществляется хранение и подготовка культуры продуцента (инокулята), подготовка и получение питательных субстратов и сред, ферментационной аппаратуры, технологических и рециркулируемых воды и воздуха. Компоненты питательных сред подбирают на основании расчета материального баланса, связанного с трансформацией того или иного источника питания в клеточную биомассу и/или метаболит при учете расходуемой (выделяемой) энергии. Обычно качественный и количественный состав питательных сред указан в регламентной документации.

Поддержание и подготовка чистой культуры является очень важным моментом предферментационной стадии для получения целевых продуктов: чаще всего это биомасса микроорганизмов – продуцентов. Таковыми являются бактерии и низшие грибы, однако иногда в качестве продуцентов могут выступать клетки высших эукариот (насекомых, млекопитающих, растений). Продуцент, его физиолого-биохимические характеристики и свойства определяют эффективность всего биотехнологического процесса. В отделении чистой культуры осуществляют хранение производственных штаммов и обеспечивают их реактивацию и наработку продуцента в количествах, требуемых для начала процесса. Промышленный штамм в идеале должен удовлетворять следующим основным требованиям:

- 1) стабильности структурно-морфологических признаков и физиологической активности и эксплуатации в производстве;
- 2) повышенной скорости роста и биосинтеза целевого(-ых) продукта(ов);
- 3) достаточно широкому диапазону устойчивости к воздействию неблагоприятных внешних факторов (колебания температуры, pH, перемешиванию, вязкости среды);
- 4) умеренной требовательности к ограниченному числу источников питания; чем более широкий набор источников углерода, азота и других элементов может использовать производственный штамм, тем легче его культивировать, и с большей выгодой.

При выращивании посевных доз инокулята применяют *принцип масштабирования*, т. е. проводят последовательное наращивание биомассы продуцента в колбах, бутылках, далее в серии последовательных ферментаторов. Каждый последующий этап данного процесса отличает-

ся по объему от предыдущего обычно на порядок. Полученный продуцент по стерильной посевной линии направляется далее в аппарат, в котором реализуется ферментационная стадия.

Приготовление питательных сред осуществляется в специальных реакторах, оборудованных мешалками. В зависимости от растворимости и совместимости компонентов сред могут быть применены отдельные реакторы. Технология приготовления сред значительно усложняется, если в их состав входят нерастворимые компоненты. В различных биотехнологических процессах применяются разные по происхождению и количествам субстраты, поэтому процесс их приготовления варьируют. Дозирование питательных компонентов подбирается и осуществляется индивидуально на каждом производстве в соответствии с технологическим регламентом конкретного процесса. В качестве дозирующего оборудования при этом применяются весовые и объемные устройства, используемые в пищевой и химической промышленности. Транспорт веществ осуществляется насосами, ленточными и шнековыми транспортерами. Сыпучие компоненты подают в ферментаторы с помощью вакуумных насосов. Часто применяют принцип предварительных смесей, т. е. соли предварительно растворяют и затем транспортируют по трубопроводам, дозируя их подачу по объему.

В силу исключительного разнообразия биотехнологических процессов и применяемых для их реализации сред, методов и аппаратуры, рассмотрение данных элементов далее будет связано с конкретными биотехнологическими производствами.

2.1.2. Ферментация

Стадия ферментации является основной стадией в биотехнологическом процессе, так как в ее ходе происходит взаимодействие продуцента с субстратом и образование целевых продуктов. Эта стадия осуществляется в биохимическом реакторе (ферментаторе) и может быть организована различными способами в зависимости от особенностей используемого продуцента и требований к типу и качеству конечного продукта. Ферментация может происходить в строго асептических условиях или без соблюдения правил стерильности (так называемая «незащищенная» ферментация); на жидких и твердых средах, анаэробно и аэробно. Аэробная ферментация может протекать, в свою очередь, поверхностно или глубинно (во всей толще питательной среды). Культивирование биологических объектов может осуществляться в периодическом и проточном режимах, полунепрерывно с подпиткой субстратом.

В ходе периодической ферментации выращиваемая культура проходит ряд последовательных стадий: лаг-фазу, экспоненциальную, замедления роста, стационарную и отмирания (рис. 2.2). При этом происходят существенные изменения физиологического состояния биообъекта, а также ряда параметров среды. Целевые продукты образуются в экспоненциальной (первичные метаболиты – ферменты, аминокислоты, витамины, т. е. вещества, которые требуются для роста культуры клеток) и стационарной (вторичные метаболиты – антибиотики, алкалоиды, гормоны, токсины – низкомолекулярные вещества, не требующиеся для роста культуры, но необходимые для функционирования зрелой популяции, часто выполняющие защитную функцию) фазах, поэтому в зависимости от целей биотехнологического процесса в современных промышленных процессах применяют принцип дифференцированных режимов культивирования. В результате этого создаются условия для максимального производства того или иного целевого продукта.

Непрерывная ферментация биообъектов осуществляется в условиях установившегося режима, когда микробная популяция и ее продукты наиболее однородны, т. е. в стационарной фазе. Применение непрерывных процессов ферментации создает условия для эффективного регулирования и управления процессами биосинтеза. Системы непрерывной ферментации могут быть организованы по принципу полного вытеснения или полного смешения.

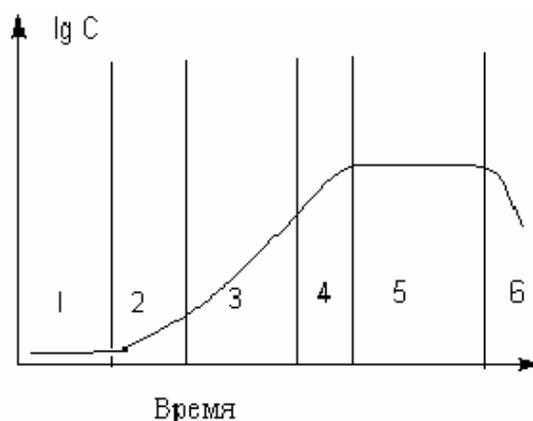


Рис. 2.2. Кривая роста микроорганизмов в ходе периодической ферментации:
 1 – лаг-фаза; 2 – фаза экспоненциального роста; 3- фаза линейного роста;
 4- фаза замедления роста; 5- стационарная фаза; 6- фаза отмирания

Первый пример – так называемая тубулярная культура: процесс ферментации осуществляется в длинной трубе, в которую с одного конца непрерывно поступают питательная среда и инокулят, а с другой – с той же скоростью вытекает культуральная жидкость и целевые продук-

ты. Данная система проточной ферментации является гетерогенной и реализуется, как правило, без перемешивания. При непрерывной ферментации в ферментаторах полного смешения (гомогенно-проточный способ) во всей массе ферментационного аппарата создаются одинаковые условия. Применение таких систем ферментации позволяет эффективно управлять отдельными стадиями, а также всем биотехнологическим процессом и стабилизировать продукт в практически любом требуемом экспериментатору или биотехнологу состоянии.

Обеспечение процесса ферментации с точки зрения инженерной реализации сводится к дозированному поступлению в ферментатор потоков (инокулята, воздуха или газовых смесей, питательных биогенных элементов, пеногасителей) и отвода из него тепла, отработанного воздуха, культуральной жидкости, а также к измерению и стабилизации основных параметров процесса на уровне, требуемом для оптимального развития продуцента и образования целевого продукта. В ходе ферментации образуются сложные смеси, содержащие клетки, внеклеточные метаболиты, остаточные концентрации исходного субстрата. При этом целевые продукты, как правило, находятся в этой смеси в небольших концентрациях, а многие из них легко разрушаются. Все это накладывает ограничения на методы выделения и сушки биологических препаратов.

2.1.3. Постферментационная стадия

Постферментационная стадия обеспечивает получение готовой товарной продукции и также обезвреживание отходов и побочных продуктов. Культуральная жидкость, образующаяся в процессе ферментации, представляет собой сложную многофазную систему: в водной фазе содержатся клетки продуцента, продукты их жизнедеятельности, непробеленные компоненты питательной среды, мельчайшие капельки жира и пузырьки воздуха. В свою очередь, водная фаза культуральной жидкости (нативный раствор) включает большое количество органических и неорганических веществ, коллоидных фракций белков, сухой остаток культуральной жидкости – до 17 % и более, содержание биомассы в культуральной жидкости достигает 8–10 %. Концентрация целевого продукта чаще всего не превышает 1,5 %, что составляет менее 10 % сухого остатка.

В зависимости от целевого назначения конечного продукта (для здравоохранения, технических целей, сельского хозяйства и т. д.), локализации конечного продукта (клетка или культуральная жидкость) и его

природы на постферментационной стадии применяют различную аппаратуру, методы выделения и очистки (рис. 2.3). Наиболее трудоемко выделение продукта, накапливающегося в клетках.

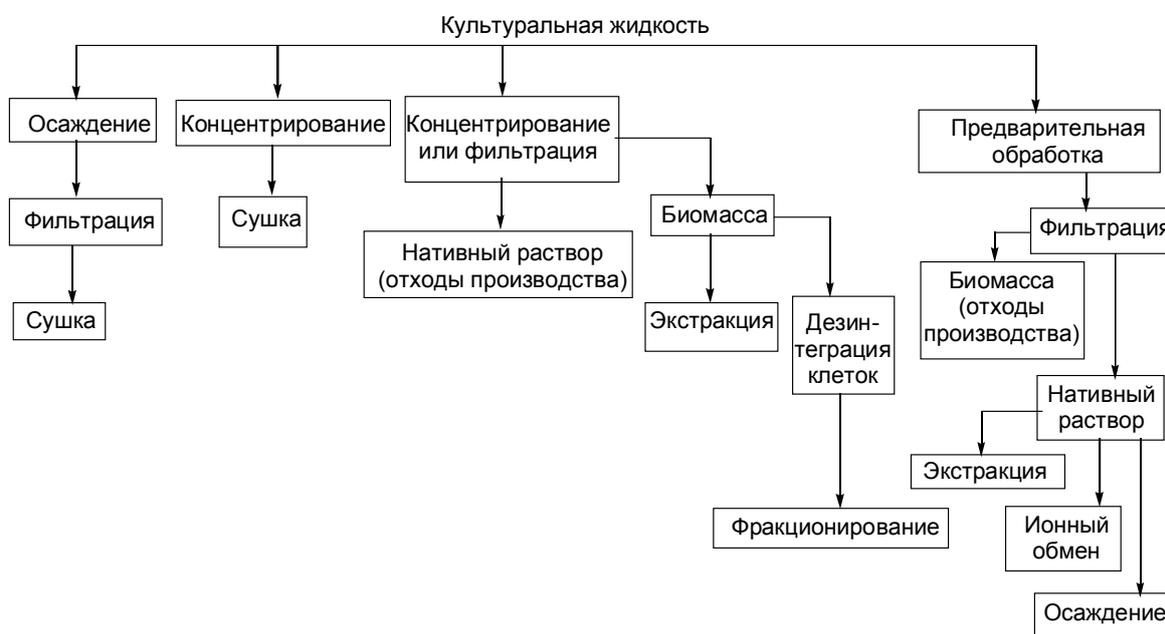


Рис. 2.3. Возможные способы выделения целевого продукта

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

Фракционирование экстрактов биомассы

Полученные с помощью биосинтеза (ферментации) продукты всегда оказываются в сложной смеси с другими продуктами жизнедеятельности той же биосинтетической системы, будь то культура клеток микробов, клеток животных или растений или даже целый организм. Важнейшей задачей биотехнологии является очистка целевого продукта из

этой сложной смеси. Целевой продукт может находиться либо внутри клетки, либо вне ее – в культуральной жидкости. Отделяя клеточную массу от культуральной жидкости, мы частично обогащаем целевой продукт, удаляя из содержащей его смеси соответствующие компоненты – внеклеточные или внутриклеточные соответственно. Однако сложность смеси, в которой оказывается продукт, остается все еще высокой. В случае если он находится внутри клеток, последние необходимо разрушить, после чего мы переходим к фракционированию многокомпонентного раствора; если же мы имеем дело с внеклеточным продуктом, то сразу можем приступить к фракционированию раствора, что, по сути, является первым этапом очистки целевого продукта. Эта задача является фактической задачей на разделение суспензии и имеет несколько вариантов инженерного решения.

Разделение суспензий. Одним из способов разделения суспензий является *седиментация* – разделение культуры как дисперсной системы на дисперсную фазу и дисперсионную среду (в нашем случае – клетки продуцента и культуральную жидкость). Разделение фаз в простейшем случае может быть достигнуто длительным *отстаиванием*, в процессе которого клетки продуцента, отличающиеся по плотности от культуральной жидкости, рано или поздно либо выпадут в осадок, либо всплывут. Однако при осуществлении биотехнологических процессов образуются системы, в которых дисперсная фаза состоит из мелких частиц, мало отличающихся по плотности от дисперсионной среды. Кроме того, поскольку мы имеем дело с живой системой, в которой продолжают действовать биохимические системы, возможно понижение концентрации целевого продукта за счет деградации его клеточными ферментами. Все это приводит к необходимости ускорить процесс разделения системы. Для этого используют центрифуги (*центрифугирование*). С их помощью можно решить следующие технологические задачи:

- разделение суспензии на осадок и раствор;
- разделение эмульсий на две жидкие фазы различной плотности.

Центрифуги используют как в лабораториях, так и в промышленном производстве. Лабораторные центрифуги представляют собой аппараты периодического действия, в которые загружается определенное количество разделяемой смеси, производят в заданных условиях процесс разделения, останавливают и выгружают жидкую фазу и осадок. В промышленности чаще применяют центрифуги непрерывного действия, позволяющие перерабатывать за один цикл объемы разделяемой смеси, значительно превышающие вместимость ротора.

Скорость осаждения можно регулировать путем подбора соотношения плотностей дисперсной фазы и дисперсионной среды. Одним из

вариантов использования этого принципа является *центрифугирование в градиенте плотности растворителя*. Для этого в состав растворителя вводят компонент, дающий растворы высокой плотности. Чаще всего используются сахароза, некоторые специальные полимеры (фиколл – сополимер сахарозы и эпихлоргидрина, перколл – коллоидные частицы силикагеля, покрытые поливинилпирролидоном) или растворы солей (CsCl , Cs_2SO_4 , CsI и другие соли цезия).

Другие способы разделения суспензий. Клетки микроорганизмов можно просто *отфильтровать* от культуральной жидкости, что и используется при стерилизации питательных сред. Но если при стерилизации требования к содержанию микробных клеток в фильтрате очень высоки, то при отделении клеток от культуральной жидкости, после выращивания микробной культуры, эти требования гораздо ниже. Эти обстоятельства позволяют использовать при фильтрационном разделении технологической культуры материалы более грубые по размерам пор, но обладающие высокой механической прочностью и пропускной способностью. К такого рода материалам относится, в частности, ткань Петрянова (по имени советского ученого-химика). Для осуществления фильтрации применяется специальная аппаратура – вакуумные фильтры барабанного типа, фильтр-прессы, на которых фильтрация идет под давлением. Существуют также фильтрующие центрифуги, в которых центробежная сила используется для продавливания жидкости через слой фильтрующего материала.

В некоторых случаях при разделении микробных суспензий используют технику *флотации*, когда в культуру добавляют относительно небольшое количество несмешивающейся с водой жидкости в мелко раздробленном состоянии. На поверхности раздела капелек этой жидкости и воды сорбируются клетки культуры, и после расслаивания эмульсии микробную массу удастся сконцентрировать.

Разрушение клеточной массы (дезинтеграция)

Для извлечения целевых продуктов, находящихся внутри клетки микроорганизма или при получении продуктов из тканей животных или растений, необходимо прежде всего разрушить их или осуществить процедуру *дезинтеграции*.

Дезинтеграция клеточной массы представляет собой один из важнейших элементов биотехнологического процесса. Эту процедуру осуществляют физическими, химическими или ферментативными методами.

Наиболее распространенными в промышленности являются физические методы, среди которых чаще всего применяют *баллистические*

методы дезинтеграции. Сущность этой группы методов состоит в том, что биомассу подвергают воздействию удара или истирания. В первом случае биомассу помещают в цилиндрический барабан, вращающийся вокруг оси и наполненный шариками из тяжелого твердого материала (металл или фарфор). При вращении барабана шарики перекатываются и ударяют по агломератам биомассы, причем удары происходят достаточно часто и в разных направлениях. Это приводит к разрушению клеточных стенок и получению однородного вязкого раствора, в котором находится содержимое клеток. Однако следует учитывать, что в ходе такой обработки содержимое барабана существенно нагревается от соударений. Учитывая термолабильность компонентов клетки, это тепло необходимо удалять, что достигается введением в конструкцию дезинтегратора теплоотводящих элементов. Обычно это рубашка (кожух, в который помещают барабан), через которую пропускают холодную воду или другой хладагент. Степень дезинтеграции (доля разрушенных клеток) за один цикл составляет 52–85 %, в зависимости от вида подвергаемой обработке биомассы.

Ход дезинтеграции можно описать уравнением

$$\lg \frac{100}{100 - A} = \frac{K}{f},$$

где A – степень дезинтеграции, %, K – константа скорости дезинтеграции, f – объемная скорость, л/час.

Другим способом механической дезинтеграции клеток является *экструзия*. Сущность этого метода заключается в том, что суспензию клеточной массы под высоким давлением продавливают через узкое отверстие в камеру с нормальным давлением. При этом из-за большого перепада давления вода, которая попала в клетки, быстро выходит из них и при этом разрушает клеточную стенку. Кроме этого происходит разогрев и также необходимо охлаждение во избежание потерь продукта из-за термоинактивации. Степень разрушения клеток при таком способе составляет до 90 %.

Ультразвуковая дезинтеграция. Помимо механических способов используются приемы, основанные на воздействии на клетки ультразвука. Под действием ультразвукового поля клетки испытывают попеременные сжатия и растяжения, скручивание в различных направлениях, что, в конце концов, приводит к разрыву клеточной стенки и ее разрушение.

Как и в случае баллистических методов, операция дезинтеграции с помощью ультразвука может осуществляться как в периодическом, так и в непрерывном режимах. Для этой цели сконструированы специальные ячейки, позволяющие прокачивать суспензию разрушаемой био-

массы со скоростью нескольких литров в минуту при концентрации клеток в суспензии до 20 % и поддерживать при этом температуру 2–4°C. Для более полного разрушения биомассу можно возвращать в цикл.

Химические методы разрушения клеток. Как различные методы механической дезинтеграции, так и ультразвуковая дезинтеграция биомассы основаны на использовании механического разрыва клеточной оболочки – либо ее абразивное разрушение, либо разрыв ее за счет осмотических сил.

В ряде случаев более удобным оказывается разрушение клеточной оболочки за счет перевода в раствор отдельных ее компонентов, т. е. изменения ее состава и структуры, что делает ее более проницательной для клеточного содержимого.

Одним из таких методов является *детергентный лизис клеток*. Биомасса продуцента в этом случае обрабатывается каким-либо из детергентов, который растворяет липидные компоненты клеточной стенки, после чего внутриклеточные компоненты через образовавшиеся поры вытекают в окружающую среду.

Фракционирование экстрактов биоматериалов

Существует несколько подходов к фракционированию смесей. Один из них – *неспецифический*, когда, располагая ограниченной информацией о свойствах продукта, мы проводим его через ряд последовательных стадий технологического процесса в надежде, что на каждой из этих стадий удастся реализовать какие-либо различия в свойствах целевого продукта и сопутствующих ему веществ. В принципе, можно утверждать, что всегда найдется такая комбинация приемов фракционирования, которая позволит получить целевой продукт в достаточно очищенном состоянии, однако, следует иметь в виду, что каждая технологическая стадия сопровождается неизбежными потерями продукта, и если число таких стадий будет велико, то выход конечного продукта окажется низким, что приведет к его удорожанию и снижению экономических показателей процесса.

Второй подход основан на большем объеме информации о продукте и, следовательно, на подборе *специфических* для него приемов фракционирования. Таким путем можно сократить затраты на процесс производства, повысить выход продукта и экономичность технологии, но это потребует больших затрат на разработку процесса.

Основные принципы фракционирования сложных смесей удобно рассмотреть на неспецифических процедурах.

Солевое фракционирование

Этот тип фракционирования основан на различии растворимости продукта в солевых растворах различной концентрации. Обычно для этих целей применяют сульфаты, фосфаты натрия, калия и аммония. К суспензии биомассы добавляют 10 %-й раствор сульфата аммония, при этом наименее растворимые побочные продукты (обычно белки) выпадают в осадок, их отделяют центрифугированием и добавляют следующую порцию сульфата аммония 20 %-й концентрации, после чего получают второй осадок, т. е. продолжая эту процедуру получают ряд фракций, в которых содержание целевого продукта значительно выше, чем в других фракциях.

Точно таким же образом можно фракционировать суспензии *добавлением органических растворителей*, постепенно увеличивая их концентрацию. Чаще всего в качестве осадителей используют этанол и ацетон. Можно также применять метанол, изопропанол, диоксан, этилацетат и др., однако при использовании органических растворителей становится крайне важным соблюдение норм техники безопасности и пожарной безопасности, так как органические растворители токсичны и горючи. Это требует использования оборудования во взрывозащищенном исполнении, эффективной вентиляции и применения средств индивидуальной защиты.

Осаждение продуктов органическими полимерами

Помимо солей и органических растворителей агрегацию белков в растворах вызывают и ряд нейтральных высокомолекулярных соединений. Однако растворы полимеров обычно имеют повышенную вязкость, поэтому для целей фракционирования используют полимеры, образующие растворы с минимальной вязкостью. Среди таковых наиболее удобными оказались полиэтиленгликоли (М.м. 4000–6000). Растворы полиэтиленгликоля с молекулярной массой 6000 имеют небольшую вязкость, вплоть до концентрации 20 вес %.

Полиэтиленгликоль, в частности, используется для фракционирования плазмы крови. Первым из плазмы крови при добавлении полиэтиленгликоля выпадает фибриноген – крупный белок с ассиметрическими молекулами; далее осаждаются гамма-глобулины и другие компоненты.

В случае полимеров определенные проблемы возникают при их отделении от целевых белков. Обычно это осуществляется с помощью гель-фильтрации на молекулярных ситах типа Сефадекс и т. п. либо путем осаждения белка из раствора солью так, чтобы полимер при этом

остался в растворе. Полиэтиленгликоль солевому осаждению практически не препятствует.

Тонкая очистка продуктов биотехнологического процесса

Рассмотренными методами можно получить относительно грубо очищенные препараты со степенью очистки целевого продукта 5–10. Для многих целей такой очистки оказывается достаточно и этим следует пользоваться, так как простые по технологии процедуры с использованием дешевых реагентов приводят к получению препаратов с низкой себестоимостью.

Однако иногда возникает необходимость получения высокоочищенных препаратов (например, получение продуктов для применения в медицине в качестве лекарственных или диагностических средств, а также для исследовательских целей в области молекулярной биологии, биохимии, биоорганической химии и т. д.).

При разработке процессов получения высокоочищенных биопрепаратов используются процедуры тонкой очистки, большая часть которых заимствована из лабораторной практики. Здесь, однако, нужно обратить внимание на следующее: лабораторные процессы получения высокоочищенных препаратов разрабатывались для получения одного целевого продукта без учета возможностей использования экстракта биомассы для извлечения других полезных продуктов. Таким образом, разработка технологического процесса получения целевого продукта в высокоочищенном состоянии в настоящее время чаще всего осуществляется путем случайного подбора процедур фракционирования. Какой-либо обобщенной концепции конструирования такого рода технологических процессов в настоящее время не существует.

На рис. 2.4 представлено условное отображение типичной процедуры очистки продукта в обобщенных координатах: логарифм степени очистки ($\lg p_f$) – порядковый номер технологической стадии.

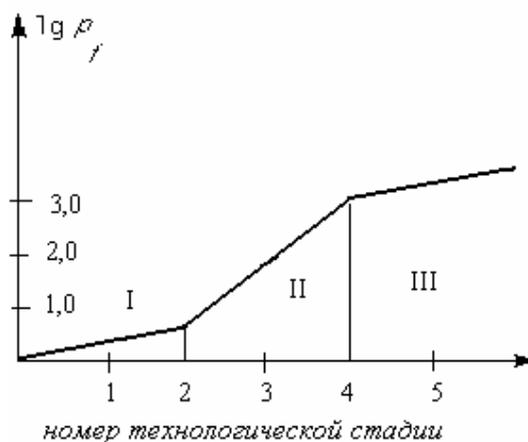


Рис. 2.4. Обобщенное представление технологического процесса

Процесс может быть разделен условно на три фазы: стадии 1 и 2 – грубое фракционирование, стадии 3 и 4 – основная очистка, стадия 5 – финишная очистка.

Грубое фракционирование обычно включает разрушение клеточной массы и отделение целевого продукта (например, белка) от остальных компонентов экстракта (нуклеиновых кислот, полисахаридов, липидов). Цель этих процедур – облегчение последующего фракционирования. Как правило, на этой фазе технологического процесса значительного обогащения целевого продукта не достигается.

Вторая фаза очистки обеспечивает отделение целевого продукта от основной массы компонентов той же природы (в нашем случае – белков). Здесь используются наиболее существенные отличия в физико-химических свойствах целевого продукта от остальных белковых компонентов разделяемой смеси. За счет этих различий и достигается очистка.

На последней фазе, в которую вступает зачастую почти индивидуальный в химическом смысле целевой продукт, осуществляется его отделение от микропримесей других компонентов, близких по свойствам к целевому продукту. Очевидно, что и на этой стадии существенного обогащения продукта также не достигается, однако очень часто процедуры, используемые на этом этапе процесса самым существенным образом сказываются на качестве продукта.

Специфичность стадий технологического процесса

Проанализируем вторую фазу процесса – фазу основной очистки. Обычно на этом этапе используются в различных комбинациях одни и те же основные приемы фракционирования биологических экстрактов:

фракционное разделение, хроматографическое разделение, препаративный электрофорез и т. д.

В реальных процедурах очистки выход высокоочищенного продукта обычно невысок и редко превышает 20 % от его содержания в исходной биомассе. Процессы являются многостадийными. Легко подсчитать, что даже при выходе целевого продукта на каждой стадии ~80 % (что является довольно высоким показателем), при последовательном применении таких шести стадий общий выход выделяемого продукта составит 25 %.

Трудоемкость и относительно большое число стадий обусловлено их низкой эффективностью.

Для характеристики эффективности стадии фракционирования используется количественный показатель – коэффициент специфичности технологической стадии. Его определяют как степень обогащения целевого продукта на данной стадии:

$$k = \frac{p_{i+1}}{p_i},$$

где p_{i+1} и p_i – степень очистки продукта на $(i+1)$ стадии и i -стадии соответственно.

Можно условиться, какую специфичность считать высокой, а какую – низкой. Учитывая, что большинство процедур разработано для очистки ферментов, проведем рассуждения в применении к этим продуктам.

Содержание фермента в клетке обычно составляет 0,1 – 1 % от общего содержания белкового материала, следовательно, для получения индивидуального фермента его необходимо обогатить в 100–1000 раз по сравнению с исходным клеточным экстрактом. Процедуру считают удовлетворительной, если требуемая степень очистки достигается за три стадии фракционирования. При этом необходимо, чтобы коэффициент специфичности каждой из этих стадий был более пяти. Именно такие стадии считаются специфичными. Понятно, что использование в технологическом процессе лишь специфических стадий приведет к снижению трудоемкости процесса, сокращению потерь продукта и в целом к повышению эффективности технологии и снижению себестоимости продукта.

К настоящему времени накоплен обширный экспериментальный материал по различным методическим приемам фракционирования клеточных экстрактов, среди них значительное число специфичных стадий фракционирования. В процессах тонкой очистки целевых продуктов

специфические стадии фракционирования используются весьма широко. Наиболее распространенным вариантом является *хроматография*.

Основные приемы осуществления хроматографического процесса

Для хроматографического разделения смесей веществ используются различные технологические приемы, основанные на разных принципах взаимодействия компонентов разделяемой смеси с хроматографическими материалами (сорбентами). Наиболее часто используются:

– *ионообменная хроматография* (сорбент представляет собой твердый носитель, содержащий ионизируемые в водных растворах функциональные группы, с которыми связываются компоненты разделяемой смеси);

– *адсорбционная хроматография* (сорбент представляет собой твердый носитель, на котором происходит обратимая сорбция компонентов разделяемой смеси за счет дисперсионного взаимодействия их с поверхностью твердой фазы. Разделение осуществляется за счет различия в константах равновесия связывания компонентов смеси с поверхностью сорбента);

– *хроматография на молекулярных ситах* (гель-проникающая хроматография, гель-фильтрация); сорбент представляет собой гранулы геля, имеющий поры определенного размера, в которые могут проникать молекулы компонентов с размером ниже размера пор и не могут проникать молекулы с большим размером пор. Разделение достигается за счет разной скорости перемещения частиц с разными размерами молекул, при этом частицы большего размера движутся с большей скоростью. Такой вид хроматографии широко применяется при фракционировании компонентов клеточных экстрактов, и во многих случаях коэффициент специфичности этой процедуры высок. Однако для направленного применения гель-фильтрации в биотехнологии опять-таки необходимо располагать дополнительной информацией о размерах частиц целевого продукта;

– *афинная хроматография* (сорбент представляет собой твердый носитель, к которому химически присоединены функциональные группы, избирательно связывающие какой-либо из компонентов разделяемой смеси (по принципу «замка–ключа»); остальные компоненты раствора не взаимодействуют с носителем, а свободно выходят из колонки. Обычно к инертному носителю прикрепляют субстраты или ингибиторы ферментов. Например, для белка плазминогена субстратом является аминокислота лизин (рис. 2.5,а)– ее и закрепляют на твердом носителе. Через колонку пропускают сыворотку крови, и только плазминоген на ней закрепляется, а все остальные белки свободно проходят по колонке.

Затем плазминоген смывают с колонки, используя аминокaproновую кислоту (рис. 2.5,б), которая также является субстратом для плазминогена, но отличается более высоким сродством.

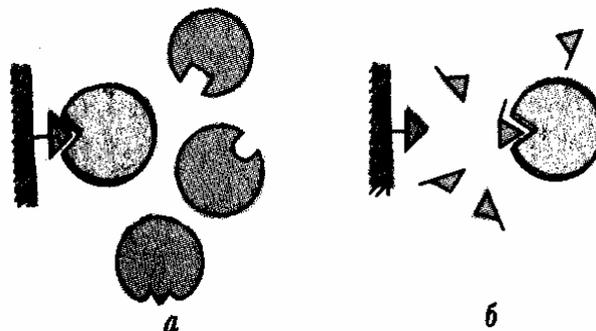


Рис. 2.5. Афинная хроматография

После завершения очистки биотехнологических продуктов производят их обезвоживание и стабилизацию. Это необходимо для увеличения их сроков годности.

На эти заключительные стадии продукт поступает в виде более или менее разбавленного раствора, так что приходится решать задачу *концентрирования* этого раствора, которое представляет собой удаление воды и низкомолекулярных компонентов. Наиболее простым методом является упаривание, однако оно не применимо в случае получения биологически активных соединений. Таким образом, обычное упаривание применяется лишь для достаточно стабильных продуктов (низкомолекулярных продуктов биосинтеза, таких как аминокислоты и антибиотики). Во многих случаях оказывается необходимым получить продукт в сухом виде. Для этого используются различные технологические приемы сушки. В зависимости от свойств продукта применяют различные методы высушивания. Сушка термостабильных препаратов осуществляется на подносах, ленточном конвейере, а также в кипящем слое. Особо чувствительные к нагреванию препараты высушивают в вакуум-сушильных шкафах (при пониженном давлении и температуре) и в распылительных сушилках. В этом случае раствор продукта подают в специальный аппарат через форсунку, которая обеспечивает распыление раствора на капли малого размера. В направлении, противоположном подаче раствора продукта, подается турбулентный поток горячего воздуха.

К стабилизации свойств биотехнологических продуктов ведет добавление в качестве наполнителей различных веществ. Для стабилизации кормового белка добавляют отруби, кукурузную муку, обладающие

дополнительной питательной ценностью. Для стабилизации ферментных препаратов используют глицерин и углеводы (КМЦ), которые препятствуют денатурации ферментов, а также ионы кобальта, магния, натрия и др.

2.2. ЭЛЕМЕНТЫ, СЛАГАЮЩИЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ

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

2.2.1. Биологический агент

Биологический агент является активным началом в биологических процессах и одним из наиболее важных из элементов. Номенклатура биологических агентов бурно расширяется, но до настоящего времени важнейшее место занимает традиционный объект – микробная клетка. Микробные клетки могут быть выделены из природных источников и далее существенно модифицированы и улучшены с помощью традиционных (селекции, отбора) и новейших (клеточной и генетической инженерии) методов. При выборе биологического агента и постановке его на производство прежде всего следует соблюдать принцип технологичности штаммов. Это значит, что микробная клетка, популяция или сообщество особей должны сохранять свои основные физиолого-биохимические свойства в процессе длительного ведения ферментации. Промышленные продуценты также должны обладать устойчивостью к мутационным воздействиям, фагам, заражению посторонней микрофлорой, характеризоваться безвредностью для людей и окружающей среды, не иметь при выращивании побочных токсичных продуктов обмена и отходов, иметь высокие выходы продукта и приемлемые технико-экономические показатели.

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

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

смешанных популяциях. Возможны различные типы такого взаимодействия:

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

- *мутуализм* – оба штамма быстрее растут в смешанной культуре, чем в соответствующих чистых культурах.

Пример: совместное культивирование штамма *Lactobacillus*, нуждающегося в фенилаланине, и штамма *Streptococcus*, нуждающегося в фолиевой кислоте.

На среде, не содержащей ни одного из этих компонентов, чистые культуры обоих штаммов практически не растут. Смешанная культура растет на этой среде хорошо. В данном случае мутуализм представляет собой взаимный обмен ростовыми факторами. Резко выраженный мутуализм, когда один микроорганизм совершенно не может существовать без другого называют *симбиозом*.

Пример: в свое время была описана «бактерия» *Metanobacillus omelianskii*, которая при ближайшем рассмотрении оказалась смесью двух видов. Один из них окисляет этанол до ацетата с образованием водорода, но его рост подавляется продуцируемым им же водородом. Второй вид не способен расти на этаноле, но утилизирует водород, превращая его в метан.

Если один вид продуцирует вещества, ускоряющие рост другого вида, говорят, что во взаимоотношениях между этими видами имеет место *комменсализм*. Противоположен комменсализму *аменсализм*, когда один вид продуцирует вещество, подавляющее рост второго вида.

По сравнению с монокультурами микробные ассоциации способны потреблять сложные, неоднородные по составу субстраты, минерализуют сложные органические соединения, имея повышенную способность к биотрансформации, имеют повышенную устойчивость к воздействию неблагоприятных факторов среды и токсических веществ, а также повышенную продуктивность и возможность обмена генетической информацией между отдельными видами сообщества. Основные области применения смешанных культур – производство пищевых продуктов, охрана окружающей среды, биodeградация и усвоение сложных субстратов.

Особая группа биологических агентов в биотехнологии – ферменты, катализаторы биологического происхождения. Ферменты находят все большее применение в медицине, пищевой промышленности и т. д.

До 60-х гг. это направление сдерживалось трудностями их получения, неустойчивостью, высокой стоимостью. Как отдельную отрасль в создании и использовании новых биологических агентов следует выделить иммобилизованные ферменты: преимущество – стабильность и повышенная активность, удержание в объеме реактора, возможность полного быстрого отделения продуктов ферментации с многократным использованием биологического агента.

К нетрадиционным биологическим агентам на данном этапе развития биотехнологии относят растительные и животные ткани, в том числе гибридомы, трансплантаты. Большое внимание в настоящее время уделяется получению новейших биологических агентов – трансгенных клеток микроорганизмов, растений, животных – генно-инженерными методами. Развита также новые методы, позволяющие получать искусственные клетки с использованием различных синтетических и биологических материалов (изотопы, антитела и др.) Разрабатываются подходы к конструированию ферментов с заданными свойствами, имеющих повышенную реакционную активность и стабильность.

Таким образом, в биотехнологических процессах возможно использование различных биологических агентов с разным уровнем организации – от клеточной до молекулярной.

2.2.2. Субстраты и среды

Используемые в биотехнологии субстраты разнообразны и их спектр непрерывно расширяется. С развитием промышленных процессов происходит накопление новых видов отходов, которые могут быть обезврежены и превращены в полезные продукты методами биотехнологии. В настоящее время наблюдается рост интереса биотехнологов к природным возобновляемым ресурсам – продуктам фотосинтеза, биоресурсам мирового океана.

В состав сред для биотехнологических процессов входят источники углерода и энергии, а также минеральные элементы и ростовые факторы.

Наиболее распространенными *источниками углерода* при культивировании микроорганизмов являются углеводы (чистые и углеводсодержащее сырье), спирты, органические кислоты, углеводороды. Довольно часто в качестве источников углеродного питания используют технические виды углеродсодержащего сырья: мелассу, соки растений, патоку, крахмал, сульфитный щелок, барду (продукт переработки спирта), целлюлозу, гидролизаты полисахаридов и древесины. Все эти тех-

нические источники углерода чаще всего представляют сложные многокомпонентные смеси различных веществ и служат не только источниками углерода, но и других (необходимых для роста культуры микроорганизмов) химических элементов.

Минеральные элементы, необходимые для роста биологических агентов и входящие в состав питательных сред, подразделяются на макро- и микроэлементы. Среди макроэлементов на первом месте стоит азот, так как потребность в нем у биологических объектов на порядок выше, чем в других элементах (фосфоре, сере, калии и др.). Азот необходим микроорганизмам для обеспечения синтеза нуклеиновых кислот, белков и полимеров клеточной стенки. **Источники азота**, используемые в промышленном культивировании микроорганизмов также разнообразны. Среди них могут быть простые (аммиак и соли аммония, мочевины), и сложные (кукурузный экстракт, соевая мука, рыбная мука, дрожжевой экстракт и др.). Однозначного предпочтения простым или сложным источникам азота отдать нельзя: простые позволяют точно контролировать состав питательной среды и точно задавать содержание в ней азота. Сложные источники азота лучше усваиваются микроорганизмами, но наличие в них не утилизируемых микробной культурой компонентов осложняет дальнейшие стадии технологического процесса и повышает количество отходов, что отрицательно сказывается на экономических показателях технологии.

Минеральные элементы необходимы для роста любого биологического агента, но их концентрация в среде, в зависимости от биообъекта и задач биотехнологического процесса, различна. Обычно она составляет 10^{-3} – 10^{-4} М. Потребности в микроэлементах невелики, и их концентрация составляет 10^{-6} – 10^{-8} М, поэтому микроэлементы часто специально не вносят в среду, так как их примеси в основных солях и воде обеспечивают потребности продуцентов.

Отдельные продуценты нуждаются для роста в наличии в среде **ростовых факторов** (аминокислот, витаминов и пр.). Помимо чистых индивидуальных веществ такой природы на практике часто используют в качестве ростовых добавок кукурузный или дрожжевой экстракт, картофельный сок, экстракт проростков ячменя, зерновых отходов и отходов молочной промышленности. Добавление ростовых факторов способно увеличить выход целевого продукта в десятки раз. Все указанные выше компоненты питательной среды существенны для культивирования микроорганизмов и эукариотических клеток – иначе их называют **биохимическими факторами** роста. Существуют также и **биофизические факторы** роста, к которым относят физические условия, обеспечивающие нормальный рост культуры: это температура культивирования и

интенсивность перемешивания, обеспечивающий необходимый массообмен в культуре. Различные продуценты имеют определенный диапазон температур, при которых их рост происходит наиболее эффективно. Однако следует иметь в виду, что оптимальная для роста культуры температура не всегда совпадает с таковой для накопления целевого продукта. Большинство используемых в биотехнологии продуцентов требуют температуры $\sim 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ (мезофильные микроорганизмы), известны термофильные микроорганизмы, оптимум роста которых находится в диапазоне $70\text{--}90\text{ }^{\circ}\text{C}$, а иногда и выше ($>100\text{ }^{\circ}\text{C}$ – экстремальные термофилы). Перемешивание культуры также является важным фактором роста, потому что микробная клетка для своего развития потребляет питательные вещества, в связи с этим вокруг клетки постепенно образуется пространство с пониженной концентрацией этих веществ, так что возникает градиент концентрации питательных веществ. Со временем этот градиент начинает лимитировать рост клетки и всей культуры. Наиболее эффективным способом преодоления возникающих проблем является обеспечение эффективного массообмена в культуре, что и достигается путем перемешивания.

Традиционно состав питательной среды, оптимальной для каждого биотехнологического процесса, определяется методом длительного эмпирического подбора, но в последние 20 – 25 лет все шире используется математический метод планирования экспериментов, математическое моделирование биотехнологических процессов – это позволяет обоснованно подходить к конструированию питательных сред, сделать их экономичными.

Конструирование питательных сред для выращивания микроорганизмов

Многие нетребовательные микроорганизмы, например бактерия *Escherichia coli*) хорошо растут на среде очень простого состава. Такая среда называется *минимальной (синтетической)*.

Таблица 2.2

Состав минимальной питательной среды

KH_2PO_4	0,5 г
NH_4Cl	1,0 г
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 г
CaCl_2	0,01 г
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,01 г
Глюкоза	10,0 г
Раствор микроэлементов	1 мл
Вода	1000 мл

Иногда минимальной среды недостаточно для нормального роста микроорганизмов. В этом случае в состав среды вводят добавки, предварительно установив, в каких из них нуждается данный микроорганизм. Для многих почвенных бактерий используют смесь витаминов, которые добавляют в количестве 2–3 мл на 1000 мл минимальной среды – такая среда будет называться *сложной (комплексной)*.

