

Министерство сельского хозяйства Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Саратовский государственный аграрный университет
имени Н. И. Вавилова»

БИОТЕХНОЛОГИЯ
(в том числе бионанотехнологии)

краткий курс лекций

для аспирантов

Направление подготовки
06.06.01 Биологические науки

Профиль подготовки
Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Саратов 2014

Биотехнология (в том числе бионанотехнологии): краткий курс лекций для аспирантов направления подготовки 06.06.01 Биологические науки (профиль подготовки – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии) / Сост.: Л.В. Карпунина, А.А. Щербаков, О.С. Ларионова // ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ». – Саратов, 2014. – 82 с.

Краткий курс лекций по дисциплине «Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)» составлен в соответствии с рабочей программой дисциплины и предназначен для аспирантов направления подготовки 06.06.01 Биологические науки (профиль подготовки – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)). Краткий курс лекций содержит теоретический материал по биотехнологии. Направлен на формирование у аспирантов знаний в области молекулярной генетики, генетической инженерии микроорганизмов, растений и животных и применении биотехнологии и биоинженерии в селекции и растениеводстве, животноводстве, ветеринарной медицине, биоконверсии органических отходов, биоэнергетике, окружающей среды.

Карпунина Л.В., Щербаков А.А., Ларионова О.С. 2014
ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ», 2014

Введение

Биотехнология – одна из важнейших естественнонаучных дисциплин. Предметом биотехнологии является использование живых систем и их компонентов для создания и производства новых продуктов, повышающих качество жизни и улучшающих состояние окружающей среды.

Краткий курс лекций по дисциплине «Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)» предназначен для аспирантов по направлению подготовки 06.06.01 Биологические науки (профиль подготовки – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)). Он включает в себя введение в биотехнологию, знакомит с организацией биотехнологического процесса, актуальными направлениями современной биотехнологии в области молекулярной биологии и молекулярной генетики, сельского хозяйства и окружающей среды. Курс направлен на формирование ключевых компетенций, необходимых для решения профессиональных задач и организации профессиональной деятельности на основе глубокого и всестороннего изучения биотехнологических и биоинженерных проблем.

Лекция 1

БИОТЕХНОЛОГИЯ КАК НАУКА

Биотехнология как наука возникла в начале сороковых годов и получила ускоренное развитие с 1953 г., после открытия Д. Уотсона и Ф. Крика химической структуры и пространственной организации ДНК. В 70 годах прошлого века С. Коэн и Г. Бойер разработали способ переноса генетической информации из одного организма в другой. Этот метод, получивший название технологии рекомбинантных ДНК, позволил выделять конкретные гены и вводить их в организм нового хозяина. Технология рекомбинантных ДНК стимулировала развитие различных областей науки, но прежде всего она создала необходимые предпосылки для появления современной биотехнологии.

Современная биотехнология - это наука о генно-инженерных и клеточных методах и технологиях создания и использования генетически трансформированных (модифицированных) микроорганизмов, растений и животных в целях интенсификации производства и получения новых видов продуктов различного назначения. Данное определение и определяет цель биотехнологии. Задачами биотехнологии являются: создание микроорганизмов, растений и животных с повышенной устойчивостью к стрессовым факторам среды, высокой продуктивностью и качеством продукции, оздоровление экологической обстановки в природе и всех отраслях производства. Для достижения цели и решения данных задач предстоит преодолеть определенные трудности в повышении эффективности генетической трансформации и, прежде всего, в идентификации и клонировании генов, создании их банков, расшифровке механизмов полигенной детерминации признаков и свойств биологических объектов, создании надежных векторных систем и обеспечении высокой устойчивости экспрессии генов. Уже сегодня во многих лабораториях мира с помощью методов генетической инженерии созданы принципиально новые трансгенные растения, животные и микроорганизмы, используемые в коммерческих целях.

1.1. Биологические объекты биотехнологии

Объектами биотехнологии являются самые разнообразные биологические системы: микроорганизмы, клеточные линии насекомых, растений и млекопитающих, многоклеточные организмы (растения, мыши, домашние животные и др.). Выбор системы зависит от цели эксперимента. Среди множества биологических объектов, используемых в биотехнологии, основными “рабочими лошадками” являются бактерии (кишечная палочка – *Escherichia coli*), дрожжи (*Saccharomyces cerevisiae*) и различные клеточные линии животного происхождения. Все они играют важную роль в получении различных продуктов, кодируемых клонированными генами.

Все живые организмы делятся на две основные группы: про- и эукариоты. В основе этой классификации лежат многочисленные структурные различия. Основные из них:

- 1) наличие или отсутствие ядра, содержащего хромосомную ДНК,
- 2) строение и химический состав клеточной стенки,
- 3) наличие или отсутствие субклеточных цитоплазматических органелл.

В прокариотической клетке хромосомная ДНК находится непосредственно в цитоплазме и окружена ригидной клеточной стенкой, в состав которой входит пептидог-

ликан, не хитин или целлюлоза; в клетке нет субклеточных цитоплазматических оргanelл.

В эукариотической клетке имеется ядро, отделенное ядерной мембраной; хромосомная ДНК находится в ядре; клеточная стенка, если она есть, может содержать хитин или целлюлозу, но не пептидогликан; в цитоплазме содержатся различные органеллы (митохондрии, аппарат Гольджи, хлоропласты в клетке растений).

Бактерии *Escherichia coli* – один из хорошо изученных организмов. За последние 50 лет удалось получить исчерпывающую информацию о ее генетике, молекулярной биологии, биохимии, физиологии и общей биологии. Это граммотрицательная неподвижная палочка менее 1 мкм. Средой обитания является кишечник человека, животных, также может быть в почве, воде. Благодаря способности размножаться простым делением на простых средах кишечная палочка стала любимым объектом научных исследований. Время генерации 22 минуты. Температура роста 37 °С. *E. coli* можно культивировать как в аэробных, так и в анаэробных условиях.

Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* – это непатогенные одноклеточные микроорганизмы с диаметром клетки ~ 5 мкм. Генетика, молекулярная биология, метаболизм этих грибов хорошо изучен. Размножаются почкованием и хорошо растут на простой среде, как и кишечная палочка. Дрожжи являются удобной моделью для исследования других эукариот, в том числе человека, поскольку многие гены, ответственные за регуляцию клеточного деления *S. cerevisiae* сходны с таковыми у человека. В 1996 году была определена полная нуклеотидная последовательность всего набора хромосом *S. cerevisiae*.

Культуры эукариотических клеток. При всех различиях между типами эукариот методические подходы к культивированию клеток насекомых, растений и млекопитающих имеют много общего. Сначала берут небольшой кусочек ткани данного организма и обрабатывают его протеолитическими ферментами, расщепляющими белки межклеточного материала; при работе с растительной клеткой добавляют еще ферменты, разрушающие клеточную стенку. Высвободившиеся клетки помещают в сложную питательную среду, содержащую аминокислоты, антибиотики, витамины, соли, глюкозу и факторы роста. В этих условиях клетки делятся до тех пор, пока на стенках емкости с культурой не образуется клеточный монослой. Если после этого клетки не перенести в емкости со свежей питательной средой, то рост прекратится. Обычно удается перенести (перевивать, субкультивировать) и поддерживать до 50-100 клеточных генераций исходной (первичной) клеточной культуры, затем клетки начинают терять способность к делению и гибнут. Культивируемые клетки сохраняют некоторые свойства исходного клеточного материала, поэтому их можно использовать для изучения биохимических свойств различных тканей.

1.2. Основные направления биотехнологии

К актуальным направлениям биотехнологии можно отнести генетическую инженерию, иммобилизацию клеток и ферментов, клеточную и тканевую биотехнологию в селекции и растениеводстве, биотехнологию кормовых препаратов, изучение генетических основ повышения эффективности использования симбиотических, ассоциативных и свободноживущих в почве азотфиксирующих микроорганизмов; получение трансгенных животных, биоконверсию и биоэнергетику, нанобиотехнологию, а также биотех-

нологию и окружающую среду, биотехнологию и пищевые продукты, биотехнологию и биобезопасность.

Вопросы для самоконтроля

- 1) Что такое биотехнология?
- 2) Объекты биотехнологии.
- 3) Строение про- и эукариотической клетки.
- 4) Основные направления биотехнологии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. **Клунова, С.М.** Биотехнология: учебник / С.М. Клунова, Т.А. Егорова, Е.А. Живухина. – М.: Академия, 2010. – 256 с.
2. **Коростелева, Н.И.** Биотехнология: учебное пособие / Н.И. Коростелева, Т.В. Громова, И.Г. Жукова. - Барнаул: Изд-во АГАУ, 2006. - 127 с.
3. **Сазыкин, Ю.О.** Биотехнология / Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева; под ред. А.В. Катлинского. - М.: Академия, 2008. – 256 с.
4. **Тихомирова Е.И.** Введение в биотехнологию / Е.И. Тихомирова, В.А. Спивак, О.Ю. Ксенофонтова. – Саратов: Изд-во Саратовского ун-та, 2006. – 64 с.

Дополнительная

1. **Баев, А.А.** Биотехнология / А.А. Баев. – М.: Наука, 1984. – 320 с.
2. **Елинов, Н.П.** Основы биотехнологии / Н.П. Елинов. – СПб.: ИФ “Наука”, 1995. – 600 с.
3. **Емцев, В.Т.** Микробиология / В.Т. Емцев, Е.Н. Мишустин. – М.: Дрофа, 2005. – 289 с.
4. **Сассон, А.** Биотехнология: Свершения и надежды / А. Сассон. – М.: Мир, 1987. – 411 с.
5. Сельскохозяйственная биотехнология / В.С. Шевелуха [и др.]. – М.: Высшая школа, 2003. – 427 с.

Лекция 2

ОРГАНИЗАЦИЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА

2.1. Культивирование биологических объектов

Биологические объекты можно выращивать в *ферментере периодического действия*, *ферментере периодического действия с добавлением субстрата* и в *непрерывной культуре*.

Рост бактерий в периодической культуре. При внесении микроорганизмов в питательную среду они обычно растут до тех пор, пока содержание какого-нибудь из необходимых им компонентов среды не достигнет максимума, после чего рост прекращается. Если на протяжении этого времени не добавлять питательных веществ и не удалять конечных продуктов обмена, то получим так называемую периодическую культуру (популяцию клеток в ограниченном жизненном пространстве).

Если периодически в ферментер добавлять субстрат, то это будет приводить к удлинению экспоненциальной и стационарной фаз, к увеличению биомассы и количества метаболитов, синтезируемых в стационарной фазе. Если свежую питательную среду добавлять через определенные интервалы времени, то можно продлить логарифмическую фазу (*периодическая культура с добавлением субстрата*).

Такую же цель можно достичь, если в сосуд, содержащий популяцию быстро растущих микроорганизмов, в течение всего процесса непрерывно вносить (вводить) новый питательный раствор и одновременно удалять из него соответствующее количество бактериальной суспензии и отработанную среду. Именно такой метод положен в основу *непрерывного культивирования* в хемостатах и турбистатах.

Хемостат состоит из сосуда культиватора, в который из особого резервуара поступает с постоянной скоростью питательный раствор. Благодаря аэрации и механическому перемешиванию в культиваторе создаются оптимальные условия для снабжения клеток кислородом и для быстрого и равномерного распределения питательных веществ, поступающих с новыми порциями раствора. По мере поступления в культиватор питательного раствора из него вытекает бактериальная суспензия. Рост культуры в хемостате контролируется концентрацией субстратов. Стабильность динамического равновесия культуры в хемостате обусловлена тем, что ее рост лимитирует концентрация какого-то субстрата. В хемостате скорость потока жидкости устанавливается на определенном уровне, а скорость роста культуры приходит в соответствие со скоростью потока. Хемостат представляет собой саморегулирующуюся систему, простую в работе; если скорость притока достаточно долго остается постоянной, то работа хемостата регулируется автоматически.

Работа в турбистате основана на поддержании постоянной плотности бактериальной суспензии, или постоянной мутности. Датчик мутности регулирует через управляющую систему поступление питательного вещества. В сосуде для культивирования все питательные вещества содержатся в избытке, и скорость роста бактерий приближается к максимальной. Работа с турбистатами технически сложнее, чем с хемостатами.

2.2. Имобилизованные клетки и ферменты

Слово иммобилизация от лат. *immobilis* - неподвижный. Иммобилизованные клетки (ИК) в сравнении со свободными клетками и иммобилизованными ферментами (ИФ) делают их более экономичными биокатализаторами, во-первых, отсутствуют затраты на выделение и очистку ферментов, во-вторых, снижаются затраты на выделение и очистку продуктов реакции. ИК обладают более высокой активностью и стабильностью, осуществляется возможность создания непрерывных и полунепрерывных автоматизированных процессов. Кроме того, ИК способны к длительному функционированию полиферментных систем без экзогенных кофакторов.

Для иммобилизации могут быть использованы клетки в различном состоянии: живые и поврежденные в различной степени. Одностадийные реакции могут осуществлять и живые и поврежденные клетки. Полиферментные многостадийные реакции проводят с применением живых клеток, которые длительное время могут регенерировать АТФ и такие коферменты как НАД и НАДФ. В настоящее время существуют различные методы иммобилизации микроорганизмов и весьма расширились области их применения.

Методы иммобилизации клеток микроорганизмов

Методы ИК микроорганизмов можно условно разделить на три типа: химические, физические и механические.

Химический метод основан на образовании ковалентных связей с активированным носителем. Ковалентное привязывание клетки к носителю используется пока не часто. Это объясняется токсичностью используемых реагентов. Тем не менее методы ковалентного связывания, разработанные рядом авторов, позволяют сохранить жизнеспособность клеток, т.к. в этих методах исключен непосредственный контакт с токсичными реагентами. Часто для таких целей используют посредники, например, глицин, аланин. Присутствие таких посредников освобождает клетку микроорганизма от непосредственного контакта с токсичным реагентом и тем способствует сохранению активности. Эти методы довольно трудоемки, но преимущество ковалентного связывания состоит в минимальном взаимодействии клетки и носителя, что обуславливает наибольшую доступность для низкомолекулярных субстратов.

К *физическим методам* относятся адсорбция и агрегация. В качестве адсорбентов могут быть использованы различные органические и неорганические носители: различные полимеры, стекло, керамика, глина и др. Особое внимание привлекают в последнее время крупнопористые носители (имеющие поверхность более $0,01\text{ м}^2$ / носителя). Такие носители имеют контролируемый размер пор (от 50 до 2500 \AA) превышающий размер микроорганизмов в 5-6 раз, а спор грибов в 16 раз. Вследствие этого микроорганизмы адсорбируются не только на наружной, но, главным образом, на внутренней стороне пор, что в свою очередь приводит к повышению активности единицы носителя. Сравнительные эксперименты с культурами *S. cerevisiae* и *Penicillium chrysogenum* показали, что крупнопористые носители адсорбируют больше биомассы, чем активированный силон и непористое бромсиликатное стекло. К достоинствам крупнопористых носителей можно отнести то, что на размеры пор не влияет температура, рН, природа растворителя. Материал носителя прочный, действию бактерий не подвергается. Недостаток пористого носителя (стекла), ограничивающий его широкое применение в промышленности – его дороговизна. Пористая керамика мало уступает по своим свойствам пористому стеклу, она дешевле и более устойчива в щелочных средах. На ней

также как и на пористом стекле иммобилизованы многие ферменты: глюкооксидаза, аминоацелаза, протеаза, глюкоамилаза, пепсин, трипсин, лактаза, которые нашли применение в пищевой промышленности, в медицине.

Иммобилизацию клеток путем включения в различные гели, мембраны, волокна иногда относят к *механическим методам*, хотя чаще всего этот метод основан на химических и физических взаимодействиях. Включение основано на неспецифическом осаждении (коллаген, агар, полистирол, каррагинан), ионном образовании геля (Al и Са-альгинаты), полимеризации (полиакриламид, фоточувствительные полимеры). ИК в гели, мембраны, волокна имеет наибольшее применение как в лабораторной, так и в промышленной практике. Клетки, включенные в ПААГ, Са-альгинатный и каррагинановый гели, могут сохранять свою жизнеспособность и в присутствии питательной среды, размножаться в приповерхностных слоях гелей. Этот прием позволяет в значительной мере стабилизировать ферментативную активность ИК и повысить активность иммобилизованной системы в целом.

Применение иммобилизованных клеток

Биокаталитическая активность целых ИК в настоящее время может быть использована в самых различных областях науки и техники. Существуют по меньшей мере три большие области в которых могут найти применение ИК микроорганизмов, а именно: 1) при производстве аминокислот, антибиотиков и др. веществ, 2) производство лекарственных средств и 3) охрана окружающей среды (обработка сточных вод, гидролиз городских, промышленных и с/х стоков, содержащих целлюлозу, гемицеллюлозу и лигнин. Помимо того, что эти процессы имеют социальное значение, они выгодны с экономической точки зрения, т.к. при этом утилизируется энергия в форме метана.

Ферментативная активность ИК используется в последние годы достаточно широко при очистке сточных вод. Следует отметить, что активные илы всегда содержали адсорбированные клетки. Применение добавочных стадий при очистке с помощью ИК может дать большой эффект т.к. позволяет направленно обезвредить особенно токсичные соединения, например фенол, бензол, гексаметилендиамин. Возможна деградация и неприродных веществ, таких как циклический димер аминокaproновой кислоты, содержащейся в сточных водах с нейлоновых фабрик. Показана возможность применения целых клеток *Alcaligenes eutrophus*, иммобилизованных в альгинатный или каррагинановый гели, для очистки сточных вод от трития. 10 г клеток (сырая биомасса) эквивалентны 1 г платинового катализатора. Для очистки сточных вод применяют пилотные установки (30 °С). Они предназначены для очистки сточных вод содержащих высокие концентрации минеральных масел и ПАВ (до 5 г/л) и может быть использована на металлургических предприятиях для утилизации отработанных моющих растворов и смазочно-охлаждающих жидкостей (СОЖ). В основе технологии – ассоциации специализированных микроорганизмов–деструкторов, иммобилизованных на волокнистом носителе и помещенных в компактную передвижную установку.

Ферментативная активность ИК используется для обработки не только сточных вод, но и органических отходов. Реакторы с адсорбированными клетками в анаэробных условиях действовали более двух лет. Получаемый при этом газ содержит до 90 % метана и менее 5 % CO₂.

Переработка больших масс жидкого навоза анаэробным способом приобретает большое значение в современной биотехнологии. Ферментацию проводят на термостатическом режиме (55 °С) с использованием активного ила (в качестве закваски). Иссле-

дования проводятся в метантенках. Утилизация навоза этим способом позволяет получать биогаз, органо-минеральные удобрения, кормовые белковые добавки. Получаемый биогаз используется в технологии процесса сбраживания, в теплицах для прямого сжигания в дневное время с целью обогащения атмосферы CO₂. Избыточный биогаз сжигается в котельной, из дымовых газов извлекается CO₂ для выращивания микророслей, хранения силоса, корнеплодов, овощей, получения жидкой углекислоты и сухого льда.

Приведенные выше данные свидетельствуют о перспективности развития одного из направлений биотехнологии, связанного с изучением и применением ИК микроорганизмов. Развитие этого направления безусловно связано с наличием высокоактивных штаммов-продуцентов, т.е. с достижением микробиологии, биохимии, генетики, органической химии, химии полимеров, методов рДНК. Достигнуты немалые успехи в изучении ИК, ряд процессов внедрен или внедряется в промышленность. Многие процессы ждут своего технологического решения. Будущее во многом будет определяться расшифровкой причин высокой стабильности живых и неживых иммобилизованных клеточных систем и созданием новых живых иммобилизованных катализаторов пролонгированного действия.

Вопросы для самоконтроля

- 1) Периодическое культивирование биологических объектов.
- 2) Непрерывное культивирование.
- 3) Отличие хемостата от турбистата.
- 4) Что такое иммобилизация?
- 5) Иммобилизация клеток и ферментов.
- 6) Методы иммобилизации.
- 7) Применение иммобилизованных клеток и ферментов в народном хозяйстве.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. **Клунова, С.М.** Биотехнология: учебник / С.М. Клунова, Т.А. Егорова, Е.А. Живухина. – М.: Академия, 2010. – 256 с.
2. **Коростелева, Н.И.** Биотехнология: учебное пособие / Н.И. Коростелева, Т.В. Громова, И.Г. Жукова. - Барнаул: Изд-во АГАУ, 2006. - 127 с.
3. **Котова, И.Б.** Общая микробиология / И.Б. Котова, А.И. Нетрусов. – М.: Академия, 2007. – 352 с.
4. **Сазыкин, Ю.О.** Биотехнология / Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева; под ред. А.В. Катлинского. - М.: Академия, 2008. – 256 с.
5. **Тихомирова, Е.И.** Введение в биотехнологию / Е.И. Тихомирова, В.А. Спивак, О.Ю. Ксенофонтова. – Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 2006. – 64 с.

Дополнительная

1. **Баев, А.А.** Биотехнология / А.А. Баев. – М.: Наука, 1984. – 320 с.

2. **Елинов, Н.П.** Основы биотехнологии / Н.П. Елинов. – СПб.: ИФ “Наука”, 1995. – 600 с.
3. Микробиологическое производство биологически активных веществ и препаратов / В.А. Быков [и др.]. – М.: Высшая школа, 1987. – 143 с.
4. **Сассон, А.** Биотехнология: Свершения и надежды / А. Сассон. – М.: Мир, 1987. – 411 с.

Лекция 3

ПАРАМЕТРЫ РОСТА И АНАЛИЗЫ ДАННЫХ О РОСТЕ КУЛЬТУР И МИКРООРГАНИЗМОВ

3.1. Микроорганизмы как продуценты сложных органических веществ

Во всем мире тенденция к производству разнообразных продуктов микробного синтеза с каждым годом расширяется. Если до 40-ых годов микроорганизмы и их продукты использовались в основном в хлебопекарной, молочной, ликеро - водочной промышленности, то в настоящее время (по прошествии 60 лет) их применение увеличилось в десятки раз. В 60-80 годы возникло множество предприятий микробиологической промышленности, производящие аминокислоты, кормовые белки, ферменты, различные препараты для сельского хозяйства. Огромное значение имеет микробиологический синтез для медицины. Этот процесс лежит в основе получения крайне важных для здравоохранения лекарственных препаратов, антибиотиков, а также ферментов медицинского назначения. С помощью микроорганизмов в настоящее время осуществляется микробиологическая трансформация - преобразование одних органических веществ в другие в случае, когда химический синтез невозможен или очень сложен.

Микроорганизмы используются также в работе очистных сооружений, что учитывает требования к охране окружающей среды, делая это направление их применения особо важным. Разнообразие областей применения и свойств продуктов микробиологического синтеза затрудняет нахождение общих закономерностей в способах их получения. Так, например, культивирование микроорганизмов может осуществляться периодическим, полунепрерывным или непрерывным методами в аэробных или анаэробных условиях что существенно влияет на применение аппаратуры и технологические приемы. Различия имеют место в характере получаемых конечных продуктов, которые условно можно разделить на 2 группы: получение биомассы (дрожжи, бактерии) и синтезируемых первичных и вторичных метаболитов (антибиотики, ферменты). Условия культивирования микроорганизмов, требуемые для накопления биомассы или получения вторичных метаболитов тоже обычно различны. Однако, не смотря на все различия присутствие живых объектов в системе накладывает на всю технологическую цепочку получения целевых продуктов общие специфические особенности, для решения которых необходимо проведение как специальных различных исследований, так и разработок в области аппаратурно-технологического оформления. Поэтому методы биохимии, математического моделирования, систем математического контроля, все это необходимо для современного понятия процессов и их контроля в производстве.

Основные особенности процессов культивирования:

1. Строгая чистота культуры сохраняется длительное время, не допуская контаминации;
2. Культивирование в 3-ех фазной системе: газ-жидкость- твердое тело(клетка), при этом необходимо постоянство критериев: теплового, химического, диффузионного, гидравлического;
3. Использование больших объемов воздуха, как наиболее экономичного источника кислорода, из-за его низкой растворимости в питательной среде и культуральных жидкостях;

4. Чувствительность микроорганизмов к физико-химическим воздействиям, а также механическим и низкая скорость процессов биосинтеза (по сравнению с химическими реакциями)

5. Многокомпонентность питательных сред и свойства их и культуральной жидкости образовывать пену;

6. Сложность биохимических механизмов регуляции роста микроорганизмов и биосинтез целевых продуктов (энергия активации, репрессия, ингибирование)

7. Нестабильность (в ряде случаев) целевых продуктов, их термолабильность

Поэтому поиск оптимальных условий культивирования микроорганизмов с учетом выше перечисленных факторов при многообразии микроорганизмов-продуцентов, задача достаточно сложная. Надо учитывать возрастание потребностей народного хозяйства в получение с помощью микробиологического синтеза требует интенсификации производства.

Таков круг вопросов, которые встают перед инженером-биотехнологом и его знания общих закономерностей роста и развития культур промышленных микроорганизмов позволяют решать многие вопросы реально, а не эмпирически.

3.2. Методы культивирования микроорганизмов и общие закономерности роста культур

Процессы выращивания микроорганизмов до недавнего времени представлялись довольно простыми, идущими через ряд принципиально общих стадий, приводящих к получению из ничтожного количества посевного материала значительные количества биомассы или биомассы и продуктов метаболизма. Кривая роста - это суммарная часть истории роста культуры. Фазы роста не столько изучались, сколько описывались, и этого уже было достаточно для того, чтобы можно было передавать и изменять по желанию исследователя состояния клеток.

