

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Ивановский государственный химико-технологический университет

Е.В. Найденко, Т.Е. Никифорова, С.В. Макаров

ВВЕДЕНИЕ В БИОТЕХНОЛОГИЮ

Учебное пособие



2019

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации

Ивановский государственный химико-технологический университет

Е.В. Найденко, Т.Е. Никифорова, С.В. Макаров

ВВЕДЕНИЕ В БИОТЕХНОЛОГИЮ

Учебное пособие

Иваново 2019

Найденко, Е.В.

Введение в биотехнологию: учеб. пособие / Е.В. Найденко, Т.Е. Никифорова, С.В. Макаров; Иван. гос. хим.-технол. ун-т.– Иваново, 2019. – 108 с.

В пособии изложены основные вопросы, раскрывающие содержание биотехнологии как науки и отрасли производства. Приведены сведения об этапах ее развития, сформулированы цели и задачи, охарактеризованы основные направления биотехнологии. Рассмотрены биологические объекты биотехнологии, химические компоненты живых организмов. Представлены основы микробиологического синтеза с использованием культур растительных, животных и бактериальных клеток, особенности их роста, состав питательных сред и принципы непрерывного культивирования.

Учебное пособие может быть рекомендовано студентам, обучающимся по направлениям подготовки: 19.03.01 «Биотехнология», 19.03.02 «Продукты питания из растительного сырья», 19.03.03 «Продукты питания животного происхождения», 19.03.04 «Технология продукции и организации общественного питания» (укрепленная группа 19.00.00 «Промышленная экология и биотехнологии»).

Печатается по решению редакционно-издательского совета Ивановского государственного химико-технологического университета.

Рецензенты:

кафедра микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО Ивановской государственной
медицинской академии Минздрава России;
кандидат химических наук В.Б. Шейнин
(Институт химии растворов им. Г.А. Крестова РАН)

©Найденко Е.В., Никифорова Т.Е.,
Макаров С.В., 2019
©ФГБОУ ВО «Ивановский государственный химико-технологический университет», 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
1. ПОНЯТИЕ БИОТЕХНОЛОГИИ.....	5
1.1. Предмет, история развития, цели и задачи биотехнологии.....	5
1.2. Основные направления биотехнологии.....	10
2. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОБЪЕКТЫ В БИОТЕХНОЛОГИИ.....	15
2.1. Номенклатура биологических объектов.....	15
2.2. Вирусы, бактерии, грибы, растения, животные как объекты биотехнологии.....	30
3. ПОСТУПЛЕНИЕ ВЕЩЕСТВ В КЛЕТКУ И ИХ МЕТАБОЛИЗМ.....	39
3.1. Превращение органических веществ в клетке.....	39
3.2. Основные биомолекулы клетки.....	45
4. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ.....	72
4.1. Рост и культивирование микроорганизмов.....	72
4.2. Способы культивирования микроорганизмов.....	78
4.3. Культивирование животных и растительных клеток.....	86
4.4. Выделение и очистка целевого продукта.....	87
4.5. Питательные среды для культивирования микроорганизмов.....	91
4.6. Среда для культивирования микроорганизмов.....	96
4.7. Принципы непрерывного культивирования: хемостат, турбидостат	101
Список рекомендуемой литературы.....	107

ВВЕДЕНИЕ

Дисциплина «Основы биотехнологии» является первым шагом на пути познания новой области науки – биотехнологии. Эта новая современная междисциплинарная область связывает биологию и химическую технологию, биохимию и инженерные науки.

В большинстве стран, в том числе и в России, биотехнология рассматривается как приоритетное направление, во многом определяющее технический прогресс и развитие общества. Некоторые биотехнологические процессы, относящиеся главным образом к производству продуктов питания, были известны в древние времена. Традиционная биотехнология завоевала мировой рынок и в экономическом плане вносит большой вклад в развитие, как отдельных фирм, так и стран в целом. Биотехнологическая промышленность производит белки, пептиды, аминокислоты, ферменты, витамины, антибиотики, этанол, органические кислоты (лимонную, изолимонную, уксусную и др.), регуляторы роста растений, природные пестициды, биопрепараты для человека и животных. Биотехнологические процессы имеют существенные достоинства: в большинстве случаев они используют возобновляемое сырье, проводятся в мягких условиях с меньшим числом стадий, их отходы доступны переработке.

В настоящее время биотехнология все шире использует новейшие методы молекулярной биологии. Она и в дальнейшем будет применяться в разных областях деятельности человека благодаря многочисленным открытиям, позволяющим вносить необходимые изменения в живые системы.

1. ПОНЯТИЕ БИОТЕХНОЛОГИИ

1.1. Предмет, история развития, цели и задачи биотехнологии

За последние 20 лет биотехнология, благодаря своим специфическим преимуществам перед другими науками, совершила решительный прорыв на промышленный уровень, что привело к развитию новых методов исследований и интенсификации процессов, открывших ранее неизвестные способы получения биопрепаратов, выделения, идентификации и очистки биологически активных веществ.

Биотехнология формировалась и эволюционировала по мере формирования и развития человеческого общества. В 1984 г. на Третьем съезде Европейской ассоциации биотехнологии в Мюнхене голландский ученый Е. Хаувинк разделил историю биотехнологии на пять периодов.

Эмпирический (допастеровский) период – самый длительный, охватывающий примерно 8000 лет, из которых более 6000 лет до н.э. и около 2000 лет н.э. Древние народы интуитивно использовали приемы и способы изготовления хлеба, пива, получали сыр, вино, уксус и некоторые другие продукты, которые теперь относятся к биотехнологическим.

К эмпирическому периоду относятся получение кисло-молочных продуктов, квашеной капусты, медовых алкогольных напитков, силосование кормов с помощью биотехнологических процессов брожения, ферментации.

Пастеровский период в развитии биотехнологии охватывает вторую половину XIX в. и первую треть XX в. (1856–1933 гг.). Он связан с выдающимися исследованиями великого французского ученого Л. Пастера (1822–1895) – основоположника научной микробиологии. Пастер установил микробную (ферментативную) природу брожения, доказал возможность жизни в бескислородных условиях, создал научные основы вакцинопрофилактики и др. Он доказал, что спиртовое брожение сахара есть процесс, тесно связанный с жизнедеятельностью дрожжевых грибков, которые питаются и размножаются за счет бродящей жидкости, при этом часть сахара тратится на постройку дрожжевых клеток и образование побочных продуктов – глицерина и янтарной кислоты. Были установлены два типа бактерий – аэробные, требующие для своей жизни воздух, и анаэробные, развивающиеся без него. Пастер опроверг теорию самозарождения микроорганизмов. Его работы по вопросу самозарождения имели очень большое значение для развития и применения антисептических методов в хирургии. Пастер предложил использовать нагревание для увеличения сроков хранения вина, пива и молока – этот процесс получил название “пастеризации”. На основе работ Пастера и его учеников были созданы производства этанола, бутанола, ацетона, глицерина, лимонной кислоты, многих вакцин, организованы процессы биологической очистки сточных вод.

В этот же период творили его выдающиеся ученики, сотрудники и коллеги: Э. Дюкло, Э. Ру, Ш.Э. Шамберлан, И.И. Мечников; Р. Кох, Д. Листер, Г. Риккетс, Д. Ивановский и др.

В 1859 г. Л. Пастер приготовил жидкую питательную среду, Р. Кох в 1881 г. предложил метод культивирования бактерий на стерильных ломтиках картофеля и на агаризованных питательных средах. В результате удалось доказать индивидуальность микробов и получить их в чистых культурах. Более того, каждый вид мог быть размножен на питательных средах и использован в целях воспроизведения соответствующих процессов (бродильных, окислительных и др.).

Среди достижений 2-го периода особо стоит отметить следующие:

- 1856 г. – чешский монах Г. Мендель открыл законы доминирования признаков и ввел понятие единицы наследственности в виде дискретного фактора, который передается от родителей потомкам;
- 1869 г. – Ф. Милер выделил «нуклеин» (ДНК) из лейкоцитов;
- 1883 г. – И. Мечников разработал теорию клеточного иммунитета;
- 1984 г. – Ф. Леффлер изолировал и культивировал возбудителя дифтерии;
- 1892 г. – Д. Ивановский открыл вирусы;
- 1893 г. – В. Оствальд установил каталитическую функцию ферментов;
- 1902 г. – Г. Хаберландт показал возможность культивирования клеток растений в питательных растворах;
- 1912 г. – Ц. Нейберг раскрыл механизм процессов брожения;
- 1913 г. – Л. Михаэлис и М. Ментен разработали основы кинетики ферментативных реакций;
- 1926 г. – Х. Морган сформулировал хромосомную теорию наследственности;
- 1928 г. – Ф. Гриффит описал явление «трансформации» у бактерий;
- 1932 г. – М. Кнолль и Э. Руска изобрели электронный микроскоп.

В этот период было начато изготовление прессованных пищевых дрожжей, а также продуктов их метаболизма – ацетона, бутанола, лимонной и молочной кислот, во Франции приступили к созданию биоустановок для микробиологической очистки сточных вод. Тем не менее, накопление большой массы клеток одного возраста оставалось исключительно трудоемким процессом. Вот почему требовался принципиально иной подход для решения многих задач в области биотехнологии.

В 1933 г. А. Клюйвер и А.Х. Перкин опубликовали работу «Методы изучения обмена веществ у плесневых грибов», в которой изложили основные технические приемы, а также подходы к оценке получаемых результатов при глубинном культивировании грибов. Началось внедрение в биотехнологию крупномасштабного герметизированного оборудования, обеспечивающего проведение процессов в стерильных условиях.

Особенно мощный толчок в развитии промышленного биотехнологического оборудования был отмечен в период становления и развития производства антибиотиков (время второй мировой войны 1939–1945 гг., когда возникла острая необходимость в противомикробных препаратах для лечения больных с инфицированными ранами).

Огромную роль сыграла работа английского микробиолога А. Флеминга (1928 г.), обнаружившего способность нитчатого гриба зеленой плесени (*Penicillium notatum*) вызывать гибель стафилококков. Дальнейшая работа привела к выделению в чистом виде первого антибиотика – пенициллина, открывшего эру антибиотиков (1933–1960 гг. – *третий период развития биотехнологии*). За пенициллином последовало получение стрептомицина, тетрациклинов, эритромицина и других антибиотиков, начала развиваться микробиологическая промышленность. Назовем также другие основные результаты, полученные в эти годы:

- 1936 г. – решены основные задачи по конструированию, созданию и внедрению в практику необходимого оборудования, в том числе главного из них – биореактора (ферментера, аппарата-культиватора);
- 1938 г. – А. Тизелиус разработал теорию электрофореза;
- 1942 г. – М. Дельбрюк и Т. Андерсон впервые увидели вирусы с помощью электронного микроскопа;
- 1943 г. – пенициллин произведен в промышленных масштабах;
- 1949 г. – Дж. Ледерберг открыл процесс конъюгации у *E. coli*;
- 1950 г. Ж. Моно разработал теоретические основы непрерывного управляемого культивирования микробов;
- 1951 г. – М. Тейлор разработал вакцину против желтой лихорадки;
- 1952 г. – У. Хейс описал плазмиду как внехромосомный фактор наследственности.

В 1953 г. в самостоятельную науку выделилась молекулярная биология. Это было связано с открытием *Д. Уотсоном* и *Ф. Криком* знаменитой *двойной спирали дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК)* и постулированием матричного механизма ее синтеза.

В период управляемого биосинтеза (1960–1975 гг. – *четвертый период развития биотехнологии*) были созданы технологии получения аминокислот, витаминов В₂ и В₁₂, биогаза, микробиологического белка на парафинах, иммобилизованных ферментов. В 70-х годах XX в. появился термин “*биотехнология*”. К главным достижениям этого периода относятся:

- 1959 г. – японские ученые открыли плазмиды антибиотикоустойчивости (К-фактор) у дизентерийной бактерии;
- 1960 г. – С. Очоа и А. Корнберг выделили белки, которые могут «сшивать» или «склеивать» нуклеотиды в полимерные цепочки, синтезируя тем самым макромолекулы ДНК. Один из таких ферментов был выделен из кишечной палочки и назван ДНК-полимераза (с 1960 г. микробные протеиназы начали добавлять в стиральные порошки; с 1965 г. началось применение микробного реннина в сыроварении);
- 1961 г. – М. Ниренберг прочитал первые три буквы генетического кода для аминокислоты фенилаланина;
- 1962 г. – Х. Корана синтезировал химическим способом функциональный ген;

- 1969 г. – М. Беквит и С. Шапиро выделили ген *lac*-оперона у *E.coli*;
- 1970 г. – выделен фермент рестриктаза (рестриктирующая эндонуклеаза).

Начало современного, *пятого* этапа развития биотехнологии было положено в 1972 г. с рождением новой отрасли молекулярной биологии – *генетической (генной) инженерии*. Группе ученых под руководством П.Берга удалось получить *in vitro* рекомбинантную, т.е. созданную методами генетической инженерии, ДНК. Естественно, что без фундаментальной работы Ф. Крика и Дж. Уотсона по установлению структуры ДНК было бы невозможно достигнуть современных результатов в области биотехнологии. Выяснение механизмов функционирования и репликации ДНК, выделение и изучение специфичных ферментов привело к формированию строго научного подхода к разработке биотехнических процессов на основе генно-инженерных манипуляций.

Генетическая инженерия позволила вводить в различные типы клеток чужеродную ДНК. Использование методов генетической инженерии дает возможность решать многие практически важные задачи: получать разнообразные биологически активные вещества, используя рекомбинантные штаммы бактерий и вирусов, а также синтезировать их в бесклеточной системе. Прежде всего, это получение лекарственных средств, в частности, инсулина и интерферона путем бактериального синтеза. Большим достижением является создание диагностических препаратов для выявления СПИДа. Разработка методов получения так называемых трансгенных растений открывает новые возможности для растениеводства в создании сельскохозяйственных культур, устойчивых к экстремальным воздействиям и инфекциям. Это возможный метод решения проблемы обеспечения населения Земли продуктами питания, хотя и вызывающий споры об их потенциальной опасности.

К наиболее важным достижениям биотехнологии последних лет относятся:

- 1) разработка интенсивных процессов (вместо экстенсивных) на основе направленных, фундаментальных исследований (с продуцентами антибиотиков, ферментов, аминокислот, витаминов);
- 2) получение суперпродуцентов;
- 3) создание различных продуктов, необходимых человеку, на основе генно-инженерных технологий;
- 4) создание необычных организмов, ранее не существовавших в природе;
- 5) разработка и внедрение в практику специальной аппаратуры биотехнологических систем;
- 6) автоматизация и компьютеризация биотехнологических производственных процессов при максимальном использовании сырья и минимальном потреблении энергии.

Вышеперечисленные достижения биотехнологии реализуются в настоящее время в народном хозяйстве и будут внедряться в практику в последующие 10–15 лет. В обозримом будущем будут определены новые краеугольные камни биотехнологии и нас ждут новые открытия и достижения.

Предмет и задачи биотехнологии

Биотехнология (от греч. *bios* – жизнь, *tesen* – искусство, *logos* – наука) – это область знаний, которая на основе изучения биологических процессов, протекающих в живых организмах и системах, использует эти процессы, а также сами биообъекты (главным образом бактерии, вирусы, грибы, растительные и животные клетки) для получения в промышленных условиях необходимых ценных для человека продуктов или создания процессов и материалов, ранее не встречавшихся в природе.

Биотехнология – это наиболее быстро развивающаяся наука, которая на ближайшие десятилетия будет определять уровень научно-технического прогресса всего человечества. Связано это с тем, что она решает такие важные проблемы, как создание принципиально новых эффективных и экономичных технологий получения необходимых в жизни человека веществ и материалов, в том числе медикаментозных средств, новых сложных материалов, осуществление процессов, ранее неизвестных в природе, поиски оригинальных путей решения экологической безопасности на планете и новых источников энергии, повышение продуктивности сельскохозяйственных растений и животных и т.д.

Биотехнология базируется на интегральном использовании биохимии, микробиологии и инженерных наук в целях промышленной реализации способности микроорганизмов, культур клеток и тканей и их частей.

Современная биотехнология оказывает огромное влияние на все аспекты практической деятельности человека. С ее помощью в настоящее время получают десятки дорогостоящих биологически активных веществ (гормоны, ферменты, витамины, антибиотики, некоторые лекарства). Огромна роль биотехнологии в медицине. Здесь, благодаря применению генной инженерии, позволяющей «встраивать» чужие гены в клетки-продуценты, удается производить такие ценнейшие вещества, как человеческий инсулин, интерфероны и др.

Важное значение имеет биотехнология в экологизации промышленных производств на основе создания безотходных процессов; биотехнологические методы применяются для очистки воды; биологические методы подавления вредителей сельскохозяйственных культур уверенно вытесняют химические инсектициды. Благодаря биотехнологии разработаны и внедрены энерго- и ресурсосберегающие производства.

Биотехнологические процессы являются базой для получения кормового и пищевого белка. Биотехнологическим способом получают возобновляемые источники энергии.

Дальнейший прогресс человечества связывают с широким применением во всех сферах жизни электроники и биотехнологии.

Продукты биотехнологической промышленности можно условно разделить на крупнотоннажные (этиловый спирт, дрожжи, органические кислоты, фруктовые сиропы) и малотоннажные (медикаменты, гормоны и другие продукты тонкого микробного синтеза).

Контрольные вопросы

1. Биотехнология как наука о применении важнейших процессов и систем в производстве. Ее основные цели и задачи.
2. Ученые, внесшие наиболее заметный вклад в развитие биотехнологии.
3. Важнейшие этапы развития и становления биотехнологии.
4. Расскажите об истории развития биотехнологии.
5. Какие цели и задачи решает биотехнология?
6. Какой период развития биотехнологии называют пастеровской эрой?
7. Какое открытие принадлежит английскому микробиологу А. Флемингу?
8. Что является предметом биотехнологии?
9. Важнейшие достижения биотехнологии последних лет.
10. Отличие биотехнологии от традиционной химической технологии.

1.2. Основные направления биотехнологии

Биотехнология является междисциплинарной областью знаний, базирующейся на микробиологии, биохимии, молекулярной биологии, биоорганической химии, биофизике, вирусологии, иммунологии, генетике, инженерных науках и электронике и объединяет целый ряд направлений:

Медицинская биотехнология – технология получения продуктов, необходимых для профилактики и лечения заболеваний, из живых клеток различного происхождения. Она решает следующие задачи:

1) создание профилактических, диагностических и лечебных препаратов *на основе современных экономичных и эффективных технологий* с использованием биообъектов (микробные, растительные и животные клетки, органы животных, растения) и продуктов их жизнедеятельности (первичные и вторичные метаболиты). Это, прежде всего, создание и производство антибиотиков, вакцин, витаминов, гормонов, иммуномодуляторов, антигенов, антител, нуклеиновых кислот, диагностических систем, иммунокомпетентных клеток, препаратов крови и др.;

2) разработка новых материалов, органов и тканей человека. В качестве примера можно привести создание искусственной кожи из культуры клеток эпидермиса для восполнения дефектов при ожогах; создание искусственной почки, сердца и других органов; восстановление работы иммунной системы с помощью пересадки иммунокомпетентных клеток и т.д.;

3) генодиагностика, генотерапия и генопрофилактика наследственных и других заболеваний путем пересадки генов;

4) создание принципиально новых методов для проведения лабораторных и клинических исследований с помощью биосенсоров. Принцип работы биосенсоров сводится к регистрации точными и чувствительными приборами (детекторами) физических, химических и биологических эффектов взаимодействия биореагентов (например, ферментов, антител, антигенов) с клетками или молекулами-мишенями, т.е. с определяемым детектируемым веществом.

Вакцины – специально выращенные болезнетворные микроорганизмы, вирусы и их компоненты, которые после специальной обработки вводят в виде ослабленной или убитой культуры в организм человека и обеспечивают за счет этого создание у него иммунитета к данному заболеванию.

Антибиотики – это вещества, получаемые с помощью микроорганизмов – продуцентов и действующие против болезнетворных микроорганизмов.

Иммуномодуляторы (интерфероны, интерлейкины) – стимулируют иммунную систему безотносительно к типу заболевания. Их получают из крови человека, на которую всегда был дефицит, а в последнее время, в связи с угрозой СПИДа – особенно. В настоящее время микроорганизмы синтезируют интерфероны с высокой скоростью.

Сельскохозяйственная биотехнология:

-в области растениеводства–разработка биологических средств защиты растений, бактериальных удобрений, микробиологических методов рекультивации почв (для повышения урожайности);

-в области животноводства–разработка и производство диагностических, профилактических и лечебных ветеринарных препаратов; создание эффективных кормов из растительной, микробной биомассы и отходов сельского хозяйства (получение кормового белка переработкой парафинов или целлюлозы, агропромышленных и сельскохозяйственных отходов, сточных вод); повышение продуктивности сельского хозяйства путем выведения с помощью генной инженерии новых сортов растений и пород животных (трансгенные растения и животные).

Экологическая биотехнология разрабатывает экологически безопасные технологии очистки сточных вод, утилизации отходов агропромышленного комплекса; биологические системы обезвреживания токсичных химических веществ, загрязняющих почву, водоемы, атмосферу. Например, уже получены штаммы микроорганизмов, утилизирующих нефть и нефтепродукты на водных поверхностях, фенол – в сточных водах и т. д.; разрабатываются системы экологизированной защиты растений.

Пищевая биотехнология призвана решать такие проблемы, как нехватка продуктов питания и дефицит белка. В настоящее время широко распространено выращивание дрожжей, водорослей и бактерий для получения белков, аминокислот, витаминов, ферментов. Перспективно создание принципиально новых процессов на основе ферментных систем микроорганизмов, в том числе для технологии пищевых добавок и пищевых целевых продуктов.

В дальнейшем на основе методов рекомбинантных ДНК биотехнология позволит освоить синтез растительных белков и добиться искусственного фотосинтеза и фиксации азота.

Биогеотехнология предусматривает внедрение биотехнологии в добывающую промышленность, что перспективно для извлечения из руд платины и других драгоценных и стратегически важных металлов, а также для увеличения извлечения нефти из скважин, удаления серы из угля, метана из шахт.

Генетическая инженерия (новейшее направление биотехнологии) – сводится по существу к процессу получения рекомбинантных ДНК, содержащих, кроме набора природных генов, присущего «хозяйской» ДНК, «чужой» ген или гены, взятые из другой ДНК.

Задачей генетической инженерии является создание генетических программ, основная цель которых – создание *in vitro* молекул ДНК посредством соединения фрагментов ДНК, которые в естественных условиях не сочетаются благодаря межвидовым барьерам (рекомбинантные ДНК).

В настоящее время уже разработаны сотни медицинских препаратов, полученных на основе генетической инженерии. Многие из них внедрены в практику и применяются в медицине (инсулин, гормон роста, интерферон).

Микробиологическая технология в результате разработки промышленных способов культивирования микробов позволила получать разнообразные медицинские препараты, пищевые продукты (сахар, сиропы, дрожжи), многие химические вещества (спирт, уксусная кислота, ацетон и др.).

Нанобиотехнология – соединение биотехнологии и нанотехнологий. Нанотехнология – это технология, оперирующая величинами порядка нанометра. Развитие нанотехнологии идет по трем основным направлениям:

- изготовление электронных схем с активными элементами, сопоставимыми с размерами атомов и молекул;
- разработка и изготовление наномашин, т.е. механизмов и роботов размером с молекулу;
- непосредственная манипуляция атомами и молекулами и сборка из них всего существующего.

Перспективы нанотехнологии:

- Достижение бессмертия человека за счет внедрения в организм молекулярных роботов, предотвращающих старение клеток, а также перестройки и «облагораживания» тканей человеческого организма.
- Создание молекулярных роботов – врачей, которые бы «жили» внутри человеческого организма, устраняя все возникающие повреждения, или предотвращали бы их возникновение, включая генетические повреждения.
- Устранение вредного влияния деятельности человека на окружающую среду. Во-первых, за счет насыщения экосферы молекулярными роботами – санитарами, превращающими отходы деятельности человека в исходное сырье; во-вторых, за счет перевода промышленности и сельского хозяйства на безотходные нанотехнологические методы.

Инженерная энзимология занимается конструированием органических катализаторов с заданными свойствами на основе ферментов и полиферментных систем, выделенных из клеток или находящихся в них. Ее цель – разработка научных основ применяемых биокатализаторов для создания новых биотехнологических производств, новых методов в диагностике и терапии, органическом синтезе и др., а также решение фундаментальных проблем энзимологии при помощи иммобилизованных ферментов.

Задачи инженерной энзимологии:

- получение нового продукта;
- улучшение качества известного продукта;
- повышение экономичности биотехнологического процесса.

Так, инженерная энзимология позволяет при помощи ферментов получать ряд продуктов: фруктозный сироп, L-аминокислоты, медикаменты, да и сами ферменты служат медикаментами. Ферменты, или энзимы, катализируют миллионы химических превращений в клетках животных, растений, микроорганизмов и воздействуют на соответствующие субстраты вне клетки. Ферменты используются в пищевой промышленности и во многих областях деятельности человека.

В *энергетике* перспективно применение новых источников биоэнергии, полученных на основе микробиологического синтеза и фотосинтетических процессов, биоконверсии биомассы в биогаз.

Современное состояние биотехнологии в России и в мире

Когда говорят о развитии биотехнологий в России, приходится учитывать длительный период упадка и деградации научных учреждений. Сейчас, после нескольких лет интенсивного роста, российские биотехнологии представлены на мировом рынке в количестве 0,2%, а в 1885 году СССР имел долю 5% на рынке продукции, относимой к биотехнологиям. Это медицинские препараты, ферменты, гормональные препараты, чистые линии микроорганизмов, используемых в научных исследованиях, сельскохозяйственном производстве и очистке окружающей среды от вредных отходов.

Интересна судьба самого громкого и скандального проекта, ставшего достоянием гласности в конце восьмидесятых. Это БВК, белково-витаминные концентраты, получаемые из парафинов нефти, при использовании специально выведенных бактериальных культур. В прессе был поднят шум, тему обсуждали эмоционально, общественность требовала закрытия «вредного проекта». Однако работа была уже сделана – бактерии, питающиеся нефтепродуктами, существовали.

Для них нашлась полезная функция: очистка воды и земли от разлившейся нефти. Сейчас вода в морских и речных портах содержит значительно меньше нефтепродуктов, чем в 70–80 годы XX в., благодаря их биологическому разложению. При помощи прожорливых бактерий очищают территорию на предприятиях от мазута и других нефтепродуктов. Трудно

переоценить пользу от этих микроорганизмов – ведь нефтяная пленка в двадцатом веке грозила погубить моря и океаны!

Производство белковой продукции из нефти не было поставлено на поток, но польза от данной биотехнологии несомненна.

В 2017 году российское правительство значительно увеличило государственное финансирование научных исследований в этой отрасли. Интересно, что ряд проектов осуществляется на общественные пожертвования. К таким проектам относится исследование микрофлоры кишечника.

Роль биотехнологии в решении глобальных проблем человечества

В конце XX века невиданными ранее темпами стала развиваться биологическая наука и ее самая передовая отрасль – биотехнология, которая наравне с микроэлектроникой, робототехникой и компьютеризацией в настоящее время играет определяющую роль в научно-техническом прогрессе. Современная биотехнология оказывает огромное влияние на все аспекты практической деятельности человека.

Контрольные вопросы

1. Охарактеризуйте основные направления развития биотехнологии.
2. Обоснуйте необходимость использования методов биотехнологии в решении проблемы обеспечения населения Земли продовольствием.
3. На какие области знаний опирается биотехнология?
4. Перечислите современные направления развития биотехнологии и основные проблемы на решение которых они нацелены?
5. В каких отраслях народного хозяйства применяются достижения биотехнологии?
6. Расскажите о медицинской биотехнологии. Перечислите задачи, которые она решает.
7. Какие задачи решает сельскохозяйственная биотехнология в области растениеводства и в области животноводства?
8. Приведите примеры проблем, которые призвана устранить пищевая биотехнология. Каким образом может быть устранена нехватка продуктов питания и дефицит белка?
9. На каком принципе основывается генетическая инженерия – новейшее направление биотехнологии? Каковы ее основные задачи? Что такое рекомбинантные ДНК?
10. Что представляет собой нанобиотехнология? Перечислите важнейшие перспективы ее развития.

2. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОБЪЕКТЫ В БИОТЕХНОЛОГИИ

2.1. Номенклатура биологических объектов

Объектами биотехнологии служат бактерии, вирусы, животные и растительные клетки, органы и ткани животных и человека, растения, грибы и другие биообъекты.

Любая *животная, растительная и микробная клетка* является своего рода биофабрикой, синтезирующей огромное число макромолекул, химических соединений, служит своеобразным хранилищем веществ, обладающих биологической активностью и представляющих ценность для использования в медицине, ветеринарии, пищевой промышленности и других сферах народного хозяйства. Например, микробная клетка синтезирует и содержит более 2500 белков, ферментов, олиго- и полисахаридов, липиды, витамины и другие вещества.

Преимущество получения этих веществ из *микробной клетки* по сравнению, например, с химическим синтезом или другими технологиями:

1) микробные клетки можно выращивать в больших объемах в короткие сроки на недефицитных питательных средах и по сравнительно простой технологии;

2) большинство химически сложных веществ, получаемых из микробов, пока недоступны для синтеза другими способами;

3) для микробиологической промышленности не требуется сложной аппаратуры, в ней в основном применяется аппаратура, используемая в химической промышленности.

Микроорганизмы различаются по сложности строения и проявлению жизненных функций, представленных в табл. 1.

Таблица 1. Мир микробов

Представители	Уровень организации	Размер, мкм	Число генов	Распространение в природе
Доклеточные				
Прионы (инфекционные белки)	Макромолекулы	0,1–0,3	1 (хозяина)	Только в живом организме (внутриклеточные паразиты)
Вироиды (ДНК, РНК)	Макромолекулы	1–100	До 100	
Вирусы	Частицы	0,01–0,4	До 100	
Клеточные				
Бактерии	Прокариоты	1–10	До 5000	В живой и неживой природе
Грибы	Эукариоты	1–30	До 5000	
Простейшие	Эукариоты	10–50	До 10 000	

К микромиру относятся как сложно устроенные одноклеточные организмы (бактерии, грибы, простейшие), так и простейшие формы жизни (вирусы, прионы, инфекционные нуклеиновые кислоты).

Условно к живым существам можно отнести вирусы, которые не способны размножаться самостоятельно, и их репродукция может происходить только внутри живых клеток.

В биотехнологии нашли применение десятки видов бактерий, дрожжей, вирусов. Обычно используются виды микробов, обладающие высокой синтетической способностью, интенсивным ростом и накоплением целевого продукта, а также безопасностью и безвредностью при массовом культивировании. Чаще всего в производственных условиях применяют *грибы* для получения *антибиотиков*; *дрожжи* – в *хлебопечении*, виноделии, пивоварении, для получения кормового белка, питательных сред; *бациллы* – для получения *ферментов*; *клостридии* – для сбраживания сахаров в ацетон, этанол, бутанол; *псевдомонады* – для получения витамина В, молочнокислые бактерии – в пищевой промышленности и т.д.

Кроме того, многие микроорганизмы (бактерии, дрожжи, вирусы) используются для получения рекомбинантных штаммов – продуцентов биотехнологической продукции (гормонов, интерферонов, иммуномодуляторов, вакцин и др.).

Две разновидности клеточной организации – эукариотная и прокариотная

Эволюция жизни на нашей планете привела к возникновению чрезвычайно большого разнообразия живых существ. По химическому составу они очень сходны: основные компоненты всякой клетки – дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК), рибонуклеиновая кислота (РНК), белки, липиды, фосфолипиды, углеводы и др. Однако имеются заметные различия между клетками бактерий и цианобактерий, с одной стороны, и животными и растительными клетками (включая также микроскопически малых представителей) – с другой. Так, ядро бактерии не имеет ядерной оболочки, поэтому их называют прокариотами (от греч. *καρυον* – ядро); другие (грибы, простейшие) имеют очерченное ядро, это эукариоты.

Прокариотические и эукариотические микроорганизмы существенно различаются по строению клетки и функциям отдельных клеточных структур. Эти различия накладывают отпечаток на все физиологические отправления микробной клетки.