Таблица 2.3

Состав смеси микроэлементов

Биотин	0,2 мг
Никотиновая кислота (витамин РР)	2,0 мг
Тиамин (B_1)	1,0 мг
п-Аминобензойная кислота	1,0 мг
Пантотеновая кислота	0,5 мг
Пиридоксамин (B_6)	5,0 мг
Цианкобаламин (B_{12})	2,0 мг
Дистиллированная вода	100 мл

При выделении микроорганизмов из природных источников часто появляется необходимость проводить культивирование таким образом, чтобы размножались преимущественно клетки определенного вида микроорганизмов. В таких случаях используется *метод накопительных культур*, предложенный Виноградским и Байеринком. Для подобных ситуаций часто приходится составлять специальные среды, называемые

элективными. Проводя несколько кратковременных пассажей на такой среде, можно получить чистую культуру целевого микроорганизма.

Технология приготовления питательных сред

Питательная среда для культивирования микроорганизмов должна удовлетворять двум основным требованиям: 1) она должна содержать все необходимые для роста компоненты; 2) не должна содержать примесей каких-либо микроорганизмов, т. е. должна быть *стерильной*.

Технология стерилизации питательных сред включает ряд разнообразных приемов. Главным и наиболее традиционным является *термическая стерилизация* – прогревание среды при высоких температурах, когда большинство микроорганизмов погибают (рис. 2.6). Для большинства микроорганизмов достаточным оказывается кипячение среды (~100°C). Обычно среду прогревают при более высокой температуре, для чего нагревание проводят при повышенном давлении (3–5 атм.; избыточное давление). Для небольших количеств среды используют автоклавы, а при стерилизации больших объемов сред обработку проводят прямо в ферментаторе «острым» паром – струей сильно перегретого пара с температурой 130–140°C.

Пастеризация как вариант термической стерилизации. В случае спорообразующих микроорганизмов термическая стерилизация непригодна, так как споры микроорганизмов обладают исключительно высокой термостабильностью, поэтому используют метод *пастеризации*, получивший свое название от имени выдающегося ученого второй половины прошлого века Луи Пастера – одного из основателей современной микробиологии. Сущность этого метода заключается в том, что среду прогревают при относительно невысокой температуре (~60 °C), затем охлаждают и цикл повторяют несколько раз. Микроорганизмы (вегетативные формы) при этих условиях погибают, а споры остаются жизнеспособными. После охлаждения стерилизуемой среды до нормальной для роста температуры, споры прорастают и микроорганизмы переходят в стадию вегетативной культуры, после чего повторное прогревание вызывает их гибель.

Стерилизация фильтрацией. Часто приходится использовать питательные среды сложного состава, не выдерживающие термической стерилизации. Например: глюкоза при повышенной температуре «караメリзуется», раствор темнеет из-за образования полимерных продуктов распада. Ясно, что в таких случаях необходимо использовать щадящие методы стерилизации, такие, как *фильтрация*. Фильтрация также известна со времен Пастера. Часто в качестве фильтров используют неглазурованные фарфоровые фильтры (свечи Шамберлана), в настоящее

время применяют фильтр Беркефельда (из прессованного кизельгура), асбестовые пластины, стеклянные и мембранные фильтры. Современная технология изготовления мембран позволяет изготавливать мембраны с заданным размером пор. Стерилизация фильтрацией является одним из процессов так называемой *мембранной технологии*, которая используется не только для стерилизации, но и для фракционирования сложных смесей. При всех положительных качествах стерилизующей фильтрации через мембраны нельзя не отметить и недостатки этого способа, к которым относятся: адгезия частиц к мембранам, неоднородность пор по диаметру, удержание части стерилизуемой дорогостоящей жидкости на мембране при фильтрации малых объемов ее, а также возможная селективная адсорбция ионов (чаще – катионов) из небольших объемов растворов, недостаточная или плохая смачиваемость мембран водой и др.

Другие способы стерилизации включают облучение УФ-светом, рентгеновскими и γ -лучами. Также используют химические методы, например, обработку β -пропиолактоном, окисью этилена и др. Наиболее часто применяют β -пропиолактон, его добавляют к готовой питательной среде в концентрации 0,2 %. В течение двух часов при температуре 37°C все микроорганизмы погибают. После выдерживания среды в течение ночи β -пропиолактон полностью гидролизуеться, и среда становится пригодной к использованию.

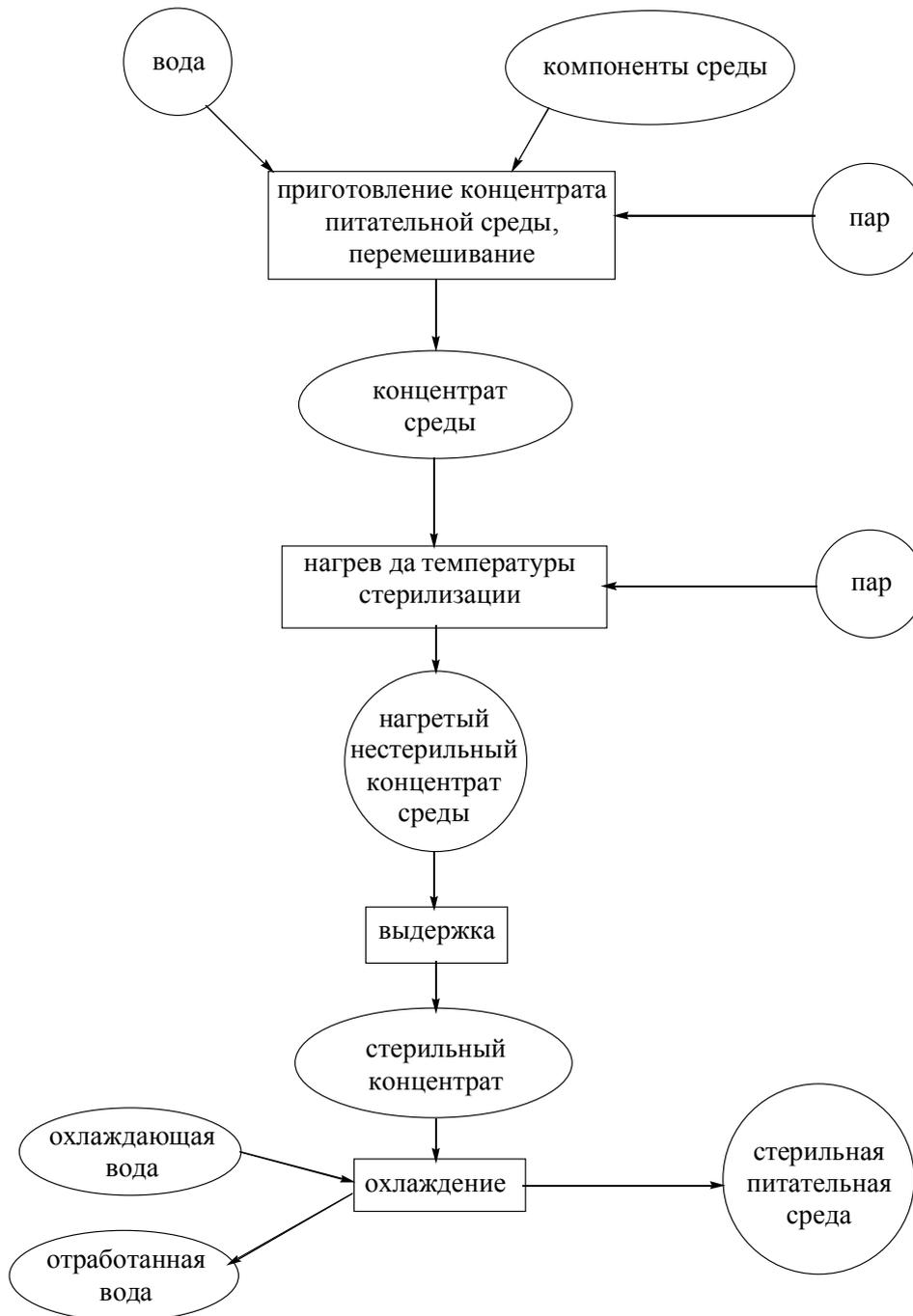


Рис. 2.6. Принципиальная схема процесса приготовления и тепловой стерилизации питательной среды

2.2.3. Аппаратура

Вопросами технического обеспечения биотехнологических процессов занимается *биоинженерия*. Для различных процессов существует огромное

разнообразии аппаратуры: собственно для процесса ферментации, а также для выделения и получения готового продукта. Наиболее сложна и специфична аппаратура для ферментационной стадии. Технически наиболее сложным процессом ферментации является аэробный глубинный стерильный непрерывный (или с подпиткой субстратом). Аппараты для поверхностной и анаэробной ферментации менее сложны и энергоемки.

В современной литературе описаны сотни биореакторов, отличающихся по конструкции, принципу работы и размерам (от нескольких литров до нескольких тысяч кубометров). Многочисленность методов культивирования, чрезвычайное многообразие используемых биологических агентов привели к огромному разнообразию конструктивных решений, которые зависят от ряда факторов: типа продуцента и среды, технологии и масштабов производства, целевого продукта и пр. Принципиальное отличие биотехнологических процессов от чисто химических заключается:

- в чувствительности биологических агентов к механическим воздействиям;
- наличии межфазового переноса веществ (по типу "жидкость–клетки", "газ – жидкость–клетки");
- требовании условий асептики;
- низких скоростях протекания многих процессов в целом;
- нестабильности целевых продуктов;
- пенообразованию;
- сложности механизмов регуляции биосинтеза.

Рассмотрим некоторые типы ферментационных аппаратов.

Аппараты для анаэробных процессов применяются в процессах конверсии растительного сырья, в том числе растительных отходов, а также различных других отходов. При метановом брожении для получения биогаза, а также в ряде других процессов (получения ацетона, шампанских вин) используют ферментационные аппараты (метантенки). Эти аппараты имеют различную конструкцию (от простой выгребной ямы до сложных металлических дайджестеров или железобетонных сооружений) и объемы (от нескольких до сотен кубометров). Данные аппараты оборудованы системой подачи сырья, системой теплообменных труб для стабилизации температуры, несложным перемешивающим устройством для гомогенного распределения сырья и биомассы продуцента, газовым колпаком и устройством переменного объема (газгольдером) для сбора образуемого биогаза.

Аппараты для аэробной поверхностной ферментации широко применяются для производства органических кислот (жидкофазные) и ферментов (твёрдофазные). Поверхностная жидкофазная ферментация протекает в так называемых бродильных вентилируемых камерах, в которых

на стеллажах размещены плоские металлические кюветы. В кюветы наливают жидкую питательную среду, высота слоя составляет 80–150 мм, затем с потоком подаваемого воздуха среду инокулируют порами продуцента. В камере стабилизируется влажность, температура и скорость подачи воздуха. После завершения процесса культуральная жидкость сливается из кювет через вмонтированные в днища штуцеры и поступает на обработку. При твердофазной ферментации процесс также протекает в вентилируемых камерах, но вместо кювет на стеллажах размещают лотки, в которые насыпают сыпучую твердую среду слоем 10–15 мм. Для лучшей аэрации среды подаваемый в камеру воздух проходит через перфорированное днище лотков.

Аппараты для аэробной глубинной ферментации наиболее сложны как конструктивно, так и с точки зрения их эксплуатации. Главная задача, возникающая при их конструировании, – обеспечение высокой интенсивности массо- и энергообмена клеток со средой. Массообмен определяется транспортом (переносом) кислорода и других биогенных элементов из среды в микробную клетку и отводом из нее продуктов обмена. Главным показателем массообменных характеристик ферментатора служит *коэффициент массопередачи кислорода*, так как кислород является основным лимитирующим фактором аэробных ферментационных процессов. Расход кислорода на образование 1 кг биомассы, в зависимости от типа углеродосодержащего сырья и степени его восстановленности, может составлять от 0,75 до 5,00 кг. Клетки способны утилизировать кислород только в растворенном виде, поэтому необходимо постоянно поддерживать его концентрацию в культуре на уровне, оптимальном для конкретного продуцента. При этом скорость поступления кислорода к клеткам должна превышать скорость его включения в клетки и в околклеточном пространстве не должно возникать так называемых «концентрационных ям». Кроме этого, концентрации клеток и растворенного субстрата должны быть равномерными по всему объему ферментатора. Поэтому перемешивание является также одним из основных факторов, обеспечивающих требуемую гидродинамическую обстановку в аппарате. При интенсивном перемешивании пузырьки воздуха дробятся в аппарате и, диспергируясь, увеличивают площадь контакта фаз «среда – клетка». Однако очень сильное перемешивание может вызвать механическое повреждение биологических объектов.

К настоящему времени разработано и применяется огромное количество разнообразнейших перемешивающих и аэрирующих устройств, и классифицировать их практически невозможно. Наиболее удачна, по нашему мнению, попытка классификации ферментационных

аппаратов для аэробной глубинной ферментации по подводу энергии для перемешивания (Виестур и др., 1986, табл. 2.4). Согласно этой классификации аппараты такого типа делятся на три группы по подводу энергии: 1 – к газовой фазе (ФГ), 2 – к жидкой фазе (ФЖ), 3 – комбинированный подвод (ФЖГ).

Таблица 2.4

Классификация ферментаторов по способу ввода энергии для перемешивания

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

Ферментаторы с подводом энергии к газовой фазе (рис. 2.7). Их общий признак – подвод энергии в аппарат через газовую фазу, которая является ее носителем. Ферментаторы характеризуются достаточно простой конструкцией (отсутствуют трущиеся, движущиеся узлы), высокой эксплуатационной надежностью, но имеют не очень высокие массообменные характеристики (коэффициент массопередачи кислорода менее $4 \text{ кг/м}^3 \cdot \text{ч}$). Данные аппараты представляют собой вертикальную емкость, снабженную газораспределительным устройством одного из известных типов.

Барботажный – газораспределительное устройство данного типа обычно устанавливается в нижней части аппарата; подаваемый сверху

через распределительную трубу воздух, пройдя через барботер, насыщает кислородом толщу среды. Коэффициент массопереноса кислорода невысок, 1–2 кг/м³·ч.

Барботажно-колонный – в нижней части корпуса такого аппарата устанавливается перфорированная пластина с диаметром отверстий 0,0005 м или сопловой эжектор с диаметром сопла 0,004 м.

Барботажно-эрлифтный аппарат характеризуется наличием внутри одного или нескольких диффузоров («стаканов») или нескольких перегородок для принудительного разделения восходящих и нисходящих потоков циркулирующей жидкости; эти элементы расположены равномерно по сечению аппарата или концентрично.

Газлифтный колонный ферментатор состоит из двух колонн разного диаметра, соединенных между собой; одна представляет собой барботажную колонну с восходящим потоком воздуха, другая – циркуляционную с нисходящим потоком. Воздух вводится в нижнюю зону аппарата, в барботажную колонну; камера, соединяющая колонны в верхней части аппарата, образует большую поверхность контакта фаз.

Трубчатый аппарат сконструирован по типу теплообменных труб; взаимодействие газа в трубе при высоких скоростях продувки более интенсивное, чем в большом объеме, поэтому массообмен интенсивнее.

Аппарат *с плавающей насадкой* позволяет интенсифицировать массообмен за счет увеличения поверхности контакта фаз и турбулизации жидкости при работе с большими скоростями подачи газовой и жидкой фаз. В аппарат введены секционные элементы в виде решеток, оборудованных лопастной насадкой; в центре аппарата находится труба, через которую вводится воздух, а жидкая фаза поступает противотоком сверху. Газ, поступая в лопастную насадку, сделанную обычно из полиэтилена, вращает ее; это существенно увеличивает поверхность контакта газовой и жидкой фаз.

Ферментаторы с вводом энергии жидкой фазой (рис. 2.8) наиболее сложны по конструкции и энергоемки, но обеспечивают более высокие по сравнению с группой ферментаторов ФГ значения коэффициента массопередачи кислорода, свыше 6 кг/м³·ч. В данных аппаратах ввод энергии осуществляется жидкой фазой, обычно самовсасывающими мешалками или насосами; в последнем варианте жидкость вводится в аппарат через специальное устройство (сопло, эжектор, диспергатор). Данные аппараты также можно подразделить на ряд типов.

Ферментаторы *с самовсасывающими мешалками* не требуют специальных воздуходувных машин, так как поступление в них воздуха происходит в результате разрежения в воздушной камере мешалки, со-

единенной с воздухопроводом и с жидкостью, отбрасываемой лопатками мешалки.

В эжекционных ферментаторах возможна рециркуляция газовой фазы, что экономит субстрат, однако требуется наличие специальных насосов для перекачки газосодержащей культуральной среды. Применение эжекционного ввода газовых субстратов в ферментатор может интенсифицировать массообмен на порядок.

Струйные ферментаторы (с затопленной или падающей струей) оборудуются мощными насосами, которые забирают культуральную жидкость из нижней части аппарата и через напорный трубопровод подводят поток к аэрирующему устройству (по типу шахтного перепада или напорно-струйные). Струя жидкости под давлением свободно падает сверху и пронизывает аэрируемую жидкость до дна аппарата. Происходит интенсивная турбулизация и перемешивание жидкости. Внизу жидкость вновь засасывается насосом и снова подается вверх аппарата, т. е. возникает замкнутый контур циркуляции. Недостатком данных аппаратов являются потери энергии при перекачке жидкости, трудности проектирования в связи с отсутствием надежных методик расчета конструкций и режимов работы струйных и эжекционных устройств.

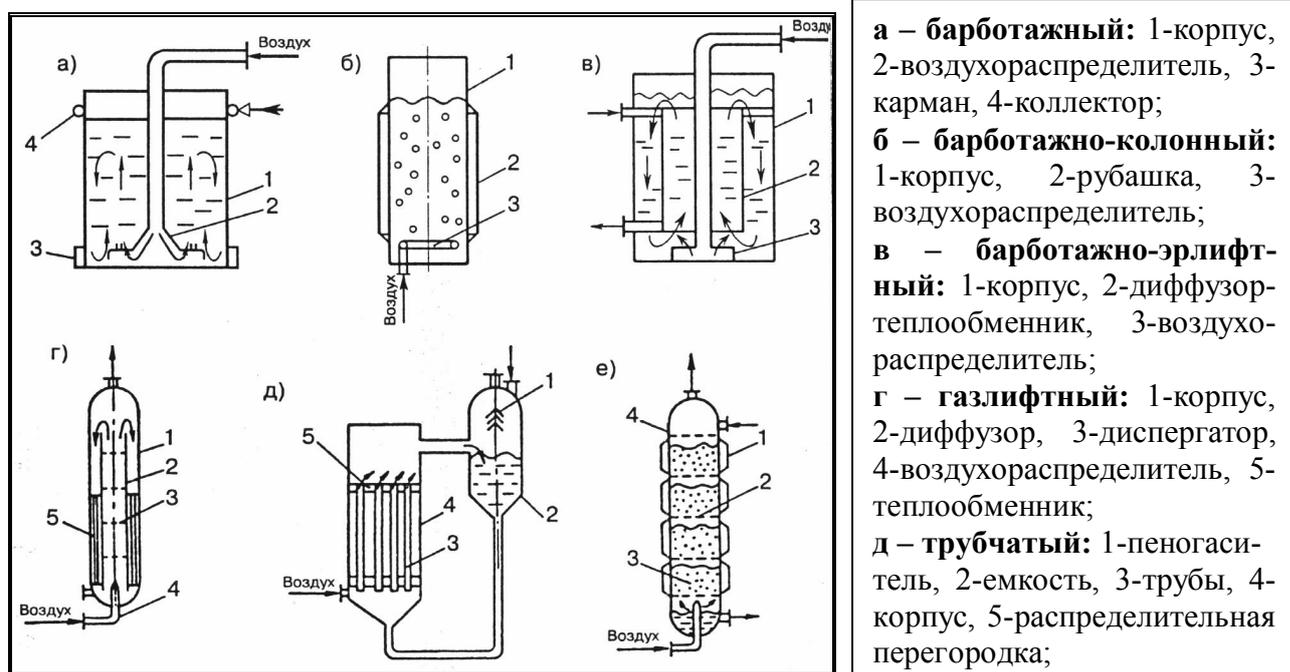


Рис. 2.7. Ферментаторы с подводом энергии газовой фазой (группа ФГ)

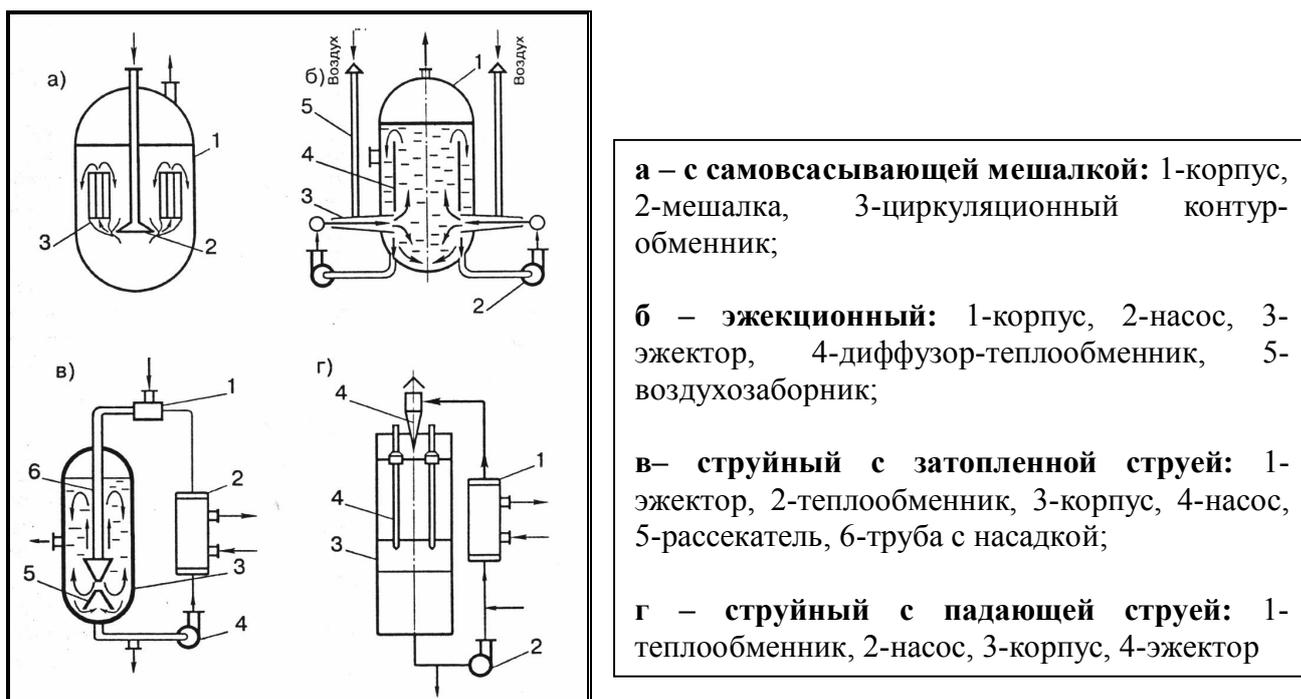


Рис. 2.8. Ферментаторы с вводом энергии жидкой фазой (группа ФЖ)

Третья группа аппаратов – с подводом энергии газовой и жидкой фазы (группа ФЖГ). Основными их конструкционными элементами являются перемешивающие устройства всех известных типов, а также наличие в совокупности насосов и перемешивающих устройств. Это могут быть аппараты с группой самовсасывающих мешалок и насосом для перекачивания культуральной жидкости и другие сочетания перемешивающих и аэрирующих устройств. Коэффициент массопереноса кислорода в таких ферментаторах может в принципе иметь любой из известных значений. Ферментаторы периодического действия из групп ФЖГ применяют с 1944 г. в промышленности для получения антибиотиков, витаминов и других биологически активных веществ. Их конструкции обеспечивают стерильность ферментации в течение длительного времени (нескольких суток) при оптимальных условиях для роста и жизнедеятельности продуцента.

Прогресс в области получения клеточных и рекомбинантных культур выдвигает специальные требования к биореакторам. При этом на первый план выдвигаются такие показатели, как стабильность биологических агентов, повышенные требования к асептике, лимитация срезовых условий при перемешивании и др.

2.2.4. Продукты

Все продукты, получаемые в биотехнологии, можно разделить на две группы:

1. Продукты основной биотехнологии – крупнотоннажные производства с невысокой степенью очистки:

– технические ферментные препараты: протеазы (для облагораживания некоторых видов мяса, обработки шкур); амилазы (для частичного гидролиза крахмала в крахмалсодержащих видах пищевого сырья, обработки муки), пектиназы (для осветления соков);

– пищевые добавки или сырье для их приготовления (белок одноклеточных организмов);

– микробиологические средства защиты растений, часто представляющих собой высушенную культуру микроорганизмов, патогенных для насекомых-вредителей сельского хозяйства;

– метаболиты для использования в пище и кормах: первичные метаболиты – аминокислоты, витамины, кислоты (лимонная кислота), спирты, растворители; вторичные метаболиты – антибиотики для медицины и ветеринарии.

2. Продукты тонкой биотехнологии – комплекс процессов и производств, ориентированный на получение высокоочищенных продуктов:

– высокоочищенные ферментные препараты, используемые в медицине в качестве лекарственных средств, при обработке пищевых продуктов, в качестве аналитических реагентов в клинической лабораторной диагностике и производстве (при контроле за ходом технологических процессов и качества готовой продукции химической технологии и биотехнологии);

– действующие основы лекарственных средств (инсулин и другие вещества гормонального действия).

2.3. КРИТЕРИИ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОЦЕССОВ

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

Скорость роста (увеличения биомассы) организмов с бинарным делением в хорошо перемешиваемой среде в периодической культуре будет пропорциональна концентрации микробной биомассы:

$$dX/dt = \mu X$$

где dX/dt – скорость роста, X – концентрация биомассы, μ – коэффициент пропорциональности («удельная скорость роста»); параметр аналогичен сложным процентам (например, если удельная скорость роста равна 0.1 ч^{-1} , значит, увеличение биомассы равно 10 % в час). Если величина μ постоянна, как это бывает в установившемся режиме культивирования, то интегрирование представленного уравнения имеет вид

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

где X_0 — биомасса в начальный период времени t .

График зависимости $\ln X_0$ от времени будет иметь вид прямой линии с наклоном μ . Удельная скорость роста является одним из основных параметров, характеризующих физиологическое состояние продуцента; ряд других параметров может быть выражен через этот показатель.

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

$$P = q_S Y_{P/S} X [\text{г/л} \cdot \text{час}],$$

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

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

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

$$Y = \frac{X}{S_0 - S}$$

где S и S_0 — конечная и исходная концентрация субстрата.

Данный коэффициент выражает эффективность использования субстрата для получения целевого продукта и является очень важной харак-

теристикой, так как непосредственно связан с продуктивностью и позволяет влиять на себестоимость конечного продукта. Экономический коэффициент имеет четкий физический смысл, характеризующий степень перехода энергии, заключенной в субстрате, в продукт. Данная величина для расчетов и прогнозирования процесса в целом используется в качестве параметра для контроля и управления ходом различных процессов и сопоставления их эффективности.

Конечная концентрация продукта должна планироваться с учетом продолжительности процесса и величины выхода продукта. Достижение конечной высокой концентрации продукта оправдано, когда трудоемки и дорогостоящи этапы постферментационной стадии (выделение, концентрирование).

Удельные энергозатраты существенно варьируют в зависимости от направленности и схемы процесса ферментации, а также условий подготовки сырья на предферментационной стадии и от постферментационных процедур. Удельные энергозатраты очень существенно также зависят от типа ферментационного оборудования.

Непродуктивные затраты субстрата (h) – затраты энергии субстрата, которые не проявляются в приросте продукта. В общем виде они выражаются через экономический коэффициент:

$$h = \frac{Y_{\text{экспериментальный}}}{Y_{\text{теоретический}}} \leq 1.$$

Непродуктивные затраты существенно влияют на эффективность и экономику биотехнологического процесса, поэтому выявление причин и мест дополнительных трат энергетического субстрата очень важно. Непродуктивные затраты субстрата могут быть связаны с ошибками при считывании генетической информации в ходе быстрого роста продуцента и из-за возрастания трат энергии на поддержание жизни без размножения (транспорт субстратов и мономеров в клетке, защитные реакции, процессы репарации).

Первичная оценка эффективности биотехнологических процессов по перечисленным параметрам проводится на стадии лабораторных работ и испытаний процесса и далее уточняется при масштабировании на опытных и опытно-промышленных стадиях.

2.4. КОНТРОЛЬ И УПРАВЛЕНИЕ BIOTEХНОЛОГИЧЕСКИМИ ПРОЦЕССАМИ; МОДЕЛИРОВАНИЕ И ОПТИМИЗАЦИЯ

Эффективное проведение биотехнических процессов тесно связано с совершенствованием *способов контроля и управления*. В период предыстории биотехнологии делались отдельные попытки регулировать развитие продуцента с помощью изменений параметров внешней среды. До середины XX в. регулирование в основном сводилось к эмпирике, так как без знаний сущности происходящего невозможно эффективно контролировать и управлять процессом. В основном объектом управления в тот период была экстенсивная периодическая культура микроорганизмов со всеми ее недостатками: динамикой состояния продуцента и среды, отсутствием средств контроля.

В последние 25 лет с внедрением управляемых культур биотехнологи переходят от простой задачи поддержания определенных параметров среды к управлению процессом в целом. Для реализации управляемого культивирования необходимо построение алгоритмов управления, основанных на моделях биотехнологического процесса. Моделирование является одним из наиболее значимых направлений при разработке биотехнологических процессов, так как с помощью моделирования, *экспериментального и математического*, исследуются и разрабатываются новые процессы, совершенствуются аппараты и технологические схемы производств.

При *экспериментальном моделировании* в лабораторных и промышленных условиях применяются, как правило, модели объектов процессов, отличающимися масштабами. Экспериментальное моделирование позволяет исследовать и оптимизировать процессы, сущность которых мало изучена. Данный подход часто служит единственным средством для исследования биотехнологического процесса. Первым этапом экспериментального моделирования служит лабораторный уровень, на котором при сравнительно небольших затратах проводится изучение новых продуцентов и разработка новых процессов. Далее полученные результаты переносят в опытные, полупромышленные и промышленные масштабы. На опытных установках отрабатываются все технологические детали будущего процесса, обучается персонал, создается оборудование, уточняются технико-экономические показатели. Затем проводятся крупномасштабные дорогостоящие промышленные эксперименты и испытания. Экспериментальное моделирование имеет ряд особенностей: трудоемкость, сложность реализации новой модели процесса. Наиболее трудны при этом вопросы масштабирования технологии и оборудования. Развитие биологических агентов связано не только с поведением жидкости и реагентов в ферменте, но и с их собственным метаболизмом. Поэтому масштабирование в биологии требует специальных ре-

шений, при этом до настоящего времени нет единого подхода к данной задаче.

Для оптимизации и управления биотехнологическими процессами, помимо экспериментального, необходимо также привлечение *математического моделирования*. Эти два подхода дополняют друг друга и позволяют более эффективно решать поставленные задачи. Экспериментальное моделирование часто предшествует математическому, являясь для него источником информации. Математические модели – удобное средство обобщения экспериментальных данных. Известны *неструктурированные* модели, предполагающие простейший подход к моделированию роста культуры клеток и описывающие только количество биологической фазы (биологического агента), и *структурированные* модели (*компаратментальные* и *метаболические*), учитывающие состав биофазы. Причем компартментальные модели являются более простыми и включают небольшое число переменных, а метаболические модели являются более сложными и включают все ключевые детали метаболизма. Наличие математических моделей позволяет более обоснованно подходить к планированию экспериментов и обрабатывать данные, существенно сокращать объем экспериментальных работ.

Оптимизация биотехнологических процессов осуществляется на основе сочетания экспериментального и математического моделирования и применения современных методов оптимизации (динамического и нелинейного программирования, вариационного исчисления). Однако в настоящее время для оценки оптимальности биотехнологических процессов трудно даже подобрать критерии. Как правило, на первых этапах оптимизируются отдельные звенья, стадии, параметры процесса и только потом весь процесс в целом, что наиболее эффективно.

Моделирование и оптимизация биотехнологических процессов – задача сложная и во многом еще неразрешенная, однако именно разработка адекватных моделей разных биотехнологических процессов и создание на этой основе современных методов оптимизации и управления важнейших направлений биотехнологии, без которых невозможен прогресс.

2.5. СИСТЕМЫ GLP и GMP В СВЯЗИ С КАЧЕСТВОМ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОДУКТОВ

В целях организации качественного проведения доклинических испытаний лекарственных и других биологически активных веществ (пищевых добавок, агрохимикатов и др.) в промышленно развитых странах (Англии, Германии, США, Франции, Японии и др.) утверждены единые

правила системы GLP (Good Laboratory Practice). Существует группа GLP в Европейском Центре по экологии и токсикологии химической промышленности; в США система GLP действует с июня 1979 г. Главными в такой системе являются следующие основные действия:

- заблаговременная разработка стандартной методики проведения испытаний, или SOP (Standard Operating Procedure) применительно ко всем ее этапам;

- назначение руководителя и ответственного за каждый вид испытаний;

- каждому ответственному исполнителю поручается строго выполнять все операции в отведенных ему пределах;

- результаты выполнения операций должны быть внесены в специальный протокол, датированы и подписаны;

- в случае выполнения сложных операций во избежание ошибок рекомендуется прибегать к двойной проверке;

- в установленном порядке исполнитель докладывает руководителю о ходе испытаний. Руководитель должен быть компетентным во всех делах, связанных с испытанием;

- фактические данные, записи и препараты (вещества) должны храниться в полном порядке таким образом, чтобы всегда можно было отыскать требуемое (необходимое);

- окончательный отчет по своему содержанию должен отражать свежие и еще не обработанные данные, а также сопровождаться обсуждением, составленным ответственным исполнителем; на отчете проставляются дата и подписи (ответственного исполнителя и лиц, подтверждающих содержание отчета;

- должна быть служба качественной оценки испытаний – QAU (Quality Assurance Unit). Лица, занятые в этой службе, обязаны стремиться к тому, чтобы свою внутреннюю инспекцию проводить в установленном порядке и по необходимости выдавать рекомендации, направленные на совершенствование процессов проведения испытаний.

На систему GLP опираются в случаях испытания веществ на микробную обсемененность, на пирогенность; острую, подострую и хроническую токсичность, на специфическую токсичность (канцерогенность, антигенность, лекарственную зависимость, мутагенность, тератогенность, цитотоксичность); на безопасность для макроорганизма при введение *in vivo* (адсорбция, распределение, скорость выведения, метаболизм). Проводят фармакологические испытания с оценкой фармакокинетики (действие изучаемого препарата на организм) и фармакодинамики (изучение силы действия лекарственного вещества).

В связи с необходимостью проведения названных испытаний создают специальные группы: общую (в том числе для контроля за гигиеной и санитарией личного состава), микробиологическую, метаболизма, общепармакологических испытаний, общих клинических исследований, патологоанатомическую, проведения экспериментов на животных, обработки данных (с включением управления ЭВМ), по приготовлению проб, аналитическую, по управлению исследованием и, при необходимости, другие. Во главе каждой группы утверждается руководитель, который не должен совмещать свои прямые обязанности с работой в группе инспекций.

Соблюдение требований системы GLP должно быть подкреплено совершенством организации всех вспомогательных служб и достаточным материальным обеспечением.

Одобренный препарат (вещество) после лабораторных предклинических испытаний по системе GLP и последующей клинической проверки разрешается к выпуску в условиях промышленного производства. Для обеспечения изготовления высокого качества продукта Всемирная Организация Здравоохранения (ВОЗ) еще в 1968 г. утвердила «Требования для практики качественного производства при изготовлении и контроле качества лекарств и к специалистам в области фармации». Годом позже эти требования, вошедшие в правила системы GMP (Good Manufacturing Practice), были рекомендованы Ассамблеей ВОЗ для международной торговли, а в 1971 г. они были изданы в качестве приложения ко второму изданию Международной Фармакопеи.

GMP – это единая система требований по контролю качества лекарственных средств с начала переработки сырья до производства готовых препаратов, включая общие требования к помещениям, оборудованию и персоналу. С 1975 г. требования GMP расширены, и они касаются различных химических и биологических веществ в индивидуальном виде, ветеринарных препаратов, применяемых в животноводстве; исходных материалов для использования в дозированных формах, если они включены в законодательства стран-экспортеров и стран-импортеров; и, наконец, информацию о безопасности и эффективности перечисленных веществ, материалов и препаратов.

С учетом издания в 1987 г. руководств Международной Организации Стандартизации (ISO) серии ISO 9000–9004 по системам качества возникла необходимость пересмотреть существовавшие требования GMP. В сентябре 1991 г. на специальной конференции по GMP в г. Москве представлен пересмотренный проект требований GMP, включающий три части:

1. «Управление качеством в промышленном производстве лекарственных средств: философия и основные составляющие».
2. « Практика качественного производства и контроль качества».
3. « Дополнительные и вспомогательные направления».

Первая часть содержит 12 разделов, касающихся организации контроля за качеством производства, санитарии и гигиены, заключения контрактов, стандартных рабочих методик, оформления необходимой документации и др.

Вторая часть содержит два раздела – производство и контроль качества. Применительно к производству лекарственных веществ указано, что оно должно опираться на принцип четкого соблюдения методов ведения технологического процесса согласно нормативно-технической документации с целью получения продукта требуемого качества и в соответствии с разрешением на его изготовление и продажу. По возможности избегать любых отклонений от методик или инструкций. При наличии таких отклонений необходимо согласование, разрешение, утверждение и подпись назначенного ответственного лица, а при необходимости – привлечение службы отдела контроля качества.

Операции с различными продуктами не должны выполняться одновременно и последовательно в одном и том же помещении, пока не устранен риск перемешивания или перекрестного загрязнения.

Доступ в производственные помещения должен быть ограничен лишь определенным кругом лиц, занятых в производстве. Избегать изготовления немедицинской продукции в зонах и на оборудовании, предназначенных для изготовления фармацевтической продукции. При работе с сухими материалами и продуктами необходимы меры предосторожности для предупреждения возникновения, накопления и распространения пыли, что может привести к перекрестному загрязнению изготавливаемых продуктов или к их микробному загрязнению. Перекрестное загрязнение может быть предотвращено изготовлением каждого целевого продукта в отдельных зонах или по крайней мере разделением изготовления их по времени; обеспечением соответствующих воздушных шлюзов; ношением защитной технологической одежды; использованием средств эффективной деконтаминации оборудования, стен и пр.; использованием «закрытых систем» производства и т. д.

Необходимо проверять правильность и надежность сочленения трубопроводов и другое оборудование, используемое для транспортировки продуктов (материалов) из одной зоны в другую. Дистиллированная или деионизированная вода, поступающая по трубам, должна соответствовать санитарно-микробиологическим нормативам. Операции по

техническому обслуживанию или ремонту не должны сказываться на качестве продукции.

Контроль качества продукции касается процесса забора проб, проведения исследований, документации и пр. Все исследования должны проводиться согласно утвержденным инструкциям для каждого материала или продукта.

Забор проб осуществляют таким образом, чтобы не загрязнить их или не подвергнуть нежелательному воздействию, сказывающемуся на качестве продукта или, напротив, чтобы отбираемый материал не был токсичным для здоровья оператора.

Для каждой партии продукта до выпуска должна иметься лабораторная документация с подтверждением соответствия конечного продукта спецификациям.

Из каждой партии целевого продукта оставляют пробы на хранение при рекомендуемых условиях сроком не менее года, превышающего срок годности. Пробы должны храниться в таком количестве, чтобы можно было при необходимости провести, как минимум, два повторных исследования.

Третья часть требований GMP включает разделы о стерильных фармацевтических продуктах и практике качественного производства основной массы лекарственных субстанций.

Необходимо помнить о том, что лица, обладающие повышенной чувствительностью к конкретному веществу, не должны включаться в группу исполнителей. Для них допустима работа в отделении или цехе упаковки, где исключен контакт с аллергеном.

В 1991 г. правила GMP утверждены в нашей стране применительно к производству и контролю качества лекарственных средств. Эти правила соответствуют Международной системе GMP и включают следующие разделы: введение, терминология, персонал, здания и помещения, оборудование, процесс производства, отдел технического контроля, аттестация и контроль производства. Выделены требования к стерильным лекарственным средствам и описаны особенности их производства.

Соблюдение правил GMP обеспечивает выпуск качественных продуктов и гарантирует благополучие потребителей.

ГЛАВА 3. ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

Генная инженерия – это раздел молекулярной генетики, связанный с целенаправленным созданием новых комбинаций генетического материала. Основа прикладной генетической инженерии – теория гена. Созданный генетический материал способен размножаться в клетке-хозяине и синтезировать конечные продукты обмена.

Генетическая инженерия возникла в 1972 г. в Станфордском университете США. Тогда лаборатория П. Берга получила первую рекомбинантную (гибридную) ДНК. Она соединяла в себе фрагменты ДНК фага лямбда, кишечной палочки и обезьяньего вируса SV40.

Генная инженерия – это направление исследований в молекулярной биологии и генетике, конечной целью которых является получение с помощью лабораторных приемов организмов с новыми, в том числе и не встречающимися в природе, комбинациями наследственных свойств. В основе генной инженерии лежит обусловленная последними достижениями молекулярной биологии и генетики возможность целенаправленного манипулирования с фрагментами нуклеиновых кислот. К этим достижениям следует отнести установление универсальности генетического кода, т. е. факта, что у всех живых организмов включение одних и тех же аминокислот в белковую молекулу кодируются одними и теми же последовательностями в цепи ДНК; успехи генетической энзимологии, представившей в распоряжение исследователя набор ферментов, позволяющих получить в изолированном виде отдельные гены или фрагменты нуклеиновой кислоты, осуществлять *in vitro* синтез фрагментов нуклеиновых кислот, объединить в единое целое полученные фрагменты. Таким образом, изменение наследственных свойств организма с помощью генной инженерии сводится к конструированию из различных фрагментов нового генетического материала и введение его в реципиентный организм, создания условий для его функционирования и стабильного исследования.

3.1. ДНК и РНК

Нуклеиновые кислоты представляют собой высокомолекулярные гетерополимеры с молекулярной массой до десяти миллионов, которые в результате гидролиза дают эквимолекулярную смесь гетероциклических аминов, пентозы и фосфорной кислоты. Они играют главную роль в передаче наследственных признаков (генетической информации) и управлении процессом биосинтеза белка. Впервые были выделены швейцарским биологом Ф. Мишером (1869 г.) из ядер клеток.