Сведения о том, что происходит с клетками и со средой по ходу роста культуры от посева и до остановки роста и его физиологического состояния не изучалось. Наибольшими достижениями раннего периода изучения роста микроорганизмов были начаты в 30 годы и связаны с изменениями размеров клеток на ранних стадиях, кстати эти вопросы и до сего времени не ясны, затем в 1960 г Шапошников и его школа выяснили двухфазность роста, фаза 1-собственно рост и 2-синтез ряда продуктов метаболизма.

Клетке необходимо реорганизовать свои микро и макромолекулярные структуры. Такая реорганизация может включить синтез и подавление ферментов или структурных компонентов клетки.

Появления системы проточного культивирования имело большое значение как одного из методов микробиологии - выращивание микроорганизмов. Развитие этого метода заставило выяснить, что представляет собой привычный метод периодического культивирования. Периодическая культура начинается с лаг- фазы, которая является совершенно необязательной, ее возникновение зависит от несоблюдения оптимальных условий культивирования, происходит перепад концентраций элементов питания, особенно углеродного, от сниженных в выросшей культуре, из которой берется посевной материал к высоким в свежей среде. Истощения клетки старого посевного материала должны перейти из состояния голодания или отравления продуктами метаболизма в состояние, соответствующее способности к размножению, которое определяется необходимым количеством и состоянием рибосом, способных к репликации хромосом, синтезу клеточной стенки и т.д.

Далее следует экспоненциальная фаза, в наибольшей степени характеризующая и выражающая способность культуры к размножению. В этой фазе сведены к минимуму все лимитирующие и ингибирующие факторы. Компоненты питательной среды имеются в избытке, продукты обмена еще не накопились, рост идет с возможно максимальной скоростью генетически заложенной в клетке. Если же среда по своему составу не оптимально, то рост будет снижен из-за недостатка питательных веществ или неоптимального значения pH и т.д. В этом случае рост имеет быть описан более пологой экспонентой. Эта фаза в лабораторных условиях не может быть очень длительной, так как даже не очень плотная популяция вскоре начинает использовать недостаток кислорода из-за его быстрого поглощения и его слабой растворимости.

Логарифмическая фаза характеризуется сбалансированным ростом, при котором удельная скорость роста постоянна, а зависимость от времени выражается прямой линией. По мере истощения питательных веществ или аккумуляции продуктов метаболизма ингибирующих рост, скорость роста понижается вплоть до нуля и культура переходит в стационарную фазу. Стационарная фаза - следствие равновесия между числом жизнеспособных клеток и мертвых клеток. По мере уменьшения живых клеток и наступления лизиса, культура переходит в фазу отмирания. Подъем кривой после фазы отмирания указывает на возможность критического роста, т.е. роста некоторых клеток за счет продуктов лизиса других клеток. Содержание РНК в клетках возрастает при быстром росте, а содержание ДНК и белка остаются примерно на одном уровне.

Если инокулят взят из старой культуры (в стационарной фазе роста), то клеткам приходится адаптироваться к новым условиям путем синтеза РНК и ферментов, а также образование рибосом. В тех случаях, когда источники энергии и углерода в новой среде отличаются от тех, которые имелись в предшествующей культуре, адаптация к новым условиям может быть связана с синтезом новых ферментов, в которых ранее не было надобности.

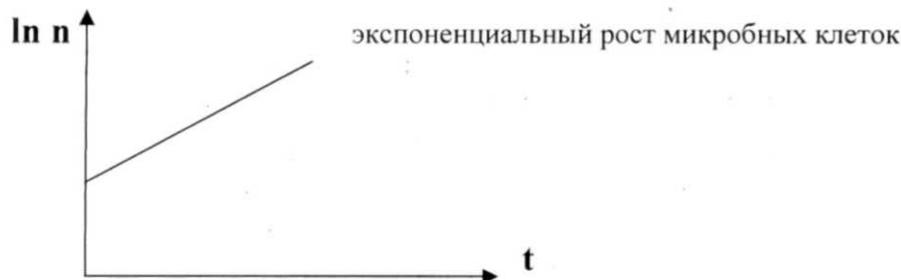
Синтез новых ферментов может индуцироваться новыми субстратами. Хорошим примером действия субстрата на синтез ферментов служит явление так называемое диауксией. Это явление - двухфазный или двуциклический рост - наблюдается на средах, содержащих смесь питательных веществ. *E. coli* из смеси глюкозы с сорбентом поглощает в первую очередь глюкозу. Глюкоза индуцирует в клетках синтез ферментов, необходимых для ее использования и одновременно подавляет синтез ферментов, необходимых для использования сорбентов. Эти последние ферменты образуются лишь после того, как вся глюкоза будет поглощена. Такие регуляторные процессы достаточно хорошо объясняют наличие двух лаг-фаз.

Изменения в составе бактериальной клетки во время лаг-фазы сильнее всего отражается на содержании РНК, которое повышается в 8-12 раз. Также увеличение количества РНК свидетельствует об участии РНК и рибосом в синтезе ферментов.

В период называемый лаг-фазой перестраивается метаболизм клетки, синтезируются ферменты, необходимые для использования новых субстратов, активизируется синтез белка.

Лаг-фаза может быть короткой или достаточно длинной. Когда необходимая реорганизация клеток завершилась, клетки входят в фазу роста, которая имеет несколько периодов. Сначала протекает переходная фаза. Она наступает по достижении клеток определенного объема и сопровождается делением клеток. Здесь происходит репликация ДНК, деление, в результате чего численность популяции увеличивается. Время между двумя последовательными делениями называется временем репарации.

Если на оси абсцисс отложить время t и на оси ординат число клеток $\ln n$, то получится прямая зависимость.



Вопросы для самоконтроля

- 1) Классификация методов культивирования микроорганизмов.
- 2) Общие закономерности культивирования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. **Лапшенков, Г.И.** Введение в инженерные проблемы биотехнологии / Г.И. Лапшенков, Д.Г. Победимский Д.Г. В.И. Швец. Часть 1: Учебное пособие. – М.: МИТХТ им. М.В. Ломоносова, 2009. – 74 с.
2. **Лапшенков, Г.И.** Введение в инженерные проблемы биотехнологии / Г.И. Лапшенков, Д.Г. Победимский, В.И. Швец. Часть 5: Учебное пособие. – М.: МИТХТ им. М.В. Ломоносова, 2010. – 39 с.
3. **Лапшенков, Г.И.** Введение в инженерные проблемы биотехнологии / Г.И. Лапшенков, Д.Г. Победимский Д.Г. В.И. Швец. Часть 7. Глава 7.3: Учебное пособие. – М.: МИТХТ им. М.В. Ломоносова, 2010. – 63 с.
4. **Лапшенков, Г.И.** Введение в инженерные проблемы биотехнологии / Г.И. Лапшенков, Д.Г. Победимский Д.Г. В.И. Швец. Часть 7. Главы 7.1 и 7.2: Учебное пособие. – М.: МИТХТ им. М.В. Ломоносова, 2010. – 68 с.

Дополнительная

1. **Антипова, Л.В.** Пищевая биотехнология. Кн. 1. Основы пищевой биотехнологии: Учебник для вузов / Л.В. Антипова, И.А., Рогов, Г.П. Шуваева. - М.: Издательство "КолосС", 2004. - 440 с.
2. **Бирюков, В.В.** Основы промышленной биотехнологии. Учебное пособие для студентов высших учебных заведений / В.В. Бирюков – М.: Колос, 2004. – 296 с.
3. **Блинов, В.А.** Общая биотехнология. Курс лекций, Ч. 1. / В.А. Блинов – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский ГАУ», 2003. – 92 с.

4. **Глик, Б.** Молекулярная биотехнология. Принципы и применение: Пер. с англ. / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 2002. – 592 с.
5. **Готшалк, Г.** Метаболизм бактерий / Г. Готшалк М.: Мир, 1982 – 310 с.

Лекция 4

КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ РОСТА И ПОТРЕБЛЕНИЯ СУБСТРАТА

4.1. Удельная скорость роста и время удвоения биомассы

Количественно рост статической культуры можно охарактеризовать по весу сухой биомассы, по скорости роста, экономическому коэффициенту.

Рост, подчиняющийся этому закону экспоненциальным или логарифмическим. Основным параметром характеризующим скорость роста служит удельная скорость роста. Остальные параметры могут быть выражены через эту удельную скорость роста.

Время удвоения биомассы.

Справедливость закона экспоненциального роста выполняется, если условия окружающей среды и состав биомассы остаются постоянными. Другими словами, если скорость роста не подчиняется этому закону, то не выполняется либо одно, либо оба из вышеуказанных условий. Наличие экспоненциальной фазы роста хорошо изучено в случае бактериальных и дрожжевых культур, но этот закон универсален прокариот и эукариот при условии, что вышеназванные замечания выполняются. Справедливость закона показала на простейших, животных клетках, на гомогенной перемешиваемой культуре микроскопических грибов. Изменения в окружающей среде чаще всего являются основной причиной, из-за которой не удается поддерживать постоянный экспоненциальный рост. Это неизбежно происходит в периодической культуре - раньше или позже.

4.2. Экономический коэффициент

Важность экономического коэффициента состоит в том, что он выражает количественные потребности организма в субстрате. Было показано, что если внешние условия в бактериальной культуре поддерживаются постоянными, то и экономический коэффициент тоже будет постоянной, количественной величиной. Если X_0 и S_0 начальные концентрации биомассы и субстрата соответственно. А X и S соответствующие концентрации во время роста в культуре, то $X - X_0 = Y(S - S_0)$

Когда биомасса достигнет своего максимума, то концентрация лимитирующего субстрата равна 0. В настоящее время экономический коэффициент используется для характеристики ферментационного процесса, например, как отношение веса клеток к количеству потребленной энергии. Экономический коэффициент не постоянен и зависит от таких биохимических параметров X и или химических (парциальное давление O_2 , C/N , содержание продуктов в среде).

Различают 3 класса экономических коэффициентов:

1 группа: Y_s, Y_{O_2} . Y ккал • Они дают информацию о зависимости выхода биомассы в зависимости от потребленного субстрата, от количества потребленного кислорода и источника энергии (в пересчете на глюкозу, ккал). Они дают информацию о технологическом процессе и следовательно о стоимости и эффективности процесса.

2 группа: Y_c, Y_n, Y_p . Описывают потребность микроорганизмов в биогенах, т.е. дают описание анаболизма, катаболизма и анфиболизма.

3 группа: Y_{atf} Описывает энергетические отношения в клетке.

4.3. Метаболический коэффициент

Существование фазы экспоненциального роста в периодической культуре доказывает, что скорость роста может быть в довольно широких пределах не зависеть от концентрации субстрата и тогда можно предположить, что кинетика потребления субстрата будет соответствовать кинетике ферментативной реакции.

Для любой культуры максимальная плотность биомассы (г/см^3) может быть в данной среде одним из 4 условий:

1. Количеством лимитирующего субстрата в среде
2. Накоплением ингибирующего продукта
3. Максимальной плотностью упаковки биомассы
4. Отмиранием клеток

Было показано, что максимальная плотность бактерий в культуре определяется требованиями к «жизненному» или биологическому пространству. Можно полагать, что это жизненное пространство может быть в значительной степени концентрацией компонента среды (особенно кислорода).

Господствовало мнение, что происходит «контактное угнетение». Однако, когда клеткам после «контактного угнетения» при их же плотности была добавлена свежая среда, наблюдался рост в форме многослойной культуры. У других клеток, рост которых прекратился после контакта, установлено ингибирование, обусловленное образованием кислот. Если в популяции нет ингибирования роста и она остается жизнеспособной и с помощью диффузии через полупроницаемую мембрану осуществляется доставка питательных веществ. Тогда концентрация биомассы будет ограничена только возможной плотностью упаковки организмов или клеток в биомассе. Такое предельное состояние устанавливается в животных и растительных тканях.

Вопросы для самоконтроля

- 1) Понятие удельной скорости роста.
- 2) Определение времени удвоения биомассы.
- 3) Экономический коэффициент.
- 4) Метаболический коэффициент.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. **Лапшенков, Г.И.** Введение в инженерные проблемы биотехнологии / Г.И. Лапшенков, Д.Г. Победимский, Д.Г. В.И. Швец. Часть 1: Учебное пособие. – М.: МИТХТ им. М.В. Ломоносова, 2009. – 74 с.

2. **Лапшенков, Г.И.** Введение в инженерные проблемы биотехнологии / Г.И. Лапшенков, Д.Г. Победимский, В.И. Швец. Часть 5: Учебное пособие. – М.: МИТХТ им. М.В. Ломоносова, 2010. – 39 с.

3. **Лапшенков, Г.И.** Введение в инженерные проблемы биотехнологии / Г.И. Лапшенков, Д.Г. Победимский, Д.Г. В.И. Швец. Часть 7. Глава 7.3: Учебное пособие. – М.: МИТХТ им. М.В. Ломоносова, 2010. – 63 с.

4. **Лапшенков, Г.И.** Введение в инженерные проблемы биотехнологии / Г.И. Лапшенков, Д.Г. Победимский Д.Г. В.И. Швец. Часть 7. Главы 7.1 и 7.2: Учебное пособие. – М.: МИТХТ им. М.В. Ломоносова, 2010. – 68 с.

Дополнительная

1. **Антипова, Л.В.** Пищевая биотехнология. Кн. 1. Основы пищевой биотехнологии: Учебник для вузов / Л.В. Антипова, И.А., Рогов, Г.П. Шуваева. - М.: Издательство "КолосС", 2004. - 440 с.

2. **Бирюков, В.В.** Основы промышленной биотехнологии. Учебное пособие для студентов высших учебных заведений / В.В. Бирюков – М.: Колос, 2004. – 296 с.

3. **Готшалк, Г.** Метаболизм бактерий / Г. Готшалк М.: Мир, 1982 – 310 с.

Лекция 5

ОТКРЫТЫЕ И ЗАКРЫТЫЕ СИСТЕМЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

5.1. Открытые и закрытые системы

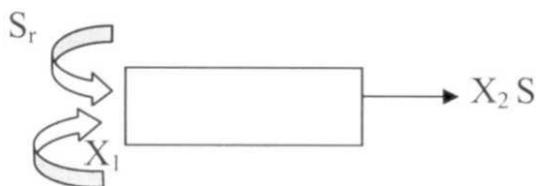
Культуры микроорганизмов можно получать выращиванием их в «открытых» и «закрытых» *системах*. Открытая система - это система, все компоненты которой (субстрат, инокулят, кислород и т.д.) могут поступать в систему и покидать ее. Закрытой системой называют такую систему, в которой хотя бы один компонент из существующих не может поступать в систему, ни покидать ее. Следовательно открытыми системами являются непрерывные культуры, в которых происходит с одной стороны приток питательной среды, а с другой отток биомассы и других продуктов.

К закрытой системе относится простая периодическая культура, содержащая ограниченное количество первоначального питательного субстрата. В закрытой системе скорость роста биомассы должна стремиться к нулю, либо из-за недостатка субстрата, либо из-за продукта при его дальнейшем накоплении. Следовательно, такие системы всегда находятся в неустойчивом состоянии. В отличие от них, в открытых системах всегда есть возможность баланса скорости превращения субстрата в продукты и биомассу со скоростью выхода и установления стационарного состояния.

Метод проточного культивирования пришел в микробиологию из химической технологии. Принцип проточного культивирования состоит в том, что в сосуд, где размножаются микроорганизмы непрерывно подается свежая питательная среда и одновременно вытекает такой же объем культуры.

5.2. Процесс полного вытеснения и процесс полного смешения

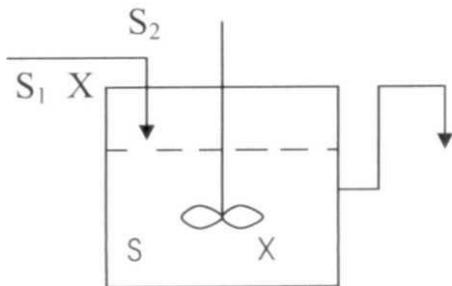
В первом случае сосуд для выращивания представляет собой трубку (тубулярный ферментер) в который втекает среда и посевной материал и где S_r - концентрация субстрата в поступающей среде; X_1 - концентрация подаваемой популяции; X_2 - концентрация вытесняемой культуры.



У одного конца ферментера, куда подается среда и культура, клетки расходятся в начале своего развития. По ходу прохождения ферментера культура «стареет», исчерпывается субстрат, накапливается продукт метаболизма и перед вытеснением культура находится в состоянии аналогичном стационарной фазе роста периодической культуры, т.е. в ферментере такого типа воспроизводится полная кривая роста и во времени и в пространстве. Пример применения такого ферментера является производство нива в проточных емкостях. Эта же картина отмечается и в батарее проточных ферментеров. Этот способ применяется при производстве этилового спирта, где весь процесс ведется в последовательном соединении 10-12 ферментеров.

2. *Процесс полного смешения (или выращивание в хемостате)*. Рост культуры происходит в емкости - ферментере при интенсивном перемешивании с помощью мешалки или продуванием воздуха и иногда используют оба приема. Во всей массе культуры создается одинаковые условия и метод называют гомогенно-непрерывным или гомо-

генно-проточным. В ферментере создаются условия соответствующие одной точке кривой роста.



При быстром протоке среды эти условия близки к экспоненциальному росту при медленном условии стационарной фазы. При этом методе могут быть воспроизведены любые периодические культуры от начала замедления роста после экспоненциальной фазы и до конца стационарной.

В этом режиме скорость протока среды равняется удельной скорости роста культуры. При этом культура находится в устойчивом стационарном состоянии динамического равновесия и обладает способностью автоматически подстраиваться к изменениям условий. Если условия меняются таким образом, что рост ускорится то ферментере повысится плотность популяции и установится новое стационарное состояние. Если рост замедлится, рост популяции снизится. Если изменение условий будут временные, то при возвращении к исходным условиям установится исходное стационарное состояние. На изменение скорости протока культура реагирует соответствующим изменением плотности популяции и остаточной концентрацией лимитирующего субстрата на выходе из стационарного состояния. Если условия культивирования в проточной культуре неизменны, то плотности популяций и остаточные концентрации лимитирующего субстрата всего воспроизводимы, тем не менее если состояние культур -максимальная скорость роста, то устойчивость системы маловероятна, поскольку незначительное повышение скорости протока или воздействие замедляющее рост культуры приводит к вымыванию культуры из реактора.

Воспроизведение в потоке определяют по точке кривой роста (т.е. состояние культуры), широко используется в промышленной микробиологии. В потоке всем и это экономически оправдано поскольку культура всегда в тах активности, нет траты времени на освобождение емкостей и времени на лаг- фазу. (Используя батарею ферментаторов можно в каждом аппарате поддерживать продуцент в определенной фазе размножения. Такое культивирование применяют для получения белковых препаратов, кормовых дрожжей, лимонной кислоты и т.д.)

Если в периодическом процессе не учитываются лимитирующие и ингибирующие и все это переносится и в проточный вариант. Эта неопределенность останется и в этом процессе. При разных скоростях протока рост может быть отражен разными факторами. Недостаток одного элемента питания при одной скорости смениться недостатком другого элемента при другой и все это без ведома экспериментатора.

Вопросы для самоконтроля

- 1) Понятие открытые и закрытые системы.
- 2) Процесс полного вытеснения и полного смешивания.

.СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. **Лапшенков, Г.И.** Введение в инженерные проблемы биотехнологии /Г.И. Лапшенков, Д.Г. Победимский Д.Г. Швец В.И.. Часть 1: Учебное пособие. – М.: МИТХТ им. М.В. Ломоносова, 2009. – 74 с.

Дополнительная

1. **Антипова, Л.В.** Пищевая биотехнология. Кн. 1. Основы пищевой биотехнологии: Учебник для вузов /Л.В. Антипова, И.А. Рогов, Г.П. Шуваева. - М.: Издательство "КолосС", 2004. - 440 с.

2. **Бирюков, В.В.** Основы промышленной биотехнологии. Учебное пособие для студентов высших учебных заведений / В.В. Бирюков – М.: Колос, 2004. – 296 с.

3. **Блинов, В.А.** Общая биотехнология. Курс лекций, Ч. 1. / В.А. Блинов – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский ГАУ», 2003.– 92 с.

4. **Готшалк, Г.** Метаболизм бактерий / Г. Готшалк М.: Мир, 1982 – 310 с.

5. **Манаков, М.Н.** Теоретические основы технологии микробиологических производств / М.Н. Мананков, Д.Г. Победимский- М.: Агропромиздат, 1990. - 272 с.

Лекция 6

НЕПРЕРЫВНОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

6.1. Хемостатный метод культивирования был изобретен и теория обоснована в 1950г Моно во Франции и Новиком и Сцилардом в Америке. Теория хорошо разработана. Она исходит из того, что рост культуры ограничивает один компонент среды и позволяет доказать зависимость между скоростью роста, плотностью популяции и концентрацией лимитирующего субстрата в среде выращивания. Рост культуры характеризуется хемостатной кривой изображающей зависимость плотности популяции и концентрации субстрата S от скорости разбавления P .

Удельная скорость μ это прирост биомассы в единицу времени и имеет размерность час⁻¹.

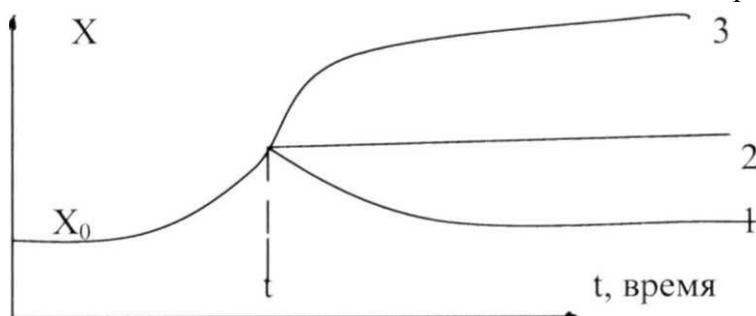


Рост микроорганизмов в хемостате описывается хемостатной кривой, изображающей зависимость X от S и P .

Эта кривая получена при культивировании микроорганизмов на синтетических средах. Пример: культура *Candida utilis* растет на синтетической среде с глицерином в качестве лимитирующего фактора.

Во многих случаях хемостатная кривая отличается от теоретической. Это происходит при изменении характера метаболизма с изменением скорости роста факультативных аэробов способных к брожению. При высоких значениях P проявляются бродильные функции, а при низких — окисление субстрата.

Рассмотрим культуру, в которой рост биомассы будет лимитирован количеством одного — единственным субстратом S , а все остальные остаются в избытке. Можно предположить, что при задержке на первом этапе свежей среды, происходит рост биомассы как в периодической культуре. После включения протока рост культуры будет происходить в соответствии с одним из 3 возможных вариантов.

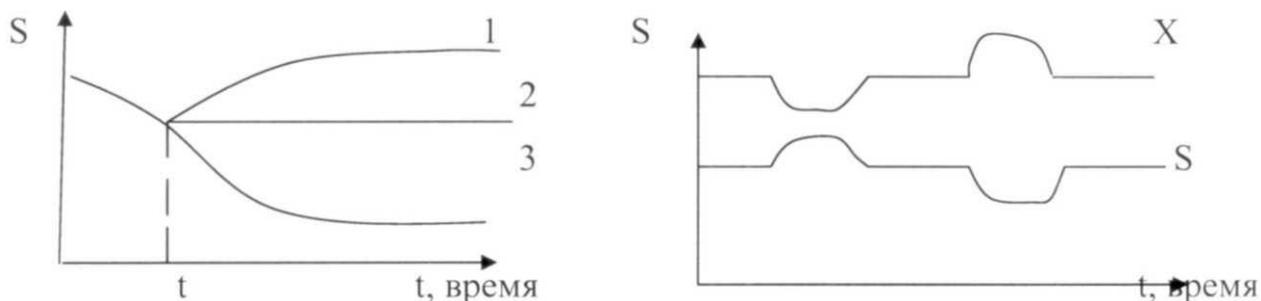


1 - скорость вымывания биомассы больше скорости роста и концентрация биомассы будет падать;

2- начальная скорость вымывания биомассы будет точно равна скорости роста; при этом микроорганизмы будут расти с их максимальной удельной скоростью роста и ус-

становится стационарное состояние, при котором концентрации биомассы и лимитирующего субстрата остаются постоянными. Однако это состояние не будет устойчивым, поскольку любое временное изменение условий влияющее на концентрацию биомассы и субстрата приведет к непрерывному изменению этих концентраций.

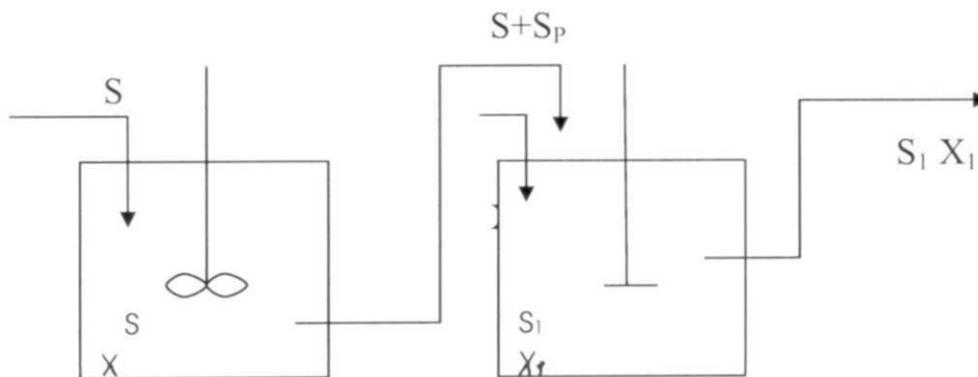
3 - третья возможность осуществиться, если скорость вливания в начале будет меньше максимальной скорости роста и тогда концентрация биомассы будет непрерывно увеличиваться. Однако лимитирующее действие субстрата не позволит увеличить удельную скорость и тогда скорость роста биомассы будет равна скорости вымывания.