Клетка – это кусочек цитоплазмы с находящимися в ней клеточными структурами, ограниченный элементарной мембраной. (Элементарная мембрана имеет характерную ультраструктуру: два электронно-плотных слоя, каждый толщиной 2,5–3,0 нм, разделенных электронно-прозрачным промежутком.) Клеточные структуры, ограниченные элементарными мембранами и выполняющие в клетке определенные функции, называются *органеллами (органоидами)*. К ним относят ядро, митохондрии, рибосомы,

лизосомы, комплекс (аппарат) Гольджи, хлоропласты и др. В клетках прокариот перечисленные выше органеллы, типичные для эукариот, отсутствуют. Ядерная ДНК у них не отделена от цитоплазмы мембраной.

Продуценты белков, аминокислот и жиров относятся как к эукариотам, так и к прокариотам.

Строение про- и эукариотических клеток, сходство и отличия

В общих чертах строение клеток животных, растений и микроорганизмов имеет много общего, однако имеются и отличия, представленные в табл. 2 и на рис. 1.

Таблица 2. Органоиды клетки и их характеристика

Органоиды	Биохимические функции	Функционально активные вещества и системы соответствующих
Ядро и его аналоги	Хранение генетической информации. Репликация ДНК, образование информационных и др. типов РНК (транскрипция)	ДНК; белки и ферменты, связанные с образованием ДНК и РНК
Хлоропласты, митохондрии и их аналоги (лизосомы)	Энергетический центр клетки. Образование АТФ. Дыхание, окисление питательных веществ и др.	Мембраны. Ферменты цикла трикарбоновых кислот и дыхательной цепи
Рибосомы	Синтез белка (трансляция)	РНК, белки
Лизосомы, пероксисомы	Разрушение биополимеров	Ферменты
Комплекс Гольджи	Секреция, модификация белков, образование мембран	Мембраны, ферменты
Вакуоли	Накопление резервных секреторных и балластных веществ	Мембраны, ферменты
Эндоплазматическая сеть	Синтез липидов, белков, углеводов, гликозилирование белков	Мембраны, ферменты
Цитоплазматическая мембрана (плазмалемма)	Транспорт веществ. Рецепторы для передачи сигналов	Липиды, белки, полисахариды
Клеточная стенка	Механический барьер, транспорт веществ, межклеточные взаимодействия	Полисахариды, белки, липиды и пр.

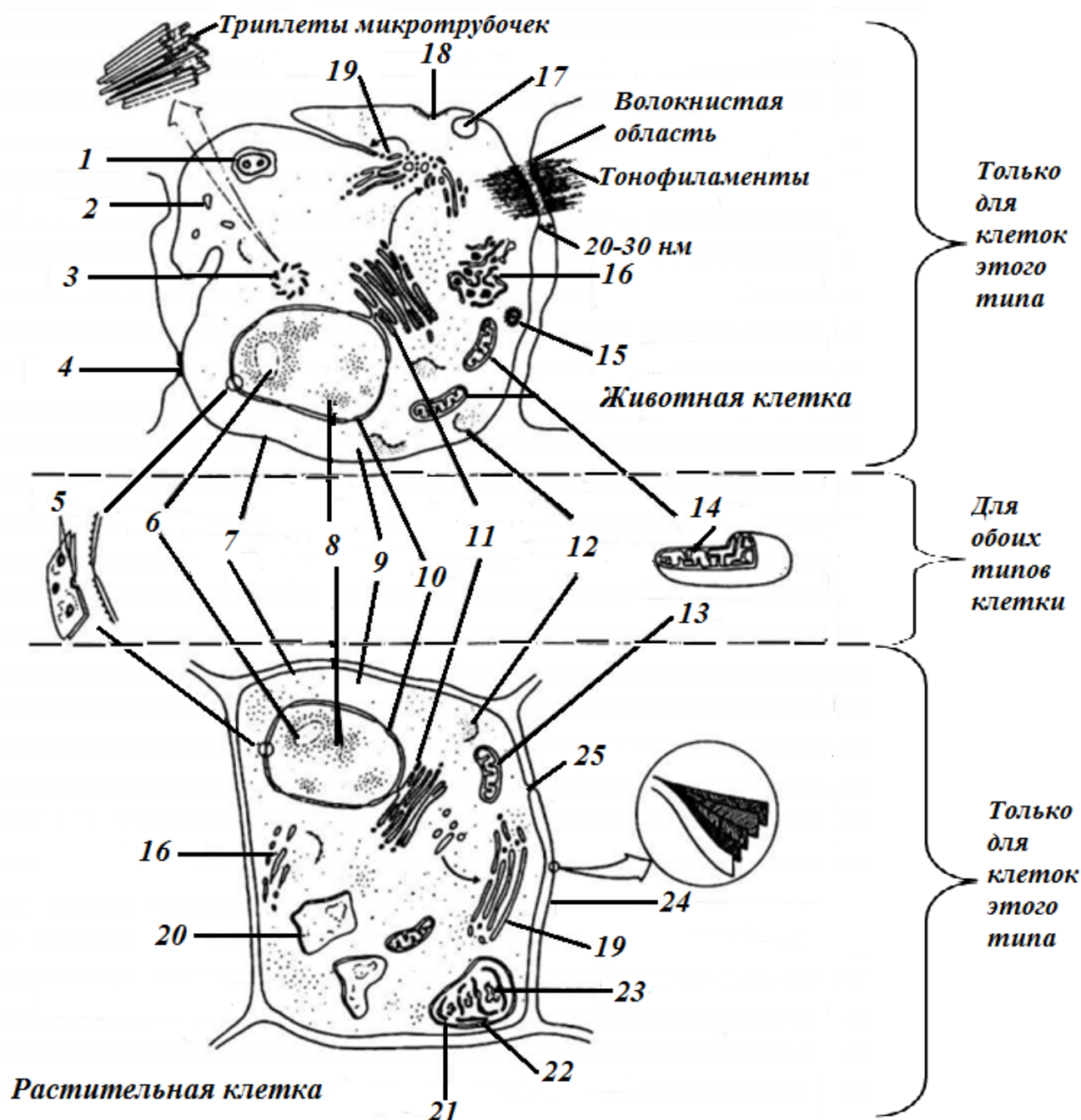


Рис. 1. Строение эукариотической клетки: 1—лизосома; 2—жировая капля; 3—центриоль; 4—плотный контакт; 5 — ядерные поры; 6 — ядрышко; 7—плазматическая мембрана (как у прокариот); 8—конденсированный хроматин; 9 — цитоплазма; 10— ядро; 11—шероховатый эндоплазматический ретикулум; 12—рибосомы (и полирибосомы); 13— митохондрии; 14— кристы; 15—окаймленный пузырек; 16— гладкий эндоплазматический ретикулум; 17— пиноцитозный пузырек; 18— окаймленная ямка; 19— комплекс Гольджи; 20— вакуоль; 21— фотосинтезирующие ламеллы; 22—хлоропласт; 23— ДНК; 24—клеточная стенка (слой целлюлозы); 25 — плазмодесма

Органеллы клетки и их функции

Эукариотическая клетка представлена на рис. 2. Она состоит из цитоплазмы, имеющей сложное строение, которая заключена в многослойную клеточную стенку.

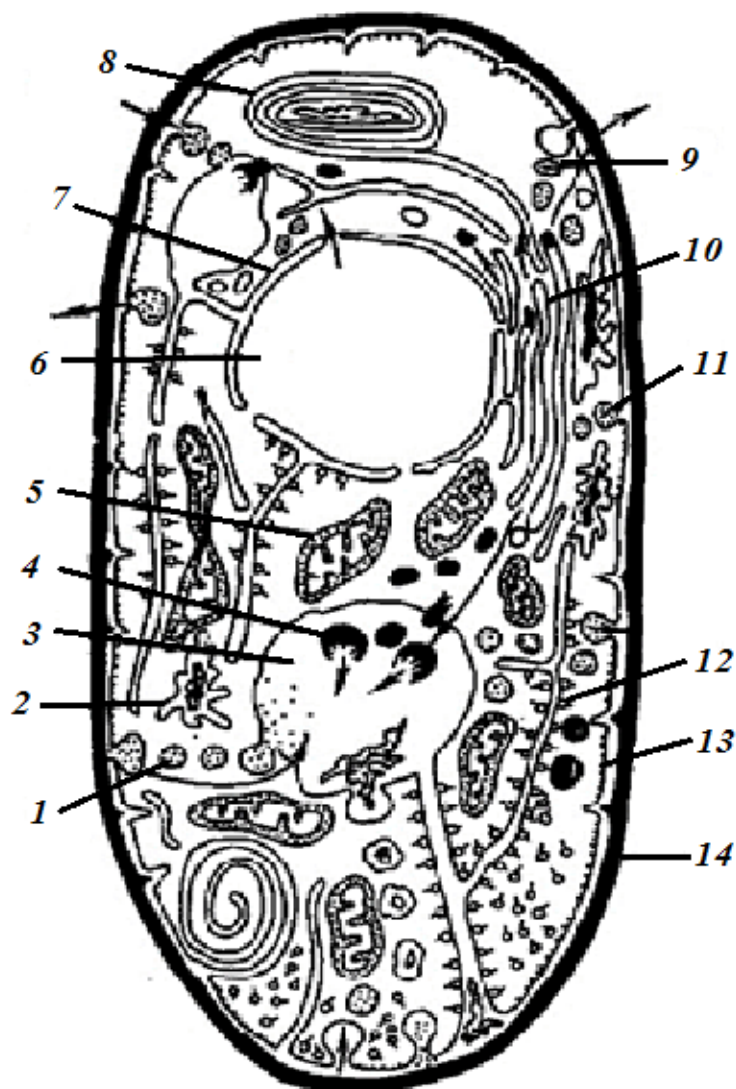


Рис.2. Схема строения дрожжевой клетки: 1 – пиноцитозный пузырек; 2 – гладкий эндоплазматический ретикулум; 3 – вакуоль; 4 – липидные включения; 5 – митохондрия; 6 – ядро; 7 – ядерная мембрана; 8 – сегрегационная гранула; 9 – выделительные пузырьки; 10 – мембраны комплекса Гольджи; 11 – фагосома; 12 – шероховатый эндоплазматический ретикулум; 13 – цитоплазматическая мембрана; 14 – клеточная стенка

Клеточная стенка – весьма прочная эластичная перегородка, отделяющая внутреннее содержимое клетки от внешней среды. Ее масса составляет 15–30 % от сухой массы клетки и имеет толщину от 150 до 280 нм. Клеточная стенка состоит на 60–70 % из гемицеллюлоз, в ее состав входят также хитин, белок, липиды и минеральные соединения.

Клеточная стенка многослойна, она состоит чаще всего из трех слоев, но их число может возрастать до 10 и выше.

Клеточная стенка выполняет важнейшую функцию регуляции проницаемости. Она имеет поры диаметром до 3,6 нм, через которые биополимеры с большой молекулярной массой поступают внутрь клетки или выделяются во внешнюю среду.

Цитоплазматическая мембрана (плазмалемма) располагается непосредственно за клеточной стенкой. Она состоит из трех слоев липопротеидов и имеет толщину около 8 нм. Наружная плазматическая мембрана осуществляет ряд функций, необходимых для жизнедеятельности клетки: сохраняет ее форму, защищает цитоплазму от физических и химических повреждений, осуществляет межклеточный контакт, избирательно обеспечивает транспорт в клетку сахаров, аминокислот, нуклеотидов и других строительных и пищевых веществ и выведение конечных продуктов обмена.

Цитоплазматическая мембрана регулирует процессы обмена веществ клетки. Она образует впячивание в виде тонкого канальца, в который попадает жидкость с растворенными в ней веществами, и способна захватывать довольно большие капли углеводов, липидов и белков. Это явление называется пиноцитозом (от греч. «пино» – пью и «цитос» – клетка) и присуще клеткам растений, животных и грибов. Цитоплазматическая мембрана может также захватывать из среды твердые частицы и втягивать их внутрь клетки – этот процесс носит название фагоцитоза (от греч. «фагос» – пожирать и «цитос» – клетка). Кроме того, мембрана ответственна за экскрецию (выброс) в среду продуктов обмена клетки. Каждая клетка животных, растений и грибов отделена от окружающей среды или других клеток цитоплазматической мембраной.

Цитоплазма – обязательная часть клетки. Это внутреннее полужидкое, коллоидное содержимое клетки, ограниченное цитоплазматической мембраной. Вязкость цитоплазмы в 800 раз выше вязкости воды. Цитоплазма клетки находится в движении, что способствует перемещению растворенных в ней веществ от одних органелл к другим. Большинство химических и физиологических процессов клетки проходит в цитоплазме. Вновь синтезированные белки и другие вещества перемещаются внутри клетки или выводятся из нее.

Цитоплазма содержит большое количество растворенных белков (ферментов), аминокислот, углеводов, минеральных веществ, витаминов, жиров и т. д. В ней находятся все клеточные органеллы: эндоплазматический ретикулум, рибосомы, аппарат Гольджи, лизосомы, вакуоли, митохондрии и, наконец, ядро. Цитоплазма у эукариот, как правило, занимает 50–60 % объема клетки.

Эндоплазматическая сеть (ретикулум) является системой синтеза и транспорта органических веществ в цитоплазме клетки, представляет собой систему соединенных полостей, канальцев и трубочек. Они ограничены мембраной, сходной по строению с плазматической мембраной.

Эндоплазматический ретикулум изолирует и локализует в клеточной цитоплазме различные ферментные системы, катализирующие синтез белковых и липидных компонентов большинства клеточных органелл.

Эндоплазматический ретикулум бывает гладким и шероховатым. Гладкий эндоплазматический ретикулум ответствен за углеводный и липидный обмен. На поверхности шероховатого эндоплазматического ретикулума концентрируются рибосомы и происходит синтез белка.

Рибосомы – это органоиды размерами от 15 до 20 нм, состоящие из нуклеопротеидов и распределенные по всей цитоплазме или прикрепленные к мембранам эндоплазматической сети. На рибосомах происходит синтез белков клетки на матрице матричной рибонуклеиновой кислоты (мРНК), т. е. трансляция.

Вновь синтезированные белки поступают в систему полостей и канальцев, по которым перемещаются внутри клетки.

В состав рибосом входят рибосомная РНК (рРНК) и белки.

Комплекс (аппарат) Гольджи представляет собой мембранное образование, состоящее из пузырьков и сложенных стопкой нескольких дисковидных пластин, называемых диктиосомами. Диктиосомы располагаются параллельно и очень близко одна от другой.

Поступающие в просветы полостей и канальцев эндоплазматической сети продукты биосинтеза концентрируются и транспортируются в комплекс Гольджи. Функции аппарата Гольджи в клетке до конца не изучены. Предполагается, что он участвует в транспорте продуктов биосинтеза к поверхности клетки и выведении их из клетки, в формировании лизосом. Правильная сортировка белков и их модификация перед избирательным выделением – одна из главных функций аппарата Гольджи.

По современным представлениям в клетке имеется единая мембранная система, в которой взаимосвязаны такие органоиды, как эндоплазматическая сеть, комплекс Гольджи, лизосомы.

Лизосомы (от греч. «лизео» – растворяю и «сома» – тело) представляют собой органоиды овальной формы, окруженные мембраной. Лизосомы содержат около 30 гидролитических ферментов, расщепляющих белки, нуклеиновые кислоты, углеводы, липиды, принесенные пиноцитозными или фагоцитозными пузырьками.

Мембрана лизосом очень прочная и препятствует проникновению собственных ферментов в цитоплазму клетки. Если же лизосома повреждается от каких-либо внешних воздействий, то разрушается вся клетка или часть ее. Лизосомы встречаются во всех клетках растений, животных и грибов.

Пиноцитозные и фагоцитозные пузырьки попадают в цитоплазму, передвигаются в ней и сливаются с лизосомами. Переваривая различные органические частицы, лизосомы обеспечивают дополнительным «сырьем» химические и энергетические процессы в клетке. При голодании клетки лизосомы переваривают некоторые органоиды, не убивая клетку. Иногда лизосомы переваривают целые клетки и группы клеток, что играет важную

роль в процессе развития животных. Пример – утрата хвоста при превращении головастика в лягушку.

Пероксисомы–содержащие пероксидазы органеллы, образуют пероксид водорода, который расщепляется по каталазному или пероксидазному пути.

Вакуоли являются производными эндоплазматического ретикулума либо аппарата Гольджи. Они могут быть местом локализации запасных веществ клетки и клеточным образованием, в котором сосредоточиваются ненужные продукты обмена и токсические вещества, т. е. вакуоли принимают непосредственное участие в выделительной функции клетки.

Вакуоли отделены от цитоплазмы липопротеидной мембраной, на поверхности которой располагаются ферменты.

Митохондрии– это органоиды, ответственные за энергетический обмен клетки. Митохондрии снабжают клетку энергией, которая накапливается в форме аденозинтрифосфата (АТФ) в результате окисления органических веществ (в митохондрии с помощью специфических ферментов происходит преобразование энергии пищевых веществ в энергию АТФ, необходимую для жизнедеятельности клетки и организма в целом). Молекулы АТФ являются универсальными источниками энергии для любых жизненных процессов в клетке. В бактериях функцию митохондрий выполняют особые образования цитоплазматической мембраны – мезосомы.

Внутри митохондрий находятся окислительные ферменты, РНК, ДНК и рибосомы, отличающиеся от цитоплазматических. Митохондрии –саморепродуцирующая система: они в процессе деления производят самостоятельно (независимо от репликации ядерной ДНК) репликацию митохондриальной ДНК при участии находящейся в них ДНК-полимеразы. В митохондриях обнаружен полный комплект синтезирующей белок системы. Считают, что эта система синтезирует структурные белки внутренней мембраны митохондрии и присущие этой мембране ферменты.

Ядро–важнейшее образование клетки, оно играет главную роль в передаче генетической информации, регулирует обмен веществ, отвечает за синтез белка, липопротеидов, за процесс размножения клетки, контролирует образование клеточных структур и т. д. Главные функции клеточного ядра: хранение информации и передача ее дочерним клеткам при репликации, делении клетки и ядер (передача информации в цитоплазму с помощью транскрипции, т. е. синтез мРНК, тРНК и рРНК).

В клетке животных, высших растений и грибов находится, как правило, одно ядро. Ядро имеет шаровидную или округлую форму. Оно окружено мембраной, которая состоит из двух слоев. Каждый из них подобен плазматической мембране, но отличается многочисленными порами. Через них осуществляется активный обмен веществами между ядром и цитоплазмой. Размеры пор позволяют проникать из ядра в цитоплазму даже крупным молекулам и частицам.

В ядре хранится наследственная информация не только о всех признаках и свойствах данной клетки, процессах, которые должны протекать в ней

(например, синтез белка), но и о признаках организма в целом. Информация записана в молекулах ДНК, которые являются важной составной частью хромосом. Однако основную часть хромосом составляют различные белки.

Именно ядро играет центральную роль в явлениях наследственности.

Пластиды. Это органоиды, свойственные только клеткам растений. По своему строению пластиды сходны с митохондриями, так как имеют двухмембранное строение. Существуют три вида пластид: хлоропласты, хромопласты и лейкопласты.

Хлоропласт по форме напоминает диск или шар диаметром 4–6 мкм с двойной оболочкой. Внутри хлоропласта имеются ДНК, рибосомы и особые мембранные структуры – граны, связанные между собой и с внутренней мембраной хлоропласта. В мембранах гран находится хлорофилл. Благодаря хлорофиллу в хлоропластах происходит фотосинтез, т.е. превращение энергии солнечного света в химическую энергию АТФ. Энергия АТФ используется в хлоропластах для синтеза углеводов из углекислого газа воздуха.

Хромопласты. Пигменты красного и желтого цвета, находящиеся в хромопластах, придают различным частям растений красную и желтую окраску. Корень моркови, плоды томатов окрашены благодаря каротиноидам, содержащимся в хромопластах. Сочетание хромопластов, содержащих разные пигменты (50 видов каротиноидов), создает большое разнообразие окрасок цветков и плодов растений.

Лейкопласты являются местом накопления запасного питательного вещества – крахмала. Особенно много лейкопластов в клетках клубней картофеля. На свету лейкопласты могут превращаться в хлоропласты (в результате чего клубни картофеля зеленеют). Осенью хлоропласты превращаются в хромопласты, и зеленые листья и плоды желтеют и краснеют.

Органоиды движения. Многие клетки одноклеточных и многоклеточных организмов обладают способностью к движению. Под этим понимается и движение клетки в пространстве, и внутриклеточное движение ее органоидов.

У растений, животных и грибов движение клеток необходимо для взаимодействия между собой. В жидкой среде перемещение клеток осуществляется движением жгутиков и ресничек. Так передвигаются многие одноклеточные, например, эвглена зеленая, туфельки и др. Некоторые виды бактерий также движутся с помощью жгутиков, длинных и гибких, которые быстро вращаются, обеспечивая продвижение клетки. Амебы и некоторые другие простейшие организмы, а также специализированные клетки многоклеточных (например, лимфоциты) передвигаются с помощью выростов, образующихся на поверхности клеток.

Клетка находится в постоянном движении. При фагоцитозе и пиноцитозе происходит впячивание плазматической мембраны внутрь клетки, передвигаются лизосомы, пузырьки комплекса Гольджи, митохондрии, наконец, движется сама цитоплазма.

Клеточное движение обеспечивается структурами, называемыми микротрубочками и микронитями. *Микротрубочки* – это длинные полые

цилиндры, стенки которых состоят из белков. Из микротрубочек состоят жгутики и реснички всех изученных клеток. *Микронити*—очень тонкие структуры, состоящие в основном из белка. В мышечных клетках они создают структуры, обеспечивающие сократительную функцию этих клеток.

В цитоплазме клеток всех организмов около ядра располагается *клеточный центр*, принимающий участие в делении клетки. В состав клеточного центра клеток животных и низших растений входит *центриоль*. Центриоль – парное образование. Она содержит две удлиненные гранулы, состоящие из микротрубочек и расположенные перпендикулярно друг к другу.

Клеточные включения. В цитоплазме находятся непостоянные структуры цитоплазмы, которые в отличие от органоидов то возникают, то исчезают в процессе жизнедеятельности клетки. Плотные в виде гранул включения содержат запасные питательные вещества (крахмал, белки, сахара, жиры) или продукты жизнедеятельности клетки, которые по той или иной причине не могут быть сразу удалены. Способностью синтезировать и накапливать запасные питательные вещества обладают все пластиды растительных клеток.

В растительных клетках накопление запасных питательных веществ происходит и в *вакуолях*, которые часто занимают почти весь объем клетки, отодвигая ядро и цитоплазму к плазматической мембране.

Прокариотическая клетка

Наиболее характерным примером прокариотической клетки может служить бактериальная клетка. Изучением ультраструктурной организации бактериальной клетки занимались многие ученые, однако до настоящего времени нет четкого представления о строении бактериальной клетки в связи с очень малыми размерами объекта исследования, сложностью препаративных методов дифференциации отдельных клеточных структур и отсутствием единого методического подхода к решению этой проблемы. Поэтому можно говорить только о гипотетической схеме ее организации.

Прокариотическая клетка, представленная на рис. 3, так же как и эукариотическая, сверху покрыта достаточно жесткой *клеточной стенкой*, определяющей ее форму. К стенке клетки примыкает цитоплазматическая мембрана, а затем цитоплазма, в которой располагаются ядерный элемент, органоиды и запасные вещества клетки.

По составу и строению клеточной стенки бактерии делятся на две группы в зависимости от окраски по Грамму: грамположительные и грамотрицательные.

Клеточная стенка грамположительных бактерий (рис. 4, а) однородна, состоит из мукополимеров. Они имеют в своем составе N-ацетилглюкозамин и N-ацетилмурамовую кислоту, которые связаны с диаминопимелиновой кислотой и аминокислотами с помощью пептидных связей.

В свою очередь, мукопептиды ковалентно связаны с тейхоевой кислотой, расположенной в периплазматическом пространстве между клеточной стенкой и мембраной.

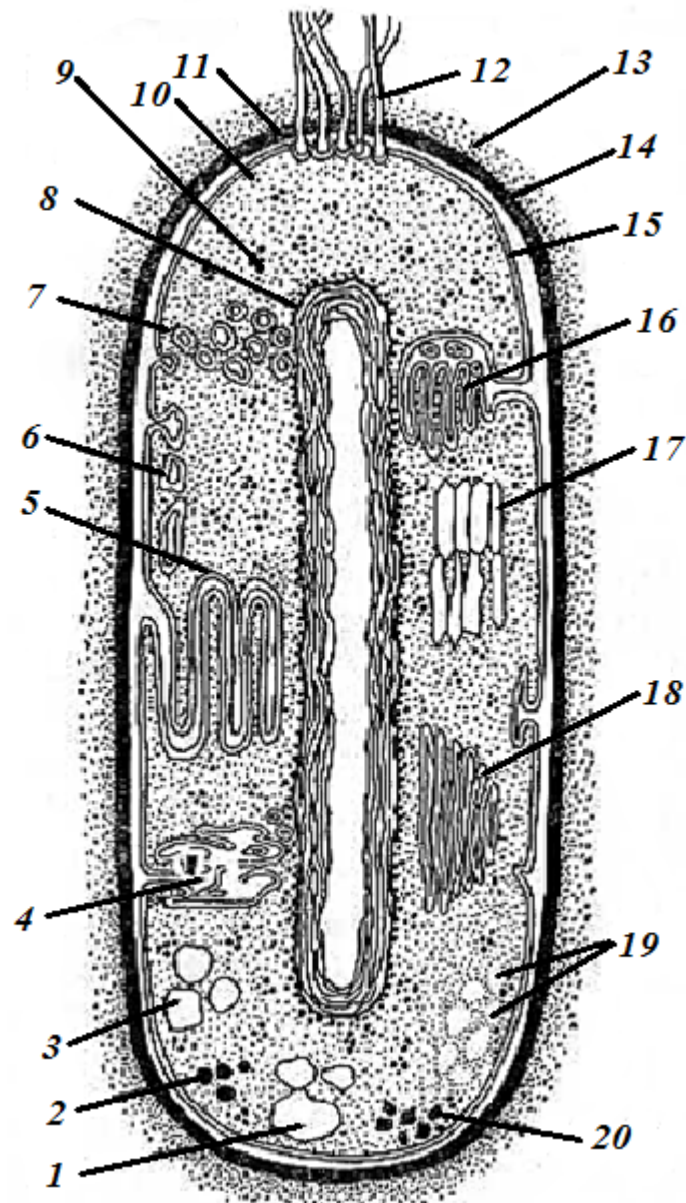


Рис. 3. Схема строения бактериальной клетки: 1 – гранула поли- β -оксимасляной кислоты; 2 – жировые капельки; 3 – включения серы; 4 – трубчатые тилакоиды; 5 – пластинчатые тилакоиды; 6 – пузырьки; 7 – хроматофоры; 8 – ядерное вещество (нуклеоид); 9 – рибосомы; 10 – цитоплазма; 11 – базальное тельце; 12 – жгутики; 13 – капсула; 14 – клеточная стенка; 15 – цитоплазматическая мембрана; 16 – мезосома; 17 – газовые вакуоли; 18 – ламеллярные структуры; 19 – гранулы полисахарида; 20 – гранулы полифосфата

В мукопептидный слой входят белки, обладающие антигенным свойством. В клеточной стенке содержатся также липиды (приблизительно 1 %

от ее массы и в редких случаях – около 4 %). Толщина клеточной стенки зависит от условий обитания и достигает 10–50 нм.

Клеточная стенка составляет примерно 20 % от массы всей клетки.

Клеточная стенка грамотрицательных бактерий, представленная на рис. 4, бустроена сложнее. Наружный слой представляет собой трехслойную складчатую структуру, состоящую из липополисахаридов и белков. На липиды в клеточной стенке приходится около 20 % от ее массы. Толщина этого слоя примерно 9 нм.

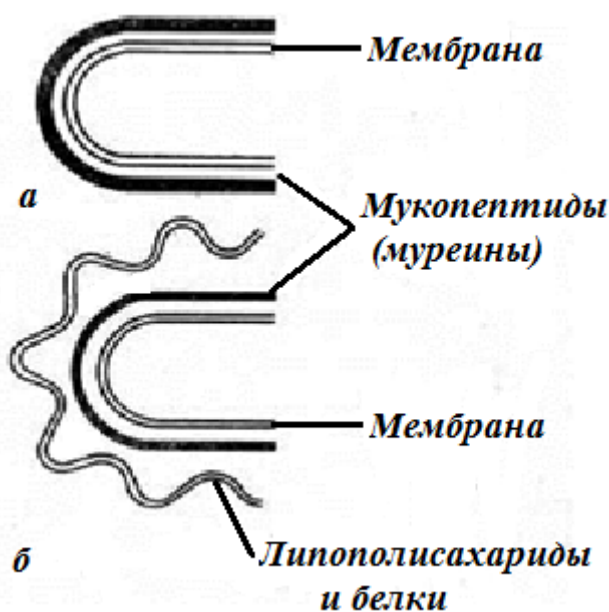


Рис. 4. Схема строения клеточных стенок грамположительных (а) и грамотрицательных (б) бактерий

Клеточная стенка проницаема, через нее внутрь клетки транспортируются питательные вещества и выводятся продукты обмена. В клеточной стенке есть поры, размером до 6 нм. Кроме того, клеточная стенка имеет отверстия выхода фимбрий, структурных тяжей и жгутиков. Клеточная стенка защищает клетку от внешних воздействий, поддерживает устойчивость определенной формы, способствует формированию капсулы.

Цитоплазматическая мембрана непосредственно прилегает к клеточной стенке. Но у некоторых бактерий между ними есть пространство, которое можно с некоторым допущением назвать периплазматическим. Здесь, по-видимому, сосредотачиваются гидролитические ферменты и вещества, транспортируемые внутрь клетки и за ее пределы. Цитоплазматическая мембрана бактерий представляет собой липопротеидную трехслойную мембрану (липидный слой покрыт с двух сторон белковым слоем). Толщина мембраны около 7,5 нм. Она является главным осмотическим барьером клетки, ею контролируются поступление и выброс веществ, водный и солевой обмены. Цитоплазматическая мембрана имеет многочисленные выпячивания (инвагинации). Внутри них находятся пузырьки и каналы, организованные в

трубчатые и пластинчатые тилакоиды, бухтообразные и спиралевидно закрученные тельца – мезосомы.

Предполагают, что одни из них выполняют функции митохондрий, другие – эндоплазматического ретикулума, третьи – аппарата Гольджи и т.д. Но это пока недостаточно четко подтверждено экспериментально. Очевидно только, что в цитоплазматической мембране происходят важнейшие биохимические превращения с участием различных ферментов, осуществляется синтез некоторых компонентов клеточной стенки и капсулы. С мембраной частично связаны рибосомы клетки. Цитоплазматическая мембрана составляет около 20 % сухой массы клетки.

Цитоплазма является внутренним содержимым клетки, ее жидкой бесструктурной субстанцией с очень сложной, тонкой, слоисто-гранулярной структурой, состоящей из нерастворимой и растворимой частей. В ней находятся все жизненно важные структуры и органоиды. При высокой разрешающей силе электронного микроскопа в цитоплазме можно заметить тонкие нитевидные структуры различной длины и гранулы, которые, возможно, являются молекулами нуклеиновых кислот, ферментов, белков. В растворимой части цитоплазмы (в цитоплазме содержится до 70–80 % всей воды клетки) обнаружены пигменты, сахара, аминокислоты и др. В цитоплазме бактерий находятся свободные рибосомы, мембранные системы, на которых закреплены рибосомы и полисомы. В центральной части цитоплазмы находится ядерное вещество.

В цитоплазме могут присутствовать гранулы запасных веществ: крахмала, гликогена, капли жира, гранулы полифосфатов, включения серы и т. д.

Внутри клетки наблюдается высокое осмотическое давление: до 3 МПа у грамположительных бактерий и до 0,8 МПа – у грамотрицательных.

Ядро как такового нет, оно может быть представлено в виде аналога – *нуклеоида* или просто ядерного вещества, диффузно распределенного в протоплазме.

В отличие от эукариотической клетки, ДНК бактериальной клетки не отделена от цитоплазмы ядерной мембраной.