Нуклеиновые кислоты относят к одному из двух классов: РНК (рибонуклеиновая кислота) и ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота); при полном гидролизе РНК образуется пентоза D-рибоза, а при гидролизе ДНК образуется 2-дезокси-D-рибоза. Неполный гидролиз нуклеиновых кислот дает нуклеотиды, которые могут быть гидролизованы до фосфорной кислоты и нуклеозидов. При гидролизе нуклеозида получают гетероциклический амин (или нуклеиновое основание) и соответствующую пентозу.

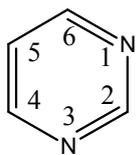
Длина молекул ДНК в клетках человека достигает нескольких сантиметров. Возможно, что ДНК каждой хромосомы представляет собой единую гигантскую молекулу или небольшое число таких молекул. Общая длина ДНК в 23-х парах хромосом человека равна примерно 1,5 м. Клетки бактерий часто содержат единственную молекулу ДНК. Молекулы РНК короче: длина их обычно не превышает 0,01 мм.

Основная часть ДНК находится в ядре клетки; небольшое количество ДНК имеется в митохондриях (около 0,2 % от всей клеточной ДНК). РНК отличаются большим разнообразием молекул и обнаруживаются во всех частях клетки.

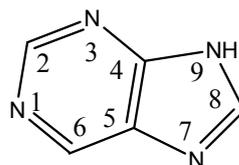
3.1.1. Структурные элементы нуклеиновых кислот

Нуклеиновые кислоты состоят из последовательности химически связанных структурных единиц – нуклеотидов. Каждый нуклеотид построен из трех компонентов: фосфорной кислоты, моносахарида пентозы и гетероциклического азотистого основания – производного пиримидина или пурина.

Азотистые основания

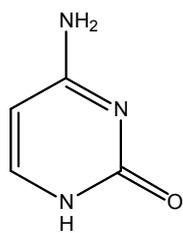


пиримидин

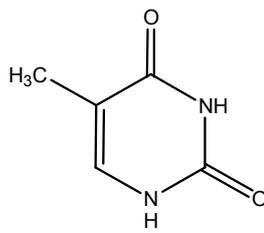


пурин

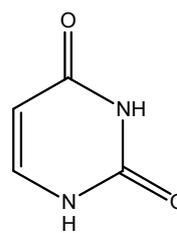
Пиримидиновые основания, представленные в нуклеиновых кислотах, следующие:



цитозин (С)

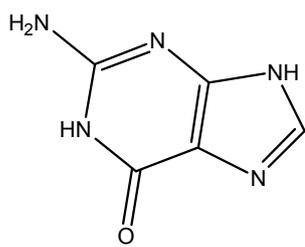


тимин (Т)

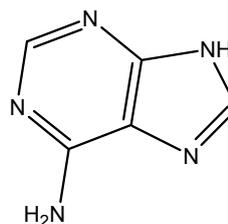


урацил (U)

Пуриновые основания, представленные в нуклеиновых кислотах, – это:



гуанин (G)



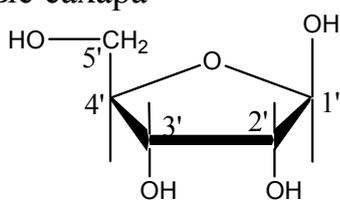
аденин (A)

Три из этих оснований – аденин (A), гуанин (G) и цитозин (C) типичны как для ДНК, так и для РНК. Тимин (T) входит только в состав ДНК, а урацил (U) – только в РНК.

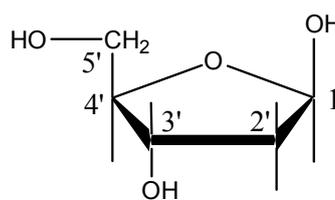
В состав каждой нуклеиновой кислоты входят четыре основания, таким образом:

- ДНК содержит аденин (A), гуанин (G), цитозин (C) и тимин (T);
- РНК содержит аденин (A), гуанин (G), цитозин (C) и урацил (U).

Моносахарид пентоза. В нуклеиновых кислотах представлены пятичленные сахара



D-рибоза
(β-D-рибофураноза)
входит в состав РНК

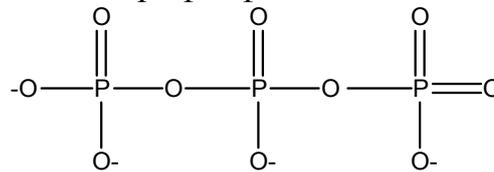
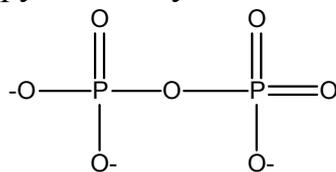
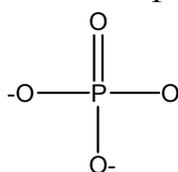


D-дезоксирибоза
(β-D-дезоксирибофураноза)
входит в состав ДНК

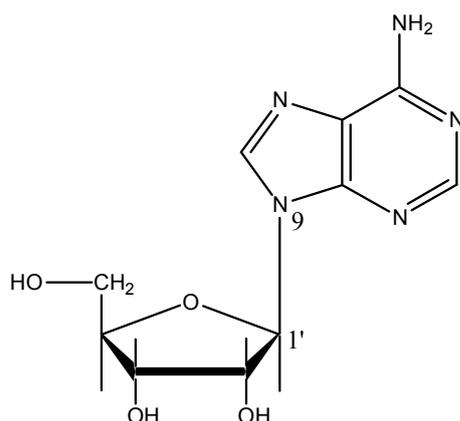
Чтобы избежать путаницы между нумерацией азотистых оснований и пентоз, атомы углерода в пентозах нумеруются со штрихом.

Фосфатные группы – остатки фосфорной кислоты, находящиеся в виде анионов: именно они придают всей структуре кислотные свойства.

Фосфатные группы могут быть моно-, ди- или трифосфатными:

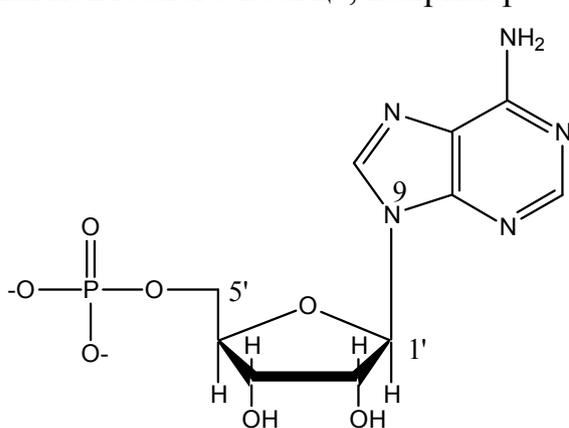


Соединения основания и пентозы называют *нуклеозидом*. Связь (β-гликозидная) образована первым атомом углерода пентозы (C-1') в пиримидиновых нуклеозидах (N-1) и девятым атомом азота (N-9) в пуриновых нуклеозидах:

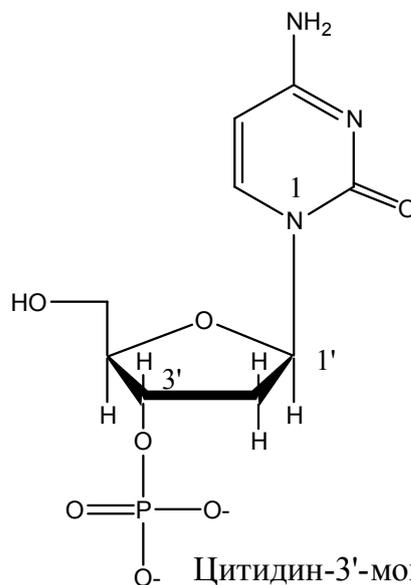


аденозин

Нуклеотиды представляют собой нуклеозидмонофосфаты, при этом фосфатная группа в нуклеотидах может находиться в 5' или 3' положении пентозного кольца, например:



Аденозин-5'-монофосфат
или аденилат (АМР)



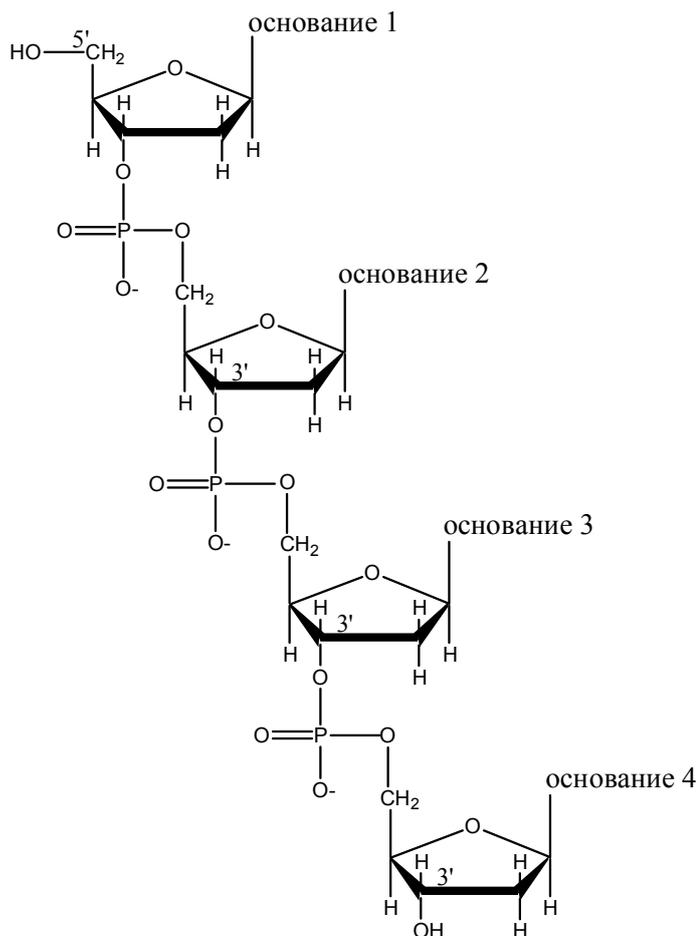
Цитидин-3'-моно-
фосфат (dCMP)
или дезоксицитидилат

Дезоксирибонуклеотиды в организме используются для образования ДНК. Функции рибонуклеотидов более разнообразны. Основная их масса расходуется на образование РНК. Кроме того, рибонуклеотиды выполняют роль коферментов в некоторых трансферзных реакциях (в частности, при синтезе полисахаридов).

3.1.2. Первичная структура нуклеиновых кислот

При действии ферментов, относящихся к группе нуклеаз (РНК-азы, ДНК-азы), полинуклеотиды (ДНК и РНК) образуются путем конденсации мономеров – мононуклеотидов, которые соединены между собой по типу 5'-3'-связи, т. е. соединение происходит путем образования слож-

ноэфирных связей между остатком фосфорной кислоты одного мононуклеотида и двумя гидроксильными группами одной, находящейся у 3' углеродного атома пентозы (рибозы или дезоксирибозы), одного нуклеотида и 5' углеродного атома пентозы следующего нуклеотида. Следует отметить, что последовательность нуклеотидов имеет направление или полярность, обусловленную тем обстоятельством, что на одном конце цепи имеется свободная гидроксильная группа при C-5' (5'-конец), а на другом – свободная 3'-ОН-группа (3'-конец):



Разные нуклеиновые кислоты отличаются друг от друга числом мононуклеотидов в молекуле, нуклеотидным составом и порядком чередования нуклеотидных остатков (фактически оснований, поскольку пентозофосфатные части у всех мономеров одинаковы). Для краткого изображения первичной структуры нуклеиновых кислот используют однобуквенные символы нуклеотидов: А – аденин, G – гуанин, С – цитозин, U – урацил, Т – тимин.

Первичная структура РНК может быть представлена, например, такой записью:

AUAAGUCCGAUUAC

Запись структуры ДНК отмечается приставкой “d” (дезокси-):
dAdTdAdAdGdTdCdCdGdAdTdTdAdC, или
d(ATAAGTCCGATTAC)

[эти две записи, помимо символа “d”, различаются еще и тем, что в первой записи (РНК) не встречается символ Т, а во второй (ДНК) не встречается символ U].

При такой записи предполагается, что слева находится 5'-конец, справа – 3'-конец. Иногда приходится писать полинуклеотидную цепь противоположным образом; в этом случае во избежание путаницы вводят дополнительные приставки

(5'→3') AUAAGC.....

здесь 5'-конец слева;

(3'→5') AUAAGC.....

здесь 5'-конец справа.

Из четырех разных нуклеотидов можно построить огромное количество нуклеиновых кислот, различающихся по первичной структуре. В этом отношении нуклеиновые кислоты сходны с белками.

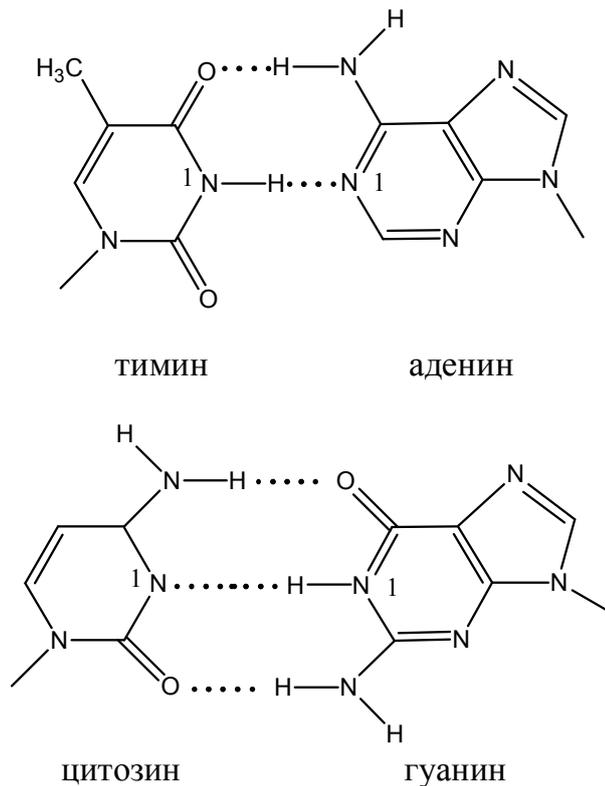
3.1.3. Вторичная структура ДНК

Особенностью нуклеотидного состава ДНК является то, что число адениловых нуклеотидов равно числу цитидиловых: A=T, G=C, следовательно, A+G=T+C, т. е. число пуриновых нуклеотидов равно числу пиримидиновых (правило Чаргаффа). Такие соотношения не свойственны РНК.

Исходя из правила Чаргаффа о нуклеотидном составе ДНК и из рентгеноструктурных исследований, Джеймс Уотсон, Фрэнсис Крик и Морис Уилкинс (Великобритания) предложили модель строения ДНК (1953). Ниже сформулированы основные черты этой модели.

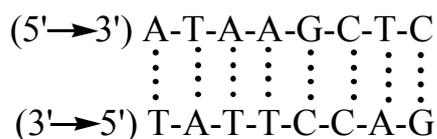
1. Молекула ДНК построена из двух полинуклеотидных цепей, ориентированных антипараллельно и на всем протяжении связанных друг с другом водородными связями (каждый из монопнуклеотидов участвует в образовании водородных связей).

2. Водородные связи между цепями образуются за счет специфического взаимодействия аденинового остатка одной цепи с тиминным остатком другой цепи (пара А...Т) и гуанинового остатка одной цепи с цитозинным остатком другой цепи (пара С...G):



Основания, образующие пару, комплементарны друг другу в том смысле, что между ними легче возникают водородные связи, чем при других сочетаниях (например, А и G, А и С и др.); это объясняется геометрией расположения групп, участвующих в образовании водородных связей между парами оснований, и геометрией молекулы ДНК в целом.

3. Первичная структура одной цепи молекулы ДНК комплементарна первичной структуре другой цепи. Это легко понять, рассматривая следующую схему:



Если в положении n (считая с 5'-конца) первой цепи находится остаток дезоксиаденилата (А), то в положении n (считая с 3'-конца) второй цепи находится комплементарный ему остаток тимидилата (Т), а не какой-либо другой мономер. Таким образом, если известна первичная структура одной цепи молекулы ДНК, то первичная структура другой цепи может быть легко написана, исходя из правил комплементарности оснований и комплементарности цепей, иначе говорят, что одна цепь является *матрицей* для другой. Следует отметить, что комплементарность цепей не означает идентичности их первичных структур.

4. Обе цепи закручены в спираль, имеющую общую ось; цепи могут быть разделены только путем раскручивания. Пуриновые и пиримидиновые основания обращены внутрь спирали; их плоскости перпендикулярны оси спирали и параллельны друг другу, так что получается стопка оснований. Между основаниями в этой стопке возникают гидрофобные взаимодействия, вносящие основной вклад в стабилизацию двойной спирали, больший, чем водородные связи между цепями. Пентозофосфатные части располагаются по периферии, образуя ковалентный остов спирали (рис. 3.1.).

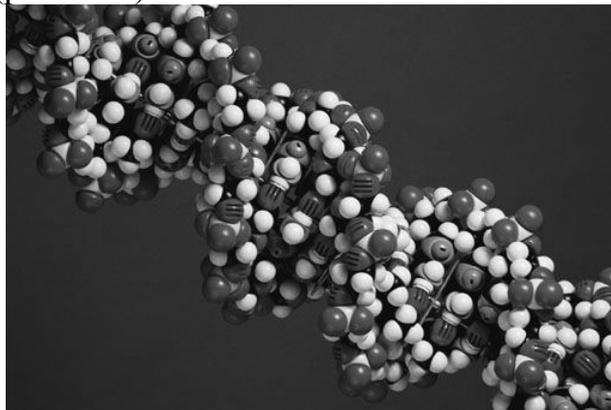


Рис. 3.1. Модель фрагмента ДНК

Структура ДНК позволяет объяснить молекулярный механизм фундаментальных биологических явлений, таких, как самовоспроизведение организмов, наследственность, изменчивость. Установление структуры ДНК – одно из выдающихся событий науки XX в. В 1962 году Джеймс Уотсон, Фрэнсис Крик и Морис Уилкинс получили Нобелевскую премию за установление структуры ДНК.

3.1.4. Вторичная структура РНК

Молекулы РНК, в отличие от ДНК, построены из одной полинуклеотидной цепи. Однако в этой цепи имеются комплементарные друг другу участки, которые могут взаимодействовать, образуя двойные спирали. При этом соединяются нуклеотидные пары А...U, G...C. Такие спирализованные участки (их называют шпильками) обычно содержат небольшое число нуклеотидных пар (до 20–30) и чередуются с неспирализованными участками (рис. 3.2):

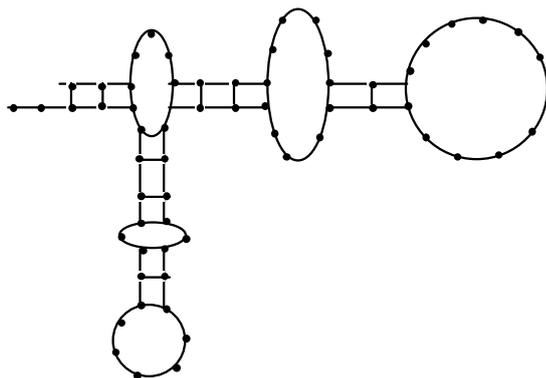


Рис. 3.2. Вторичная структура РНК

По особенностям структуры и функций различают три основных типа РНК: *рибосомные* РНК (р-РНК), *транспортные* РНК (т-РНК) и *матричные* РНК (м-РНК). Матричные РНК составляют около 2 % от всей РНК клетки. Матричные РНК называют также *информационными* РНК (и-РНК). Количество и-РНК соответствует количеству разных белков в клетке.

3.1.5. Биосинтез нуклеиновых кислот и белков (матричные биосинтезы)

Первичную структуру важнейших биополимеров – белков и нуклеиновых кислот – можно сравнить с буквенной записью: и в том, и в другом случае имеется не произвольное, а строго определенное, «имеющее смысл» чередование элементов – мономеров или букв. На этом основании нуклеиновые кислоты и белки называют *информационными молекулами*. Чтобы получить такие молекулы, недостаточно смешать мономеры и обеспечить условия образования пептидной или фосфодиэфирной связи, необходима еще программа, определяющая последовательность присоединения разных мономеров к растущей цепи полимера. При биосинтезе новых молекул нуклеиновых кислот и белков носителями такой программы являются нуклеиновые кислоты; в этой роли их называют *матрицами*. Матрица в ходе матричного синтеза не расходуется и может использоваться многократно; в этом отношении она сходна с катализатором.

Различают три основных типа матричных биосинтезов:

- 1) биосинтез ДНК (репликация ДНК) с использованием в качестве матрицы уже существующих молекул ДНК;
- 2) биосинтез РНК на матрице ДНК (транскрипция);
- 3) биосинтез белков с использованием в качестве матрицы РНК (трансляция).

Биосинтез РНК (транскрипция)

Синтез и-РНК происходит в присутствии ДНК, выполняющей роль матрицы (матрицей служит одна из цепей ДНК). Синтез РНК происходит в направлении от 5'-конца к 3'-концу. Все синтезированные молекулы и-РНК имеют структуру, комплементарную матрице (т. е. одной из цепей ДНК). Транскрипция катализируется ферментом РНК-полимеразой. Фермент присоединяется к матрице не в любом ее месте, а в специальных участках, называемых *промоторами*: в этих местах молекулы ДНК есть последовательности нуклеотидов, узнаваемые РНК-полимеразой. Связывание РНК-полимеразы с промотором приводит к локальному расхождению нуклеотидных цепей в этом участке; одна из цепей служит матрицей. Нарастивание молекулы РНК происходит в результате перемещения РНК-полимеразы вдоль ДНК путем присоединения очередного рибонуклеотида, комплементарного тому дезоксирибонуклеотиду ДНК, который в данный момент находится в области активного центра РНК-полимеразы. В участке ДНК, где заканчивается ген, имеется последовательность нуклеотидов (терминирующий кодон), достигнув которого РНК-полимераза и синтезированная РНК отделяются от ДНК. Таким образом получают отдельные молекулы РНК, каждая из которой содержит информацию одного гена или группы генов (называемой *опероном*), несущих информацию о структуре белка, необходимого для выполнения одной функции.

Биосинтез белка (трансляция)

Биосинтез белков отличается от других типов матричных синтезов двумя принципиальными особенностями:

1) нет соответствия между числом мономеров в матрице и продукте реакции (в и-РНК 4 разных нуклеотида, а в белке 20 разных аминокислот);

2) структура рибонуклеотидов (мономеров матрицы) и аминокислот (мономеров продукта) такова, что избирательные взаимодействия между ними, подобные образованию пар А–Т, С–G, невозможны, иначе говоря, между и-РНК (матрицей) и пептидной цепью белка (продуктом) нет комплементарности.

Из этого следует, что механизм использования матрицы при синтезе белков должен быть иным, чем в случае синтеза ДНК и РНК. Если репликацию и транскрипцию можно сравнить просто с переписыванием текста, то трансляция – это дешифровка, декодирование информации об аминокислотной последовательности, закодированной с помощью нуклеотидной последовательности. Способ шифровки в нуклеиновых кислотах информации о первичной структуре белков получил название

биологического кода (его называют также генетическим, нуклеотидным, аминокислотным кодом).

Биологический код – система записи информации о последовательности расположения аминокислот в белках с помощью последовательности расположения нуклеотидов в и-РНК.

Один из первых вопросов, который возникает при выяснении структуры биологического кода, – это вопрос о *кодovém числе*, т. е. о числе нуклеотидных остатков, кодирующих включение в белок одной аминокислоты. Очевидно, что кодоеое число не может быть равным единице, так как в этом случае с помощью четырех нуклеотидов можно было закодировать только четыре аминокислоты. При кодоеоем числе 2 количество разных нуклеотидных пар будет равно числу перестановки из четырех элементов по 2, т. е. равно $4^2=16$, что также недостаточно для кодирования всех аминокислот. Число разных троек нуклеотидов равно $4^3=64$. Это в три с лишним раза превышает минимальное число, необходимое для кодирования 20-ти аминокислот. Экспериментально доказано, что в биологическом коде кодоеое число равно трем: тройку нуклеотидных остатков (триплет), кодирующих включение одной аминокислоты, называют *кодоеоем*.

Из 64 триплетов 61 используется для кодирования аминокислот, а три – UAA, UAG и UGA – обозначают конец матрицы: на этих триплетах обрывается дальнейшее наращивание пептидной цепи – *терминирующие триплеты*. Каждый триплет кодирует только какую-нибудь одну аминокислоту. Это свойство кода называют *специфичностью*, или однозначностью. С другой стороны, одна аминокислота может кодироваться двумя или большим числом (до шести) разных триплетов, т. е. код вырожден.

Путь информации от ДНК к белку представляется следующим образом:

ДНК	G-A-A-A-C-T-C-G-G-A-T-G	· ·	нетранскибируемая цепь
	· · · · ·		
	C-T-T-T-G-A-G-C-C-T-A-C	· ·	- кодоны ДНК
и-РНК	G-A-A-A-C-U-C-G-G-A-U-G	· ·	- кодоны и-РНК
Белок	Glu - Thr - Arg - Met	· ·	аминокислотная последовательность

К настоящему времени биологический код изучен у большого количества разных организмов – от вирусов и бактерий до высших живот-

ных. Во всех случаях он оказался одинаковым. Эта универсальность кода лишней раз свидетельствует о единстве происхождения всех форм жизни на Земле.

Ошибка в биологическом коде приводит к различным болезням. Например, у здоровых людей в гене, несущем информацию о β -цепи гемоглобина, триплет GAA или GAG, стоящий на шестом месте, кодирует глутаминовую кислоту. У больных гемофилией второй нуклеотид в этом триплете заменен на U, а GUA или GUG кодирует аминокислоту валин.

Мутации

Изменение структуры ДНК, передающееся последующим поколениям, называется *мутацией*. На молекулярном уровне мутация – это изменение нуклеотидной последовательности ДНК. В какой-то степени мутация – это спонтанный процесс, которому ДНК подвергается постоянно. Причины мутаций различны:

1) связана с возможностью существования нуклеотидных оснований в двух таутомерных формах; предполагают, что в случае один на миллион возможно образование пар оснований и с таутомером;

2) действие продуктов нормального метаболизма клетки (пероксиды, азотистая кислота) – являются мутагенами, т. е. веществами, способными индуцировать химические мутации ДНК;

3) радиация. ДНК интенсивно поглощает УФ-излучение и при достаточной дозе это излучение убивает большинство клеток, а остальные подвергаются очень глубокой мутации (водородные связи заменяются на ковалентные). Однако каждая клетка имеет механизм для восстановления ДНК: с помощью ферментов она заменяет поврежденный фрагмент.

Мутации изменяют генетический материал клетки: возникают либо болезни, либо прекращается выработка какого-либо белка, либо просто активность белка уменьшается.

Спонтанные мутации появляются в результате ошибок репликации ДНК, неправильного формирования комплементарных пар оснований, структурных искажений ДНК и вследствие перемещения подвижных генетических элементов в процессе роста и размножения популяции бактерий. Спонтанные мутации могут обуславливать благоприятные и неблагоприятные генетические изменения. Вероятность возникновения определенных мутаций в расчете на одну клетку и на одну генерацию называют *частотой мутирования*. При высоких скоростях роста она постоянна, и ее обычно определяют для клеток в экспоненциальной фазе роста при оптимальных условиях среды. В фенотипе проявляются не

все мутации. Непроявленные мутации называются *молчащими*. У мутанта может произойти *обратная* мутация, или *реверсия*, в результате которой восстановятся свойства дикого штамма. Об истинной обратной мутации говорят лишь в тех случаях, когда вторая мутация точно восстанавливает исходный генотип, если же восстанавливается только фенотип, то говорят о *вторичной реверсии*, или *супрессорной* мутации. Супрессорные мутации могут происходить как в исходном гене, так и в каких-либо других участках хромосомы (*интрагенные* и *экстрагенные* супрессорные мутации).

Индукцированные мутации возникают под влиянием внешних факторов, которые называют *мутагенами*. Мутагены бывают физическими (УФ-лучи, γ -радиация), химическими (аналоги пуриновых и пиримидиновых оснований, например, 2-аминопурин, азотистая кислота и ее аналоги, алкилирующие агенты и др.) и биологическими (транспозоны) (табл. 3.1).

По протяженности повреждений мутации бывают *точечными*, когда повреждения ограничиваются одной парой нуклеотидов, и *протяженными* (*абберации*). Мутации разделяют на *хромосомные*, обуславливающие появление нового признака при изменении двух и более участков хромосомы, и *генные*, обусловленные появлением нового признака при изменении гена. В этом случае может наблюдаться *модификации* оснований (изменения отдельных нуклеотидов), выпадение нескольких пар нуклеотидов (*делеции*), перемещение группы нуклеотидов в пределах хромосомы (*транспозиция*), разрыв путем вставки посторонней ДНК (*инсерция*) или добавление нуклеотидных пар (*дупликация*) и деформация спирали ДНК. Для точечных мутаций частота реверсий довольно высока, в то время как для аббераций реверсии не характерны.

Первичный эффект мутагенного фактора не обязательно ведет к истинной мутации. Новый фенотип проявляется только тогда, когда измененный ген начнет функционировать. С помощью различных методов удается накапливать и выделять мутантов с разного рода дефектами: с нарушением процессов транспорта или использования субстрата, с дефектами промежуточного обмена, с повышенной чувствительностью к температуре и т. д.

Теоретически, мутации, вызванные радиацией, химическими веществами или другими факторами, могли бы привести к вымиранию бактериальной популяции, однако в любой живой клетке существуют биохимические механизмы, способные полностью или частично восстанавливать исходную структуру ДНК. Совокупность ферментов, катализирующих реакции коррекции повреждений ДНК, составляют *системы репарации*, которые принципиально различаются по биохимическим

механизмам восстановления генома. Известны три основных механизма коррекции дефектов ДНК:

1. Непосредственная реверсия от поврежденной ДНК к исходной структуре.

2. Эксцизия («выпадение») повреждений с последующим восстановлением исходной структуры.

3. Активация механизмов, обеспечивающих устойчивость к повреждениям.

Реверсия повреждений ДНК. К механизмам прямой реверсии повреждений ДНК относится *световая репарация*, или *фотореактивация* (исправление деформации ДНК под действием УФ-лучей). Световая репарация осуществляется несколькими ферментами: фотолиазой (расщепляет тиминный димер и восстанавливает целостность соседних тиминных оснований), O^6 -метилтрансферазой (удаляет O^6 -метильную группу из остатков гуанина после действия метилирующих агентов), ДНК-пурин инсертазой (осуществляет встраивание утерянного при мутации основания в апуринный сайт), ДНК-гликозилазой (удаление дефектных оснований). Все эти процессы происходят в один этап под действием конкретного фермента и безошибочно восстанавливают исходную структуру ДНК.

Системы *эксцизионной репарации* удаляют неправильно спаренные или поврежденные основания из ДНК и синтезируют новую последовательность ДНК, замещающую их. Место повреждения распознает эндонуклеаза, расщепляющая цепь ДНК вблизи дефекта, фрагмент удаляется, а дефект восполняется при помощи ДНК-полимеразы, которая проникает в брешь и встраивает в нее отсутствующие нуклеотиды, используя неповрежденную цепь ДНК в качестве матрицы. ДНК-лигаза ковалентно связывает 3'-конец вновь синтезированного участка ДНК с цепочкой. Поскольку эта система репарации основана на ресинтезе нуклеотидной цепи на базе неповрежденной матрицы, она также является практически безошибочной.

Репарационные механизмы устойчивости к повреждениям ДНК. Кроме механизмов исправления повреждений, клетки имеют возможность «обойти» вызванную повреждениями блокаду репликации ДНК, например, путем репарации в процессе рекомбинации.

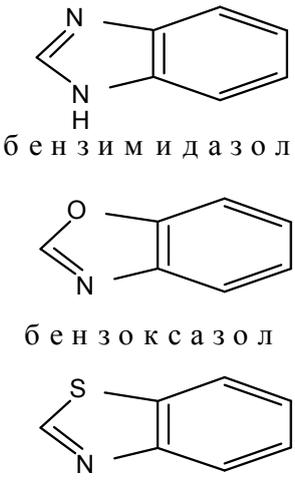
В биохимической технологии явление мутации важно с двух точек зрения:

1. С помощью мутаций можно изменить природу микроорганизма, чтобы он стал более полезным для какой-либо определенной цели. Например, основные успехи в производстве пенициллина были достигнуты благодаря получению высокопродуктивных мутантов исходного

штамма плесени *Penicillium* путем его облучения ультрафиолетовым светом, что привело к увеличению выхода пенициллина (нужного продукта метаболизма) на несколько порядков (с 20 мг/л до 7 г/л). В дальнейшем при использовании других *мутагенов* (химических веществ, вызывающих мутации) производство пенициллина удалось увеличить до 20 г/л.

Таблица 3.1

Наиболее часто применяющиеся химические агенты для получения мутагенного эффекта

<p>Аналоги гетероциклических оснований</p>  <p>бензимидазол</p> <p>бензоксазол</p> <p>бензтиазол</p>	<p>Включаются в ДНК вместо обычных гетероциклических оснований</p>
<p>Азотистая кислота HNO_2</p>	<p>Проводит дезаминирование пуриновых и пиримидиновых оснований ДНК</p>
<p>Алкилирующие агенты (хлоруксусная кислота, хлористый ацетил, диметилсульфат, иприт и др.)</p>	<p>Модификация пуриновых оснований, грубое нарушение их структуры, например, образуют дисульфидные мостики между цепями ДНК, препятствующие ее разделению при репликации</p>

2. С другой стороны, мутации могут создавать в биотехнологии и ряд затруднений. Для успеха микробиологического промышленного процесса часто необходимы чистые штаммы микроорганизмов, обладающие хорошо известными характеристиками. Вместе с тем нельзя исключать возможность мутаций в таких культурах, поэтому необходима регулярная проверка их генетической гомогенности.

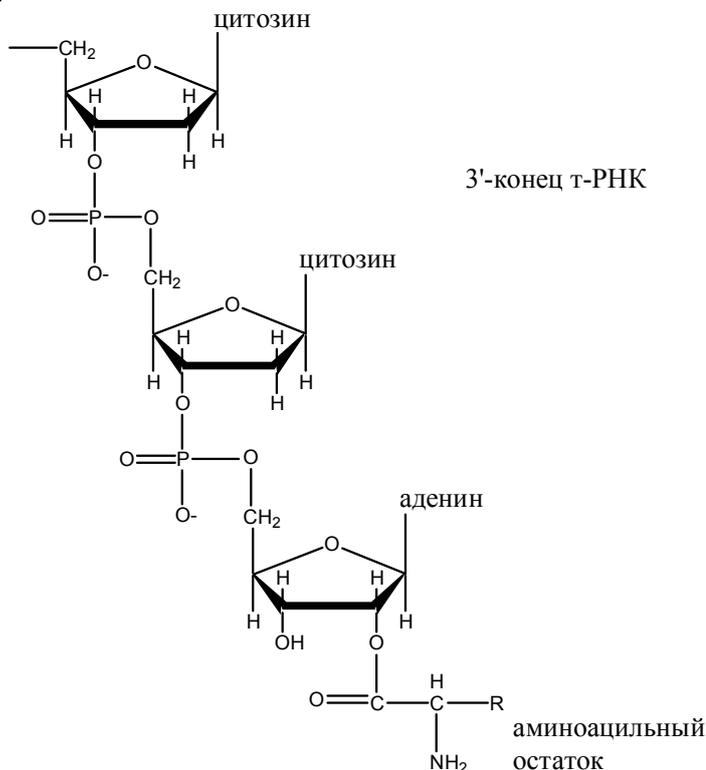
Адапторная функция т-РНК

Между аминокислотами и нуклеотидами (или триплетами нуклеотидов) невозможны комплементарные взаимодействия по типу образо-

вания нуклеотидных пар А...Т, С...G, А...U. Поэтому было сделано предположение о существовании молекул-адапторов, каждая из которых может взаимодействовать с определенным кодоном, с одной стороны, и с определенной аминокислотой, с другой стороны. В 1957 г. эти молекулы были обнаружены. Ими оказались транспортные РНК

(т-РНК). Очевидно, что для адаптирования 20-ти разных аминокислот к соответствующим им кодонам нужно 20 разных т-РНК. Эти т-РНК обозначают следующим образом: т-РНК^{Ala} т-РНК^{His} и т. д. (аланиновая т-РНК, гистидиновая т-РНК и т. д.). Однако, поскольку код вырожден, число разных т-РНК больше 20 (не меньше числа кодонов, имеющих смысл, т. е. не меньше 61-го).

Взаимодействие т-РНК с аминокислотами – ферментативный процесс, приводящий к образованию ковалентной связи между аминокислотой и т-РНК, катализируются эти реакции аминоацил-т-РНК-синтетазами. Такие соединения называют *аминоацил-т-РНК* (aa-т-РНК). Аминокислота присоединяется к 3'-концу нуклеотидной цепи т-РНК (где имеется последовательность А – С – С, общая для всех т-РНК), при этом образуется сложноэфирная связь за счет карбоксильной группы аминокислоты и гидроксильной группы концевого остатка адениловой кислоты в т-РНК:

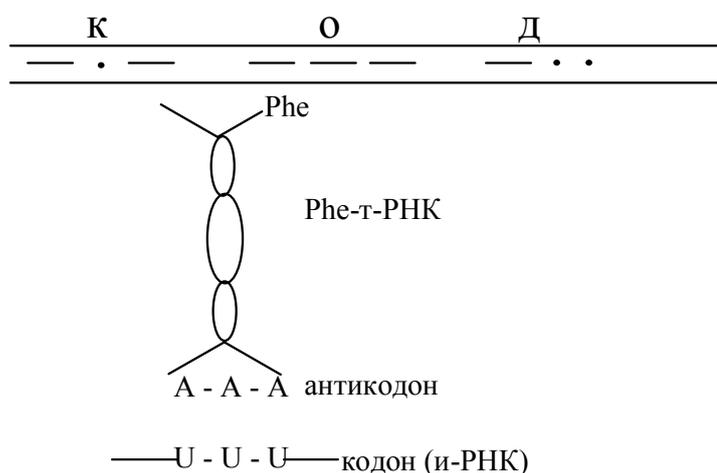


Существует не менее 20-ти разных аминоацил-т-РНК. Каждый из этих ферментов катализирует реакцию только одной из 20-ти аминокис-

лот с т-РНК, соответствующей этой аминокислоте. Например, аланил-т-РНК-синтетаза катализирует реакцию аланина с аланиновой т-РНК:



Таким образом, аминоацил-т-РНК-синтетазы должны иметь в активном центре участок, комплементарный одной из аминокислот, и участок, комплементарный какой-то части молекулы одной из т-РНК. Именно вследствие такой субстратной специфичности каждая из аминоацил-т-РНК-синтетаза «узнает» и «выбирает» из смеси 20-ти аминокислот и нескольких десятков т-РНК определенную пару (аминокислоту и соответствующую ей т-РНК), и соединяет эту пару. Взаимодействие аа-т-РНК с кодоном и-РНК обеспечивается тем, что в одной из петель молекулы т-РНК имеется триплет нуклеотидов, комплементарный какому-нибудь кодону. Такой триплет называют *антикодоном*. Образование аа-т-РНК можно сравнить с изготовлением двойного шрифта, например, для перевода знаков азбуки Морзе в знаки буквенного алфавита:



Роль матричной РНК

Располагая двойным шрифтом, легко прочитать текст, записанный азбукой Морзе. Достаточно расставить шрифт на телеграфной ленте соответственно знакам азбуки Морзе. Роль и-РНК в трансляции аналогична роли телеграфной ленты в этом примере: аа-т-РНК присоединяется антикодонами к соответствующим кодомам и-РНК, в результате чего аминокислотные остатки оказываются расположенными в той последовательности, в какой расположены кодоны в и-РНК. Теперь остается лишь соединить аминокислотные остатки пептидной связью, чтобы получилась пептидная цепь (белок) с определенной первичной структурой. Таким образом, последовательность кодонов и-РНК *коллинеарна* последовательности аминокислотных остатков в соответствующем белке. Эта схема отражает лишь принципиальный механизм перевода нук-

леотидной последовательности (точнее, последовательности кодонов) в аминокислотную последовательность.

3.2. ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛ ДНК

За последние годы методы исследования ДНК получили колоссальное развитие. К самым совершенным методам, с помощью которых изучается ДНК, относятся методы создания молекул ДНК путем соединения последовательностей, имеющих совершенно различное происхождение. Получаемый продукт называют **рекомбинантной ДНК**. Рекомбинантная ДНК содержит ген (или гены) и вектор. Вектор – это фрагмент ДНК, обеспечивающий размножение гибридной ДНК и синтез конечных продуктов деятельности генетической системы – белков. Основные исследования выполнены на бактериях и вирусах, так как они являются одними из самых простых организмов, иначе их называют клетками «хозяина». Технология рекомбинантной ДНК позволяет получать генетические видоизмененные варианты целенаправленным и строго контролируемым путем.

Каким же образом гены высших организмов могут быть введены в бактериальные клетки? Наиболее распространенным методом генной инженерии является метод получения рекомбинантных ДНК, т. е. содержащих чужеродный ген, плазмид. **Плазмиды** представляют собой кольцевые двухцепочечные молекулы ДНК, состоящие из нескольких тысяч пар нуклеотидов. Каждая бактерия, помимо основной, не покидающей клетку молекулы ДНК ($5 \cdot 10^6$ пар нуклеотидов), может содержать несколько различных плазмид, которыми она обменивается с другими бактериями. Плазмиды являются автономными генетическими, реплицирующими (т. е. размножающимися) в бактериальной клетке не в то же время, что основная молекула ДНК. Хотя на долю плазмид приходится лишь небольшая часть клеточной ДНК, именно они несут такие жизненно важные гены для бактерий, как гены лекарственной устойчивости. Разные плазмиды содержат различные гены устойчивости к антибактериальным препаратам. Простота устройства плазмид и легкость, с которой они «входят» и «выходят» из бактерий, используется генными инженерами для введения в клетки бактерий генов высших организмов.