Последствия возмущения стационарного состояния во времени представлены на графике.

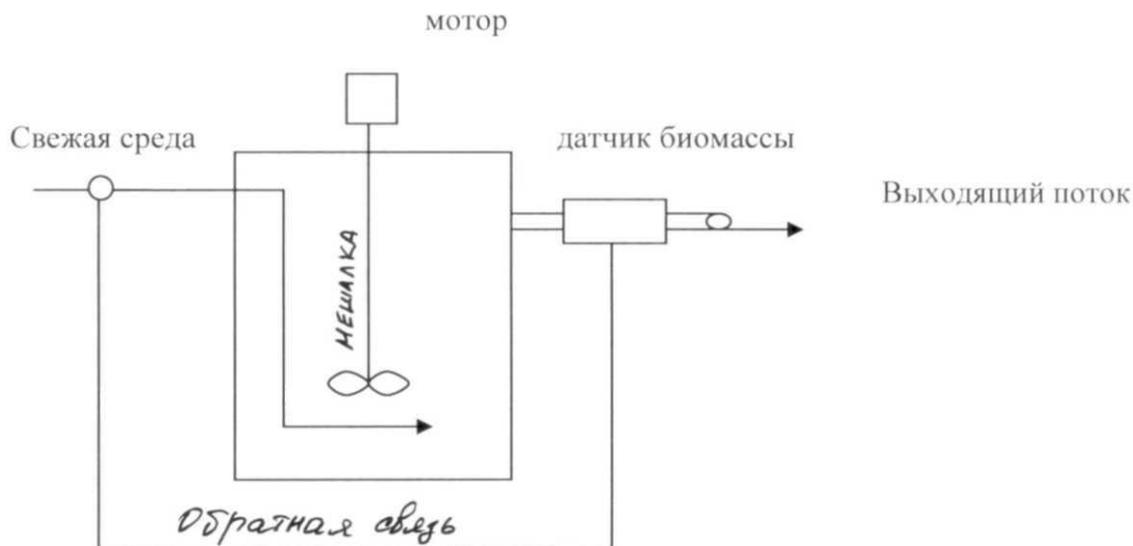
6.2. Варианты хемостатного культивирования

Хемостатный метод имеет большое количество вариантов. Одностадийное культивирование применяется при необходимости воспроизвести любую скорость роста кроме максимальной. Двухстадийное культивирование в двух последовательных ферментерах позволяет наблюдать культуры при максимальной скорости роста и создавать условия для ее проведения. При этом в первом ферментере ведется нормальное культивирование при $P < i$, пах и во второй подается свежая культура из первого и еще свежая среда.



Максимальная скорость роста может быть достигнута при турбидостатном культивировании, которое является вариантом хемостатного, когда скорость протока среды устанавливается не экспериментатором, а автоматически по сигналу оптической плотности.

6.3. Схема турбидостата



Для этой цели в ферментер устанавливают нефелометр - т.е. производится измерение мутности и по его сигналу производится регулирование скорости потока среды так, чтобы мутность оставалась постоянной. Этот метод позволяет поддерживать культуру в устойчивом состоянии на границе вымывания из ферментера, так как при снижении плотности популяции среда перестает подаваться. Турбидостат дает возможность изучать влияние внешних факторов на максимальную скорость роста и на состояние клеток. Это довольно сложно и применяется достаточно редко из-за сложности.

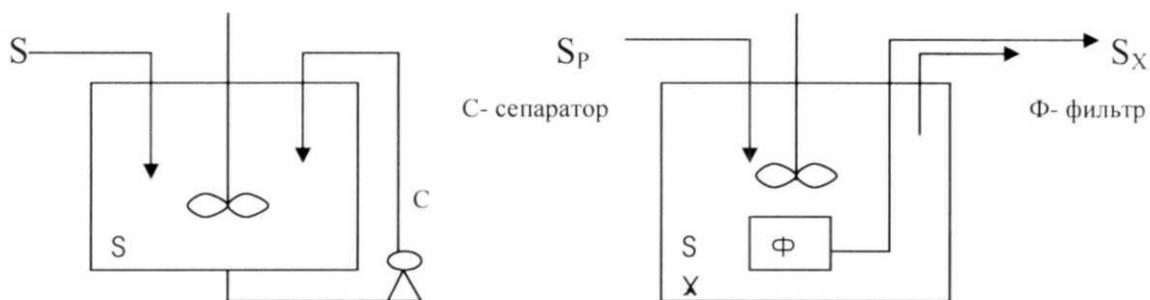
В двухстадийной системе во втором ферментере можно воспроизвести период, в котором происходит синтез вторичных метаболитов с большой производительностью, чем в одностадийном хемостате. В первом хемостате ведется выращивание культуры при большой скорости роста, а во втором ферментере условия замедляющие рост большого размера концентрации или содержит большое количество разведенной среды и поэтому поступающая из первого ферментера культура оказывается в условиях замедления роста и это соответствует условиям синтеза вторичных метаболитов.

3 вариант. При низкой концентрации субстрата и при низкой плотности популяции можно вернуть в ферментер часть вытекающей из него биомассы и повысить ее концентрацию и ускорить процесс. Имеется несколько вариантов возврата биомассы:

1. Сепарируют вытекающую культуру и концентрированную часть подают в ферментер.

2. Устанавливают различные фильтрующие устройства, позволяющие вытекать культуральной жидкости не задерживающие клетки.

Имеется ряд методов культивирования, занимающие промежуточное положение между непрерывным и периодическим культивированием.



1 .Отъемно-доливной метод. Среда подается порциями и порциями выходит из ферментера.

2.Метод добавления питания к периодической культуре без отъема культуры. Если таким образом добавлять источник углерода, то не наблюдается лимитация углеродом и культура более полно использует все имеющиеся в среде элементы питания. Такой способ культивирования называют «предельной» культурой.

6.4. Изучение влияния внешних факторов на микроорганизмы в переходном состоянии от одного стационарного состояния в хемостате к другому. Если к культуре , находящейся в стационарном состоянии в хемостате резко, за минуту изменить состав среды, например, добавить ингибитор, то культура переходит в новое состояние . Изучение этого физиологического состояния во время перехода в течении минуты позволяет получить данные о реакции клеток на этот фактор. Таким образом можно изучить влияние различных факторов. Преимуществом изучения переходных состояний в хемостате является то, что на культуру действует только изменение одного фактора при полном постоянстве остальных. Этот метод изучения влияния внешних факторов на физиолого- биохимические свойства микроорганизмов находит широкое применение на процессах при отладке производства.

6.5. Аппаратура. Хемостатный метод культивирования требует сложного оборудования. Современные лабораторные установки состоят из следующих частей:

ферментер емкостью 0,5-2,0 л с регулирующим обогревом. Аэрация осуществляется при помощи перемешивания мешалкой с регулирующим числом оборотов и с регулированием подачи воздуха. Ферментер снабжен электродом pH с устройством для автоматического поддержания заданного уровня и электродом для измерения насыщения среды кислородом. Показания датчиков t, pH, O₂ регистрируются самописно. Для подачи среды насос и насосы для подачи других инфедентов. Нефелометрическое устройство для работы в режиме турбидостата. Иногда содержания O₂ и CO₂ в отходящем газе. Такая установка позволяет решать многие задачи.

Требования к ферментационным установкам:

- 1 .Они должны быть недорогие и экономически выгодные в работе;
- 2.Обеспечивать гомогенность содержимого ферментера по 1, O₂, плотности популяции;
- 3.Пригодная для периодического и непрерывного культивирования;
- 4.Пригодность для создания аэро и анаэробноза;
- 5.Пригодность для создания многостадийного комплекса;
- 6.Способной длительно действовать при минимальном уходе;
- 7.Допускать возможность измерения max числа параметров;
- 8.Удобной для отбора проб;

9. Приспособленной для подавления пенообразования;

Для многих целей достаточно бывает простых установок, выполненных из стекла с перемешиванием воздуха и подачей среды самотеком с регулированием скорости протока изменением уровней жидкостей.

Аппаратурное оформление процессов непрерывного культивирования имеет тенденцию к усложнению. За счет увеличения числа регулируемых и регистрируемых параметров. Установки позволяют автоматически поддерживать не только заданные условия, но и оптимизировать эти условия на основании показаний различных датчиков. В этом случае в комплекс вводятся управляющие в системах компьютеры.

Некоторые условия хемостатного культивирования в стендовой установке.

1. Ферментер, подготовленный к работе, стерилизуется в автоклаве и электроды, не выдерживающие автоклавирования, стерилизуют химическими реагентами (спирт, перекись, ультрафиолет и т.д.)

2. Производится посев и ведется наблюдение за ростом культуры. После достижения экспоненциальной фазы роста, включается проток среды. Отток культуры ведется через сливную трубку так, чтобы вытекал нижний слой. Слив с верхнего слоя осложняется вспениванием и концентрированием клеток в пене. Стационарное состояние при данной скорости протока считается установившемся. Если плотность популяции не изменяется в течении 5-7 периодов генерации.

3. Культура сливается в емкости охлаждения в сосуде Дьюари, чтобы приостановить всякие изменения в клетках. При длительном исследовании имеются помехи, которые обрастают мешалки и стенки ферментера клетками микроорганизмов. Поэтому мало исследований на фибрах и актиномицетах, склонных к образованию обрастаний.

4. Не рекомендуется вести культивирование более 4 недель из-за возможного появления и развития популяций, спонтанных мутантов и поэтому засев хемостата всегда проводится коллекционной культурой, но не хемостатной.

6.6. Преимущества и особенности хемостатного культивирования

Как уже сообщалось метод хемостатного культивирования позволяет воспроизвести фазы замедленного роста, во время которой быстро изменяются условия и состояние культуры. Она представляет большой теоретический и практический интерес, т.к. именно в этой фазе выращенная биомасса лишается возможности к дальнейшему росту из-за того или иного лимитирования или ингибирования, то ее богатый ферментный аппарат и субстрат позволяют ей вести энергетические и конструктивные процессы, но с учетом недостатка отдельных элементов питания или из-за ингибирования. Эти переходные состояния не поддаются изучению в периодической культуре и могут как бы задержаны, приостановлены при хемостатном культивировании и изучены всесторонне. Хемостатный метод культивирования позволяет установить любые физиологические состояния клеток в фазе замедления роста, тщательно изучить действие недостатка любого элемента питания или ингибитора. При этом клетки могут быть подвергнуты действию этих факторов в любой степени - от едва заметного замедления роста (почти экспоненциальной фазы) до глубокого, когда проток среды и следовательно рост сильно замедлен. При непрерывном хемостатном культивировании любая, большая или малая скорость протока среды и следовательно скорость роста могут быть установлены на любое время и связанное с этим длительное или короткое время пребывания клеток в

ферментере обеспечивает длительное или коротковременное влияние изучаемого фактора.

Может быть обеспечена любая степень аэрации. Тем более, что можно работать при низких плотностях популяции, которые легко обеспечить при подаче воздуха с низкой интенсивностью. Но аэрация должна быть определенной, охарактеризованная сульфитным числом и контролируемая кислородным датчиком. Количество O_2 должно быть в избытке, чтобы не стать для аэробов лимитирующим фактором при изменении условий в ферментере. Для аэробных микроорганизмов достаточно 5-10 % от насыщения среды кислородом.

Хемостатное культивирование позволяет применять все биохимические и химические методики для исследования физиологического состояния не только микробных, но и растительных и животных клеток, изучить их реакции на любые факторы среды. Изучение поведения клеток в зависимости от окружающих условий имеет громадное значение для управляемого культивирования и направления физиологических процессов клетки в желаемую сторону.

6.7. Общие особенности непрерывного культивирования

1. В хемостате может быть получено и поддержано длительное время-недели и месяцы - стационарное равновесное состояние культуры, при котором она испытывает недостаток по любому выбранному исследователем элементу питания, и можно установить любую степень этого лимита в зависимости от скорости протока.

2. При проверке состава среды для культивирования должны быть установлены зависимости, показывающие, что повышение концентрации лимитирующего элемента приводит к пропорциональному повышению плотности популяции. Добавка любого другого элемента питания не влияет на плотность популяции.

3. Плотность популяции, при которой ведется выращивание должна быть обеспечена кислородом так, чтобы не определялась лимитация по O_2

4. При лимитации углеродом облигатных аэробов, хемостатная кривая должна иметь классический характер. Если она имеет другой вид, то имеется либо смена характера метаболизма, так при увеличении скорости протока отмечают неполное окисление субстрата, что приводит к снижению плотности популяции. Если хемостатная кривая имеет отличный от классической вид, то выяснение причин приводит к выявлению новых физиологических особенностей культуры.

5. Хемостатный способ позволяет выяснять влияние внешних факторов на физиологическое состояние микроорганизмов. При медленном протоке клетки длительное время пребывают в хемостате. При быстром протоке клетки находятся в ферментере короткое время и фактор снижается.

6. Автоингибиторы образующие культуры могут быть факторами определяющим стационарное состояние. Концентрация субстрата подбирается с учетом, что из него образуется ингибитор и последний определяет степень роста культуры

7. Изучение влияния ингибирующих скорость роста условий требует применения «острых опытов». Различные варианты изучения кинетики роста методами «острых опытов» могут дать довольно значительную информацию о характере действия ингибиторов. В соответствии с Государственным образовательным стандартом высшего профессионального образования, утвержденным Госкомитетом по высшему образованию при подготовке инженера по специальности 070100-Биотехнология, Вы должны прослушать курс лекций, обработать лабораторные занятия по дисциплине «Теоретические

основы биотехнологии». На дисциплину отводится 186 часов, в том числе аудиторные - 90, из них лекционные 40, лаб.занятия - 50, форма итогового контроля - экзамен (1 семестр).В лекционном материале Вы познакомитесь с основными количественными характеристиками роста и продуктивности микроорганизмов, метаболическими процессами и биохимией микроорганизмов, механизмами регуляции накопления полезного продукта. На практических занятиях Вы познакомитесь подготовкой питательных сред, основами культивирования аэробных и анаэробных бактерий, количественной характеристикой идентификации микроорганизмов, рассмотрите процессы роста молочнокислых микроорганизмов, расположением клетчатки и пектиновых веществ.

Вопросы для самоконтроля

- 1) Схема хемостата.
- 2) Схема турбидостата.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. **Лапшенков, Г.И.** Введение в инженерные проблемы биотехнологии /Г.И. Лапшенков, Д.Г. Победимский Д.Г. Швец В.И.. Часть 1: Учебное пособие. – М.: МИТХТ им. М.В. Ломоносова, 2009. – 74 с.

Дополнительная

1. **Антипова, Л.В.** Пищевая биотехнология. Кн. 1. Основы пищевой биотехнологии: Учебник для вузов /Л.В. Антипова, И.А. Рогов, Г.П. Шуваева. - М.: Издательство "КолосС", 2004. - 440 с.

2. **Бирюков, В.В.** Основы промышленной биотехнологии. Учебное пособие для студентов высших учебных заведений / В.В. Бирюков – М.: Колос, 2004. – 296 с.

3. **Блинов, В.А.** Общая биотехнология. Курс лекций, Ч. 1. / В.А. Блинов – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский ГАУ», 2003.– 92 с.

4. **Готшалк, Г.** Метаболизм бактерий / Г. Готшалк М.: Мир, 1982 – 310 с.

5. **Манаков, М.Н.** Теоретические основы технологии микробиологических производств / М.Н. Мананков, Д.Г. Победимский- М.: Агропромиздат, 1990. - 272 с.

Лекция 7

РЕГУЛЯЦИЯ КЛЕТОЧНОГО МЕТАБОЛИЗМА

7.1. Методы регуляции проницаемости мембран

Наряду с метаболической регуляцией клетки обладают еще одним регуляторным механизмом, в основе которого лежат эффекты проницаемости клеточных мембран.

Если метаболическая регуляция предотвращает сверхпродукцию низкомолекулярных и высокомолекулярных метаболитов важных для жизнедеятельности клетки, цитоплазматическая мембрана как основной барьер проницаемости позволяет клетке удерживать концентрированные растворы этих веществ и селективно переносить внутрь, те из них, которые являются элементами питания. Транспорт питательных веществ осуществляется механизмами, которые мы относительно хорошо знаем, это:

Пассивная диффузия, облегченная – это путь также идет без затрат энергии, активный транспорт - идет с затратами энергии. Степень накопления иногда до 10000. Сложные перемещения системы, осуществляющие процессы переноса во многих случаях контролируются индукцией или репрессией, поскольку одновременное образование всех пермеаз может оказаться для клетки истощающими, именно таким путем клетка отбирает из окружающей среды лактозу и галактозу.

Групповое перемещение – перенос через мембрану сопровождается реакцией обмена группами атомов и требует затрат энергии. Переносимое растворенное вещество, например, сахар, химически модифицируется (фосфорелируется) на стадии перехода молекул через мембрану и поступая в клетку, присутствует в ней в виде сахарофосфата. Перенос фосфатных групп происходит с участием белков, связывающих субстрат и ферментов, катализирующих образование сахарофосфата. Именно таким путем бактерии отбирают глюкозу, фруктозу и другие углеводы, т.е. посредством системы известной как фосфофенолпириват-зависимая фосфотрансфераза.

С помощью мутаций или изменения состава питательной среды может быть изменена проницаемость клеточной мембраны. Последнее реализуется при культивировании микроорганизмов в среде дефицитной по биотина, либо при добавлении в среду антибиотиков или детергентов.

Пример, для получения большого количества глютаминовой кислоты необходимо облегчить ее выход из клетки в среду. Если создать дефицит биотина или добавить в среду пенициллин или производные жирных кислот (стеарат, пальмитат) происходит облегченная диффузия аминокислоты в среду. Такая «утечка» стимулирует постоянный синтез аминокислоты. При отсутствии дефекта проницаемости высокие концентрации глютаминовой кислоты (до 50 мг/г в пересчете на СВ) ингибируют глютаматдегидрогеназу, катализирующую превращение α-кетоглutarовой кислоты в глютаминовую и накопление последней прекращается.

Добавление регуляторов проницаемости - биотина (1-5 мкг/л), пенициллина (2-4 мкг/л), детергентов в экспоненциальной фазе роста позволяет метаболиту «выходить» из клетки, вследствие чего внутриклеточный уровень аминокислоты быстро снижается до 5 мг/г в пересчете на СВ. Биотин контролирует проницаемость мембран путем влияния на биосинтез жирных кислот, что вызывает снижение содержания фосфолипидов в клеточных мембранах микроорганизмов продуцентов. Повышение концентрации био-

тина более 5мг/л способствует увеличению скорости роста биомассы бактерий и практически устраняет выделение аминокислоты в среду.

Способы преодоления барьера проницаемости их тел ограничения роста микроорганизмов биотипом или выделением из клеток фосфолипидов при добавлении пенициллин используют для синтеза микробных метаболитов, когда последние выходят из клеток и не могут далее служить внутриклеточными предшественниками других метаболитов.

Вопросы для самоконтроля

- 3) Пассивная диффузия.
- 4) Транслокация групп.
- 5) Регуляторы проницаемости мембран.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. **Лапшенков, Г.И.** Введение в инженерные проблемы биотехнологии /Г.И. Лапшенков, Д.Г. Победимский Д.Г. Швец В.И.. Часть 1: Учебное пособие. – М.: МИТХТ им. М.В. Ломоносова, 2009. – 74 с.

Дополнительная

1. **Антипова, Л.В.** Пищевая биотехнология. Кн. 1. Основы пищевой биотехнологии: Учебник для вузов /Л.В. Антипова, И.А. Рогов, Г.П. Шуваева. - М.: Издательство "КолосС", 2004. - 440 с.

2. **Бирюков, В.В.** Основы промышленной биотехнологии. Учебное пособие для студентов высших учебных заведений / В.В. Бирюков – М.: Колос, 2004. – 296 с.

3. **Блинов, В.А.** Общая биотехнология. Курс лекций, Ч. 1. / В.А. Блинов – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский ГАУ», 2003. – 92 с.

4. **Готшалк, Г.** Метаболизм бактерий / Г. Готшалк М.: Мир, 1982 – 310 с.

5. **Мананков, М.Н.** Теоретические основы технологии микробиологических производств / М.Н. Мананков, Д.Г. Победимский - М.: Агропромиздат, 1990. - 272 с.

Лекция 8

ОСНОВЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ И МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГЕНЕТИКИ

Возникновение генетической инженерии связано прежде всего с развитием молекулярной биологии. Исследования, проведенные в этой области за последние десятилетия, позволили перейти от описания структуры и функции клеток на уровне органелл к установлению молекулярных механизмов протекающих в них процессов. В конце 60-х годов многие исследователи считали, что молекулярные механизмы фундаментальных генетических процессов - репликации, транскрипции, трансляции, а также система их регуляции в основном изучены. Стройное, логичное здание молекулярной биологии, казалось, было в основном построено. Схема, показывающая строго однонаправленный поток генетической информации, ДНК - РНК - белок, была названа основной догмой молекулярной биологии и свидетельствовала о незыблемости возведенного здания. Правда, основные положения этой схемы были в основном показаны для кишечной палочки *Escherichia coli*, которая является прокариотическим организмом, не имеющим истинного ядра. Однако логичность и простота схемы давала возможность считать ее универсальной для всего живого, в том числе и для эукариотических организмов, имеющих ядро, к которым относятся: животные и человек. Однако, несмотря на несомненные успехи молекулярной биологии прокариот, геном сложных организмов был практически недоступен для анализа. Изучение общих биохимических свойств клетки не давало надежды на установление деталей генетической организации: слишком велики были геномы эукариотических организмов и слишком сложно было проводить с ними какие-либо эксперименты. Для этого необходимо было, как минимум, научиться «разрезать» ДНК не в случайных, а в строго определенных местах, с точностью до одного нуклеотида. Возникла и другая проблема - невозможность определения последовательности нуклеотидов в ДНК. Не было выделено ни одного гена, не была расшифрована структура гена. Одна из причин такой ситуации заключается в том, что даже простейшие организмы содержат очень длинные молекулы ДНК (геном кишечной палочки составляет $4,2 \cdot 10^6$ н. п.), а геном высших эукариот, в том числе растений и млекопитающих, содержит $10^9 - 10^{11}$ н. п. В геноме содержится несколько десятков тысяч генов.

Сейчас генетическая инженерия позволяет вводить в ядерный аппарат реципиента не только отдельные новые гены и регуляторные последовательности, исходно не присущие данному организму, но и получать новые формы организмов, путем введения целых хромосом, отдельных органелл или слияния двух клеток.

8.1. Ферменты генетической инженерии

Ферменты генетической инженерии - это ферменты, позволяющие проводить различные манипуляции с молекулами ДНК: разрезать в определенных местах, соединять различные по происхождению фрагменты, синтезировать новые, не существующие в природе последовательности, и т. д. Рассмотрим основные ферменты генетической инженерии.

ДНК-полимеразы. Одним из наиболее часто используемых в генетической инженерии ферментов является ДНК-полимераза I, выделенная из *E. coli* или фага T4. ДНК-полимераза I обладает способностью удлинять цепь ДНК в направлении 5'-3' путем присоединения комплементарного нуклеотида. Это свойство ДНК-полимераз используется в генной инженерии для построения второй комплементарной цепи: при добавлении фермента к одноцепочечной ДНК-матрице в присутствии праймера произойдет ее удвоение.

Экзонуклеазная активность ДНК-полимераз используется для введения радиоактивной метки во фрагмент ДНК.

ДНК-лигаза осуществляет одну функцию - соединение фрагментов ДНК путем восстановления фосфодиэфирных связей между соседними нуклеотидами. Этот процесс называется лигированием. Наиболее часто для лигирования в генной инженерии используют ДНК-лигазу фага Т4. С помощью лигазы Т4 соединяют любые фрагменты ДНК с любыми концами: «липкими» или «тупыми». Это один из наиболее часто используемых ферментов.

Нуклеазы - это большая группа ферментов, катализирующих реакцию гидролиза молекул нуклеиновых кислот. В результате действия нуклеаз молекула ДНК или РНК распадается на фрагменты или отдельные нуклеотиды. Исходная функция нуклеаз в клетке - деградация ненужных в данный момент жизнедеятельности молекул (например, деградация мРНК после трансляции) и защита от чужеродных молекул нуклеиновых кислот (расщепление фаговой ДНК бактериальными нуклеазами при заражении бактерии фагом).

Нуклеазы по типу их действия можно поделить на группы. Нуклеазы могут действовать только на молекулы ДНК (ДНКазы) или РНК (РНКа-зы), либо на молекулы и ДНК, и РНК одновременно (нуклеаза золотистой фасоли). Нуклеазы избирательно могут действовать на одноцепочечную (нуклеаза S1), или двуцепочечную (экзонуклеаза III) молекулы ДНК, или на гибридную ДНК - РНК-молекулу (рибонуклеаза H).

Кроме того, нуклеазы можно разделить на два типа: на *экзонуклеазы* и *эндонуклеазы*. Экзонуклеазы обычно гидролизуют молекулы с 5'- или 3'-свободных концов, а эндонуклеазы могут расщеплять внутри последовательности фрагмента или кольцевой молекулы ДНК.

Рестриктазы. Отдельную группу, особенно с утилитарной точки зрения ее применения в генной инженерии, представляют специфические эндонуклеазы-*рестриктазы*.

К настоящему времени из разных микроорганизмов выделено более тысячи различных рестриктаз. В генетической инженерии наиболее широко используются около 200. Рестриктазы представляют собой особый класс эндонуклеаз, которые гидролизуют ДНК строго по определенным специфическим последовательностям, называются *сайтами рестрикции*. Каждая из рестриктаз узнает свой сайт рестрикции и разрезает ДНК либо внутри последовательности сайта рестрикции, либо в непосредственной близости от него. Обозначение рестриктаз складывается из начальных букв латинского названия вида бактерий, из которого был выделен фермент, и дополнительного обозначения, так как из бактерий одного вида может быть выделено несколько различных рестриктаз: *Escherichia coli*— *EcoR I*, *EcoR V*, *Haemophilus Influenzas* - *Hinf I*, *Sreptomycetes albus* - *Sal I*, *Thermus aquaticus*- *Taq I*.