Предполагается, что весь геном бактериальной клетки представлен одной гигантской замкнутой молекулой ДНК с молекулярной массой $7 \cdot 10^9$ – *плазмидой*. Плазмиды – кольцевые двуспиральные молекулы ДНК длиной в тысячи пар нуклеотидов присутствуют как в бактериальных клетках, так и в клетках низших эукариот. Плазмиды играют важную роль в обмене генетической информацией между клетками микроорганизмов.

Ее вполне можно расценивать как бактериальную хромосому. Но все же следует помнить, что ДНК бактерий упакованы менее плотно, чем в ядре эукариотической клетки, в ядерном веществе отсутствует мембрана, не найдены ядрышко и набор хромосом, ДНК не связана с основными белками – гистонами. Все это свидетельствует об эволюционно более примитивной форме организации ядерного вещества у прокариотов. Многие бактерии имеют

капсулу или дополнительные внешние структуры: жгутики, фимбрии, структурные тяжи.

Капсула является обязательной частью бактериальной клетки. Она выполняет защитную функцию, предохраняя бактерии от механических повреждений, высыхания, служит препятствием для проникновения фага, создает дополнительный осмотический барьер. Капсула может покрывать клетку толстым слоем или тонкой пленкой, заметной только под электронным микроскопом. Консистенция капсулы слизистая, состоит она преимущественно из полисахаридов, гликопротеинов, реже из полипептидов и клетчатки.

Жгутики, располагающиеся на поверхности ряда бактерий, являются органом их передвижения. По своей структуре жгутики бывают двух типов. Первый тип жгутиков характеризуется спиральной укладкой глобулярных белковых молекул, образующих от 3 до 10 параллельных рядов. У жгутиков второго типа с фибриллярной структурой белка фибриллы тянутся по всей длине органоида.

Фимбрии пили – это тончайшие ворсинки, которые покрывают сверху всю поверхность бактерий. Эти структуры свойственны многим видам бактерий. Ворсинки выполняют прикрепительные функции, удерживая бактерии на различных частицах, они способствуют скреплению клеток между собой, выполняют роль защитного фактора, могут служить каналом для передачи наследственной информации (пили имеют канал длиной не менее 3–4 нм).

В клетках многих микроорганизмов имеются *гранулы* и *вакуоли* – образования, которые являются хранилищами резервных веществ. Чаще всего они представлены в виде волютина, жира или углеводов.

Сравнительная характеристика клеток эукариот

По строению различные эукариотические клетки сходны. Но наряду со сходством между клетками организмов различных царств живой природы имеются заметные отличия. Они касаются как структурных, так и биохимических особенностей.

Для *растительной* клетки характерно наличие различных пластид, крупной центральной вакуоли, которая иногда отодвигает ядро к периферии, а также расположенной снаружи плазматической мембраны клеточной стенки, состоящей из целлюлозы. В клетках высших растений в клеточном центре отсутствует центриоль, встречающаяся только у водорослей. Резервным питательным углеводом в клетках растений является *крахмал*.

В клетках представителей царства грибов клеточная стенка обычно состоит из хитина – вещества, из которого построен наружный скелет членистоногих животных. Имеется центральная вакуоль, отсутствуют пластиды. Только у некоторых грибов в клеточном центре встречается центриоль. Запасным углеводом в клетках грибов является *гликоген*.

В клетках животных отсутствует плотная клеточная стенка, нет пластид и центральной вакуоли. Центриоль характерна для клеточного центра животных клеток. Резервным углеводом в клетках животных также является *гликоген*.

Сравнительная характеристика клеток прокариот и эукариот

Клетки *прокариот*, к которым относятся бактерии, в отличие от эукариот, имеют относительно простое строение. В прокариотической клетке нет организованного ядра, в ней содержится только одна хромосома, которая не отделена от остальной части клетки мембраной, а лежит непосредственно в цитоплазме. Поскольку бактериальная хромосома содержит очень мало белков и представляет собой нить ДНК, она может быть только условно названа хромосомой. Однако в ней также записана вся наследственная информация бактериальной клетки.

Цитоплазма прокариот по сравнению с цитоплазмой эукариотических клеток значительно беднее по составу структур. Там находятся многочисленные более мелкие, чем в клетках эукариот, рибосомы. Функциональную роль митохондрий и хлоропластов в клетках прокариот выполняют специальные, довольно просто устроенные мембранные структуры.

Клетки прокариот, так же как и эукариотические клетки, покрыты плазматической мембраной, поверх которой располагается клеточная оболочка или слизистая капсула. Несмотря на относительную простоту, прокариоты являются типичными независимыми клетками. Сравнительная характеристика прокариот и эукариот представлена в табл. 3.

Таблица 3. Сравнительная характеристика прокариот и эукариот

Признаки	Прокариоты	Эукариоты
Ядерная оболочка	Нет	Есть
ДНК	Замкнута в кольцо (условно называется <i>бактериальная хромосома</i>)	Ядерная ДНК представляет собой линейную структуру и находится в хромосомах
Хромосомы	Нет	Есть
Митоз	Нет	Есть
Мейоз	Нет	Есть
Гаметы	Нет	Есть
Митохондрии	Нет	Есть
Пластиды у автотрофов	Нет	Есть

Способ поглощения пищи	Адсорбция через клеточную мембрану	Фагоцитоз и пиноцитоз
Пищеварительные вакуоли	Нет	Есть
Жгутики	Есть	Есть

Контрольные вопросы

1. Перечислите объекты биотехнологии. Дайте их сравнительную оценку.
2. Укажите преимущества получения этих веществ из микробной клетки по сравнению, например, с химическим синтезом или другими технологиями.
3. Какие виды микробов обычно используются в биотехнологии? Приведите примеры получения ряда продуктов с использованием микроорганизмов в производственных условиях.
4. Какие две разновидности клеточной организации Вы знаете? Укажите их сходство и различие.
5. Расскажите о строении прокариотических клеток, перечислите органоиды клетки и дайте их характеристику.
6. Охарактеризуйте строение эукариотических клеток, перечислите органоиды клетки и перечислите выполняемые ими функции.
7. Какой органоид играет главную роль в передаче генетической информации, регулирует обмен веществ, отвечает за синтез белка, липопротеидов, за процесс размножения клетки, контролирует образование клеточных структур и т. д.?
8. Какие органоиды называют рибосомами? Какую важнейшую функцию они выполняют?
9. Что представляет собой комплекс (аппарат) Гольджи? С какими органоидами мембранной системы клетки он связан?
10. Какие органоиды клетки содержат около 30 гидролитических ферментов, расщепляющих белки, нуклеиновые кислоты, углеводы, липиды?

2.2. Вирусы, бактерии, грибы, растения, животные как объекты биотехнологии

Объектами биотехнологии являются вирусы, бактерии, грибы – микромицеты и макромицеты, протозойные организмы, клетки (ткани) растений, животных и человека, некоторые биогенные и функционально сходные с ними вещества (например, ферменты, простагландины, лектины, нуклеиновые кислоты и др.). Объекты биотехнологии могут быть представлены

организованными частицами (вирусы), клетками (тканями) или их метаболитами (первичными, вторичными).

Вирусы занимают положение между живой и неживой природой, у них нет ядра, хотя имеется наследственный ядерный материал – рибонуклеиновая кислота (РНК) и дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК). В отличие от микробов клеточной организации рибонуклеиновую и дезоксирибонуклеиновую кислоты в вирусных частицах вместе никогда не обнаруживают.

В настоящее время большинство объектов биотехнологии составляют микробы, относящиеся к трем надцарствам (безъядерные, предъядерные, ядерные) и пяти царствам (вирусы, бактерии, грибы, растения и животные).

Микробами среди растений являются микроскопические водоросли (Aglae), а среди животных – микроскопические простейшие (Protozoa). Из эукариот к микробам относятся грибы и лишайники, которые являются природными симбиотическими ассоциациями микроскопических грибов и микроводорослей или грибов и цианобактерий.

Из всех объектов биотехнологии лишь вирусы, вироиды и биомолекулы не имеют клеточной организации. Однако вирусы, находясь в клетках, ведут себя как живые существа – они реплицируются и их генетический материал функционирует.

Бактерии имеют клеточную организацию и у них имеются нуклеиновые кислоты обоих типов – РНК и ДНК, из которых ДНК представлена в виде одиночной (кольцевидной) хромосомы. Большинство из них размножается на питательных средах (вне организма), а если среди бактерий и есть безусловные (облигатные) паразиты, приближающиеся по данному признаку к вирусам (хламидии, спироплазмы, риккетсии), то паразитизм их отличается по своему механизму – его можно назвать клеточным. Паразитизм вирусов развивается на генетическом уровне. Таким образом, бактерии – это организмы, состоящие из функционально связанных структур, в том числе генетических. Несмотря на то, что генетические структуры бактериальной клетки функционируют полноценно, они не сгруппированы в форме отграниченного ядра.

Вирусы. Среди микробов вирусы характеризуются наименьшей величиной – (измеряются в нанометрах) и облигатным паразитизмом. Последний признак положен в основу классификации их на вирусы бактерий, или бактериофаги, вирусы растений и вирусы животных; имеются также и вирусы грибов. Структурно вирусы представляют собой организованные частицы, содержащие один какой-либо тип нуклеиновой кислоты (РНК или ДНК), не обладающие собственным обменом веществ, но способные к репликации в клетках организма-хозяина или интеграции с его геном. Под организованностью вирусной частицы понимают специфическое построение, характерное для того или иного вируса, существующего вне организма – вирион. Каждый вирион в очищенном виде представляет собой истинный кристалл, который построен из нуклеиновой кислоты и белка, не связанных друг с другом ковалентными связями.

Нуклеиновые кислоты – вещества наследственности вирусов. По типу нуклеиновой кислоты их подразделяют на РНК-содержащие вирусы и ДНК-содержащие вирусы. К первым относят все вирусы растений, ко вторым – большинство бактериофагов, ряд вирусов человека и животных (аденовирусы, вирусы герпеса, осповакцина и др.).

Белок структурируется вокруг вирусной нуклеиновой кислоты (генома) в виде оболочки и называется капсидом. Форма вириона определяется его капсидом. Вместе с нуклеиновой кислотой капсид образует нуклеокапсид.

Представителями ДНК-содержащих вирусов являются вирусы контагиозного моллюска, оспы, герпеса, большинство фагов бактерий; РНК-содержащими являются вирусы растений, вирусы гриппа человека, бешенства, полиомиелита и др.

Растения. Царство растений включает подцарства багряннок, водорослей и высших растений. У первых двух нет дифференциации тела на органы и ткани – они представляются слоевищем и обитают главным образом в воде. Тело высших растений расчленено на органы и ткани. К настоящему времени насчитывают сотни тысяч видов растений, многие из которых используют в различных отраслях народного хозяйства.

Для растений характерны: способность к фотосинтезу, наличие целлюлозы, биосинтез крахмала.

Водоросли. К водорослям относятся багрянки, пиррофитовые, золотистые, желто-зеленые, эвгленовые и харовые. Как правило, водоросли являются водными организмами, их насчитывают около 100 тыс. видов. Все они пигментированы за счет хлорофилла, каротиноидов, ксантофиллов, фикобилинов. Водоросли – важный источник различных полисахаридов и других биологически активных веществ. Размножаются они вегетативно, бесполым и половым путями. Как биообъекты используются недостаточно, хотя, например, ламинария под названием морской капусты производится промышленностью различных стран. Хорошо известны получаемые из водорослей агар-агар и альгинаты, полисахариды, используемые в пищевой промышленности, а также для изготовления микробиологических сред.

Клетки высших растений. Высшие растения (порядка 300 тыс. видов) – это дифференцированные многоклеточные, преимущественно наземные организмы. В процессе дифференциации и специализации клетки растений группировались в ткани. Ткани, в зависимости от функции, подразделяют на образовательные, или меристемные, покровные, проводящие, механические, основные, секреторные. Из всех тканей лишь меристемные способны к делению, и за их счет образуются все другие ткани. Это важно для получения клеток, которые затем должны быть включены в биотехнологический процесс.

В 1902г. Г. Хаберландт впервые сделал попытки культивировать клетки растений. Промышленное производство декоративных и плодовоовощных культур в ряде стран мира базировалось преимущественно на методе культур тканей и органов растений.

Любой вид растения может дать в соответствующих условиях неорганизованную массу делящихся клеток – каллус (от лат. *callus* – мозоль), особенно при индуцирующем влиянии растительных гормонов. Массовое производство каллусов с дальнейшей регенерацией побегов пригодно для крупномасштабного производства растений. Каллус представляет собой основной тип культивируемой на питательной среде растительной клетки. Каллусная ткань из любого растения может длительно рекультивироваться.

Кроме выращивания каллусов удастся культивировать клетки некоторых растений в суспензионных культурах.

Важными биообъектами представляются также и протопласты растительных клеток. Методы их получения принципиально сходны с методами получения бактериальных и грибных протопластов.

Растения служат поставщиками питательных веществ для других организмов. Их также используют для получения многих лекарственных средств (сердечных, мочегонных, противовоспалительных и т.д.).

Для извлечения из растений физиологически активных и лекарственных соединений по-прежнему широко используются традиционные методы (экстракция, перегонка, фильтрация), однако все большее значение приобретают технологии получения биологически активных веществ из клеточных культур, а также производство продуктов из генетически модифицированных растений.

Грибы. К царству низших эукариот относятся микромицеты, то есть микроскопические грибы (например, дрожжи, пенициллы, аспергиллы и др.) и макромицеты, формирующие в процессе своего роста и развития визуально наблюдаемые плодовые тела – трутовики, агариковые грибы и др. Микро- и макромицеты могут быть объектами биотехнологии.

Примечательно, что грибы имеют сходство и с растениями (верхушечный, или апикальный рост, прочная клеточная стенка, наличие вакуолей и поперечных перегородок у многих из них) и с животными (гетеротрофный тип питания, большая или меньшая потребность в витаминах, наличие хитина или хитозана, синтез гликогена). Следовательно, грибы эволюционно произошли раньше – до дивергенции растений и животных в самостоятельные царства. В то же время лишь грибам присуще мицелиальное строение и, как следствие, абсорбционный способ питания (осмотрофия); для них известны явления дикариозиса (раздельное нахождение двух ядер в одной клетке, способных к одновременному делению и имитирующих диплоидное ядро) и гетерокариозиса (нахождение разнокачественных ядер в одной клетке).

Основные таксономические группы грибов (от греч. *taxis* – приведение в порядок, устройство, *nomos* – закон) являются достаточно устоявшимися, однако предлагаемые разными авторами классификационные схемы весьма многочисленны и порой во многом различны. В этой связи целесообразно и научно оправдано придерживаться следующей схемы. Царство грибов включает два отдела – *Muchomycota* и *Eumycota*, то есть грибы-слизевики (от

греч. туха–слизь) и настоящие грибы (от греч. eu– хорошо, в смысле – типичный, хорошо развитый). Первые из них немногочисленны и представлены "голой" плазменной массой – плазмодием. Они претерпевают своеобразный цикл развития и образуют половые аттрактанты (от лат. attractio – притяжение, тяготение).

Отдел эумицетов включает 7 классов: Chytridiomycetes, Oomycetes, Rhizophytridiomycetes, Zygomycetes, Ascomycetes, Basidiomycetes и Deuteromycetes. К хитридиевым (от греч. chytridion – капелька, что отражает содержание капли жира в зооспорах) относится более 500 видов грибов, в основном представленных плазмодияльными образованиями, то есть у них полностью отсутствует мицелий, а если он есть, то находится лишь в зачаточном состоянии. Зооспоры и планогаметы (клетки размножения) располагают только одним задним бичевидным (плетевидным) жгутиком, что имеет определенное таксономическое значение.

Гифохитридиевые имеют зооспоры с одним передним бичевидным жгутиком, нити их не имеют перегородок, класс представлен немногими видами.

Оомицеты также включают свыше 500 видов. Это водные грибы, объединяемые на основании оогамии – полового процесса. Бесполое зооспоры их обладают двумя разными жгутиками, один из которых передний сверкающий (блестковидный, перистый), другой – задний бичевидный.

Зигомицеты, включающие свыше 500 видов, полностью утратили подвижные стадии в циклах развития. Половой процесс у них – зигогамия. Мицелий, как правило, хорошо развит и в основном без перегородок. Нередко в отечественной и зарубежной учебной и научной литературе все, преимущественно водные, грибы (включая и "вышедших на сушу" зигомицетов) объединяют в один класс Phycomycetes (от греч. phycos – водоросль). Все водные грибы либо лишены мицелия, либо он в зачаточном или развитом состоянии, но не имеет перегородок (септ) или они редкие – такие грибы относят к низшим.

К высшим грибам относят аскомицеты, или сумчатые грибы; базидиомицеты, или базидиальные грибы, и дейтеромицеты, или несовершенные грибы (Fungi imperfecti).

Сумчатые грибы– наиболее обширный класс, включающий свыше 15 тыс. видов самого различного строения, формы и местообитания. Отличительным признаком их являются сумки, образующиеся на аскогенных гифах в результате полового процесса. В сумках формируются половые споры, с помощью которых они размножаются. Чаще образуется 8 спор, хотя нередки и исключения из этого правила. Мицелий у них септированный (от лат. septum –перегородка), в септах имеются центральные поры, обеспечивающие сообщение между клетками и обмен клеточным содержимым.

Сформировавшиеся сумки образуют плодовые тела, которые могут быть закрытыми и открытыми блюдцевидными или чашевидными апотециями. Для

сумчатых грибов характерно и бесполое размножение с помощью конидий, образующихся на гаплоидном мицелии. Следовательно, в цикле развития аскомицетов имеются половые и бесполое стадии.

Базидиальные грибы. Насчитывается свыше 30 тыс. видов базидиомицетов (от греч. basis – основание), различающихся большим разнообразием по строению, форме и размерам. Для базидиомицетов так же характерны половая и бесполое стадии развития. Первая завершается формированием базидии – репродуктивного органа, на котором образуются, как правило, по 4 споры, сидящие на стеригмах. Бесполое стадия кратковременна – она представлена прорастающими трубками спор и позже – дикариотическим мицелием. Из этого последнего возникает плодовое тело – базидиокарп, на котором затем образуются базидии. Для многих базидиомицетов характерны пряжки, образующиеся на мицелии и участвующие в синхронном процессе деления ядер, а в мицелиальных септах – долипоры.

Дейтеромицеты (от греч. deiteros – второй) – сборный класс грибов, поскольку в него включены все те представители микромицетов, у которых не обнаружен половой процесс развития. Если же половая стадия выявляется, то такой гриб сразу же переносят в соответствующий ему класс. Насчитывают многие тысячи видов несовершенных грибов. Им присущ хорошо развитый септированный мицелий и конидиальное (бесполое) спороношение.

Лишайники (от лат. Lichenes) – это естественные симбионты грибов (микобионтов) и водорослей (фикобионтов) или грибов и цианобактерий (бактериобионтов). Лишайники выделяют в самостоятельную группу организмов, изучаемую в специальной научной дисциплине – лихенология. В настоящее время известно около 30 тыс. видов лишайников. Микобионтами у них выступают преимущественно аскомицеты (исключительно редко – базидиомицеты), фикобионтами и бактериобионтами – зеленые и желто-зеленые водоросли, цианобактерии. Лишайники подразделяют по форме на листоватые (в том числе – кочующие), кустистые и корковые (накипные). Размножаются они бесполом (кусочками, конидиями) и половым путем за счет микобионта.

Из сказанного можно составить представление о том, что потенциальных биообъектов для использования в производстве самых различных веществ обильное множество. Как клетки животных, они способны синтезировать полисахариды – хитин и гликоген и нуждаются в некоторых витаминах. Особенно интересны для биотехнологии микроскопические грибы – *дрожжи*, плесневые и другие микроорганизмы, применяемые в хлебопекарной, пивоваренной и молочной промышленности, а также для получения органических кислот, спиртов, антибиотиков, кормового белка, различных биологически активных веществ.

Животные состоят из двух основных групп: простейших (одноклеточных) и высших (многоклеточных). Их клетки, как и клетки растений, являются

ядерными. Поскольку многие простейшие являются паразитами и возбудителями болезней высших животных и человека, культивирование их на искусственных средах затруднено. Они используются в основном в токсикологических исследованиях.

Простейшим способом получения биотехнологической продукции является использование животных и их органов и тканей. Ткани высших животных являются источниками белка, липидов, некоторых витаминов. Например, иммунные сывороточные препараты получают из крови иммунизированных животных (лошадей, кроликов); гормон инсулин – из поджелудочных желез крупного рогатого скота и свиней. Гормон роста получают из гипофиза умерших людей; для получения препаратов крови используют донорскую, плацентарную и абортную кровь.

Сырье животного происхождения является наиболее дорогим. В связи с этим в настоящее время все чаще используются культуры клеток животных или человека, выращиваемые на искусственных средах. Примером такой технологии является получение противовирусного препарата интерферона, применяющегося для профилактики и лечения гриппа и других вирусных инфекций. Наиболее перспективным способом производства биологически активных веществ является генная инженерия. В частности, так получают человеческий инсулин – гормон белковой природы.

Бактерии – существа клеточной организации, у которых ядерный материал не отделен от цитоплазмы элементарными мембранами и не связан с какими-либо основными белками. Цитоплазма в них с нерегулярно разбросанными рибосомами неподвижна, клетки не обладают способностями к эндо- и экзоцитозу. В большинстве своем бактерии одноклеточны. Все бактерии составляют единое царство *Bacteria*, хотя одни из них – археобактерии (*archaeobacteria*) заметно отличаются от других, названных эубактериями (*eubacteria*) (от греч. *eu* – хорошо). Очевидно, археобактерии являются более древними представителями прокариот, чем эубактерии. Они обитают в средах с экстремальными условиями (от лат. *extremus* – крайний) – высокие концентрации неорганических солей, повышенные температуры, оксид и диоксид углерода как единственные источники углерода. К археобактериям относятся галобактерии, термоацидофильные бактерии и метанобразующие, или метаногенные бактерии. Бактерии наиболее часто используются в биотехнологических процессах. Из биомассы бактерий получают различные органические вещества – аминокислоты, белки, в том числе ферменты. Бактерии являются удобным объектом для генетических исследований. Наиболее изученной и широко применяемой в генно-инженерных исследованиях является кишечная палочка *Escherichiacoli* (*E. coli*), обитающая в толстом кишечнике человека.

Классификация бактерий

Размеры большинства *бактерий* находятся в пределах 0,5–3 мкм. Клетки прокариот имеют различную форму: сферы (кокки), цилиндра (палочки) или спирали (спириллы или вибрионы), кольца, звезды; для некоторых видов характерно ветвление. Многоклеточные прокариоты представляют собой скопления различной конфигурации, чаще всего – нити.

Бактерии чрезвычайно разнообразны по условиям обитания, приспособляемости, типам питания и основному источнику углерода, биоэнергообразованию, физиологическим особенностям, по отношению к макроорганизмам – животным и растениям.

1. По условиям обитания различают:

– наиболее древние формы бактерий – *архебактерии*, способные жить в экстремальных условиях (высокие температуры и давления, концентрированные растворы солей, кислые растворы);

– *зубактерии* (типичные прокариоты, или *бактерии*) более чувствительны к условиям окружающей среды.

2. В зависимости от типа потребляемого источника углерода все микроорганизмы разделяются:

– на *автотрофные*, способные усваивать в качестве единственного источника углерода углекислый газ;

– *гетеротрофные*, получающие углерод в виде готовых органических соединений. Продуценты белков, аминокислот и липидов относятся преимущественно к гетеротрофам, исключением являются сине-зеленые водоросли, которые относятся к автотрофам и используются в промышленности для получения кормового белка.

3. По типу питания бактерии делятся на следующие группы:

– *фототрофы*, использующие энергию солнечного света (например, сине-зеленые водоросли). Фотосинтезирующие организмы, используя солнечную энергию, отщепляют от молекулы воды водород и выделяют кислород. В процессе фотосинтеза из диоксида углерода и воды с использованием солнечной энергии образуются органические вещества, в первую очередь, глюкоза;

– *хемотрофы* используют энергию, выделяемую в результате окислительно-восстановительных реакций;

– *хемоавтотрофы*, использующие энергию окисления неорганических веществ (соединений серы, метана, аммиака, нитритов, соединений двухвалентного железа и др.). Эти микроорганизмы способны синтезировать органические соединения из CO_2 без помощи хлорофилла и без прямого использования солнечной энергии. К таким хемосинтезирующим микроорганизмам относятся нитрифицирующие бактерии, которые, окисляя аммиак до азотистой кислоты, высвобождают необходимую для синтеза энергию. К хемосинтетикам относятся также водородные бактерии,

получающие энергию в процессе окисления молекулярного водорода. Водородные бактерии, культивируемые в питательной среде, которая содержит минеральные вещества и смесь газов H_2 , O_2 и CO_2 , дают богатую белками микробную массу. Так как H_2 и O_2 можно получить электролизом воды, то пригодную для целей питания и животноводства органическую массу можно добывать из минеральных веществ, воды, воздуха и электроэнергии;

– *хемоорганотрофы* (гетеротрофы), получающие энергию при разложении органических веществ до минеральных веществ (*органические вещества служат донорами электронов в ходе окислительно-восстановительных реакций*); При этом гетеротрофные организмы выделяют углекислый газ и воду, которые вновь используются автотрофными организмами для процесса фотосинтеза. Эти бактерии – основные участники круговорота углерода, к этой же группе относятся бактерии, использующие энергию брожения.

Кроме того, хемотробы подразделяются на аэробы, которые используют в качестве конечного акцептора электронов молекулярный кислород, и анаэробы, которые переносят электроны на другие соединения, кроме молекулярного кислорода.

Подавляющее большинство используемых в биотехнологии микроорганизмов относятся к аэробным гетеротрофам.

4. По воздействию на макроорганизмы (человека и животных) различают:

– *бактерии-паразиты*, вызывающие болезни человека, животных и растений. Болезнетворные микроорганизмы называются *патогенными*;

– *неболезнетворные бактерии*, способные обитать на слизистых оболочках и кожных покровах, но не питающиеся “живым белком”, называются *сапрофитами*.

Контрольные вопросы

1. Дайте определение вирусам. Что они собой представляют в структурном отношении? В чем их принципиальное отличие от бактерий?
2. Охарактеризуйте царство грибов. В чем заключается их сходство с растениями и животными?
3. Дайте определение бактериям. Приведите классификацию.
4. Какую организацию имеют бактерии?
5. Какие микроорганизмы среди растений и животных Вы знаете?
6. Какие микробы характерно не обладают собственным обменом веществ, но способны к репликации в клетках организма-хозяина?
7. Что собой представляют нуклеиновые кислоты? Какие типы нуклеиновых кислот вы знаете?
8. Что служит источником получения агар-агара, альгината, полисахаридов, используемых в пищевой промышленности, а также для изготовления микробиологических сред?

9. Что представляет собой каллус и для чего его можно использовать?
10. Для каких организмов характерен гетеротрофный тип питания, потребность в витаминах, наличие хитина или хитозана, синтез гликогена?

3. ПОСТУПЛЕНИЕ ВЕЩЕСТВ В КЛЕТКУ И ИХ МЕТАБОЛИЗМ

3.1. Превращение органических веществ в клетке

В растительных клетках органические вещества (углеводы, жиры, белки, витамины и др.) образуются из углекислого газа, воды и минеральных солей.

Животные получают органические вещества в готовом виде, употребляя растительную пищу. Вместе с ними переходит и энергия, запасенная в этих веществах. В клетках гетеротрофных организмов энергия органических соединений при их окислении превращается в энергию АТФ.

Аденозинфосфорные кислоты. Особо важную роль в биоэнергетике клетки играет адениловый нуклеотид, к которому присоединены два остатка фосфорной кислоты. Такое вещество называют *аденозинтрифосфорной кислотой (АТФ)*. Молекула АТФ представлена на рис. 5. В химических связях между остатками фосфорной кислоты молекулы АТФ запасена энергия, которая освобождается при отщеплении органического фосфата: АТФ – универсальный биологический аккумулятор энергии.

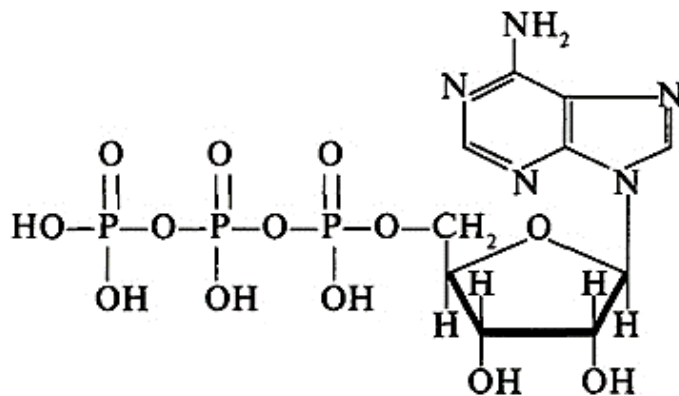


Рис. 5. Молекула АТФ

Световая энергия Солнца и энергия, заключенная в потребляемой пище, запасается в молекулах АТФ, которая освобождается при отщеплении органического фосфата:



где Ф – органический фосфат,

Е – освобождающаяся энергия,

АДФ – аденозиндифосфорная кислота (остаток молекулы АТФ).

Энергия, запасенная в АТФ, затрачивается на поддержание всех процессов жизнедеятельности: биосинтеза белков и других органических соединений, движения, роста и деления клеток, производства тепла, нервных импульсов, свечений (например, у люминесцентных бактерий).

Преобразование энергии в клетке. Процессы биологического окисления. Для всех клеток живых организмов характерна способность к преобразованию одного вида энергии в другой.

Электроны в составе молекул органических соединений обладают большим запасом энергии. Энергия высвобождается, когда электроны перемещаются с высокого энергетического уровня на более низкий. Таким акцептором электронов служит кислород.

Кислород, необходимый для процессов окисления, поступает в организм во время дыхания. Поэтому процесс дыхания непосредственно связан с биологическим окислением. Процессы биологического окисления органических веществ осуществляются в митохондриях.

Биологическое окисление органических веществ, как и горение, сопровождается образованием углекислого газа и воды. Но биологическое окисление в корне отличается от горения. Процессы биологического окисления протекают ступенчато, при участии ряда ферментов. При сгорании органических веществ почти вся энергия выделяется в виде теплоты. При биологическом окислении около 50 % энергии органических веществ превращается в энергию АТФ, а также иных молекул-носителей энергии.

Остальные 50 % энергии окисления превращаются в теплоту. Поскольку ферментативные процессы окисления идут ступенчато, тепловая энергия выделяется постепенно и успевает рассеиваться во внешней среде, не повреждая чувствительных к нагреванию белков и других веществ клетки.

Метаболизм. Жизненные циклы микроорганизмов во многом зависят не только от специфики их организации, но и от того, в какую внешнюю среду они попадают. В зависимости от среды обитания ослабляются или усиливаются те или другие ферментные системы организма, меняется ход и направленность сложнейших биохимических превращений в клетке.

Преобразование различных соединений среды обитания в вещества «тела» микроорганизма осуществляется в результате огромного количества реакций, протекающих со строго запрограммированной последовательностью при участии всех органоидов и структур микробной клетки, а также мультиэнзимных систем, которые являются движущей силой всех процессов, имеющих место в живой клетке, т. е. в результате ее метаболизма.

Метаболизм, или обмен веществ, называется вся сумма целенаправленных реакций, протекающих под действием ферментных систем клетки, которые регулируются различными внешними и внутренними факторами, и обеспечивающих обмен веществом и энергией между средой обитания и самой клеткой.

Результат жизнедеятельности микроорганизмов проявляется в увеличении размеров клетки, ее делении или почковании, что приводит к

увеличению количества особей и возрастанию массы микроорганизмов в питательной среде.

Несмотря на огромные физиологические и морфологические различия между отдельными классами, родами и видами микроорганизмов, обмен веществ в клетке идет тремя основными (центральными) метаболическими путями:

1) из внешней среды в клетку поступает энергия либо в виде химической энергии органических веществ, либо в виде энергии солнечного света;

2) из веществ среды, перенесенных в клетку, собираются «строительные блоки», из которых должны формироваться биополимеры клетки и синтезироваться макромолекулы белков, нуклеиновых кислот, углеводов, жиров и других клеточных компонентов;

3) в клетке происходят постоянный синтез и разрушение биомолекул, выполняющих различные специфические функции.