Мощным инструментом генной инженерии являются открытые в 1974 г. ферменты – рестрикционные эндонуклеазы, или **рестриктазы**.

Рестрикция буквально означает «ограничение». Бактерии клетки вырабатывают рестриктазы для разрушения инородной (в первую очередь фаговой ДНК), что необходимо для ограничения вирусной инфекции. Рестриктазы «узнают» определенные последовательности нуклеотидов в ДНК (так называемые **сайты** – участки узнавания) и вносят

симметричные разрывы в цепях ДНК на равных расстояниях от центра сайта. В результате на концах каждого фрагмента рестриктированных ДНК образуются короткие одноцепочечные «хвосты», которые называются «липкими концами».

Из разных видов бактерий выделено около пятисот различных рестриктаз, для которых описаны сайты рестрикции.

3.3. МЕТОДЫ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Для получения рекомбинантной плазмиды ДНК одна из плазмид расщепляется выбранной рестриктазой. Гены, которые нужно ввести в бактериальную клетку, выщепляют из ДНК хромосом человека с помощью той же рестриктазы, поэтому его «липкие концы» являются комплементарными нуклеотидным последовательностям на концах плазмиды. Ферментом лигазой «сшивают» оба конца ДНК (гена и плазмиды), в результате получается рекомбинантная кольцевая плазида, которую вводят в бактерию *E. coli*. Все потомки этой бактерии называются **клоном** и содержат в плазидах чужеродный ген, способный вырабатывать белок, кодируемый этим геном. Весь процесс получения таких бактерий, называют **клонированием**. Он состоит из последовательных стадий (рис. 3.3):

1. Рестрикции – разрезания ДНК человека рестриктазой на множество различных фрагментов, но с одинаковыми «липкими» концами. Такие же концы получают при разрезании плазмидной ДНК той же рестриктазой.

2. Лигирования – включения фрагмента ДНК человека в плазмиды благодаря сшиванию «липких концов» ферментом лигазой.

3. Трансформации – введения рекомбинантных плазмид в бактериальные клетки, обработанные специальным образом – так, чтобы они на короткое время стали проницаемыми для макромолекул. Однако плазмиды проникают лишь в часть обработанных бактерий. Их разделяют, используя определенную питательную среду (например, раствор антибиотика). Каждая из трансформированных бактерий размножается и образует колонию из многих тысяч потомков – клон.

4. Скрининга – отбора среди клонов трансформированных бактерий тех, которые сохраняют плазмиды, несущие ген человека.

Не всегда удается точно вырезать нужный ген с помощью рестриктаз. Многие гены расщепляются этими ферментами на несколько частей или не содержат последовательностей, узнаваемых рестриктазами. Поэтому в ряде случаев процесс клонирования начинают не с вырезания из хромосом случайных фрагментов ДНК, а с целенаправленного получе-

ния нужного гена. Для этого из клеток человека выделяют и-РНК, которая является транскрипционной копией этого гена, и с помощью фермента – **обратной транскриптазы** (ревертазы) – синтезируют комплементарную цепь ДНК, после чего и-РНК, служащая матрицей при синтезе ДНК, уничтожается РНК-азой – специальным ферментом, способным гидролизовать цепь РНК. Оставшаяся цепь ДНК служит матрицей для синтеза обратной транскриптазой (ДНК-полимераза) комплементарной второй цепи ДНК. Получаемая двойная спираль ДНК носит название к-ДНК (комплементарная ДНК), она соответствует гену, с которого была считана и-РНК. Такая к-ДНК встраивается в плазмиду, которая трансформирует бактерии, и получают клоны, содержащие только выбранные гены человека.

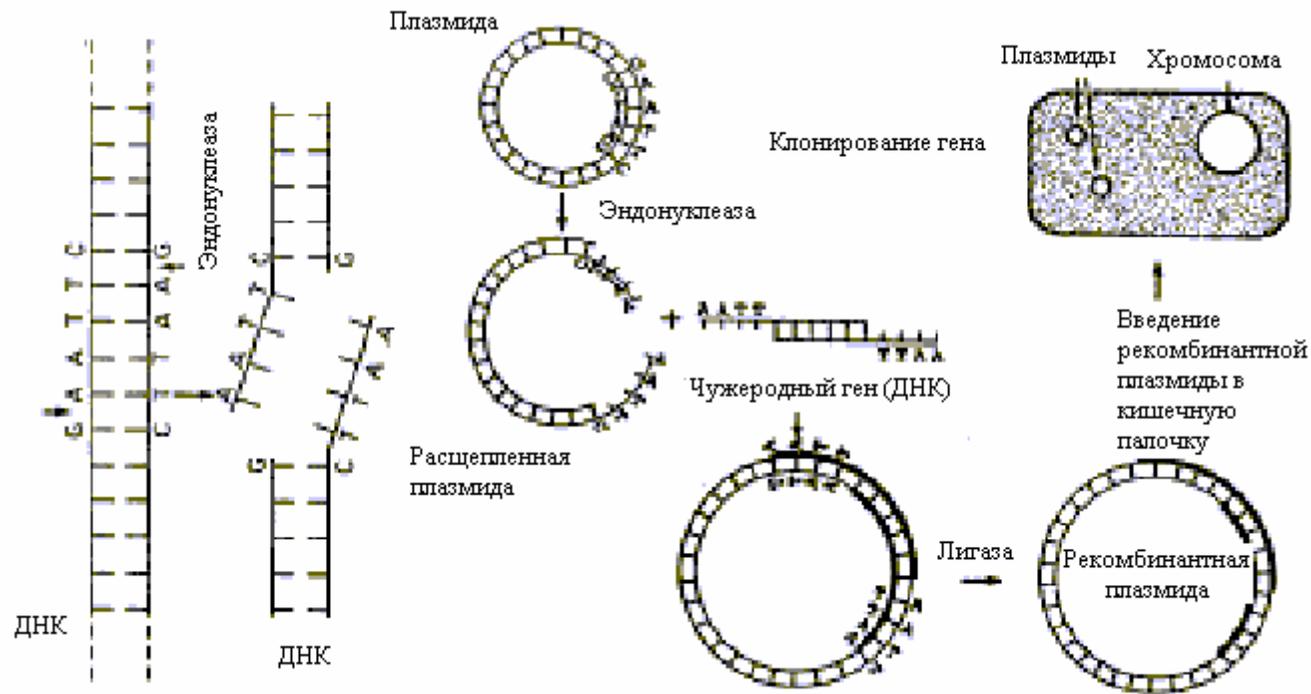


Рис. 3.3. Введение гена в плазмиду *Escherichia coli* и клонирование этого гена в клетках кишечной палочки

Плазмида *E.coli* расщепляется рестрикционной эндонуклеазой в специфическом участке в обеих цепях ДНК, так что на концах расщепленной плазмиды располагаются короткие неспаренные последовательности дезоксирибонуклеотидов (ТТАА или ААТТ), т. е. по четыре нуклеотида, в которых основания представлены тиминем и аденином.

Ген, который нужно встроить в плазмиду, выщепляют с помощью этой же рестриктазы, так что его концы являются комплементарными нуклеотидным последовательностям на концах плазмиды (ААТТ и ТТАА).

Обе ДНК (гена и плазмиды) сшивают вместе с помощью лигазы. Затем рекомбинантную плазмиду вводят в клетку *E.coli*, которая, размножаясь, образует клон, все клетки которого содержат рекомбинантную плазмиду, а поэтому и чужеродный ген. Последний теперь клонирован в клетках кишечной палочки и индуцирует в ней синтез специфического белка.

3.4. ПОЛУЧЕНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДОВ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ

3.4.1. Биосинтез инсулина человека в клетках кишечной палочки

Инсулин – это белок, который является гормоном поджелудочной железы. Действие инсулина в основном направлено на обмен углеводов и проявляется снижением уровня сахара в крови (гипогликемический эффект). Это происходит за счет того, что инсулин облегчает переход глюкозы в клетки органов и тканей, где стимулирует ее активирование путем образования глюкозо-6-фосфата. Последний, окисляясь, обеспечивает клетки энергией. Таким образом, инсулин способствует периферическому окислению глюкозы. Наряду с этим инсулин тормозит распад гликогена в клетках печени. При этом снижаются процессы распада жиров и превращение аминокислот в глюкозу и происходит активирование синтеза жиров и белков. При недостатке инсулина развивается тяжелое заболевание – диабет; при этом разрушается нормальный обмен веществ. Диабетики должны получать инсулин ежедневно, если этого не происходит, то развивается тяжелое состояние – диабетическая кома, и организм погибает. Потребность в инсулине огромна. Долгое время источником инсулина служили железы коров и свиней. Учитывая, что поджелудочная железа коровы весит 200–250 г, для получения 100 г кристаллического инсулина нужно 800–1000 кг исходного сырья. Понятно, что животный инсулин не мог обеспечить всех больных. Например, в 1979 г. из 60-ти млн больных диабетом во всем мире, только 4 млн получали препарат инсулина.

Инсулин построен из двух полипептидных цепей А и В длиной 20 и 30 аминокислот, последовательность которых была установлена Сэнгером в 1955 г. Синтез обеих цепей и соединение их дисульфидными связями для получения инсулина были проведены тремя коллективами исследователей в США, Китае и ФРГ в 1963 и 1965 гг. Однако осуществить в промышленном масштабе столь дорогостоящий и сложный синтез, который включает 170 химических реакций, оказалось трудно. Тем не менее в 1980 г. в Дании (компанией «Ново индастри») был разработан способ превращения инсулина свиньи в инсулин человека замещением остатка аланина, который является 30-й аминокислотой в цепи В на остаток треонина. Это удалось достигнуть путем ферментативного замещения с последующей хроматографической очисткой продукта; в результате был получен однокомпонентный инсулин человека 99 %-й чистоты. Исследования двух однокомпонентных инсулинов (человеческого и свиного) показали, что они не различались по активности и по

времени действия. В 1982 г. инсулин производили главным образом две компании «Эли Лилли» (85 % сбыта инсулина в США и патент на его производство с 1923 г.) и «Ново индастри» (47,5 % сбыта гормона в Европе).

В организме животного две полипептидные цепи инсулина исходно являются частями одной белковой молекулы длиной 109 аминокислот – препроинсулина. При синтезе препроинсулина в клетках поджелудочной железы первые 23 аминокислоты служат сигналом для прохождения молекулы сквозь мембрану клетки; эти аминокислоты отщепляются, образуется проинсулин длиной 86 аминокислот. Молекула проинсулина сворачивается таким образом, что начальный и конечный ее сегменты сближаются, а центральная часть молекулы удаляется с помощью ферментов. Так образуется инсулин. Роль центральной части сводится к правильному взаимному расположению двух цепей инсулина.

Гилберт с сотрудниками выделили и-РНК из поджелудочной железы крысы, синтезировали ДНК-копию (комплементарная ДНК), которая была встроена в плазмиду *E. coli* в среднюю часть гена пенициллиназы (этот фермент в норме секреторируется из клеток), и получили рекомбинантную плазмиду. Как показало определение последовательности ДНК, рекомбинантная плазида содержала информацию о структуре проинсулина, но не препроинсулина. При трансляции и-РНК в клетках кишечной палочки синтезировался гибридный белок, содержащий последовательности пенициллиназы и проинсулина. Далее отщепляли пенициллиназу и удаляли средний сегмент проинсулина действием трипсина. Позднее было показано, что полученные таким образом молекулы влияют на сахарный обмен, как гормон, выделенный из поджелудочной железы крысы.

В 1979 г. в США были синтезированы гены, кодирующие А и В цепи инсулина. Далее каждый синтетический ген встраивали в плазмиду *E. coli* в конце гена -галактозидазы. После этого синтезированные полипептиды отщепляли от фермента, проводили их очистку и цепи соединяли *in vitro* для получения полной молекулы инсулина.

В клетках *E. coli* был также осуществлен биосинтез проинсулина, а не только отдельных ее цепей. Для этого на и-РНК проинсулина синтезировали ее ДНК-копию с помощью обратной транскриптазы (ДНК-полимераза). Этот способ имеет серьезное преимущество, поскольку различные этапы экстракции и выделения гормона сведены к минимуму. С помощью этого метода был получен высокий выход гормона – 200 г на 1000 л культуральной жидкости (это эквивалентно количеству инсулина, выделенного из 1600 кг поджелудочной железы животных).

Исследователям из компании «Генентек» потребовалось 10 месяцев, чтобы в сентябре 1978 г. получить инсулин человека в специально сконструированном штамме кишечной палочки. Этот инсулин прошел самые серьезные и длительные испытания, которые показали, что он не вызывает никаких побочных явлений, как инсулин животных (у одного из каждых 20-ти больных инсулин животных вызывает аллергию; часто наблюдаются также расстройства почек и зрения). Кроме того, при длительном применении препарат не вызывал отрицательных иммунологических реакций.

Технология производства инсулина в бактериальных клетках имеет огромные преимущества перед получением инсулина из поджелудочной железы животных: не зависит от перебоев или количества сырья, конечный продукт всегда имеет одинаковый состав и степень чистоты.

В октябре 1982 г. был налажен выпуск «хемулина» (препарата синтетического инсулина человека) фирмой «Эли Лилли», которая затратила 100 млн долларов, чтобы начать поставку продукта на рынок.

3.4.2. Биосинтез соматотропина и других гормонов человека

Гормон роста человека, или соматотропин, синтезируется в головном мозге человека в передней доли гипофиза. Впервые он был выделен из трупного материала и очищен в 1963 г. При недостатке соматотропина развивается гипофизарная карликовость, частота встречаемости которой оценивается от 7 до 10 случаев на миллион человек. Гормон обладает видовой специфичностью, т. е. в отличие от инсулина гормоны роста животных не имеют активности в организме человека. Следовательно, единственным средством излечения гипофизарной карликовости является гормон гипофиза, который выделяли из трупов. Исследования показали, что при внутримышечном введении соматотропина в дозах 10 мг на 1 кг массы в течение года по три инъекции в неделю дает увеличение роста примерно на 8–18 см в год. Больные дети четырех–пяти лет при непрерывном лечении догоняли в росте своих сверстников к половой зрелости (14–16 лет). Если учесть тот факт, что из одного трупа можно получить 4–6 мг соматотропина, то можно понять, что лечение этого заболевания природным соматотропином – дело совершенно безнадежное. Помимо недостатка препарата возникли и другие проблемы, связанные с гетерогенностью гормона, выделяемого из трупного материала. Существовала также опасность, что гипофизарный материал заражен медленно развивающимися вирусами. Такие вирусы обладают необычайно длительным инкубационным периодом, поэтому дети, по-

лучавшие препарат, нуждались в многолетнем медицинском наблюдении.

Гормон роста человека, синтезированный в специально сконструированных клетках бактерий, имеет очевидные преимущества: он доступен в больших количествах, его препараты являются биохимически чистыми и свободны от вирусных загрязнений.

Биосинтез соматотропина (состоящего из 191-го аминокислотного остатка) специально сконструированными бактериями на основе кишечной палочки был осуществлен фирмой «Генентек». Поскольку при синтезе ДНК на и-РНК получается ген, кодирующий предшественник соматотропина, не расщепляющийся в бактериальных клетках с образованием активного гормона, то поступили следующим образом: на 1 этапе клонировали двунитевую ДНК-копию и-РНК и расщеплением рестрикционными эндонуклеазами получили последовательность, которая кодирует всю аминокислотную последовательность гормона, кроме 23-х первых аминокислот. Затем клонировали синтетический полинуклеотид, соответствующий аминокислотам от 1-й до 23-й. Далее два фрагмента объединили вместе и «подстроили» в плазмиду *E. coli*, после чего клетки бактерии начали синтезировать этот гормон.

К 1980 г. были закончены клинические испытания препарата и тесты на токсичность и были начаты массовые эксперименты на детях, близких по возрасту к половой зрелости. Результаты были обнадеживающими, и синтетический соматотропин с 1982 г. начал производиться в промышленном масштабе.

Еще один гормон, β -эндорфин – опиат мозга, состоящий из 31-й аминокислоты, – был синтезирован в генетически сконструированных клетках кишечной палочки. В 1980 г. австралийский ученый Шайн и американские ученые Феттес, Лэн и Бакстер успешно клонировали ДНК, кодирующую β -эндорфин, в клетках *E. coli* и получили этот полипептид в виде слитного белка с ферментом β -галактозидазой. На первом этапе они клонировали фрагмент ДНК, полученный в результате обратной транскрипции и-РНК, кодирующей β -эндорфин, и далее встраивали его в плазмиду *E. coli* за геном β -галактозидазы, при этом получили гибридный белок, состоящий из β -галактозидазы и β -эндорфина; далее ферментативно отщепляли β -галактозидазу, получая биологически активный β -эндорфин.

3.4.3. Получение интерферонов

Еще одним замечательным достижением генной инженерии является синтез интерферона.

Впервые интерферон был получен в 1957 г. в Национальном институте медицинских исследований вблизи Лондона. Это белок, который выделяется в очень низких количествах клетками животных и человека при попадании в организм вирусов и направлен на борьбу с ними. Первые же исследования выявили высокую биологическую активность интерферона при лечении гриппа, гепатита и даже раковых заболеваний (подавляет размножение аномальных клеток). Интерферон, как и соматотропин, обладает видовой специфичностью: интерфероны животных неактивны в организме человека и даже отторгаются им.

В организме человека вырабатывается несколько видов интерферонов: лейкоцитарный (α), фибробластный (β) и иммунный (γ) (Т-лимфоцитарный).

Природные интерфероны получают из крови человека с крайне низким выходом: в 1978 г. в Центральной лаборатории здравоохранения в Хельсинки (в то время мировой лидер в получении лейкоцитарного интерферона) из 50-ти тысяч литров крови было получено 0,1г чистого интерферона.

Процесс получения интерферонов в основных чертах был одинаков для всех типов клеток, выращиваемых в культурах и образующих интерферон. Клетки крови заражали вирусом Сендай и через 24 ч фильтровали на суперцентрифуге. В надосадочной жидкости содержался грубый препарат интерферона, который подвергали хроматографической очистке. Стоимость препарата была очень велика – 400 г интерферона стоил 2,2 млрд долларов. Однако перспективность фармакологического его использования (в том числе против четырех видов рака) заставляла искать новые пути его получения, в первую очередь с помощью генной инженерии.

В январе 1980 г. был получен интерферон человека в генетически сконструированных клетках кишечной палочки. Исходная трудность при этих методах заключалась в том, что и-РНК интерферонов мало даже в лейкоцитах, стимулированных заражением вирусами, и в том, что выходы были очень низкие: сообщалось о получении 1–2 молекул интерферона на одну бактериальную клетку. В 1981 г. фирме «Генентек» удалось сконструировать рекомбинантную ДНК, кодирующую γ -интерферон, и ввести ее в геном бактерий, дрожжей и даже клетки млекопитающих, и они стали способными синтезировать интерферон с большим выходом – 1 л культуры клеток дрожжей содержал 1млн еди-

ниц интерферона (единица интерферона соответствует такому его количеству, которое защищает 50 % клеток в культуре от заражения вирусом). Процесс был осуществлен следующим образом: исследователи выделили смесь молекул и-РНК из лимфоцитов человека, получили молекулы соответствующих ДНК-копий и ввели их в клетки *E. coli*. Далее были отобраны бактерии, продуцирующие интерферон.

3.4.4. Получение иммуногенных препаратов и вакцин

Другая область применения генной инженерии связана с получением новых эффективных, безопасных и дешевых вакцин.

Вакцины – одно из самых значительных достижений медицины, их использование к тому же чрезвычайно эффективно с экономической точки зрения. В последние годы разработке вакцин стали уделять особое внимание. Это обусловлено тем, что до настоящего времени не удалось получить высокоэффективные вакцины для предупреждения многих распространенных или опасных инфекционных заболеваний.

Повышенный интерес к вакцинам возник после того, как была установлена роль патогенных микроорганизмов в развитии тех заболеваний, которые ранее не считали инфекционными. Например, гастриты, язва желудка и двенадцатиперстной кишки, злокачественные новообразования печени (вирусы гепатита В и С).

Поэтому в последние 10–15 лет правительства многих стран стали принимать меры, направленные на интенсивную разработку и производство принципиально новых вакцин.

Используемые сегодня вакцины можно разделить в зависимости от методов их получения на следующие типы:

- живые аттенуированные вакцины;
- инактивированные вакцины;
- вакцины, содержащие очищенные компоненты микроорганизмов (протеины или полисахариды);
- рекомбинантные вакцины, содержащие компоненты микроорганизмов, полученные методом генной инженерии.

Технологию рекомбинантных ДНК применяют также для создания живых ослабленных вакцин нового типа, достигая аттенуации путем направленной мутации генов, кодирующих вирулентные протеины возбудителя заболевания. Эту же технологию используют и для получения живых рекомбинантных вакцин, встраивая гены, кодирующие иммуногенные протеины, в живые непатогенные вирусы или бактерии (векторы), которые и вводят человеку.

Принцип применения ДНК-вакцин заключается в том, что в организм пациента вводят молекулу ДНК, содержащую гены, кодирующие иммуногенные белки патогенного микроорганизма. ДНК-вакцины называют иначе *генными* или генетическими.

Для получения ДНК-вакцин ген, кодирующий продукцию иммуногенного протеина какого-либо микроорганизма, встраивают в бактериальную плазмиду. Кроме гена, кодирующего вакцинирующий протеин, в плазмиду встраивают генетические элементы, которые необходимы для экспрессии («включения») этого гена в клетках эукариотов, в том числе человека, для обеспечения синтеза белка. Такую плазмиду вводят в культуру бактериальных клеток, чтобы получить большое количество копий. Затем плазмидную ДНК выделяют из бактерий, очищают от других молекул ДНК и примесей. Очищенная молекула ДНК и служит вакциной. Введение ДНК-вакцины обеспечивает синтез чужеродных протеинов клетками вакцинируемого организма, что приводит к последующей выработке иммунитета против соответствующего возбудителя. При этом плазмиды, содержащие соответствующий ген, не встраиваются в ДНК хромосом человека.

ДНК-вакцины обладают рядом преимуществ по сравнению с традиционными вакцинами:

- способствуют выработке антител к нативной молекуле вирусных протеинов;
- способствуют выработке цитотоксических Т-лимфоцитов;
- могут избирательно воздействовать на различные субпопуляции Т-лимфоцитов;
- способствуют формированию длительного иммунитета;
- устраняют риск инфицирования.

3.4.5. Другие области применения генной инженерии

1. Новые методы диагностики и исследований

Методы генной инженерии открывают новые возможности и в медицинской диагностике. Например, ДНК или РНК вируса могут быть выделены в очень малых количествах для изучения их состава, последовательности нуклеотидов и механизма реакции. Полученные при этом данные позволяют различать многие типы вирусов, и подобный метод приобретет важную роль в эпидемиологии и в медицинской диагностике.

Эти и другие, более общие, методы связаны с синтезом нуклеиновых кислот, используются для изучения функций мозга на молекулярном уровне. Так всегда считалось, что полипептидные гормоны (инсу-

лин) образуются только в эндокринных железах, откуда они транспортируются с потоком крови в органы. Благодаря таким исследованиям было обнаружено, что они синтезируются в головном мозге. Впервые это было показано исследователем Вилла-Комароффом. Она получила ДНК-копию гена инсулина крысы, ввела их в клетки мозга и обнаружила, что инсулиновая ДНК-проба связывалась с двумя и-РНК в мозге, т. е. показала, что клетки мозга синтезируют инсулин. (Молекулы ДНК будут связывать и-РНК гормонов и чем ближе сходство между гормоном и синтезирующимся в мозге веществом, тем прочнее ДНК-копии будут связываться с и-РНК.) Следующая задача – уточнить подлинную функцию этих гормонов в мозге.

2. Генная инженерия и белковая инженерия ферментов

Технология рекомбинантных ДНК позволила проводить перемещение генов, ответственных за синтез полезного фермента, из одного организма в другой, т. е., когда фермент проявляет свойства, важные для промышленного использования, соответствующий ген можно клонировать в более подходящем микроорганизме-«хозяине» (рис. 3.4) и затем провести промышленную ферментацию. Таким методом становится возможным производить промышленные ферменты очень высокого качества и чистоты.

Недавний пример этой технологии – получение моющего фермента липолазы, улучшающий удаление жирных пятен на тканях. Фермент был вначале обнаружен при росте плесени *Humicola lanuginosa* в количестве, не соответствующем для промышленного производства. Далее, фрагмент ДНК (ген), кодирующий фермент, был клонирован в продукты роста плесени *Aspergillus oryzae* и начал производиться на промышленном уровне. Фермент оказался эффективным при различных моющих условиях, а также очень устойчивым при разных температурах и рН.

Белковая инженерия или «молекулярная хирургия» использовалась для изменения свойств молекул ферментов. Белковая инженерия ферментов включает создание трехмерной графической модели очищенного фермента, полученного методом рентгено-структурного анализа. Можно считать, что изменения в структуре фермента, приводящие к большей стабильности при изменении, например, рН и температуры, сделаны с помощью замен участков гена, кодирующего фермент, на молекулярном уровне.

Имеются два главных подхода для изменения функции ферментов. Первый – мутагенез клонированного продукта: аминокислотные остатки в определенном положении в структуре фермента можно заменить

другими подходящими закодированными аминокислотными остатками. Измененный ген далее трансформируется в подходящий организм «хозяина», и производится мутантный фермент. Этот процесс известен как «мутагенез направленного участка». Второй используемый метод включает выделение природного фермента и модификацию его структуры химическими или ферментными методами, иногда этот метод называется *химической мутацией*. Недавний успешный пример белковой инженерии – модификация фермента фосфолипазы, который был изменен для того, чтобы он мог работать при более высоких концентрациях кислоты. Этот фермент широко используется как эмульгатор в пищевой промышленности.

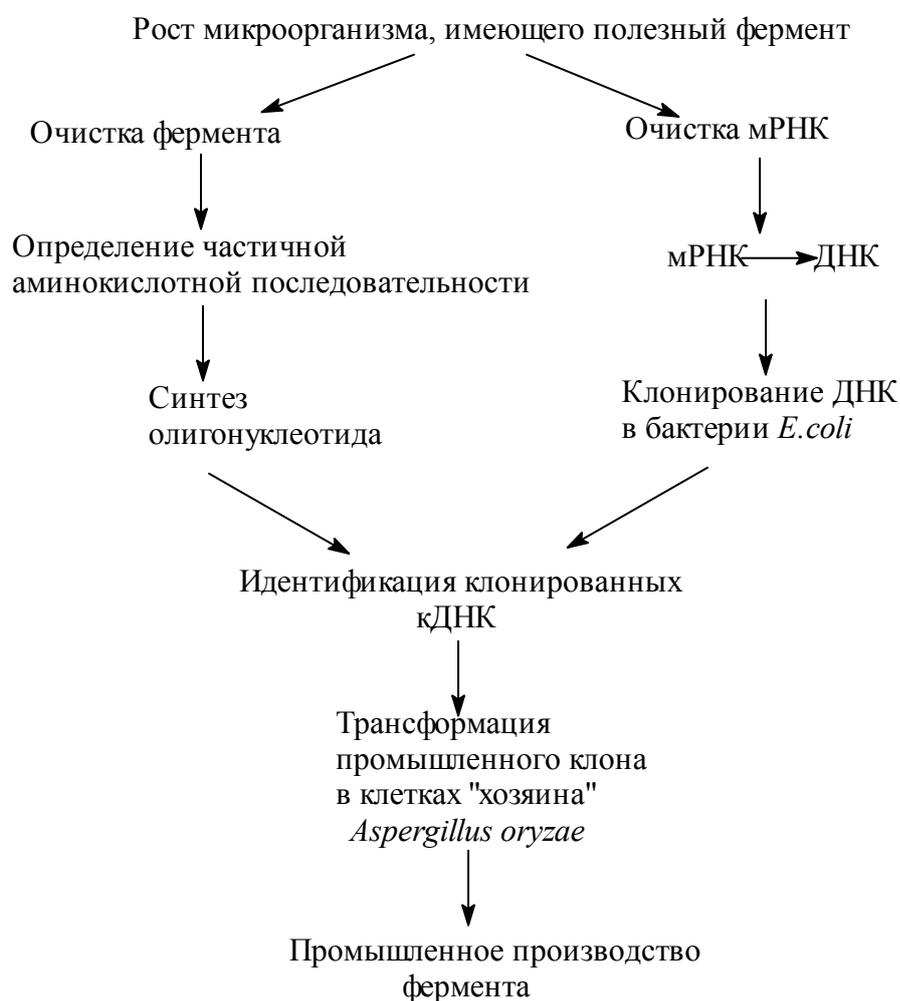


Рис. 3.4. Метод клонирования ферментов

Из вышесказанного следует, что генная и белковая инженерии будут иметь огромное влияние на производство ферментов в многих фор-

мах. Генная инженерия будет обеспечивать лучшие экономические показатели продуктивности ферментов, производство ферментов редких микроорганизмов и т. д.

3. Получение бактерий для деградации токсикантов и ксенобиотиков

С помощью генетического конструирования создан «супермикроб», способный утилизировать большинство основных углеводов нефти. В природе имеются 4 штамма бактерий, имеющих несколько плазмид, каждая из которых кодирует фермент для расщепления одного класса углеводов: 1) октана, гексана и декана (ОСТ); 2) ксилола и толуола (XYL); 3) камфоры (САМ) и 4) нафталина (НАН). В результате последовательных скрещиваний был получен «суперштамм», несущий плазмиды XYL, НАН и гибридную плазмиду, содержащую части плазмид ОСТ и САМ. Такая мультиплазмидная бактерия растет, утилизируя неочищенную нефть (рис. 3.5).

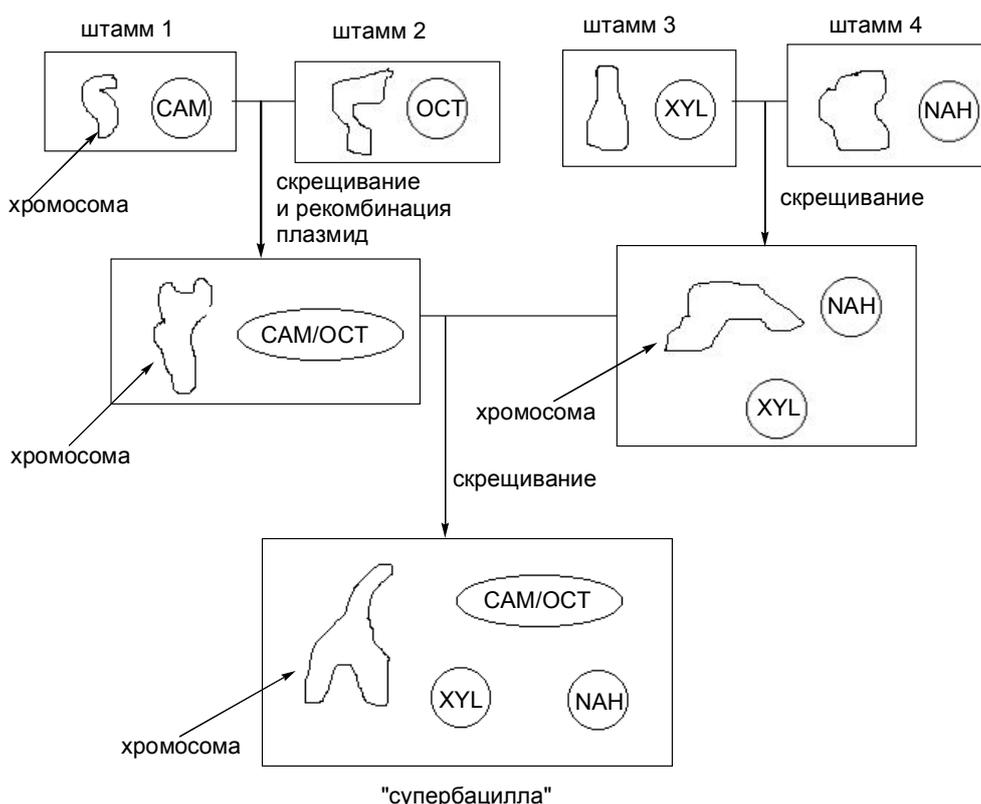


Рис. 3.5. Получение мультиплазмидной бактерии

4. Биоматериалы

Протезы и искусственные устройства для замены поврежденных частей тела или компенсаций их дисфункций изготавливаются из поли-

меров (полиэфиров, силиконов, метилполиметакриламида, полиэтилена), сплавов металлов (нержавеющей стали, сплавов хрома, кобальта, молибдена, титана и титановых сплавов), керамики (глинозема, стекло-керамики), композитных материалов (углерод-углеродных, полимерно-графитных, стеклянных с наполнителями) и т. п. Реакция тканей организма на контакт с этими материалами может вызвать (и часто вызывает) иммунную реакцию, вплоть до отторжения имплантата, при этом возникает необходимость удаления протеза.

Чтобы избежать таких реакций или снизить их до безопасного уровня, разрабатываются материалы нового поколения – биоматериалы, или биосовместимые материалы. Рынок этих материалов неограничен, вернее, ограничен пока стоимостью и необходимым качеством.

В области сердечной и артериальной хирургии разработаны и совершенствуются биоматериалы, придающие поверхности полимера антикоагуляционные свойства. Для этого используют соединения, обладающие свойством препятствовать свертыванию крови. Из таких материалов могут быть изготовлены протезы сосудов чрезвычайно малого диаметра, не вызывающие свертываемости крови, используемые для предупреждения сердечных приступов.

Для протезирования костей и суставов используются металлы и сплавы, но они по своим свойствам сильно отличаются от костей и тоже довольно часто вызывают иммунную реакцию. Керамика, и особенно кальцинированный глинозем, обладают отличной биосовместимостью, однако они хрупкие. Для создания протезов высокого качества созданы материалы по оригинальной технологии: протезы из керамики при помощи методов клеточной инженерии заселяются клетками костной ткани, которая заполняет все поры протеза, при этом получается изделие, сочетающее высокую прочность и отличную биосовместимость.

Методы биотехнологии используются и для создания биосовместимых гибких и тонких контактных линз. Их изготавливают из макромолекулярных гелей, содержащих 80 % воды. Это обеспечивает хорошую диффузию O_2 и CO_2 . В качестве сыворотки крови используются декстраны и желатин.

Разработаны также довольно прочные полимерные нити, легко подвергающиеся биодegradации. Из них изготавливают шовный материал для скрепления внутренних послеоперационных швов; после операции они через какое-то время рассасываются.

Существуют еще несколько больших прикладных областей биотехнологии, в частности, создание биотестов в аналитике, диагностике и для контроля окружающей среды.

3.5. ПРЕИМУЩЕСТВА И ОПАСНОСТЬ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Методы генной инженерии отличаются от манипуляций с обычными патогенными микробами, поскольку большей частью они имеют дело с обычными кишечными бактериями, живущими в пищеварительной системе человека и, более того, широко распространенными в окружающей среде. Поэтому сконструированные штаммы могут очень легко распространяться и привести к серьезным последствиям. Перенос генов азотфиксации в злаки при помощи микроорганизмов имеет некоторые выводы, однако размножение таких микроорганизмов в почве может способствовать произрастанию и других растений и тем самым нарушать биологический баланс как в растительных сообществах, так и в животных биоценозах. С другой стороны, относительная скудость определенных биологических веществ, таких, как гормоны, может быть с лихвой восполнена за счет синтетических веществ, получаемых при помощи микроорганизмов, сконструированных методами генной инженерии, а это может привести к терапевтически необоснованному применению этих веществ.

В США исследования такого рода неуклонно расширяются, но под контролем соответствующих организаций. Национальные институты здоровья США одобрили 31 проект по определенному производству инсулина, соматотропина (гормона роста человека и крупного рогатого скота) и интерферона, которые производились различными фирмами.

После периода сомнений некоторые биологи пришли к заключению, что потенциальная опасность невелика, так как сконструированные генно-инженерным путем микробы имеют мало шансов выжить вне лабораторных условий. Это привело к снижению защитных норм, т. е. учета возможности распространения микробов при строительстве исследовательских зданий, хотя меры по обеспечению биологической безопасности продолжали осуществляться.

В Страсбурге, на заседании Европейского парламента, впервые были рассмотрены рекомендации относительно законности применения методов генной инженерии к людям. Проект рекомендовал включить в Европейскую конвенцию прав человека определенные положения для защиты личности от реальной угрозы генетических манипуляций. В нем отмечалось, что беспокойство, вызываемое этой техникой, связано с непредсказуемостью ее воздействия на здоровье человека и окружающую его среду, а также с юридическими и этическими сложностями. В сообщении, представленном комиссией Парламентской ассамблеи и касающемся правовых вопросов, содержалась подробная оценка риска, свя-

занного с исследованиями человеческих генов. Были выделены три группы риска.

К первой относится детальное генетическое картирование человеческих клеток, которое может оказать существенную помощь в диагностике наследственных заболеваний, но может и способствовать накоплению индивидуальных генетических характеристик в компьютерных банках данных.

Вторая группа риска связана с работами по генной инженерии соматических клеток, в частности, с замещением аномальных генов.

К третьей группе риска относятся эксперименты, связанные с воздействием на половые клетки для получения постоянных наследственных изменений.

Несмотря на определенные преимущества генной инженерии, комиссия заключила, что решения, принятые человеком, не должны заменить свободную игру природы. Должны быть также подтверждены неотъемлемые права каждого не подвергаться генетическим манипуляциям.

Рассмотренные рекомендации представляют собой попытку добиться на международном уровне правовой защиты от последствий генетических манипуляций.

3.6. МЕРЫ БЕЗОПАСНОСТИ

Генетическая инженерия с момента зарождения привлекла внимание ученых и широких кругов общественности потенциальной опасностью некоторых исследований. Это опасение было высказано в 1974 г., вскоре после первых успешных экспериментов по получению рекомбинантных молекул ДНК. Группа известных молекулярных биологов во главе с П. Бергом призвала ученых к ограничению проведения ряда генно-инженерных экспериментов. Характер высказанных опасений был двоякого рода. Во-первых, указывалось на реальную возможность «утечки» клеток с рекомбинантными молекулами ДНК за пределы лабораторий или промышленных производств и, следовательно, угрозу внесения в организм человека или животных вредных чужеродных либо «собственных» продуктов (например, гормонов), но в неконтролируемых концентрациях. Во-вторых, отсутствие достаточных знаний о структуре и функциях генов, находящихся в клонируемом фрагменте ДНК, может привести к тому, что при внесении их в реципиентные клетки они начнут синтезировать не только желаемое вещество, но и какие-либо опасные продукты (например, токсины, продукты онкогенов, т. е. генов, чьи продукты обладают способностью трансформиро-

вать эукариотические клетки так, что они приобретают свойства опухолевых клеток).

В 1975 г. данные проблемы обсуждались на Международной конференции, посвященной вопросам получения рекомбинантных молекул ДНК. В ней приняли участие ученые разных областей биологии, а также юристы, представители прессы, государственных и частных промышленных компаний. Участники конференции пришли к выводу, что эксперименты с использованием методов генетической инженерии должны продолжаться, но при обязательном соблюдении определенных правил и рекомендаций.

В настоящее время в России работы генно-инженерного плана регулируются федеральным законом, принятым в 1996 г. Они подразделяются на два типа – ведущиеся в «закрытых» или «открытых» системах. В закрытых системах работы ведутся так, что имеется химический, биологический или физический барьер между генно-инженерными организмами и окружающей средой. В открытых системах такой контакт осуществляется (например, культивирование генно-инженерных овощей и злаков).

ГЛАВА 4. ПРОМЫШЛЕННАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

4.1. ПРОИЗВОДСТВО ПЕРВИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ

Первичные метаболиты – низкомолекулярные соединения, необходимые для роста микробов: одни из них являются строительными блоками макромолекул, другие – участвуют в синтезе коферментов. Среди наиболее важных для промышленности первичных метаболитов можно выделить аминокислоты, органические кислоты, нуклеотиды и витамины.

4.1.1. Производство аминокислот

Производство аминокислот в мире постоянно растет и в настоящее время составляет около 400 тыс. тонн/год, хотя потребность в них оценивается гораздо выше.

Как уже отмечалось, недостаток в рационе аминокислот (особенно, незаменимых) отрицательно сказывается на росте и развитии. Так, добавка к кормам животных нескольких долей % дефицитной кислоты может повысить кормовую ценность белка более чем в два раза.

Из всех возможных способов получения аминокислот (химическим путем, микробиологическим и др.) предпочтение отдается микробиологическому: хотя организацию микробного производства нельзя назвать

простой, ее преимущество состоит в синтезе оптически чистых (L-аминокислот), тогда как при химическом синтезе получается рацемическая смесь L- и D-аминокислот, которую трудно разделить.

Микробный синтез аминокислот основан на культивировании строго определенного продуцента целевой кислоты в среде заданного состава при строго определенных параметрах ферментации. Продуцентами являются штаммы бактерий, полученные мутантной селекцией или с помощью методов генной инженерии. Бактерии-мутанты, с одной стороны, утратили способность самостоятельно синтезировать некоторые вещества, а с другой стороны, приобрели способность к сверхсинтезу целевой аминокислоты. Уже к 70-м годам прошлого века были получены микробы-суперпродуценты из родов *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Micrococcus* и др. с помощью которых возможно производить все известные аминокислоты. В настоящее время имеются суперпродуценты, у которых количество синтезируемого специфического белка достигает 10–50 % (здесь важнейшую роль играют многокопийные плазмиды, несущие встроенные гены).

Технология получения аминокислот базируется на принципах ферментации продуцентов и выделения первичных метаболитов, т. е. размножают маточную культуру вначале на агаризованной среде в пробирках, затем – на жидкой среде в колбах, инокуляторах и посевных аппаратах, а затем – в основных ферментаторах.