Рестриктазы делятся на несколько типов по характеру расщепления нуклеотидной последовательности. Рестриктазы I типа узнают сайт рестрикции, но расщепляют последовательность ДНК на произвольном расстоянии (от нескольких десятков до нескольких тысяч пар нуклеотидов) от сайта узнавания. Такие рестриктазы невозможно использовать для решения генно-инженерных задач. Рестриктазы III типа похожи на рестриктазы I типа, они гидролизуют ДНК на расстоянии 20-35 н. п. от сайтов узнавания и также довольно редко используются практических целей. Ферменты, используемые для получения рекомбинантных молекул,- рестриктазы II типа. Основной характеристикой таких рестриктаз является то, что у них сайты узнавания и места рестрикции совпадают. Обычно рестриктаза II типа узнает определенную последовательность на ДНК и гидролизует ее внутри последовательности сайта рестрикции.

Ферментативная активность рестриктаз измеряется в *единицах активности*. Это такое количество фермента, которое необходимо для полного гидролиза за один час 1 мкг ДНК фага λ , при оптимальных условиях. Оптимальные условия рестрикции для каждой рестриктазы являются индивидуальными и зависят от pH, ионной силы, присутствия определенных ионов, температуры проведения реакции. Рестриктазы являются основными ферментами, используемыми в генетической инженерии.

8.2. Разделение фрагментов ДНК и построение рестрикционных карт

Ферменты рестрикции стали эффективным инструментом исследования. Они позволяют превращать молекулы ДНК очень большого размера (10^6 - 10^{11} н. п.) в набор фрагментов длиной от нескольких сотен до десятков тысяч пар оснований. С помощью *метода электрофореза в агарозном геле* фрагменты ДНК, различающиеся по размеру, можно легко разделить, а затем исследовать каждый фрагмент отдельно. Метод электрофореза основан на разделении (фрагментов) молекул ДНК, движущихся с различной скоростью в электрическом поле. В растворе ДНК существует в виде аниона, и при помещении раствора ДНК в электрическое поле молекулы будут двигаться к положительному полюсу (катоде).

Разделение фрагментов ДНК осуществляют в носителе, которым является раствор полимера агарозы. Использование геля в качестве среды, где проводится электрофорез, позволило решить проблему разделения фрагментов и затем выделения конкретного фрагмента ДНК. Короткие фрагменты в агарозном геле мигрируют намного быстрее, чем длинные, при этом подвижность фрагментов ДНК в геле обратно пропорциональна логарифму массы (заряда) этого фрагмента. При окрашивании гелей красителями (например, бромистым этидием), связывающимися с ДНК, выявляется набор полос, каждая из которых отвечает рестрикционному фрагменту. Молекулярную массу фрагмента можно определить, проводя калибровку с помощью фрагментов ДНК с известными молекулярными массами.

Использование электрофореза для разделения рестрикционных фрагментов дает возможность получать *рестрикционные карты* - последовательности ДНК с нанесенными на них сайтами разрезания для различных рестриктаз. Первая карта была получена для вируса S V 40, содержащего 5423 пары оснований. Использовали рестриктазу Hind III, расщепляющую кольцевую ДНК вируса на 11 фрагментов. Порядок их расположения в ДНК был установлен путем исследований наборов образованных фрагментов. Первый разрыв превращал кольцевую молекулу в линейную, которая затем расщеплялась на все меньшие фрагменты. Вначале исследовали наборы перекрывающихся фрагментов, а затем продукты полного расщепления. Таким образом была получена рестрикционная карта кольцевой вирусной ДНК, на которую были нанесены сайты расщепления рестриктазой Hind III. Повторив подобные эксперименты с другими рестриктазами, можно получить более подробную карту, где отмечены сайты рестрикции для нескольких рестриктаз. Чем больше взято рестриктаз для картирования, тем более подробна карта.

Вопросы для самоконтроля

- 1) Ферменты генетической инженерии.
- 2) Почему рестриктазы I и III типов практически не используются в генной инженерии?

- 3) Метод разделения фрагментов ДНК?
- 4) Что такое рестриционные карты?
- 5) Ферментативная активность рестриктаз?

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. **Карпунина, Л.В.** Молекулярная биотехнология микроорганизмов: методические указания к лабораторным занятиям для студентов специальности 240901 – “Биотехнология”/ Л.В. Карпунина, Е.А. Горельникова, Т.В. Спирихина. – Саратов: “Саратовский ГАУ”, 2010. – 28 с.
2. **Коростелева, Н.И.** Биотехнология: учебное пособие / Н.И. Коростелева, Т.В. Громова, И.Г. Жукова. - Барнаул: Изд-во АГАУ, 2006. - 127 с.
3. **Котова, И.Б.** Общая микробиология / И.Б. Котова, А.И. Нетрусов. – М.: Академия, 2007. – 352 с.
4. **Лапшенков, Г.И.** Введение в инженерные проблемы биотехнологии /Г.И. Лапшенков, Д.Г. Победимский Д.Г. Швец В.И.. Часть 1: Учебное пособие. – М.: МИТХТ им. М.В. Ломоносова, 2009. – 74 с.

Дополнительная

1. **Рыбчин, В.Н.** Основы генетической инженерии / В.Н. Рыбчин. – СПб.: Изд-во СПбГТУ, 1999. – 521 с.
2. Сельскохозяйственная биотехнология / В.С. Шевелуха [и др.]. – М.: Высшая школа, 2003. – 427 с.

Лекция 9

БИОТЕХНОЛОГИЯ КОРМОВЫХ ПРЕПАРАТОВ

9.1. Получение кормовых белков

Белки являются обязательными компонентами клеток любого живого организма, выполняющими жизненно важные функции: каталитические, регуляторные, транспортные, биоэнергетические, защитные от инфекции и действия стрессовых факторов; структурные, запасные и др. В вегетативной массе растений на долю белков приходится 5-15 % сухого вещества, в зерне злаков – 8-18 %, семенах масличных растений – 16-28 %, зерне зернобобовых культур – 20-40 %. В различных тканях организма человека и животных содержание белков обычно от 20 до 80 % их сухой массы.

Растения и большинство микроорганизмов способны синтезировать все входящие в их состав аминокислоты из простых веществ - углекислоты, воды и минеральных солей, тогда как в организме человека и животных некоторые аминокислоты не могут синтезироваться и должны поступать в организм в готовом виде как компоненты пищи. Такие аминокислоты принято называть *незаменимыми*, к ним относятся валин, лейцин, изолейцин, лизин, метионин, треонин, триптофан, фенилаланин. Отсутствие в пище хотя бы одной незаменимой аминокислоты приводит к тяжелым заболеваниям человека, а недостаток их в кормах снижает продуктивность сельскохозяйственных животных. Главными источниками незаменимых аминокислот для человека являются белки животного или растительного происхождения, входящие в состав пищи, а для сельскохозяйственных животных - главным образом растительные белки. Поступающие с пищей или кормом белковые вещества под действием ферментов желудочного сока гидролизуются до аминокислот, которые затем используются для образования белковых молекул человеческого или животного организма. При этом первостепенное значение имеют незаменимые аминокислоты, недостаток которых вызывает прекращение синтеза белков и, следовательно, задержку роста и развития организма.

Кормовые дрожжи. Дрожжи впервые стали использоваться как источник белка для человека и животных в Германии во время первой мировой войны, когда была разработана промышленная технология культивирования пивных дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*), предназначенных для добавления в продукты питания. В настоящее время нашей биотехнологической промышленностью на основе гидролиза растительного сырья производится значительный объем кормовых дрожжей для сельского хозяйства. Для культивирования на гидролизатах растительных отходов наиболее эффективны дрожжи родов *Candida*, *Torulopsis*, *Saccharomyces*), которые способны использовать в качестве источника углерода гексозы, пентозы и органические кислоты. Кроме углеводов и углеводородов в качестве источников углерода дрожжевые клетки могут также использовать молочную сыворотку, низшие спирты — метанол и этанол, которые обычно получают из природного газа или растительных отходов.

Кроме совершенствования производственной технологии, важное значение имеет создание высокопродуктивных штаммов дрожжей, способных накапливать много белка, быстро наращивать биомассу и эффективно использовать субстрат для своей жизнедеятельности. Для создания новых штаммов микроорганизмов применяются как методы обычной селекции, так и генноинженерная биотехнология.

Белковые концентраты из бактерий. Наряду с получением кормовых дрожжей важное значение для кормопроизводства имеют также бактериальные белковые концентраты с содержанием сырого белка 60—80 % от сухой массы. Известно более 30 видов бактерий, которые могут быть использованы в качестве источников полноценного кормового белка. Бактерии способны наращивать биомассу в несколько раз быстрее дрожжевых клеток и в белке бактерий содержится значительно больше серо-содержащих аминокислот, вследствие чего он имеет более высокую биологическую ценность по сравнению с белком дрожжей. Источником углерода для бактерий могут служить различные газообразные продукты (природный и попутный газы, газовый конденсат и др.), низшие спирты (метанол и этанол), водород.

Обычно кормовой белок бактериального происхождения добавляют в комбикорма в количестве 2,5—7,5 % от белка рациона, при кормлении взрослых свиней — до 15 %. Основное препятствие, которое не позволяет его использовать в большей концентрации, — повышенное содержание нуклеиновых кислот (10-25 %). Кроме того, в бактериальной массе наряду с полезными компонентами в значительном количестве синтезируются трудно усвояемые формы липидов; сложнее и дороже методы выделения и очистки бактериальных белковых препаратов.

Кормовые белки из водорослей. В России и ряде других стран для производства кормового белка используются одноклеточные водоросли *Chlorella* и *Scenedesmus*, а также сине-зеленые водоросли из рода *Spirulina*, которые способны синтезировать белки и другие органические вещества из углекислоты, воды и минеральных веществ за счет усвоения энергии солнечного света. Для их выращивания необходимо обеспечивать определенные режимы освещения и температуры, а также требуются большие объемы воды. Чаще всего в естественных условиях водоросли выращивают в южных регионах с использованием бассейнов открытого типа, однако разрабатываются и технологии их культивирования в закрытой системе.

Белки микроскопических грибов. Ценным источником хорошо сбалансированных по аминокислотному составу белков являются клетки мицелия многих микроскопических грибов. По своим питательным свойствам белки грибов приближаются к белкам сои и мяса, вследствие чего могут использоваться не только для приготовления кормовых концентратов, но и как добавка в пищу человека. Сырьем для промышленного выращивания микроскопических грибов обычно служат растительные отходы, содержащие клетчатку, гемицеллюлозы, лигнин. При этом одновременно решаются две важные задачи — получение белковой массы и утилизация отходов растениеводства, деревообрабатывающей и целлюлозно-бумажной промышленности, которые могут быть источниками загрязнения окружающей среды.

Кормовые белковые концентраты из растений. Белки вегетативной массы трав и других растений имеют хорошо сбалансированный аминокислотный состав. Они различаются в основном по интенсивности синтеза белков, тогда как аминокислотный состав их белков довольно близок. По содержанию всех аминокислот белки трав не уступают или значительно превышают эталон ФАО, и только лишь некоторый дефицит отмечается по количеству метионина.

Опыты показывают, что из всех травянистых растений наиболее высокую биологическую ценность белков имеют бобовые кормовые травы (80—90 %), несколько ниже биологическая ценность белков у мятликовых трав (75—85 %). Бобовые растения также отличаются более высоким содержанием белков в вегетативной массе (15—25 % от сухой

массы), чем мятликовые травы (8—15 %). Особенно много белков содержится в листьях люцерны.

9.2. Производство витаминных препаратов

Важным фактором повышения питательной ценности кормов сельскохозяйственных животных является наличие в них витаминов - биологически активных веществ разного химического строения и необходимых для поддержания жизнедеятельности организмов. Биологическая активность витаминов определяется тем, что они в качестве активных групп входят в состав каталитических центров ферментов. Поэтому при недостатке этих веществ понижается активность соответствующих ферментов и, как следствие, ослабляются или полностью прекращаются биохимические процессы, происходящие с участием данных ферментов. Последнее является причиной ряда серьезных заболеваний, вызванных недостатком витаминов.

В связи с тем, что основные компоненты кормов сельскохозяйственных животных - продукты растительного происхождения имеют не оптимальный состав и постоянно меняющееся содержание необходимых животным витаминов, при составлении кормовых рационов возникает необходимость добавлять в корма препараты, обогащенные витаминами, которые получают из культур микроорганизмов. Микробиологическая промышленность нашей страны выпускает два вида кормовых витаминных препаратов - кормовой рибофлавин, содержащий витамин В₂, и КМБ-12, имеющий в своем составе витамин В₁₂.

9.3. Кормовые липиды

Кроме белков, углеводов и витаминов неотъемлемым компонентом кормов сельскохозяйственных животных являются липиды, содержащие полиненасыщенные жирные кислоты - линолевую, линоленовую, арахидроновую, которые не могут синтезироваться в организме животных и, следовательно, должны поступать с пищей. Полиненасыщенные жирные кислоты, называемые незаменимыми, участвуют в построении клеточных мембран, входя в состав структурных липидов. При недостатке незаменимых жирных кислот снижается интенсивность роста сельскохозяйственных животных, угнетается их репродуктивная функция, понижается сопротивляемость организма инфекции.

Основной источник незаменимых жирных кислот для сельскохозяйственных животных - различные растительные продукты, входящие в состав кормов. Однако очень часто в растительных кормах содержится мало липидов или они имеют неблагоприятный состав жирных кислот, что ухудшает питательную ценность кормов. В целях балансирования кормовых рационов сельскохозяйственных животных по содержанию незаменимых жирных кислот осуществляется поиск новых источников биологически полноценных липидов, которые можно было бы использовать в качестве высококонцентрированных кормовых добавок. Опыты показывают, что наиболее перспективными промышленными продуцентами липидов, близкими по составу к растительным жирам и пригодными для использования в кормовых целях, являются дрожжи и микроскопические грибы, которые чаще всего накапливают внутриклеточные липиды, однако известны виды, способные выделять липиды в культуральную жидкость. В клетках этих мик-

роорганизмов обычно содержится от 25 % до 70 % липидов в расчете на сухую массу, которые на 40-90 % представлены триацилглицеринами и на 5-50 % - фосфолипидами. В них также много содержится стероидных веществ (до 1-1,5% на сухую массу), представленных главным образом эргостерином, из которого в организме животных образуется витамин D₂.

9.4. Ферментные препараты

Одним из важных направлений современной биотехнологии является получение на основе культивирования микроорганизмов и использование в сельском хозяйстве различных ферментных препаратов, которые могут применяться в процессе приготовления кормов для сельскохозяйственных животных как добавки к кормам в целях улучшения их усвояемости, а также в ветеринарии для профилактики и лечения желудочно-кишечных и паразитарных заболеваний.

Основной компонент кормов сельскохозяйственных животных - растительная продукция (зерно, силос, грубые корма и др.), содержащая довольно много трудноперевариваемых веществ, - клетчатка, лигнин, гемицеллюлоза. Даже у жвачных животных, содержащих в преджелудке (рубце) активные штаммы целлюлозоразлагающих микроорганизмов, клетчатка переваривается на 40—65 %. Не полностью перевариваются также растительные белки (60-80 %), липиды (60-70 %), крахмал и полифруктозиды (70-85 %), пектиновые вещества.

В целях улучшения перевариваемости и повышения эффективности использования растительных кормов в рационы сельскохозяйственных животных вводят ферментные препараты (0,1- 1,5 % от сухой массы корма), полученные из микроорганизмов и содержащие активные комплексы гидролитических ферментов. Препараты микробных ферментов обычно получают из культур бактерий или микроскопических грибов.

В рационе крупного рогатого скота значительный удельный вес занимают сочные и грубые корма, богатые клетчаткой, пентозанами, пектиновыми веществами, которые медленно перевариваются микроорганизмами рубца, снижая усвояемость организмом других питательных веществ. Значительное улучшение перевариваемости этих веществ наблюдается при добавлении в корм ферментных препаратов с активным комплексом гидролитических ферментов, таких как пектофоетидин ГЗх и целловиридин ГЗх (в соотношении 1:1), амилосубтилин ГЗх и глюковаморин Пх. При этом не только повышается общая продуктивность животных, но и существенно снижается расход кормов на создание одной единицы животноводческой продукции (на 8—10%).

При откорме свиней положительное действие оказывают ферментные препараты с амилолитической и протеолитической активностью - амилосубтилин ГЗх, протосубтилин ГЗх, амилоризин Пх, глюковаморин Пх, протезим ГЗх.

Особенно важное значение имеет применение ферментных препаратов при кормлении молодняка сельскохозяйственных животных. Так, например, у телят формирование рубца происходит к 2—3-месячному возрасту, вследствие чего наблюдается слабое переваривание грубых и сочных кормов. Поэтому для замены молока растительными кормами и лучшего их использования в рацион телят целесообразно вводить ферментные препараты - пектофоетидин ГЗх, амилосубтилин ГЗх, протосубтилин ГЗх и глюковаморин Пх, содержащие комплекс амилолитических и протеолитических ферментов.

Наряду с производством ферментных препаратов, выделяемых из микробных клеток, разработаны технологии получения биопрепаратов на основе живых микроорганизмов - симбионтов желудочно-кишечного тракта животных, которые в процессе своей жизнедеятельности синтезируют различные ферменты, витамины, незаменимые аминокислоты, антибиотики, вещества, обладающие гормональным действием, и таким образом активно участвуют в процессах пищеварения и синтеза веществ, не образующихся в клетках животных, защите от микробной инфекции.

Эффективные микробные препараты, широко используемые в животноводстве, производятся на основе пропионовокислых (пропиовит) и ацидофильных (пропиацид) бактерий, а также азотобактерий (азотацид).

Создание высокоактивных штаммов микроорганизмов и сбалансированных экосистем желудочно-кишечного тракта животных проводится как обычными методами генетики и селекции, так и с использованием мутагенеза и клонирования генов. Применение этих методов позволит целенаправленно изменять экосистемы желудочно-кишечного тракта животных в нужном направлении, добиваясь улучшения усвояемости корма, усиления синтеза полезных веществ, подавления патогенной микрофлоры.

Вопросы для самоконтроля

- 1) Получение кормовых белков.
- 2) Получение витаминных препаратов.
- 3) Получение липидов.
- 4) Получение ферментных препаратов.
- 5) В чем заключается биологическое действие ферментных и микробных препаратов, используемых в животноводстве?

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. **Коростелева, Н.И.** Биотехнология: учебное пособие / Н.И. Коростелева, Т.В. Громова, И.Г. Жукова. - Барнаул: Изд-во АГАУ, 2006. - 127 с.
2. **Котова, И.Б.** Общая микробиология / И.Б. Котова, А.И. Нетрусов. – М.: Академия, 2007. – 352 с.

Дополнительная

1. Сельскохозяйственная биотехнология / В.С. Шевелуха [и др.]. – М.: Высшая школа, 2003. – 427 с.
2. **Хазин, Д.А.** Производство кормового белка и его использование в кормлении сельскохозяйственных животных / Д.А. Хазин. – М.: ВНИИТЭИ, 1987. – 52 с.
3. **Эрнст, Л.К.** Биотехнология сельскохозяйственных животных / Л.К. Эрнст, М.И. Прокофьев. – М.: Колос, 1995. – 192 с.

Лекция 10

НАНОБИОТЕХНОЛОГИЯ

Нанобиотехнология - область нанонауки и наноинженерии, применяющей методы и подходы нанотехнологии для создания устройств для изучения биологических систем. В рамках нанобиотехнологии также изучаются возможности использования живых систем для создания наноустройств. Слово нанотехнология произошло от единицы измерения нанометр, составляющей одну тысячную микрометра (микрона), что является приблизительным размером молекулы. Нанотехнология – изучение, производство и манипуляции над сверхмалыми структурами и приспособлениями, состоящими из одной молекулы, – возникла благодаря созданию микроскопических приборов, обеспечивающих возможность визуализации отдельных молекул, манипулирования ими и измерения возникающих между ними электромагнитных взаимодействий.

Нанобиотехнология объединяет в себе достижения нанотехнологии и молекулярной биологии. Молекулярные биологи помогают нанотехнологам научиться понять и использовать наноструктуры и наномеханизмы, созданные в результате процесса эволюции, длившегося 4 миллиарда лет, – клеточные структуры и биологические молекулы. Использование особых свойств биологических молекул и клеточных процессов помогает биотехнологам в достижении целей, перед которыми бессильны другие методы.

Нанотехнологи также пользуются способностью биомолекул к самосборке в наноструктуры. Так, например, липиды способны спонтанно объединяться и формировать жидкие кристаллы.

ДНК используется не только для создания наноструктур, но и в качестве важного компонента наномеханизмов. К тому времени, как микропроцессоры и микросхемы превратятся в нанопроцессоры и наносхемы, молекулы ДНК могут заменить используемые в настоящее время неорганические полупроводники.

К практическим применениям нанобиотехнологии относятся:

- увеличение скорости и точности диагностики заболеваний;
- создание наноструктур для доставки функциональных молекул в клетки-мишени;
- повышение специфичности и скорости доставки лекарств;
- миниатюризация биосенсоров путем объединения биологического и электронного компонентов в один мельчайший прибор;
- способствование развитию экологически чистых производственных процессов и др.

Получены данные о возможности использования наночастиц для создания нанолечкарств, эффективных вакцин. Разработаны новые транспортные наносистемы (контейнеры) для доставки лекарств в органы-мишени и т.д. Эти разработки позволяют повысить растворимость, биодоступность, терапевтические возможности препаратов, снизить дозы и побочные эффекты, значительно уменьшив лекарственные нагрузки на организм.

10.1. Нанолечкарства

Если говорить о лечении, то уже появились наноматериалы, из которых делают нанолечкарства - препараты нового поколения. Развитие нанотехнологий с применением белковых, липидных молекул, нуклеиновых кислот или их синтетических миметиков в

медицине дает возможность создавать новые высокочувствительные и дешевые системы для ранней диагностики, лечения, а также доставки лекарств к клеткам-мишеням или органам. В период 1998-2005 годов опубликовано более 200 научных работ, демонстрирующих эффективность применения фуллеренов (фуллерены - молекулярные соединения, представляющие собой выпуклые замкнутые многогранники, составленные из четного числа трехкоординированных атомов углерода) при лечении целого ряда заболеваний, включая рак, склероз, вирусные и бактериальные инфекции (менингит и ВИЧ). Создаются лекарства для клеток-мишеней и клеточных наноструктур, включая генотерапию, новые противоопухолевые, кардиотропные и психотропные средства, новые антибиотики, иммуномодуляторы, аллерготропины и наноантитела для лечения иммунодефицитов, аллергии, опухолей и аутоиммунных заболеваний. Ученые работают над адресным преодолением клеточных мембран, различных биологических барьеров для адресной доставки лекарств. В России ведутся работы и получены положительные результаты, подтвержденные публикациями и патентами, в области применения фуллеренов и их модификаций для лечения гриппа, онкологических заболеваний и бактериальных инфекций (туберкулез).

Одним из способов создания лекарственных средств нового поколения стало снабжение их системами доставки, обеспечивающими пролонгированное поступление лекарственных веществ в определенные органы и клетки-мишени, а также улучшение фармакологических свойств препарата. Разработанные системы доставки лекарств используются практически во всех областях медицины - в эндокринологии, пульмонологии, кардиологии, онкологии и т.д. При этом существенное внимание уделяется фосфолипидным наночастицам - переносчикам лекарственных средств, эффективность действия которых обеспечивается не только их биологическими свойствами, но и малыми размерами. Адресная доставка лекарств к больным клеткам позволяет медикаментам попадать только в больные органы, избегая здоровые, которым эти лекарства могут нанести вред. Например, лучевая терапия и химиотерапевтическое лечение, уничтожая больные клетки, губит и здоровые. Решение этой проблемы подразумевает создание некоторого "транспорта" для лекарств, варианты которого уже предложены целым рядом институтов и научных организаций.

Директор НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича академик РАМН А.И. Арчаков считает, что разработка технологии и создание лекарственных препаратов на основе фосфолипидных наночастиц позволит организовать выпуск отечественных препаратов нового поколения, снабженных средствами неселективного транспорта (доксорубицин, метотрексат, рибавирин и др.) или направленного рецепторно-опосредованного транспорта (РЖД-блеомицин), действие которого основано на селективном сродстве к рецепторам метастазирующих клеток. Разработана и сертифицирована фосфолипидная наносистема с диаметром наночастиц от 25 до 50 нм (фосфоглив для внутривенных инъекций).

Таким образом, по мнению ученых, создание нанодиагностик, а также наночастиц, служащих контейнерами для доставки лекарств, стало перспективным направлением развития нанобиотехнологий.

10.2. Нановакцины

С помощью нанотехнологий становятся возможными противоопухолевая защита организма, адресное стимулирование или подавление его иммунитета. В первую очередь, речь идет о создании вакцин нового типа против туберкулеза, СПИДа, гепатитов,

гриппа и других новых и возвращающихся социально значимых инфекций. Исследователи синтезируют белки, способные связываться с вирусами и мутантными генами, вызывающими опухоли, и обезвреживать их; создают высокоэффективные вакцины и изучают белки-рецепторы клеточной поверхности, которые часто являются мишенями для фармацевтических препаратов. Получены данные о возможности использования наночастиц для производства эффективных вакцин. Фосфолипидные наносистемы применяются для введения вакцин.