Принципиальные основы центральных метаболических путей проследить и понять сравнительно легко, хотя каждый из этих путей представляет собой множество различных простых и сложных реакций, часть из которых пока еще до конца не расшифрована.

Сверхсинтез, т. е. способность микроорганизма синтезировать определенный продукт в количествах, превосходящих физиологические потребности, довольно часто встречается в природе. Нередко тот или иной продукт обмена веществ (органические кислоты, спирты, антибактериальные вещества), выделяемый микроорганизмом в окружающую среду, является токсичным для других видов и служит продуценту как средство защиты обитаемого пространства или как резерв питательного вещества.

Обмен веществ у микроорганизмов можно рассматривать как сумму двух явлений: катаболизма, представляющего собой ферментное расщепление крупных органических молекул с выделением свободной энергии, которая запасается в виде энергии *макроэргических связей* АТФ, и анаболизма, связанного с построением новых биополимеров клетки из простых соединений и протекающего с поглощением энергии *макроэргических связей* АТФ. Оба процесса представлены на рис. 6, 7.

В результате этих двух параллельно текущих процессов строится «тело» клетки, накапливаются необходимые клеткам запасные вещества, а также промежуточные продукты обмена веществ, которые частично остаются в клетке, а частично удаляются из нее как неиспользуемый отход метаболизма.

Таким образом, обмен веществ складывается, с одной стороны, из реакций, которые дают клетке «строительные блоки», образуют предшественники целевого продукта и сам продукт, с другой стороны – из энергетических изменений, которые обеспечивают все превращения в клетке, т.е. в клетке протекают конструктивный и энергетический обмены.

Катаболизм и анаболизм – это два самостоятельных пути в обмене веществ, хотя отдельные их участки могут быть общими. Такие общие участки, свойственные катаболизму и анаболизму, называют амфиболическими.

В катаболических и анаболических превращениях одна реакция следует за другой в строгой последовательности, так как продукты реакции предыдущей стадии процесса, как правило, являются субстратом для последующей. Такая четкая преемственность возможна благодаря высокой специфичности ферментов, участвующих в обмене веществ.

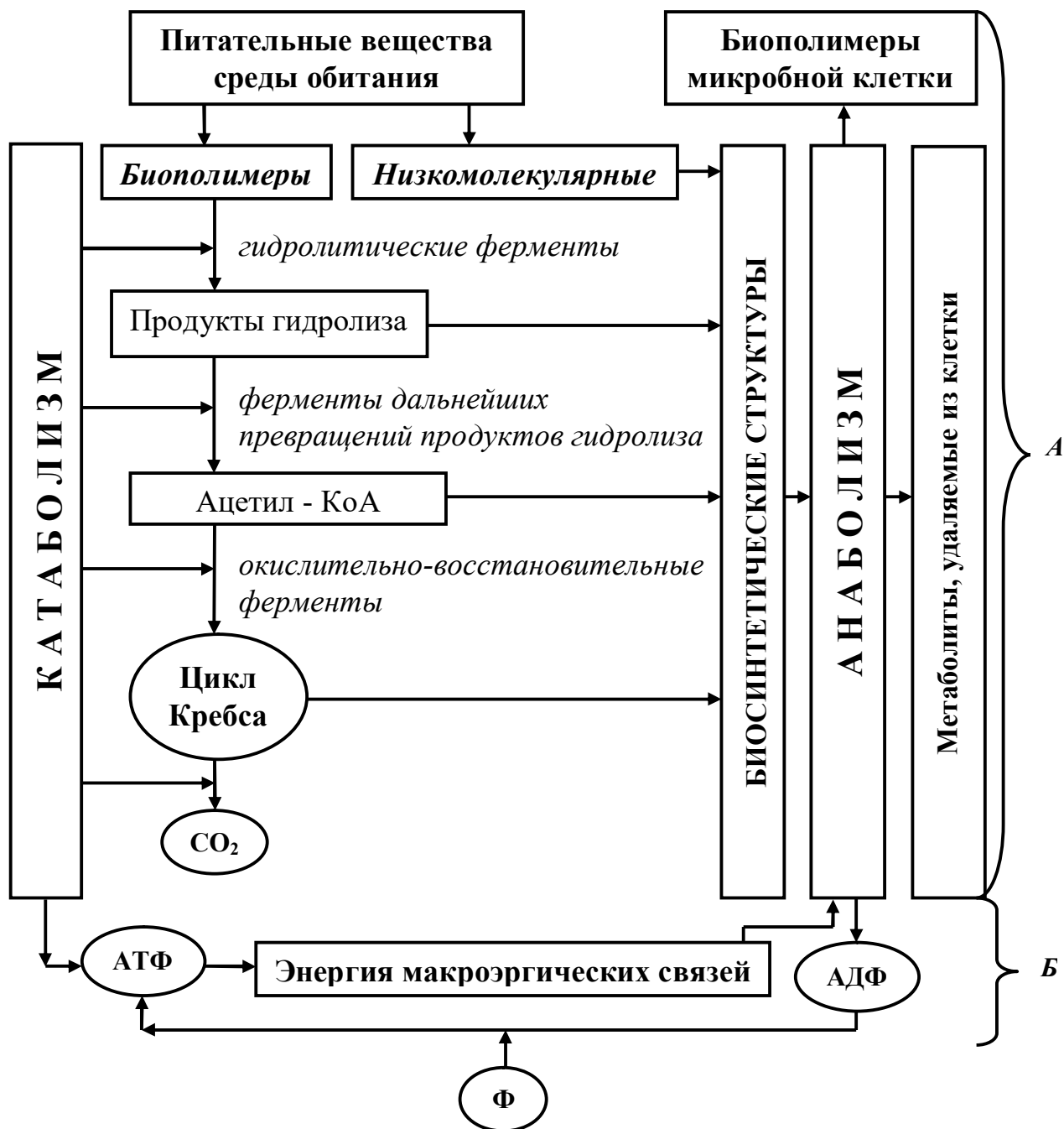


Рис.6. Схема катаболизма и анаболизма микробной клетки

Ферменты обычно локализуются на определенных органоидах клетки и в растворимой фракции цитоплазмы. Комплекс ферментов, осуществляющий

определенный цикл последовательно текущих реакций, локализуется в структуре органоида таким образом и на таком расстоянии, чтобы обеспечить этот процесс с минимальными затратами энергии на перемещение промежуточных продуктов от фермента к ферменту. Поэтому реакция строго координируется в клетке по времени и в пространстве. Прекрасный пример тому – биосинтез белка на рибосомах.

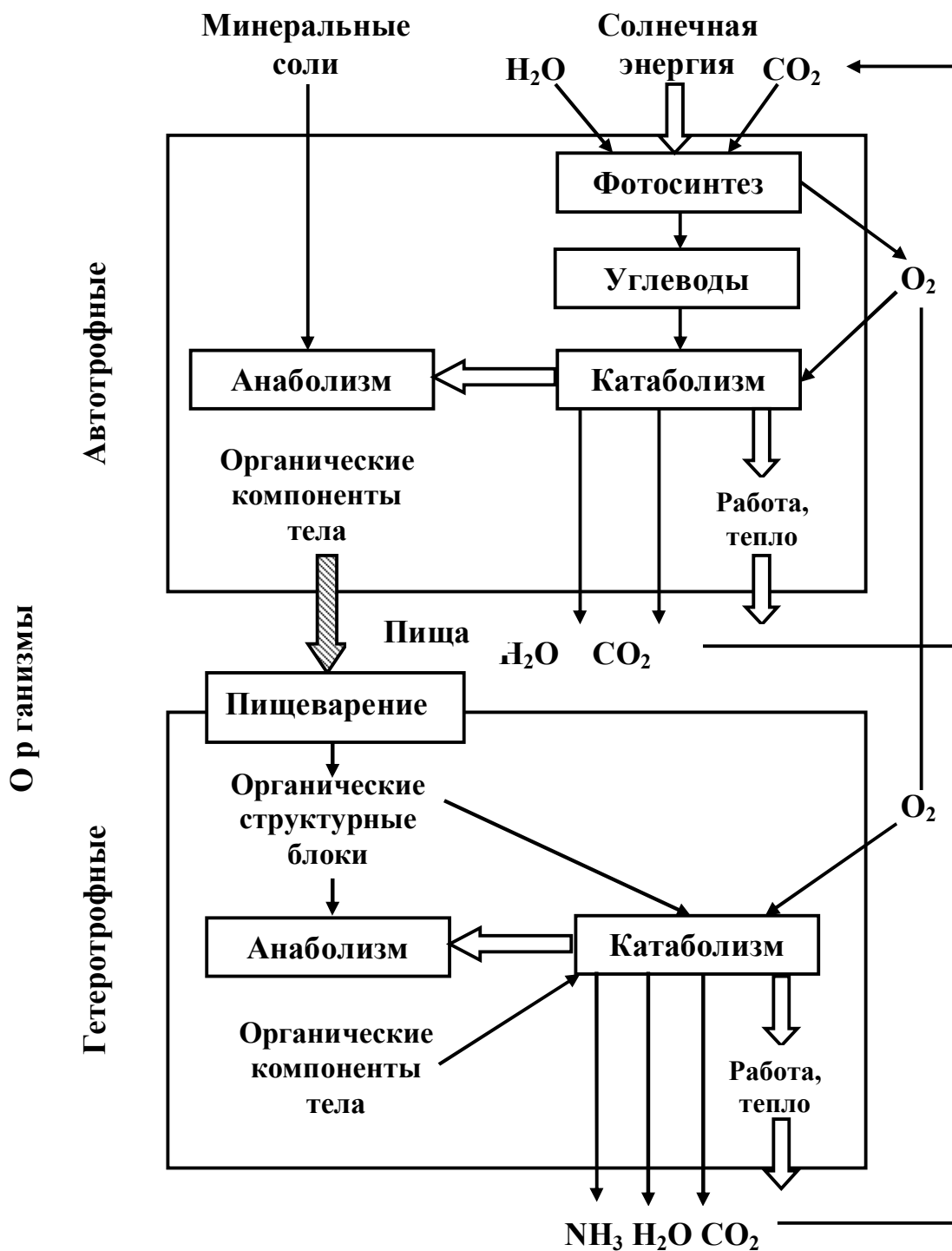


Рис. 7. Взаимоотношения между анаболизмом и катаболизмом у автотрофных и гетеротрофных организмов

В осуществлении ферментативных превращений большая роль принадлежит рибосомам, митохондриальным мембранам, цитоплазме и другим структурам клетки.

Скорость течения реакций и в целом обмен веществ клетки зависят от состава питательной среды, условий культивирования микроорганизмов и, главное, от потребности клетки в каждый данный момент в энергии (АТФ) и «строительных блоках». Клетка очень экономно высвобождает энергию и нарабатывает «строительных блоков» ровно столько, сколько необходимо ей в настоящий момент. Этот принцип лежит в основе регуляции и контроля всех стадий метаболических путей в клетке.

Регуляция метаболизма в микробной клетке имеет сложную взаимозависимую систему, которая «включает» и «выключает» определенные ферменты с помощью самых различных факторов: рН реакционной среды, концентрации субстратов, некоторых промежуточных и конечных метаболитов, кофермента, металлов и т. д. Изучение путей регуляции определенных продуктов обмена веществ в клетке необходимо для определения оптимальных условий биосинтеза микроорганизмом целевого соединения в условиях промышленного производства.

Интенсивный обмен веществ между клеткой и средой обеспечивается большой поверхностью «тела» микроорганизма, через которую происходит поступление питательных веществ и выделение в окружающую среду продуктов жизнедеятельности клетки. В процессе роста и развития микроорганизмов заметно изменяется состав среды обитания, часть соединений непосредственно или после предварительного гидролиза ферментами клетки транспортируется внутрь микроорганизма, претерпевая сложные биохимические превращения в клеточное вещество микроба, а частично вновь поступает в среду в виде нереализуемых клеткой продуктов обмена.

Контрольные вопросы

1. В каких соединениях в клетках гетеротрофных организмов запасается энергия органических соединений при их окислении?
2. Какую роль в клетках живых организмах играют аденозинфосфорные кислоты?
3. Как происходит преобразование энергии в клетке?
4. Охарактеризуйте процессы биологического окисления в клетках живых организмов.
5. Дайте определение понятия «метаболизм».
6. Перечислите и охарактеризуйте основные (центральные) метаболические пути обмена веществ в клетке.
7. Что такое «сверхсинтез»?
8. Раскройте роль катаболизма в процессе обмена веществ.
9. Раскройте роль анаболизма в процессе обмена веществ.

10. Охарактеризуйте взаимоотношения между анаболизмом и катаболизмом у автотрофных и гетеротрофных организмов.

3.2. Основные биомолекулы клетки

Полимеры – это высокомолекулярные соединения, которые образованы из больших и гибких молекул, состоящих из отдельных звеньев, последовательно соединенных друг с другом.

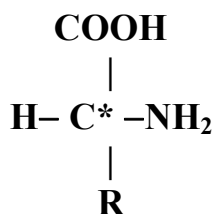
В живой клетке это, прежде всего, белки, нуклеиновые кислоты, углеводы и жиры.

Фундаментальную роль в структуре и жизнедеятельности организмов играют белки (протеины). Белки – основная и необходимая составная часть всех организмов. Большинство биологических функций выполняется белками или при их непосредственном участии. В природе существует примерно $10^{10} \dots 10^{12}$ различных белков, обеспечивающих жизнь более 2 млн видов организмов всех степеней сложности – от вирусов до человека.

Белки – это линейные полимеры (точнее, сополимеры), состоящие из α -аминокислот, соединенных пептидной связью.

Молекулярная масса белков находится в пределах от нескольких десятков до сотен тысяч. Несмотря на различие в строении и функциях, элементный состав белковых веществ колеблется незначительно. Белки содержат (% на массу сухого вещества): 50...55 % углерода, 21...23 % кислорода, 15...17 % азота, 6...7 % водорода, 0,3...2,5 % серы. В составе отдельных белков обнаружены также фосфор, йод, железо, медь, селен и некоторые другие макро- и микроэлементы в различных, часто очень малых количествах.

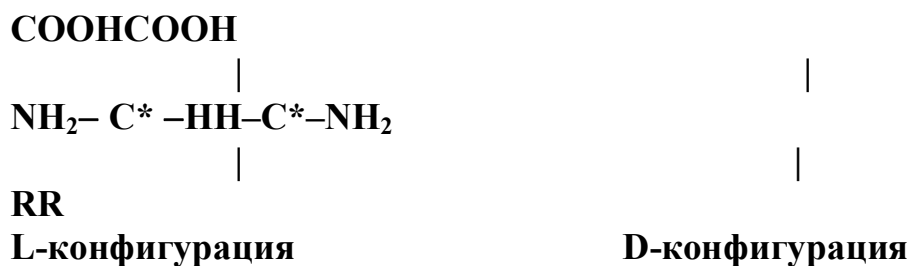
Структурными единицами белков являются аминокислоты. *Аминокислоты* – это органические (карбоновые) кислоты, содержащие несколько функциональных групп: одну или две аминогруппы $-\text{NH}_2$, карбоксильную группу $-\text{COOH}$ и радикалы $-\text{R}$, имеющие различное строение:



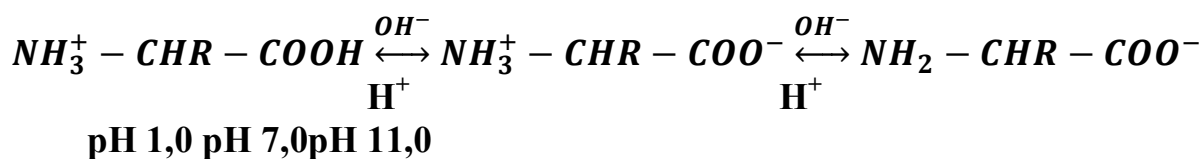
Природа радикалов разнообразна: от атома водорода до циклических соединений. Именно радикалы определяют структурные и функциональные особенности аминокислот.

Аминокислоты, за исключением глицина (R=H), содержат асимметрический атом углерода (*), связанный с четырьмя различными заместителями могут существовать в виде двух оптических изомеров: L- и D-. Расположение аминогруппы -NH₂ в проекционной формуле аминокислоты слева соответствует L-конфигурации, справа – D-конфигурации.

В состав всех изученных в настоящее время белков входят только аминокислоты L-ряда.



Аминокислоты – амфотерные соединения и в водном растворе в зависимости от pH среды могут существовать в виде анионов, катионов или электронейтральных биполярных ионов (цвиттер-ионов) NH₃⁺CHR[–]COO[–].



В клетках встречается 170 аминокислот, но лишь 20 из них – протеиногенные, которые входят в состав белков. У протеиногенных аминокислот амино- и карбоксильная группы присоединены к одному и тому же атому углерода. Такие соединения называются α-аминокислотами.

Растения синтезируют все необходимые им аминокислоты. Животные и человек не способны синтезировать 8 аминокислот, называемых незаменимыми. Это *валин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, треонин, триптофан, фенилаланин*.

Если количество этих аминокислот в пище будет недостаточным, нормальное развитие и функционирование организма человека нарушается.

Простые белки (протеины) состоят только из остатков белков; сложные белки (протеиды) включают белковую (апобелок) и небелковую (простетическая группа) части.

Каждый белок обладает своей, присущей ему последовательностью расположения аминокислотных остатков. Остатки аминокислот соединены *пептидной*, или амидной, (-CO-NH-) связью между α-амино- и α-карбоксильными группами. По числу α-аминокислотных остатков, участвующих в построении пептида, различают *олигопептиды* (ди-, три-, ..., до декапептида) и *полипептиды*. Названия пептидов образуют из названий,

соответствующих α -аминокислот, причем аминокислоты, принимающие участие в образовании пептидной связи за счет карбоксильной группы, получают суффикс *-ил*. При этом конец со свободной аминогруппой обозначают символом водорода H, а конец со свободной карбоксильной группой – символом OH, например, H-Val-Ser-OH – валилсерин.

Белок как биологически значимая структура может представлять собой как один полипептид, так и несколько полипептидов, составляющих в результате нековалентных взаимодействий единый комплекс.

Исключительное свойство белка – *самоорганизация структуры*, т.е. способность самопроизвольно создавать определенную, свойственную только данному белку пространственную структуру. Установлено, что все белки построены по единому принципу и имеют четыре уровня организации: первичную, вторичную, третичную, а отдельные из них – и четвертичную структуры.

Пространственная структура белков формируется посредством разнообразных форм связи: прочных *ковалентных* (пептидных и дисульфидных) и относительно слабых *нековалентных* связей (гидрофобные взаимодействия, электростатические, ионные, а также водородные связи), что обеспечивает белковой молекуле определенную прочность и динамичность в процессе функционирования.

Ковалентные (химические) связи в молекуле белка могут быть двух типов – пептидные и дисульфидные. Пептидная, или амидная (-CO-NH-), связь является типично ковалентной связью, с ее помощью аминокислотные остатки соединяются друг с другом, образуя остов белковой молекулы. Пептидная связь возникает при взаимодействии карбоксильной группы одной аминокислоты и α -аминогруппы другой:

Важную роль в стабилизации пространственной структуры белковой молекулы играют ковалентные дисульфидные связи (-S=S-), которые образуются в результате окисления сульфгидрильных (HS-) групп аминокислоты цистеина.

В стабилизации конформации белковой молекулы существенное значение имеют нековалентные связи и взаимодействия. К ним относятся гидрофобные взаимодействия, электростатические, ионные, а также водородные связи. Гидрофобное взаимодействие возникает при сближении гидрофобных углеводородных и ароматических радикалов некоторых аминокислот (аланина, валина, лейцина, изолейцина, фенилаланина, триптофана).

Водородные связи образуются между атомом, который содержит неподеленную электронную пару, и другим электроотрицательным атомом. В биологических структурах водородная связь чаще всего образуется за счет атома водорода, связанного с атомом кислорода или азота.

Ионные (солевые) связи предположительно образуются между диссоциированными свободными карбоксильными группами (COO⁻) моноаминодикарбоновых аминокислот (глутаминовой и аспарагиновой) и

протонированными свободными аминогруппами (NH_3^+) диаминомонокарбоновых кислот (лизин, аргинин).

Под *первичной структурой* белков, представленной на рис.8, понимают качественный и количественный состав аминокислот, а также их последовательность расположения в полипептидных цепях белковой молекулы.

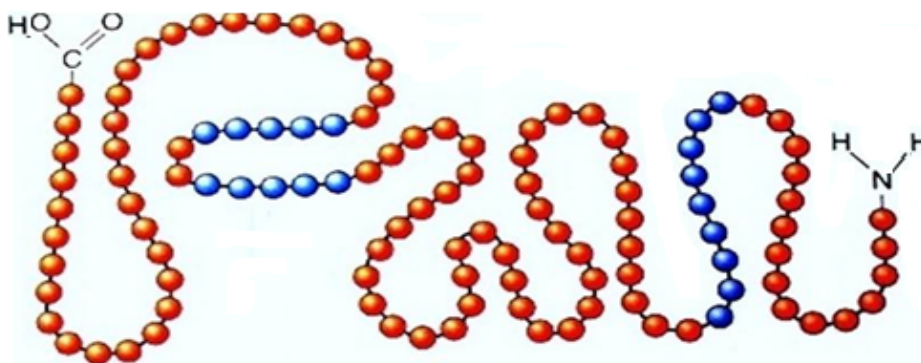


Рис. 8. Первичная структура белка

Она представляет собой линейную цепь аминокислот (полипептид) с четким генетически обусловленным порядком чередования, соединенных между собой *пептидными* ($-\text{CO}-\text{NH}-$) связями, образование которых изображено на рис. 9.

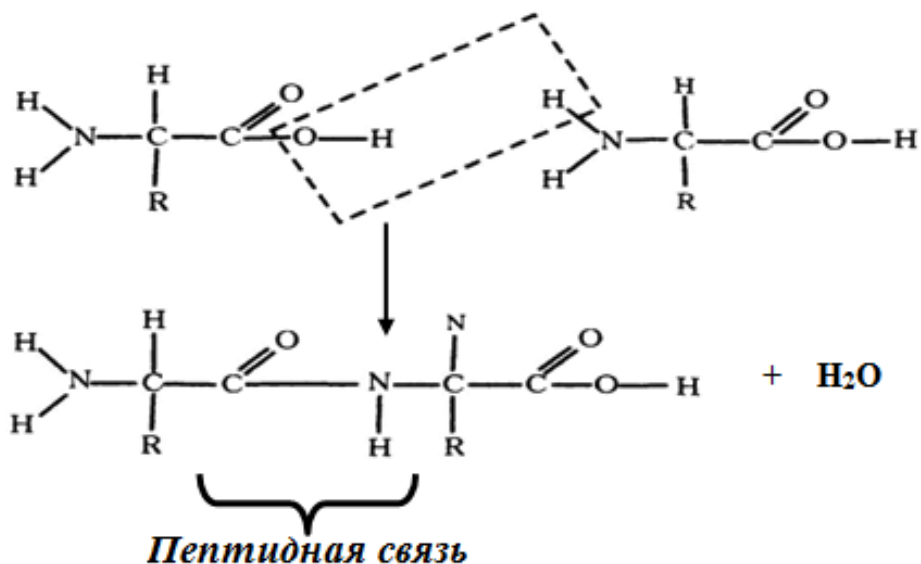


Рис. 9. Образование пептидной связи

К настоящему времени установлены последовательности аминокислот для нескольких тысяч различных белков. Запись структуры белков в виде развернутых структурных формул громоздка и ненаглядна. Поэтому используется сокращенная форма записи – трехбуквенная или однобуквенная.

При записи аминокислотной последовательности в полипептидных или олигопептидных цепях с помощью сокращенной символики предполагается, если это особо не оговорено, что α -аминогруппа находится слева, а α -карбоксильная группа – справа.

Вторичной структурой называют конформацию, которую образует полипептидная цепь. Вторичной структурой обладает большая часть белков, правда, не всегда на всем протяжении полипептидной цепи. За счет водородных связей между пептидными группами – (аминокислотных остатков) полипептидные цепи приобретают спиралевидную форму – α -структура.

Водородные связи могут обеспечить соединение соседних (вытянутых) полипептидных цепочек с образованием вторичной структуры другого типа – β -структуры (структуры складчатого листа, складчатого слоя), представленной на рис. 10.

Полипептидные цепочки с определенной вторичной структурой могут быть по-разному расположены в пространстве.

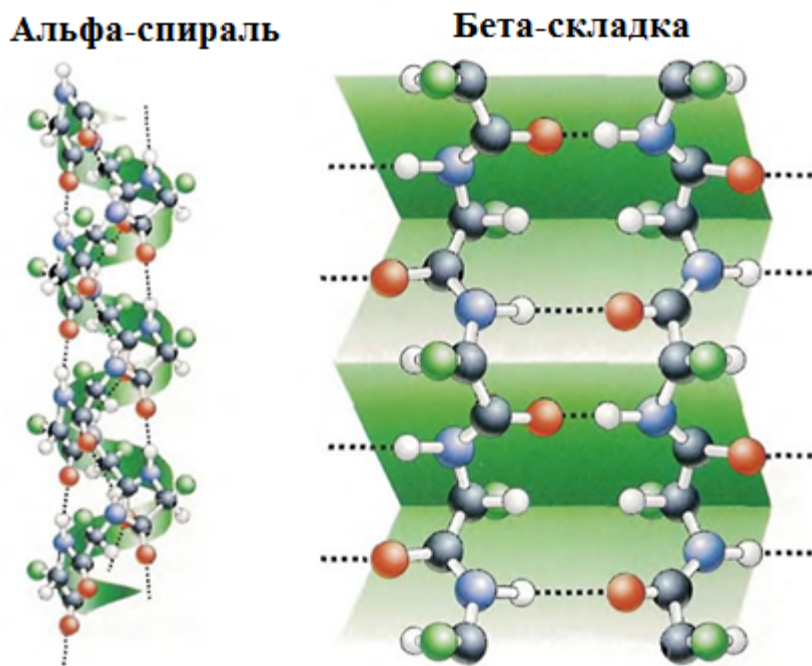


Рис.10. Вторичная структура белка в виде α -спирали и β -складчатой структуры

Третичная структура подразумевает общее расположение в пространстве одной или нескольких полипептидных цепей, соединенных нековалентными связями.

Третичная структура имеет компактную пространственную структуру, которая определяется размером, формой и полярностью аминокислотных радикалов, а также последовательностью аминокислот. Превращение развернутой полипептидной цепи в компактную молекулу связано с гидрофобными и ионными взаимодействиями, водородными связями и др.

Под действием этих сил достигается термодинамическая целесообразность конформации белковой молекулы и ее стабилизация.

Свойства большинства белков в нативном состоянии определяются их третичной структурой. Третичной структурой объясняется специфичность белковой молекулы, ее биологическая активность.

Среди связей, удерживающих третичную структуру, на рис. 11 следует отметить:

1 –ионная связь возникает между положительно и отрицательно заряженными функциональными группами;

2 –водородная связь возникает между гидрофильной незаряженной и любой другой гидрофильной группой;

3 –гидрофобные взаимодействия возникают между гидрофобными радикалами;

4 –дисульфидная связь формируется за счет окисления SH-групп остатков цистеина и их взаимодействия друг с другом.

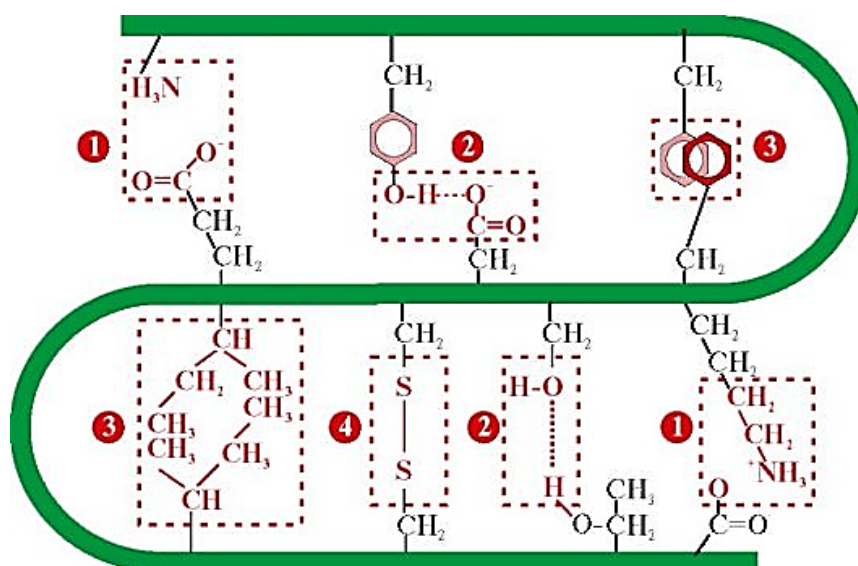


Рис. 11. Типы связей, возникающих между радикалами аминокислот при формировании третичной структуры белка

У большинства белков пространственная организация заканчивается третичной структурой, но для некоторых белков с молекулярной массой больше 50...100 тысяч, построенных из нескольких полипептидных цепей, характерна *четвертичная структура*, представленная на рис. 12.



Рис. 12. Четвертичная структура белка

Сущность такой структуры заключается в объединении нескольких полипептидных цепей со своей первичной, вторичной и третичной структурой под воздействием водородных связей, электростатических, Ван-дер-Ваальсовых и гидрофобных взаимодействий с образованием комплекса, составляющего одну функционально индивидуальную молекулу белка.

Классификация белков

Существует несколько классификаций белков.

1. По *форме белковой молекулы* (сложившейся на третьем уровне пространственной ее организации) различают:

- *глобулярные белки* – растворимые вещества, как правило, с α -спиральной структурой и с компактной третичной структурой. По форме они приближаются к шару или эллипсоиду. Большинство белков животных, растений и микроорганизмов относятся к глобулярным белкам (например, белки молока).

- *фибрилярные белки* имеют нитевидную форму. Они обычно нерастворимы (белки волос и ногтей – кератин и мышц – миозин).

2. По *степени сложности*:

- *протеины* (простые белки) состоят только из остатков белков. Это запасные, скелетные, отдельные ферментные белки;

- *протеиды* (сложные белки) включают белковую (апобелок) и небелковую (простетическая группа) части. Это нуклеопротеиды: кроме белка включают нуклеиновые кислоты; липопротеиды: кроме белка присутствуют липиды (содержатся в протоплазме и мембранах); фосфопротеиды: кроме белка содержат фосфорную кислоту (казеин молока).

3. По *растворимости* в отдельных растворителях:

- *альбумины* – белки с относительно небольшой молекулярной массой, хорошо растворимые в воде и в слабых солевых растворах; типичный представитель альбуминов – белок яйца альбумин;

- *глобулины*– растворяются в водных растворах солей. Это очень распространенные белки, входят в состав мышечных волокон, крови, молока, они составляют большую часть семян бобовых и масличных культур. Представителем глобулинов животного происхождения является лактоглобулин молока;

- *проламины*– растворяются в 60–80 % растворе этилового спирта. Это характерные белки семян злаковых культур *например глиадин – пшеницы и ржи, зеин – кукурузы, авенин – овса, гордеин – ячменя;*

- *глутелины*– растворяются только в растворах щелочей. *Из них следует выделить оризенин из семян риса и глютенин клейковинных белков пшеницы.*

Свойства белков

Белки характеризуются следующими признаками и свойствами: форма молекул, конформация, нативность, молекулярная масса, амфотерность, растворимость и набухаемость, денатурация и др.

1. Под *конформацией* понимают геометрические формы, принимаемые молекулами органических веществ при свободном вращении отдельных фрагментов вокруг простых углерод-углеродных связей.

2. *Нативный*– это естественный, натуральный, не поврежденный при исследовании. Нативные белки – это белки, сохранившие структуру, присущую им в живой клетке, и не подвергшиеся денатурации.

3. *Молекулярная масса* белков находится в пределах от нескольких тысяч до миллионов.