Если аминокислота предусмотрена в качестве добавки к кормам, то биотехнологический процесс кормового продукта включает следующие стадии: ферментацию, стабилизацию аминокислоты в культуральной жидкости перед упариванием, вакуум-упаривание, стандартизацию упаренного раствора при добавлении наполнителя, высушивание и упаковку готового продукта, в котором должно содержаться не более 10 % основного вещества. Если же аминокислота используется в качестве лекарственного препарата, в этом случае получают изолированные чистые кристаллы, которые высушивают под вакуумом и упаковывают. Например, в промышленности изготавливают сухой кормовой и жидкий кормовой концентраты лизина наряду с кристаллическим лизином (рис. 4.1).

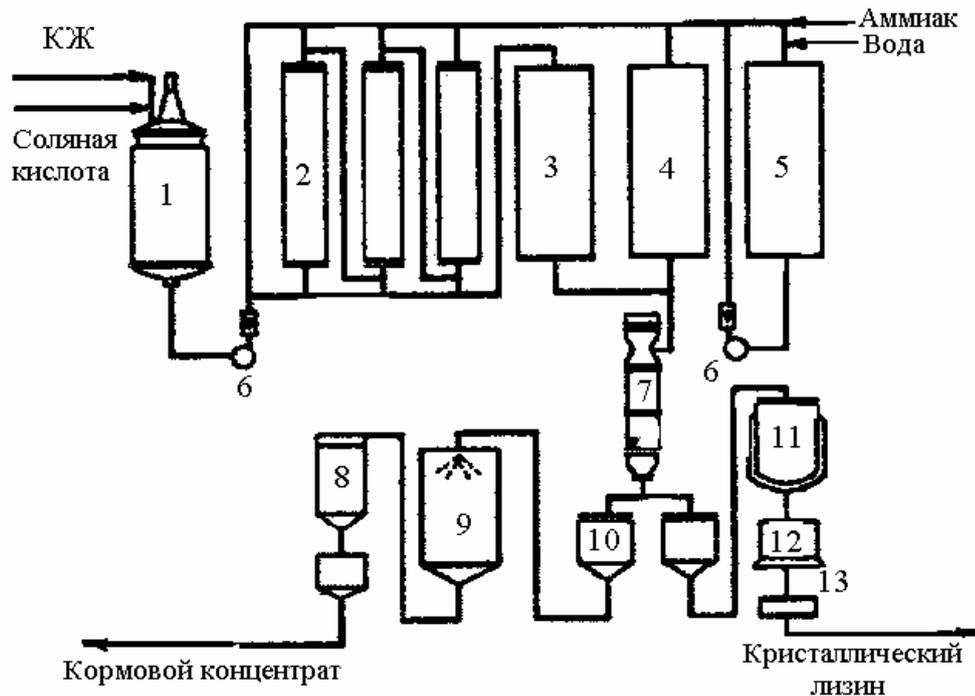


Рис. 4.1. Технологическая схема получения лизина:

1 – емкость для культуральной жидкости (КЖ); 2 – ионообменные колонны; 3 – сборник элюата; 4 – сборник фильтрата; 5 – емкость для элюата; 6 – насос; 7 – вакуум-выпарной аппарат; 8 – циклон; 9 – сушилка кормового концентрата; 10 – сборник; 11 – реактор-кристаллизатор; 12 – центрифуга; 13 – сушилка

Известны два способа получения аминокислот: одноступенчатый и двухступенчатый. Согласно первому способу, например, мутантный ауксотрофный штамм – продуцент аминокислоты – культивируют на оптимальной для биосинтеза среде. Целевой продукт накапливается в культуральной жидкости, из которой его выделяют согласно схеме на рис. 4.2.

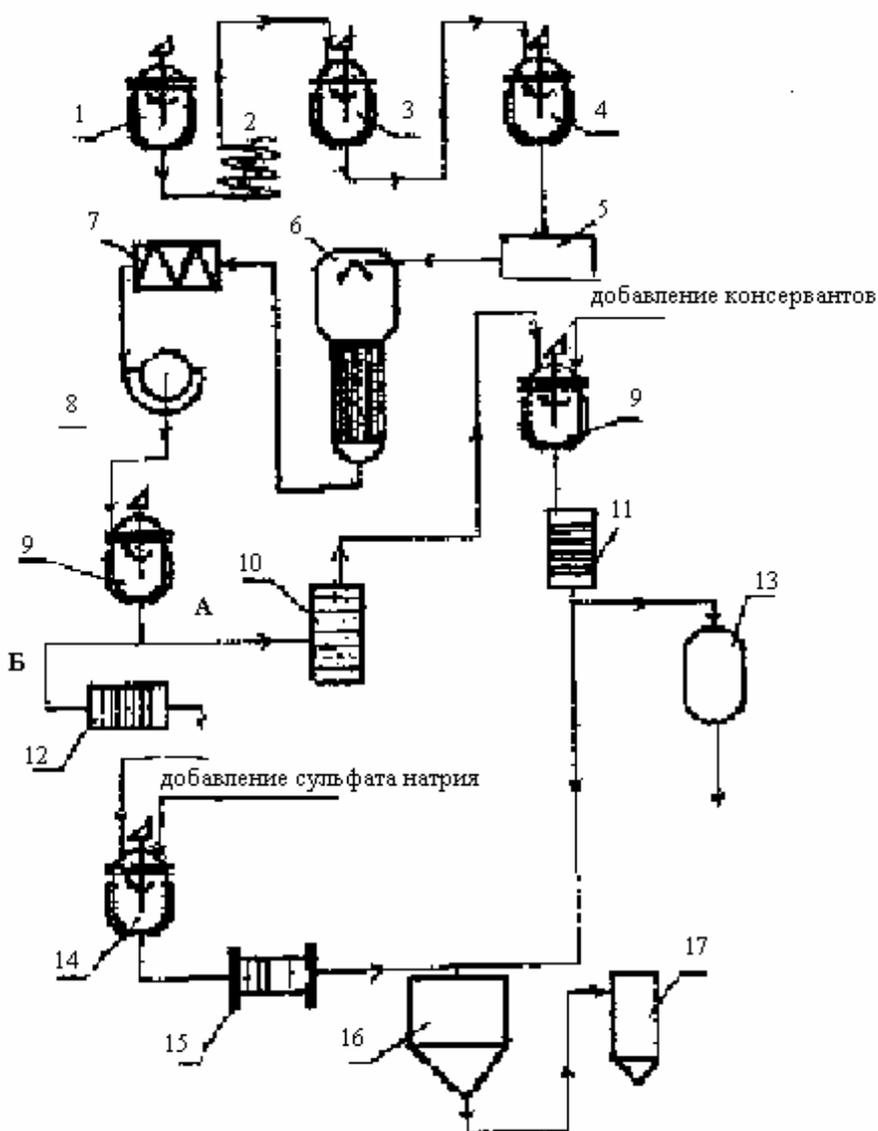
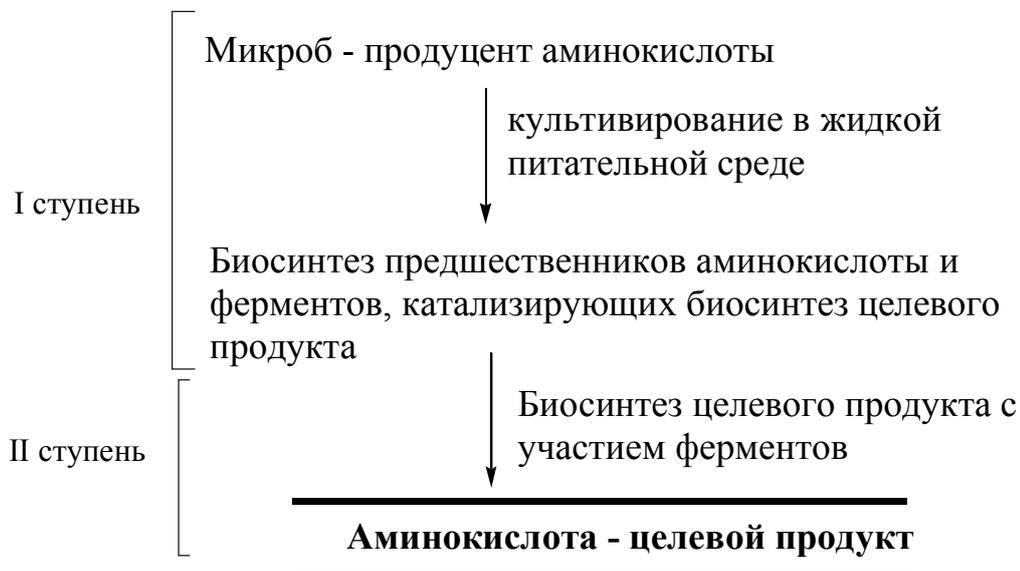


Рис. 4.2. Примерная технологическая схема получения аминокислоты:
 1 – ферментатор; 2 – охладитель; 3, 9 – рефрижераторы; 4 – емкость для предварительной обработки; 5 – центрифуга; 6 – вакуум-упариватель; 7 – аппарат прямой предобработки аминокислоты; 8 – барабанный фильтр; А, Б – пути (при необходимости смыкающиеся); 10 – аппарат для ультраfiltrации; 11 – емкость для консервации раствора аминокислоты; 12 – мембранный фильтр; 13 – накопитель жидкого концентрата; 14 – емкость для осаждения аминокислоты; 15 – фильтр-пресс; 16 – распылительная сушилка; 17 – накопитель сухого концентрата

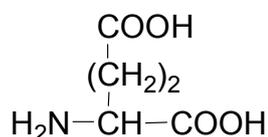
В двухступенчатом способе микроб-продуцент культивируют в среде, где он получает и синтезирует все необходимые ингредиенты для

последующего синтеза целевого продукта. Схема двухступенчатого процесса может быть представлена в следующем виде:



Если ферменты биосинтеза аминокислоты накапливаются внутриклеточно, то после 1-й ступени клетки сепарируют, дезинтегрируют и применяют клеточный сок. В других случаях для целей биосинтеза целевых продуктов применяют непосредственно клетки.

Получение глутаминовой кислоты



Глутаминовая кислота – это первая аминокислота, полученная микробиологическим путем. Мутантов, обеспечивающих сверхсинтез этой кислоты, не получено, а «перепроизводство» этой аминокислоты связано с особыми условиями, при которых нарушается синтез мембранных фосфолипидов. Глутаминовая кислота синтезируется исключительно культурами *Corynebacterium glutamicum* и *Brevibacterium flavum*.

Субстратами для ее получения являются глюкоза и уксусная кислота, а в начале 60-х гг. прошлого столетия использовали и *n*-парафины. Особые условия для роста культур создаются добавлением к культуральной жидкости пенициллина, который подавляет синтез клеточной стенки, или уменьшением (по сравнению с оптимальной) концентрации биотина (витамина В₇) в среде, который индуцирует структурно-функциональные изменения в клеточной мембране, благодаря чему увеличивается ее проницаемость для глутаминовой кислоты, выходящей из

клетки в культуральную жидкость. В Японии с помощью селекции выделены температурозависимые штаммы бактерий (термофилы), которые продуцируют высокое содержание глутаминовой кислоты при повышенных температурах: в таких условиях достигают 50 %-го превращения используемого источника углерода в глутаминовую кислоту.

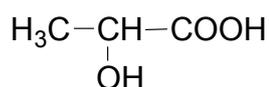
Натриевая соль глутаминовой кислоты широко применяется в пищевой промышленности для улучшения вкуса продуктов питания в консервированном и замороженном виде.

4.1.2. Производство органических кислот

Органические кислоты можно получать как в анаэробных условиях (так называемые бродильные процессы), так и в аэробных условиях (окислительные процессы).

Бродильные процессы

Получение молочной кислоты



Молочная кислота широко применяется в пищевой, текстильной и фармацевтической промышленности, в изготовлении растворителей и пластификаторов в лаках, олифах и т. п.

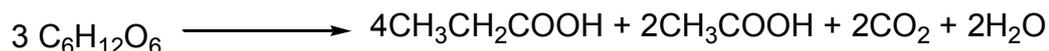
В промышленном производстве молочной кислоты обычно используют термофильные штаммы бактерий, синтезирующие целевой продукт при 50°C. Таким штаммом является *Lactobacillus delbrueckii*, отличающийся высокими стабильностью и активностью кислотообразования (выход молочной кислоты составляет 95–98 % от потребленной сахарозы).

Принципиальная технологическая схема получения L(+)-молочной кислоты состоит в следующем: меласную среду, содержащую 5–20 % сахара, вытяжку солодовых ростков, дрожжевой экстракт, витамины, фосфат аммония, засевают *L. delbrueckii*. Брожение протекает при 49–50°C при исходном pH 6,3–6,5. По мере образования молочной кислоты ее нейтрализуют мелом. Весь цикл ферментации завершается за 5–10 дней; при этом в культуральной жидкости содержатся 11–14 % лактата кальция и 0,1–0,5 % сахарозы. Клетки бактерий и мел отделяют фильтрованием, фильтрат упаривают до концентрации 3–0 %, охлаждают до 25°C и подают на кристаллизацию, которая длится 1,5–2 суток. Кристаллы лактата кальция обрабатывают серной кислотой при 60–70°C,

гипс выпадает в осадок, а к надосадочной жидкости добавляют желтую кровяную соль при 65°C для удаления ионов железа, затем – сульфат натрия для освобождения от тяжелых металлов. Красящие вещества удаляют с помощью активированного угля. После этого раствор молочной кислоты подвергают вакуум-упариванию до 50 или 80 %. Оставшийся не до конца очищенный раствор молочной кислоты используют для технических целей. Более очищенную кислоту можно получить при перегонке ее сложных метиловых эфиров, при экстракции простым изопропиловым эфиром в противоточных насадочных колоннах.

Получение пропионовой кислоты

Производство пропионовой кислоты осуществляется пропионовыми бактериями, представляющими собой грамположительные, бесспорные, неподвижные палочки семейства *Propionibacteriaceae*, культивируемые в средах, где источником углерода является глюкоза. Из трех молекул глюкозы образуется 4 молекулы пропионовой кислоты, 2 молекулы уксусной кислоты, 2 молекулы углекислого газа и 2 молекулы воды:



Перспективными для производства пропионовой кислоты оказались виды *P. freudenreichii* и *P. acidipropionici*.

Биосинтез кислоты проводят на достаточно простых средах, например такого состава (в %): углевод – 1–2; сульфат аммония – 0,3; гидроксид фосфата калия – 0,2; хлорид кобальта – 0,0001; биотин – 0,00001; пантотенат – 0,1; тиамин – 0,01.

Конечные продукты ферментации (пропионат и ацетат) можно не разделять, поскольку обе кислоты обладают консервирующими свойствами. Биосинтетическая пропионовая кислота применяется в пищевой и фармацевтической промышленности в качестве консерванта.

Окислительные процессы

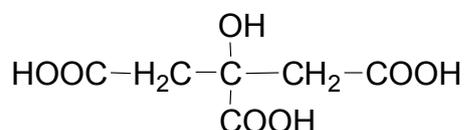
Получение уксусной кислоты

Микробиологическое производство уксусной кислоты экономически выгодно лишь при получении пищевого уксуса, а не технической уксусной кислоты.

Получают уксусную кислоту методом глубинного культивирования грамотрицательных штаммов бактерий *Acetobacter aceti*. Так, при периодическом выращивании *A. aceti* в глубинных условиях при 25–30°C на среде, содержащей 10–11 % этанола, 1 % уксусной кислоты и мине-

ральные соли, выход уксусной кислоты составляет 18–23 кг/м³/сут. Более производительным является непрерывный глубинный процесс, реализуемый в батарее ферментаторов (например, из пяти ферментаторов, емкостью 6 м³ каждый, соединенных последовательно). Исходная среда с 4 % этанола, 1,5 % уксусной кислоты и минеральными солями (моногоидрофосфат аммония, дигидрофосфат калия, сульфат магния) непрерывно поступает в первый ферментатор, обогащается спиртом в последующих ферментаторах. Таким образом происходит обогащение среды уксусной кислотой при снижении концентрации этанола. Из последнего ферментатора непрерывно вытекает уксус. Выход уксусной кислоты достигает 30 кг/м³/сут. и более.

Получение лимонной кислоты



Около 60 лет назад лимонную кислоту выделяли преимущественно из плодов citrusовых растений. Теперь же основную массу ее производят с помощью определенных штаммов плесневого гриба *Aspergillus niger*.

Поскольку основным сырьем для получения лимонной кислоты является меласса, в которой содержится много железа, то на стадии предферментации его осаждают при помощи желтой кровяной соли – $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.

Известны два способа ферментации *A. niger* – поверхностный и глубинный. Первый из них реализуют на предприятиях малой и средней мощности в виде жидкофазной ферментации на жидкой среде (например, в ряде стран Европы и Америки) и в виде твердофазной ферментации (например, в Японии).

Технологическая схема жидкофазной ферментации представлена на рис. 4.3.

Поверхностный способ жидкофазной ферментации для промышленного производства лимонной кислоты реализуют в «бродильных камерах», где на стеллажах (одну над другой) размещают кюветы (8–10 штук на один стеллаж). На дне каждой кюветы расположен сливной штуцер. «Бродильные камеры» оборудованы приточно-вытяжной вентиляцией, обеспечивающей равномерный приток стерильного воздуха заданной температуры и влажности (3–4 м³/м² мицелия час⁻¹). Температура в камерах поддерживается на уровне 34–36 °С, высота питающего слоя жидкой мелассной среды – 6–12 см. Максимальное тепловыде-

ление ($500\text{--}550 \text{ кДж/м}^2 \text{ ч}$) имеет место к пяти суткам; исходная концентрация сахаров в питательной среде в среднем порядка 12 %, начальное значение рН 6,8–7 снижается до 4,5 в течение первых трех суток и до 3,0 к концу процесса (8–9 сутки). Максимальное кислотообразование в таких условиях происходит на 5–6– сутки ($100\text{--}105 \text{ г/м}^2 \text{ пленки гриба час}^{-1}$), а затем стабильно удерживается на уровне $50\text{--}60 \text{ г/м}^2 \text{ час}^{-1}$.

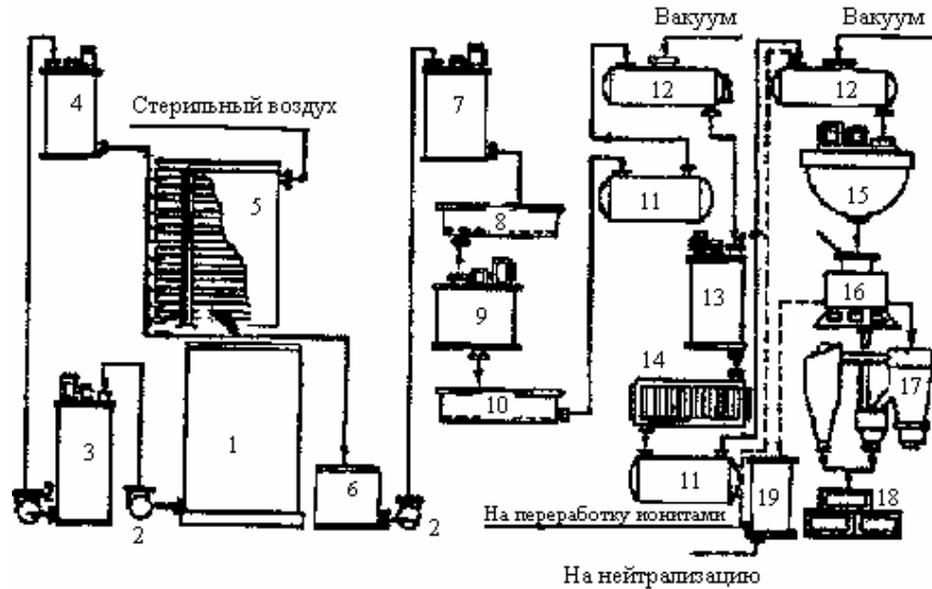


Рис. 4.3. Технологическая схема получения лимонной кислоты из мелассы поверхностным способом (жидкофазная ферментация):

1 – цистерна для мелассы; 2 – центробежные насосы; 3 – реактор для разбавления мелассы; 4 – стерилизационная камера; 5 – бродильная камера; 6 – сборник сброженных растворов; 7 – нейтрализатор; 8, 10 – нутч-фильтры; 9 – расщепитель; 11 – сборник-монтежу; 12 – вакуум-аппарат; 13 – дисолвер; 14 – фильтр-пресс; 15 – кристаллизатор; 16 – приемник; 17 – сушилка; 18 – готовая продукция; 19 – сборник фильтрата

В собранной культуральной жидкости содержится смесь органических кислот – лимонная, глюконовая, щавелевая и неиспользованный сахар в примерном соотношении 45–50:3:1:7, т. е. лимонная кислота составляет от 80 до 90 %. Ее выделяют химическим путем – добавляют к нагретой до $100 \text{ }^\circ\text{C}$ культуральной жидкости известковое молоко $\text{Ca}(\text{OH})_2$ или мел CaCO_3 , доводя рН до 6,8–7,0; это количество составляет примерно 2,5–3 %; трехзамещенный цитрат кальция, хуже растворимый в горячей воде, чем в холодной, выпадает в осадок вместе с оксалатом кальция (глюконат кальция остается в растворе); осадок отфильтровывают, промывают горячей водой и гидролизуют серной кислотой. Свободная лимонная кислота остается в растворе, а негидролизированный оксалат кальция и образовавшийся гипс CaSO_4 остаются в осадке. Раствор лимонной кислоты очищают, подвергают вакуум-упариванию и

кристаллизуют. Кристаллы кислоты высушивают и фасуют. Мицелий продуцента либо используют для выделения фермента пектиназы, либо высушивают и поставляют на корм скоту и домашней птице.

Твердофазная ферментация на уплотненных средах для получения лимонной кислоты – наиболее простой способ из всех известных. Ферментацию определенного штамма *A. niger* проводят на увлажненных отрубях риса или пшеницы, находящихся в кюветах. Условия биосинтеза кислот при этом аналогичны условиям на агаризированных или в жидких питательных средах. После окончания процесса отруби экстрагируют водой, куда переходят кислоты, а затем выделяют цитрат кальция и чистую лимонную кислоту согласно схеме, изложенной выше.

Глубинный способ производства базируется на использовании специальных культур *A. niger* (В России применяют селекционированный штамм № 288/9). Инокулят подращивают сначала в инокуляторе, затем – в посевном аппарате (примерно в 1/10 объема основного ферментатора) на среде с 3–4 % сахара. Спустя 1–1,5 суток инокулят передают из посевного в основной ферментатор, где процесс ведут в течение 5–7–10 суток на аналогичной среде с трехразовым доливом 25–28 % (по сахару) раствора мелассы с целью доведения конечной концентрации сахара в культуральной жидкости до 12–15 %. После окончания ферментации (контроль – снижение кислотообразования) мицелий гриба отфильтровывают и культуральную жидкость подвергают обработке, как указано выше.

Общая технологическая схема получения лимонной кислоты при глубинной ферментации приведена на рис. 4.4.

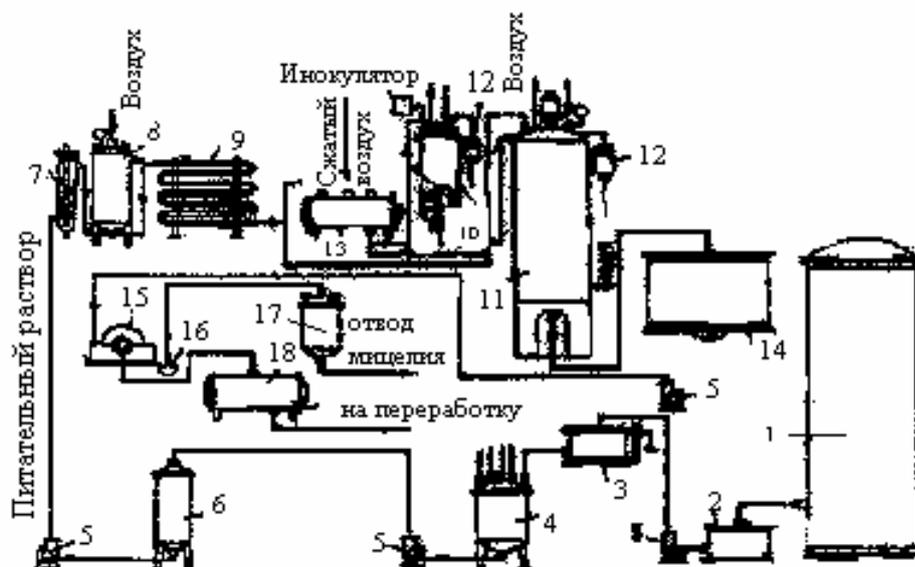


Рис. 4.4. Технологическая схема получения лимонной кислоты при глубокой ферментации продуцента:

1 – емкость с мелассой; 2 – приемник мелассы; 3 – весы; 4 – варочный котел; 5 – центробежный насос; 6 – промежуточная емкость; 7 – стерилизующая колонка; 8 – выдерживатель; 9 – холодильник; 10 – посевной аппарат; 11 – головной ферментатор; 12 – стерилизующие фильтры; 13 – емкость для хранения мелассы; 14 – промежуточный сборник; 15 – барабанный вакуум-фильтр; 16 – приемник для мицелия; 17 – вакуум-сборник для мицелия; 18 – вакуум-сборник фильтрата культуральной жидкости

Лимонную кислоту широко используют в пищевой, медицинской, фармацевтической и лакокрасочной промышленности.

4.1.3. Получение витаминов

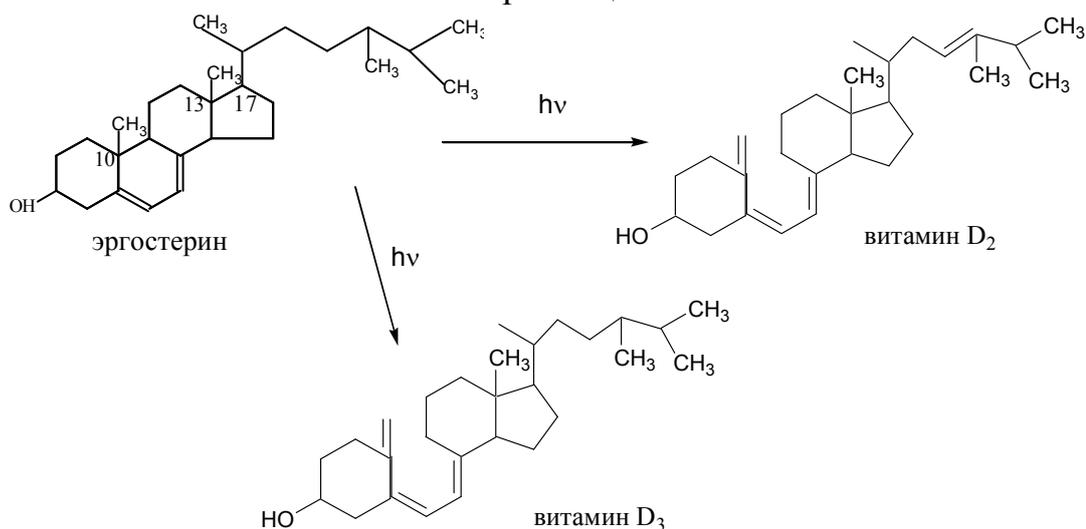
Витамины поставляются в организм с пищей или их назначают в форме лекарственных препаратов при определенных патологических процессах. Среди жиро- и водорастворимых витаминов биотехнологическим путем производят витамины А₁ и D, рибофлавин (витамин В₆), аскорбиновую кислоты (витамина С) и цианкобаламин (витамин В₁₂).

Получение витамина D

Витамин D – это группа родственных соединений, в основе которых находится эргостерин, который обнаружен в клеточных мембранах эукариот. Поэтому, например, пекарские или пивные дрожжи применяют для получения эргостерина как провитамина, обладающего антирахиитическим действием. Содержание эргостерина в дрожжевых клетках колеблется в пределах 0,2–11 %.

При недостатке в организме гормона 1,25–дигидрокси-холекальциферола, предшественником которого является витамин D, у детей развивается рахит, а у взрослых – остеомаляция.

Трансформация эргостерина в витамин D₂ (кальциферол) происходит под влиянием ультрафиолетового света. При этом разрывается связь в кольце (позиции 9,10) и образуется двойная связь в боковой цепочке (позиции 22, 23). Эта последняя гидрирована в витамине D₃. Физиологическая активность этих витаминов равноценна.



Кроме дрожжей, продуцентами эргостерина могут быть мицелиальные грибы – аспергиллы и пенициллы, в которых содержится 1,2–2,2 % эргостерина.

Получение эргостерина в производственных условиях можно подразделить на следующие этапы: размножение исходной культуры и накопление инокулята, ферментация, сепарирование клеток, облучение ультрафиолетовыми лучами, высушивание и упаковка целевого продукта.

Так, применительно к дрожжам, инокулят получают на средах, обеспечивающих полноценное развитие клеток, после чего основную среду с ацетатом (активатором биосинтеза стерина), обогащенную источником углерода и содержащую пониженное количество азота, засевают сравнительно большим количеством инокулята. Ферментацию дрожжей проводят при максимальной для конкретного штамма температуре и выраженной аэрации (2 % O₂ в газовой фазе). Спустя трое-четверо суток клетки сепарируют и подвергают вакуум-высушиванию. Затем сухие дрожжи облучают ультрафиолетовыми лучами (длина волны 280–300 нм). Облученные сухие дрожжи применяют в животновод-

стве; в промышленности их выпускают под названием «кормовые гидролизные дрожжи, обогащенные витамином D₂».

В случае получения кристаллического витамина D₂ клетки продуцента гидролизуют соляной кислотой при 110 °С, затем температуру снижают до 75–78 °С и добавляют этанол. Смесь фильтруют при 10–15 °С, оставшуюся после фильтрации массу промывают водой, высушивают, измельчают, нагревают до 78 °С и дважды обрабатывают тройным объемом этанола. Спиртовые экстракты объединяют и упаривают до 70 %-го содержания сухих веществ. Полученный «липидный концентрат» обрабатывают раствором едкого натра. Эргостерин кристаллизуют из неомыленной фракции концентрата при 0 °С. Его можно очистить повторными кристаллизациями. Кристаллы высушивают, растворяют в этиловом эфире, облучают УФЛ, эфир отгоняют, раствор витамина D₂ концентрируют и кристаллизуют.

Получение витамина B₁₂

Продуцентами витамина B₁₂ являются пропионовые бактерии, которые и в естественных условиях образуют этот витамин.

Учитывая важную функцию витамина в организме человека (он является противоанемическим фактором), его мировое производство достигло 10 т в год, из которых 6,5 т расходуют на медицинские нужды, а 3,5 т – в животноводстве.

Отечественное производство цианкобаламина базируется на использовании культуры *P. freudenreichii var. shermanii*, культивируемой в периодическом режиме без доступа кислорода. Ферментационная среда обычно содержит глюкозу, кукурузный экстракт, соли аммония и кобальта, рН около 7,0 поддерживают добавлением NH₄OH; продолжительность ферментации – 6 суток; через трое суток в среду добавляют 5,6–диметилбензимидазол – предшественник витамина B₁₂ и продолжают ферментацию еще трое суток. Цианкобаламин накапливается в клетках бактерий, поэтому операции по выделению витамина заключаются в следующем: сепарирование клеток, экстрагирование водой при рН 4,5–5,0 и температуре 85–90 °С в присутствии стабилизатора (0,25 %-й раствор нитрита натрия). Экстракция протекает в течение часа, после чего водный раствор охлаждают, нейтрализуют раствором едкого натра, добавляют коагулянты белка (хлорид железа (III) и сульфат алюминия) с последующим фильтрованием. Фильтрат упаривают и дополнительно очищают, используя методы ионного обмена и хроматографии, после чего проводят кристаллизацию витамина при 3–4 °С из водно-ацетонового раствора. Все операции по выделению витамина необхо-

димо проводить в затемненных условиях (или при красном свете) из-за высокой светочувствительности витамина В₁₂.

Первоначальная стоимость витамина В₁₂ составляла 12500 долларов/г, в настоящее время она составляет 200 долларов/г, однако, витамин В₁₂ остается самым дорогим органическим соединением в мире.

4.2. ПРОИЗВОДСТВО ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ

Вторичные метаболиты (идиолиты) – это низкомолекулярные соединения, не требующиеся на стадии роста чистой культуры, однако они необходимы для функционирования зрелой популяции. Часто они выполняют защитную роль при конкуренции с другими микроорганизмами. К ним относятся антибиотики, алкалоиды, гормоны роста растений, токсины.

Производство антибиотиков

Антибиотиками называют продукты жизнедеятельности организмов, обладающие антибактериальным действием. Большинство известных в настоящее время антибиотиков являются веществами, выделяемыми различного вида микроорганизмами – бактериями, дрожжами, плесенями, актиномицетами. Антибиотики получены также из животных тканей и высших растений (фитонциды).

Идея использования антагонизма между микроорганизмами (так называемого «антибиоза») для подавления болезнетворных микробов принадлежит И. И. Мечникову, положившему в конце прошлого века начало современному учению о лекарственных веществах микробов.

Для того чтобы антибиотическое вещество могло быть применено в медицинской практике, необходима совокупность высокой антибактериальной активности и отсутствия токсического действия по отношению к макроорганизму. Из большого числа выделенных и изученных антибиотиков этому важнейшему требованию удовлетворяют очень немногие соединения.

В химическом отношении антибиотики – вещества очень разнообразные, хотя некоторые из них представляют целые классы с подобной структурой, например: пенициллины, тетрациклины и др. В настоящее время установлено, что вещества, сходные по химической структуре, сходны и по характеру действия. Так, пенициллины действуют на клеточную стенку бактерий и препятствуют ее синтезу. Некоторое время бактерии еще размножаются, но, лишенные клеточной стенки, скоро погибают.

Антибиотик стрептомицин, проникнув в клетку микроба, достигает рибосом (места синтеза белков) и блокирует их деятельность.

Актиномицин действует на молекулу ДНК, в результате становится невозможным синтез информационной РНК, переносящей к рибосомам «приказы» ДНК о синтезе белков. Сходное действие проявляет и рифампицин, хотя и несколько иным способом: он снижает активность РНК-полимеразы и РНК не может образовываться.

На ДНК действуют и молекулы противоопухолевого антибиотика митомицина С: прочно связываясь с ней, он препятствует дальнейшему синтезу ДНК.

При повторных воздействиях молекул антибиотика клетка микроба погибает. Если же антибиотик вводится в недостаточном количестве, то клетки микроба восстанавливаются, и микроб выживает и дает потомство, устойчивое (резистентное) к действию данного антибиотика.

Приведенные примеры действия антибиотиков – это лишь отдельные случаи их разнообразного биохимического воздействия на микроорганизмы.

Классификация антибиотиков

Среди основных принципов классификации антибиотиков рассмотрим следующие:

1. Классификация антибиотиков по биологическому происхождению:

- а) антибиотики, вырабатываемые микроорганизмами, относящимися к эубактериям;
- б) антибиотики, образуемые микроорганизмами, принадлежащими к порядку *Actinomycetales*;
- в) антибиотики, образуемые цианобактериями;
- г) антибиотики, образуемые несовершенными грибами;
- д) антибиотики, образуемые грибами, относящимися к классам базиди-мицетов и аскомицетов;
- е) антибиотики, образуемые лишайниками, водорослями и низшими растениями;
- ж) антибиотики, образуемые высшими растениями;
- з) антибиотики животного происхождения.

2. Классификация по спектру биологического действия:

- а) противобактериальные антибиотики узкого спектра действия, активные преимущественно в отношении грамположительных организмов;
- б) противобактериальные антибиотики широкого спектра действия;
- в) противотуберкулезные антибиотики;
- г) противогрибные антибиотики;
- д) противоопухолевые антибиотики.

3. Классификация антибиотиков по химическому строению:

- а) антибиотики ациклического строения;
- б) антибиотики алициклического строения;
- в) тетрациклины;
- г) ароматические антибиотики;
- д) антибиотики–хиноны;
- е) антибиотики–кислородсодержащие гетероциклические соединения;
- ж) антибиотики–азотсодержащие гетероциклические соединения;
- з) антибиотики–аминогликозиды;
- и) металлсодержащие антибиотики.

Основные этапы промышленного получения антибиотиков

После установления высоких лечебных свойств первого антибиотика – пенициллина сразу же возникли задачи организации его производства в больших количествах. На первом этапе промышленное получение этого препарата носило примитивный, экономически нерентабельный характер. Выращивание продуцента антибиотика осуществлялось на средах, находящихся в небольших сосудах, при поверхностном культивировании гриба. Процесс развития гриба продолжался 8–10 суток. Такой способ культивирования гриба при большой затрате труда давал весьма низкий выход антибиотика, и себестоимость препарата была соответственно очень высокой. В результате поисков путей наиболее рационального способа производства антибиотика был предложен метод глубинного выращивания гриба в специальных емкостях–ферментаторах при продувании воздуха и перемешивании культуральной жидкости.

Современное промышленное получение антибиотиков – это сложная многоступенчатая биотехнологическая схема, состоящая из ряда последовательных стадий:

1. Стадии биосинтеза (образования) антибиотика. Это основная биологическая стадия сложного процесса получения антибиотического вещества. Главная задача на этой стадии – создание оптимальных условий для развития продуцента и максимально возможного биосинтеза антибиотика.

Высокая результативность стадии зависит от уровня биосинтетической активности продуцента антибиотика, времени его максимального накопления, стоимости сред для культивирования организма, в том числе стоимости применяемых предшественников, а также общих энергетических затрат на процессы, связанные с развитием продуцента антибиотического вещества.

2. Стадии предварительной обработки культуральной жидкости, клеток (мицелия) микроорганизма и фильтрации (отделение культуральной жидкости от биомассы продуцента). Эффективность стадии во многом определяется составом среды для выращивания продуцента антибиотика, характером его роста, местом основного накопления биологически активного вещества (в культуральной жидкости или внутриклеточно).

3. Стадия выделения и очистки антибиотика. На этой стадии, в зависимости от свойств антибиотика, его химического строения и основного места накопления антибиотического вещества, применяют различные методы выделения и очистки. В качестве основных методов используются экстракция, осаждение, сорбция на ионообменных материалах, упаривание, сушка. Особенность этой технологической стадии определяется тем, что на первой стадии работы имеют дело с небольшой концентрацией (~1 %) антибиотика в обрабатываемом растворе, тогда как на последующих этапах его концентрация увеличивается до 20–30 %. Все это требует применения различных емкостей и объемов используемых реагентов.

4. Стадии получения готовой продукции, изготовления лекарственных форм, расфасовки. Особенность стадии определяется очень высоким требованиям к качеству конечного продукта. В случае выпуска антибиотиков, предназначенных для инъекций, препараты должны быть стерильными; получение таких антибиотических препаратов, приготовление различных лекарственных форм, дозировка (расфасовка) и упаковка должны осуществляться в асептических условиях.

Для максимального выхода антибиотика при культивировании продуцента используют комплекс мер, включающих подбор наиболее благоприятных для этих целей питательных сред и режимов культивирования организма. Весь этот комплекс мер включается в понятие «управляемый биосинтез».

В промышленных условиях управляемый биосинтез требует строгого соблюдения технологического процесса как на стадии подготовки инокулята, так и на стадии биосинтеза. На стадии подготовки инокулята особое внимание обращают на состав среды, на которой выращивается организм, на возраст клеток или мицелия. На стадии биосинтеза, кроме состава среды, большую роль играют скорость потребления тех или иных компонентов, предшественники, регуляция процесса аэрации культуры, поддержание соответствующих температуры и рН среды и других показателей режима культивирования.

В современных условиях производства принимают меры к максимальному снижению себестоимости препаратов путем интенсификации

всех стадий технологического процесса и, прежде всего, повышением эффективности первой стадии – биосинтеза антибиотического вещества. Для этого необходимо:

а) внедрение в производство наиболее высокопродуктивных штаммов микроорганизмов – продуцентов антибиотиков;

б) создание и обеспечение самых благоприятных условий развития продуцента антибиотика на относительно дешевых средах;

в) широкое использование математических методов планирования процесса развития организма и электронно-вычислительной техники с целью оптимизации и моделирования условий его культивирования, обеспечивающих максимальный выход антибиотика;

г) применение современного оборудования на всех стадиях технологического процесса с автоматизированными контролирующими устройствами основных параметров развития организма и стадий биосинтеза антибиотика.

Методы культивирования продуцентов антибиотиков

В современных условиях наиболее перспективным методом выращивания микроорганизмов–продуцентов антибиотиков признан метод глубинного культивирования. Метод состоит в том, что микроорганизм развивается в толще жидкой питательной среды, через которую непрерывно подается стерильный воздух, и среда перемешивается.

Существует четыре основных модификации глубинного способа выращивания микроорганизмов.

1. Периодическое культивирование. При этом способе весь процесс развития микроорганизмов полностью завершается в одном ферментаторе, после чего ферментатор освобождается от культуральной жидкости, тщательно промывается, стерилизуется и вновь заполняется свежей питательной средой. Среда засеивается изучаемым микроорганизмом, и процесс возобновляется.

2. Отъемный метод. Культивирование микроорганизмов осуществляется в ферментаторах с периодическим отбором части объема культуральной жидкости в ферментаторе и доводится свежей питательной средой до исходного уровня.

3. Батарейный способ. Микроорганизмы развиваются в ряду последовательно соединенных ферментаторов. Культуральная жидкость на определенной стадии развития микроорганизма перекачивается из первого ферментатора во второй, затем из второго в третий и т. д. Освобожденный ферментатор немедленно заполняется свежей питательной средой, засеянной микроорганизмом. При этом способе выращивания микроорганизмов емкости используются более рационально.