10.3. Наноантитела

В 70-х годах прошлого века в разработке противораковых препаратов наступил переломный момент – были созданы так называемые моноклональные антитела (МАТ). За счёт того, что эти белковые молекулы обладают свойствами специфически узнавать определённый антиген или белок какой-то определённой структуры, они могут существенно более избирательно, чем традиционные химиопрепараты, воздействовать именно на целевые клетки злокачественной опухоли, заметно меньше повреждая при этом нормальные клетки организма. У этой технологии, как и у всего на свете, есть свои минусы. Во-первых, МАТ – молекулы довольно крупные и проникать внутрь клетки или глубоко в ткани они не способны. Во-вторых, для достижения необходимого результата их концентрация должна быть в 5–10 тысяч раз выше, чем концентрация молекул-мишеней. И, в-третьих, МАТ вырабатываются исключительно на клеточных культурах, что делает их производство недешёвым.

Специфика наноантител. Как и обычные антитела, например, те же МАТ, наноантитела обладают высокой специфичностью и низкой токсичностью, но наряду с этим у них есть сразу несколько потенциальных преимуществ:

- во-первых, они имеют гораздо меньший размер (2х4 нанометра) и новые структурные особенности – лучшее проникновение внутрь ткани и узнавание того, что до сих пор не узнавалось;
- во-вторых, наноантитела намного проще и дешевле производить в больших количествах;
- в-третьих, наноантитела по сравнению с узнающими доменами традиционных антител намного лучше растворяются в организме человека и гораздо более устойчивы к значительным колебаниям температуры и кислотности (рН);
- в-четвёртых, с наноантителами довольно просто проводить всевозможные генно-инженерные манипуляции (например, создавать более эффективные комбинированные конструкции, включающие два или несколько наноантител, а также другие белковые домены или функциональные группы).

Все эти преимущества открывают широкое поле применения наноантител в качестве основы лекарственных препаратов нового поколения для широкого спектра заболеваний.

10.4. Биосенсоры

Биосенсорная технология сочетает в себе достижения биологии и современной микроэлектроники. Биосенсор обычно состоит из биологического компонента (клетки, фермента или антитела), соединённого с крошечным преобразователем – прибором, приводимым в действие одной системой и передающим энергию (обычно в другой форме) другой системе. Биосенсоры являются детекторами, действие которых основано на специфичности клеток и молекул и используется для идентификации и измерения

количества малейших концентраций различных веществ. При связывании искомого вещества с биологическим компонентом биосенсора преобразователь генерирует электрический или оптический сигнал, мощность которого пропорциональна концентрации вещества. Биосенсоры могут быть использованы для:

- измерения пищевой ценности, свежести и безопасности продуктов питания;
- экспресс-анализа крови непосредственно у кровати больного;
- обнаружения и измерения степени загрязнения окружающей среды;
- детекции и определения количества взрывчатых веществ, токсинов и возможного биологического оружия.

10.5. Нанотрансгенез или трансгенное наноконструирование

Трансгенными могут называться те организмы, в которых успешно функционирует ген (или гены) пересаженные из других организмов (растений, животных или микроорганизмов). Осуществляется трансгенез бактерий, вирусов, происходит создание различных векторных наноконструктов; трансгенез растений, животных.

Делается это для того, чтобы организм, например, растение реципиент получило новые удобные для человека свойства, повышенную устойчивость к вирусам, к гербицидам, к вредителям и болезням растений. Пищевые продукты, полученные из таких генноизмененных культур, могут иметь улучшенные вкусовые качества, лучше выглядеть и дольше храниться. Также часто такие растения дают более богатый и стабильный урожай, чем их природные аналоги. Создание, например, трансгенных растений в настоящее время развиваются по следующим направлениям: получение сортов с/х культур с более высокой урожайностью, получение с/х культур, дающих несколько урожаев в год (например, в России существуют ремонтантные сорта клубники, дающие два урожая за лето), создание сортов с/х культур, токсичных для некоторых видов вредителей (например, в России ведутся разработки, направленные на получение сортов картофеля, листья которого являются остро токсичными для колорадского жука и его личинок), создание сортов с/х культур, устойчивых к неблагоприятным климатическим условиям (например, были получены устойчивые к засухе трансгенные растения, имеющие в своем геноме ген скорпиона), создание сортов растений, способных синтезировать некоторые белки животного происхождения (например, в Китае получен сорт табака синтезирующий лактоферрин человека).

10.6. Нанотехнологии в экологии

Основные направления нанотехнологии в экологии:

- мониторинг окружающей среды (создание высоко чувствительных нанобиосенсоров).
- разработка наночипов на основе клеток природных и модифицированных микроорганизмов для мониторинга состояния окружающей среды,
- устранение последствий загрязнения окружающей среды (особенно в районах захоронения радиоактивных отходов) и др.

Вопросы для самоконтроля

- 1) Что такое нанобиотехнология?
- 2) Нанолечения.

- 3) Нановакцины.
- 4) Наноантитела.
- 5) Нанотрансгенез (растения, животные, микроорганизмы).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. **Кирпичников, М.П.** О развитии нанобиотехнологии / М.П. Кирпичников, К.В. Шайтан // Инновации. - 2007. - N 12. - С. 55-61.
2. **Козырев, С.В.** Нанобиотехнологии - панорама направлений / С.В. Козырев, П.П. Якуцени // Рос. нанотехнологии. - 2008. - Т. 3, N 3-4. - С. 8-11.
3. **Макаров, Н.В.** Нанотехнологии для решения экологических и медицинских проблем / Н.В. Макаров // Строительные материалы, оборудование, технологии XXI века. - 2007. - N 3. - С. 58-59.
4. **Мисюров, Д.** Нанобиотехнологии – новые горизонты / Д. Мисюров // В мире науки. – 2005. - N 8. – С. 81-87с.
5. **Пул, Ч.** Нанотехнологии / Ч. Пул, Ф. Оуэнс. – М.: Техносфера, 2005. – 336 с.
6. **Рябцева, Е.** Интернет-журнал «Коммерческая биотехнология» / Е. Рябцева - 2006. <http://www.cbio.ru/> по материалам BIO.org

Дополнительная

1. **Рыбалкина, М.** Нанотехнологии для всех / М. Рыбалкина. – М.: Издательский дом “Вильямс”, 2005. – 444 с.
2. **Булатова, А.** Наноантитела – «волшебные пули» российского производства /А. Булатова. – 2009. STRF.ru

Лекция 11

БИОКОНВЕРСИЯ И БИОЭНЕРГЕТИКА

11.1. Биотехнология органических отходов. Технология производства биогаза

Обострение экологических проблем, истощение запасов невозобновляемых энергоресурсов, рост цен на них, обусловили глобальный интерес к разработке и использованию технологии биоконверсии органических отходов для получения тепловой и других видов энергии.

Известно, что животные плохо усваивают энергию растительных кормов и более половины ее уходит в навоз, который прежде всего является ценнейшим видом органических удобрений. Вместе с тем, он может быть использован в качестве возобновляемого источника энергии. Концентрация животных на крупных фермах и комплексах обусловила увеличение объемов навоза и навозных стоков, которые должны утилизироваться, не загрязняя окружающую среду. Одним из путей рациональной утилизации навоза и навозных стоков является их анаэробное сбраживание, которое обеспечивает обезвреживание навоза и сохранение его как важнейшего органического удобрения при одновременном получении биогаза.

Анаэробное сбраживание навоза с получением биогаза осуществляется в специальных биогазовых установках, основными элементами которых являются герметические емкости. Технологический процесс обработки навоза осуществляется следующим образом. Из животноводческого помещения навоз поступает в накопительную емкость, далее фекальным насосом его загружают в метантенк (емкость для анаэробного сбраживания навоза). Биогаз, образующийся в процессе брожения, поступает в газгольдер и далее к потребителю. Для нагрева навоза до температуры брожения и поддержания теплового режима в метантенке установлен теплообменник, через который протекает горячая вода, нагреваемая в котле. Сброженный навоз выгружают в навозохранилище.

В метантенке обеспечиваются все необходимые параметры процесса (температура, концентрация органических веществ, кислотность и др.). Метантенк имеет тепловую изоляцию, позволяющую обеспечивать и поддерживать на заданном уровне температурные режимы сбраживания, в нем также имеется устройство для постоянного перемешивания навоза. Поступление навоза в метантенк регулируется так, чтобы процесс сбраживания протекал равномерно. Во время сбраживания в навозе развивается микрофлора, которая последовательно разрушает органические вещества до кислот, а последние под действием синтрофных и метанообразующих бактерий превращаются в газообразные продукты - метан и углекислоту. Степень разложения органического вещества при анаэробном сбраживании навоза составляет 25—45 %. Дегградация органических веществ при метаногенезе осуществляется как многоступенчатый процесс, в котором углеродные связи постепенно разрушаются под действием различных групп микроорганизмов. Согласно современным воззрениям, анаэробное превращение практически любого сложного органического вещества в биогаз проходит через четыре последовательных стадии:

- гидролиз сложных биополимерных молекул (белков, липидов, полисахаридов и др.) на более простые мономеры: аминокислоты, углеводы, жирные кислоты и др.;

- ферментация (брожение) образовавшихся мономеров до еще более простых веществ — низших кислот и спиртов, при этом образуются также углекислота и водород;

- ацетогенная стадия, на которой образуются непосредственные предшественники метана: ацетат, водород, углекислота;

- метаногенная стадия, которая ведет к конечному продукту расщепления сложных органических веществ - метану.

Физические свойства биогаза позволяют судить о возможностях его использования. Объемная теплота сгорания, температура воспламенения и предел воспламеняемости определяются в основном содержанием CH_4 , поскольку незначительное количество H_2 и H_2S на этот показатель почти не оказывает влияния.

Биогаз успешно применяется как топливо. Его можно сжигать в горелках отопительных установок, водогрейных котлов, газовых плит, использовать в холодильных установках абсорбционного типа, в инфракрасных излучателях, в автотракторных двигателях. Карбюраторные двигатели легко переводятся на газ: достаточно заменить карбюратор на смеситель.

При производстве электроэнергии из биогаза в электрический ток преобразуется всего 30 % его энергоресурса, остальная часть - отбросная теплота. Ее можно использовать при нагревании воды для бытовых нужд и содержания скота, отопления жилых помещений и теплиц, подогрева воздуха для сушилок, а также при регулировании микроклимата в животноводческих помещениях и нагрева навоза до нужной температуры брожения в биогазовых реакторах.

Кроме того, метановое сбраживание навоза обеспечивает его дезодорацию, дегельминтизацию, уничтожение способности семян сорных растений к всхожести, перевод удобрительных веществ в легкоусвояемую Растениями минеральную форму. При этом питательные (для растений) вещества — азот, фосфор и калий- практически не теряются. Химический состав сброженного навоза, полученного на биогазовой установке ВИЭСХ, приведен в табл. 8.5.

При анаэробной обработке навоза фосфор и калий практически полностью сохраняются в сброженной массе. Потери азота, которые при других методах обработки навоза составляют до 30 %, в процессе метаногенеза не превышают 5 %. При этом значительная часть азота, присутствующего в свежем навозе в форме органических соединений, в сброженном - содержится в аммиачной форме, которая быстро усваивается растениями.

Экономическими критериями невозможно оценить тот факт, что анаэробная переработка навоза животных находится в полном согласии со все более строгими требованиями к соблюдению принципов охраны окружающей среды. Навоз после анаэробной обработки является дезодорированным, биологически стабилизированным, не привлекает насекомых.

Экологические требования к природоиспользованию приобретают особое значение в условиях хозрасчета, когда требуется возмещение использованных природных ресурсов законодательными актами. При высоких ценах на энергию перспективной становится малоэнергоёмкая анаэробная биологическая очистка с положительным выходом энергии в виде биогаза. Анаэробную очистку навоза следует рассматривать не только как дополнительный источник энергии, но и как энергосберегающую технологию.

11.2. Биогазовые установки и их технико-экономические показатели

Главным звеном биогазовой установки является реактор для сбраживания навоза, по типу которого составлена классификация биогазовых установок, предназначенных для анаэробного сбраживания навоза различного вида и состава.

Различные конструктивные и технологические решения относятся к так называемым реакторам первого поколения - традиционным метантенкам. Эти метантенки иногда имеют две или более секций, в которых осуществляется частичное разделение стадий анаэробного сбраживания. Конструкции метантенков достаточно разнообразны, отличаются главным образом гидравлическим режимом (проточные или периодического наполнения) и способами загрузки (непрерывный или периодический). При непрерывной (проточной) схеме навоз загружают через определенные промежутки времени (до 10 раз в сутки), удаляя такое же количество сброженной массы. При соблюдении всех условий сбраживания такая схема позволяет получить максимальный выход биогаза.

При периодической схеме метантенки (их обычно два) загружают по очереди. При этом свежий навоз смешивают с остатками сброженного навоза. Газ начинает образовываться по истечении 5-10 сут и при достижении максимального количества постепенно снижается до минимума. Затем сброженный навоз выгружают и метантенки снова загружают свежим навозом.

Проточные метантенки считаются наиболее приемлемыми для получения биогаза из жидкого или полужидкого навоза влажностью 91-96 %. Однако для анаэробной обработки навозных стоков, избыточного активного ила, фугата (навозных стоков) и осадков очистных сооружений такие реакторы неэффективны. Поэтому для обработки таких стоков применяются конструкции реакторов, использующих принцип удержания биомассы. В таких реакторах создают плавающие или фиксированные насадки, производят рециркуляцию биомассы или делают реактор из нескольких секций.

Для сбраживания подстилочного и полужидкого навоза влажностью менее 90 % наибольшее распространение получили установки с рециркуляцией жидкой фракции сброженного навоза после его разделения. Жидкая фракция возвращается в реакторы для поддержания в них нужного гидравлического режима, что обеспечивает возможность обработки высококонцентрированного навоза, к которому относится как подстилочный, так и полужидкий навоз.

Рассмотренные биогазовые установки обеспечивают производство биогаза при сбраживании навоза с различными физико-механическими свойствами. Подавляющая часть биогазовых установок, действующая в западноевропейских странах, работает в мезофильном режиме, т. е. сбраживание осуществляется при 30-37°C. В Японии, Германии и Швейцарии намечается тенденция к использованию психрофильных процессов брожения, протекающих при температурах окружающей среды (табл. 8.7). По мнению западных экспертов это направление, как более экономичное, может получить дальнейшее развитие в ближайшей перспективе.

По продолжительности обработки навоза и дозе суточной загрузки использующиеся в практике биогазовые установки значительно отличаются (от 5 до 30 суток - время обработки и соответственно от 3,3 до 20 % - доза суточной загрузки). Удельный объем метантенков в расчете на одну условную голову составляет от 2,57 м³/гол (Венгрия) до 0,625 м³/гол (КОБОС); удельный выход биогаза от 0,5 м³/гол до 2,0 м³/гол.

Метаногенез требует значительных затрат тепловой энергии на осуществление процесса. Чем выше температура, тем выше затраты дополнительного тепла. Поэтому повышение скорости метаногенеза за счет температурного эффекта имеет некоторые негативные стороны. Экономическая эффективность биогазовых установок зависит от конкретных условий региона и хозяйства, где планируется их использование. В северных районах в целях экономии топлива предпочтительнее использовать мезофильный режим, при котором увеличивается время удержания и рабочий объем реакторов. Примером могут служить конструкции биогазовых установок, разработанных фирмой «АВ Епбот» (Финляндия), работающих в условиях Лапландии, при температурном режиме ферментации 33°C. В отдельных случаях с целью снижения тепловых затрат и для увеличения выхода товарного биогаза процесс метаногенерации разделяют на две фазы: кислотогенную и метаногенную. Первую осуществляют при 30-35°C, вторую - при 55°C. Показатели выхода биогаза на этих реакторах находятся в полном соответствии с удельной нагрузкой на единицу объема реакторов и составляют от 0,67 до 2,55 м³/м³сут.

Установка КОБОС-1 предназначена для переработки жидкого навоза влажностью 89—96 % в качественное, частично обеззараженное и дезодорированное удобрение с одновременным улучшением санитарного состояния зоны животноводческих комплексов и получением биогаза. Применяется в составе технологических линий переработки навоза на комплексах и фермах с механическим и гидравлическим способами удаления навоза.

Биофильтр БФ-500 предназначен для анаэробной очистки жидкого свиного навоза после его предварительного разделения на фракции с получением биогаза.

Биогазовые установки БГУ-25, БГУ-50 и БГУ-100 разработаны для фермерских хозяйств, например для свиноферм на 100, 250 и 500 голов, для санитарной обработки навоза и получения биогаза, который используется для приготовления кормов.

Эффективность биогазовых установок изменяется в широких пределах, поскольку она сильно зависит от природно-климатических условий, эксплуатации, вида, состава и состояния исходных материалов для сбраживания, технологических и технических параметров установки и режима ее работы. Чем выше цена энергоносителя, с которым ведется сравнение (жидкое топливо), тем более эффективными будут биогазовые установки. На основании проведенных в Германии экономических расчетов было установлено, что можно гарантировать экономичность биогазовых Установок, если удельные первоначальные капитальные вложения на 1 усл. гол. не превышают 1000—2000 немецких марок, а удельный выход полезно используемого газа не менее 0,4 м³ с 1 кг сухого органического вещества.

По данным американских исследователей себестоимость производства биогаза составляет для биогазовых установок, работающих в непрерывном режиме - 0,27-0,52 долл./м³. При этом биогазовая установка должна удовлетворять энергетические потребности производства при температуре окружающего воздуха не ниже 2°C. В условиях более холодного климата необходим внешний приток энергии.

С учетом эффекта от дезодорации и использования высококачественного удобрения себестоимость производства 1 м³ биогаза снижается на 15-20 % по сравнению с затратами только на получение биогаза.

Себестоимость производства биогаза может быть значительно снижена, если биогазовые установки будут применяться в технологических линиях утилизации навоза

на фермах. В этом случае анаэробное сбраживание навоза с получением биогаза может рассматриваться как альтернативный или дополнительный метод его обработки.

Имеющийся опыт по внедрению процесса метаногенеза в сельскохозяйственную практику показывает, что первое место пока занимает его экологический аспект, затем следует эффект от получения высококачественных удобрений и только третье место занимает недооцениваемая или изолированно оцениваемая энергетическая составляющая процесса.

Однако при отсутствии или недостатке других источников энергии, особенно для бытовых целей, биогаз будет приобретать все большее значение как возобновляемый источник энергии. Многие хозяйственники считают, что главным назначением биогазовых установок является получение биогаза, служащего дополнительным источником местного энергоснабжения. При этом они учитывают и то обстоятельство, что биогазовые установки являются дополнительным оборудованием для переработки навоза и навозных стоков, а поэтому затраты на их создание и эксплуатацию должны быть отнесены к оборудованию, необходимому для обеззараживания навоза и производства удобрений и к системе мер по защите окружающей среды. В этом случае биогазовые установки всегда будут иметь положительный экономический эффект.

11.3. Биоэнергетика в селекции, растениеводстве и биотехнологиях. Учет биоэнергетических процессов в био- и агротехнологиях

Из общего количества энергии, используемой при производстве сельскохозяйственной продукции, техногенная (промышленная) энергия составляет не более 3-4 %. Главная ее часть приходится на природную энергию – электромагнитную энергию солнечного излучения (света). Эту энергию первоначально преобразуют и запасают растения, а затем используют другие организмы (человек, животные, микроорганизмы) и их сообщества. Большие количества природной энергии накоплены в органическом веществе почвы, где она также преобразуется живыми почвенными организмами, которые формируют и поддерживают почвенное плодородие.

Конечная цель агро- и биотехнологий – получение определенного вида высококачественной продукции при низких энергетических и материальных затратах, а также минимальном негативном воздействии на природную среду.

Наукой выявлен общебиологический закон биоэнергетической направленности структур и функций живых существ, названный законом выживания. Сущность этого закона состоит в том, что все элементы живой природы в своем развитии самопроизвольно направлены к наиболее полному использованию доступной свободной энергии.

Под свободной энергией понимается та часть общей энергии, которая потенциально может быть использована данным элементом природы на свои процессы или преобразована в требуемый вид энергии. Важное практическое следствие этого закона - необходимость количественной оценки этой энергии на входе в любой ее преобразователь (потребитель), а также на выходе из него.

В селекции возникло и развивается направление по выведению энергоэкономных сортов (гибридов) растений, пород животных, штаммов микроорганизмов. При такой селекции важно иметь прогнозную (расчетную) оценку на энергоэкономность исходно-

го селекционного материала. Эта оценка должна учитывать конкретные экологические условия, в которых будут выращиваться новые сорта, гибриды, породы, штаммы.

Надежный анализ энергопреобразующих процессов как в технических, так и в биологических системах можно проводить на основе закона термодинамики. Законы термодинамики разрабатывались применительно к техническим преобразователям энергии – тепловым машинам. Эти законы применимы и для анализа преобразования энергии живыми системами, но их недостаточно для объяснений их развития и функционирования. Эти особенности можно объяснить на основе закона выживания – общей биоэнергетической направленности структур и функций саморегулирующихся живых систем.

Вопросы для самоконтроля

- 1) Что такое биогаз и как он образуется?
- 2) Процесс деградации навоза и других органических отходов при их конверсии в биогаз.
- 3) Основные типы биогазовых установок и их назначение.
- 4) Перспективы использования биогаза в экономике страны.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. **Клунова, С.М.** Биотехнология: учебник / С.М. Клунова, Т.А. Егорова, Е.А. Живухина. – М.: Академия, 2010. – 256 с.
2. **Коростелева, Н.И.** Биотехнология: учебное пособие / Н.И. Коростелева, Т.В. Громова, И.Г. Жукова. - Барнаул: Изд-во АГАУ, 2006. - 127 с.
3. **Котова, И.Б.** Общая микробиология / И.Б. Котова, А.И. Нетрусов. – М.: Академия, 2007. – 352 с.
4. **Сазыкин, Ю.О.** Биотехнология / Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева; под ред. А.В. Катлинского. - М.: Академия, 2008. – 256 с.

Дополнительная

1. **Елинов, Н.П.** Основы биотехнологии / Н.П. Елинов. – СПб.: ИФ “Наука”, 1995. – 600 с.
2. Сельскохозяйственная биотехнология / В.С. Шевелуха [и др.]. – М.: Высшая школа, 2003. – 427 с.
3. **Свентицкий, И.И.** Экологическая биоэнергетика растений и сельскохозяйственное производство / И.И. Свентицкий. – Пущино, НЦБИ АН СССР, 1982. – 221 с.
4. **Скулачев, В.П.** Биоэнергетика. Мембранные преобразователи энергии / В.П. Скулачев. – М.: Высшая школа, 1989. – 271 с.

Лекция 12

БИОТЕХНОЛОГИЯ И ОКРУЖАЮЩАЯ СРЕДА

12.1. Биотрансформация органических ксенобиотиков и природных полимеров

Стремительные темпы развития промышленности приводят к появлению огромного количества разнообразных химических соединений, постоянно загрязняющих биосферу и пагубно влияющих на живую природу. Эти вещества могут взаимодействовать друг с другом, образуя новые соединения с неизвестными токсикологическими характеристиками. Чужеродные для организма соединения (которые не используются ни для производства энергии, ни для выработки тканевых компонентов, не являются химическими посредниками или кофакторами) называют *ксенобиотиками* (от греч. *xenos* – чужой, *bios* – жизнь).

Биохимический процесс изменения структуры соединения под действием ферментной системы получил название *биотрансформации* или метаболизма веществ. Интерес к биотрансформации органических ксенобиотиков вызван многими причинами. Образующиеся в результате реакции биотрансформации метаболиты могут быть более токсичными, чем исходные соединения, или проявлять нежелательные побочные эффекты. Попадая в окружающую природную среду, они могут вызвать повышение частоты аллергических реакций, гибель организмов, изменить наследственные признаки, снизить иммунитет, нарушить обмен веществ, нарушить ход процессов в естественных экосистемах вплоть до уровня биосферы в целом. Как правило, повышение концентрации ксенобиотиков в окружающей среде прямо или косвенно связано с хозяйственной деятельностью человека. К ксенобиотикам в ряде случаев относят: нефть и нефтепродукты, ПАВ, ПАУ, галогенсодежащие, пестициды, отравляющие и взрывчатые вещества, природные полимеры и др. Некоторые вещества, относимые к ксенобиотикам, могут быть найдены в природе, но в чрезвычайно низких концентрациях. Так, диоксины могут синтезироваться при лесных пожарах. Такие вещества, как, например ксилол, стирол, толуол, ацетон, бензол, пары бензина или хлороводорода - могут быть отнесены к ксенобиотикам, если будут обнаружены в окружающей среде в неестественно высоких концентрациях, связанных с промышленным производством. Липофильные ксенобиотики в настоящее время вызывают особое внимание экологов и токсикологов, так как, накапливаясь в жировых тканях, способны переходить по пищевой цепи в организмы животных и человека, превращаясь в более полярные и, следовательно, более легко усваиваемые или экскретируемые вещества.

Нефть и продукты её переработки - основные источники загрязнения окружающей среды. Попадая в почву, нефтепродукты резко ухудшают её агрофизические и агрохимические свойства. Разработка способов очистки почвы от загрязнения углеводородами нефти - одна из важнейших задач при решении проблемы снижения антропогенного воздействия на окружающую среду. В настоящее время наиболее перспективным методом для очистки нефтезагрязненных почв, как в экономическом, так и в экологическом плане является биотехнологический подход, основанный на использовании различных групп микроорганизмов, обладающих повышенной способностью к биодegradации нефтей и продуктов её переработки. Биологическую трансформацию органических соединений можно рассматривать как ряд сложных химических процессов, об-

щих для животного и растительного мира. Известно большое количество работ, посвященных трансформации углеводов микроорганизмами.