4. Важнейшим свойством белков является их способность выступать в роли *амфотерных электролитов* (проявлять как кислые, так и основные свойства). При взаимодействии с кислотами или основаниями они образуют солеподобные соединения. Свойство амфотерности лежит в основе буферных свойств белков и их участия в регуляции рН крови. Величина рН крови человека отличается постоянством и находится в пределах 7,36–7,4, несмотря на различные вещества кислого или основного характера, поступающие с пищей или образующиеся в обменных процессах, *следовательно, существуют специальные механизмы регуляции кислотно-щелочного равновесия внутренней среды организма.*

Для белков, пептидов и аминокислот характерно так называемое *изоэлектрическое состояние*, когда их положительные и отрицательные заряды уравниваются, т. е. суммарный заряд равен нулю. Концентрация водородных ионов, при которой белок находится в изоэлектрическом состоянии, называется *изоэлектрической точкой.*

5. Белки обладают *гидрофильными свойствами*, т. е. способностью связывать воду. При этом они набухают, увеличивается их масса и объем. При набухании они образуют студни или гели. Гидрофильность белков зависит от гидрофильных групп, расположенных на поверхности белковой глобулы и притягивающих к себе дипольные молекулы воды. К ним относятся пептидная связь -CO-NH-, аминная группа -NH₂, карбоксильная группа -COOH и т. д. Свойство белков набухать,

образовывать студни, стабилизировать суспензии, эмульсии и пены имеет большое значение в биологии и пищевой промышленности. Очень подвижным студнем, построенным в основном из молекул белка, является цитоплазма – полужидкое содержимое клетки.

Сильногидратированный гель – пшеничная клейковина - содержит около 65 % воды.

В воде белки образуют *коллоидные растворы*. Эти растворы характеризуются высокой вязкостью, способностью рассеивать лучи видимого света. Коллоидные частицы не проходят через полупроницаемые мембраны (целлофан, коллоидную пленку), так как их поры меньше коллоидных частиц. Непроницаемыми для белка являются все биологические мембраны. Это свойство белковых растворов широко используется в медицине и химии для очистки белковых препаратов от посторонних примесей. Такой процесс разделения называется диализом.

6. Разрушение связей, стабилизирующих четвертичную, третичную и вторичную структуры, приводящее к дезориентации конфигурации белковой молекулы, агрегированию, изменению физических свойств (растворимости, вязкости), химической активности, снижению или полной потере биологической функции, называется *денатурацией* белка. Первичная структура, а следовательно, и химический состав белка при этом не меняются.

Различают физические (температура, давление, механическое воздействие, ультразвуковое и ионизирующее излучения) и химические (тяжелые металлы, кислоты, щелочи, органические растворители, алкалоиды) факторы, вызывающие денатурацию. Все эти приемы широко используют в пищевой технологии и биотехнологии. Обратным процессом является *ренатурация*, то есть восстановление физико-химических и биологических свойств белка. Иногда для этого достаточно удалить денатурирующий объект. Ренатурация невозможна, если затронута первичная структура.

7. Под действием протеолитических ферментов белки подвергаются *гидролизусу* образованием поли- и дипептидов, а также аминокислот. Свободные –SH-группы повышают активность протеолитических ферментов.

8. Функциональная способность белков образовывать высококонцентрированные системы жидкость – газ относится к *пенообразованию*. Характеристики получаемой пены зависят от природы белка, его концентрации и условий протекания процесса. Структуру пены имеет мякиш готового хлеба.

Функции белков

Функции белков чрезвычайно многообразны. Каждый данный белок как вещество с определенным химическим строением выполняет одну узкоспециализированную функцию и лишь в нескольких отдельных случаях – несколько взаимосвязанных. Например, гормон мозгового слоя надпочечников – адреналин, поступая в кровь, повышает потребление кислорода и артериальное давление, содержание сахара в крови, стимулирует обмен веществ, а также

является медиатором нервной системы у холоднокровных животных. Основные виды белков и их функции представлены в табл. 4.

Таблица 4. Основные виды белков и их функции

Класс белков	Примеры	Локализация / Функции
Структурные белки	Коллаген	Компонент соединительной ткани, костей, сухожилий, хряща
	Кератин	Кожа, перья, волосы, ногти, рога
Ферменты	Трипсин	Катализирует гидролиз белков
Гормоны	Инсулин	Регулирует обмен глюкозы
Транспортные белки	Гемоглобин	Переносит O ₂ в крови
	Миоглобин	Переносит O ₂ в мышцах

Окончание табл. 4

Защитные белки	Антитела	Образуют комплексы с инородными белками
Сократительные белки	Миозин	Сокращение мышц
	Актин	
Запасные белки	Овальбумин	Белок куриного яйца
Токсины	Змеиный яд	Фермент

В этих условиях скорости протекания большинства реакций ничтожно малы, поэтому для их приемлемого осуществления необходимы специальные биологические катализаторы – ферменты (*fermentum* – закваска) или энзимы (*enzyme* – в дрожжах). Как правило, ферменты – это либо белки, либо комплексы белков с каким-либо кофактором – ионом металла или органической молекулой. Ферменты обладают высокой специфичностью по отношению к субстрату, т.е. тому соединению, превращение которого они ускоряют. Эффективность действия ферментов особенно сильно зависит от ряда факторов: температуры (оптимальная температура 30–50 °С), наличия активаторов или ингибиторов, pH среды. Контакт фермента с субстратом происходит с помощью активного центра. Обычно это небольшая часть молекулы фермента, в которой выделяют две зоны: связывающую и каталитическую. В состав активного центра входят отдельные части полипептидной цепи и кофакторы.

Всего известно около 3 000 различных ферментов, их делят на 6 классов.

1. *Оксиредуктазы*, или окислительно-восстановительные ферменты (дегидрогеназы, редуктазы, трансгидрогеназы, гидроксилазы). Они катализируют окисление или восстановление различных химических веществ,

2. *Трансферазы*. Представители этой группы ферментов катализируют перенос различных групп от одной молекулы к другой, например, фосфорилирование, переаминирование. К ним принадлежат, например, трансаминазы.

3. *Гидролазы* (пептидазы, эстеразы, гликозидазы, фосфатазы). Эти ферменты расщепляют белки, жиры и углеводы посредством гидролиза. Играют особенно важную роль в пищеварении и в процессах пищевой технологии.

4. *Лиазы*. Катализируют реакции расщепления между атомами С; С и О; С и N; Си Hal. К ферментам этой группы относятся, например, декарбоксилазы, отщепляющие молекулу CO_2 от органических кислот.

5. *Изомеразы* (рацемазы, эпимеразы). Катализируют структурные изменения в пределах одной молекулы органического соединения.

6. *Лигазы* (синтетазы). Катализируют образование связей С-О, С-S, С-N, С-С.

Нуклеиновые кислоты

Нуклеиновые кислоты получили свое название от латинского *nucleus* – ядро, так как были открыты 1868 г. швейцарским врачом Иоганном Фридрихом Мишером как составная часть ядра. Термин «нуклеиновая кислота» был введен в 1899 г.

Нуклеиновые кислоты, наряду с белками, являются важнейшими биополимерами живой клетки. Основная функция ДНК – хранение и передача атонаследственной информации. Именно ДНК используется в генной инженерии для создания новых видов организмов.

Подобно белкам, ДНК имеют первичную, вторичную и третичную структуры. ДНК в ядрах находится в комплексе с белками (*в основном гистонами*) в виде нуклеопротеида, где НК связаны водородными и солевыми связями с белками.

Цепи НК построены по иному принципу, чем цепи белков. Цепь нуклеиновой кислоты однообразна. Она состоит из одних и тех же звеньев – *нуклеотидов*, выступающих в роли мономеров. Нуклеотид, представленный на рис. 13, состоит из трех компонентов: азотистого основания (пуринового или пиримидинового), пятиуглеродного циклического углевода (рибозы или дезоксирибозы) и остатка фосфорной кислоты.

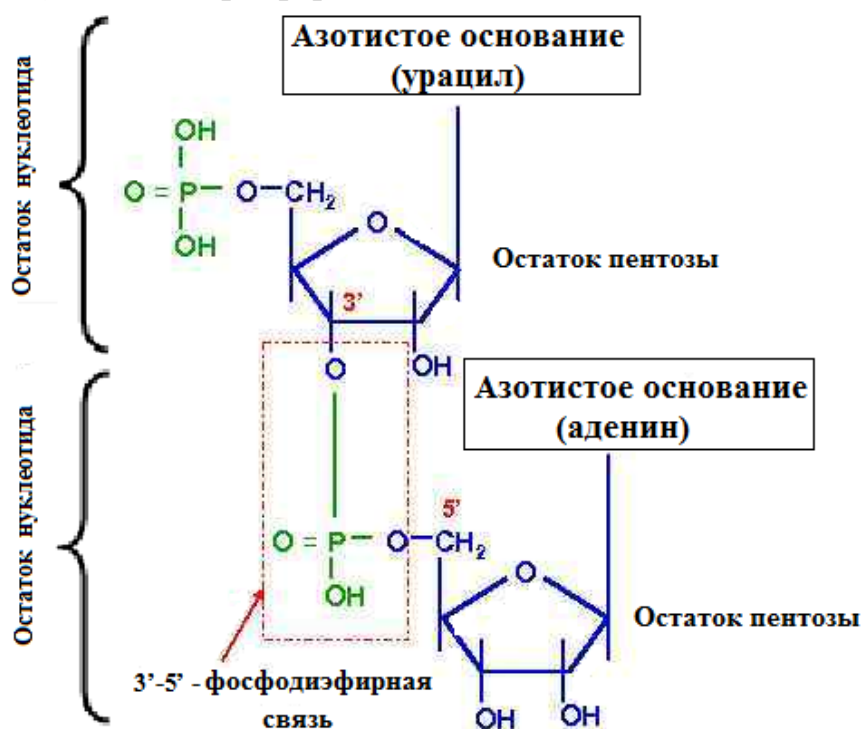


Рис. 13. Схема образования полинуклеотида

Основание связано с 1-м углеродным атомом углевода одним из своих атомов азота С-N- связью (*образуется нуклеозид*), а остаток фосфорной кислоты связан эфирной связью с 5-м углеродом углевода. В образовании нуклеиновых кислот могут участвовать две группы нуклеотидов, отличающиеся друг от друга природой сахаров и оснований, которые входят в их состав – рибонуклеотиды (содержат сахар рибозу) и дезоксирибонуклеотиды (содержат дезоксирибозу). Первые образуют *рибонуклеиновые кислоты (РНК)*, вторые – *ДНК*. В ДНК имеются нуклеотиды четырех типов, различающиеся лишь азотистыми основаниями. К этим основаниям относятся два пурина (Pu) – аденин (А) и гуанин (Г) – и два пиримидина (Py) – тимин (Т) и цитозин (Ц).

В РНК присутствуют те же звенья с заменой тимина на урацил (У) и дезоксирибозы на рибозу.

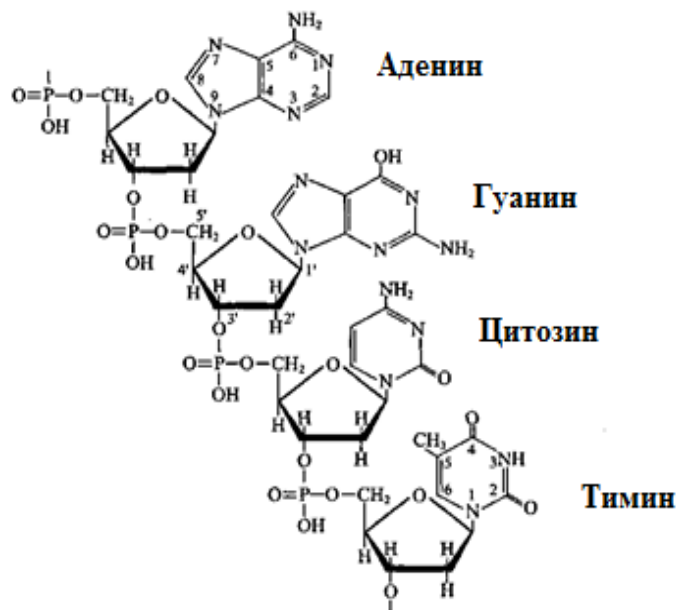
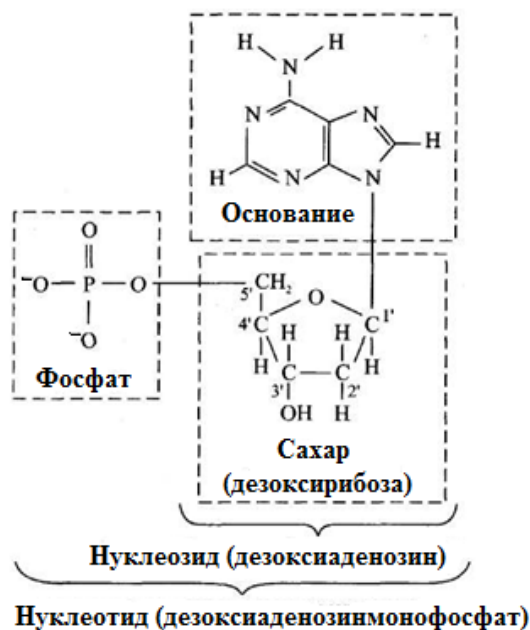
В 1953 г. Уотсон и Крик предложили модель ДНК. ДНК состоит из двух полинуклеотидных цепей, правозакрученных и свитых вместе относительно одной оси. Степень полимеризации очень высокая, цепь может состоять из нескольких десятков (30 – 40) тысяч нуклеотидов. Полный оборот спирали приходится на 10 пар оснований.

Каждая цепь – это регулярный полимер, в котором отдельные нуклеотиды соединяются между собой через остаток фосфорной кислоты по третьему атому углерода.

В образовании этой связи всегда принимают участие 5'– фосфат одного нуклеотида и 3'– гидроксил другого. Поэтому углеводно-фосфатный остов молекулы имеет регулярную структуру, причем 3', 5'– фосфодиэфирная связь молекулы наиболее чувствительна как к химическому, так и к ферментативному расщеплению.

В отличие от углеводно-фосфатного остова, последовательность пуриновых и пиримидиновых оснований вдоль цепи в высшей степени нерегулярна, каждая молекула ДНК определенного типа характеризуется особой последовательностью. Две цепи удерживаются вместе при помощи водородных связей между парами оснований. Такую структуру называют *дуплексом*. Цепи *комплементарны* друг другу, т. е. последовательность оснований в одной цепи определяет их последовательность в другой. Аденин всегда соответствует тимину, а гуанин – цитозину ($A \leftrightarrow T$; $G \leftrightarrow C$).

Структура отдельного нуклеотида и нуклеотидов, объединённых в цепочку ДНК представлена на рис.14.



а

б

Рис. 14. Структура отдельного нуклеотида (а) и нуклеотидов, объединённых в цепочку ДНК (б)

Удвоение ДНК

Молекулы ДНК обладают свойством, не присущим ни одной другой из известных молекул, – способностью к удвоению. В основе удвоения молекул ДНК также лежит принцип комплементарности. С помощью специальных ферментов водородные связи, скрепляющие нити ДНК, разрываются. При этом две нити исходного дуплекса расходятся, и каждая из них способна управлять построением комплементарной цепи из мономеров, что приводит к воссозданию двух дуплексов, идентичных исходному, – «дочерние молекулы». Каждая из них имеет одну нить, полученную от материнской, и другую нить, синтезированную вновь.

Поскольку молекулы ДНК являются матрицами для синтеза всех белков, в ДНК заключена информация о структуре и деятельности клеток и организма в целом. Участок молекулы ДНК, служащий матрицей для синтеза одного белка, называют *геном*, а информацию, которую содержит ДНК, – генетической.

Однако последовательность нуклеотидов в каждой из цепей – это только чертёж для создания новых молекул ДНК. Для сборки новых цепей нужен достаточный запас мономеров, а также специальное устройство, осуществляющее последовательное присоединение мономеров к растущей новой полимерной цепи. Этими устройствами являются ферменты, названные *ДНК-полимеразами*. Процесс синтеза комплементарной дочерней цепи ДНК на одной из родительских цепей называется *репликацией*.

После установления строения ДНК было сформулировано представление о *генетическом коде*, то есть о том, как на молекуле ДНК записаны аминокислотные последовательности программируемых ею белков. Порядок

расположения нуклеотидов в молекулах ДНК определяет порядок расположения аминокислот в линейных молекулах белков, т. е. их первичную структуру. Непосредственно сборкой белков из аминокислот ДНК не управляет. Это делает РНК, которая синтезируется при участии ДНК.

Основные виды РНК

В отличие от ДНК, *рибонуклеиновая* кислота одноцепочечная, правозакрученная спираль.

Главное химическое отличие между ДНК и РНК заключается в структуре сахара. Тот факт, что у рибозы есть лишняя *ОН*-группа, приводит к тому, что РНК легче подвергается действию окислителей, чем ДНК, т. е. менее устойчива.

Рибонуклеиновые кислоты подразделяются на три основных типа: матричную, или информационную (*м-РНК*), транспортную (*т-РНК*) и рибосомную (*р-РНК*). Все три типа РНК синтезируются непосредственно на ДНК, которая служит матрицей для этого процесса. *Количество РНК в каждой клетке прямо пропорционально количеству вырабатываемого этой клеткой белка.*

Матричная РНК составляет 3–5 % всей содержащейся в клетке РНК. Она обладает повышенной метаболической активностью, непрерывно распадается и синтезируется вновь.

Наследственная информация, хранящаяся в молекулах ДНК, (о всех свойствах клетки и организма в целом) передается молекулами *м-РНК*. *м-РНК* переносится в цитоплазму, где с помощью рибосом идет синтез белка. Именно *м-РНК*, которая строится комплементарно одной из нитей ДНК, определяет порядок расположения аминокислот в белковых молекулах.

Рибосомная РНК входит в состав рибосом и определяет их структуру. Это высокомолекулярная РНК, нерастворимая в условиях клетки. Она составляет более 80 % всей РНК клетки. *р-РНК* кодируется особыми генами, находящимися в нескольких хромосомах и расположенных в ядрышке. Последовательность оснований в *р-РНК* идентична для всех организмов – от бактерий до высших растений и животных.

Транспортная РНК представлена на рис.15 и составляет около 15 % всей клеточной РНК. Это растворимая в условиях клетки низкомолекулярная РНК (в нее входит в среднем 80 нуклеотидов). *т-РНК* доставляет активированные аминокислоты к месту синтеза белка – *рибосомам*, своеобразным фабрикам по производству белков. *т-РНК* играет роль связующих звеньев между триплетным кодом, содержащимся в *м-РНК*, и аминокислотной последовательностью полипептидной цепи. Каждая переносимая аминокислота имеет свою *т-РНК*. Вторичная и третичная структуры этой *т-РНК* весьма изменчивы и отличаются от матричной и рибосомной РНК.

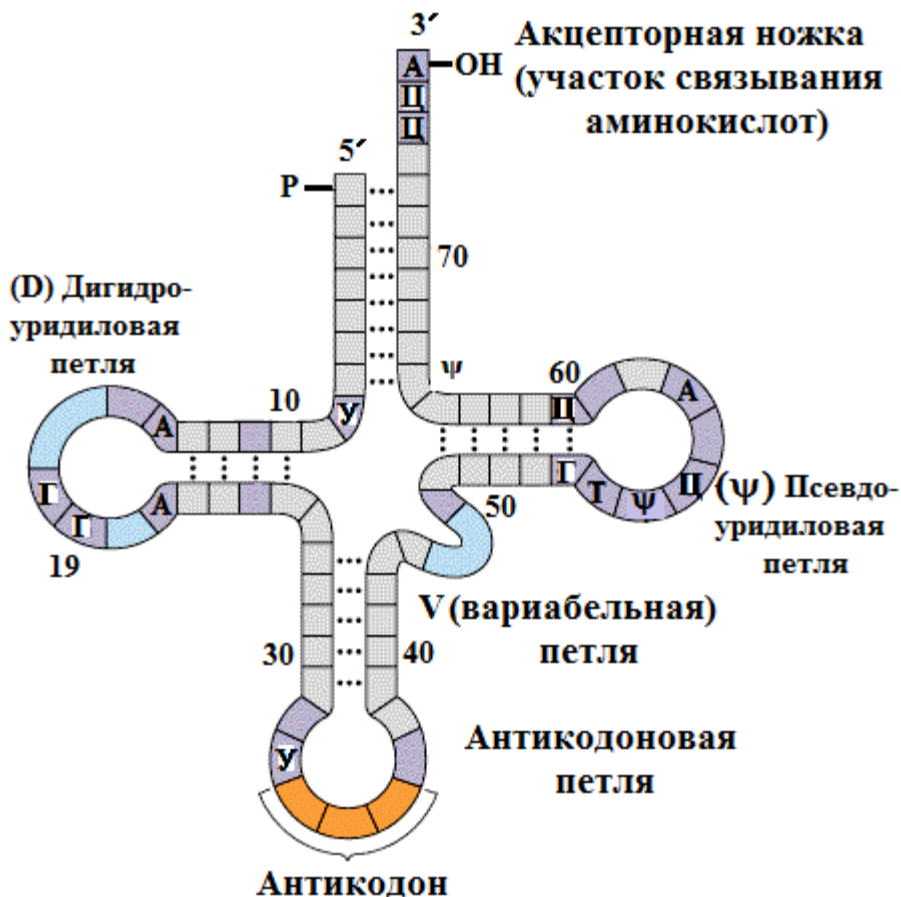


Рис.15. Транспортная РНК

Синтез молекул м-РНК

Синтез новых молекул РНК –*транскрипция*– осуществляется в ядре с помощью РНК-полимеразы. При этом соответствующая часть ДНК, содержащая информацию о некоторой определенной последовательности аминокислот, переписывается в определенную последовательность кодирующих элементов, построенных из рибонуклеотидов. Таким образом, информация, заложенная в молекуле ДНК, передается с помощью специального посредника матричной РНК (*мРНК*). Синтез м-РНК идет на одной из цепей молекулы ДНК, при этом механизм до конца не выяснен.

Синтез белков

Синтез белков на рибосомах называется *трансляцией*. м-РНК, несущая сведения о первичной структуре белковых молекул, проходит через поры ядерной оболочки и направляется к рибосомам, где осуществляется расшифровка генетической информации.

Аминокислоты, из которых синтезируются белки, доставляются к рибосомам с помощью т-РНК. В клетке имеется столько же разных типов т-РНК, сколько типов кодонов (триплетов), шифрующих аминокислоты. В каждой молекуле т-РНК имеется последовательность из трех нуклеотидов, комплементарных нуклеотидам кодона в м-РНК. Такая последовательность

нуклеотидов в структуре т-РНК называется *антикодоном*. Специальный фермент «узнает» антикодон и присоединяет к т-РНК «свою» аминокислоту. В этом состоит *первый этап синтеза*.

На *втором этапе синтеза* белка т-РНК выполняет функцию переводчика с «языка» нуклеотидов на «язык» аминокислот. Такой перевод происходит на рибосоме. В ней имеется два участка: на одном т-РНК получает команду от м-РНК – антикодон узнает кодон, на другом – выполняется приказ – аминокислота отрывается от т-РНК.

Третий этап синтеза белка заключается в том, что фермент синтетаза присоединяет оторвавшуюся от т-РНК аминокислоту к растущей белковой молекуле.

Когда на рибосоме в первом участке оказывается один из трех триплетов, являющихся знаками препинания между генами, это означает, что синтез белка завершен. Готовая цепь белка отходит от рибосомы. Схема синтеза белка представлена на рис. 16.

Репликация, транскрипция и трансляция – три основополагающих процесса, на которых основана любая жизнедеятельность.

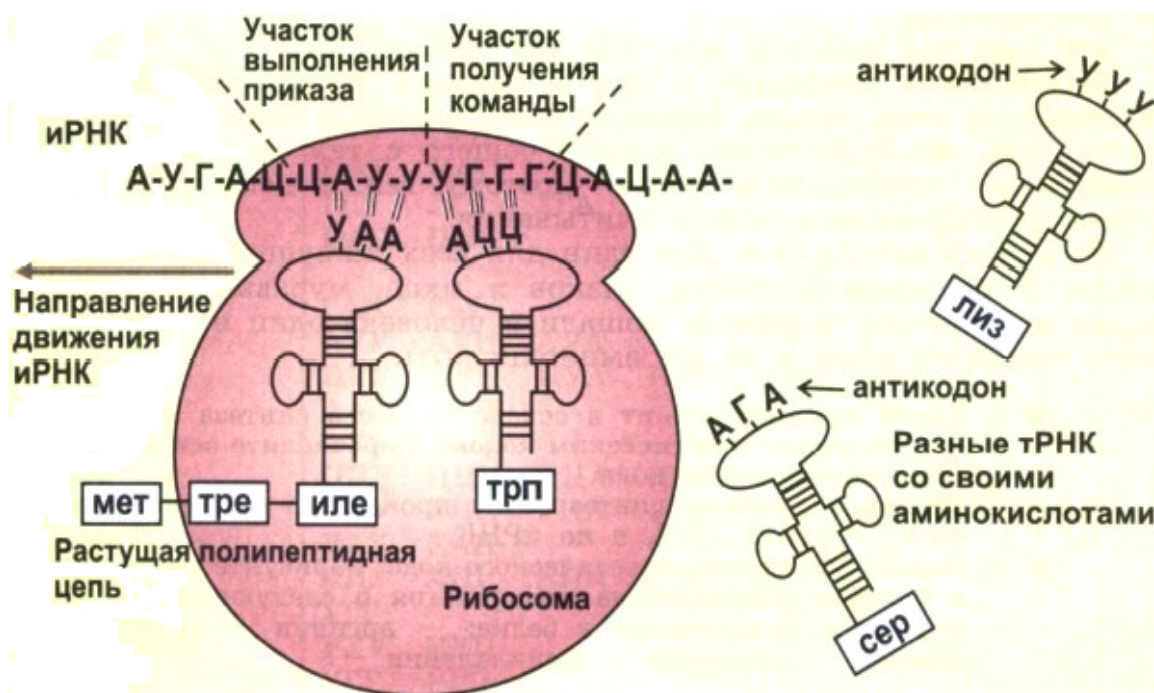


Рис.16. Схема синтеза белка в рибосоме (трансляция)

Итак, чтобы поддерживать жизнь, клетке необходимо иметь: вещество, из которого она строит собственные органеллы; энергию, чтобы это вещество использовать, и информацию, позволяющую воспроизводить себе подобных. Вещество и энергия поступают с белками; сохранение и передачу информации осуществляют НК.

Генетический код и его свойства

Генетическая информация, содержащаяся в ДНК и в м-РНК, заключена в последовательности расположения нуклеотидов в молекулах. Суть кода заключается в том, что последовательность расположения нуклеотидов в м-РНК определяет последовательность расположения аминокислот в белках. Этот код называют *генетическим*, его расшифровка – одно из великих достижений науки. Носителем генетической информации является ДНК, но так как непосредственное участие в синтезе белка принимает м-РНК – копия одной из нитей ДНК, то генетический код записан на «языке» РНК.

Код триплетен. В состав РНК входят 4 нуклеотида: А, Г, Ц, У. Если бы мы пытались обозначить одну аминокислоту одним нуклеотидом, то можно было бы зашифровать лишь 4 аминокислоты, тогда как их 20 и все они используются в синтезе белков. Двухбуквенный код позволил бы зашифровать 16 аминокислот (из 4 нуклеотидов можно составить 16 различных комбинаций, в каждой из которых имеется 2 нуклеотида).

В природе же существует трехбуквенный, или триплетный, код. Это означает, что каждая из 20 аминокислот зашифрована последовательностью из 3 нуклеотидов, т. е. триплетом, который получил название *кодона*. Из 4 нуклеотидов можно создать 64 различные комбинации, по 3 нуклеотида в каждой ($4^3 = 64$). Этого с избытком хватает для кодирования 20 аминокислот.

Код однозначен. Каждый триплет шифрует только одну аминокислоту.

Между генами имеются знаки препинания. Каждый ген кодирует одну белковую цепочку. Так как в ряде случаев м-РНК является копией нескольких генов и по ней последовательно создаются разные цепи, то они должны быть отделены друг от друга. Поэтому в генетическом коде существуют три специальные триплета (УАА, УАГ, УГА), каждый из которых обозначает прекращение синтеза одной белковой цепи. Таким образом, эти триплеты выполняют функцию знаков препинания. Они находятся в конце каждого гена. Внутри гена нет знаков препинания. Поскольку генетический код подобен языку, разберем это его свойство на примере такой, составленной из триплетов, фразы:

жил был кот тих был сер мил мне тот кот.

Смысл написанного понятен, несмотря на отсутствие знаков препинания. Если же мы уберем в первом слове одну букву (один нуклеотид в гене), но читать будем также тройками букв, то получится бессмыслица:

илб ылк отт ихб ылс ерм илм нет отк от.

Бессмыслица возникает и при выпадении одного или двух нуклеотидов из гена. Белок, который считывается с такого «испорченного» гена, не будет иметь ничего общего с тем белком, который кодировался нормальным геном. Поэтому ген в цепи ДНК имеет строго фиксированное начало считывания.

Код универсален. Код един для всех живущих на Земле существ. У бактерий, гриба, человека, краба, астры одни и те же триплеты кодируют одни и те же аминокислоты.

Липиды

Липиды –это группа органических соединений, содержащих длинноцепочечные углеводородные радикалы и сложноэфирные группировки.

Они нерастворимы в воде и хорошо растворимы в органических растворителях (бензине, диэтиловом эфире, хлороформе и др.).

Липиды широко распространены в природе, они являются обязательным компонентом каждой клетки. По химическому строению липиды отличаются большим разнообразием. Их молекулы построены из различных компонентов, в состав которых входят спирты и высокомолекулярные кислоты. В состав отдельных групп липидов могут входить остатки фосфорной кислоты, углеводов, азотистых оснований и другие компоненты, связанные между собой различными связями.

Липиды — важнейший компонент пищи, во многом определяет ее пищевую ценность и вкусовое достоинство.

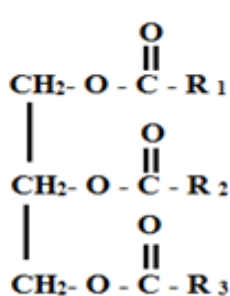
В растениях они накапливаются главным образом в семенах и плодах. Содержание в них липидов зависит не только от индивидуальных особенностей растений, но и от сорта, места и условий произрастания. У животных и рыб липиды концентрируются в подкожных жировых тканях, в брюшной полости и тканях, окружающих многие важные органы (сердце, почки), а также в мозговой и нервной тканях. Особенно много липидов в подкожной жировой ткани китов (25–30 % от их массы), тюленей и других морских животных.

У наземных животных содержание липидов сильно колеблется от 33,3% (мясная свинина), 16,0% (говядина) до 3,0% (поросята) и 2,0 % (телятина); в тушке рыб (угорь) может достигать 30 %, сельди – 7,0–19,5, у трески – 0,6 %; в молоке животных: оленя– 17–18 %, козы – 5,0 %, коровы – 3,5–4,0 %.

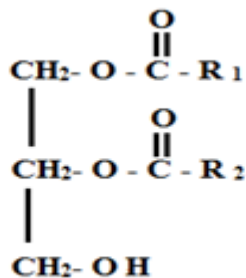
По химическому строению липиды отличаются большим разнообразием. Молекулы их построены из различных структурных компонентов, в состав которых входят спирты и высокомолекулярные кислоты, а в состав отдельных групп липидов могут также входить остатки фосфорной кислоты, углеводов, азотистых оснований и другие компоненты, связанные между собой различными связями.

Липиды делятся на простые и сложные. Молекулы *простых липидов* содержат только атомы С, О, Н и не содержат атомов N, P, S. К ним относят производные одноатомных (высших, с 12...22 атомами С) карбоновых кислот и одно- и многоатомных спиртов (в первую очередь, трехатомного спирта – глицерина). Наиболее важными и распространенными представителями простых липидов являются полные сложные эфиры глицерина и высокомолекулярных карбоновых кислот (триглицериды). Триглицериды представляют собой жидкости или твердые вещества с низкими (до 40 °С) температурами плавления и довольно высокими температурами кипения, с повышенной вязкостью, без цвета и запаха, легче воды, нелетучи.

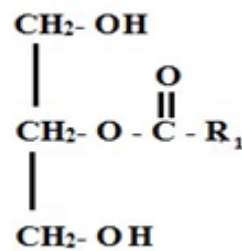
Они составляют основную массу липидов (до 96 %) и именно их называют *маслами и жирами*. Моно- и диглицериды встречаются в природе лишь как соединения, образующиеся в процессе обмена веществ.