4. Непрерывное культивирование. В основе метода лежит принцип непрерывного потока питательной среды, что позволяет поддерживать развитие микроорганизма на определенной стадии его роста. Стадия развития микроорганизма определяется тем, что в этот период происходит максимальный биосинтез антибиотика или другого биологически активного соединения. Установлено, что в условиях непрерывного процесса биосинтеза некоторых антибиотиков можно получить хорошие результаты, если процесс вести в две стадии. В первом аппарате батареи поддерживают высокую скорость потока, обеспечивающую большую скорость роста продуцента антибиотика, с тем, чтобы получить высокоактивную биомассу, а во втором аппарате – обеспечивают низкую скорость потока и соответственно небольшую скорость роста. Процесс непрерывного культивирования – перспективное направление современной биотехнологии.

Стерилизация питательных сред

Для каждого продуцента антибиотика разрабатывается оптимальная питательная среда. Среда должна соответствовать определенным требованиям:

- а) обеспечивать максимальный выход антибиотика;
- б) состоять из относительно дешевых компонентов;
- в) иметь хорошую фильтрующую способность;
- г) обеспечивать применение наиболее экономичных приемов выделения и очистки антибиотиков.

Стерилизация питательных сред в промышленных условиях осуществляется двумя методами: периодическим и непрерывным.

Периодический метод стерилизации применяется при использовании небольших объемов среды и состоит в том, что среда нагревается до температуры 120–130 °С непосредственно в ферментаторах или в специальных котлах–стерилизаторах, выдерживается при этой температуре в течение 30–60 минут (в зависимости от объема среды и ее состава), после чего охлаждается до 27–30 °С.

За время, затрачиваемое на нагрев среды до температуры, необходимой для стерилизации, и ее охлаждение, уничтожается значительное число микроорганизмов. Эффект стерилизации и сохранение термолабильных веществ достигаются в том случае, если стерилизацию проводят при более высокой температуре и за более короткое время.

Непрерывный метод стерилизации целесообразно применять при использовании больших объемов среды. Приготовленная среда из специального сосуда с помощью насоса подается в стерилизационную колонну, через которую пропускают острый пар (давление пара около 50⁵ Па). Пар подают сверху по внутренней трубе, имеющей щелевидные

прорези, благодаря чему он поступает в среду, быстро ее нагревая. Среда в колонну подается снизу и движется по спирали вокруг внутренней трубы.

Среда, нагретая в колонне до необходимой для стерилизации температуры (~130 °С), поступает в специальный аппарат, где она выдерживается определенное время при температуре 125–130 °С. Время выдержки зависит от состава среды и длится 5–10 минут. Отсюда стерильная среда поступает в змеевиковый холодильник, охлаждается до 30–35 °С (на выходе) и поступает в ферментатор.

Непрерывный метод стерилизации имеет ряд преимуществ: возможность автоматического регулирования процесса, быстрый и равномерный нагрев среды, обеспечение более полной стерильности среды и др.

Подготовка посевного материала

Подготовка посевного материала – одна из ответственных операций в цикле биотехнологического способа получения антибиотиков. От количества и качества посевного материала зависит как развитие культуры в ферментаторе, так и биосинтез антибиотика. Продуцент обычно выращивают на богатых по составу натуральных средах, способных обеспечить наивысшую физиологическую активность микроорганизмов. Подготовка посевного материала – процесс многоступенчатый (рис.5.5).

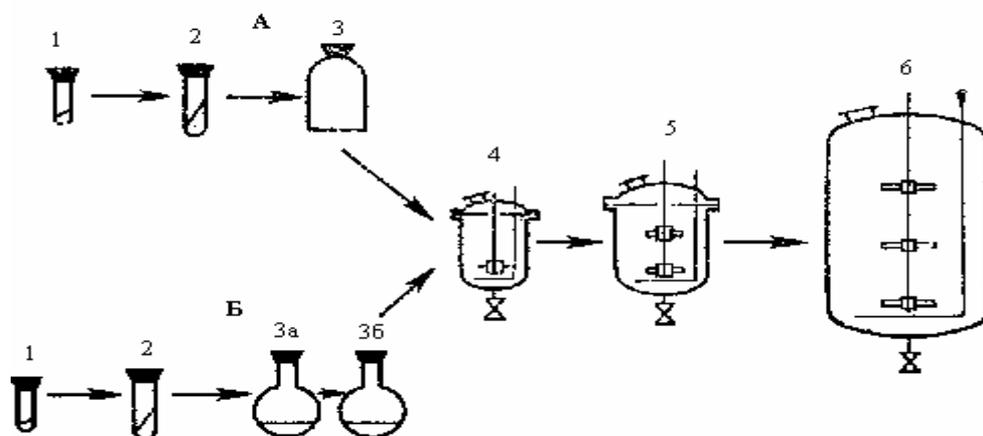


Рис. 4.5. Схема многоступенчатого приготовления посевного материала

А – выращивание во флаконах, Б – в колбах на качалках:

1 – законсервированный исходный материал; 2 – споровая генерация на косом агаре в пробирке; 3 – II споровая генерация на твердой среде в сосуде; 3а и 3б – I и III генерации на жидкой среде в колбе; 4 – ферментатор предварительного инокулирования; 5 – ферментатор инокулирования; 6 – основной ферментатор

Микроорганизм предварительно выращивают на агаризованной среде в пробирке (1, 2), затем из пробирки делают высев в колбы с жидкой питательной средой и проводят две генерации при глубинном вы-

рацивании на качалках в течение двух–трех суток для каждой генерации (3а и 3б). Из второй генерации культуры в колбе делают посев в небольшой (10 л) инокулятор 4, после чего хорошо развившуюся культуру переносят в более крупный инокулятор 5 (100–500 л), откуда и делают посев в основной ферментатор 6. Для посева в основной ферментатор используют от 5 до 10 % посевного материала (инокулята).

Развитие продуцента антибиотика в ферментаторах

Развитие микроорганизма в ферментаторах проходит при строгом контроле всех его стадий и очень точном выполнении регламента условий развития. Большое внимание уделяют поддержанию заданной температуры культивирования, активной кислотности среды (рН), степени аэрации и скорости работы мешалки. В процессе развития организма осуществляют биологический контроль, учитывают потребление организмом основных питательных компонентов субстрата (источника углерода, азота, фосфора), внимательно следят за образованием антибиотика. В последнее время все чаще биологический контроль проводят с помощью ЭВМ.

Большое внимание при развитии продуцента в ферментаторах обращают на процесс пеногашения. При продувании воздуха через культуру микроорганизма образуется обильная пена, которая существенно нарушает процесс развития продуцента антибиотика в ферментаторе. Появление большого количества пены обусловлено белковыми веществами, находящимися в среде, и ее высокой вязкостью, что связано с обильным накоплением биомассы.

Для борьбы с пеной в ферментаторах используют поверхностно-активные вещества: растительные масла (соевое, подсолнечное), животный жир (лярд, кашалотовый жир), а иногда минеральные масла (вазелиновое, парафиновое), спирты и высшие жирные кислоты. Нередко в качестве пеногасителей используют специально синтезированные вещества (силиконы, diazobutanancarbamyl и др.).

Многие вещества (масла, жиры, спирты и др.), используемые в качестве пеногасителей, потребляются продуцентами антибиотиков как дополнительные источники углеродного питания. При этом часто наблюдается повышение выхода антибиотика. Однако внесение пеногасителя может снижать скорость растворения кислорода, что, в свою очередь, отрицательно сказывается на развитии микроорганизма и его биосинтетической активности.

Иногда используются механические способы пеногашения (отсасывание пены через специальные трубы, разрушение пузырьков пены сильными струями жидкости, пара или газа).

Общая схема производства антибиотиков до стадии выделения и химической очистки представлена на рис. 4.6.

Предварительная обработка культуральной жидкости, выделение и химическая очистка антибиотиков

В процессе развития микроорганизмов образующиеся ими антибиотики в большинстве случаев почти полностью выделяются из клеток в окружающую среду. Однако в ряде случаев в культуральную жидкость попадает лишь часть антибиотика, а другая часть сохраняется внутри клеток.

У ряда продуцентов антибиотик почти полностью содержится в клетках организма. В зависимости от того, где антибиотическое вещество сосредоточено, применяют соответствующие методы его извлечения. Так, если антибиотик находится в культуральной жидкости, его выделяют методами экстракции, используя для этого растворители, не смешивающиеся с жидкой фазой, осаждают в виде нерастворимого соединения или сорбируют ионообменными смолами. Если антибиотик содержится в культуральной жидкости и в клетках продуцента, то сначала антибиотик переводят в фазу, из которой наиболее целесообразно его изолировать. Например, антибиотик, содержащийся в культуральной жидкости, и клетки с антибиотическим веществом переводят в осадок, из которого антибиотик экстрагируют.

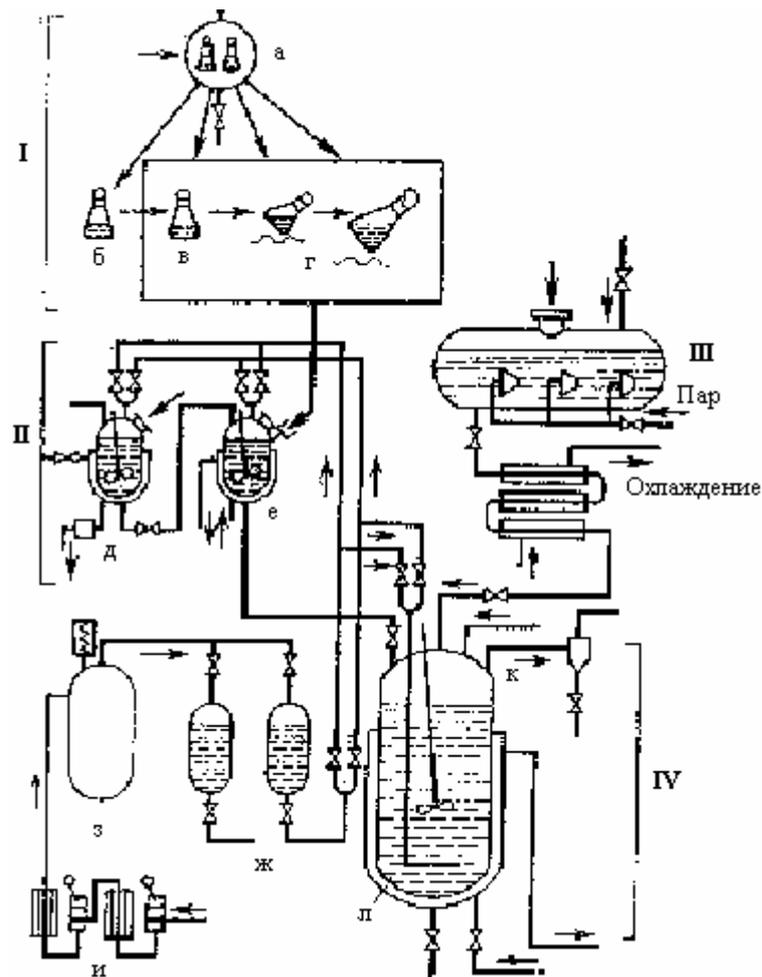


Рис. 4.6. Схема производства антибиотиков:

I – приготовление посевного материала; II – инокуляторы для наращивания посевного материала; III – стерилизатор среды для большого ферментатора; IV – установка для биосинтеза антибиотика; а – стерилизация среды в колбах; б – охлаждение и посев культуры продуцента в колбу; в – рост культуры в покое; г – рост культуры в качалке; д – инокулятор со стерильной средой; е – инокулятор со средой, засеянной культурой продуцента; ж – фильтры и компрессор; з – резервуар со сжатым воздухом; и – нагрев воздуха; к – ферментатор; л – рубашка для охлаждения ферментатора

Отделение нативного раствора от биомассы и взвешенных частиц проводят методами фильтрации или центрифугирования.

Цель химической очистки – извлечение антибиотика из нативной жидкости или из клеток продуцента, его концентрация и освобождение (собственно, очистка) от сопутствующих примесей и в конечном счете получение высокоочищенного препарата, пригодного для соответствующего применения.

В ряде случаев антибиотические вещества под влиянием жестких внешних факторов (повышенной температуры, высокой кислотности

или щелочности и др.) теряют свои свойства, инактивируются. Поэтому при их выделении и очистке необходимо соблюдать максимум осторожности.

Основные методы очистки антибиотиков следующие: экстракция, ионообменная сорбция и осаждение.

Сушка, контроль и расфасовка препарата

После выделения и химической очистки антибиотика его необходимо высушить, т. е. удалить из препарата свободную и связанную воду. Поскольку большинство антибиотиков в той или иной степени термолабильны, для их высушивания применяют методы, не приводящие к потере биологической активности, не изменяющие цвета препарата. На современном этапе промышленного получения антибиотиков используют следующие методы обезвоживания. Это:

- Лиофильная сушка антибиотиков – широко распространенный метод, он проводится при сравнительно низких температурах ($-8 - -12^{\circ}\text{C}$).

- Высушивание с применением распылительной сушилки – прогрессивный метод при работе с большими количествами антибиотика, раствор антибиотика пневматически распыляется до мельчайших капель в камере с потоком нагретого воздуха. Процесс высушивания антибиотиков занимает несколько секунд, при этом даже термолабильные препараты не меняют свойств.

- Метод взвешенного слоя (или сушка в вакуум-сушильных шкафах) применяется для высушивания зернистых и пастообразных антибиотических препаратов.

Контроль препарата. Готовый антибиотик подвергается тщательному контролю: биологическому и фармакологическому.

При биологическом контроле ставится задача выяснения стерильности готового препарата. Для этого обычно используют два метода.

Первый связан с инактивацией антибиотика и высевом его в соответствующую питательную среду. Например, биологический контроль бензилпенициллина и полусинтетических препаратов, полученных на его основе, проводится следующим образом. В пробирки, содержащие тиогликолевую среду, вносят фермент пенициллазу в количестве, способном полностью инактивировать пенициллин. Пробирки с пенициллазой выдерживают двое–трое суток при температуре 37°C для контроля стерильности фермента, затем в них вносят раствор пенициллина. Пробирки разделяют на две группы: одну выдерживают при 37°C , а другую – при 24°C в течение пяти суток. Ведут ежедневное наблюдение за возможным развитием микроорганизмов.

Второй метод выяснения стерильности антибиотиков определяется тем, что для большинства этих соединений не имеется инактиваторов их

биологической активности. Поэтому у изучаемых препаратов выявляют устойчивые к ним формы микроорганизмов, а также определяют возможное присутствие чувствительной микрофлоры. Для определения возможного присутствия в таких препаратах чувствительной к ним микрофлоры раствор антибиотика пропускают через мембранные фильтры с диаметром пор не более 0,75 мк.

Фармакологический контроль. К антибиотическим веществам, используемых в медицинской практике, в соответствии с Государственной Фармакопеей предъявляются очень строгие требования. Каждый новый лекарственный препарат, прежде чем он будет разрешен к практическому применению, должен пройти всесторонние испытания на токсичность, пирогенность и другие свойства, жизненно важные для организма. Препарат изучают на разных видах животных в отношении его острой и хронической токсичности (влияние на кровь, ЦНС, дыхание и

т. д.). Показатели острой токсичности – один из критериев качества антибиотического вещества. Устанавливают максимально переносимую дозу (МПД) антибиотика; дозу, вызывающую гибель 50 % подопытных животных (LD_{50}) и смертельную дозу (LD_{100}). Только после всестороннего и тщательного изучения препарата он может быть рекомендован к практическому применению.

Расфасовка и упаковка антибиотика – завершающий этап работы. Расфасованный и упакованный антибиотик с указанием показателя биологической активности, даты выпуска и срока годности поступает в продажу.

Обобщая весь многостадийный и многоступенчатый процесс получения антибиотика, можно отметить, что он включает в себя четыре основные стадии:

I стадия – получение соответствующего штамма, продуцента антибиотика, пригодного для промышленного производства;

II стадия непосредственно связана с процессом биосинтеза антибиотика;

III стадия – это процессы выделения и очистки образовавшегося в ходе биосинтеза антибиотика;

IV стадия включает в себя операции, связанные с концентрацией антибиотика, его стабилизацией и получением готового продукта.

Биотехнологический процесс получения антибиотиков можно представить в виде следующей схемы (рис. 4.7).

Производство пенициллинов

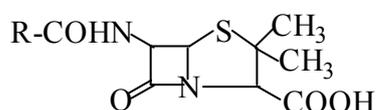
В 1871 г. В.А. Манасейным было установлено, что зеленая плесень *Penicillium glaucum* при своем росте уничтожает бактерии, попадающие

в культуральную среду. Это свойство *Penicillium* было тогда же использовано врачом А. Г. Полотебневым, применившим смоченные этой плесенью повязки при лечении гнойных ран и язв.

Выдающееся открытие русских ученых не получило широкой известности, и в 1928 г. англичанин Александр Флеминг вторично обнаружил способность плесневого грибка *Penicillium* угнетать рост микроорганизмов. Было показано, что вызываемая плесенью гибель микробов обусловлена образованием неизвестного органического вещества, названного *пенициллином*. Однако выделение пенициллина в чистом виде в то же время осуществлено не было, так как он оказался веществом очень лабильным, а применявшиеся методы очистки были несовершенны.

В годы Второй мировой войны огромная практическая потребность в эффективных антибактериальных препаратах привлекла к пенициллину внимание широкого круга специалистов, и примерно с 1939 г. начался период интенсивных исследований. Благодаря этому в относительно короткий срок (3–5 лет) англичанами Х. Флори и А. Чэттенем были разработаны способы промышленного получения и очистки пенициллина, изучены его лечебные свойства и методы клинического применения, а также установлена его химическая структура.

К пенициллинам относится группа близких по химическим свойствам соединений, содержащих в своей структуре β -лактамное и тиазолидиновые кольца:



R может иметь различные значения, в зависимости от типа пенициллина. Например, при $R = -\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ – это бензилпенициллин; $R = -\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_5$ – это феноксиметилпенициллин и т. д. Наличие карбоксильной группы придает молекуле пенициллина сильные кислотные свойства, поэтому пенициллин легко образует соли со щелочами (Na, K), а также с органическими основаниями, например с дибензилэтилендиамином (препарат – бициллин).

Для практических целей медицины пенициллин получают в промышленности путем биосинтеза. Процесс биосинтеза складывается из следующих стадий: 1) выращивания посевного материала (микроорганизмов) в аппаратах малой емкости – инокуляторах; 2) выращивания посевного материала в больших посевных аппаратах; 3) процесса ферментации; 4) выделения антибиотика из культуральной жидкости и его очистки.

Важное значение имеет также селекционный подбор высокопроизводительных штаммов плесени, подготовка и стерилизация питательной среды и аппаратуры.

Очень важное значение для высокого выхода пенициллина имеет питательная среда, примерный состав которой (в %) следующий:

Кукурузный настой – 3 (по объему)	Сульфат цинка – следы
Лактоза (или глюкоза) – 2 (по весу)	Карбонат кальция – 0,25
Нитрат натрия – 0,6	Магний сернокислый гептагидрат – 0,05
Калий фосфорнокислый (однозамещенный) – 0,15	Вода ~ 90

Вместо кукурузного настоя успешно применяется мука из хлопковых семян или мясные гидролизаты.

Приготовленную питательную среду подвергают стерилизации. Процесс ведут в колоннах непрерывного действия. Далее питательная среда поступает в аппарат-выдерживатель, где охлаждается в течение определенного времени до температуры 23–25 °С.

Первая стадия процесса – выращивание стандартной колонии штаммов плесени *Penicillium chrysogenum* – проводится в инокуляторах на питательной среде, где процесс идет ~30 часов. Подготовленный инокулят передают в посевной аппарат, объем которого ~ в 10 раз больше объема инокулятора. В посевном аппарате находится также стерилизованная питательная среда. Процесс роста здесь идет ~15–20 часов, и далее посевной материал передается на ферментацию в большие реакторы – ферментаторы объемом до 100 м³ на питательную среду. Процесс ферментации идет ~70 часов при температуре 23–24 °С, рН среды 6–6,5 и постоянной аэрации воздуха – 1 л воздуха/1 литр питательной среды/1 мин по всему объему ферментатора.

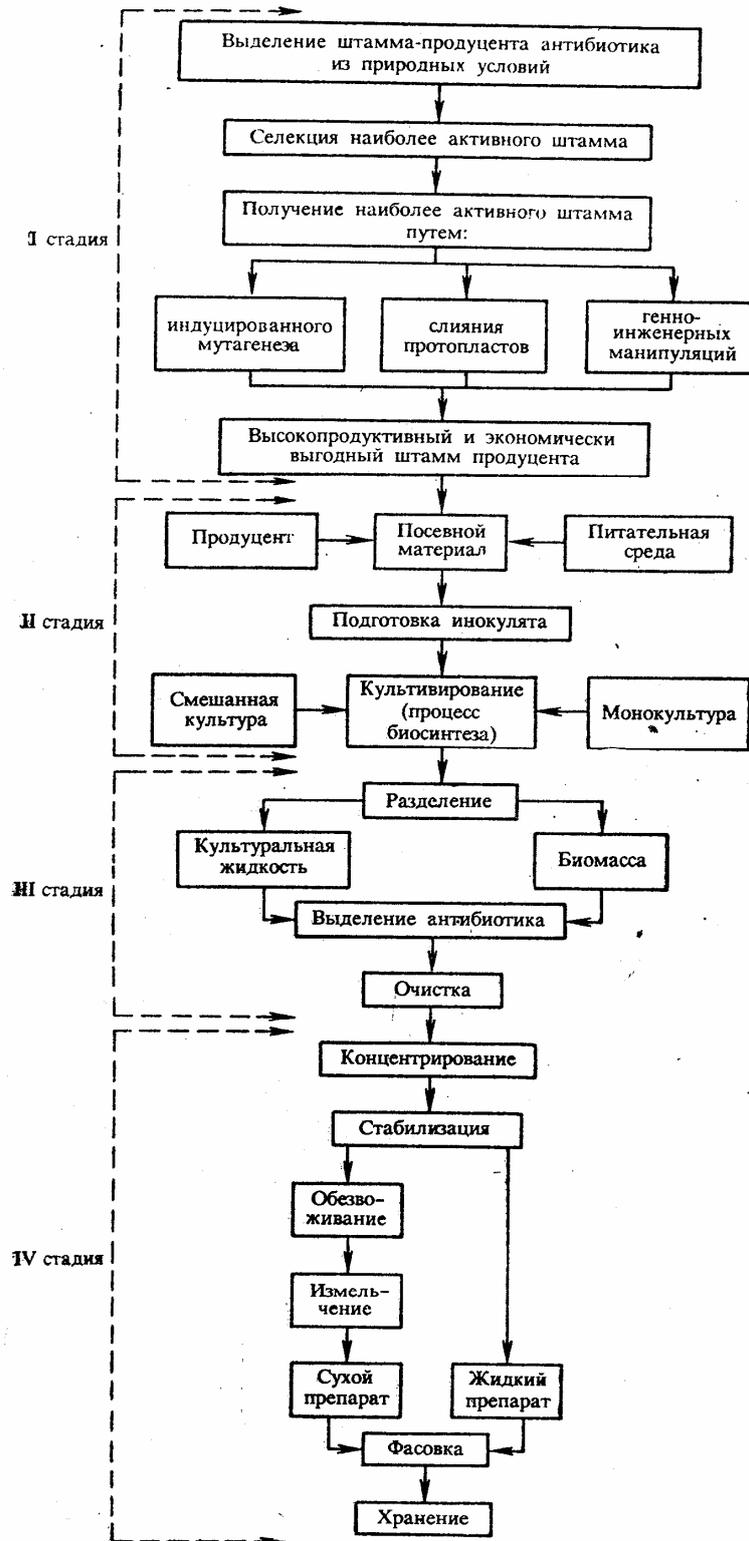


Рис. 4.7. Схема производства антибиотиков в процессе микробного синтеза

Основная задача этого процесса – создание оптимальных условий для развития продуцента и накопления антибиотика. Биосинтез антибиотика – двухфазный процесс. В течение первой фазы происходит быстрый рост и размножение мицелия или бактериальных клеток. Культуральная жидкость в этот период богата углеводами, азотом и неорганическим фосфором. Продукты обмена веществ микроорганизмов, в том числе и антибиотики, находятся в малых количествах.

Вторая фаза начинается с момента замедления роста культуры. Протекает она в культуральной жидкости, обогащенной продуктом жизнедеятельности организма с небольшим количеством углеводов и фосфора. В начале этой фазы мицелий обладает максимальной способностью к синтезу антибиотика. Фазы отличаются характером и интенсивностью биохимических реакций. С учетом этих различий подбирают условия, благоприятные для первой и второй фаз развития продуцента.

Для увеличения выхода антибиотика в питательную среду вводят «предшественники», т. е. химические вещества, способствующие целенаправленному синтезу антибиотика. Так, в питательную среду при биосинтезе пенициллина вводят «предшественник» фенилацетамид – это увеличивает выход антибиотика более чем в 2 раза.

По окончании процесса ферментации культуральную массу передают на процесс выделения антибиотика.

Большинство продуцентов при биосинтезе выделяют антибиотик в водную фазу, поэтому процесс выделения антибиотика начинается с разделения твердой и жидкой фаз.

Твердая фаза, кроме массы мицелия, содержит значительное количество коллоидных примесей, затрудняющих фильтрование, поэтому культуральную массу предварительно подвергают различным типам коагуляции (электролитической, тепловой, кислотной и т. д.). Наиболее эффективным методом коагуляции культуральной массы является ее обработка флокулянтами (высокомолекулярными полиэлектролитами), например, поли-(4-винил)-N-бензилтриметиламмонийхлоридом. Оставшийся от фильтрации мицелия водный раствор антибиотика направляют на химическую очистку и выделение. Таким образом, водный раствор пенициллина направляют после фильтрации на экстракцию бутилацетатом при рН водной среды, равной 2. При таком значении кислотности среды подавляет кислотная ионизация пенициллина в водной фазе и он переходит в органическую фазу (в бутилацетат). Реэкстракцию пенициллина из бутилацетата проводят слабыми растворами щелочей.

Широко применяются сорбционные методы выделения и очистки антибиотиков. В качестве сорбентов широко используются синтетические ионообменные смолы.

Сушат пенициллины методом сублимации или распыления.

Угроза резистентности

Успехи применения бензилпенициллина в лечении болезней, вызванных различными бактериями, были поистине сенсационными. Чувствительными к нему оказались и стафилококки, являющиеся возбудителями очень серьезных заболеваний. Статистические данные показывают, что в 1944 г. число инфекционных больных, вылеченных бензилпенициллином, было около 99,8 %, однако, уже в 1956 г. этот процент снизился до 65 %, особенно большой процент инфицированных больных, не поддававшихся лечению бензилпенициллином, наблюдался среди работников предприятий, производящих антибиотики, и работников хирургических клиник, широко использующих антибиотики для лечения больных.

Почему же именно эти заведения стали рассадниками болезнетворных организмов, устойчивых к действию пенициллина? Уже со времени первого применения пенициллина стало известно, что некоторые стафилококки невосприимчивы к нему. Чувствительные к пенициллину штаммы стафилококков погибают при лечении, остаются резистентные стафилококки, которые начинают размножаться и заполнять опустевшую нишу. И, таким образом, применение пенициллина для лечения заболеваний, вызванных резистентными формами стафилококка, не приведет к положительному результату.

Каким же путем избегают гибели стафилококки, резистентные к пенициллину? Было установлено, что они способны обезвредить молекулу пенициллина, изменив его структуру в самом слабом месте. Устойчивые стафилококки вырабатывают фермент, который может разрушить молекулу пенициллина при добавлении к ней молекулы воды. При этом процессе (гидролизе) образуется соединение, безвредное для микробов.

Фермент, способствующий реакции «обезвреживания», называется *пенициллиназой*. Его возникновение вызывается присутствием в среде пенициллина. С 1969 г. стала известна и химическая структура пенициллиназы, вырабатываемой стафилококками. В построении ее молекулы участвуют 257 структурных единиц двадцати аминокислот, соединенных в различной последовательности.

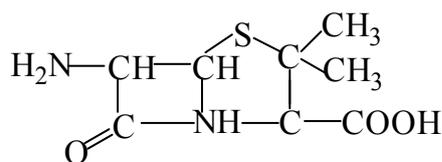
Другие бактерии образуют ферменты (ацилазы), которые разрывают связь между основным ядром молекулы бензилпенициллина и ее боковой ацильной группой, образуя биологически неактивную б-аминопеницилановую кислоту



Второе расщепление ученые стали использовать для своих целей как возможность изменить молекулу пенициллина таким образом, чтобы ацилаза не смогла подвергнуть ее гидролизу. Таким способом были получены новые полусинтетические пенициллины.

Полусинтетический способ получения пенициллинов

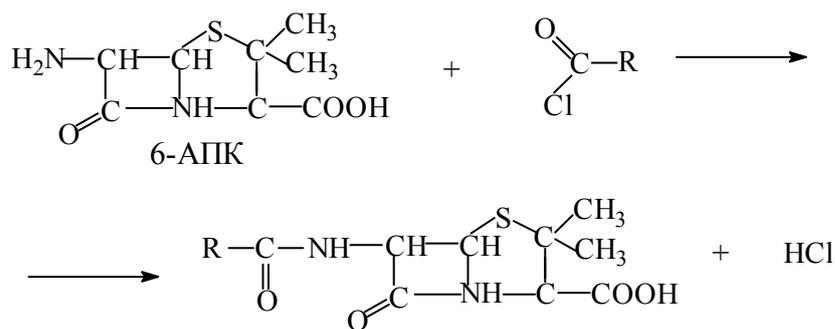
В настоящее время большое значение имеет так называемый полусинтетический (биологический + химический) способ получения аналогов природного пенициллина, обладающих рядом ценных свойств. Исходным продуктом в синтезе служит 6-аминопенициллановая кислота (6-АПК)



6-аминопенициллановая кислота

Кислоту получают в результате биосинтеза, при развитии штамма плесени *Penicillium chrysogenum*, в специфических условиях его культивирования (при отсутствии предшественников в среде) или чаще путем ферментативного дезацилирования бензилпенициллина с участием пенициллинацилазы. При этом образуется 6-АПК и фенилуксусная кислота.

Ацилированием аминогруппы 6-АПК получен ряд новых полусинтетических антибиотиков, которые кислотоустойчивы в желудке, не подвергаются деструкции в организме пенициллиназой, обладают более широким спектром действия:



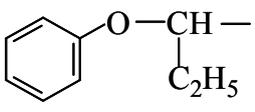
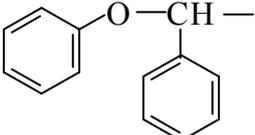
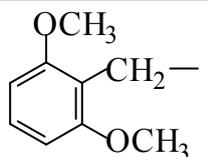
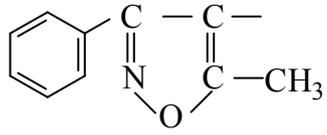
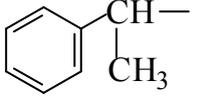
новые антибиотики

В табл. 4.1 приведены наиболее распространенные полусинтетические пенициллины.

Химический синтез природного бензилпенициллина был проведен в 1957 г. Дж. Шееном с сотрудниками, однако он был многостадийен, давал низкий выход бензилпенициллина и поэтому не нашел практического применения.

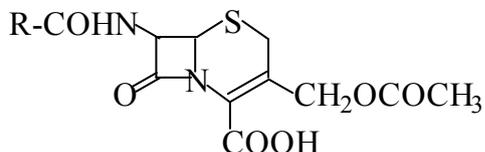
Таблица 4.1

Полусинтетические пенициллины

Медицинское название антибиотика	R
Кислотоустойчивые препараты	
Тропициллин	
Фенбициллин	
Пенициллиназоустойчивые препараты	
Метициллин	
Оксациллин	
Ампициллин	

Получение цефалоспоринов

Цефалоспорины относятся к группе β -лактамных антибиотиков, близких по структуре к пенициллину. Основной продуцент этого антибиотика – гриб *Cephalosporium acremonium*:



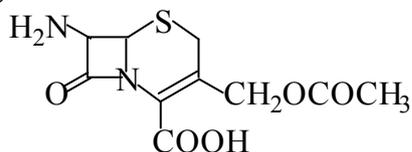
Цефалоспорин С

Цефалоспорин подавляет развитие грамположительных и грамотрицательных бактерий, но антибиотическая активность гораздо ниже, чем у пенициллина. Структура β -лактамного кольца его также неустойчива, и гидролизуется ферментом цефалоспоринойазой.

Полусинтетические аналоги цефалоспоринов

В последнее время методом смешанного (биологического и химического) синтеза получено большое число аналогов цефалоспоринов. Многие из этих соединений имеют важное практическое значение.

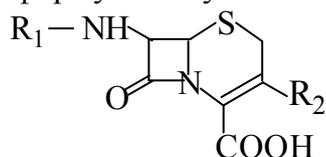
Основой полусинтеза цефалоспоринов служит 7-аминоцефалоспориновая кислота, которая получается в результате отщепления ацильного остатка от цефалоспоринов С под действием фермента ацилазы. Модификация основного ядра цефалоспоринов может происходить с двух сторон молекулы:



7-аминоцефалоспориновая кислота

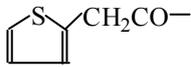
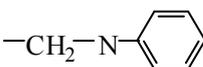
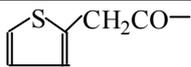
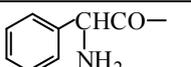
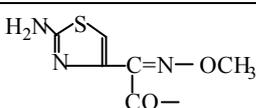
Химическим или биотехнологическим (ферментативным) путем можно отщепить правую ацетоксигруппу ($-\text{OCOCH}_3$) 7-аминоцефалоспориновой кислоты с образованием 7-аминодеацетоксицефалоспориновой кислоты и на ее основе синтезировать полусинтетические антибиотики, широко применяемые в медицинской практике.

Общая формула полусинтетических цефалоспоринов



В табл. 4.2 приведены некоторые медицинские препараты, полученные на основе полусинтетических цефалоспоринов.

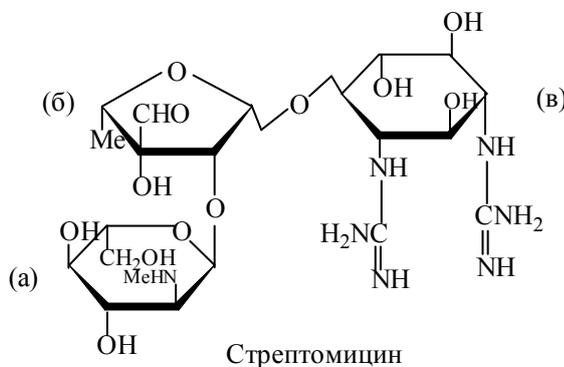
Таблица 4.2

Медицинское название антибиотика	R ₁	R ₂
Цефалоридин		
Цефокситин		
Цефалексин		
Цефотаксим		

Модификация молекулы цефалоспориона приводит к существенным изменениям антимикробных свойств: расширению спектра антимикробного действия, увеличению устойчивости антибиотиков к лактамазам, повышению липофильных свойств веществ, что дает возможность использовать их в таблетках.

Получение стрептомицина

Ярко выраженной способностью вырабатывать антибиотические вещества обладают, помимо плесеней и микробов, также и лучистые грибки – актиномицеты, обычно обитающие в почве. Сравнительно быстрая гибель большинства патогенных микробов при попадании в почву тесно связана с явлением антагонизма актиномицетов и бактерий. Изучение этого явления привело к открытию в 1943 г. С. Ваксманом второго после пенициллина антибиотика – стрептомицина, устойчивого не только к грамположительным, но и к грамотрицательным, и кислотоустойчивым бактериям:



В этом смысле он превосходит пенициллин, который почти не активен к последним двум группам возбудителей инфекции. Особенно важным свойством стрептомицина является его высокая активность к возбудителю туберкулеза.

В своей структуре стрептомицин содержит (а) N-метил-D-глюкозамин, (б) – стрептозу и (в) – стрептидин и является сильным органическим основанием. В практике применяют его соли с кислотами (соляной, серной и др.)

При культивировании стрептомицина в качестве источника энергии требуется быстро метаболизируемый сахар (например, глюкоза), который вводят в начале процесса. Однако скорость его ассимиляции должна быть строго ограничена количеством присутствующего азота и фосфата, что в противном случае приводит к чрезмерному росту мицелия и снижению выхода антибиотика. На практике азот вводится в виде сложных соединений (фильтрат барды и остатки масличного семени), которые в течение длительного процесса ферментации медленно разлагаются, выделяя аммиачный азот, рН среды 7,0–8,0, температура ферментации ~28,5 °С. На стрептомицин не действует ни пеницилаза, ни большинство микроорганизмов; если на более поздних стадиях процесса происходит инфицирование культуры, то образовавшийся стрептомицин не разрушается.

Типичные промышленные среды представляют смеси 2,5 %-й глюкозы, 4 %-й соевой муки с низким содержанием масла, 0,5 %-й барды и 0,25 %-й поваренной соли; в некоторых случаях добавляют сухие дрожжи, мясные экстракты и кукурузный экстракт. В процессе ферментации могут использоваться масла и жирные кислоты (в качестве питательных компонентов либо в качестве пеногасителей). Процесс ферментации развивается так же, как и в случае производства пенициллина, причем образование стрептомицина в течение первых трех дней не происходит. За 6 дней концентрация стрептомицина достигает конечной величины – 0,8 %.

Поскольку мицелий получается гораздо более мелкий, его нельзя собрать на волокнистом фильтре, поэтому для осветления субстрата используют кизельгур, в результате чего отфильтрованная масса делается пригодной для скармливания скоту. Субстрат разделяют на ионообменной колонне.

Получение тетрациклинов

В 1948 г. из почвы был выделен новый вид актиномицета – *Streptomyces aureofaciens*, образующий антибиотики – хлортетрациклин, тетрациклин и другие вещества:

слотой и очищается посредством фракционного осаждения: после перекристаллизации можно получить продукт, достигающий 98 % чистоты.

Окситетрациклин был впервые изготовлен в 1950 г. при культивировании актиномицета *Streptomyces rimosus*. Среда и условия ферментации подобны используемым при производстве хлортетрациклина, за тем исключением, что в качестве источника азота могут быть использованы нитраты и кукурузный экстракт.

Окситетрациклин образует нерастворимый комплекс с солями четвертичного аммониевого основания, и этот комплекс может быть легко отделен от субстрата, после чего его размягчают соляной кислотой и затем кристаллизуют в виде соли уксусной кислоты. Как и другие тетрациклины, этот препарат выпускается главным образом в виде таблеток или суспензии.

Тетрациклин был получен после хлортетрациклина и окситетрациклина, причем почти одновременно как путем направленной ферментации с помощью отобранных штаммов *Streptomyces aureofaciens* в условиях низкого содержания хлоридов в питательной среде, так и путем каталитического восстановления хлортетрациклина.

В методе направленной ферментации используется ряд организмов, в том числе и *Streptomyces vicidifaciens*, при этом полученный штамм в адекватной среде может обеспечить большие выходы тетрациклина или равные количества хлортетрациклина и тетрациклина пропорционально количеству присутствующих ионов хлора. В случаях, когда необходимо избежать образования хлортетрациклина, содержание хлорида в среде не должно превышать 17 ч./млн. Если необходимо использовать в качестве основных компонентов субстрата сложные биологические вещества, то в условиях промышленного производства для контроля уровня хлоридов имеются два способа:

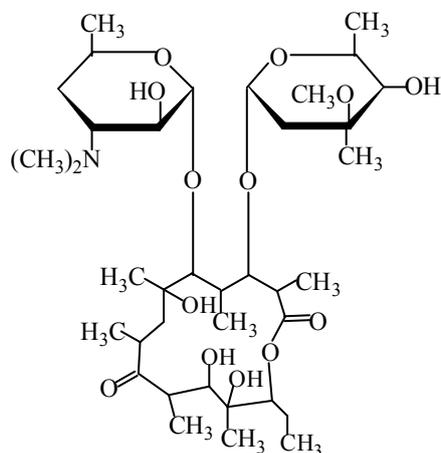
1) удалять большую часть хлорида, пропуская компоненты, такие, как сахар-сырец и кукурузный экстракт через ионообменные смолы. Этот метод вполне эффективен, если применяется к разбавленным растворам;

2) вводить в среду вещества, замедляющие утилизацию хлорида, например, бромиды. Оказалось, что при концентрациях от 10 до 350 ч./млн., ионы брома практически подавляют образование хлортетрациклина, даже в присутствии ионов хлора в концентрациях 1500 ч./млн. На практике применяют бромистый натрий (5 %).

Получение антибиотиков-макролидов

Большую группу антибиотиков (эритромицин, олеандомицин и др.), содержащих в своей структуре макроциклический лактонный

фрагмент и продуцируемых различными штаммами *Streptomyces*, составляют так называемые макролиды. Наиболее известным представителем этой группы является эритромицин, который по спектру антибактериального действия близок к пенициллину и применяется для лечения больных с повышенной чувствительностью к пенициллину и тетрациклину.



Эритромицин

Культивирование продуцента эритромицина длится 150 часов при pH~7 на среде, приготовленной на основе крахмала, соевой муки, масла, кукурузного экстракта, сухих дрожжей и извести. Культуральную жидкость фильтруют на кизельгуре, и антибиотик экстрагируют с помощью амилацетата. Обычно фильтрат культуры и растворитель пропускают через установленный в системе смеситель, а затем через обычную центрифугу. Антибиотик можно разбавить буферным раствором, осадить ацетоном и хлористым натрием, и, наконец, кристаллизовать его из ацетонового раствора.

Широкое и успешное использование антибиотиков в медицине привело к их использованию и в других областях, в том числе:

- в ветеринарии (с теми же целями, что и в медицине);
- для борьбы с некоторыми болезнями растений бактериального и грибкового происхождения;
- в качестве добавки к кормам животных, так как они ускоряют рост и увеличивают степень превращения кормов в мясо;
- в качестве консервантов скоропортящихся продуктов;
- для подавления бактериальной флоры при осуществлении различных процессов при производстве вакцин.

Наука об антибиотиках продолжает быстро развиваться. С одной стороны, продолжают поиски новых, еще более эффективных препаратов биотехнологии, в том числе с иммуностимулирующим, противо-

опухолевым, противовирусным действием, с другой стороны, расширяются работы по химическому синтезу производных этих веществ и химической модификации природных антибиотиков.