12.2. Биологическая очистка сточных вод

Проблема чистой воды является одной из актуальнейших проблем наступившего века. Для сохранения мест забора питьевой воды чистыми необходима качественная очистка сточных вод, производство которых в России достигает 500 литров в сутки на душу городского населения. В настоящее время разработаны и развиваются современные технологии очистки сточных вод. Наибольший интерес и перспективу имеют естественные и самые дешевые биологические методы очистки, представляющие собой интенсификацию природных процессов разложения органических соединений микроорганизмами в аэробных или анаэробных условиях. Очистка сточных вод подразумевает практически полное биологическое разложение органических соединений в воде. По существующим нормам, содержание органических веществ в очищенной воде не должно превышать 10 мг/л. Деградация органических веществ микроорганизмами в аэробных и в анаэробных условиях осуществляется с разными энергетическими балансами суммарных реакций. При аэробном биоокислении глюкозы 59% энергии, содержащейся в ней, расходуется на прирост биомассы и 41% составляют тепловые потери. Этим обусловлен активный рост аэробных микроорганизмов. Чем выше концентрация органических веществ в обрабатываемых стоках, тем сильнее разогрев, выше скорость роста микробной биомассы и накопления избыточного активного ила. При анаэробной деградации глюкозы с образованием метана лишь 8% энергии расходуется на прирост биомассы, 3% составляют тепловые потери и 89% переходит в метан. Анаэробные микроорганизмы растут медленно и нуждаются в высокой концентрации субстрата.

Аэробное микробное сообщество представлено разнообразными микроорганизмами, в основном бактериями, окисляющими различные органические вещества в большинстве случаев независимо друг от друга, хотя окисление некоторых веществ осуществляется путем соокисления (кометаболизм). Аэробное микробное сообщество активного ила систем аэробной очистки воды представлено исключительным биоразнообразием. В последние годы с помощью новых молекулярно-биологических методов, в частности специфических рРНК проб, в активном иле показано присутствие бактерий родов *Paracoccus*, *Caulobacter*, *Hyphomicrobium*, *Nitrobacter*, *Acinetobacter*, *Sphaerotilus*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Cytophaga*, *Flavobacterium*, *Flexibacter*, *Halisomonobacter*, *Artrobacter*, *Corynebacterium*, *Microtrix*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus*. Считается, однако, что к настоящему времени идентифицировано не более 5% видов микроорганизмов, участвующих в аэробной очистке воды. Следует отметить, что многие аэробные бактерии являются факультативными анаэробами. Они могут расти в отсутствие кислорода за счет других акцепторов электрона (анаэробное дыхание) или брожения (субстратное фосфорилирование). Продуктами их жизнедеятельности являются углекислота, водород, органические кислоты и спирты.

Анаэробная деградация органических веществ, при метаногенезе осуществляется как многоступенчатый процесс, в котором необходимо участие по меньшей мере четырех групп микроорганизмов: гидролитиков, броодильщиков, ацетогенов и метаногенов. В анаэробном сообществе между микроорганизмами существуют тесные и сложные взаимосвязи, имеющие аналогии в многоклеточных организмах, поскольку ввиду субстратной специфичности метаногенов, их развитие невозможно без трофической связи

с бактериями предыдущих стадий. В свою очередь метановые археи, используя вещества, продуцируемые первичными анаэробами, определяют скорость реакций, осуществляемых этими бактериями. Ключевую роль в анаэробной деградации органических веществ до метана играют метановые археи родов *Methanosarcina*, *Methanosaeta* (*Methanothrix*), *Methanomicrobium* и другие. При их отсутствии или недостатке анаэробное разложение заканчивается на стадии кислотогенного и ацетогенного брожения, что приводит к накоплению летучих жирных кислот, в основном масляной, пропионовой и уксусной, снижению рН и остановке процесса.

Преимуществом аэробной очистки является высокая скорость и использование веществ в низких концентрациях. Существенными недостатками, особенно при обработке концентрированных сточных вод, являются высокие энергозатраты на аэрацию и проблемы, связанные с обработкой и утилизацией больших количеств избыточного ила. Аэробный процесс используется при очистке бытовых, некоторых промышленных и свиноводческих сточных вод с ХПК не выше 2000. Преимуществом анаэробного процесса является также относительно незначительное образование микробной биомассы. К недостаткам следует отнести невозможность удаления органических загрязнений в низких концентрациях. Для глубокой очистки концентрированных сточных вод анаэробную обработку следует использовать в комбинации с последующей аэробной стадией. Выбор технологии и особенности обработки сточных вод определяются содержанием органических загрязнений в них.

Биопрепараты как средство для инициации и интенсификации очистки сточных вод

В настоящее время существует множество биопрепаратов, используемых для очистки сточных вод. Это консорциумы микроорганизмов, выделенные методом накопительных культур обычно из активного ила аэротенков городских сооружений очистки сточных вод. Они используются для очистки сточных вод местного значения, например в селах, дачных и коттеджных поселках, небольших поселках городского типа, мини-заводах и т.п. Биопрепараты, содержащие ограниченное число видов микроорганизмов, по спектру разлагаемых веществ уступают свежему активному илу. Однако, они содержат быстро растущие штаммы, которые иницируют процессы разложения органических загрязнений. В не стерильном процессе развиваются также микроорганизмы, содержащиеся в отходах, и в микробное сообщество включаются недостающие звенья.

Действие микроорганизмов биопрепаратов в том, что в процессе своей жизнедеятельности они вырабатывают ферменты, которые способны, расщеплять жиры, белки и другие сложные вещества органического происхождения на более простые органические вещества, которые легко разлагаются ими до углекислоты и простых соединений азота. Клетки микроорганизмов иногда иммобилизуют на твердом дисперсном носителе, который может служить дополнительным источником азота и фосфора. Препараты содержат ассоциации 6-12 штаммов аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов, обеспечивающих комплексную очистку сточной воды от органических загрязнителей: жиров, белков, сложных углеводов, и даже (специализированные) от нефтепродуктов. Аналогичные биоактиваторы, но с несколько другим составом, применяются так же при производстве компоста, в биотуалетах и т.п.

С экологической точки зрения захоронение органических отходов неприемлемо, по нескольким причинам. Во - первых, это потеря органического вещества: при ежегодном выносе питательных веществ с урожаем свыше 13 млн. т, возвращается в почву только

2,7 млн. т, что составляет 20% от выноса. Во - вторых, органические отходы на свалке - это основной источник санитарно-эпидемиологической опасности и неприятных запахов.

Хорошей альтернативой захоронению является компостирование. Цель компостирования – эффективно, и насколько возможно без запаха, провести деградацию органического материала - а также преобразование органики в устойчивые и доступные растениям гуминовые вещества. Это необходимо для того, чтобы произвести высококачественный продукт - быстро и с наименьшими затратами.

Кроме использования компоста в качестве эффективного органического удобрения или создания на его основе почвогрунтов, рентабельным и эффективным способом переработки является изготовление топливных брикетов и гранул. Топливные брикеты обладают высокой теплоемкостью и удобны в транспортировке. Компостные гранулы используются в качестве удобрения, за счет значительного уменьшения удельной поверхности, гранулы значительно увеличивают срок действия удобрения.

12.3. Переработка органических отходов

Одной из острейших проблем современной науки и практики является утилизация и переработка органических промышленных, бытовых и сельскохозяйственных отходов, которые чужды биосфере и не вписываются в естественный биологический круговорот, что приводит к загрязнению воздуха, воды, почвы и отрицательно сказывается на здоровье человека.

Вермикультура (от лат. *vermi* - червь) - использование дождевых червей для переработки органических отходов - является одним из перспективных направлений биотехнологии. В настоящее время преобладающей тенденцией является культивирование красного калифорнийского червя - выведенной селекционным путем линии навозного червя, которая отличается значительной плодовитостью, утратой инстинкта покидания своего местообитания при неблагоприятных условиях среды, высокой степенью адаптации к переработке специфических видов отходов. Таковыми могут служить различные субстанции органического происхождения, например навоз и помет сельскохозяйственных животных, отходы мясокомбинатов, рыбоперерабатывающей, целлюлозной промышленности, овощей и фруктов, бумага, картон, опилки, осадки городских и производственных очистных станций. Работа комплекса по переработке органических отходов посредством использования вермикультуры как в стационарном, так и в мобильном исполнении может быть существенно интенсифицирована путем внедрения установок вермикомпостирования непрерывного действия. Среди таких наиболее приемлемыми являются система вермикомпостирования с непрерывной подачей отходов сверху и выгрузкой готового биогумуса снизу и технология непрерывного наращивания из отходов так называемой кормовой цепи путем добавления свежего корма.

Анализ мирового опыта вермикомпостирования органических отходов различного происхождения свидетельствует о реальной, технологически обоснованной возможности устранения критической антропогенной нагрузки на окружающую среду наряду с производством экологически чистых органических удобрений и кормового белка.

Одной из основных экологических проблем на предприятиях топливно-энергетического комплекса являются аварии на нефтепроводах, в связи с их износом, старением, а также при перевозках нефти и нефтепродуктов различными видами транспорта. Немаловажное значение в последние годы приобрели также аварии на трубопро-

водах, в связи с несанкционированными врезками в нефте- и продуктопроводы с целью хищения нефтепродуктов и, как следствие, аварийные локальные загрязнения почвы площадью 1-2 га и объемом нефтезагрязненной почвы от 3000 до 10000 м³ с нефтесодержанием от 100 до 400 г/кг. Создавшееся положение диктует необходимость принципиально новых подходов к ликвидации аварийных разливов на почве, разработки научно-методических основ, приемов и технологий ее реабилитации.

12.4. Биоремедиация почв

Одним из факторов, сдерживающих решение этой проблемы, является отсутствие в нормативных и директивных документах реальных критериев оценки уровня загрязнения нефтью и нефтепродуктами почвы и грунта, экологической и экономической обоснованности применения различных методов ликвидации последствий аварийных разливов нефти на почве, с учетом зарубежного и отечественного опыта. Почвы и грунты считаются загрязненными, когда концентрация нефтепродуктов в них достигает такой величины, при которой начинаются негативные экологические изменения в окружающей среде: нарушается экологическое равновесие в почвенной экосистеме, гибнет почвенная биота, падает продуктивность или наступает гибель растений, происходит изменение морфологии, водно-физических свойств почв, падает их плодородие, создается опасность загрязнения подземных и поверхностных вод в результате вымывания нефтепродуктов из почвы или грунта и их растворения в воде. Определение уровня загрязнения почвы необходимо для решения вопроса о целесообразности проведения специальных работ по санации почвы. Небезопасным уровнем загрязнения почвы считается уровень, который превышает предел потенциала самоочищения.

В мировой практике для обезвреживания почвы, загрязненной нефтепродуктами, применяются различные методы. К первой группе относятся методы, предусматривающие выемку загрязненного грунта и последующие мероприятия по утилизации загрязнения:

–Запахивание в почву на неудобьях. При этом способе санации почву, загрязненную нефтью и нефтепродуктами, распределяют по поверхности разрыхленного грунта из расчета 10 кг/ м². При таком способе санации срок детоксикации загрязненного грунта не превышает трех лет, но может быть сокращен до одного года при условии интенсификации процесса биodeградации;

–Вывоз на свалку. Загрязненный нефтью и нефтепродуктами грунт и твердые материалы добавляют к отходам на городских свалках в количестве 1-2 % от общего количества сдаваемых на свалку отходов. Срок утилизации – 3-5 лет;

–Выемка загрязненного грунта и вывоз на специально подготовленные площадки – полевые грядки (метод "Ландфарминга"). Срок утилизации - 1 год;

–Санирование в кагатах, которое предусматривает выемку загрязненной почвы и укладку её в форме кагата высотой 0,4-2 м. После этого производится орошение кагата суспензией биомассы микроорганизмов и питательных веществ. Срок утилизации – 2 года;

–Обработка загрязненного нефтью грунта в стационарных условиях на двух-трех блочных линиях грубой и тонкой очистки, позволяющих максимально извлечь и подготовить до заданных параметров нефть, а грунт с концентрацией нефтепродуктов не более 15 г/кг возвращается на участок, из которого был изъят, затем следует период

рекультивации территории (технологии АО «ГенЭКО», Россия; LRS-технология, США и др.).

Вторая группа методов включает проведение биоремедиационных мероприятий непосредственно на участке загрязнения:

–Обработка почвы селекционированными нефтеокисляющими штаммами микроорганизмов в сочетании с введением комплексных минеральных удобрений;

–Обработка нефтезагрязненной почвы стимуляторами роста аборигенной нефтеокисляющей микрофлоры;

Эти технологии в настоящее время относятся к наиболее широко применяемым биотехнологическим методам ликвидации нефтяного загрязнения почвы.

–Выжигание разлитой нефти или нефтепродуктов на месте разлива. Недостаток метода – утилизация нефти только в поверхностном слое почвы, при этом в местах прокаливания уничтожаются природные биоценозы, происходит загрязнение атмосферного воздуха продуктами горения.

Существуют и другие методы санирования почвы: сепарация, высокотемпературный обжиг, обработка паром и др. Однако, эти методы, требующие использования специального оборудования, не вышли за рамки экспериментальных разработок.

Изучение отечественной и зарубежной литературы, методических материалов, отчетов ликвидаторов нефтяного загрязнения, а также анализ проведенных научно-исследовательских и практических работ по ликвидации аварийных разливов нефти и нефтепродуктов в различных регионах СНГ, дает возможность предложить следующую концепцию ликвидации нефтезагрязнения почвы как комплекса мероприятий, включающих:

а) локализацию нефтяного загрязнения;

б) сбор товарных нефтепродуктов, а также загрязненных растительных остатков, мусора для переработки или утилизации;

в) химическую мелиорацию (применение минералов – бентонитовых глин, карбонатных силикатов, бокситовых руд; гашеной извести и др. для химической деградации нефти);

г) биоремедиацию – очистку нефтезагрязненной почвы и воды с использованием препаратов углеводородоокисляющих микроорганизмов, биогенных добавок для дополнительного их питания или специальных препаратов, содержащих биологически позитивные эмульгаторы, ферменты, сахара, минеральные соли, необходимые для стимуляции аборигенной нефтеокисляющей микрофлоры. Важным элементом биоремедиации нефтезагрязненных почв на финишном этапе очистки может быть использование олигохет *Eisenia foetida*, *E. irregularis*.

д) биологическую рекультивацию (фитомелиорацию) земель, предназначенных для сельскохозяйственного использования (внедрение севооборотов, включающих растения, в дальнейшем используемые в качестве сидератов; внесение повышенных доз минеральных удобрений; мульчирование и др.).

Из всех нефтеокисляющих микроорганизмов в природе наиболее широко распространены бактерии рода *Pseudomonas*. Они являются постоянными обитателями вод Мирового океана, внутренних водоемов, почвы и грунтов. Более 50 видов этого рода способны участвовать в биоразложении нефти в окружающей среде. Наиболее активная нефтеокисляющая способность выявлена у *P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. fluorescens*. О широком распространении и пластичности вида *P. fluorescens* свидетельствуют факты

выделения этого вида из почвы, пресноводных и морских водоемов, пластовых вод, донных отложений. Высокая углеводородокисляющая активность, эмульгирующие свойства псевдомонад, способность расщеплять углеводороды, как в аэробных условиях, так и в условиях дефицита кислорода, позволяет использовать наиболее активные штаммы для борьбы с нефтяным загрязнением воды и почвы.

Вопросы для самоконтроля

- 1) Биотрансформация органических ксенобиотиков.
- 2) Биотрансформация природных полимеров.
- 3) Биологическая очистка сточных вод.
- 4) Переработка органических отходов.
- 5) Биоремедиация почв.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. **Коростелева, Н.И.** Биотехнология: учебное пособие / Н.И. Коростелева, Т.В. Громова, И.Г. Жукова. - Барнаул: Изд-во АГАУ, 2006. - 127 с.
2. **Котова, И.Б.** Общая микробиология / И.Б. Котова, А.И. Нетрусов. – М.: Академия, 2007. – 352 с.
3. **Матвеева, О.Н.** Трансформация углеводородного загрязнения в почве под действием биодеструкторов /О.Н. Матвеева : дис. ... канд. хим. наук. – Иркутск, 2006. – 110 с.

Дополнительная

1. **Елинов, Н.П.** Основы биотехнологии / Н.П. Елинов. – СПб.: ИФ “Наука”, 1995. – 600 с.
2. **Емцев, В.Т.** Микробиология / В.Т. Емцев, Е.Н. Мишустин. – М.: Дрофа, 2005. – 289 с.
3. **Сассон, А.** Биотехнология: Сверхшения и надежды / А. Сассон. – М.: Мир, 1987. – 411 с.

Лекция 13

КЛЕТОЧНАЯ И ТКАНЕВАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ В СЕЛЕКЦИИ И РАСТЕНИЕВОДСТВЕ

13.1. Культура клеток и тканей

Клеточная биотехнология базируется на способности клеток к существованию и размножению *in vitro*, их тотипотентности и регенерации. Метод культивирования изолированных тканей на искусственных питательных средах в стерильных условиях (*in vitro*) используют в биотехнологии для сохранения и размножения ценных генотипов, эмбриогенезе, оздоровлении посадочного материала и т.д.

Роль культуры изолированных клеток и тканей в биотехнологии следует рассматривать в трех направлениях.

Первое связано со способностью изолированных растительных клеток продуцировать ценные для медицины, парфюмерии, косметики и других отраслей промышленности вещества вторичного синтеза: алкалоиды, стероиды, гликозиды, гормоны, эфирные масла и др. Как правило, вторичные вещества получают из каллусной ткани, выращенной на твердой (агаризованной) или жидкой (суспензионная культура) питательной среде. На основе клеточных технологий получают такие медицинские препараты, как диосгенин из клеток диоскореи, аймолин из клеток раувольфии змеиной, тонизирующие вещества из клеток женьшеня, используемые в медицине и парфюмерии. Продуктивность культивируемых клеток в результате клеточной селекции может значительно превышать продуктивность целых растений. Преимуществом такого способа получения веществ вторичного синтеза является также возможность использовать для этой цели растения, не произрастающие в наших природных условиях, и получать продукцию круглый год.

Второе направление - это использование культуры изолированных тканей для размножения и оздоровления посадочного материала. Этот метод, названный клональным микроразмножением растений, позволяет получать от одной меристемы сотни тысяч растений в год.

Третье направление - использование изолированных клеток в селекции растений, дающее возможность получать быстрорастущие растения, устойчивые к различным неблагоприятным факторам среды: засуха-засоление, низкие и высокие температуры, фитопатогены, тяжелые металлы и др. Вместе с тем это направление предусматривает создание новых растений путем слияния изолированных протопластов и получения неполовых (соматических) гибридов. Перенос в изолированные протопласты чужеродных генов методами генной инженерии позволяет получать в дальнейшем растения с новыми наследуемыми свойствами. Культивирование изолированных пыльников и семяпочек на искусственных питательных средах дает возможность получать гаплоиды, культивирование зародышей позволяет получать растения из нескрещиваемых (с плохо развитым эндоспермом) гибридных семян. Оплодотворение в пробирке позволяет преодолеть нескрещиваемость некоторых растений.

Успех в применении культуры клеток и тканей в первую очередь зависит от оптимизации физиологических процессов, обеспечивающих нормальное деление клеток, их дифференцировку и регенерацию из них взрослых растений. Наиболее сложной являет-

ся регенерация растений из отдельных клеток. В первую очередь это касается злаковых растений. Поэтому важнейшее значение имеет выяснение механизма морфогенеза *in vitro*, регенерации и лежащих в их основе процессов.

13.2. Культура каллусных тканей

Культура изолированных тканей обычно бывает представлена каллусными или реже - опухолевыми тканями. Каллусная культура - это неорганизованная пролиферирующая ткань, состоящая из дедифференцированных клеток. В дальнейшем они специализируются как каллусные, т. е. становятся особым образом дифференцированными. Каллус, что означает «мозоль», может образовываться как на изолированных кусочках ткани (эксплантах) *in vitro*, так и на растении при поранении.

Каллусная ткань *in vitro* в основном бывает белого или желтоватого, реже светло-зеленого цвета. Очень редко она может иметь интенсивную зеленую окраску (у мандрагоры). Темно-коричневая окраска возникает чаще при старении каллусных клеток и связана с накоплением в них фенолов. Последние окисляются в хиноны. Для избавления от них в питательные среды вносят антиоксиданты.

Каллусная ткань аморфна и не имеет конкретной анатомической структуры, но в зависимости от происхождения и условий выращивания она может быть разной консистенции: 1) рыхлой, состоящей из сильно овоидных клеток, легко распадающейся на отдельные мелкие агрегаты; 2) средней плотности, с хорошо выраженными меристематическими очагами; 3) плотной, в которой дифференцируются элементы камбия и проводящей системы.

Обязательным условием дедифференцировки растительной клетки и превращения ее в каллусную является присутствие в питательной среде представителей двух групп фитогормонов: ауксинов и цитокининов. Ауксины вызывают процесс дедифференцировки клетки, подготавливающий ее к делению, а цитокинины - пролиферацию (деление) дедифференцированных клеток (рис. 3.1). Если в питательную среду без гормонов поместить кусочек стебля, листа, корня (без верхушки) или любой другой растительный эксплант, состоящий из специализированных (дифференцированных) клеток, то деления клеток не произойдет и каллусная ткань не образуется. Это связано с неспособностью дифференцированных клеток к делению. Каждая клетка проходит три фазы роста: 1) деление; 2) растяжение; 3) дифференцировку. Характерной чертой заключительной фазы роста является утолщение вторичной клеточной оболочки и потеря клеткой способности к делению. Для того чтобы дифференцированные клетки вновь приобрели способность к делению, необходимо, чтобы произошла их дедифференцировка, т. е. клетки как бы возвратились в меристематическое состояние. Размножение дедифференцированных клеток приводит к анархическому, неорганизованному росту, в результате чего образуется каллусная ткань. Таким образом, превращение специализированной клетки в каллусную связано с индукцией клеточного деления, способность к которому она потеряла в процессе дифференцировки.

13.3. Клональное микроразмножение растений

Для семенных растений характерно два способа размножения: семенной и вегетативный. Оба эти способа имеют как преимущества, так и недостатки. К недостаткам семенного размножения следует отнести, в первую очередь, генетическую пестроту по-

лучаемого посадочного материала и длительность ювенильного периода. При вегетативном размножении сохраняется генотип материнского растения и сокращается продолжительность ювенильного периода. Однако для большинства видов (в первую очередь для древесных пород) проблема вегетативного размножения остается до конца нерешенной. Это обусловлено следующими причинами: 1) не все породы, даже на ювенильной стадии, могут размножаться вегетативным способом с требуемой эффективностью (дуб, сосна, ель, орехоплодные и др.); 2) практически невозможно с помощью черенкования размножить многие виды древесных пород в возрасте старше 10—15 лет; 3) не всегда удается получить стандартный посадочный материал (возможность накопления и передачи инфекции); 4) трудоемкостью и сложностью операций при размножении взрослых (древесных) растений с помощью прививок; 5) неэффективностью разработанных технологий для получения достаточного количества генетически однородного материала в течение года.

Достижения в области культуры клеток и тканей привели к созданию принципиально нового метода вегетативного размножения - клонального микроразмножения (получение в условиях *in vitro* (в пробирке), неполовым путем растений, генетически идентичных исходному экземпляру). В основе метода лежит уникальная способность растительной клетки реализовывать присущую ей тотипотентность, т. е. под влиянием экзогенных воздействий давать начало целому растительному организму. Этот метод, несомненно, имеет ряд преимуществ перед существующими традиционными способами размножения:

- получение генетически однородного посадочного материала;
- освобождение растений от вирусов за счет использования мери-стемной культуры;
- высокий коэффициент размножения (10^5 — 10^6 — для травянистых, цветочных растений, 10^4 — 10^5 — для кустарниковых древесных, 10^* — для хвойных);
- сокращение продолжительности селекционного процесса;
- ускорение перехода растений от ювенильной к репродуктивной фазе развития;
- размножение растений, трудно размножаемых традиционными способами;
- возможность проведения работ в течение года и экономия площадей, необходимых для выращивания посадочного материала;
- возможность автоматизации процесса выращивания.

Первые достижения в области клонального микроразмножения были получены в конце 50-х годов XX столетия французским ученым Жоржем Морелем, которому удалось получить первые растения-регенеранты орхидей. Успеху Ж. Мореля в микроразмножении способствовала уже разработанная к тому времени техника культивирования апикальной меристемы растений в условиях *in vitro*. Как правило, исследователи в качестве первичного экспланта использовали верхушечные меристемы травянистых растений: гвоздики, хризантемы, подсолнечника, гороха, кукурузы, одуванчика, салата и изучали влияние состава питательной среды на процессы регенерации и формирования растений. Ж. Морель в своих работах также использовал верхушку цимбидиума (сем. орхидные) состоящую из конуса нарастания и двух-трех листовых зачатков, из которой при определенных условиях наблюдал образование сферических сфер-протокормов. Сформировавшиеся протокормы можно было делить и затем культивировать самостоятельно на вновь приготовленной мигательной среде до образования листовых примордиев и корней. В результате им было обнаружено, что этот процесс бесконечен и мож-

но получать в большом количестве высококачественный и генетически однородный, безвирусный посадочный материал.

В нашей стране работы по клональному микроразмножению были начаты в 60-х годах в лаборатории культуры тканей и морфогенеза Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Под руководством проф. Р.Г. Бутенко были изучены условия микроразмножения картофеля, сахарной свеклы, гвоздики, герберы, фрезии и некоторых других растений и предложены промышленные технологии.

Таким образом, первые успехи в клональном микроразмножении связаны с культивированием апикальных меристем травянистых растений на соответствующих питательных средах, обеспечивающих в конечном итоге получение растений-регенерантов.