триглицерид



диглицерид



моноглицерид

где $\text{R}_1, \text{R}_2, \text{R}_3$ — углеводородные радикалы, содержащие 12–22 атома С.

Поскольку глицерин является обязательной структурной составляющей всех жиров, свойства конкретных глицеридов определяются составом жирных кислот, участвующих в построении их молекул и положением, которое занимают остатки этих кислот в молекулах глицеридов. Наиболее распространенные кислоты, входящие в состав жиров, представляют собой неразветвленные углерод-углеродные цепи с четным числом атомов С (жирные кислоты).

Стеариновая (C_{18}^0) и пальмитиновая (C_{16}^0) кислоты входят в состав практически всех природных масел и жиров, эруковая (C_{22}^1) кислота входит в состав рапсового масла. В состав большинства наиболее распространенных масел входят ненасыщенные кислоты, содержащие 1–3 двойные связи, — олеиновая (C_{18}^1), линолевая (C_{18}^2), линоленовая (C_{18}^3). Арахидоновая кислота (C_{18}^4), содержащая 4 двойные связи, присутствует в жире животных. В жирах рыб и морских животных обнаружены кислоты с 5–6 и более двойными связями.

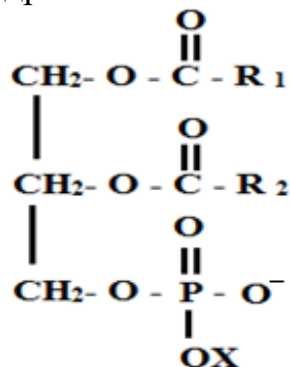
Ненасыщенные кислоты природных масел и жиров, как правило, имеют цис-конфигурацию, т.е. заместители расположены по одну сторону плоскости двойной связи.

Кислоты, имеющие разветвленные углеродные цепи, содержащие окси- (ОН-), кето- (-С-) и другие группы, в липидах растений, животных и рыб встречаются, как правило, в незначительном количестве (исключение — рицинолевая кислота в касторовом масле).

В группу простых липидов входят также *воски*. Это сложные эфиры высокомолекулярных одноосновных карбоновых кислот и одноосновных высокомолекулярных спиртов.

Воски широко распространены в природе, они покрывают тонким слоем листья, стебли, плоды растений, предохраняя их от смачивания водой, высыхания, действия микроорганизмов. Воски, которые выполняют защитные функции, могут быть условно отнесены к защитным липидам.

Сложные липиды, помимо атомов С, О, Н, содержат атомы N, P, S. Наиболее важная и распространенная группа сложных липидов – *фосфолипиды* (*фосфатиды*). Их молекула построена из остатков спиртов, высокомолекулярных жирных кислот, фосфорной кислоты, азотистых оснований, чаще всего холина $\text{HO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N(OH)(CH}_3)_3$ и этаноламина $\text{HO(CH}_2)_2\text{NH}_2$, аминокислот и др.



Структурная формула сложных липидов,

где R_1, R_2 – углеводородные радикалы; X – H или остаток амноспирта $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N(OH)(CH}_3)_3$, или $-(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$

По функциям, которые выполняют липиды в организме, их подразделяют на две группы: запасные и структурные.

Запасные липиды, в основном глицериды, обладают высокой калорийностью, являются энергетическим резервом организма.

Структурные липиды (в первую очередь, фосфатиды) образуют сложные комплексы с белками, углеводами и участвуют в разнообразных процессах, протекающих в клетках.

Химические реакции, в которых участвуют глицериды, составляющие основную массу масел и жиров, весьма разнообразны. К ним относятся гидролиз, окисление, обмен остатков жирных кислот, входящих в их молекулы (переэтерификация), гидрирование ненасыщенных глицеридов.

При выделении липидов из масличного сырья в масло переходит большая группа сопутствующих им жирорастворимых веществ: стероиды, пигменты, жирорастворимые витамины и некоторые другие соединения. Извлекаемая из природных объектов смесь, которая состоит из липидов и растворенных в них соединений, получила название «сырого» жира.

Вещества, сопутствующие липидам и входящие в состав «сырого» жира, играют большую роль в пищевой технологии, влияют на пищевую и физиологическую ценность полученных продуктов питания.

Среди жирорастворимых природных пигментов наиболее распространены каротиноиды и хлорофиллы.

Каротиноиды – растительные красно-желтые пигменты, обеспечивающие окраску ряда жиров, овощей и фруктов, яичного желтка и других продуктов. Это углеводороды состава $\text{C}_{40}\text{H}_{56}$, каротины и их кислородсодержащие производные.

Помимо красящих свойств отдельные каротиноиды обладают провитаминными свойствами, так как они, распадаясь в живом организме, превращаются в витамин А.

Один из наиболее распространенных стеридов – холестерин. Он обнаружен во всех животных липидах, в крови и яичном желтке и отсутствует или присутствует в незначительном количестве в липидах растений. Холестерин является структурным компонентом клетки, участвует в обмене желчных кислот, гормонов.

Углеводы

Важнейшим классом соединений, входящих в состав живых организмов, являются *углеводы*. В растениях на их долю приходится до 90 % сухого вещества. В клетках живых организмов углеводы являются источником энергии. Они играют роль опорного скелетного материала у растений и некоторых животных и выступают в качестве регуляторов ряда важнейших биохимических реакций. В соединении с белками и липидами углеводы образуют сложные высокомолекулярные комплексы, представляющие основу живой материи. Они входят в состав природных биополимеров – нуклеиновых кислот, участвующих в передаче наследственной информации.

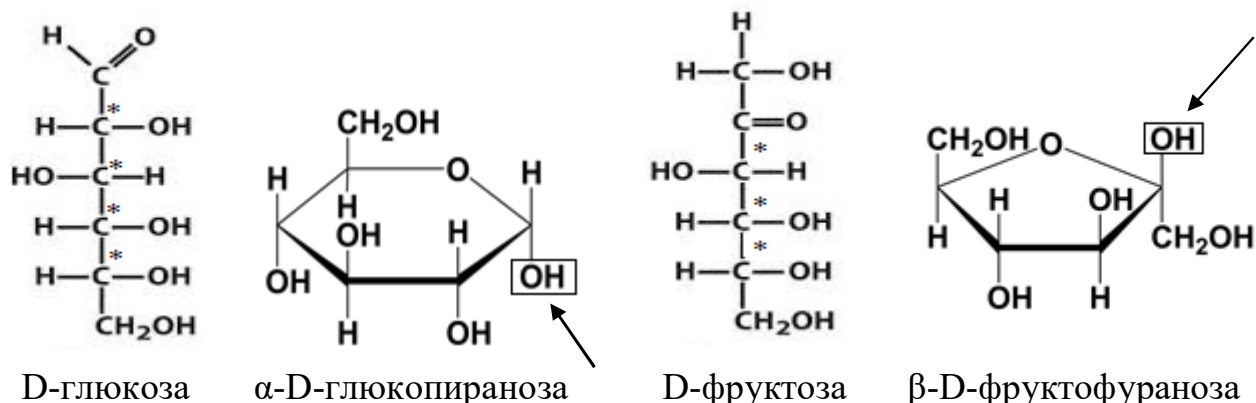
Углеводы образуются в растениях в ходе фотосинтеза под действием солнечных лучей, CO_2 воздуха и являются первыми органическими веществами в кругообороте углерода в природе.

Все углеводы делят на простые и сложные. К *простым (моносахариды, монозы)* относят углеводы, которые не способны гидролизиться с образованием более простых соединений. Их общая формула $\text{C}_n\text{H}_{2n}\text{O}_n$, причем число атомов С равно числу атомов О. К *сложным углеводам* относят соединения, способные гидролизиться с образованием более простых и низкомолекулярных продуктов. У них число атомов С не равно числу атомов О. Сложные углеводы очень разнообразны по составу, молекулярной массе, следовательно, и по свойствам. Их делят на 2 группы:

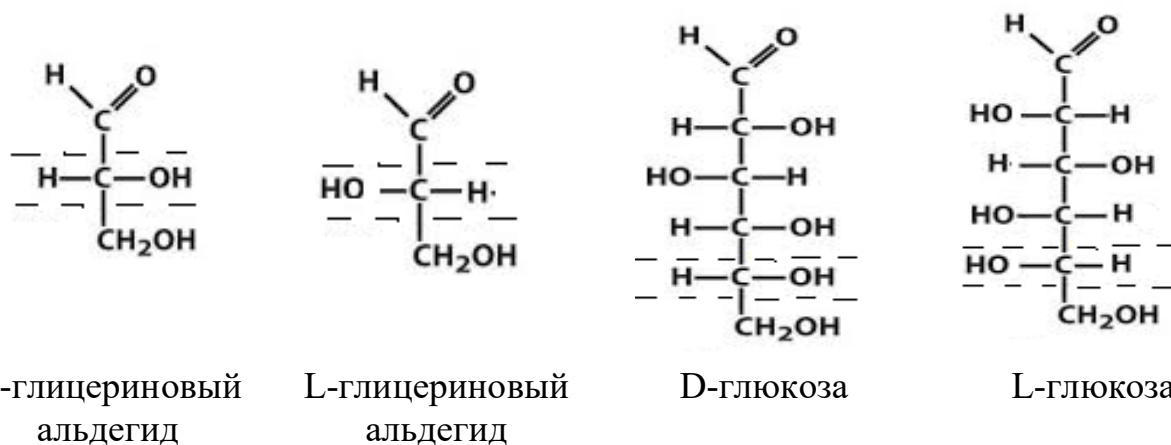
- 1) низкомолекулярные (сахароподобные, или *олигосахариды*);
- 2) высокомолекулярные (несахароподобные *полисахариды*) – соединения с большой молекулярной массой, в состав которых могут входить остатки тысяч простых углеводов. Их также можно разделить на 2 группы:
 - а) цепи построены из одинаковых моноз (крахмал, гликоген, целлюлоза);
 - б) цепи построены из различных моноз (гемицеллюлозы, пектины).

Молекулы простых углеводов – моноз построены из неразветвленных углерод-углеродных цепей, содержащих различное число атомов С. В состав растений и животных входят главным образом монозы с 5 и 6 атомами углерода – пентозы и гексозы. У атомов С расположены гидроксильные группы, а одна из них окислена до альдегидной (альдозы) или кетонной (кетозы) группы. Вследствие наличия асимметрических атомов углерода монозы обладают оптической активностью. В состав природных углеводов входят монозы D-ряда. Наиболее распространенными и важными представителями простых

углеводов являются глюкоза и фруктоза. Первое соединение относится к альдогексозам, второе – к кетогексозам. В водном растворе глюкоза и фруктоза существуют в форме циклических полуацеталей.



Наличие спиртовых, альдегидных или кетонных групп, а также появление в циклических формах моноз полуацетального (гликозидного) гидроксила, обладающего восстановительными свойствами, определяет химическое поведение этих соединений.

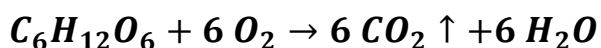


Окисление альдегидной группы до карбоксильной приводит к соответствующим альдоновым кислотам, а окисление концевой спиртовой группы до карбоксильной – к уроновым кислотам.

Наличие спиртовых, альдегидных или кетонных групп, а также появление в циклических формах моноз полуацетального (гликозидного) гидроксила, обладающего восстановительными свойствами, определяет химическое поведение этих соединений. Окисление альдегидной группы до карбоксильной приводит к соответствующим альдоновым кислотам, а окисление концевой спиртовой группы до карбоксильной – к уроновым кислотам. Продукты восстановления одной из гидроксигрупп монозы называют дезоксисахарами. Примером их является дезоксирибоза, лежащая в основе дезоксирибонуклеотидов и ДНК.

Особое место в превращениях моносахаридов занимают 2 процесса: *дыхание и брожение*.

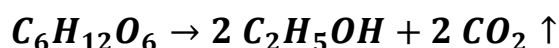
Дыхание является аэробным процессом, т.е. происходит в присутствии воздуха:



Эта реакция катализируется ферментами. Дыхание, наряду с фотосинтезом, является важнейшим источником энергии для живых организмов.

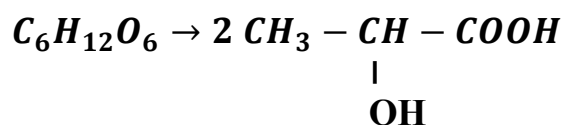
Брожение протекает в отсутствие воздуха, т.е. анаэробно. Процесс имеет несколько разновидностей.

Спиртовое брожение, протекающее под влиянием микроорганизмов, играет исключительную роль в производстве спирта, вина, хлебобулочных изделий:



Наряду с главными продуктами – спиртом и CO_2 , при спиртовом брожении моноз образуются разнообразные побочные продукты (глицерин, янтарная кислота, уксусная кислота, изоамиловый и изопропиловый спирты и т.д.).

Кроме спиртового брожения, существует *молочно-кислое брожение* моноз:



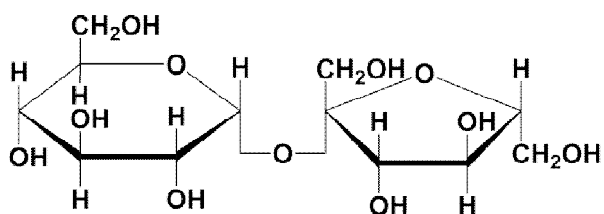
молочная кислота

Это основной процесс при получении простокваши, кефира и других молочно-кислых продуктов, квашении капусты.

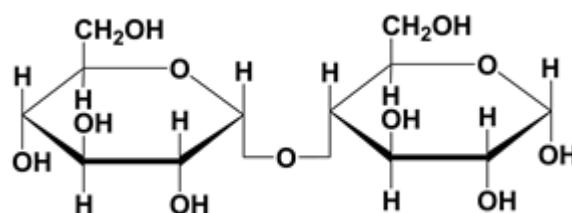
Брожение моноз может приводить к образованию масляной кислоты (*масляно-кислое брожение*).

Молекулы *полисахаридов* построены из различного числа остатков моноз. В зависимости от этого их делят на низко- и высокомолекулярные полисахариды. Из первых особое значение имеют *дисахариды*, молекулы которых построены из 2-х одинаковых или разных остатков моноз. Важнейшими дисахаридами являются сахароза, мальтоза и лактоза.

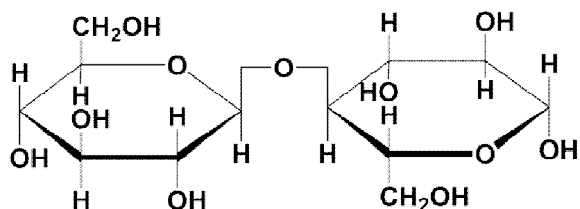
Одна из молекул моноз всегда участвует в построении молекулы дисахарида своим полуацетальным гидроксилем, другая – полуацетальным или одним из спиртовых гидроксильных групп. Если в образовании молекулы дисахарида монозы участвуют своими полуацетальными гидроксильными группами, образуется невосстанавливающий дисахарид (сахароза); во втором случае – восстанавливающий (мальтоза, лактоза). Это одна из главных характеристик дисахаридов.



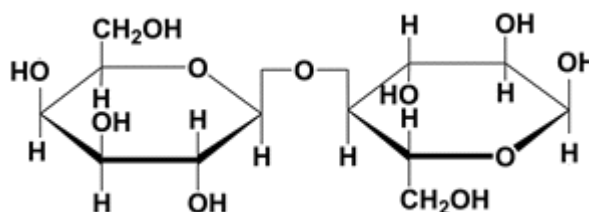
сахароза



мальтоза

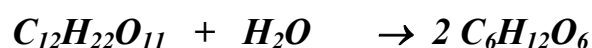


целлобиоза



лактоза

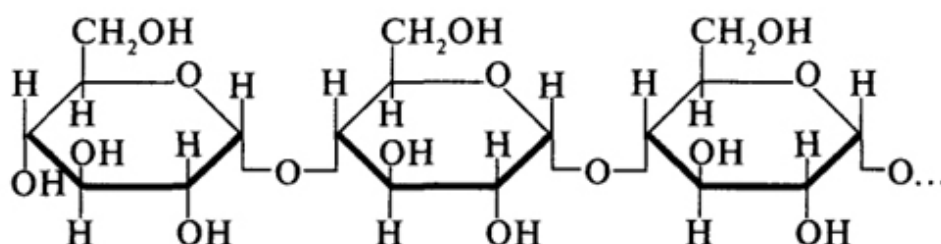
Важнейшая реакция дисахаридов – гидролиз:



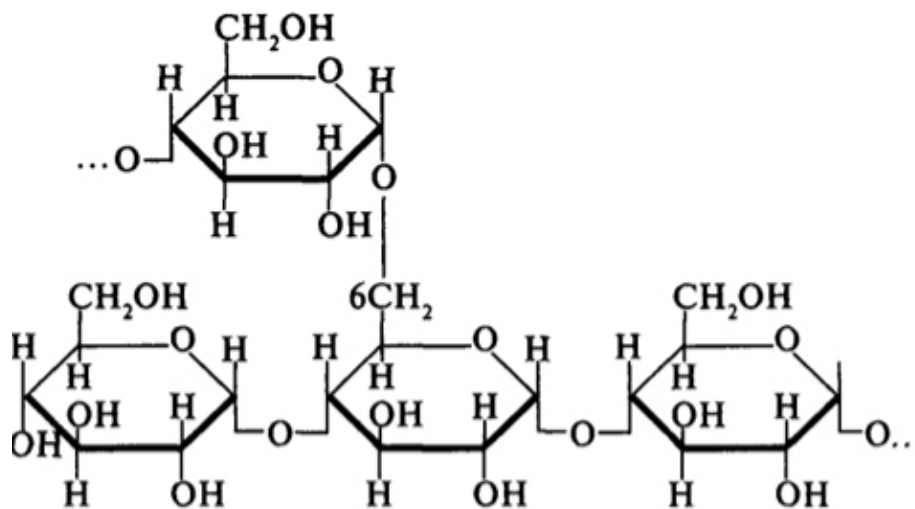
дисахарид моносахариды

Важнейшими полисахаридами являются крахмал, гликоген и целлюлоза. Все они построены на базе D-глюкозы и служат в растительных и животных организмах резервными углеводами питания или углеводами для построения остова клеточной ткани.

Крахмал $(C_6H_{10}O_5)_n$ – главный компонент зерна, картофеля и многих видов пищевого сырья. Крахмал не является индивидуальным веществом, он состоит из полимеров двух типов: амилозы (18–25 %) и амилопектина (75–82 %), построенных из остатков α -D-глюкозы.



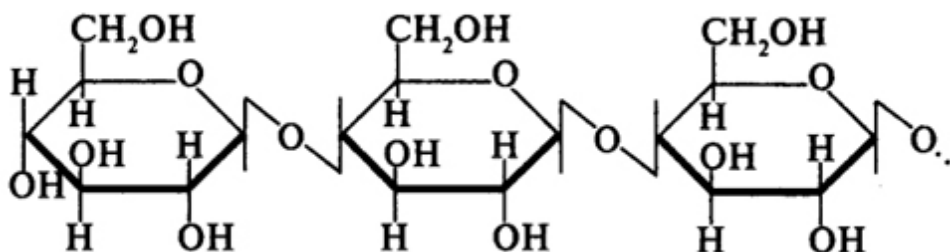
амилоза



амилопектин

Гликоген содержится в мускульной ткани и печени. Он также является резервным полисахаридом. По своему строению он напоминает крахмал.

Целлюлоза – полимер, построенный из остатков β -D-глюкозы. Это основная составная часть клеток растений; относительно чистой целлюлозой являются волокна хлопчатника, джута и конопли. Важными производными целлюлозы, выделяемыми в основном из панцирей ракообразных, являются *хитин* и *хитозан*.



целлюлоза

В отличие от целлюлозы, у второго углеродного атома имеется не гидроксильная, а ацетамидная (хитин) или аминогруппа (хитозан). Благодаря биосовместимости с тканями человека, низкой токсичности, способности усиливать регенеративные процессы при заживлении ран, биodeградируемости материалы на основе хитина и хитозана представляют особый интерес для медицины.

Витамины

Важнейшими регуляторами процессов, протекающих в живом организме, являются низкомолекулярные органические соединения различной химической природы, называемые *витаминами*. Витамины необходимы для нормальной жизнедеятельности человека, но так как в организме они не синтезируются в

достаточных количествах, то должны поступать с пищей в качестве необходимого компонента. Свое название витамины получили от лат. *vita*–жизнь.

В настоящее время известно свыше 30 соединений, относящихся к витаминам.

Различают собственно витамины и витаминоподобные (полная незаменимость которых не всегда доказана). В отдельных продуктах содержатся провитамины, т.е. соединения, способные превращаться в витамины в организме. Например, β -каротин переходит в витамин А, эргостеролы под действием ультрафиолетовых лучей в организме человека превращаются в витамин D. В то же время имеется группа соединений, часто близких к витаминам по строению, которые, конкурируя с витаминами, могут занять место в ферментных системах, но не в состоянии выполнять его функции. Они получили название антивитаминов.

Так как химическая природа витаминов была открыта после установления их биологической роли, их условно обозначили буквами латинского алфавита (А, В, С, D и т. д.), которые сохранились и до настоящего времени.

Сведения об основных функциях витаминов приведены в табл.5.

Таблица 5. Виды и основные функции витаминов

Витамин	Функция
Аскорбиновая кислота (витамин С)	Участвует в редокс-реакциях, повышает сопротивляемость организма к экстремальным воздействиям.
Тиамин (аневрин) (витамин В ₁)	Необходим для нормальной деятельности нервной системы
Рибофлавин (витамин В ₂)	Участвует в редокс-реакциях
Пиридоксин (витамин В ₆)	Участвует в синтезе и метаболизме аминокислот, жирных кислот и ненасыщенных липидов
Ниацин (витамин РР)	Участвует в редокс-реакциях в клетке
Фолиевая кислота (В ₉ , фолицин)	Кроветворный фактор, переносчик одноуглеродных радикалов, участвует в синтезе аминокислот, нуклеиновых кислот, холина
Цианкобаламин (витамин В ₁₂)	Участвует в биосинтезе нуклеиновых кислот, холина, лецитина. Фактор кроветворения, обладает липотворным действием

Биотин (витамин Н)	Участвует в реакциях карбоксилирования, обмена аминокислот, липидов, углеводов, нуклеиновых кислот
Пантотеновая кислота (витамин В ₃)	Участвует в реакциях биохимического ацилирования, обмена белков, липидов, углеводов
Холин (холинхлорид)	Участвует в синтезе биологически важных соединений
Ретинол (витамин А)	Участвует в деятельности мембран клеток, в процессе восприятия света. Необходим для роста и развития человека, для функционирования слизистых оболочек
Кальциферол (витамин D)	Регулирует содержание кальция и фосфора в крови, минерализацию костей, зубов
Токоферолы (витамин Е)	Является активным антиоксидантом, предотвращает окисление липидов

Контрольные вопросы

1. Дайте определение понятия «белки». Какова их молекулярная масса? Перечислите основные функции белков.
2. Каков элементный состав белков? По какому признаку белки делятся на простые и сложные? Что представляют собой структурные единицы белков? Какими связями они соединены в молекуле белка?
3. Какие аминокислоты являются протеиногенными? Сколько известно протеиногенных аминокислот?
4. Какие аминокислоты являются незаменимыми? Перечислите их.
5. Какие известны уровни организации белков? Приведите классификацию белков.
6. Охарактеризуйте свойства белков. Перечислите их функции.
7. Что такое нуклеиновые кислоты, каковы их основные функции? Из каких элементов построены цепи НК? Отметьте сходство и различие строения ДНК и РНК.
8. Перечислите основные виды РНК и дайте их характеристику.
9. Дайте определение понятия «липиды». Приведите их строение и свойства.
10. Дайте определение понятия «углеводы». Перечислите простые и сложные углеводы. Перечислите основные функции углеводов. Приведите их строение и свойства.

4. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ

4.1. Рост и культивирование микроорганизмов

Микроорганизмы (грибы, растения, дрожжи) – очень сложные и весьма лабильные живые существа. Они сравнительно быстро размножаются и поэтому за короткое время способны накапливать значительные количества клеточной массы – биомассы.

При оценке продуктивности производственных культур и их пригодности для использования в заводских условиях важны два показателя:

1) *способность к быстрому накоплению биомассы* – характеризует физиологическую способность данной культуры к быстрому росту и размножению;

2) *лабильность микроорганизма* – дает возможность направленно изменять те или иные признаки продуцента для усиления биосинтеза целевого продукта.

Все микроорганизмы объединяются общностью строения клетки и направленностью обменных процессов, едиными закономерностями роста и развития при выращивании на различных средах и в различных аппаратах.

Производственная схема получения биотехнологической продукции состоит из следующих основных этапов:

1) культивирование микробов;

2) выделение, концентрирование и очистка целевого продукта (микробной массы, ферментов, антибиотиков, интерферонов, гормонов и др.);

3) приготовление, стандартизация и контроль готового целевого продукта (препарата).

Микробов культивируют на жидких, реже на плотных сбалансированных питательных средах в аппаратах (ферментерах) различной емкости (от 2 л до 400 м³) при оптимальном температурном режиме и физико-химических условиях (рН, масс-обменные характеристики), поддерживаемых автоматически. В качестве питательных сред используют дешевое, доступное, недефицитное сырье, например, рыбкокостную муку, отходы сахарного производства (меласса), дрожжевой экстракт, в некоторых случаях гидролизатыказеина и другого белкового сырья.

Время выращивания большинства бактерий при определенных условиях составляет 1–3 сут. Из 1 т культуры за это время получается примерно 50 кг биомассы. Для повышения выхода продукции используют высокопродуктивные промышленные штаммы микробов. Из культуральной жидкости выделяют и концентрируют биомассу бактерий с помощью различных методов (сепарирование, центрифугирование, седиментация, выпаривание, ультрафильтрация, хроматография). Дальнейшей обработке подвергают или биомассу, или освобожденный от биомассы фильтрат культуральной жидкости, содержащий целевой продукт. Очистку и концентрирование целевого продукта (антибиотика, антигена, фермента и др.) осуществляют одним из известных физико-химических методов: изоэлектрическое осаждение, осаждение кислотами, спиртами, высаливание, хроматография и др. Затем очищенному и

концентрированному продукту или культуре бактерий (например, при изготовлении живых и убитых вакцин) придают конечную форму в виде жидкого, сухого, таблетированного препарата, который стандартизуют и контролируют по активности, физико-химическим и медико-биологическим параметрам.

По такой же схеме получают биотехнологическую продукцию и при культивировании животных и растительных клеток. Растительные клетки используют для получения фармацевтических веществ (женьшень, мочегонные, сердечно-сосудистые и другие препараты), а животные клетки – для выращивания вирусов с целью получения вакцин, антигенов, гормонов, эндогенных иммуномодуляторов и других биологически активных веществ. Однако культивирование животных и растительных клеток значительно сложнее и дороже, чем культивирование бактерий, так как выращивание этих клеток в отличие от бактерий требует сложных по составу питательных сред, специальной аппаратуры и условий культивирования. Поэтому в биотехнологии интенсивно разрабатываются и уже используются рекомбинантные штаммы бактерий, способные синтезировать продукт растительной и животной природы.

Микроорганизмы, применяемые в микробиологической промышленности, принадлежат разным таксономическим группам (бактерии, дрожжи, плесневые грибы – аскомицеты, фикомицеты, актиномицеты и др.) и существенно отличаются друг от друга по морфологии, размерам клеток, отношению к кислороду, потребностям в ростовых факторах, способности ассимилировать разные компоненты субстрата и т. д.

Из более чем 100 000 известных видов микроорганизмов в промышленности используют относительно мало – около 100 видов, к которым принадлежат несколько тысяч штаммов. Промышленный штамм должен соответствовать следующим требованиям:

- расти на дешевых и доступных субстратах;
- обладать высокой скоростью роста биомассы (m) и иметь высокую продуктивность целевого продукта (D , P) при экономичном потреблении питательного субстрата (Y_x/s , Y_p/s);
- проявлять направленную биосинтетическую активность при минимальном образовании побочных продуктов;
- быть генетически однородным, стабильным по продуктивности, требованиям к питательному субстрату и условиям культивирования;
- быть устойчивым к фагам и другой посторонней микрофлоре;
- быть безвредным (не обладать патогенными свойствами) для людей и окружающей среды;
- желательно, чтобы продуценты были термофильными и ацидофильными (или алкалофильными), так как в этом случае легче предохранить ферментируемый субстрат от инвазии посторонней микрофлорой;

- целевой продукт биосинтеза должен иметь экономическую и народно-хозяйственную ценность и должен легко выделяться из субстрата.

Большой интерес для производства представляют анаэробные микроорганизмы, поскольку при их культивировании не требуются энергоемкие аэрирующие устройства.

В промышленности применяют три вида штаммов:

- 1) природные штаммы, улучшенные естественным или искусственным отбором;
- 2) штаммы, измененные в результате индуцированных мутаций;
- 3) штаммы культур, полученные методами генной или клеточной инженерии.

Продукты микробного брожения и метаболизма

К продуктам микробного брожения и метаболизма относятся первичные метаболиты, вторичные метаболиты, ферменты и сама клеточная биомасса (так называемые белки одноклеточных микроорганизмов).

Первичные метаболиты – это низкомолекулярные соединения (молекулярная масса менее 1500 дальтон), необходимые для роста микробов; одни из них являются строительными блоками макромолекул, другие участвуют в синтезе коферментов. Среди наиболее важных для промышленности метаболитов можно выделить аминокислоты, органические кислоты, пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды, витамины и др. Исходными штаммами для промышленных процессов служат природные организмы и культуры с нарушениями регуляции синтеза этих метаболитов, так как обычные микробные клетки не производят избытка первичных метаболитов.

Вторичные метаболиты – это низкомолекулярные соединения, образующиеся на более поздних стадиях развития культуры, не требующиеся для роста микроорганизмов. По химическому строению вторичные метаболиты относятся к различным группам соединений. Среди наиболее важных для промышленности метаболитов можно выделить антибиотики, алкалоиды, гормоны роста растений, токсины и пигменты.

Влияние условий среды на рост микроорганизмов

Для культивирования микроорганизмов прежде всего необходимо создать подходящую питательную среду. Микроорганизмы очень чувствительны к составу питательных сред.

Питательный субстрат, или питательная среда, является сложной трехфазной системой, содержащей жидкие, твердые и газообразные компоненты. Микроорганизм использует питательные вещества среды не только на построение клеточного вещества, но и на обеспечение энергией всех биохимических превращений в клетке.

Для нормальной жизнедеятельности микроорганизмов питательная среда должна быть стерильной, содержать водный раствор или суспензию усвояемых

форм углерода, азота, фосфора и других необходимых макро- и микроэлементов и иметь оптимальное значение температуры, рН (3–9), окислительно-восстановительного потенциала, осмотического давления, вязкости. Отрицательные факторы задерживают рост и образование целевого продукта и даже вызывают отмирание частей клетки.

Потребность микроорганизма в тех или иных соединениях определяется физиологическими особенностями данного вида микроба, но во всех случаях среда должна быть водным раствором этих веществ и обеспечивать в определенном количестве приток их в клетку.

В самом приближенном виде физиологические потребности микроорганизма в питательных веществах можно выявить, определив химический состав микробной клетки, представленной в табл.6.

Таблица6. Усредненный элементарный состав биомассы некоторых групп микроорганизмов

Химический состав микробной клетки	Состав биомассы, % на абсолютно сухое вещество		
	бактерии	дрожжей	грибов (мицелия со спорами)
Углерод	50,4	49,8	47,9
Азот	12,3	12,4	5,2
Кислород	30,5	31,1	40,2
Водород	6,8	6,7	6,7
P ₂ O ₅	4,95	3,54	4,85
K ₂ O	2,41	2,34	2,81
SO ₃	0,29	0,04	0,11
Na ₂ O	0,07	-	1,12
MgO	0,82	0,42	0,38
CaO	0,89	0,38	0,19
Fe ₂ O ₃	0,08	0,03	0,16
SiO ₂	0,03	0,09	0,04

Все элементы, входящие в состав клеток микроорганизмов, должны присутствовать в питательной среде. Отсутствие даже одного из них приведет к замедлению роста или полному его прекращению.