Продолжаются работы по созданию новых и совершенствованию действующих процессов биотехнологии, предусматривающих создание экологически чистых безотходных технологий.

Развитие исследований в этом направлении и внедрение их в практику является одним из перспективнейших разделов естествознания.

4.3. ПРОИЗВОДСТВО БЕЛКОВ ОДНОКЛЕТОЧНЫХ И МНОГОКЛЕТОЧНЫХ ОРГАНИЗМОВ

Крупномасштабное культивирование микроорганизмов как прямой источник белка для питания человека и животных рассматривалось в качестве способа решения проблемы нехватки пищи в Германии уже во время Первой мировой войны. Были разработаны технологические процессы культивирования пивных дрожжей, которые после обработки и высушивания добавляли в супы и колбасы. Во время Второй мировой войны эти процессы уже были хорошо отработаны.

Выражение «белки одноклеточных организмов» возникло в 60-е гг. применительно к бактериальной биомассе (преимущественно дрожжей), которая используется в качестве пищевого компонента животных и человека. Особенно привлекательным является тот факт, что питательной средой при культивировании бактерий зачастую являются отходы сельского хозяйства: жмых сахарной свеклы в производстве сахара, подсолнечный жмых при получении растительного масла, молочная сыворотка в производстве сыра, древесная стружка и опилки и т. п.

Интерес к этой проблеме вспыхнул после публикации результатов исследований, показывающих возможность производства таких белковых концентратов на основе углеводов. Нефтяные компании финансировали развитие этих исследований не только по причине использования углеводов, но и в связи с благоприятными результатами пищевых тестов и перспективами сбыта.

Первая крупномасштабная фабрика белкового концентрата была разработана совместной фирмой «British Petroleum» (Великобритания) и «Италпротеин» (Италия) в 1975 г, ее производительность составляла 100000 т/год; сырьем были нормальные парафины. Этой проблемой занялась и Япония, были построены 8 заводов производительностью 1500 т белка/год. Однако интерес к производству белка одноклеточных организмов в 70-е гг. несколько снизился; отчасти из-за благоприятной сельскохозяйственной ситуации тех лет, но главным образом из-за не-

совершенства технологий, не удаляющих некоторые токсические вещества из конечного продукта.

В 80-е гг. германская фирма «Хехст», отличающаяся на рынке своими высокими технологиями, разработала процессы получения высококачественных белковых концентратов. В 80-е гг. одним из ведущих в мире производителем белков был СССР с его неисчерпаемой сырьевой базой. В Финляндии сооружена фабрика, использующая гриб *Raecilomyces* в сульфитных стоках бумажных комбинатов; мощность фабрики – 10000 т белка/год.

В странах ЕЭС производится белковых концентратов около 25 млн т в год. Эти цифры говорят о рентабельности предприятий. Корм для скота становится дорогим из-за ограничения земельных угодий и по ряду других причин. Белки одноклеточных организмов имеют огромные преимущества: высокую скорость воспроизводства, доступность сырьевых источников, решение проблем утилизации отходов многих предприятий и т. д. Кроме того, белки имеют постоянный и воспроизводимый состав, их легко витаминизировать, добавлять необходимые микроэлементы; их также легко изготавливать в виде гранул или таблеток, их хранение осуществляется намного легче, чем хранение растений или других кормов.

Тем не менее, производители белка не рассматривают свою продукцию как заменитель белка в рационе животных: белковые концентраты служат добавками к кормам, удешевляя их и повышая их качество. Следует отметить, однако, что производство белковых добавок развивается не столь быстро, как прогнозировалось в 60-70 гг. Дело в том, что в значительной степени ужесточились требования к безопасности технологий, которые должны учитывать результаты всех необходимых токсикологических и пищевых испытаний.

Особенно осторожными следует быть в вопросах применения белковых концентратов в питании человека. Однако их использование для решения проблемы питания населения земли не имеет альтернативы, поскольку прогнозы свидетельствуют о том, что прирост населения не соответствует приросту продуктов питания. Можно с уверенностью сказать, что освоение микроорганизмов в питании человека только начинается.

Микроорганизмы начали использовать в производстве белковых продуктов задолго до возникновения микробиологии. Достаточно упомянуть всевозможные разновидности сыра, а также продукты, получаемые путем ферментации соевых бобов. И в первом, и во втором случае питательной основой является белок. При выработке этих продуктов, при участии микробов, происходит глубокое изменение свойств бело-

ксодержащего сырья. В результате получают пищевые продукты, которые можно дольше хранить (сыр) или удобнее потреблять (соевый творог). Микробы играют роль в производстве некоторых мясных продуктов, предназначенных для хранения. Так, при изготовлении некоторых сортов колбасы используется кислотное брожение, обычно при участии комплекса молочнокислых бактерий. Образовавшаяся кислота способствует сохранности продукта и вносит вклад в формирование его особого вкуса.

Этим, пожалуй, и ограничивается использование микроорганизмов в переработке белков. Возможности современной биотехнологии в этих производствах невелики, за исключением сыроделия. Другое дело – выращивание и сбор микробной массы, перерабатываемой в пищевые продукты: здесь биотехнология может проявить себя во всей полноте.

4.3.1. Производство белка одноклеточных организмов

По многим важным показателям биомасса микроорганизмов может обладать весьма высокой питательной ценностью. В немалой степени эта ценность определяется белками: у большинства видов они составляют значительную долю сухой массы клеток. На протяжении десятилетий активно обсуждаются и исследуются перспективы увеличения доли белка микроорганизмов в общем балансе производимого во всем мире белка.

Производство такого белка связано с крупномасштабным выращиванием определенных микроорганизмов, которые собирают и перерабатывают в пищевые продукты. Чтобы осуществить возможно более полное превращение субстрата в биомассу микробов, требуется многосторонний подход. Выращивание микробов в пищевых целях представляет интерес по двум причинам. Во-первых, они растут гораздо быстрее, чем растения и животные: время удвоения их численности измеряется часами. Это сокращает сроки, нужные для производства определенного количества пищи. Во-вторых, в зависимости от выращиваемых микроорганизмов в качестве субстратов могут использоваться разнообразные виды сырья. Что касается субстратов, то здесь можно идти по двум главным направлениям: перерабатывать низкокачественные бросовые продукты или ориентироваться на легкодоступные углеводы и получать за их счет микробную биомассу, содержащую высококачественный белок.

Получение микробного белка на метаноле

Основное преимущество этого субстрата – высокая чистота и отсутствие канцерогенных примесей, хорошая растворимость в воде, высокая летучесть, позволяющая легко удалять его остатки из готового продукта. Биомасса, полученная на метаноле, не содержит нежелательных примесей, что дает возможность исключить из технологической схемы стадии очистки.

Однако необходимо учитывать при проведении процесса и такие особенности метанола, как горючесть и возможность образования взрывоопасных смесей с воздухом.

В качестве продуцентов, использующих метанол в конструктивном обмене, были изучены как дрожжевые, так и бактериальные штаммы. Из дрожжей были рекомендованы в производство *Candida boidinii*, *Hansenula polymorpha* и *Pichia pastoris*, оптимальные условия для которых (температура 34–37°C, pH 4,2–4,6) позволяют проводить процесс с экономическим коэффициентом усвоения субстрата до 0,40 при скорости потока в интервале 0,12–0,16 ч⁻¹. Среди бактериальных культур применяется *Methylomonas clara*, *Pseudomonas rosea* и др., способные развиваться при температуре 32–34°C, pH 6,0–6,4 с экономическим коэффициентом усвоения субстрата до 0,55 при скорости потока до 0,5ч⁻¹.

Особенности процесса культивирования во многом обусловлены применяемым штаммом-продуцентом (дрожжи или бактерии) и условиями асептики. Ряд зарубежных фирм предлагает использовать дрожжевые штаммы и проводить выращивание в отсутствии строгой асептики. В этом случае технологический процесс протекает в ферментаторе эжекционного типа производительностью 75 т белка в сутки, а удельный расход метанола составляет 2,5 т/т белка.

При культивировании дрожжей в асептических условиях рекомендованы аппараты колонного или эрлифитного типа производительностью 75–100 т белка/сут при расходе метанола до 2,63 т/т белка. В том и другом случае процесс культивирования проводится одностадийно, без стадии «дозревания», с невысокой концентрацией субстрата (8–10 г/л).

В ряде стран в качестве продуцентов применяются бактериальные штаммы, процесс проводится в асептических условиях в ферментаторах эрлифитного или струйного типов производительностью 100–300 т/сут и расходом метанола до 2,3 т/т белка. Ферментация осуществляется одностадийно при невысоких концентрациях спирта (до 12 г/л), с высокой степенью утилизации метанола.

Наиболее перспективным по своей конструкции является струйный ферментатор Института технической химии (Германия). Ферментатор объемом 1000 м³ состоит из секций, расположенных одна над другой и

соединенных между собой шахтными переливами. Ферментационная среда из нижней секции ферментатора по напорному трубопроводу подается центробежными циркуляционными насосами в верхние шахтные переливы, через которые проходит в низлежащую секцию, подсасывая при этом воздух из газоведа. Таким образом, среда протекает из секции в секцию, постоянно подсасывая новые порции воздуха. Падающие струи в шахтных переливах обеспечивают интенсивное аэрирование среды.

Питательная среда непрерывно подается в зону верхних шахтных переливов, а микробная суспензия отводится из выносных контуров. На стадии выделения для всех видов продуцентов предусмотрено отделение грануляции с целью получения готового продукта в гранулах.

Кормовые дрожжи, полученные на метаноле, имеют следующий состав (в %): сырой протеин 56–62; липиды 5–6; зола 7–11; влага 8–10; нуклеиновые кислоты 5–6. Бактериальная биомасса характеризуется следующим составом (в %): сырой протеин 70–74; липиды 7–9; зола 8–10; нуклеиновые кислоты 10–13; влажность 8–10.

Кроме метанола, в качестве высококачественного сырья используют этанол, который имеет малую токсичность, хорошую растворимость в воде, небольшое количество примесей.

В качестве микроорганизмов – продуцентов белка на этиловом спирте как единственном источнике углерода могут использоваться дрожжи (*Candida utilis*, *Sacharomyces lambica*, *Hansenula anomala*, *Acinetobacter calcoaceticus*). Процесс культивирования проводят одностадийно в ферментаторах с высокими массообменными характеристиками при концентрации этанола не более 15 г/л.

Дрожжи, выращенные на этаноле, содержат (в %): сырого протеина – 60–62; липидов – 2–4; золы – 8–10; влаги – до 10.

Получение белковых веществ на углеводном сырье

Исторически одними из первых субстратов, используемых для получения кормовой биомассы, были гидролизаты растительных отходов, предгидрализаты и сульфитный щелок – отходы целлюлозно-бумажной промышленности. Интерес к углеводному сырью как основному возобновляемому источнику углерода значительно возрос еще и с экологической точки зрения, так как оно может служить основой для создания безотходной технологии переработки растительных продуктов.

В связи с тем, что гидролизаты представляют собой сложный субстрат, состоящий из смеси гексоз и пентоз, среди промышленных штаммов-продуцентов получили распространение виды дрожжей

C. utilis, *C. scottii* и *C. tropicalis*, способные наряду с гексозами усваивать пентозы, а также переносить наличие фурфурола в среде.

Состав питательной среды, в случае культивирования на углеводородном сырье, значительно отличается от применяемого при выращивании микроорганизмов на углеводородном субстрате. В гидролизатах и сульфитных щелоках имеются в небольшом количестве практически все необходимые для роста дрожжей микроэлементы. Недостающие количества азота, фосфора и калия вводятся в виде общего раствора солей аммофоса, хлорида калия и сульфата аммония.

Ферментация осуществляется в эрлифтных аппаратах конструкции Лефрансуа-Мариёе объемом 320 и 600 м³. Процесс культивирования дрожжей осуществляется в непрерывном режиме при рН 4,2–4,6. Оптимальная температура – от 30 до 40 °С.

Кормовые дрожжи, полученные при культивировании на гидролизатах растительного сырья и сульфитных щелоках, имеют следующий состав (в %): белок – 43–58; липиды – 2,3–3,0; углеводы – 11–23; зола – до 11; влажность – не более 10.

Одним из перспективных субстратов в производстве кормовой биомассы являются гидролизаты торфа, имеющие в своем составе большое количество легкоусвояемых моносахаров и органических кислот. Дополнительно в состав питательной среды вводятся лишь небольшие количества суперфосфата и хлорида калия. Источником азота служит аммиачная вода. По качеству кормовая биомасса, полученная на гидролизатах торфа, превосходит дрожжи, выращенные на отходах растительного сырья.

4.3.2. Производство грибного белка (микопротеина)

Микопротеин – это пищевой продукт, состоящий в основном из мицелия гриба. При его производстве используется штамм *Fusarium graminearum*, выделенный из почвы. Микопротеин производят сегодня на опытной установке методом непрерывного выращивания. В качестве субстрата используется глюкоза и другие питательные вещества, а источниками азота служат аммиак и аммонийные соли. После завершения стадии ферментации культуру подвергают термообработке для уменьшения содержания рибонуклеиновой кислоты, а затем отделяют мицелий методом вакуумного фильтрования.

Если сопоставить производство микопротеина с процессом синтеза белков животных, то выявится ряд его преимуществ. Помимо того, что здесь выше скорость роста, превращение субстрата в белок происходит несравненно эффективнее, чем при усвоении пищи домашними животными. Это отражено в табл. 4.3.

Нелишне напомнить, что корма для животных должны содержать некоторое количество белка (до 15–20 %), в зависимости от вида животных и способа их содержания. Положительным фактором является и волокнистое строение выращенной культуры; текстура массы мицелия близка к таковой у естественных продуктов, поэтому у продукта может быть имитирована текстура мяса, а за счет добавок – его вкус и цвет. Плотность продукта зависит от длины гифов выращенного гриба, которая определяется скоростью роста.

Таблица. 4.3

Эффективность конверсии при образовании белка для различных животных и *Fusarium graminearum*

	Исходный продукт	Продукция	
		Белок, г	Общая, г
Корова	1 кг корма	14	68 говядины
Свинья	1 кг корма	41	200 свинины
Курица	1 кг корма	49	240 мяса
<i>Fusarium graminearum</i>	1 кг углеводов + неорганический азот	13 + 6	1080 клеточной массы

После проведения всесторонних исследований питательной ценности и безвредности микопротеина Министерство сельского хозяйства, рыболовства и пищевых продуктов дало разрешение на его продажу в Англии. Содержание питательных веществ в нем указано в табл. 4.4 .

Таблица 4.4

Средний состав микопротеина и сравнение его с составом говядины

Компоненты	Состав, % (на сухой вес)	
	микопротеин	бифштекс
Белки	47	68
Жиры	14	30
Пищевые волокна	25	Следы
Углеводы	10	0
Зола	3	2
РНК	1	Следы

4.3.3. Производство цианобактерий

В 1521 г. испанец Бернал Диас дель Кастильо в своих записках упомянул о галетах под названием «текуитлатл», которые продавались на базаре в Мехико. Они были необыкновенного синего или зеленого цвета, очень вкусные и питательные. Оказалось, что они изготовлены из сине-зеленых водорослей озера Текскоко (неподалеку от Мехико). Пласты этих водорослей извлекали из озера, сушили слоями и изготавливали галеты. Озеро Текскоко примечательно тем, что вода в нем имеет сильно щелочную реакцию (вплоть до рН 11).

В настоящее время известно, что эти сине-зеленые водоросли представляют собой цианобактерии *Spirulina platensis*.

В 1964 г. бельгийский ботаник Леонар, участвуя в экспедиции через Сахару, обратил внимание на сине-зеленые лепешки, которые употребляли в пищу жители в районе озера Чад и прудов, его окружающих. По возвращении в Бельгию он проанализировал лепешки (местные жители называли их «дахэ») и обнаружил в них высокое содержание белка (до 70 % сухого веса), больше, чем в соевых бобах. Примерный состав (в %): белок 65, углеводы 19, липиды 4, волокна 3, пигменты 6, зола 3.

Состав белковых аминокислот также оказался исключительно сбалансированным: концентрация метионина, триптофана и других аминокислот была такой же (если не выше), как в казеине. Однако в белке *Spirulina* оказалось мало лизина (клеточная стенка этих прокариот имеет не такой состав, как у других бактерий, например дрожжей), поэтому этот белок легко подвергается перевариванию.

При скармливании животным пищи, весь белок которой состоял из *Spirulina*, они хорошо развивались, имели нормальную скорость роста; не наблюдалось никаких аномалий или патологических эффектов. Другими словами, белок сине-зеленых водорослей оказался идеальным диетическим продуктом как для питания животных, так и человека. Еще одной особенностью *Spirulina* является ее чрезвычайно быстрый рост: за 3–4 дня ее биомасса удваивается.

Франция, Италия, Япония, Мексика, США интенсивно разрабатывают технологии производства продуктов питания на основе цианобактерий. В Мексике рядом с озером Текскоко в 1973 г. была организована компания по выпуску муки. Поверхность пруда составила примерно 900 га; сбор проводили круглые сутки. После фильтрации суспензия высушивалась горячим воздухом и превращалась в муку. В первый год было произведено 150 т муки, в 1982 г. – 1000 т. Главными импортерами мексиканской муки являются Япония, США, европейские страны. Продукция выпускается в виде таблеток и гранул, в которые по договоренности с потребителями добавляются витамины А (ретинол) и С (аскорбиновая кислота). На их основе изготавливаются продукты диетического питания.

Ежегодные урожаи *Spirulina* в десять раз выше, чем у пшеницы, а содержание белка – более чем в десять раз выше, чем у соевых бобов (табл. 4.5).

Для сравнения можно привести таблицу, в которой отражены данные продуктивности основных культур, содержащих белок, и такие же данные для *Spirulina*.

Таблица 4.5

Сравнение продуктивности основных белоксодержащих культур и *Spirulina*

Культура	Продуктивность, т/га/год	
	Сухой вес	Неочищенный белок
Пшеница	4	0,5
Кукуруза	7	1,0
Соевые бобы	6	2,4
<i>Spirulina</i>	50	35,0

Генетическое усовершенствование штаммов *Spirulina* значительно повысило урожаи.

Еще одно направление использования цианобактерий: пигменты, полученные из *Spirulina*, содержат каротиноидные пигменты синего и зеленого цветов, редко встречающиеся в естественных продуктах. Они пользуются большим спросом на рынке как красители для пищевой и парфюмерной промышленности, поскольку абсолютно безвредны и имеют очень интенсивную окраску.

В Японии из цианобактерий разработан специальный корм для декоративных рыбок, который придает им необычайную окраску. На Тайване в одном из птицеводческих хозяйств было обнаружено, что при кормлении кур кормом на основе белка цианобактерий желток приобретает интенсивную желто-оранжевую окраску. Продажа яиц по более высокой цене обеспечила хозяйству высокую конкурентоспособность и рентабельность.

В Узбекистане, недалеко от г. Самарканда в четырехстах искусственных водоемах выращиваются цианобактерии, с успехом используемые на корм скоту, домашней птице и тутовому шелкопряду, а также для удобрения хлопковых полей. Лимитирующим фактором является довольно низкая температура зимой (2–5 °С).

В настоящее время многими научными учреждениями РФ и за рубежом проведена успешная разработка методов получения кормового белка из различных отходов. Некоторые из них могут быть использова-

ны для промышленного получения белка, другие – в хозяйственных условиях.

Многие микроорганизмы могут быть использованы для получения незаменимых кормовых аминокислот и витаминов. Только правильное сочетание всех компонентов корма дает наилучший результат, а недостаток хотя бы одного из них снижает эффективность остальных.

ГЛАВА 5. СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

5.1. БИОПЕСТИЦИДЫ

Убытки сельского и лесного хозяйства от насекомых-вредителей ежегодно исчисляются в мире около 100 млрд долларов. Долгое время для борьбы с ними использовались ядохимикаты, но, во-первых, они зачастую токсичны для животных и человека, а, во-вторых, ко многим ядохимикатам у насекомых развивается устойчивость. Все это привело к необходимости поиска новых эффективных средств борьбы.

Наиболее перспективным оказалось использование природных патогенов – микроорганизмов, чьи токсины являются причиной гибели насекомых-вредителей в их природных условиях. В настоящее время в различных странах мира производят более 30-ти микробиологических энтомопатогенных препаратов. Они характеризуются высокой специфичностью поражения определенных видов насекомых и практически полной безвредностью для человека, теплокровных животных, птиц и полезных насекомых.

Энтомопатогенные препараты, получаемые на основе микроорганизмов, выделенных из естественных условий и внесенных вновь в те же условия в виде патогенных препаратов, не вызывают нежелательных изменений в биоценозах и не нарушают экологического состояния в регионах.

Российская микробиологическая промышленность производит три группы энтомопатогенных препаратов:

1. Бактериальные препараты на основе *Bacillus thuringiensis*: энтобактерин, дендробациллин, инсектин, токсобактерин.
2. Грибной препарат боверин на основе гриба *Beauveria bassiana*.
3. Препараты на основе вирусов ядерного полиэдроза: вирин-ЭНШ и вирин-ЭКС.

Все микробные патогены выпускают в виде смачивающихся порошков или паст, реже гранул, эмульсии и кристаллов. При непосредственном применении чаще всего предполагают различные добавки в ви-

де растворителей, эмульгаторов, способствующих повышению их эффективности.

5.1.1. Технология получения бактериальных энтомопатогенных препаратов

Из всех энтомопатогенных бактерий наиболее широко применяется грамположительная бактерия *Bac. thuringiensis*, которая, помимо образования спор, вызывающих септицимию насекомого при попадании внутрь его тела, в ходе культивирования продуцирует ряд токсических соединений, повышающих эффективность приготовленных на ее основе препаратов. Среди таких токсичных продуктов, вырабатываемых этой бактерией, выделяют четыре компонента:

1. α -экзотоксин (фосфолипаза C) – продукт растущих клеток бактерий. Он вызывает распад незаменимых фосфолипидов в тканях насекомого, что приводит к их гибели.

2. β -экзотоксин, или термостабильный токсин. Накапливается в культуральной жидкости симбатно росту клеток. Его действие связано с ингибированием действия ДНК-зависимой РНК-полимеразы, что приводит к прекращению синтеза РНК в клетках насекомых и к их гибели. Действие этого токсина довольно медленное.

3. δ -эндотоксин. Представляет собой кристаллический белок (имеет форму правильных кристаллов). Он не выделяется в культуральную среду, а остается внутри бактерии. Проявляет свое токсическое действие в желудочно-кишечном тракте насекомого, разрушая его ферментную систему.

Известно, что бактерии группы *Bac. thuringiensis* антагонистичны к 130-ти видам насекомых, среди которых вредители полевых, овощных, плодовых культур, виноградников и леса. Наибольший эффект достигается при применении данной группы препаратов по отношению к листогрызущим вредителям.

Способность *Bac. thuringiensis* образовывать различные токсичные продукты, споры, кристаллы используется в промышленности при производстве на основе этого микроорганизма широкого круга различных энтомопатогенных препаратов.

Все бактериальные энтомопатогенные препараты на основе *Bac. thuringiensis* производят по одной и той же технологической схеме. Технология производства включает все стадии, типичные для любого микробиологического производства, основанного на глубинном способе получения микроорганизмов: выращивание посевного материала в лаборатории и в посевном аппарате; промышленное культивирование в

ферментаторе; концентрирование культуральной жидкости; сушку; стандартизацию и фасовку готового препарата.

Если посевной материал получают в виде спор, то на всех стадиях производственного культивирования используют питательную среду одного и того же состава. Как правило, это дрожже-полисахаридная среда, содержащая (в %): кормовые дрожжи – 2–3; кукурузную муку – 1–1,5; кашалотовый жир – 1. Если при выращивании посевного материала не предполагается доведение его до стадии образования спор, то в посевном аппарате применяют более концентрированные среды, чем в производственных ферментаторах.

Перед началом культивирования рН среды не регулируют: при добавлении всех компонентов она устанавливается обычно около 6,3. К концу ферментации рН повышается до 8–8,5. Процесс культивирования заканчивают при степени спорулизации 90–95 % и титре спор не менее 10^9 в 1 мл. Готовую культуральную жидкость перекачивают в отдельный простерилизованный сборник подкисляют до рН 6–6,2 и передают на стадию сепарации. В результате сепарации получают пасту влажностью 85 % с выходом около 100 кг в 1 м³ культуральной жидкости. Конечным продуктом производства может быть либо смачивающий порошок, либо стабилизированная паста. Первый получают путем высушивания пасты на распылительной сушилке до остаточной влажности 10 % и смешением с каолином. Вторую – внесением в пасту карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ). В этом варианте готовый продукт представляет собой вязкую жидкость светло-серого цвета, однородную по составу, не замерзающую при хранении, без запаха, не подвергающуюся гниению или брожению.

5.1.2. Технология получения грибных энтомопатогенных препаратов

Энтомопатогенные препараты на основе микроскопических грибов способны поражать большое количество насекомых-вредителей, вызывая у них заболевание – микоз. По сравнению с бактериями и вирусами грибы обладают рядом особенностей: а) поражение происходит не через пищеварительный тракт, а непосредственно через поверхностные ткани; б) насекомые поражаются в фазе развития куколки, что не наблюдается при воздействии на них микробных препаратов; в) грибы характеризуются относительно большой скоростью роста и огромной репродуктивной способностью; в виде спор могут длительное время находиться в природных условиях без заметного снижения энтомопатогенной активности.

Воздействие грибного препарата на насекомое начинается с проникновения споры гриба в полость его тела через кожные покровы. Попав в тело насекомого, грибная спора прорастает в гифу, затем разрастается в мицелий, от которого отчленяются гифальные тельца – конидии, составляющие инфекционную единицу энтомопатогенных грибов. Как правило, гибель наступает от большого количества токсинов, выделяющихся грибами. Если же токсинов недостаточно либо насекомое не чувствительно к ним, гибель наступает после того, как нитевидный мицелий заполняет все тело насекомого, поражая, прежде всего, мышечную ткань. В зависимости от размеров насекомого гибель наступает в период от двух до восьми дней.

В России производится грибной препарат боверин на основе гриба рода *Beauveria*. Этот препарат применяют для уничтожения около 60-ти видов насекомых-вредителей, преимущественно жуков. Он безвреден для теплокровных животных и человека, не вызывает ожогов у растений.

Получают боверин с помощью как глубинного, так и поверхностного культивирования промышленного штамма гриба.

Получение боверина методом глубинного культивирования

Получение боверина этим методом осуществляют в строго асептических условиях. В состав питательной среды входят следующие компоненты (в %): дрожжи кормовые – 2; крахмал – 1; хлорид натрия – 0,2; хлорид марганца – 0,01; хлорид кальция – 0,05. Продолжительность культивирования составляет трое–четверо суток при температуре 25–28°C. Выращивание гриба проводят в условиях постоянного перемешивания и принудительной аэрации. В ходе глубинного культивирования гриба в течение первых суток–полтора кормовые дрожжи полностью лизируются, а гриб за это время проходит все фазы своего роста. К концу полного созревания гриба выделяется максимальное количество ферментов, что ведет к лизису мицелия и способствует накоплению конидий. Готовую культуральную жидкость подвергают сепарации или фильтрации. После фильтрования получают пасту влажностью 70–80 %, которую направляют на распылительную сушилку. Высушенные споры представляют собой мелкодисперсный порошок влажностью 10 %. Полученный порошок стандартизуют необходимым количеством каолина, иногда в качестве добавок в готовый препарат вводят смачиватель и прилипатель.

Технология получения боверина методом поверхностного культивирования гриба

Этот способ более длителен и трудоемок, поэтому имеет ограниченное применение. Поверхностное культивирование гриба проводят как в жидкой питательной среде, так и на полутвердых, на этих средах гриб обладает хорошей скоростью роста. Его микробиологическое производство завершается на стадии получения спороносной пленки, которую впоследствии снимают, высушивают, измельчают и при необходимости стандартизуют соответствующим количеством наполнителя. Среди возможных приемов, используемых в производстве боверина поверхностным культивированием, различают: а) культивирование гриба на жидких средах без автоклавирования, перемешивания и аэрации; б) культивирование на твердых автоклавированных средах без перемешивания и аэрации. Эти приемы основаны на том, что гриб хорошо растет на различных растительных субстратах – отходах сельскохозяйственной продукции.

Культивирование гриба на жидких средах без автоклавирования, перемешивания и аэрации проводят без предварительной стерилизации среды, ее просто нагревают до кипения, разливают в деревянные каркасы, покрытые изнутри полиэтиленовой пленкой. Среду, охлажденную до 30–40 °С, засевают сухими спорами. Сверху каркасы накрывают полиэтиленовой пленкой, которую после образования спороносной пленки гриба снимают. В качестве сред используют всевозможные отвары, например: из сахарной свеклы, картофеля, тыквы, зерна, муки.

В процессе культивирования гриба на твердых автоклавированных средах без перемешивания и аэрации предусматривается стерилизация размещенных по отдельным емкостям питательных сред (сусло–агар, картофель, морковь, кукуруза, корки арбуза) в течение сорока минут при 110 °С. В стерильный субстрат вносят сухие споры, емкости с субстратом встряхивают до однородного распределения посевного материала и оставляют стоять при температуре окружающего воздуха 18–23 °С. Образование конидиоспор завершается к концу 12–15 суток. Культуру гриба с остатками субстрата извлекают из емкостей и высушивают на стеллажах при 25–28 °С. Получение готового препарата завершают размолотом материала до мелкодисперсного порошка.

5.1.3. Технология получения вирусных энтомопатогенных препаратов

Из всех энтомопатогенных препаратов вирусные обладают наиболее высокой специфичностью по отношению к насекомому-хозяину: обычно они поражают только один вид, поэтому они практически полностью безвредны для флоры, фауны и человека.

Вирусы отличает высокая устойчивость к неблагоприятным воздействиям окружающей среды (температуры, влажности), они способны сохранять свою активность в течение 10–15 лет, находясь вне насекомого.

Заражение насекомого вирусом происходит при питании вредителя. Попавшие в кишечник вирионы проникают в клетки организма, и в ядрах этих клеток происходит репликация вирусов. Высвободившиеся вирусы поражают другие клетки до тех пор, пока насекомое не погибнет.

Отличительной особенностью производства вирусов является то, что они размножаются только в живой ткани. Поэтому производство любого вирусного препарата отличается от рассмотренных бактериальных препаратов.

Технология любого из вирусных препаратов начинается с разведения насекомого-хозяина на искусственных питательных средах, обеспечивающих их физиологически здоровое состояние. На определенной стадии развития (обычно на стадии гусеницы) насекомых заражают, добавляя вирусную суспензию к корму. При этом инокулят предварительно получают от нескольких больных личинок. После выдержки, для максимального накопления вирусов в тканях насекомого (7–9 суток), собирают отмершие личинки, подсушивают их при 30–35 °С, измельчают механическим способом для вывода телец-включений из тканей. К полученной массе добавляют физиологический раствор или дистиллированную воду из расчета 1 мл на гусеницу, перемешивают и фильтруют (центрифугируют).

Готовые препараты изготавливают в виде водных растворов, масляных растворов, сухих порошков, паст и т. п.

5.2. БИОЛОГИЧЕСКИЕ УДОБРЕНИЯ

Присутствующая в почве микрофлора оказывает непосредственное влияние на ее плодородие, а, следовательно, и на повышение урожайности. Почвенные микроорганизмы в процессе роста и развития улучшают структуру почв, накапливают в них питательные вещества, превращая органические и неорганические соединения в легкоусвояемые растениями компоненты питания.

С целью стимулирования деятельности почвенной микрофлоры разработаны различные бактериальные удобрения. В практике сельского хозяйства нашли применение такие бактериальные удобрения, как нитрагин, азотобактерин и фосфоробактерин.

5.2.1. Технология получения сухого нитрагина

Нитрагин – бактериальное удобрение, приготовленное на основе жизнеспособных клубеньковых бактерий из рода *Rhizobium* и предназначенное для повышения урожая бобовых растений: гороха, фасоли, сои, люцерны, люпина и др. Бактерии способны фиксировать свободный азот атмосферы, превращая его в легкоусвояемые растениями соединения, поскольку в их организмах есть фермент – нитрогеназа. Нитрогеназа восстанавливает молекулярный азот до аммиака, который вовлекается затем в ряд превращений с образованием глутамина и глутаминовой кислоты. Эти кислоты в дальнейшем идут на синтез растительного белка. Этот процесс возможен только в симбиозе с бобовыми растениями: растение обеспечивает бактерии необходимыми питательными веществами и создает для них оптимальные условия существования, а бактерии, находясь в клубеньках, проросших в корни растения, снабжают его азотистым питанием. Ни растения, ни бактерии сами по себе не могут фиксировать азот.

В почве всегда есть некоторое количество клубеньковых растений, которые располагаются на дикорастущих бобовых растениях. Однако при засевании полей бобовыми монокультурами клубеньковых бактерий оказывается недостаточно, вследствие чего растения снижают урожайность. При этом минеральные азотистые удобрения оказываются в данном случае бесполезными, поскольку азот усваивается только через клубеньки. Поэтому производство бактериальных удобрений чрезвычайно актуально.

Задачей конкретного производства бактериальных удобрений является максимально возможное накопление жизнеспособных клеток, сохранение их жизнеспособности на всех стадиях технологического процесса и приготовление на их основе готовых форм препаратов с сохранением их активности в течение гарантийного срока.

Сухой нитрагин – порошок светло-серого или коричневого цвета, который содержит в 1 г препарата не менее 9 млрд жизнеспособных клеток в смеси с наполнителем (бентонитом, каолином, мелом и пр.).

Промышленное производство нитрагина построено по типичной схеме асептического микробиологического процесса. «Узким» местом является стадия высушивания, поскольку именно на этой стадии бактерии могут потерять жизнеспособность из-за температурных воздействий. Поэтому сушку осуществляют под вакуумом при 30–35 °С.

Для производства посевного материала исходную культуру клубеньковых бактерий выращивают сначала на агаризованной среде, содержащей, например, отвар семян бобовых растений, 2 % агара и 1 % сахарозы. На всех этапах промышленного культивирования применяют

питательную среду одного и того же состава, включающую такие компоненты, как мелассу, кукурузный экстракт, минеральные соли в виде сульфатов аммония и магния, мел, хлорид натрия и двухзамещенный фосфат калия. Основную ферментацию проводят в течение двух–трех суток при температуре 28–30 °С и рН 6,5–7,5. Готовую культуральную жидкость направляют на сепарацию, в результате которой отделяется биомасса в виде пасты влажностью 70–80 %. Пасту смешивают с защитной средой, имеющей различный состав, но всегда содержащей мелассу и тиомочевину в соотношении 20:1, и направляют на высушивание. Процесс сушки осуществляют в вакуум-сушильных шкафах при 30–35 °С и остаточном давлении 10–13 кПа. Высушенную биомассу размалывают.

Нитрагин способствует увеличению урожайности бобовых на 15–25 %, а в районах, где бобовые засеваются впервые, – на 100 %. Вносят препараты путем опудривания семян непосредственно перед посевом.

5.2.2. Технология получения сухого азотобактерина

Азотобактерин – бактериальное удобрение, приготовленное на основе культуры свободноживущего почвенного микроорганизма *Azotobacter chroococcum*, способного фиксировать до 20 мг атмосферного азота на 1 г использованного сахара. Кроме того, эти бактерии выделяют в почву биологически активные вещества: никотиновую кислоту (витамин РР), пантотеновую кислоту, пиридоксин, биотин (витамин Н) и некоторые фунгицидные вещества, угнетающие развитие нежелательных микроскопических грибов.

Все виды азотобактера – строгие аэробы. Бактерии этого вида очень чувствительны к наличию фосфора и развиваются при высоком содержании его в питательной среде. Технология получения азотобактерина имеет много общего с технологией производства нитрагина, поэтому будут рассмотрены наиболее существенные отличия в его технологии.

Культуру микроорганизмов выращивают методом глубинного культивирования на среде, содержащей те же компоненты, что и при культивировании *Rhizobium*. Дополнительно вводят сульфаты железа и марганца, а также сложную соль молибденовой кислоты. РН среды культивирования 5,7–6,5, аэрация – 1 объем воздуха на 1 объем среды в 1 мин.

Процесс ферментации проводят до начала стационарной фазы роста культуры, так как в этой стационарной фазе биологически активные вещества выделяются из клетки и остаются в культуральной жидкости.

При этом существует опасность, что с их выходом клетки могут утратить способность фиксировать атмосферный азот после внесения в почву.

Биологически активные вещества полностью или частично могут теряться и в процессе высушивания клеток, однако оставшиеся жизнеспособными клетки после выведения азотобактера из анабиоза восстанавливают способность продуцировать биологически активные вещества.

Использовать препараты азотобактерина рекомендуется лишь в плодородных почвах, содержащих фосфор и микроэлементы. Отсутствие последних отрицательно сказывается на жизнедеятельности вносимых бактерий. Применяют азотобактерин для бактеризации семян, рассады, компостов. При этом улучшается корневое питание растений и на 10–15 % повышается урожайность зерновых, технических и овощных культур.

5.2.3. Технология получения фосфобактерина

Фосфобактерин – бактериальное удобрение, содержащее споры микроорганизма *Bacillus phosphaticum*. Бактерии обладают способностью превращать сложные фосфорорганические соединения (нуклеиновые кислоты, нуклеопротеины и др.) и трудноусвояемые минеральные фосфаты (пирофосфаты, полифосфаты) в доступную для растений форму. Кроме того, они также вырабатывают различные биологически активные вещества, в том числе витамины, стимулирующие рост растений, особенно на ранних стадиях их развития.

По морфологическим признакам *Bac. phosphaticum* представляет собой мелкие, грамположительные, аэробные спорообразующие палочки.

Технология его получения мало отличается от таковой для нитрагина и азотобактерина.

Культуру *Bacillus phosphaticum* выращивают глубинным способом. Состав питательной среды следующий (в %): кукурузный экстракт – 1,8; меласса – 1,5; сульфат аммония – 0,1; мел – 1; вода – остальное. Культивирование проводят в строго асептических условиях при постоянном перемешивании и принудительной аэрации до стадии образования спор. Основные параметры проведения процесса: температура – 28–30 °С, pH среды – 6,5–7,5; длительность культивирования – 1,5–2 суток. Полученную в ходе культивирования биомассу клеток отделяют центрифугированием и высушивают в распылительной сушилке при 65–75 °С до оста-

точной влажности 2–3 %. Высушенные споры смешивают с наполнителем (каолином).

В отличие от нитрагина и азотобактерина фосфоробактерин обладает большей устойчивостью при хранении. Потеря жизнеспособности клеток после 1 года хранения не превышает 20 %.

Следует отметить, что фосфоробактерин не заменяет фосфорные удобрения, а резко увеличивает их эффективность, поэтому его вносят вместе с фосфорными удобрениями. Фосфоробактерин рекомендуют применять на черноземных почвах. Он необходим для повышения урожайности зерновых, картофеля, сахарной свеклы и других сельскохозяйственных растений.

ГЛАВА 6. ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

6.1. АЭРОБНАЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ ОЧИСТКА СТОЧНЫХ ВОД

Бытовые и промышленные сточные воды представляют собой сложную смесь, в состав которой входят различные питательные вещества и самые разнообразные микроорганизмы, поэтому для обработки стоков необходимо такое большое количество различных протистов. Эти организмы конкурируют в потреблении питательных веществ, уничтожают друг друга и взаимодействуют многими другими путями, характерными для небольшой экологической системы.

В сточных водах содержится сложная смесь твердых и растворенных веществ, причем последние обычно присутствуют в очень малых концентрациях. На очистных станциях концентрации всех этих веществ снижают до приемлемого уровня или же химически трансформируют вредные вещества в безопасные соединения. Конкретная схема очистной станции зависит от степени загрязненности и количества обрабатываемых стоков, а также от экономических и экологических соображений. Большая часть водоочистных станций, однако, имеет много общего, что позволяет изобразить общую схему системы водоочистки, как на рис. 6.2. Показанные здесь различные способы переработки ила и удаления загрязняющих веществ отражают разные возможные пути достижения одной и той же цели. В типичной станции по биологической очистке сточных вод используются лишь некоторые из множества возможных вариантов.

Теперь перейдем к изучению общих задач и целей каждой из основных операций (или последовательностей нескольких операций). В операциях первичной обработки удаляют наиболее легко отделяющиеся

загрязнения, например: крупные, легкоосаждающиеся частицы (рис. 6.1), масляные пленки и другие «легкие» компоненты. Суспендированные твердые частицы и растворимые компоненты отделяют в процессе вторичной обработки. Во многих случаях загрязняющие вещества имеют органическую природу; в таких случаях обычно используют биологическое окисление, которое мы рассмотрим детальнее чуть позже. Цель третичной обработки заключается в полном или частичном отделении всех оставшихся примесей. На этой стадии используются такие методы, как электродиализ, обратный осмос, фильтрование через толстый слой и адсорбция.

В процессе первичной обработки отделяют влажные концентрированные твердые вещества, называемые илом; при вторичной обработке образуется активный клеточный ил. Мы неоднократно упоминали о взаимосвязи между утилизацией субстрата и образованием биомассы. Хотя процессы вторичной биологической обработки с участием множества видов микроорганизмов очень эффективны при деградации разбавленных смесей органических отходов, не следует забывать, что при этом образуется и биомасса. Таким путем очень мелкие нерастворимые частицы и растворенные компоненты жидких отходов частично превращаются в ил, который легче поддается отделению, чем исходные загрязняющие вещества. Установки для переработки ила являются важной составной частью станций по очистке сточных вод.