Однако область применения микроразмножения разнообразна и имеет тенденцию к постоянному расширению. Это в первую очередь относится к размножению *in vitro* взрослых древесных пород, особенно хвойных, и использование техники *in vitro* для сохранения редких и исчезающих видов лекарственных растений. В настоящее время в этом направлении наметился положительный сдвиг.

Первые работы по культуре тканей древесных растений были опубликованы в середине 20-х годов XX столетия и связаны с именем французского ученого Готре. В них сообщалось о способности камбиальных тканей некоторых видов вяза и сосны к каллусогенезу *in vitro*. В последующих работах 40-х годов было выяснено о способности различных тканей вяза листового к образованию адвентивных почек. Однако дальнейший рост и формирование побегов авторами не были получены. Лишь к середине 60-х годов Матесу удалось получить первые растения-регенеранты осины, которые были доведены до почвенной культуры. Культивирование тканей хвойных пород *in vitro* долгое время использовалось как объект исследования. Это было связано со специфическими трудностями культивирования ювенильных и тем более взрослых тканей, изолированных с растения. Известно, что древесные, и особенно хвойные, характеризуются медленным ростом, трудно укореняются, содержат большое количество вторичных соединений (фенолы, терпены и другие вещества), которые в изолированных тканях окисляются различными фенолазами. В свою очередь, продукты окисления фенолов обычно ингибируют деление и рост клеток, что ведет к гибели первичного экспланта или к уменьшению способности тканей древесных пород к регенерации адвентивных почек, которая с возрастом растения-донора постепенно исчезает полностью. Однако, несмотря на все трудности, ученые все чаще используют в качестве объектов исследований различные ткани и органы древесных растений. В настоящее время насчитывается более 200 видов древесных растений из 40 семейств, которые были размножены *in vitro* (каштан, дуб, береза, клен, осина, гибриды тополей с осинкой, сосна, ель, секвойя и др.), а работы в этом направлении ведутся в научных учреждениях Москвы, Санкт-Петербурга, Воронежа, Уфы, Новосибирска, Архангельска, Киева, Одессы, Ялты и др.

13.4. Культура изолированных клеток и тканей в селекции растений

Одно из направлений клеточных технологий — это использование их в селекции, которое облегчает и ускоряет традиционный селекционный процесс в создании новых форм и сортов растений. Существующие методы культивирования изолированных клеток и тканей *in vitro* условно можно разделить на две группы. 132

Первая группа - это вспомогательные технологии, которые не подменяют обычную селекцию, а служат ей. К ним можно отнести: оплодотворение *in vitro* (преодоление

прогамией несовместимости), культивирование семян и незрелых гибридных зародышей (преодоление по-сгамией несовместимости), получение гаплоидов путем культивирования пыльников и микроспор, криосохранение изолированных клеток, тканей и органов, клональное микроразмножение отдаленных гибридов.

Вторая группа методов ведет к самостоятельному, независимому от традиционных методов селекции, получению новых форм и сортов растений: клеточная селекция с использованием каллусной ткани, соматическая гибридизация (слияние изолированных протопластов и получение неполовых гибридов), применение методов генной инженерии.

Вопросы для самоконтроля

- 1) Каковы главные направления использования культуры изолированных клеток и тканей растений в биотехнологии?
- 2) Что такое каллусная ткань? Как получить каллусную ткань и каковы возможности ее использования в биотехнологии?
- 3) Что такое клональное микроразмножение растений?
- 4) Методы культивирования изолированных клеток и тканей *in vitro*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. **Клунова, С.М.** Биотехнология: учебник / С.М. Клунова, Т.А. Егорова, Е.А. Живухина. – М.: Академия, 2010. – 256 с.
2. **Коростелева, Н.И.** Биотехнология: учебное пособие / Н.И. Коростелева, Т.В. Громова, И.Г. Жукова. - Барнаул: Изд-во АГАУ, 2006. - 127 с.
3. **Сазыкин, Ю.О.** Биотехнология / Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева; под ред. А.В. Катлинского. - М.: Академия, 2008. – 256 с.
4. **Тихомирова Е.И.** Введение в биотехнологию / Е.И. Тихомирова, В.А. Спивак, О.Ю. Ксенофонтова. – Саратов: Изд-во Саратовского ун-та, 2006. – 64 с.

Дополнительная

1. **Бутенко, Р.Г.** Культура клеток растений и биотехнология / Р.Г. Бутенко. – М.: Наука, 1986. – 272 с.
2. **Глеба, Ю.Ю.** Клеточная инженерия растений / Ю.Ю. Глеба, К.М. Сытник. – Киев: Наукова думка, 1984. – 160 с.
3. **Катаева, Н.В.** Клональное микроразмножение растений / Н.В. Катаева, Р.Г. Бутенко. – М.: Наука, 1983. – 96 с.
4. Основы сельскохозяйственной биотехнологии / Г.С. Муромцев [и др.]. – М.: Мир, 1987. – 384 с.
5. Сельскохозяйственная биотехнология / В.С. Шевелуха [и др.]. – М.: Высшая школа, 2003. – 427 с.
6. **Сидоров, В.А.** Биотехнология растений. Клеточная селекция / В.А. Сидоров. – Киев: Наукова думка, 1990. – 360 с.

Лекция 14

БИОТЕХНОЛОГИЯ В ЖИВОТНОВОДСТВЕ И В ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЕ

14.1. Клонирование животных

Число потомков от одной особи, как правило, у высших животных бывает небольшим, а специфический комплекс генов, определяющий высокую продуктивность, возникает редко и в последующих поколениях претерпевает значительные изменения. Вместе с тем известно, что ядро соматической клетки обладает полной генетической информацией о данном организме, и если создать условия для реализации этой информации, то можно получить практически неограниченное число генетических копий (клонов) определенной особи. Поскольку ядра большинства соматических клеток находятся в дифференцированном состоянии, то эту задачу на первом этапе решали, используя эмбриональные клетки на определенной стадии развития зародыша, когда еще не произошла их дифференциация. Пересадка ядер (бластомеров) в зрелые ооциты дает такую возможность, потому что цитоплазма ооцитов содержит специфические факторы, способные репрограммировать пересаженное ядро и запускать программу развития нового эмбриона.

Получение однойцовых близнецов имеет большое значение для животноводства. С одной стороны, увеличивается выход телят от одного донора, а с другой - появляются генетически идентичные двойни. Получение идентичных двоен в большом количестве могло бы облегчить оценку быков по качеству потомства, уменьшить стоимость спермопродукции, ускорить и удешевить тестирование препаратов и упростить исследования в области кормления животных.

Клонирование эмбрионов путем пересадки ядер эмбриональных клеток в энуклеированные яйцеклетки. После пересадки ядер эмбриональных клеток в энуклеированные яйцеклетки ядро репрограммируется таким образом, что начинает развиваться новый эмбрион. Теоретически все бластомеры из эмбриона донора имеют одну и ту же генетическую основу и, таким образом, способны обеспечить развитие идентичных особей. Эмбрионы, развившиеся после пересадки ядер, в свою очередь, могут быть использованы как доноры ядер. После нескольких генераций создается возможность получения сотен и даже тысяч идентичных эмбрионов.

Клонирование животных путем пересадки ядер соматических клеток в энуклеированные яйцеклетки. Накопленный опыт клонирования эмбрионов путем пересадки ядер тотипотентных клеток из эмбрионов в энуклеированные яйцеклетки послужил базой для разработки метода клонирования животных путем пересадки ядер соматических клеток в энуклеированные яйцеклетки. Принципиальное отличие состоит в том, что клонирование путем пересадки ядер эмбриональных клеток обеспечивает получение идентичных животных между собой, тогда как пересадка ядер соматических клеток взрослого животного обеспечивает получение не только одинаковых между собой животных, но и идентичных по генотипу с животным-донором соматических клеток. Это открывает возможность получать неограниченное число генетически идентичных потомков уже в первом поколении. Нет необходимости объяснять, насколько революционным может быть этот прием в селекции и разведении сельскохозяйственных животных.

14.2. Получение трансгенных животных

Микроинъекции гена. Получение трансгенных животных путем микроинъекции гена включает извлечение эмбрионов на стадии пронуклеуса хирургическим путем или после убоя доноров. Для получения оплодотворенных яйцеклеток, необходимых для микроинъекции, у животных гормональной обработкой вызывают суперовуляцию по определенной для каждого вида схеме, а затем извлекают яйцеклетки промывая яйцеводы у наркотизированных или убитых животных.

Пересадка трансфицированных ядер открывает возможность пересаживать только трансгенные эмбрионы, т.к. при этом используются ядра клеток, отобранные на основе трансгенной интеграции. В связи с этим, любой новорожденный организм, полученный после трансплантации этих реконструированных эмбрионов, будет трансгенным и последующая селекция трансгенных эмбрионов не требуется.

Ретровирусные векторы – получение животных путем введения гена с ретровирусным вектором непосредственно в ооцит. Несмотря на то, что эта система ограничена размером трансгенов, в связи с ограничениями ретровирусного вектора, она представляет альтернативный метод для тех видов, у которых возможно оплодотворение *in vitro*.

Использование сперматозоидов в качестве векторов экзогенного ДНК до последнего времени остается противоречивой и спорной.

14.3. Создание разных типов трансгенных животных

Трансгенные животные с новыми хозяйственно-полезными свойствами (увеличение скорости роста, повышения надоев, качества продукции), с устойчивостью к заболеваниям. Применение техники трансгеноза для улучшения состава молока. Трансгенные животные, продуцирующие биологически активные вещества медицинского и технологического назначения.

14.4. Биотехнология в ветеринарной медицине

Вакцинация - один из основополагающих способов борьбы с инфекционными заболеваниями. Путем поголовной вакцинации животных ликвидирована натуральная оспа, резко ограничено распространение бешенства, ящура и многих других заболеваний. Большое экономическое значение имеет своевременная разработка вакцин против болезней сельскохозяйственных животных и проводимая с их помощью профилактика. Традиционные вакцинные препараты изготавливают на основе ослабленных или инактивированных возбудителей болезней с использованием различных питательных сред по общепринятым или вновь разработанным технологиям.

Современные *биотехнологические* разработки предусматривают создание многочисленных вариантов вакцинных препаратов, наибольший интерес из которых представляют *рекомбинантные вакцины* и *вакцины-антигены*. Вакцины обоих типов основаны на генно-инженерном подходе.

Для получения *рекомбинантных вакцин* обычно используют хорошо известный вирус коровьей оспы (осповакцины). В его ДНК встраивают чужеродные гены, кодирующие им-

муногенные белки различных возбудителей: гемагглютинин вируса гриппа, гликопротеин D вируса герпеса, поверхностный антиген вируса гепатита В, антиген малярийного плазмодия. К достоинствам вакцин, полученных генно-инженерными методами, относится возможность создания поливалентных препаратов на основе объединения участков ДНК различных патогенов «под эгидой» ДНК вируса осповакцины. Открывается возможность одномоментной комплексной иммунизации крупного рогатого скота и других видов животных против всех опасных инфекций данной местности.

Вакцины - антигены, получают, клонируя гены возбудителя болезни в *E. coli*, дрожжах, клетках насекомых и млекопитающих. В настоящее время клонирован ген поверхностного антигена НВS-вируса гепатита (сывороточного гепатита), ген белка оболочки VPI - вируса ящура. Вирус ящура существует в виде многих серотипов. Методом белковой инженерии удалось скомбинировать иммуногенные компоненты различных серотипов в рамках одной вакцины-антигена. Вакцины-антигены высокостабильны при хранении и перевозке, сравнительно просты в использовании, в том числе и при крупномасштабном производстве, содержат минимальное количество белка и поэтому малоопасны как аллергены. К сожалению, пока остается проблема низкой иммуногенности вакцин-антигенов.

Не ослабевает внимание ученых к поиску новых антибиотиков, что связано с токсичностью существующих препаратов, аллергическими реакциями, вызываемые ими, нарастанием устойчивости патогенных микроорганизмов к применяемым препаратам, а также с необходимостью изыскания средств борьбы с возбудителями, против которых недостаточно эффективны известные антибиотики.

Важной задачей является повышение эффективности биосинтеза известных антибиотиков. Значительных результатов ученым и практикам удалось добиться в селекции штаммов-продуцентов с применением индуцированного мутагенеза и многоступенчатого отбора. Например, продуктивность штаммов *Penicillium* по синтезу пенициллина увеличена в сотни раз. Определенные перспективы открываются в связи с возможностью клонирования генов «узких мест» биосинтеза антибиотика или в случае, если все биосинтетические ферменты кодируются единым опероном.

Перспективным подходом является инкапсулирование антибиотиков, в частности их включение в липосомы, что позволяет прицельно доставлять препарат к определенным органам и тканям, повышает его эффективность и снижает побочное действие. Этот подход применим и для других лекарственных препаратов. Например, калазар, болезнь, вызываемая лейшманией, поддается лечению препаратами сурьмы. Однако лечебная доза этих препаратов токсична для человека. В составе липосом препараты сурьмы избирательно доставляются к органам, пораженным лейшманией, - селезенке и печени.

Вместо антибиотика в организм человека может вводиться его продуцент, антагонист возбудителя заболевания. Этот подход берет начало с работ И.И. Мечникова о подавлении гнилостной микрофлоры в толстом кишечнике человека посредством молочнокислых бактерий. Важную роль в возникновении кариеса зубов играет обитающая во рту бактерия *S. mutans*, которая при введении в ротовую полость почти не образует коррозивных кислот, вытесняя дикий штамм.

Большое значение в связи с интенсификацией животноводства отводится профилактике инфекционных заболеваний сельскохозяйственных Животных с применением рекомбинантных живых вакцин и генно-инженерных вакцин-антигенов, ранней диагностики этих заболеваний с помощью моноклональных антител и ДНК/РНК-проб.

До недавнего времени считалось, что наиболее реальным подходом является микробиологический синтез тех поверхностных белков вирусов или бактерий, в которых локализованы главные антигенные детерминанты. Идя по этому пути, уже ставшим традиционным для технологии рекомбинантной ДНК, удалось достичь определенных успехов. Так, осуществлена экспрессия в бактериях вирусных генов, кодирующих геммаглобулин, поверхностные белки вируса гриппа, ящура и некоторых других вирусов. Однако ни один из этих оболочечных белков, успешно синтезируемых на матрице рекомбинантных плазмид в бактериальной клетке, не стал, и вряд ли в ближайшем будущем станет вакциной субъединичного типа. Это связано с тем, что вирусные белки, синтезированные в бактериальной системе, уступают по иммуногенности и по выходу продуктов эукариотического синтеза. Сегодня широко применяется противоящурная синтетическая вакцина, представляющая собой олигопептид, несущий главную антигенную детерминанту и связанный с ним носитель. Такие вакцины абсолютно безопасны. Они не обладают побочным действием, но их производство обходится пока дорого. Более перспективным и технологичным является генно-инженерный путь синтеза полиантигенных детерминант к нескольким видам или серотипам вирусов. Антигенные детерминанты должны быть встроены в молекулы белка носителя, специально сконструированного таким образом, чтобы обеспечить экспонирование детерминантных участков белковой молекулы. Такая задача является вполне разрешимой, разработанным методом, позволяющим рассчитывать вторичную и третичную структуры белков в растворе. В этом случае иммуногенная активность таких белков не будет зависеть от их способности формировать мультимерные агрегаты. Их иммуногенность должна однозначно определяться первичной структурой молекулярной полипептидной цепи. В этом случае полиантигенные генно-инженерные вакцины второго поколения, разработка которых уже началась, окажутся технологичными и в микробной системе.

В настоящее время для профилактики инфекционных болезней животных получены генно-инженерные вакцины против ящура, бешенства, Диареи свиней и других вирусных болезней. Разработаны препараты против бактериальных инфекций. Например, в США открыт белок, токсичный для стафилококков, которые в 55 % случаев являются причиной мастита у КРС. Лабораторные исследования показали, что этот белок действует в течение нескольких минут и убивает клетки антибиотико-резистентных штаммов.

Задача конструирования и производства генно-инженерных вакцин будущего может быть решена лишь как составная часть фундаментальной проблемы - создание методами генной инженерии искусственных белков с заранее заданными свойствами и структурой.

Рекомбинантные ДНК могут быть широко использованы для выявления возбудителей методом молекулярной гибридизации. Этот метод позволяет быстро и точно диагностировать инфекционные болезни, может использоваться для пренатального диагноза генетических дефектов, выявления животных - носителей возбудителя. Метод основан на использовании зондов - ДНК, меченных радиоактивными соединениями или биочипами, с последующей гибридизацией зондов с образцами ткани животного - носителя возбудителя болезни. Это особенно ценно для выявления скрытых инфекций (хламидиозы, медленные инфекции). Использование молекулярных зондов на основе ДНК позволяет идентифицировать близких по своим свойствам возбудителей.

Как в медицине, в ветеринарной науке в перспективе возможно применение генно-терапевтических методов лечения наследственных заболеваний. Искусственное исправление генома особо ценных животных может и должно быть осуществлено. Принципиальная схема такой технологии и ее экспериментальная проверка в медицине проводится. Пересадка определенного количества клеток с нормальным геномом может при определенных условиях дать положительный конечный результат. Эти условия изучаются и проверяются в медицинской практике.

Таким образом, применение биотехнологии и прежде всего генетической инженерии в ветеринарной медицине открывает широкие возможности для более эффективного решения главной задачи - обеспечения санитарного благополучия в животноводстве и получения безопасной для человека животноводческой продукции.

Вопросы для самоконтроля

- 1) Методы клонирования животных.
- 2) Получение трансгенных животных.
- 3) Перспективы развития ветеринарной биотехнологии.
- 4) Биотехнологические и другие методы создания новых вакцинных препаратов.
- 5) Основные пути защиты животных от инфекционных заболеваний биотехнологическими методами.
- 6) Генно-инженерные методы устойчивости животных к инфекционным заболеваниям.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. **Клунова, С.М.** Биотехнология: учебник / С.М. Клунова, Т.А. Егорова, Е.А. Живухина. – М.: Академия, 2010. – 256 с.
2. **Коростелева, Н.И.** Биотехнология: учебное пособие / Н.И. Коростелева, Т.В. Громова, И.Г. Жукова. - Барнаул: Изд-во АГАУ, 2006. - 127 с.
3. **Сазыкин, Ю.О.** Биотехнология / Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева; под ред. А.В. Катлинского. - М.: Академия, 2008. – 256 с.

Дополнительная

1. **Баев, А.А.** Биотехнология / А.А. Баев. – М.: Наука, 1984. – 320 с.
2. Биотехнология в животноводстве / В.Ф. Красота [и др.]. – М.: Колос, 1994. – 293 с.
3. Сельскохозяйственная биотехнология / В.С. Шевелуха [и др.]. – М.: Высшая школа, 2003. – 427 с.
4. **Эрнст, Л.К.** Биотехнология сельскохозяйственных животных / Л.К. Эрнст, М.И. Прокофьев. – М.: Колос, 1995. – 192 с.

Лекция 15

БИОТЕХНОЛОГИЯ И БИОБЕЗОПАСНОСТЬ

Биотехнология и ее фундаментальное, стратегическое ядро - биоинженерия, затрагивают коренные механизмы формирования важнейших свойств живых организмов - наследственность, изменчивость, энерго-и массообмен, адаптацию и устойчивость, продуктивность и качество. Искусственное вмешательство в генетические структуры, их модификация в целях совершенствования биологических объектов вызывают структурную и функциональную перестройки, последствия которых не всегда могут быть точно и своевременно спрогнозированы, что вызывает серьезное беспокойство людей во многих странах Западной Европы и мира, в том числе и в России.

Движения защитников природы и человека от использования генетически модифицированных растений, животных и микроорганизмов становятся заметной общественной силой, которая способна оказать отрицательное влияние на темпы развития биотехнологии и резко сократить масштабы экономического и других видов полезных и важных эффектов от применения их результатов.

Сопоставляя уже полученные и ожидаемые результаты развития биотехнологии и биоинженерии как научного приоритета XXI века с масштабами возможного риска и опасности отрицательных последствий, большинство ученых мира, работающих в этой области, уверенно заявляют о возможности научно обоснованного и безопасного развития этой области науки и производства. Об этом уже свидетельствует и реально сложившаяся ситуация в биотехнологии и биоинженерии на протяжении всего полувекowego периода их развития - от момента зарождения этих наук до наших дней. Каковы научные основы гарантии дальнейшего безопасного развития биотехнологии и биоинженерии и возможного риска от использования их результатов для человека и окружающей среды?

15.1. Понятие о безопасности

Природные, техногенные и другие факторы оказывают постоянное и значительное воздействие на человека и среду его обитания. Эти воздействия могут быть положительными и отрицательными. Наука, общество, государство должны разрабатывать и эффективно использовать системы мер по защите человека и окружающей среды от вредных воздействий любых опасных факторов. Жизнь человека и общества, существование и деятельность государства должны быть надежно защищены от любых внутренних и внешних воздействий. В этом состоит одна из главных задач любого общества, государства, цивилизации в целом. Из этого важнейшего положения вытекает общее понятие о безопасности человека, общества, государства, цивилизации, под которым понимается устойчивое состояние защищенности жизненно важных интересов личности и самой жизни человека, общества и государства от внешних и внутренних угроз.

Главнейшим объектом безопасности является человек. Безопасность человека не может быть обеспечена без защиты среды его обитания и жизнедеятельности, без защиты общества, в котором он живет. Одним из основных принципов безопасности является взаимная ответственность человека, общества и государства. Достижение

безопасности — это результат действия системы, предполагающей приведение в действие мер, адекватных угрозам жизненно важных интересов.

Безопасность может быть биологической, экологической, экономической, продовольственной, военной и другой — в зависимости от факторов, масштабы, направленность и степень воздействия которых угрожают деятельности, существованию и самой жизни объектов - человека, общества, государства, цивилизации в целом от внутренних и внешних угроз.

15.2. Понятие о биобезопасности

Биобезопасность стала одной из важнейших проблем безопасности человека, общества, государства и цивилизации в целом. Под биобезопасностью понимается защищенность человека, общества, цивилизации и окружающей среды от вредного воздействия, опасного для жизни и здоровья людей токсичных и аллергенных биологических веществ и соединений, содержащихся в природных или генно-инженерномодифицированных биологических объектах и полученных из них продуктов. Биологически опасные организмы и их продукты представляют собой угрозу для существования не только человека, но и для растений, животных и полезных микроорганизмов, вызывая различную степень их поражения или гибель, лишая человека продовольственных и других источников и возможностей существования.

Проблемы биобезопасности существуют в мире давно, т.к. и в природе, и в производстве различных, необходимых человеку и обществу веществ – продуктах питания, гигиены, лекарствах и других нередко встречаются, содержащие опасные для здоровья и жизни человека соединения.

Во всех государствах мира разработаны различные методы контроля за технологическими процессами и качеством вновь вовлеченных в сферу использования человеком новых биологических объектов и веществ, их токсичностью, аллергенностью и общей безопасностью для здоровья людей и состояния окружающей среды. Большую

Опасность для здоровья людей до сих пор представляют ядовитые грибы. Самым опасным и часто трагичным остается алкогольная токсикация людей. Равной ей по масштабу опасности для здоровья и жизни людей может быть только вооруженный или химический геноцид. Над проблемой алкогольной безопасности работают во всем мире. Но эффективных результатов пока не достигнуто. Самой опасной для нынешних и будущих поколений является наркомания. Наркотики всех видов, в том числе растительного происхождения, парализуют волю людей, разрушают их как личности и являются причиной гибели. Общество стоит перед опасностью наркотического автотогоцида.

15.3. Биобезопасность в клеточных, тканевых и органогенных биотехнологиях

Опыты с растительными и животными клетками и их органелами, а также с одноклеточными микроорганизмами осуществляются в научных лабораториях АПК, медицинской, пищевой и других видах промышленности давно. Они основаны на фундаментальных исследованиях биологии и цитологии клеток и тканей, открытии явления тотипотентности клеток - способности регенерировать взрослые организмы, а также на выявлении способности соматических клеток к слиянию- соматической гибридизации, обмену органелами, дифференциации и дедифференциации. В кле-

точных технологиях используется спонтанный и направленный мутагенез, получение клеток с измененной наследственностью. Это - главная причина генетической гетерогенности клеток, полученных из одного и того же генотипа. Поэтому в клеточных биотехнологиях необходим постоянный мониторинг за спектром соматической вариабельности, появлением мутантов с положительными и отрицательными свойствами. В большинстве случаев соматическая вариабельность не выходит за рамки положительных или иных доброкачественных изменений и позволяет получать исходный материал для селекции растений с улучшенными или исходными свойствами в границах обеспечения биобезопасности.

Главное, чего добиваются клеточные биотехнологи,- получение комплексно устойчивых генотипов сельскохозяйственных растений. Распространение неустойчивых к вредным организмам и абиотическим факторам среды сортов и гибридов сельскохозяйственных растений может привести к большим потерям урожая. В этой связи лабораторный и полевой контроль за полученными клеточными регенерантами растений является крайне важным, с точки зрения экологической безопасности, при их использовании в производстве. Система государственного испытания и регистрации сортов и гибридов при ее строгом соблюдении позволяет значительно снизить такую опасность.

Технология получения продуктов вторичного метаболизма в биореакторах на основе культуры клеток и суспензий позволяет непрерывно, автоматически контролировать и своевременно выявлять возможные отклонения от нормы основных ее параметров и качества получаемой продукции, не допускать опасных отклонений в любом звене технологического процесса. Биотехнологи, работающие с животными тканями и клетками, отмечают случаи накопления токсичных веществ в тканях при нарушении техники и технологии их хранения и использования. Таким образом, в клеточных биотехнологиях с растениями в целом складывается безопасная ситуация с их использованием в селекции растений, получения продуктов вторичного синтеза для фармацевтической и пищевой промышленности. В то же время требуется более жесткий контроль за использованием клеточных и тканевых технологий в животноводстве.