Среди элементов наибольшее биогенное (жизненно важное) значение имеет *углерод*. Он входит в состав почти всех органических соединений, образующихся в микробной клетке. Углерод вступает во взаимодействие с кислородом, водородом, азотом и серой, образует соединения из длинных цепочек углеродных атомов, связанных между собой последовательно или с

участием некоторых других элементов, дающих циклические соединения. Известно, что такие вещества с углеродной цепочкой составляют основу жизненно важных соединений клетки: аминокислот, белков, углеводов, нуклеиновых кислот, жиров и т. д.

Вторым не менее важным биогенным элементом является *азот*. Он входит в состав аминокислот, белковых веществ, нуклеиновых кислот, которые самым активным образом участвуют в построении тела клетки, в процессах роста и размножения микроорганизма. Азотсодержащие соединения обладают высокой реакционной способностью.

Важны для питания микроорганизма и остальные элементы: фосфор, сера, кислород, железо, калий и др.

В лабораторных условиях часто используют агары, мясной бульон, молоко, бобовый отвар и другие универсальные субстраты, богатые ценными веществами. Необходимо стерилизовать биореактор, вспомогательную аппаратуру, все компоненты питательной среды, а также аэрируемый воздух при аэробном процессе.

Надо учитывать способность многокомпонентной питательной среды производить устойчивую пену, что вызывает необходимость регулирования режимов пенообразования. Кроме того, в результате интенсивного обмена веществ у микроорганизмов часть химической энергии, связанной во время ферментации, выделяется в виде теплоты. Ассимилируя 1 кг сахара, микроорганизмы выделяют 4–6 тыс. кДж тепла. На биохимических заводах работают десятки ферментеров, от которых отводят лишнее тепло.

Микроорганизмы в результате секреции продуктов обмена веществ непрерывно меняют среду культивирования, а сами процессы метаболизма, в свою очередь, чутко реагируют на изменения в среде.

В то же время микроорганизмы весьма непритворливы, они сравнительно легко адаптируются (приспосабливаются) к условиям обитания. Например, дрожжи прекрасно растут на глюкозе, сахарозе, мальтозе, но они могут быть адаптированы к выращиванию на пентозах, парафинах нефти, этиловом и метиловом спиртах и т.д.

Часто субстратом для жизнедеятельности микроорганизма служат такие соединения, которые они не в состоянии использовать без предварительной подготовки (например, целлюлоза, гемицеллюлоза, крахмал, пектин, пентозаны и т.д.). В этом случае при подготовке питательной среды следует предусмотреть предварительный ферментативный либо химический способ разрушения биополимера, для того чтобы углерод в среде был в усвояемой форме.

Сырье. Микроорганизмы способны ассимилировать любое органическое соединение, поэтому потенциальными ресурсами для микробиологической биотехнологии могут служить все мировые запасы органических веществ, включая первичные и вторичные продукты фотосинтеза, а также запасы органических веществ в недрах Земли.

Получение посевного материала

Поддержание чистой культуры штамма-продуцента – ключевая задача любого биотехнологического производства. Культуры микроорганизмов-продуцентов заводы получают из коллекций в пробирках на агаризованных питательных средах или в ампулах. Чистая культура микроорганизма может постоянно или по мере необходимости использоваться в производстве. При длительном хранении чистых культур могут происходить случайные нерегулируемые мутации. Для избежания мутаций следует не только соблюдать правила хранения и поддержания исходной культуры, но и периодически проводить пересев культуры и проверку ее однородности как по морфологическим, так и по физиологическим признакам.

Посевным материалом (инокулятом) называют чистую культуру микроорганизма, которую получают путем ее последовательного посева из пробирки в колбу, а затем в аппараты увеличивающегося объема до количества, необходимого для промышленного производства. Сначала чистую культуру размножают в лаборатории, затем в цехе чистых культур и инокуляции, далее направляют на культивирование. Приготовление посевного материала состоит из следующих стадий:

- 1) получение культуры микроорганизма в микробиологической лаборатории завода;
- 2) выращивание микроорганизмов в малом посевном аппарате;
- 3) выращивание микроорганизмов в большом посевном аппарате;
- 4) накопление культуры микроорганизмов в малом ферментере.

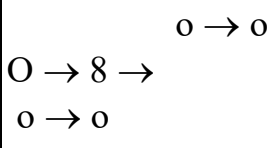
Передачу чистых культур из одного аппарата в другой осуществляют в конце логарифмической фазы роста. Качество полученного посевного материала контролируют путем микроскопирования.

В биотехнологии широко применяются плесневые грибы, дрожжи, актиномицеты (грамположительные бактерии, не образующие спор), бактерии и водоросли в виде чистых и смешанных культур. В традиционных процессах ферментации предпочтение обычно отдается смешанным культурам, а в большинстве современных ферментационных процессов – монокультурам (чистым культурам), выращиваемым в асептических условиях. Большинство используемых сегодня культур получено из природных источников, однако затем эти культуры были улучшены или путем выращивания в условиях, характерных для данного процесса (для повышения выхода биомассы и первичных метаболитов), или с помощью мутагенеза или генетической инженерии (для производства вторичных метаболитов).

Рост и размножение микроорганизмов

В росте клеток микроорганизмов различных видов имеются различия, представлены в табл.7.

Таблица 7. Рост и размножение микроорганизмов

Наименование	Тип размножения	Схема размножения	Примечание
Бактерии	Деление		Обе дочерние клетки одинаковы
Дрожжи	Почкование		Дочерняя клетка Материнская клетка со «шрамом»
Мицелиальные грибы	Удлинение и разветвление мицелия		Удлинение, разветвление

Контрольные вопросы

1. Какие организмы относятся к микроорганизмам?
2. Какие показатели важны при оценке продуктивности производственных культур и их пригодности для использования в заводских условиях?
3. Что характеризует способность данной культуры к быстрому накоплению биомассы?
4. Что означает термин «лабильность микроорганизма»?
5. Охарактеризуйте основные этапы производственной схемы получения биотехнологической продукции.
6. Какие среды используют для культивирования микробов?
7. Что называют культуральной жидкостью?
8. Каким требованиям должен соответствовать промышленный штамм?
9. Каково влияние условий среды на рост микроорганизмов?
10. Как происходит рост и размножение микроорганизмов различных видов?

4.2. Способы культивирования микроорганизмов

Ферментация (культивирование) – это вся совокупность последовательных операций от внесения в заранее подготовленную и термостатированную питательную среду посевного материала (инокулята) до завершения процессов роста и биосинтеза вследствие исчерпывания питательных веществ среды.

Методы ферментации представлены на рис. 17.

Процессы культивирования микроорганизмов различаются:

- по содержанию кислорода – на *аэробные* и *анаэробные*;
- количеству ферментов – на *одно-, двух-, и многостадийные*;
- наличию или отсутствию перемешивания – на *динамические* и *статические*;
- состоянию питательной среды – на *поверхностные* и *глубинные*.

При *поверхностном* культивировании посевной материал высевают на

поверхность питательной среды, распределенной небольшим слоем (около 10 см) в металлических кюветах.

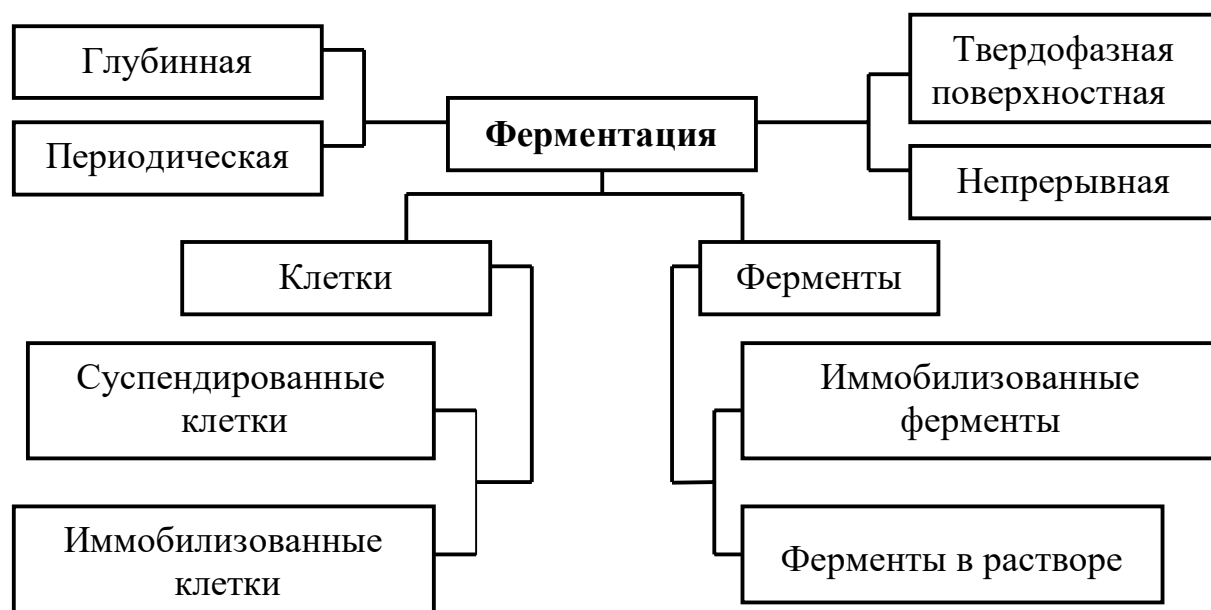


Рис. 17. Методы ферментации

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

Классификация процессов культивирования микроорганизмов по способу действия (периодический, непрерывный и промежуточные) представлена на рис. 18.

1.1. При *периодическом* способе культивирования стерильная питательная среда засеивается исходной культурой продуцента, и далее в этой же емкости микроорганизмы при определенных условиях проходят через все стадии роста и развития популяции. Когда процесс культивирования заканчивается, емкость для выращивания освобождают, и цикл возобновляется, начиная от засева питательной среды исходной культурой продуцента. При таком способе культивирования (его можно назвать «закрытой» системой, когда хотя бы один из компонентов не может поступать в нее или выводиться из нее) скорость роста биомассы всегда должна стремиться к нулю либо из-за недостатка питательных веществ, либо из-за накопления в среде токсических метаболитов.

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



Рис. 18. Классификация процессов культивирования микроорганизмов по способу действия

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

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

2. Промежуточные способы культивирования.

Продленный периодический процесс, как и периодический, предусматривает одноразовую загрузку и разгрузку ферментера. Однако цикл развития микроорганизмов в продленном периодическом процессе удлиняется либо за счет *подпитки* (периодического или непрерывного добавления питательной среды), либо за счет длительного удержания клеток в системе (диализная культура). В этом случае продлевается экспоненциальная фаза и фаза линейного роста. Суть процесса диализа заключается в том, что культура развивается в пространстве, ограниченном полупроницаемой мембраной, а продукты метаболизма диффундируют во внешний раствор. Наиболее простой диализный метод – культивирование в целлофановых мешках, погруженных в питательную среду.

Многоциклическими процессами культивирования называют такие, в которых цикл выращивания культуры повторяется многократно без многократной стерилизации емкости. Многоциклическое культивирование может быть различным. Его можно вести в одном ферментере, многократно повторяя полный цикл развития культуры без перерыва на стерилизацию. Способы, осуществляемые в одном ферментере, называют *одностадийными*. Возможны и *многостадийные* многоциклические процессы, основанные на принципе повторного и последовательного периодического культивирования, протекающего в нескольких ферментерах, соединенных в батарею, с целью длительного использования культуры. Один из вариантов такого способа заключается в следующем: культура выращивается в одном биореакторе и в то время, когда она проходит в своем развитии экспоненциальную фазу, из нее берется инокулят (посевной материал) для засева следующего реактора. В первом реакторе культура дорастивается до необходимой фазы роста. Когда культура во втором реакторе достигает экспоненциальной фазы, из нее также делается пересев в третий реактор и т.д. Поскольку культура все время пересеивается в экспоненциальной фазе, не происходит ее старения и вырождения. Кроме того, отмечается выигрыш во времени, так как одновременно работают несколько ферментеров.

Многоциклические процессы культивирования микроорганизмов применяют как для получения биомассы, так и для производства продуктов

микробного синтеза – антибиотиков, внеклеточных ферментов, аминокислот. Применение данного способа позволяет в несколько раз сократить затраты труда на производство продукта по сравнению с периодическим способом.

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

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

Гомогенные системы идеального смешения. В системе идеального смешения микроорганизмы растут в культуральной среде, постоянной по своему составу, и, следовательно, в каждый данный момент времени находятся в одном и том же физиологическом состоянии, то есть в состоянии установившегося динамического равновесия. По количеству ферментеров гомогенные системы могут быть одностадийными, двухстадийными и многостадийными.

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

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

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

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

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

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

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

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

В данной системе лимитирующим фактором для аэробных микробов являются кислород и субстрат (питательные вещества). В тонких пленках каждая из прикрепленных к поверхности клеток полностью обеспечена этими веществами и способна расти и размножаться с максимальной экспоненциальной скоростью. По мере того, как клетки образуют более

толстую пленку биомассы, рост их ограничивается (верхним слоям не хватает кислорода, нижним – питательных веществ).

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

Во-первых, появляется возможность длительной эксплуатации клеток в случае непрерывной ферментации.

Во-вторых, известны примеры повышения устойчивости клеток к действию различных неблагоприятных внешних факторов (температуры, кислотности, концентрации токсичных веществ и других) в результате иммобилизации.

В-третьих, существенно упрощаются процедуры выделения используемых клеток и культуральной жидкости, содержащей целевой продукт.

В-четвертых, благодаря применению иммобилизации обычно снижаются энергозатраты на процесс в целом: за счет уменьшения (а следовательно, и удешевления) размеров применяемых ферментеров; а также за счет упрощения процедур выделения и очистки конечного продукта.

В промышленной микробиологии системы твердожидкостного типа нашли применение при очистке сточных вод, в производстве органических растворителей и кислот и т.д.

Основные показатели процесса ферментации

Для оценки реального ферментационного процесса используют ряд кинетических показателей. Практически в ферментационной среде контролируют содержание основных субстратов S (обычно источник углеводов), биомассы X и целевого продукта P . По этим показателям вычисляют удельную скорость роста μ , продуктивность системы по биомассе Q_X и продукту Q_P , а также, при необходимости, экономические коэффициенты:

- удельная скорость роста, 1/ч:

$$\mu = \frac{x_1 - x_0}{x_1(t_1 - t_0)}; (1)$$

- продуктивность системы по биомассе Q_X , кг/ч:

$$Q_X = \frac{X_1 - X_0}{t_1 - t_0}; (2)$$

- продуктивность системы по продукту Q_P , кг/ч:

$$Q_P = \frac{P_1 - P_0}{t_1 - t_0}. (3)$$

Рост культуры можно охарактеризовать временем удвоения количества клеток или биомассы. Однако эти величины могут различаться, так как биомасса может увеличиваться и без деления клеток. Если в данных условиях

культивирования время удвоения биомассы и числа клеток не различается, следовательно, рост культуры происходит согласно экспоненциальной зависимости.

Для выращивания любой культуры необходимы:

- 1) жизнеспособный посевной материал;
- 2) источники энергии и углерода;
- 3) питательные вещества для синтеза биомассы;
- 4) отсутствие ингибиторов роста;

5) соответствующие физико-химические условия (температура, pH среды, наличие или отсутствие кислорода и др.).

Если все эти требования выполнены, то скорость роста (увеличения биомассы) одноклеточных микроорганизмов с бинарным делением, размножающихся в условиях хорошо перемешиваемой периодической культуры, будет пропорциональна концентрации микробной массы, то есть:

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \text{ или } \frac{dN}{dt} = \mu N, (4)$$

где N – количество клеток в 1 л среды;

dx / dt – скорость роста;

μ – коэффициент пропорциональности, обычно называемый удельной скоростью роста, 1/ч;

x – концентрация биомассы (на сухой вес).

Если μ является постоянной величиной, то такой рост культуры микроорганизмов называют экспоненциальным или логарифмическим. Он имеет место тогда, когда состав микробной биомассы и условия окружающей среды остаются постоянными. Это относится и к смешанным культурам, в которых одноклеточные организмы равномерно распределены в культуральной среде.

Время, необходимое для удвоения массы:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{0,693}{\mu} (5)$$

Размножение вирусов и фагов идет значительно быстрее, чем рост клеток, так как репликация происходит за счет ресурсов клетки хозяина.

Контрольные вопросы

1. Что такое ферментация?
2. По каким признакам различаются процессы культивирования микроорганизмов?
3. Какие существуют методы ферментации?
4. Каковы особенности поверхностного и глубинного культивирования?
5. Сравните поверхностный и глубинный способы культивирования микроорганизмов?

6. Как получают посевной материал?
7. Какие преимущества имеет использование иммобилизованных клеток?
8. Перечислите основные показатели процесса ферментации.
9. Какие условия необходимы для выращивания любой культуры?
10. Размножение вирусов или бактерий идет быстрее?

4.3. Культивирование животных и растительных клеток

Особенности культивирования животных клеток

Животные клетки используются для культивирования вирусов, при производстве вакцин, для получения интерферона и т.д.

Суспензию отдельных клеток получают обработкой размельченной ткани эмбриона пищеварительным ферментом трипсином. Если клеткам в такой суспензии дать осесть на плоскую поверхность в сосуде с питательной средой, то клетки становятся плоскими и делятся, образуя монослой. В обычной методике культивирования пользуются цилиндрическими бутылками, которые медленно вращаются вокруг своей длинной оси.

Рост клеток и выход биомассы можно увеличить, добавив к суспензии носитель – микроскопические гранулы из инертного синтетического полимера, на которых клетки закрепляются. Деление клеток млекопитающих происходит примерно раз в сутки (для сравнения – клетки дрожжей делятся каждые 1,5–2 ч, а бактериальные клетки – каждые 20–60 мин). Клетки млекопитающих нуждаются в многочисленных питательных веществах, поэтому в питательную среду следует добавлять смесь аминокислот, пуринов и пиримидинов для синтеза белков и нуклеиновых кислот, глюкозу в качестве источника углерода и энергии, витамины и минеральные соли для поддержания необходимого осмотического давления и значения рН, близкого к 7,2. Среда также должна содержать небольшие концентрации антибиотиков для подавления роста бактерий и 5–20 % сыворотки (из крови человека или из плода крупного рогатого скота). Для оптимального роста температуру культуры необходимо поддерживать около 37 °С, так как ниже 36 °С клетки либо делятся крайне медленно, либо не делятся вовсе; при температуре выше 38 °С погибают. Большинство культур клеток млекопитающих, в том числе и клеток человека, удается сохранять неопределенно долгое время замороженными в специальной среде при 180 °С.

Особенности культивирования растительных клеток

Культивирование растительных клеток в крупных масштабах было освоено в 1976 г. японскими исследователями, которым удалось получить растительную биомассу в объеме 20 м³. Получение массы растительных клеток обходится намного дороже, чем равное количество бактериальных или дрожжевых клеток. Поэтому ученые стараются избежать разрушения клеток с целью извлечения из них полезных для человека соединений. В связи с этим, растительные клетки иммобилизуют внутри пористых полимеров. Доказано, что в таком состоянии клетки удается поддерживать жизнеспособными в течение

нескольких сотен дней. Проблемой остается извлечение метаболитов в том случае, когда они синтезируются внутри клеток, а не выделяются в среду.

Культуры растительных клеток применяют для синтеза различных веществ: алкалоидов и других вторичных метаболитов, фитогормонов (регуляторов роста растений) и т.д.

Использование растительных клеток является перспективным направлением биотехнологии, так как клетки, растущие в культуре, способны синтезировать вещества, которые не обнаруживаются в целом растении.

Контрольные вопросы

1. Какие клетки используются для культивирования вирусов, при производстве вакцин, для получения интерферона и т.д.?
2. Укажите особенности культивирования животных клеток.
3. Перечислите особенности культивирования растительных клеток
4. Как получают суспензию животных клеток?
5. Какие питательные вещества следует добавлять в питательную среду для культивирования клеток млекопитающих?
6. С какой целью растительные клетки иммобилизуют внутри пористых полимеров?
7. Для синтеза каких веществ используют культуры растительных клеток?
8. В какой стране впервые было освоено культивирование растительных клеток в крупных масштабах?
9. Получение биомассы каких клеток обходится дороже: растительных, бактериальных или дрожжевых клеток?
10. В чем заключается основное преимущество культивирования растительных клеток?

4.4.Выделение и очистка целевого продукта

Стадия выделения продукта существенно зависит от того, накапливается продукт в клетках или выделяется в культуральную жидкость, или же продуктом является сама клеточная масса. Разделение биомассы и культуральной жидкости – сепарация – осуществляется несколькими методами.

Если целевым продуктом является биомасса клеток, применяют следующие методы выделения: отстаивание, фильтрация, флотирование, сепарирование и т.д. (механические способы); выпаривание и сушка (физические способы).

Фильтрация – простой и широко применяемый процесс разделения твердых частиц и жидкости, скорость которого зависит от пористости фильтрующего материала и давления. Фильтрование при помощи вакуумных насосов существенно ускоряет процесс.

Флотирование применимо для выделения дрожжевых клеток. Процесс

флотирования клеток осуществляется путем вспенивания культуральной жидкости. Вместе с пеной из культуральной жидкости удаляется и основная масса дрожжей.

Сепарирование осуществляют в сепараторах, в которых на клетки действует центробежная сила, отбрасывающая клетки к периферии сосуда, а культуральная жидкость будет собираться в центре сепаратора. Этот процесс протекает гораздо быстрее, чем отстаивание клеток под действием силы тяжести.

Если целевой продукт содержится в самих клетках, то проводят разрушение клеток – *дезинтеграцию* – физическими, химическими и ферментативными методами.

К физическим методам можно отнести разрушение клеток под действием ультразвука, замораживания-оттаивания, баллистическую дезинтеграцию. Баллистическая дезинтеграция клеток осуществляется в мельницах, куда помещают суспензию клеток и вспомогательные мелющие вещества: песок, стеклянные или полимерные шарики.

К химическим методам дезинтеграции относят разрушение клеток с помощью толуола, бутанола и других химических соединений.

При использовании ферментативной дезинтеграции клеток применяют ферменты, способные разрушать определенные структурные компоненты клеточных стенок микроорганизмов. Например, для разрушения бактериальных клеток применяют лизоцимы яиц, бактерий, актиномицетов или грибов. Для разрушения дрожжей и плесневых грибов используются фосфоманназа и бета-глюконаза или применяют автолиз. Автолиз – разрушение клеток дрожжей или плесневых грибов под действием собственных гидролитических ферментов. Для этого суспензию клеток инкубируют при 35–45 °С.

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

Осаждение в виде нерастворимых солей производят путем добавления химического осадителя в эквимольных количествах. Применяют при получении лимонной, молочной кислоты.

Экстракция – добавление к раствору экстрагента (растворителя), который поглощает целевой продукт. Затем эмульсию разделяют и выделяют целевое вещество. Используют при получении витаминов, антибиотиков.

Кристаллизация – после предварительной обработки культуральной жидкости и выпаривания при охлаждении осуществляют кристаллизацию. Данный метод выделения и очистки используется при получении глутаминовой, итаконовой и других кислот.

Затем выделенный продукт концентрируют центрифугированием, ультрафильтрацией, выпариванием или обратным осмосом.

Центрифугирование – расслоение раствора с частицами большей плотности на осадок и надосадочную жидкость при воздействии центробежной силы.

Ультрафильтрация – обработка раствора на мембранных фильтрах с определенным размером пор (то есть разделение веществ на фракции по размерам их молекул). Применяется для ферментов и других белков.

Очистка целевого продукта

Эта стадия необходима при получении очищенного целевого продукта, например, ферментных препаратов степени очистки более двукратной. Эта стадия приводит к росту себестоимости получаемого целевого продукта.

Для очистки ферментов применяют избирательную сорбцию (связывание) каолином, трифосфатом кальция, гидроксидом алюминия и другими адсорбентами. Таким образом проводят сорбцию либо фермента, либо балластных белков, которые затем разделяют центрифугированием. Фермент из сорбента отделяют раствором фосфатного буфера.

На последнем этапе продукт отделяют от примесей, концентрируют и стабилизируют. После стабилизации продукта в зависимости от того, каким должен быть конечный продукт: сухим или жидким, его обезвоживают или сразу упаковывают и отправляют на хранение и далее – потребителю.

Сырьевые ресурсы

Сырье, используемое для получения целевого продукта, должно быть недефицитным, недорогим, по возможности легкодоступным: меласса – побочный продукт производства сахара, компоненты нефти и природного газа, отходы сельского хозяйства, деревообрабатывающей и бумажной промышленности и т.д. Наиболее часто в качестве компонентов питательных сред используются отходы пищевых производств.

Свекловичная масса– отход производства сахара из свеклы, богата органическими и минеральными веществами, необходимыми для развития микроорганизмов. Она содержит 45–60 % сахарозы, 0,25–2,0 % инвертного сахара, 0,2–3,0 % рафинозы. Кроме того, в мелассе содержатся аминокислоты, органические кислоты и их соли, бетаин, минеральные вещества, а также некоторые витамины. Используется для промышленного производства лимонной кислоты, этанола и других продуктов.

Мелассная барда– отход мелассно-спиртового производства. Химический состав барды зависит от состава исходной мелассы и колеблется в широких пределах. По своему химическому составу мелассная барда является полноценным сырьем для производства кормовых дрожжей, не требующим добавок ростовых веществ, так как содержит достаточное количество витаминов. Содержание сухих веществ в натуральной барде – 8–12 %, в упаренной барде – 53 %.

Зернокартофельная барда– отход спиртового производства. Содержание растворимых сухих веществ обычно составляет 2,5–3,0 %, в том числе 0,2–0,5 % редуцирующих веществ, имеются источники азота и микроэлементы. Применяется для получения микробного белка.

Отходы пивоварения (пивная дробина и солодовые ростки), а также *отходы подработки насоложенного ячменя* являются подходящим, однако небольшим источником усвояемых углеводов для получения микробного белка. Для производства кормовых дрожжей это сырье соответствующим образом гидролизуют и вводят в питательную среду в соотношении 8 : 0,2 : 0,05 (дробина : ростки : отходы ячменя).

Пшеничные отруби – отход мукомольного производства, используется для приготовления питательных сред при твердофазном способе культивирования. Имеют богатый химический состав и могут использоваться в качестве единственного компонента питательной среды. Так как пшеничные отруби являются дорогим продуктом, их смешивают с более дешевыми компонентами: древесными опилками, солодовыми ростками, фруктовыми выжимками и т.д.

Молочная сыворотка – отход производства сыров, творога и казеина. В связи с этим различают подсырную, творожную и казеиновую сыворотку. По химическому составу и энергетической ценности данный продукт считают «полумолоком». Молочная сыворотка очень богата различными биологически активными соединениями, ее сухой остаток содержит в среднем 70–80 % лактозы, 7–15 % белковых веществ, 2–8 % жира, 8–10 % минеральных солей. Кроме того, молочная сыворотка имеет в своем составе значительное количество гормонов, органических кислот, витаминов и микроэлементов.

Наличие в молочной сыворотке легкоусвояемых многими видами микроорганизмов источников углерода, а также различных ростовых факторов, выдвигает ее в ряд наиболее ценных питательных сред для получения продуктов микробного синтеза, например, для производства белковых препаратов в промышленных масштабах. Большое значение имеет и то обстоятельство, что применение молочной сыворотки не требует специальной сложной подготовки, а культуральная жидкость после выращивания микроорганизмов может быть использована в пищевых и кормовых целях без обработки.

Каменный уголь, природный газ и древесина могут служить сырьем для химического синтеза технических спиртов или уксусной кислоты, которые являются отличным сырьем для микробиологической промышленности.

Из органического сырья наибольшее внимание биотехнологов привлекает крахмал, хотя для его ассимиляции микроорганизмами требуется сложный комплекс амилолитических ферментов, которыми владеют только некоторые виды микроорганизмов. Много крахмала расходуется для производства этанола, а также для изготовления фруктозных сиропов. Запасы крахмалосодержащего сырья в нашей стране ограничены, поэтому рекомендуется использовать для целей биотехнологии мелассу, глюкозное сырье, метанол и этанол.

При выборе сырья учитывают не только физиологические потребности выбранного продуцента, но и стоимость.

Контрольные вопросы

1. Какие методы выделения применяют в случаях, когда целевым продуктом является биомасса клеток?
2. Какие механические способы применяют для выделения биомассы клеток?
3. Какие физические способы применяют для выделения биомассы клеток?
4. Что представляет собой процесс фильтрования? От чего зависит его скорость?
5. Для каких клеток применимо флотирование? Как его осуществляют?
6. На каком физическом принципе основано сепарирование? Где в ходе этого процесса собирается культуральная жидкость?
7. Для чего проводят процесс дезинтеграции клеток? Какие методы при этом используют?
8. Перечислите физические, химические и ферментативные методы дезинтеграции клеток.
9. Что собой представляет процесс автолиза?
10. Какой метод выделения преимущественно используют при получении витаминов и антибиотиков?

4.5. Питательные среды для культивирования микроорганизмов

Для нормальной жизнедеятельности микроорганизмов питательная среда должна быть стерильной, содержать водный раствор или суспензию усвояемых форм углерода, азота, фосфора и других необходимых макро- и микроэлементов и иметь оптимальные значения температуры, рН, окислительно-восстановительного потенциала, осмотического давления и т. д. (табл.8). Отрицательные факторы задерживают рост и образование целевого продукта и даже вызывают отмирание части клеток.

Как правило, микроэлементы поступают в среду с водой, но при необходимости (при недостатке их в воде) они могут быть добавлены в нее.

Некоторым микроорганизмам необходимо наличие в составе питательной среды так называемых дополнительных факторов роста, главным образом витаминов. В качестве факторов роста применяют автолизаты и гидролизаты дрожжей и других микроорганизмов, кукурузный экстракт, отвары растительных отходов и т. д.

Состав питательной среды для каждого продуцента устанавливается экспериментально.

Таблица 8. Основные факторы среды, определяющие рост и биосинтетическую активность продуцентов

Фактор	Роль при культивировании	Методы управления
1	2	3
Состав и концентрация питательных веществ	Обеспечивают метаболизм	Составление оптимальной композиции; подпитка во время ферментации непрерывность процесса; многостадийность с учетом потребностей продуцента по фазам развития и др.
Концентрация продукта и ингибиторов	Замедляет биохимические реакции	Осаждение продукта по мере накопления; ферментация с диализом; ферментация под разрежением с испарением летучего продукта и др.
pH	Оптимизирует скорость биохимических реакций (пределы от 3,5 до 9,0)	Регулирование путем добавления кислоты или щелочи
Температура	Оптимизирует скорость биохимических реакций (обычно равна 20–70° С)	Охлаждение или подогрев культуральной жидкости при помощи теплообменников или температуры, подаваемых в биореактор субстратов
Осмотическое давление или активность воды	Определяет границы жизни (составляет 0,6 – 0,998)	Составление сред с оптимальной концентрацией питательных веществ или влажностью твердой среды; поддержание на постоянном уровне во время ферментации путем разбавления водой или добавления отдельных компонентов
Содержание растворенного кислорода	Для аэробов обеспечивает аэробный метаболизм; является акцептором H ⁺ ; ингибирует развитие микробов	Для аэробных процессов регулируют интенсивностью аэрации или добавлением к газовой смеси кислорода; при атмосферном давлении и 20 °С в литре среды растворяется 0,28 мл O ₂ . Анаэробные процессы реализуют в бескислородной среде, что достигается продуванием N ₂ и CO ₂ или добавками восстановителей (цистеина, аскорбиновой кислоты и др.)
Содержание диоксида углерода	Источник углерода для автотрофов, гетеротрофы некоторые нуждаются, а некоторые замедляют метаболизм в присутствии CO ₂	Продувание в фотосинтезирующих процессах ферментации газовой средой, обогащенной CO ₂ , выделению CO ₂ из жидкой фазы способствует перемешивание

1	2	3
Перемешивание среды	Равномерное распределение питательных веществ и биомассы по всему пространству среды	Организируют макро- и микроперемешивание в биореакторах при помощи механических мешалок, барботажных, циркуляционных и других систем. Аэрация способствует перемешиванию, а пенообразование – флотации продуцента; флокуляция способствует осаждению биомассы
Вязкость среды	Определяет диффузию питательных веществ и перемешивание клеток продуцента	Регулирование компонентами питания, характером и концентрацией биомассы, а также наличием некоторых полимерных экстрацеллюлярных продуктов. Вязкость влияет на перемешивание и аэрацию, для чего требуются специальные технические средства

По оптимальным для роста температурам, которые представлены на рис.19, микроорганизмы условно делят на психрофилы (1), мезофилы (2) и термофилы (3).