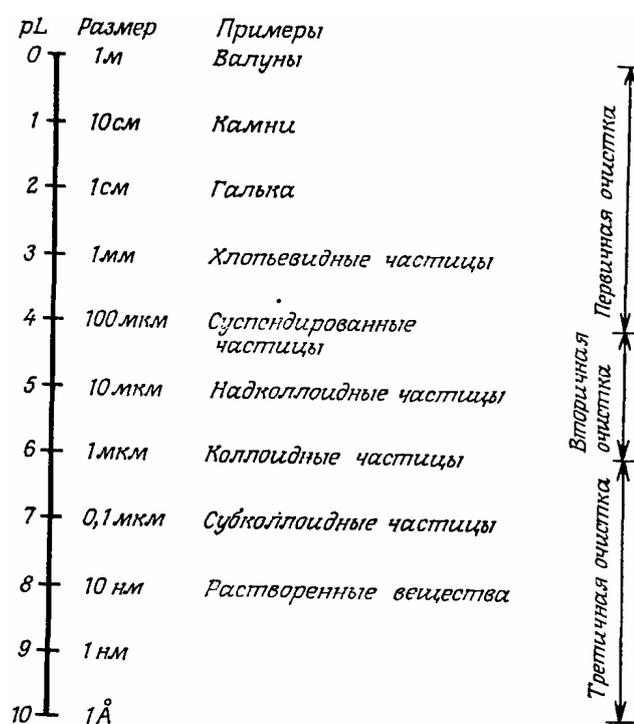


Рис. 6.1. Отделение твердых частиц различной величины на различных стадиях очистки сточных вод

Для уменьшения объема ила, образующегося при очистке воды, широко применяется операция анаэробной переработки, при которой органические вещества подвергаются биологической деградации в анаэробном окружении.

Не следует думать, что во всех случаях используются все три уровня очистки сточных вод и переработки ила. Иногда сточные воды спускают в природные водоемы (ручьи, реки, пруды, озера и океан) без какой бы то ни было обработки. В других случаях применяют только первичную обработку. В то же время для большинства городских систем водоочистки та или иная форма вторичной обработки является обязательной, а третичная обработка в настоящее время применяется лишь изредка.

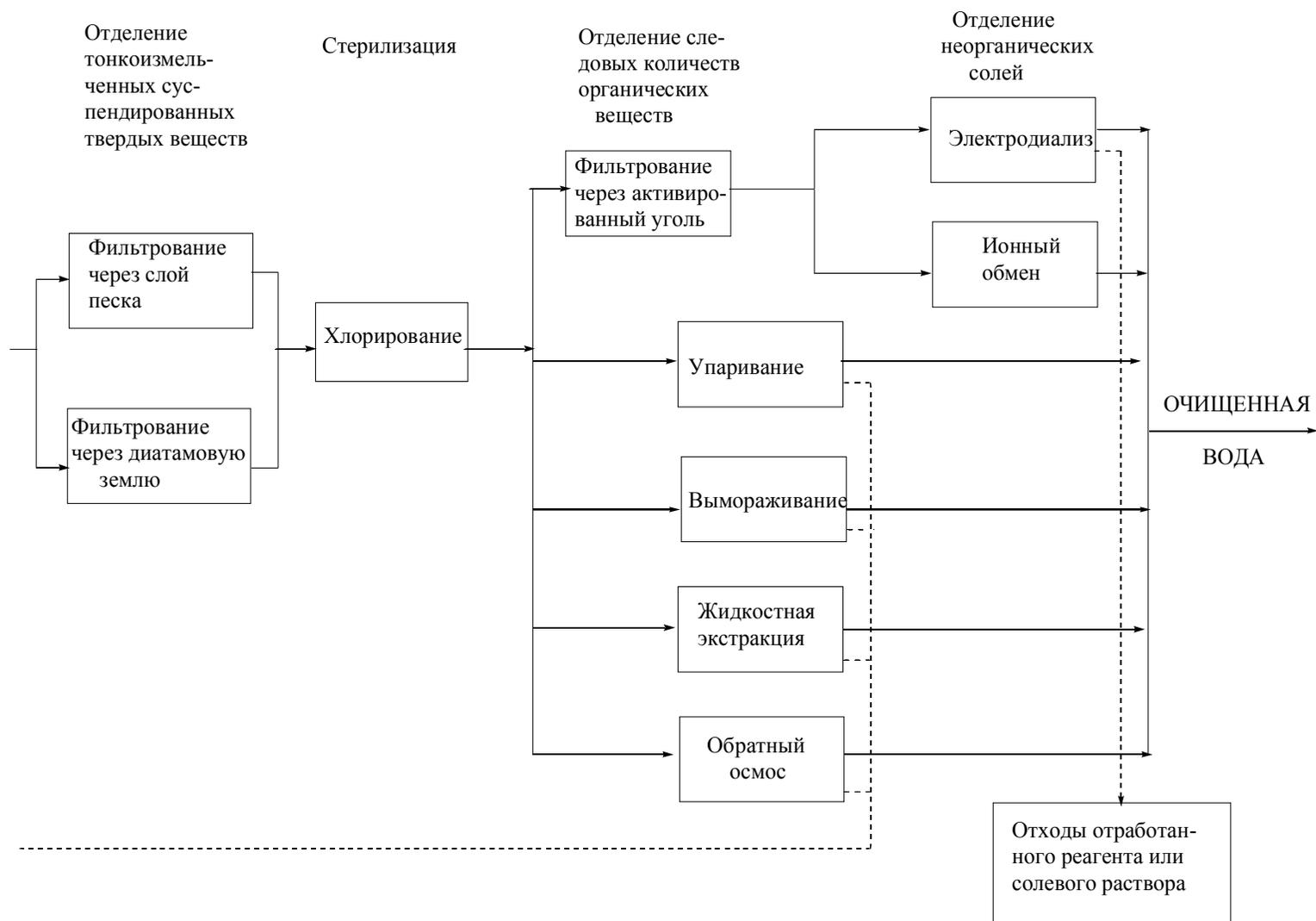


Рис. 6.2. Типовые операции, применяющиеся для первичной, вторичной и третичной очистки сточных вод

6.1.1. Основные характеристики сточных вод

Понятно, что природа и концентрация загрязняющих веществ в сточных водах зависят от их источника. Существуют два основных вида сточных вод – промышленные и бытовые. Последние загрязнены главным образом уличным мусором, моющими средствами и экскрементами.

Бытовые сточные воды обычно содержат более 99 % воды, около $300 \text{ млн}^{-1}(\text{мг/л})$ суспендированных твердых веществ, а также около 500 мг/л летучих веществ. Большая часть суспендированных твердых веществ имеет целлюлозную природу, а другие загрязняющие органические вещества включают (в порядке убывания концентрации) жирные кислоты, углеводы и белки. Как мы уже упоминали при обсуждении процессов порчи пищевых продуктов, неприятный запах бытовых сточных вод обусловлен разложением белков в анаэробных условиях.

Если учесть происхождение бытовых сточных вод, то не должен вызывать удивления тот факт, что в них содержатся различные виды почвенных и кишечных микроорганизмов, в том числе аэробные организмы, облигатные и факультативные анаэробы, бактерии, дрожжи, плесени и грибы. Поскольку в бытовых сточных водах часто присутствуют также патогенные организмы и различные вирусы, чрезвычайно важна полная изоляция источников и трубопроводов для подачи питьевой воды от загрязнения сточными водами. Популяции микроорганизмов в сточных водах служат постоянным смешанным посевным материалом для процессов биологической очистки и, кроме того, источником метаболической активности в стандартных методах определения степени загрязнения сточных вод.

Наиболее распространенным критерием концентрации загрязняющих веществ в бытовых сточных водах является показатель биохимической потребности в кислороде (БПК), равный количеству растворенного кислорода, поглощаемого единицей объема сточных вод за определенное время при $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Продолжительность периода инкубации обычно указывают в виде подстрочного индекса; так, если БПК определяют по результатам инкубирования в течение пяти суток (один из принятых периодов), то соответствующий показатель обозначают символом БПК₅. Количество растворенного кислорода, поглощаемого в ходе инкубации вплоть до полного прекращения биологического окисления органических веществ, называют *предельной* (или полной) БПК (БПК_п). Этот тест, разработанный еще в 1898 г. Британской Королевской комиссией по ликвидации отходов, должен был моделировать условия в водных потоках и обеспечивать относительно прямое определение одного из наиболее вредных и опасных последствий сброса сточных вод – исто-

щения растворенного кислорода в водных бассейнах, куда сбрасываются отходы. Снижение концентрации растворенного кислорода быстро приводит к гибели множества аэробных организмов, а также животных; конечным результатом истощения растворенного кислорода будет грязная, неприятно пахнущая река, зараженная патогенными микроорганизмами.

Другим критерием потенциального снижения общей концентрации растворенного кислорода в водоемах, в которые поступают сточные воды, служит химическая потребность в кислороде (ХПК), равная числу миллиграммов кислорода, поглощаемого одним литром пробы (сточных вод) из горячего подкисленного раствора бихромата калия. В общем случае химическому окислению подвергается больше веществ, чем биологической деградации, и, следовательно, величина ХПК должна быть больше величины БПК для одного и того же образца. Измерение ХПК связано с возможной степенью загрязнения естественных водоемов сточными водами не столь непосредственно, как определение БПК; с другой стороны, ХПК можно определить с помощью доступной простой аппаратуры за 2 часа, а с помощью сложных приборов – за несколько минут. БПК и ХПК являются общими и самыми грубыми индикаторами состава сточных вод. Тем не менее они дают полезную информацию о степени опасности, которую представляют сточные воды для окружающей среды. Другим преимуществом показателей БПК и ХПК является возможность их определения с минимальным количеством несложной аппаратуры, причем выполнение соответствующих анализов требует лишь кратковременного обучения персонала.

Чтобы охарактеризовать качество воды, часто применяют и другие параметры, в том числе концентрации фосфорсодержащих веществ (общего фосфора), азотсодержащих веществ (общего азота) и суспендированных нерастворимых веществ.

Состав промышленных сточных вод определяется их происхождением. Стоки промышленных предприятий часто загрязнены в гораздо большей степени, чем бытовые сточные воды. В стоках промышленных предприятий, связанных с переработкой материалов углеводородной природы, часто содержатся и ядовитые вещества, например: формальдегид, аммиак или цианиды. Здесь возникают две взаимосвязанные проблемы: во-первых, эти стоки чрезвычайно опасны для живых организмов в водоемах, куда они сбрасываются, во-вторых, они могут убивать микроорганизмы, участвующие в аэробных и анаэробных процессах переработки отходов. Эффективные и достаточно экономичные методы обезвреживания подобных токсичных веществ пока еще не разработаны.

6.1.2. Процессы с участием активного ила

В процессах с участием активного ила основным типом оборудования является проточный аэрируемый биологический реактор. Как показано на рис. 6.3, этот аэробный реактор (аэротенк) связан с отстойником, в котором вода осветляется. Часть ила, собирающегося в отстойнике, обычно вновь поступает в биологический реактор, в результате чего обеспечивается постоянная инокуляция илом. Кроме того, рециркуляция увеличивает среднее время пребывания ила в системе, давая таким образом возможность присутствующим в нем микроорганизмам адаптироваться к имеющимся питательным веществам. Ил должен оставаться в аэробном биореакторе достаточно долго и для того, чтобы окислились все адсорбированные органические вещества.

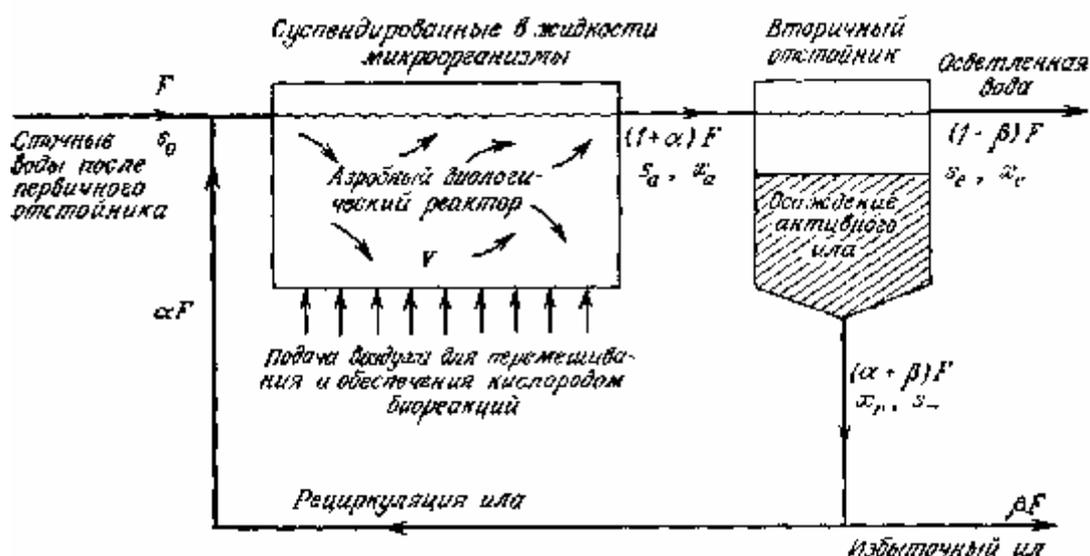


Рис. 6.3. Схема процесса очистки воды с участием активного ила

Одним из наиболее типичных для активного ила организмов является бактерия *Zoogloea ramigera*. Возможно, наиболее важной характеристикой как этого организма, так и многих других видов, существующих в активном иле, является способность синтезировать и секретировать в среду полисахаридный гель. Именно наличие геля обуславливает агрегацию микроорганизмов и образование хлопьевидных скоплений (флокул), называемых активным илом. Активный ил характеризуется высоким сродством к суспендированным твердым веществам, включая коллоидальные частицы. Именно это обстоятельство служит причиной того, что первой стадией разрушения суспендированных твердых частиц в сточных водах является их присоединение к флокулам. Затем, как

это показано на рис. 6.4, способные к биодegradации компоненты адсорбированных частиц претерпевают окисление организмами флоккулы.

Для того чтобы выгоднее использовать высокую адсорбционную способность активного ила, разработан вариант обычного процесса, называемый *контактной стабилизацией*. Как показано на схеме (рис. 6.5), в этом процессе рециркулирующий осажденный ил подвергается повторной аэрации прежде, чем он вступит в контакт с отходами, поступающими в аэрируемый резервуар. В последнем органические вещества связываются с флокулами практически исключительно за счет физических сил. Биологическая утилизация связанных органических веществ происходит в основном в процессе повторной аэрации рециркулирующего ила; одновременно восстанавливается адсорбционная способность флокул ила.

Другие модификации процесса с участием активного ила отличаются от базового варианта главным образом способом осуществления контакта сточных вод, ила и воздуха в аэрируемом реакторе.

Обычный аэротенк с активным илом представляет собой узкий длинный канал (коридор), который по своим характеристикам приближается к трубчатому реактору с незначительной дисперсией. Распределение поступающего потока по длине реактора изменяет характеристики системы таким образом, что коридорный реактор по своему поведению приближается к емкостному реактору с полным перемешиванием.

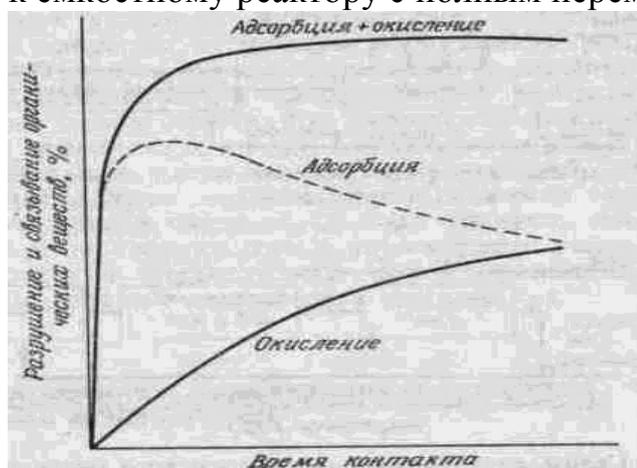


Рис. 6.4. Разрушение органического вещества в аэрируемом реакторе периодического действия с активным илом

Еще ближе к реактору с полным перемешиванием бассейн круглой формы, содержимое которого интенсивно аэрируется с целью обеспечения массопереноса и перемешивания. В такой системе градиенты концентраций растворенного кислорода и питательных веществ минимальны, а развивающаяся популяция организмов активного ила часто лучше

переносит флуктуации нагрузки или резкие повышения концентраций токсичных веществ.

Помимо барботаж с перемешиванием, обычно используемого в микробиологических процессах, здесь возможно барботирование воздуха через диффузоры, расположенные на дне или в стенках резервуара. В другом варианте на поверхности бассейна вращается мешалка с лопастями, создающая турбулентные течения и способствующая поглощению газа. Третий вариант предусматривает перемешивание и аэрацию с помощью конуса, который забирает жидкость со дна бассейна и разбрызгивает ее на стенки резервуара. Во всех случаях основной задачей системы аэрации и перемешивания является снабжение кислородом микроорганизмов, суспендирование и перемешивание ила и других нерастворимых компонентов системы, а также удаление летучих продуктов метаболизма организмов ила, например CO_2 .

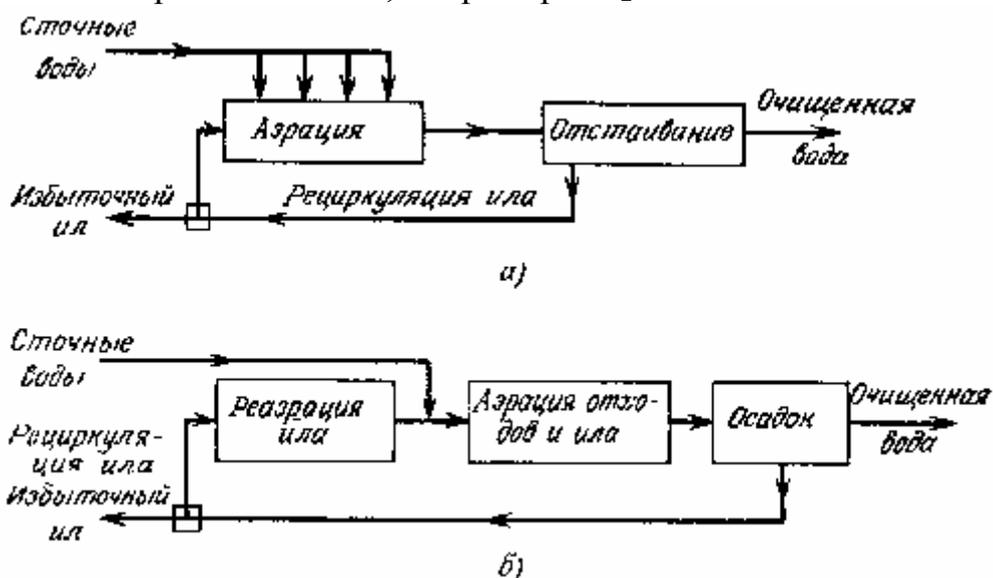


Рис. 6.5. Схемы двух процессов биологического окисления:

а) схема процесса со ступенчатой подачей стоков;

б) схема процесса с контактной стабилизацией (реаэрацией ила)

Помимо высокой адсорбционной и метаболической активности хороший ил должен также быстро оседать. Например, в цилиндре через 30 мин объем осевшего активного ила должен быть примерно в 40 раз больше объема суспендированных твердых компонентов. Если этот показатель намного выше и объем осевшего ила превышает объем суспендированных твердых частиц, например, в 200 раз, то такой ил не удовлетворяет предъявляемым к нему требованиям, поскольку он будет вытекать из отстойника вместе с очищенными сточными водами. Такое состояние называют *объемной перегрузкой*; в этом случае обработанные сточные воды не будут отвечать соответствующим стандартам.

Хотя причины, вызывающие объемную перегрузку, и механизм этого явления пока еще не выяснены, изучение неудовлетворительного ила часто показывает, что в нем содержатся филаментозные бактерии и жгутиковые простейшие. Напротив, хороший ил обычно не содержит многочисленных популяций филаментозных организмов, а из простейших в нем присутствуют главным образом стебельчатые ресничные виды. В процессе очистки воды эти простейшие выполняют полезную функцию, захватывая свободные, т. е. не включенные в флокулы, бактерии и таким образом осветляя обработанные сточные воды.

В нормальных условиях эксплуатации очистных станций филаментозные бактерии и грибы не могут конкурировать с гетеротрофными бактериями, присутствующими в хорошем иле. Резкие изменения концентраций загрязняющих веществ в поступающих сточных водах или грубое нарушение режима эксплуатации системы водоочистки могут, однако, привести к условиям, неблагоприятным для роста полезных популяций, что, в свою очередь, позволит другим видам микроорганизмов занять доминирующее положение в системе. Отсюда следует, что результаты как объемной перегрузки, так и нормального режима работы системы водоочистки представляют собой проявления принципов конкуренции видов в смешанных популяциях.

6.1.3. Аэробная обработка ила

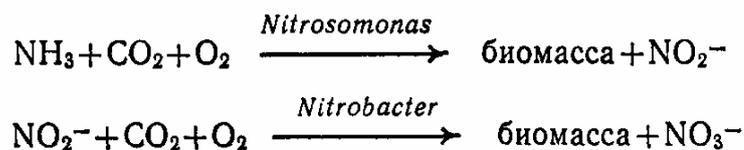
Активный ил с большим содержанием биопродуктов, образующийся в рассмотренных выше процессах, часто подвергают еще одной операции аэробной обработки; фактически она повторяет описанную в предыдущих разделах, но в отсутствие поступления свежих сточных вод.

В таких условиях биомасса в результате эндогенного дыхания утилизирует свои же источники углерода, так что в конечном счете содержание твердых компонентов уменьшается обычно на 50 %. В этой операции рециркуляцию биомассы не применяют, а время пребывания последней в реакторе составляет от 15-ти до 25-ти суток. Основной целью этой операции является уменьшение общей массы ила, подлежащего перевозке (сухопутным или речным транспортом) и уничтожению.

Нитрификация

В обычных процессах обработки отходов с аэрацией в числе подвергающихся биологическому окислению субстратов имеются и азотсодержащие органические вещества. Из последних при биологическом окислении обычно сначала образуется аммиак, который затем необходимо окислить до нитрита и, наконец, до нитрата; только в этом случае очищенная вода будет обладать достаточно низкой БПК.

Для оценки концентраций аммиака и нитрита в сточных водах, прошедших обработку в системе водоочистки с активным илом (эффективность работы которой оценивают по снижению величины БПК до заданного уровня), за основу можно взять уравнения материальных балансов по популяциям *Nitrosomonas* и *Nitrobacter*. Ниже приведен пример такого расчета. Если время пребывания биомассы в системе с активным илом слишком мало, то для завершения процесса нитрификации можно использовать второй аэрируемый биореактор.



6.1.4. Вторичная очистка сточных вод с помощью капельных биологических фильтров

В довольно распространенном варианте очистки сточных вод с участием активного ила применяют так называемые капельные, или перколяционные, биологические фильтры. В биологическом фильтре популяции микроорганизмов существуют в виде пленки или слизистого слоя на поверхности твердой насадки, неплотно заполняющей резервуар (доля пустот составляет около 0,5); в таких условиях воздух легко поступает в нижние слои насадки.

Использование термина «фильтр» для описания этой системы водоочистки во многих отношениях неудачно, поскольку механизм обезвреживания примесей здесь связан не с их механическим удерживанием, а с теми же самыми последовательными процессами связывания и биологического окисления, которые реализуются в системах с активным илом.

Подлежащие очистке сточные воды контактируют прежде всего с верхней частью неподвижного слоя, толщина которого составляет обычно от одного до трех м; сточные воды подают непрерывно через расположенные над неподвижным слоем насадки сопла или периодически с помощью вращающегося разбрызгивателя, подобного изображенному на рис. 6.6. И в том и в другом случае скорость потока сточных вод должна быть достаточно низкой, чтобы слой насадки не оказался под водой. Для обеспечения нужной скорости переноса кислорода поступающие в систему сточные воды должны обтекать покрытую слизью насадку достаточно тонким слоем, не препятствующим дыханию аэробных организмов, находящихся на наружной поверхности пленки микроорганизмов.

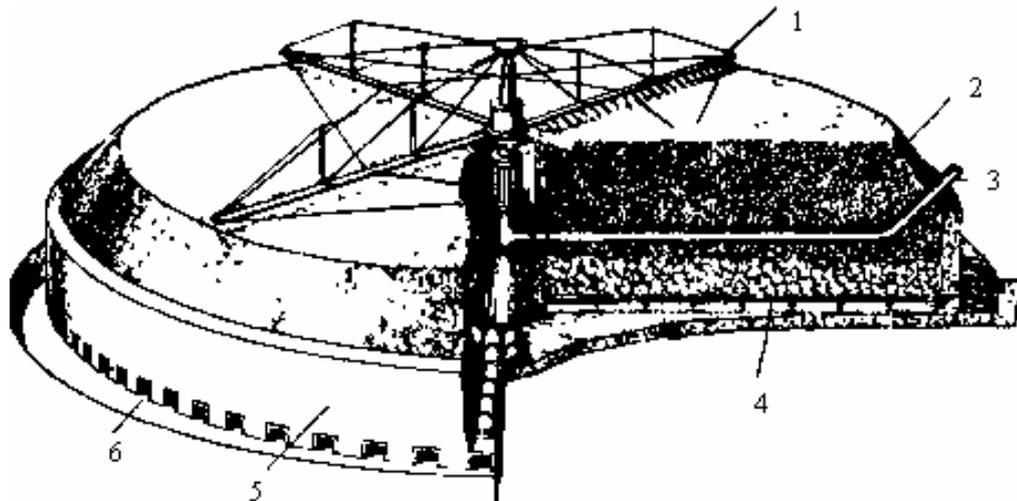


Рис. 6.6. Биологический капельный фильтр:

1 – вращающийся разбрызгиватель сточных вод; 2 – насадка; 3 – трубопровод для подачи сточных вод; 4 – дренаж; 5 – бетонная ограждающая стена; 6 – отверстия для поступления воздуха

В отличие от процессов с участием активного ила, обычно требующих принудительной аэрации, через биологический фильтр воздух циркулирует благодаря естественной конвекции. Движущей силой конвекции является разность температур, создающаяся в фильтре за счет биологического окисления загрязняющих веществ, присутствующих в сточных водах; отверстия для поступления воздуха и связанные с ними вентиляционные трубопроводы (расположенные внутри фильтра) обеспечивают поступление воздуха в нижние и промежуточные слои насадки.

Возникновение и развитие анаэробных областей в толще пленки микроорганизмов приведет к формированию газовых пузырьков, которые, в свою очередь, вызовут частичное отделение пленки от носителя. Образовавшиеся таким путем и унесенные из биологического фильтра потоком воды организмы часто называют гумусом; последний необходимо отделять в отстойнике, установленном непосредственно после биологического фильтра. С другой стороны, в результате этого процесса регулируется толщина пленки микроорганизмов, среднее значение которой зависит от множества факторов. В правильно эксплуатируемом биологическом фильтре толщина пленки микроорганизмов обычно составляет около 0,35 мм.

Недостатком высоконагружаемых биологических фильтров является вымывание большого количества гумуса, который необходимо отделять в отстойнике.

Для того чтобы понять принцип работы биологического фильтра, полезно проследить за происходящими в фильтре превращениями в пространстве и времени. Предположим, что мы перемещаемся внутри фильтра сверху вниз вместе с каплей жидкости. По мере движения через неподвижный слой насадки состав жидкости изменяется во времени, что обусловлено поглощением разных компонентов различными микроорганизмами. По мере изменения состава жидкой среды в ней поочередно развиваются преимущественно определенные виды микроорганизмов, что, в свою очередь, приводит к изменению ее состава и затем к замене одной доминирующей популяции другой.

Теперь перенесем наблюдения в фиксированную в пространстве систему координат. То, что раньше представлялось нам как изменения в капле во времени, теперь будет иметь характер распределения в рабочем пространстве фильтра, эксплуатируемого в стационарном состоянии. Организмы, наиболее приспособленные к утилизации питательных веществ сточных вод, доминируют в верхней части слоя насадки; здесь же изобилуют прочно связанные с насадкой грибы и свободно плавающие ресничные. В нижней части фильтра преобладают стебельчатые ресничные и нитрифицирующие бактерии. Среди обитателей биологических фильтров можно обнаружить и высших животных, из которых наиболее многочисленны популяции червей и личинок насекомых. Эти животные питаются организмами слизистого слоя, растущими на насадке фильтра; регулирование численности их популяций является важным фактором при управлении работой фильтра.

Разделение организмов в пространстве биологического фильтра позволяет каждому виду полностью адаптироваться к соответствующему окружению. По этой причине, в частности, низко нагружаемые биологические фильтры обычно обеспечивают большую прозрачность и большую степень нитрификации очищенной воды, чем системы с активным илом. Кроме того, опыт эксплуатации водоочистных станций показал, что по сравнению с системами с активным илом биологические фильтры менее чувствительны к пиковым нагрузкам токсичных веществ. В то же время, как показано в табл. 6.1, в некоторых отношениях системы с активным илом превосходят биологические фильтры. Предпочтение той или иной системе водоочистки можно отдать. Только после тщательного изучения характеристик сточных вод.

Таблица 6.1

Сравнение методов очистки сточных вод с помощью биологических фильтров и активного ила

Характеристики	Биологические фильтры	Системы с активным илом
Капитальные затраты	Высокие	Низкие
Эксплуатационные расходы	Низкие	Высокие
Площадь, занимаемая биореакторами	Большая	Небольшая
Регулирование аэрации	Частичное (за исключением систем с принудительной аэрацией)	Полное
Регулирование температуры	Затруднено в силу больших потерь тепла	Полное; потери тепла невелики
Чувствительность к колебаниям концентраций загрязняющих веществ в сточных водах	Низкая; восстановление чувствительности происходит медленно	Высокая, но восстановление чувствительности происходит быстро
Прозрачность очищенной воды	Хорошая	Не очень хорошая
Неприятный запах	Присутствует	Отсутствует

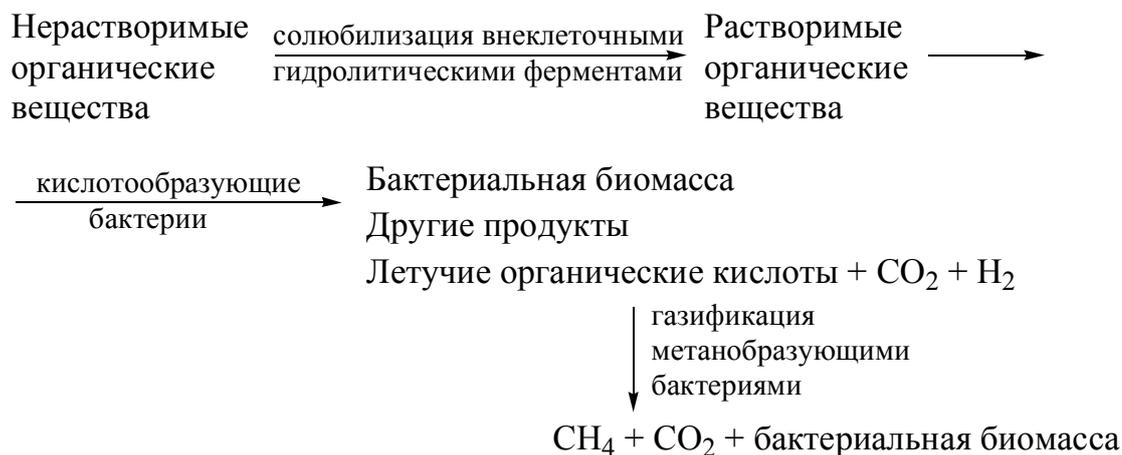
Основой другого метода очистки сточных вод являются так называемые биологические пруды; этот метод очистки намного проще, чем водоочистка с помощью активного ила или биологических фильтров. В биологических окислительных прудах, напоминающих естественные водные экосистемы, в процессе фотосинтеза водоросли выделяют кислород; тем самым поддерживается аэробный режим, который необходим для бактерий, утилизирующих органические загрязняющие вещества. Для предотвращения образования анаэробных зон окислительные пруды обычно делают неглубокими, от 0,6 до 1,2 м глубиной. Напротив, в стабилизирующих прудах для обработки сточных вод, содержащих осаждающиеся примеси, поддерживается анаэробный режим или чередование во времени аэробного и анаэробного режимов.

6.2. АНАЭРОБНАЯ ПЕРЕРАБОТКА ОТХОДОВ

Отходы, содержащие значительные количества ферментируемых органических соединений, можно подвергать биологической обработке в анаэробных условиях. Хотя анаэробная обработка применяется во многих процессах, основной сферой использования этого метода является переработка избыточного активного ила (рис. 6.3 и 6.5), образующегося при биологической очистке сточных вод. Как мы уже знаем из материала предыдущих разделов, концентрированный ил образуется на нескольких стадиях, в том числе при отделении твердых частиц на решетках и в первичном отстойнике, а также при росте микроорганизмов в ходе биологического окисления (при вторичной очистке сточных вод).

Ил далее концентрируют или сгущают часто путем простой седиментации; ликвидации ила обычно предшествует операция анаэробной биологической переработки, являющаяся одним из этапов водоочистки.

Механизм анаэробной переработки отходов, в котором участвует множество видов микроорганизмов, в самом общем и упрощенном виде можно описать следующей схемой:



На первой стадии твердые частицы ила солюбилизируются или диспергируются внеклеточными ферментами, синтезируемыми самыми различными бактериями. В системах для анаэробной обработки ила обнаружены протеолитические, липолитические и некоторые целлюлолитические ферменты. Поскольку в биореакторах для анаэробной переработки ила твердые вещества не накапливаются, то, очевидно, реакции солюбилизации осуществляются достаточно быстро и эта стадия не лимитирует скорость всей последовательности превращений.

Экспериментальное изучение следующей стадии анаэробной переработки ила, а именно микробиологического синтеза низкомолекулярных жирных и летучих кислот из растворенных органических веществ, показало, что скорость осуществляющихся на этой стадии реакций также довольно высока. По вполне понятной причине ответственные за эти превращения организмы называют *кислотообразующими бактериями*; они являются факультативными анаэробными гетеротрофами и лучше всего функционируют в диапазоне рН от 4,0 до 6,5. Главным продуктом этой стадии является уксусная кислота, хотя в некоторых количествах образуются также пропионовая и масляная кислоты.

Важнейшим субстратом для последней стадии процесса является уксусная кислота; показано, что около 70 % всего метана образуется именно из этого субстрата. Стадия газификации осуществляется с участием метанобразующих бактерий, являющихся облигатными анаэро-

бами. Эти организмы проявляют наибольшую активность в гораздо более узком диапазоне рН (от 7,0 до 7,8); их сложно выделить в виде соответствующих чистых культур, но в адекватно эксплуатируемом биореакторе (метантенке) смешанная культура этих бактерий находит очень хорошие условия для своей жизнедеятельности. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что превращение летучих кислот в CH_4 и CO_2 лимитирует скорость всей последовательности превращений.

На рис. 6.7 представлена схема аппарата для анаэробной переработки ила (метантенка). Для предотвращения чрезмерного повышения локальных концентраций кислот содержимое метантенка перемешивают. Создание условий, удовлетворительных как для кислотообразующих, так и для метанообразующих бактерий, обеспечивается поддержанием рН около 7. На рис. 6.7 указан также выносной теплообменник для поддержания повышенной температуры в резервуаре метантенка. В настоящее время в большинстве случаев температуру содержимого метантенка поддерживают на уровне мезофильного диапазона (около 32–38 °С), который обеспечивает максимальную скорость переработки ила. Имеются указания на то, что скорость процесса можно повысить в еще большей степени, если осуществлять его в термофильном диапазоне (около 55 °С). Впрочем, такой температурный режим применяют сравнительно редко; одной из причин предпочтения, отдаваемого мезофильному диапазону температур, является меньший расход энергии на нагревание метантенка. При эффективном перемешивании и средней температуре (32–35 °С) необходимое для полной переработки ила время его пребывания составляет от десяти до тридцати суток.

При анаэробной переработке ила образуется топливо, которое можно использовать для снижения эксплуатационных расходов водочистных станций. Иногда образующийся при анаэробной переработке ила метан используют вне водочистой станции для выработки тепла и электроэнергии. Газовая смесь, образующаяся при анаэробной переработке ила и накапливающаяся, как это показано на рис. 6.7, в верхней части метантенка, состоит в основном из метана (65–70 %) и углекислого газа. В небольших концентрациях в этой смеси содержатся также сероводород (продуцируемый сульфатредуцирующими бактериями), H_2 и CO .

В связи с повышением цен на топливо, однако, процессам анаэробной переработки ила как потенциальному источнику топлива (после обязательного удаления H_2S) уделяется все большее внимание.

В результате анаэробной переработки ил легче поддается последующим операциям. Во-первых, содержание органических веществ в иле снижается на 50–60 %. Во-вторых, существенные изменения пре-

терпевают и концентрации других компонентов ила. После анаэробной переработки ил в гораздо меньшей степени подвержен гниению и легче обезвоживается. После обезвоживания (эту операцию часто осуществляют с помощью ротационного вакуум-фильтра) ил высушивают и затем используют в качестве удобрения, складывают или сжигают.

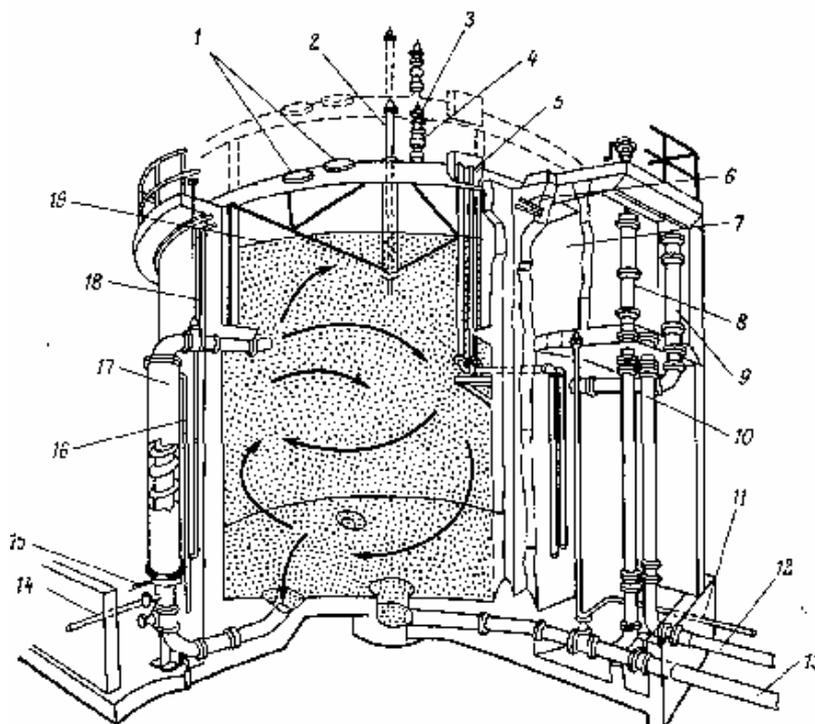


Рис. 6.7. Схема установки для анаэробной переработки ила:

1 – смотровые окна; 2 – труба для выхода газа; 3 – предохранительный клапан для регулирования давления (вакуума); 4 – пламягаситель; 5 – трубопровод для отвода газа; 6 – возвратная вода; 7 – возвратная циркулирующая вода и расширительная камера; 8 – регулируемый слив суспензии ила; 9 – регулятор уровня; 10 – вывод из камеры с илом; 11 – возврат воды в нагреватель; 12 – выпуск переработанного ила; 13 – дренажные трубы; 14 – подача сырого ила; 15 – газ; 16 – подача циркулирующей воды; 17 – выносной теплообменник; 18 – возврат циркулирующей воды; 19 – верхний уровень ила.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Воробьев А. А. Микробиология. – М.: Медицина, 2003. – 464 с.
2. Шлегель Г. Общая микробиология. – М.: Мир, 1987. – 566 с.
3. Красильников А. П. Словарь-справочник микробиологический. – Минск, 1999. – 185 с.
4. Елинов Н. П. Основы биотехнологии. – СПб: Изд-во наука, 1995. – 600 с.

5. Бейли Дж., Оллис Д. Основы биохимической инженерии. В 2-х т.– М.: Мир, 1989.
6. Сассон А. Биотехнология: свершения и надежды. – М.: Мир, 1987. – 411 с.
7. Егоров Н. С. Основы учения об антибиотиках. – М.: Изд-во МГУ, 1994.– 512 с.
8. Уэбб Ф. Биохимическая технология и микробиологический синтез. – М.: Медицина, 1969.– 562 с.
9. Биотехнология: Учеб. пособие для вузов. В 8 кн./Под ред. Н. С. Егорова, В. Д. Самуилова. Кн. 6. – М.: Высш. шк., 1987. – 143 с.
10. Загребельный С. Н. Биотехнология. Ч. 1: Культивирование продуцентов и очистка продуктов: Учеб. пособие. – Новосибирск: Новосибирский гос. ун-т, 2000. – 108 с.
11. Загребельный С. Н. Биотехнология, Ч. 2. Инженерная энзимология: Учеб. пособие. – Новосибирск: Новосибирский гос. ун-т, 2001. – 138 с.
12. В. Н. Рыбчин. Основы генетической инженерии. Учебник для вузов. 2-е изд. – СПб: Изд-во СПб ГТУ, 1999. – 522 с.

Учебное издание

ТИМОЩЕНКО Лариса Владимировна
ЧУБИК Марианна Валериановна

ОСНОВЫ МИКРОБИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ

Учебное пособие

Научный редактор доктор химических наук, профессор	<i>В.Д. Филимонов</i>
Редактор	<i>И.О. Фамилия</i>
Верстка	<i>М.В. Чубик</i>
Дизайн обложки	<i>Т.А. Фатеева</i>

Подписано к печати 00.00.2008. Формат 60x84/8. Бумага «Снегурочка».

Печать XEROX. Усл.печ.л. 000. Уч.-изд.л. 000.
Заказ XXX. Тираж 100 экз.



Томский политехнический университет
Система менеджмента качества
Томского политехнического университета сертифицирована
NATIONAL QUALITY ASSURANCE по стандарту ISO
9001:2000



ИЗДАТЕЛЬСТВО  ТПУ. 634050, г. Томск, пр. Ленина, 30.