15.4. О генетическом риске и биобезопасности в биоинженерии и трансгенезе

Встраивание в ДНК реципиентной клетки чужеродного донорского гена сопряжено с определенными трудностями, главными из которых являются обеспечение адресной вставки гена или группы генов, а также их нормального функционирования — экспрессии. Эта проблема существует постоянно и ее решение во многих случаях пока имеет случайный характер.

Еще более важной является проблема генетического риска, возможного получения мутантов с содержанием токсичных или аллергенных для человека белков или других опасных соединений. Реальный риск, связанный с поведением чужеродного гена в реципиентной клетке, гипотетически всегда существует. Это прежде всего может вызываться плейотропным эффектом при взаимодействии и взаимозаменяемости генов. Дестабилизация генома при трансгенезе может происходить не только за счет обогащения генома новыми генами или мутагенного эффекта вставки, а, возможно, в силу индуцирования эндогенных систем рекомбинации и активации «молчащих» генов. Все это дает

основания считать теоретически возможным появление при трансгенозе опасных для здоровья и жизни человека генотипов.

Риск получения таких мутантов значительно возрастает при использовании искусственных, синтетических генов для получения трансгенных растений, животных и микроорганизмов с улучшенными и принципиально новыми свойствами. Именно эти обстоятельства в определенной мере оправдывают тревогу многих людей, их настойчивое требование запретить создание и особенно использование генетически модифицированных организмов и получаемых из них пищевых и других продуктов или хотя бы ввести систему их обязательного маркирования.

К двум причинам можно добавить и третью - спонтанный перенос с пылью генов-модификаторов в другие растения, их взаимодействие с генами третьих генотипов, что может привести к появлению новых генотипов с опасными свойствами для человека и окружающей среды.

Известно, что начало дискуссии по проблеме биобезопасности в науке и обществе положили сами ученые - основатели нового направления - биоинженерии. В 1976 г. в США были приняты первые правила, регламентирующие работу с рекомбинантными микроорганизмами. В них запрещалось выпускать их за стены лабораторий. В конце 70-х годов в большинстве стран мира было разработано соответствующее законодательство. Постепенно эти правила корректировались в сторону смягчения жесткости. Многолетняя интенсивная работа в мире по новейшей биотехнологии - генетической инженерии - подтвердили их безопасность.

К сожалению, мировой терроризм не останавливается перед выбором средств для своих преступлений. Он использует в этих целях и опасные для жизни людей биоресурсы. Мировому сообществу предстоит срочно выработать и осуществить систему самых эффективных мер по пресечению терроризма и недопущения использования достижений биологической науки в его зловещих целях.

В целом ситуация с генно-инженерными исследованиями по трансгенозу должна оставаться под строжайшим контролем ученых и государства. По мнению ряда исследователей технология получения трансгенных животных далека от совершенства. Непредсказуемость результатов переноса чужеродных генов и наличие неожиданных эффектов ограничивает по их мнению практическое применение методов трансгеноза в животноводстве. Ученые биоинженерных центров - мировых и национальных - должны активно развивать работы по совершенствованию техники, методов, технологий и критериев биобезопасности генетически модифицированных организмов (ГМО). И только на такой основе они смогут ускорять процесс создания принципиально новых генотипов растений, животных и микроорганизмов для повышения устойчивости и продуктивности агропромышленного производства, решения сложных проблем современной медицины и других направлений науки и экономики.

15.5. Критерии, показатели и методы оценки генетически модифицированных организмов и получаемых из них продуктов на биобезопасность

Важным этапом оценки биобезопасности генноинженерно-модифицированных организмов и полученных из них пищевых и других продуктов является санитарно-гигиеническая экспертиза, которую проводит Институт питания Российской академии

медицинских наук (РАМН). В институте проверяют: 1) химический состав исходных и трансгенных растений; 2) не ухудшилась ли биологическая ценность и усвояемость приготовленных из ГМО продуктов; 3) не могут ли ГМО и полученные из них продукты вызывать аллергию или влиять на иммунную систему человека; 4) не окажутся ли они токсичными, канцерогенными или мутагенными; 5) не влияют ли они на репродуктивные функции животных и человека.

Испытание генетически измененных растений на биобезопасность проводят также специалисты в Институте фитопатологии и Институте биологической защиты растений РАСХН, Центре биоинженерии РАН. Они изучают участки ДНК, встроенные в геном растений, проверяют, не сможет ли введенный ген переноситься в другие организмы и будет ли передаваться потомкам растений; изучают, не влияет ли новый ген на поражаемость растений болезнями и повреждаемость вредителями; не влияют ли трансгенные растения на почвенную микрофлору и другие составляющие биоценоза.

Обязательной и крайне важной является также медикобиологическая оценка пищевой продукции, полученной из ГМО.

Институтом питания РАМН, институтом вакцин и сывороток им. Н.И. Мечникова РАМН, Министерством здравоохранения РФ, Московской медицинской академией им. И.Т. Сеченова Минздрава РФ, Центром «Биоинженерия» РАН, Медикогенетическим центром РАМН, Московским госуниверситетом прикладной биотехнологии (Рогов И.А. и др.) разработаны методические указания «Медико-биологическая оценка пищевой продукции из генетически модифицированных источников». Они введены в действие Минздравом РФ 1 июня 2000 г. Методическими указаниями установлены порядок гигиенической экспертизы и государственной регистрации пищевой продукции, полученной из генетически модифицированных источников. Утверждены методики медикогигиенической, медико-биологической оценки и клинических испытаний новых видов пищевой продукции, полученной из генетически модифицированных источников. Методические указания являются официальным изданием и их выполнение должно строго контролироваться Минздравом РФ, а также соответствующими юридическими и правовыми органами РФ.

15.6. Государственный контроль и государственное регулирование в области генно-инженерной деятельности и использования генетически модифицированных организмов (ГМО) и полученных из них продуктов

Во всех государствах с развитой генно-инженерной инфраструктурой в науке и производстве в настоящее время приняты законы и другие государственные акты, создающие нормативно-правовую базу для современной биотехнологии и биоинженерии. В большинстве своем национальные законы различных государств адаптированы по главным принципиальным вопросам к международным требованиям и правилам в этой области науки и производства, зафиксированные в документах ООН, ФАО, ЮНЕСКО и других международных организациях соответствующего профиля.

В России Федеральный Закон «О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности» принят Государственной Думой и подписан Президентом РСФСР 5 июня 1996 г. за № 86—ФЗ (14).

Закон является рамочным, прямого и непрямого действия. Он регулирует отношения в сфере природопользования, охраны окружающей среды и обеспечения экологической безопасности, возникающие при осуществлении генно-инженерной деятельности с

биологическими объектами, за исключением человека, его клеток и тканей, которые регулируются специальным законодательством. В законе определены задачи и основные направления государственного регулирования, а также система безопасности в области генно-инженерной деятельности в России.

Государство обязано по этому закону устанавливать основные направления деятельности федеральных органов государственной власти, органов государственной власти субъектов Российской Федерации, органов местного самоуправления, юридических лиц и граждан (физических лиц) в области генно-инженерной деятельности; устанавливать основные положения правового регулирования отношений, возникающих в области генно-инженерной деятельности; определять механизмы, обеспечивающие безопасность граждан и окружающей среды в процессе осуществления генно-инженерной деятельности и использования ее результатов; установление правовых основ международного сотрудничества Российской Федерации в области генно-инженерной деятельности; создавать условия для развития приоритетных направлений в этой области.

Для реализации указанных задач закон предусматривает принятие федеральных и региональных программ в области развития генно-инженерной деятельности. В законе четко сформулированы основные положения системы безопасности в области генно-инженерной деятельности. Законом установлены четыре уровня риска возможного потенциально вредного воздействия генно-инженерной деятельности на здоровье человека, в соответствии с которыми устанавливаются требования по строгому соблюдению условий при их осуществлении.

Первый уровень риска соответствует работам, которые представляют опасность для здоровья человека и сопоставимы с риском при работе с непатогенными микроорганизмами.

Второй уровень риска соответствует работам, которые представляют незначительную опасность для здоровья человека и сопоставимы с опасностью при работах с условно-патогенными микроорганизмами.

Третий уровень риска соответствует работам, которые представляют умеренную опасность для здоровья человека и сопоставимы с опасностью при работах с микроорганизмами, потенциально способными к передаче инфекции.

Четвертый уровень риска соответствует работам, которые представляют опасность для здоровья человека и сопоставимы с опасностью при работах с возбудителями особо опасных инфекций.

Генно-инженерная деятельность в условиях открытых систем приравнивается к третьему и четвертому уровням риска. Закон содержит требования к лицам, которые осуществляют генно-инженерную деятельность, главными из которых являются обязательная профессиональная подготовка и состояние здоровья, соответствующие требованиям правил безопасности генно-инженерной деятельности; наличие соответствующих помещений, отвечающих тем же правилам; обязательное получение разрешения (лицензий) при работах, соответствующих третьему и четвертому уровням риска.

В законе определены требования по стандартизации и сертификации генно-инженерной продукции (услуг). Она должна соответствовать требованиям экологической безопасности, санитарным нормам, фармакопейным статьям, обязательным требованиям государственных стандартов Российской Федерации. Продукция и услуги, полученные и предоставленные с применением генно-инженерно-модифицированных организмов, подлежат в соответствии с федеральными правовыми актами обязатель-

ной сертификации, должны иметь сертификат качеств и знак соответствия, выданные или признанные уполномоченным на то органом.

Закон определяет ответственность юридических лиц и граждан (фи-зических лиц), которые осуществляют генно-инженерную деятельность, их действия или бездействия, ставшие причиной нанесенного вреда окружающей среде, несут ответственность в соответствии с законодательством Российской Федерации.

Финансирование генно-инженерной деятельности и ее безопасности, согласно закону, осуществляется в установленном порядке за счет средств соответствующих бюджетов, целевых средств организаций и фондов, а также иных источников, не запрещенных законодательством Российской Федерации.

«Российская Федерация,- указано в законе,- заключает международные договоры в целях дальнейшего развития и укрепления международного сотрудничества в области генно-инженерной деятельности».

На основании Федерального Закона «О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности» Правительством Российской Федерации принято ряд постановлений, обеспечивающих его реализацию (15-16). Ими предусмотрено создание Межведомственной комиссии по проблемам генно-инженерной деятельности, контролю за выполнением закона и постановлений правительства в области генно-инженерной деятельности.

Правительство Российской Федерации постановлением от 16 февраля 2001 г. № 120 утвердило положение о государственной регистрации генно-инженерно-модифицированных организмов (ГМО), предназначенных для первого на территории Российской Федерации выпуска в окружающую среду, промышленного использования или импорта. Регистрацию таких организмов и ведение сводного государственного реестра правительство возложило на Министерство промышленности, науки и технологий Российской Федерации.

Биобезопасность, применительно к указанному положению, означает отсутствие фактического или прогнозируемого нежелательного воздействия модифицированного организма (в сравнении с исходными немодифицированными организмами) на окружающую среду.

Положением утвержден также срок действия свидетельства о государственной регистрации модифицированного организма - до 5 лет с даты включения его в реестр. Срок действия свидетельства может быть продлен по заявлению его владельца на следующие 5 лет. При появлении в период срока действия свидетельства о государственной регистрации модифицированного организма новых научно обоснованных данных о биобезопасности модифицированного организма (в сравнении с исходным немодифицированным организмом) Министерство промышленности, науки и технологий Российской Федерации может по представлению экспертного совета принять решение о его перерегистрации без проведения экспертизы. В случае выявления негативного воздействия модифицированного организма на окружающую среду, подтвержденного экспертизой, проведенной в соответствии с указанным выше положением, по инициативе федеральных органов исполнительной власти, органов местного самоуправления, заинтересованных организаций и граждан государственная регистрация модифицированного организма может быть аннулирована.

В соответствии с постановлением Правительства Российской Федерации от 16 февраля 2001 г. № 120 «О государственной регистрации генно-инженерно-

модифицированных организмов» Министерство промышленности, науки и технологий Российской Федерации своим приказом от 10 июля 2001 г. № 264 создало Экспертный совет Минпромнауки России по вопросам биобезопасности и утвердило Положение о нем, согласно которому он является постоянно действующим органом, обеспечивающим объективность и надлежащий уровень проверки предоставляемых заявителями сведений о биобезопасности генно-инженерно-модифицированных организмов. Указанный совет организует и проводит экспертизу представленных заявителями в Минпромнауки России сведений о биобезопасности модифицированных организмов, устанавливает наличие или отсутствие фактического или прогнозируемого нежелательного воздействия модифицированных организмов (в сравнении с исходными немодифицированными организмами) на окружающую среду, дает, по согласованию с Межведомственной Комиссией по проблемам генно-инженерной деятельности, заключение о биобезопасности модифицированных организмов и возможности их государственной регистрации или об отказе в такой регистрации и представляет его в установленном порядке в Департамент науки о жизни и земле Минпромнауки РФ.

Состав Экспертного совета формируется из ведущих ученых и высококвалифицированных специалистов в области генно-инженерной деятельности.

Государственный контроль за биобезопасностью охватывает также области производства и использования новых пищевых продуктов, материалов и изделий, полученных из генетически модифицированных и других биологических объектов. В Российской Федерации принят Федеральный Закон «О качестве и биобезопасности пищевых продуктов» № 29—ФЗ от 2.01.2000 г. в соответствии с этим законом Правительство Российской Федерации приняло Постановление «О государственной регистрации новых пищевых продуктов, материалов и изделий» № 988 от 21.12.2000 г. и утвердило Положение по этому вопросу.

В соответствии с этим постановлением правительства в нашей стране введена государственная регистрация новых пищевых продуктов, материалов и изделий и введен государственный реестр на указанные виды товаров, разрешенных для изготовления на территории Российской Федерации, или ввоза на ее территорию и оборота этих товаров. Эту работу правительство поручило осуществлять Министерству здравоохранения России, в том числе продуктов животного происхождения - проводить совместно с Министерством сельского хозяйства Российской Федерации.

Согласно утвержденному правительством положению, под новой понимается впервые разработанная и внедренная для промышленного изготовления на территории Российской Федерации продукция, а также впервые ввозимая и ранее не реализовывавшаяся на территории Российской Федерации. Государственная регистрация этой продукции проводится на этапе ее подготовки к производству, а импортной продукции — до ее ввоза на территорию Российской Федерации. С 2001 г. в России установлена система обязательной маркировки пищевых продуктов, полученных из генетически модифицированных источников. Ее введение обеспечит условия выбора гражданами продовольственной и другой продукции с учетом ее генетической природы и личного отношения граждан к такой продукции.

Вопросы для самоконтроля

- 1) Что такое безопасность и биобезопасность?

- 2) В чем состоит сущность генетического риска и возможной опасности в биоинженерии?
- 3) Какие задачи и основные направления предусматриваются государственным регулированием в области генно-инженерной деятельности?
- 4) Какие законы, постановления правительства и другие нормативно-правовые акты приняты в нашей стране в области биотехнологии, генно-инженерной деятельности и биобезопасности?

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. **Клунова, С.М.** Биотехнология: учебник / С.М. Клунова, Т.А. Егорова, Е.А. Живухина. – М.: Академия, 2010. – 256 с.
2. **Коростелева, Н.И.** Биотехнология: учебное пособие / Н.И. Коростелева, Т.В. Громова, И.Г. Жукова. - Барнаул: Изд-во АГАУ, 2006. - 127 с.
3. **Сазыкин, Ю.О.** Биотехнология / Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева; под ред. А.В. Катлинского. - М.: Академия, 2008. – 256 с.

Дополнительная

1. **Донченко, Л.В.** Безопасность пищевой продукции / Л.В. Донченко, В.Д. Надык-ва. – М.: Пищепромиздат, 2001. – 528 с.
2. **Елинов, Н.П.** Основы биотехнологии / Н.П. Елинов. – СПб.: ИФ “Наука”, 1995. – 600 с.
3. **Кнорре, Д.Г.** Биологическая химия / Д.Г. Кнорре, С.Д. Мызина. – М.: Высшая школа, 2002. – 479 с.
4. Сельскохозяйственная биотехнология / В.С. Шевелуха [и др.]. – М.: Высшая школа, 2003. – 427 с.
5. **Шевелуха В.С.** Биотехнология и биобезопасность / В.С. Шевелуха // Природно-ресурсовые ведомости. – 2001. – № 25(80).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

Основная

1. **Карпунина, Л.В.** Молекулярная биотехнология микроорганизмов: методические указания к лабораторным занятиям для студентов специальности 240901 – “Биотехнология”/ Л.В. Карпунина, Е.А. Горельникова, Т.В. Спирихина. – Саратов: “Саратовский ГАУ”, 2010. – 28 с.
2. **Кирпичников, М.П.** О развитии нанобиотехнологии / М.П. Кирпичников, К.В. Шайтан // Инновации. - 2007. - N 12. - С. 55-61.
3. **Клунова, С.М.** Биотехнология: учебник / С.М. Клунова, Т.А. Егорова, Е.А. Живухина. – М.: Академия, 2010. – 256 с.
4. **Козырев, С.В.** Нанобиотехнологии - панорама направлений / С.В. Козырев, П.П. Якуцени // Рос. нанотехнологии. - 2008. - Т. 3, N 3-4. - С. 8-11.
5. **Коростелева, Н.И.** Биотехнология: учебное пособие / Н.И. Коростелева, Т.В. Громова, И.Г. Жукова. - Барнаул: Изд-во АГАУ, 2006. - 127 с.
6. **Котова, И.Б.** Общая микробиология / И.Б. Котова, А.И. Нетрусов. – М.: Академия, 2007. – 352 с.
7. **Лапшенков, Г.И.** Введение в инженерные проблемы биотехнологии. Часть 1: Учебное пособие / Г.И. Лапшенков, Д.Г. Победимский, В.И. Швец. – М.: МИТХТ им. М.В. Ломоносова, 2009. – 74 с.
8. **Лапшенков, Г.И.** Введение в инженерные проблемы биотехнологии / Г.И. Лапшенков, Д.Г. Победимский, В.И. Швец. Часть 5: Учебное пособие. – М.: МИТХТ им. М.В. Ломоносова, 2010. – 39 с.
9. **Лапшенков, Г.И.** Введение в инженерные проблемы биотехнологии / Г.И. Лапшенков, Д.Г. Победимский Д.Г. В.И. Швец. Часть 7. Глава 7.3: Учебное пособие. – М.: МИТХТ им. М.В. Ломоносова, 2010. – 63 с.
10. **Лапшенков, Г.И.** Введение в инженерные проблемы биотехнологии / Г.И. Лапшенков, Д.Г. Победимский Д.Г. В.И. Швец. Часть 7. Главы 7.1 и 7.2: Учебное пособие. – М.: МИТХТ им. М.В. Ломоносова, 2010. – 68 с.
11. **Макаров, Н.В.** Нанотехнологии для решения экологических и медицинских проблем / Н.В. Макаров // Строительные материалы, оборудование, технологии XXI века. - 2007. - N 3. - С. 58-59.
12. **Матвеева, О.Н.** Трансформация углеводородного загрязнения в почве под действием биодеструкторов /О.Н. Матвеева: дис. ... канд. хим. наук. – Иркутск, 2006. – 110 с.
13. **Мисюров, Д.** Нанобиотехнологии – новые горизонты / Д. Мисюров // В мире науки. – 2005. – N 8. – С. 81-87.
14. **Пул, Ч.** Нанотехнологии / Ч. Пул, Ф. Оуэнс. – М.: Техносфера, 2005. – 336 с.
15. **Рябцева, Е.** Интернет-журнал «Коммерческая биотехнология» / Е. Рябцева. - 2006. <http://www.cbio.ru/> по материалам BIO.org
16. **Сазыкин, Ю.О.** Биотехнология / Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева; под ред. А.В. Катлинского. - М.: Академия, 2008. – 256 с.
17. **Тихомирова Е.И.** Введение в биотехнологию / Е.И. Тихомирова, В.А. Спивак, О.Ю. Ксенофонтова. – Саратов: Изд-во Саратовского ун-та, 2006. – 64 с.

Дополнительная

1. **Антипова, Л.В.** Пищевая биотехнология. Кн. 1. Основы пищевой биотехнологии: Учебник для вузов /Л.В. Антипова, И.А. Рогов, Г.П. Шуваева. - М.: Издательство "КолосС", 2004. - 440 с.
2. **Баев, А.А.** Биотехнология / А.А. Баев. – М.: Наука, 1984. – 320 с.
3. Биотехнология в животноводстве / В.Ф. Красота [и др.]. – М.: Колос, 1994. – 293 с.
4. **Бирюков, В.В.** Основы промышленной биотехнологии. Учебное пособие для студентов высших учебных заведений / В.В. Бирюков – М.: Колос, 2004. – 296 с.
5. **Блинов, В.А.** Общая биотехнология. Курс лекций, Ч. 1. / В.А. Блинов – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский ГАУ», 2003. – 92 с.
6. **Булатова, А.** Наноантитела – «волшебные пули» российского производства /А. Булатова. – 2009. STRF.ru
7. **Бутенко, Р.Г.** Культура клеток растений и биотехнология / Р.Г. Бутенко. – М.: Наука, 1986. – 272 с.
8. **Глеба, Ю.Ю.** Клеточная инженерия растений /Ю.Ю. Глеба, К.М. Сытник. – Киев: Наукова думка, 1984. – 160 с.
9. **Глик, Б.** Молекулярная биотехнология. Принципы и применение: Пер. с англ. / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 2002. – 592 с.
10. **Готшалк, Г.** Метаболизм бактерий / Г. Готшалк М.: Мир, 1982 – 310 с.
11. **Донченко, Л.В.** Безопасность пищевой продукции / Л.В. Донченко, В.Д. Надыва. – М.: Пищепромиздат, 2001. – 528 с.
12. **Елинов, Н.П.** Основы биотехнологии / Н.П. Елинов. – СПб.: ИФ «Наука», 1995. – 600 с.
13. **Емцев, В.Т.** Микробиология / В.Т. Емцев, Е.Н. Мишустин. – М.: Дрофа, 2005. – 289 с.
14. **Катаева, Н.В.** Клональное микроразмножение растений / Н.В. Катаева, Р.Г. Бутенко. – М.: Наука, 1983. – 96 с.
15. **Кнорре, Д.Г.** Биологическая химия / Д.Г. Кнорре, С.Д. Мызина. – М.: Высшая школа, 2002. – 479 с.
16. **Манаков, М.Н.** Теоретические основы технологии микробиологических производств / М.Н. Мананков, Д.Г. Победимский - М.: Агропромиздат, 1990. - 272 с.
17. Микробиологическое производство биологически активных веществ и препаратов / В.А. Быков [и др.]. – М.: Высшая школа, 1987. – 143 с.
18. Основы сельскохозяйственной биотехнологии / Г.С. Муромцев [и др.]. – М.: Мир, 1987. – 384 с.
19. **Рыбалкина, М.** Нанотехнологии для всех / М. Рыбалкина. – М.: Издательский дом «Вильямс», 2005. – 444 с.
20. **Рыбчин, В.Н.** Основы генетической инженерии / В.Н. Рыбчин. – СПб.: Изд-во СПбГТУ, 1999. – 521 с.
21. **Сассон, А.** Биотехнология: Свершения и надежды / А. Сассон. – М.: Мир, 1987. – 411 с.
22. **Свентицкий И.И.** Экологическая биоэнергетика растений и сельскохозяйственное производство / И.И. Свентицкий. – Пушкино, НЦБИ АН СССР, 1982. – 221 с.
24. Сельскохозяйственная биотехнология / В.С. Шевелуха [и др.]. – М.: Высшая школа, 2003. – 427 с.

25. **Сидоров, В.А.** Биотехнология растений. Клеточная селекция / В.А. Сидоров. – Киев: Наукова думка, 1990. – 360 с.
26. **Скулачев, В.П.** Биоэнергетика. Мембранные преобразователи энергии / В.П. Скулачев. – М.: Высшая школа, 1989. – 271 с.
27. **Хазин, Д.А.** Производство кормового белка и его использование в кормлении сельскохозяйственных животных / Д.А. Хазин. – М.: ВНИИТЭИ, 1987. – 52 с.
28. **Шевелуха, В.С.** Биотехнология и биобезопасность / В.С. Шевелуха // Природно-ресурсовые ведомости. – 2001. – № 25(80).
29. **Эрнст, Л.К.** Биотехнология сельскохозяйственных животных / Л.К. Эрнст, М.И. Прокофьев. – М.: Колос, 1995. – 192 с.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	3
Лекция 1. Биотехнология как наука	4
Лекция 2. Организация биотехнологического производства	7
Лекция 3. Параметры роста и анализы данных о росте культур и микроорганизмов	12
Лекция 4. Количественные характеристики скорости роста и потребления субстрата	17
Лекция 5. Открытые и закрытые системы культивирования микроорганизмов	20
Лекция 6. Непрерывное культивирование микроорганизмов	23
Лекция 7. Регуляция клеточного метаболизма	30
Лекция 8. Основы молекулярной биологии и молекулярной генетики	32
Лекция 9. Биотехнология кормовых препаратов	36
Лекция 10. Нанобиотехнология	41
Лекция 11. Биоконверсия и биоэнергетика	46
Лекция 12. Биотехнология и окружающая среда	53
Лекция 13. Клеточная и тканевая биотехнология в селекции и растениеводстве.	60
Лекция 14. Биотехнология в животноводстве и в ветеринарной медицине	65
Лекция 15. Биотехнология и биобезопасность	70
Библиографический список	79
Содержание	82