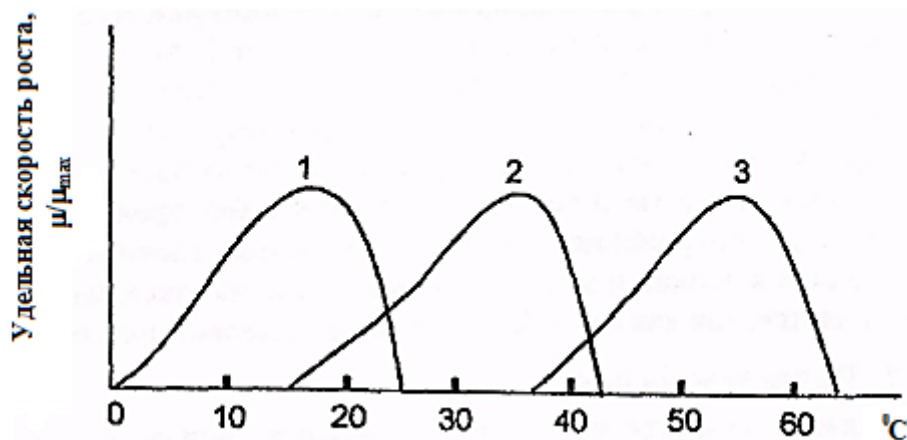


Рис. 19. Влияние температуры на удельную скорость роста микроорганизмов

В промышленности главным образом применяют мезофилы, имеющие оптимальную температуру около 30⁰С. В последнее время повышенный интерес вызывают термофилы, которые менее чувствительны к контаминации и обладают более высокими кинетическими характеристиками. Кроме того, термофилы продуцируют термостабильные вещества, главным образом ферменты.

Существенное влияние на рост культуры и образование продукта оказывает кислотно-щелочная реакция среды. Наиболее часто промышленные микроорганизмы культивируют при pH 4–8. Некоторые дрожжи и плесневые

грибы хорошо растут в кислой среде при рН 3–4, и это свойство можно использовать для борьбы с бактериальной инфекцией.

Состав питательных сред для биотехнологического производства

Питательные среды могут иметь неопределенный состав, то есть включать биогенные (растительные, животные, микробные) добавки – мясной экстракт, кукурузную муку, морские водоросли и т.д. Применяют также среды, приготовленные из чистых химических соединений в заранее определенных соотношениях - синтетические среды.

В состав практически любой питательной среды входят такие компоненты, как вода, соединения углерода, азота, фосфора и других минеральных веществ, витамины.

Вода. Вода должна отвечать требованиям ГОСТ (чистая, бесцветная, без привкуса, запаха и осадка).

Источники углерода. Легкодоступными считаются сахара: глюкоза, сахароза, лактоза, за ними следуют многоатомные спирты: глицерин, маннит и др. Далее следуют полисахариды: целлюлоза, гемицеллюлоза, крахмал, которые могут быть источниками углерода либо после превращения их в усвояемые микроорганизмами моно- и низкомолекулярные олигосахариды, либо микроорганизмы должны иметь набор ферментов, гидролизующих эти вещества. Такими микроорганизмами являются плесневые грибы родов *Aspergillus*, *Penicillium*, бактерии рода *Bacillus* и другие.

На практике встречается большое количество микроорганизмов, которые успешно утилизируют органические кислоты, особенно в анаэробных условиях.

Низкомолекулярные спирты: метанол и этанол относятся к числу перспективных видов сырья. Многие дрожжи родов *Candida*, *Hansenula* способны ассимилировать этанол. Дрожжи родов *Pichia*, *Candida*, бактерии рода *Flavobacterium* используют в качестве единственного источника углерода – метанол.

Некоторые виды микроорганизмов (незначительная часть) используют в качестве источника углерода и энергии – углеводороды: n-алканы и некоторые фракции нефти.

Источники азота. Азот может содержаться в форме неорганических солей или кислот. Большинство дрожжей хорошо усваивает аммиачные соли, а также аммиак из водного раствора, потребность в нитратах испытывают только некоторые виды дрожжей. Источником азота могут служить и органические соединения: аминокислоты, мочевины и т.д., которые легко усваиваются микроорганизмами.

Известно, что бактерии более требовательны к источникам азота, чем другие микроорганизмы (грибы, актиномицеты и дрожжи).

Источники фосфора. Фосфор является важнейшим компонентом клетки. Он входит в состав АТФ (аденозинтрифосфата), АДФ, АМФ и тем самым обеспечивает нормальное течение энергетического обмена в клетке, а также синтез белков, нуклеиновых кислот и другие процессы биосинтеза. Фосфор

вносят в среду в виде солей фосфорной кислоты.

Источники витаминов и микроэлементов. Потребность микроорганизмов в этих соединениях различна, тем не менее, практически все микроорганизмы лучше растут в присутствии витаминов. Эффективной добавкой к питательным средам оказался кукурузный экстракт благодаря наличию в нем витаминов, аминокислот и минеральных элементов в легкоассимилируемых формах. В рецептуры сред включают также дрожжевой автолизат, дрожжевой экстракт, сок картофеля, молочную сыворотку, экстракт солодовых ростков и другие продукты. Микроэлементы в состав питательных сред вводят в микродозах, в противном случае они оказывают ингибирующее действие на микробные клетки.

При составлении питательной среды для конкретного вида микроорганизма подбираются наиболее подходящие источники углерода, азота, фосфора и других веществ.

Питательные среды для биотехнологического производства

Питательная среда обеспечивает жизнедеятельность, рост, развитие биообъекта, эффективный синтез целевого продукта. Неотъемлемой частью питательной среды является вода, питательные вещества, которые образуют истинные растворы (минеральные соли, аминокислоты, карбоновые кислоты, спирты, альдегиды и т.д.) и коллоидные растворы (белки, липиды, неорганические соединения – гидроксид железа). Отдельные компоненты могут находиться в твердом агрегатном состоянии, могут всплывать, равномерно распределяться по всему объему в виде взвеси или образовывать придонный слой.

Приготовление питательной среды

Задача специалиста, оптимизирующего состав среды для конкретного вида микроорганизма, выбрать такие источники углерода, азота, фосфора и других веществ, которые наиболее оправданы в экономическом и экологическом отношении.

Принцип составления питательных сред.

Каждый конкретный вид микроорганизмов, используемых в биотехнологии, строго избирателен к питательным веществам. Потребность микроорганизма в тех или иных соединениях определяется физиологическими особенностями данного вида микроба, но во всех случаях среда должна быть водным раствором этих веществ и обеспечивать в определенном количестве их приток в клетку.

В самом приближенном виде физиологические потребности микроорганизма в питательных веществах можно выявить, определив химический состав микробной клетки. Однако в этом случае не учитываются количество и состав метаболитов, удаленных клеткой во внешнюю среду, и то обстоятельство, что состав клеточного вещества микроорганизма зависит от

состава среды обитания и варьирует в достаточно широких пределах. Но все же, первоначальную ориентировку в выборе оптимального состава питательной среды, исходя из состава клеточного вещества микроба, сделать можно.

Важнейшим условием приготовления питательных сред является соблюдение правил *септики*. Для обеззараживания питательных сред применяют, как известно, химическое воздействие (дезинфекцию), воздействие температуры и других физических факторов (ультразвука, ультрафиолетовых лучей, ультрафильтрации). Каждый из этих методов весьма избирателен. В биотехнологии широко применяют термические методы обеззараживания питательных сред (автоклавирование, стерилизацию, кипячение и др.). Споры микроорганизмов более устойчивы к высокой температуре, поэтому именно споры бактерий являются лимитирующим фактором, определяющим температурные режимы стерилизации сред.

Для стерилизации воздуха в случае аэробных процессов культивирования используют фильтрацию и ультрафиолетовое облучение.

4.6. Среда для культивирования микроорганизмов

Выращивание микроорганизмов на питательных средах называют *культивированием*, а развивающиеся в результате микроорганизмы – *культурой*. При развитии в жидкой среде культуры образуют суспензии, осадок или пленку, при развитии в плотной среде – колонии. Культура может быть чистой, т.е. содержит потомство клетки только одного вида, и накопительной, т.е. состоять преимущественно из клеток одного вида микроорганизмов.

Внесение клеток микроорганизмов или какого-либо исследуемого материала (образца почвы, пробы воды) в стерильную питательную среду для получения чистой или накопительной культур называют *посевом*. Перенесение уже выращенных клеток из одной среды в другую (стерильную) называют *пересевом*.

Бактерии выращивают на естественных и искусственных питательных средах. Естественные среды (молоко, сусло-агар, сиропы и др.) имеют несбалансированное соотношение компонентов, их состав полностью не изучен. Искусственные питательные среды включают вещества в строго определенных соотношениях с учетом потребностей данного вида в питательных веществах, ростовых добавках, солях и т.п.

Среды различаются в зависимости от консистенции, состава и назначения:

- по консистенции – плотные, полужидкие и жидкие;
- составу – простые, сложные органические и синтетические (искусственные);
- назначению – специальные, элективные и дифференциально-диагностические.

В качестве жидких сред используют мясо – пептонный бульон (МПБ), обезжиренное молоко, пивное сусло, дрожжевые среды, бобовый отвар (пептон – первый продукт гидролиза белка с высокой молекулярной массой).

Плотные питательные среды используют для учета количества бактерий, выделения чистой культуры и других целей. Такие среды готовят из жидких, добавляя гелеобразные вещества: 1,5–2,5 % агар-агара или 10–15 % желатина. При приготовлении полужидких сред вносят 0,1–0,2 % агар-агара. Так

получают мясопептонный агар, мясопептонный желатин, картофельный агар, сусло-агар.

Эти простые питательные среды применяют для выращивания многих бактерий.

Агар-агар– это растительный полисахарид, получаемый из некоторых морских водорослей.

Желатин– кислый азотсодержащий продукт, добываемый при выварке костей и хрящей.

Размножение бактерий в жидкой питательной среде. Бактерии, засеянные в определенный, не изменяющийся объем жидкой питательной среды, размножаясь, потребляют питательные элементы. Это в дальнейшем приводит к истощению питательной среды и прекращению роста бактерий. Культивирование бактерий в такой системе называют *периодическим*, а культуру – *периодической*. Если же условия культивирования поддерживаются путем непрерывной подачи свежей питательной среды и оттока такого же объема культуральной жидкости, то такое культивирование называется *непрерывным*, а культура – *непрерывной*.

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

Рост периодической культуры бактерий подразделяют на несколько фаз, представленных на рис. 19, или периодов: 1) лаг-фаза; 2) фаза логарифмического роста; 3) фаза стационарного роста, или максимальной концентрации бактерий; 4) фаза гибели бактерий.

Эти фазы можно изобразить графически в виде отрезков кривой размножения бактерий, отражающей зависимость логарифма числа живых клеток от времени их культивирования (рис.20).



Рис. 20. Фазы размножения бактерий

Лаг-фаза (от англ. *lag*–запаздывание) – период между посевом бактерий и началом их размножения. Продолжительность лаг-фазы составляет в среднем 4–5 ч. Бактерии при этом увеличиваются в размерах и готовятся к делению, активизируются ферменты, повышается количество нуклеиновых кислот, особенно РНК (что необходимо для синтеза белков), белка и других компонентов клетки.

Фаза логарифмического (экспоненциального) роста является периодом интенсивного деления бактерий продолжительностью около 5–6 ч. Клетки размножаются с максимальной для данной культуры скоростью (т.к. еще не действуют лимитирующие факторы). При оптимальных условиях роста бактерии могут делиться каждые 20–40 мин (*время генерации – интервал между делениями клетки*). Во время этой фазы бактерии наиболее ранимы, что объясняется высокой чувствительностью интенсивно растущей клетки к ингибиторам синтеза белка, нуклеиновых кислот и др.

Затем наступает *фаза стационарного роста*, при которой количество жизнеспособных клеток остается без изменений, составляя максимальный уровень (М-концентрация). Ее продолжительность выражается в часах и колеблется в зависимости от вида бактерий, особенностей их культивирования.

В ходе интенсивного роста и размножения внутри закрытой системы возрастает негативное влияние лимитирующих факторов: истощение источников питательной среды и накопление в ней продуктов метаболизма бактерий. Наступает *фаза гибели*, характеризующаяся отмиранием клеток. Продолжительность этой фазы колеблется от десятков часов до нескольких недель. Интенсивность роста и размножения бактерий зависит от многих факторов, в том числе от оптимального состава питательной среды, окислительно-восстановительного потенциала, рН, температуры и др.

Если к бактериям постоянно добавлять питательную среду и одновременно удалять продукты обмена, можно поддерживать бактериальную культуру в логарифмической фазе роста. Для этого применяют хемостат.

Методы обнаружения и выделения микроорганизмов

Обнаружение и выделение микроорганизмов производят при помощи сложных питательных сред трех видов: специальных, элективных и дифференциально-диагностических.

1. *Специальные питательные среды* используют для выявления свойств бактерий. Эти сложные питательные среды включают дополнительные компоненты – сыворотку крови (сывороточный агар), кровь (кровяной агар), сахар (сахарный бульон) и т.д., например, на кровяном агаре бактерии, продуцирующие гемолизин, образуют колонии с зоной гемолиза.

2. *Элективные (избирательные) среды* используют для выделения определенных видов бактерий. Например, элективной средой для стафилококков является желточно-солевой агар (ЖСА), для холерного вибриона – щелочной мясопептонный агар (МПА), для дифтерийной палочки – свернутая сыворотка.

Для выделения некоторых бактерий, рост которых может подавляться сопутствующими микробами, используют среды обогащения. Так, для выделения сальмонелл и шигелл из фекалий применяют селенитовый бульон, подавляющий рост сопутствующей микрофлоры – кишечной палочки.

3. *Дифференциально-диагностические среды* предназначены для дифференцирования бактерий (Гисса, Эндо, Левина, Плоскирева и др.). Они содержат индикатор, меняющий свой цвет при изменении рН в результате расщепления ферментами углеводов питательных сред.

Имеются питательные среды, сочетающие свойства дифференциально-диагностических и других питательных сред. Так, с помощью среды Плоскирева (как и среды Эндо) можно отличить кишечную палочку от дизентерийной по их действию на лактозу. Кишечная палочка, расщепляя лактозу с кислотообразованием, при росте дает колонии красного цвета (цвет индикатора) в отличие от дизентерийной палочки, не расщепляющей лактозу.

Наличие же в среде Плоскирева солей желчных кислот способствует преимущественному росту дизентерийной палочки, а бриллиантового зеленого – ведет к подавлению сопутствующих грамположительных бактерий.

Большинство патогенных и условно-патогенных бактерий растет в термостате при температуре 37 °С. Рост на питательных средах обычно учитывают через сутки после посева. Рост некоторых возбудителей (туберкулеза, бруцеллеза) становится видимым через 15–30 дней. Скорость роста бактерий зависит от их биологических свойств и условий культивирования (температура, наличие или отсутствие кислорода, углекислого газа, давление и др.). Аэрация способствует ускоренному росту аэробов. С этой целью используют шюттель-аппараты («встряхиватели»). Для культивирования анаэробов применяют специальные питательные среды (среда Китта–Тароцци, тиогликолевая среда, связывающие кислород), которые перед посевом кипятят для удаления растворенного кислорода.

Применяют также физические, химические и биологические методы культивирования анаэробов. *Физический метод* заключается в удалении из аппарата или эксикатора воздуха и замене его газовой бескислородной смесью. *Химический метод* основан на применении химических поглотителей кислорода. *Биологический метод Фортнера* предусматривает одновременный посев на одну половину чашки Петри аэробных и на другую половину – анаэробных бактерий, после чего чашку с посевом герметизируют парафином. При этом аэробы, используя при своем росте кислород, создают условия для дальнейшего роста анаэробов.

Выросшие на питательных средах бактерии идентифицируют по типу колоний на твердых питательных средах и характеру роста на жидких питательных средах. На жидких средах бактерии образуют пленку на поверхности среды, наблюдается придонный рост или равномерное помутнение среды.

Выделение чистых культур бактерий

Объекты окружающей среды, включая и материал от больного (гной, мокрота, фекалии и др.), обычно содержат смесь различных микробов. С целью их

обнаружения и определения видовой принадлежности (идентификации) применяют *бактериологическое исследование* (бактериологический метод), которое заключается в посеве проб исследуемого материала на питательные среды для получения (выделения) чистой культуры.

Для выделения чистой культуры, которое производят поэтапно в течение нескольких дней, в начале его используют механическое разобщение бактерий на плотных питательных средах (посев штрихом, шпателем на несколько чашек Петри и др.). На следующий день получают отдельные изолированные колонии. *Колония* – скопление бактерий, ведущее начало от одной клетки, а поэтому представляющее собой чистую культуру.

После описания культуральных свойств различных типов колоний (размер, цвет, форма, края и др.), выросших на чашке с плотной питательной средой, делают пересев из каждого типа колоний на скошенный агар для накопления чистой культуры. Выросшую на 3-й день чистую культуру (после проверки ее чистоты путем микроскопирования) начинают идентифицировать по различным свойствам — морфологическим, *тинкториальным*, ферментативным, антигенным и др.

Существуют способы выделения чистых культур, основанные на обработке исследуемого материала с помощью физических или химических факторов, обладающих избирательным действием на определенные бактерии. Для выделения чистых культур используют также способность некоторых бактерий быстро размножаться в организме восприимчивых к ним лабораторных животных.

При выделении чистых культур анаэробов посева исследуемого материала производят в анаэробных условиях на специальные среды с пониженным редокс-потенциалом, а также используют специальные аппараты (например, анаэростаты), исключающие доступ свободного кислорода к растущей культуре.

Контрольные вопросы

1. Перечислите основные факторы среды, определяющие рост и биосинтетическую активность продуцентов.
2. Как влияет температура на удельную скорость роста микроорганизмов?
3. Охарактеризуйте состав питательных сред для биотехнологического производства.
4. Перечислите компоненты питательных сред, являющиеся источниками азота, фосфора, витаминов и микроэлементов.
5. Укажите принципы составления питательных сред.
6. Как можно выявить физиологические потребности микроорганизма в питательных веществах?
7. Соблюдение каких правил является важнейшим условием приготовления питательных сред?
8. Какие применяют способы обеззараживания питательных сред?

9. Что является лимитирующим фактором, определяющим температурные режимы стерилизации сред?
10. Какие фазы роста периодической культуры бактерий можно выделить? Охарактеризуйте их.

4.7. Принципы непрерывного культивирования: хемостат, турбидостат

Непрерывные процессы имеют значительные преимущества перед периодическими: возможность специализации аппаратуры для каждой стадии непрерывного процесса, стабилизации его во времени, улучшение качества продукции, легкость регулировки и, главное, возможность автоматизации. Этими преимуществами объясняется тенденция в биотехнологии к переходу от периодических процессов к непрерывным.

Принцип непрерывного (проточного) культивирования микробов состоит в том, что в сосуд, где размножаются микроорганизмы, непрерывно подается свежая питательная среда и одновременно втекает такой же объем культуры. По такому принципу организуются две разновидности технического процесса непрерывного культивирования: процесс (технология) полного вытеснения и технология полного смещения.

Существует много способов непрерывного культивирования микроорганизмов, но в биопромышленности в основном применяются два типа:

- хемостатный, при котором состояние равновесия или стационарное состояние достигается путем регулирования поступления лимитирующих рост субстратов;
- турбидостатный, при котором состояние равновесия или стационарное состояние культуры достигается путем удаления биомассы и замещения её свежей средой со скоростью, равной скорости роста культуры.

Хемостат в отличие от турбидостата позволяет с высокой скоростью регулировать условия лимитирования роста (субстратное лимитирование), тогда как турбидостат предпочтительнее для изучения микроорганизмов в условиях, близких к максимальной удельной скорости роста.

1. Хемостатный способ культивирования

Хемостатное культивирование основано на том, что в простейшей форме рост бактерий можно предоставить как совокупность реакций, в которых скорость роста культуры определяется самой медленной реакцией метаболизма. Хотя в растущей культуре осуществляется метаболизм многих питательных веществ, скорость роста культуры в любой момент времени определяется скоростью метаболизма лишь одного питательного субстрата. Тот субстрат или тот компонент питательной среды, метаболизм которого осуществляется медленнее всего и который таким образом определяет скорость роста бактериальной культуры, принято называть лимитирующим фактором.

Скорость роста культуры зависит от концентрации лимитирующего субстрата. Эту зависимость установил Моно и выразил её следующей формулой:

$$\mu = \mu_{MAX} \frac{S}{S+K_s}, (6)$$

где μ – удельная скорость роста;

μ_{MAX} – максимально возможная скорость роста в данной среде;

S – концентрация лимитирующего субстрата в среде;

K_s – константа Моно или константа насыщения. Она численно равна концентрации лимитирующего субстрата, замедляющей вдвое μ_{MAX} (т.е. равна S при $\mu = \mu_{MAX}$).

Совершенно очевидно, что концентрация лимитирующего фактора или субстрата в среде ограничивает и концентрацию вырастающей биомассы. В случае полного использования лимитирующего фактора рост и размножение бактериальных клеток прекращают. Концентрация биомассы в ферменте в стационарном состоянии культуры определяется по формуле:

$$X = \frac{y}{S_0 - S}, (7)$$

где y – экономический коэффициент, или доля потребленного субстрата, пошедшего на синтез биомассы;

S_0 – концентрация субстрата в поступающей среде;

S – концентрация субстрата в ферментере.

Концентрацию субстрата в ферментере в стационарном состоянии культуры определяют по формуле:

$$S = \frac{K_s - D}{\mu_{MAX} - D}, (8)$$

где K_s – константа Моно;

D – коэффициент разбавления или скорость разбавления;

S – концентрация субстрата в ферментере;

μ_{MAX} – максимально возможная скорость роста.

Скорость разбавления, или коэффициент разбавления (D), при хемотропном культивировании известен. Он равен:

$$D = \frac{F}{V}, (9)$$

где F – скорость потока;

V – объем культуры.

Величина, обратная скорости разбавления, характеризует время полной замены имеющейся в ферменте среды новой или, что одно и то же, время пребывания в ферментере каждого компонента питательной среды:

$$t = \frac{V}{F}. (10)$$

Таким образом, следует рассматривать количественные зависимости, существующие между:

- концентрацией биомассы – X ;

- концентрацией лимитирующего субстрата – S;
- скоростью роста – μ .

Причем, если вести дельнейшее увеличение скорости разбавления, то концентрация (X) стремится к 0, т.е. при некотором значении D биомасса полностью вымывается из фермента. Эту скорость разбавления назначают критической ($D_{кр}$) или скоростью вымывания клеток. Теоретически $D_{кр} = \mu_{max}$

Но поскольку концентрация лимитирующего субстрата в аппарате (S) не может быть больше концентрации его в поступающей среде (S_0), то:

$$D_{кр} = \mu_{MAX} \frac{S_0}{S_0 + K_1}, (11)$$

Производительность фермента по выходу (урожаю) биомассы рассчитывают следующим образом:

$$R = DX. (12)$$

Зная основные константы K_s , μ_{max} и u можно легко рассчитать параметры культуры (X) и для любого значения при $\mu = D$.

Итак, хемостатное культивирование – это вариант непрерывного проточного культивирования с заданным желаемым коэффициентом разбавления (D), к которому подстраивается скорость роста культур μ . Последняя может быть минимальной или близкой к максимальной. При этом задается также фактор (лимитирующий фактор, лимитирующий субстрат, или компонент питательной среды), который обуславливает ограничение концентрации биомассы. Концентрация биомассы определяется одним определенным компонентом питания.

Хемостатный метод культивирования незаменим в лабораторных исследованиях физиологии микроорганизмов и клеток тканей. В промышленности он применяется при наращивании микробной биомассы, если известно, какой именно фактор ограничивает рост.

2. Турбидостатный способ культивирования.

Турбидостат представляет собой самую простую из всех хорошо перемешиваемых систем непрерывного культивирования. Концентрация клеток при турбидостатном культивировании регулируется постоянной подстройкой скорости поступления питательных компонентов. В отличие от хемостата концентрацию биомассы в турбидостате выбирает оператор, а скорость разбавления и соответственно концентрация субстратов поддерживаются таким образом, чтобы сохранялся заданный уровень биомассы.

Турбидостатное культивирование осуществляют обычно в тех случаях, когда лимитирующий фактор не известен или в лимитирующих количествах субстрата нет необходимости. Поэтому субстрат добавляется в ферментер в избытке. Избыток концентрации всех компонентов питательной среды делает работу турбидостата стабильной даже при удельной скорости роста культуры, близкой к максимальной (μ_{max}). Турбидостат позволяет регулировать систему в

широких интервалах концентраций биомассы при скорости разбавления, близкой к критической ($D_{кр}$). Именно в этих условиях хеостат менее стабилен.

Скорость разбавления в турбидостате всегда равна удельной скорости роста:

$$D = \frac{F}{V} = \mu(13)$$

при условии $X = \text{const}$.

В свою очередь, постоянство концентрации микробной биомассы удерживают регуляцией скорости потока, которую осуществляет не оператор, а автоматическая система. В большинстве случаев с этой целью прибегают к прямому оптическому измерению мутности биомассы, которая зависит от концентрации клеток (X).

Для этого ферментер оснащают фотоэлектроколориметром или аналогичным ему устройством, работающим по принципу светорассеивания. Если концентрация клеток остается на нужном уровне, питательная среда подается с заданной скоростью, а при снижении концентрации клеток подача питательной среды прекращается. Именно этот принцип работы турбидостата обеспечивает его устойчивую работу даже при коэффициенте разбавления, близком к критическому – на границе вымывания клеток.

Сигналом для подачи среды может быть не только оптическая плотность (мутность), но и любой параметр среды, поддающийся измерению электродом или другим устройством, переводящим величину измерительного параметра в величину электрического потенциала. Последний усиливается и приводит в действие работу насоса, подающего раствор или питательную среду.

Поскольку основные метаболические функции (поглощение бактериями кислорода, выделение CO_2 , изменение рН) тесно связаны со скоростью роста клеток и в конечном счете с удельной скоростью роста культуры, именно эти показатели чаще других используют как измеряемые переменные при регулировке потока среды.

Например, для процессов культивирования, имеющих прямую связь между приростом биомассы и изменением значения рН среды, используется рН-статный способ управления скоростью потока среды. Скорость потока с помощью автоматических устройств уравнивается со скоростью изменения рН растущей популяции, а следовательно, и со скоростью роста культур. Это обеспечивает поддержание рН на заданном уровне, а скорость роста является максимальной в данных условиях. Изменяя условия, можно проследить за соответствующими изменениями максимальной скорости роста культур. В последнее время в эксплуатацию вводятся сложные комплексы ферментер-ЭВМ, обеспечивающие более высокий уровень использования турбидостатного способа непрерывного культивирования.

Как хеостатное, так и турбидостатное культивирование имеют большое количество вариантов. Например, тот и другой способы могут осуществляться одностадийно и двухстадийно. Одностадийное культивирование означает, что

процесс ведется в одной емкости (в одном ферментере), а двухстадийное – в двух последовательных ферментерах.

Одностадийное хемостатное культивирование применяется при необходимости воспроизвести любую скорость роста культур, кроме максимальной. Двухстадийное культивирование в двух последовательных ферментерах позволяет обеспечивать культуры максимальной скоростью роста и даже создать условия для ее превышения. Для этого в первом ферментере ведется культивирование при $D < \mu_{\max}$, а во второй подается культура из первого и добавляется свежая питательная среда. При этом во втором ферментере происходит повышение скорости потока вплоть до превышения μ_{\max} , а вымывание не происходит, т.к. из первого ферментера непрерывно поступает культура.

Одностадийное турбидостатное культивирование используют для получения максимальной скорости роста. При двухстадийном культивировании можно воспроизвести во втором ферменте вторую фазу роста периодической культуры – вернее фазу роста, связанную с синтезом вторичного продукта метаболизма. В первом ферментере ведется выращивание культуры при большой скорости роста, что соответствует фазе логарифмического роста периодической культуры. Вторым ферментер берется большего размера или с содержанием значительно большего количества питательной среды. Поэтому поступающая из первого ферментера культура оказывается в условиях замедленного роста, соответствующего скорости роста периодической культуры в фазу стационарного максимума. Именно эта скорость и является оптимальной для синтеза вторичного продукта.

При низких концентрациях субстрата и при низкой концентрации клеток можно вернуть в ферментер часть вытекающей из него биомассы, возврат повышает концентрацию и ускоряет процесс. Вариантов возврата биомассы может быть несколько. Сепарируют вытекающую культуру и сгущенную часть возвращают в ферментер. Устанавливают различные фильтрующие устройства, позволяющие вытекать культуральной жидкости, но задерживающие клетки. Известны и другие методы культивирования.

Отъемно-доливной метод. Среда подается в проточный ферментер порциями. Отъем культуры также производится порциями или происходит постоянный слив. Кривая концентрации клеток при данном способе приобретает вид гребенки.

Многочисленное выращивание без стерилизации. Применяется в практике наращивания патогенных бактерий для получения вакцин или других биопрепаратов. Из ферментера после окончания цикла роста сливается не вся культура, а оставляется небольшая её часть. К ней добавляется стерильная среда, и цикл наращивания биомассы повторяется. Так проводят несколько циклов.

Продленная периодическая культура или метод подпитки. К периодической культуре добавляют свежую питательную среду по мере её

истощения. Культура продолжает свой быстрый рост, который идет с постоянной скоростью до полного исчерпания всех компонентов питания.

Диализное культивирование. Культивирование ведут в гильзе, не проницаемой для клеток, но пропускающей растворенные вещества. Гильза с культурой помещается в проточную питательную среду. Из среды поступают компоненты питания и в неё же выносятся продукты метаболизма. Таким путем получают сильно концентрируемую биомассу.

Контрольные вопросы

1. Укажите преимущества непрерывных процессов перед периодическими.
2. На чем основан принцип непрерывного (проточного) культивирования микробов?
3. Как организуются две разновидности технического процесса непрерывного культивирования: технологии полного вытеснения и полного смещения?
4. В чем заключается термостатный метод? В каком случае он предпочтительнее?
5. В чем состоит турбидостатный метод? В каком случае он предпочтительнее?
6. Как называют субстрат или компонент питательной среды, метаболизм которого осуществляется медленнее всего и который, таким образом, определяет скорость роста бактериальной культуры при хемостатном культивировании?
7. Как скорость роста культуры зависит от концентрации лимитирующего субстрата при хемостатном культивировании? Чьим именем названа эта зависимость?
8. Что происходит с ростом и размножением бактериальных клеток в случае полного использования лимитирующего фактора при хемостатном культивировании?
9. Что делает работу турбидостата стабильной даже при удельной скорости роста культуры, близкой к максимальной?
10. Для чего ферментер оснащают фотоэлектроколориметром или аналогичным ему устройством, работающим по принципу светорассеяния?

Список рекомендуемой литературы

1. Егорова, Т. А. Основы биотехнологии: учеб. пособие для вузов по специальности "Биология" /Т.А. Егорова.– 2-е изд., стер. –М.: Академия, 2005. – 208 с. (Высшее профессиональное образование). –Библиогр.: с. 205–206. – ISBN 5-7695-1967-3.
2. Рогов, И. А. Пищевая биотехнология. учеб. для вузов по специальности "Пищевая биотехнология". В 4 кн.Кн. 1. Основы пищевой биотехнологии / И.А. Рогов–М.:КолосС, 2004. – 440 с.: ил. (Учебники и учебные пособия для студентов высших учебных заведений). – Библиогр.: с. 431–432. – ISBN 5-9532-0104-4.
3. Бирюков, В. В. Основы промышленной биотехнологии: учеб. пособие для вузов по специальностям "Охрана окружающей среды и рациональное использование природных ресурсов" и "Машины и аппараты хим. пр-в" /В.В. Бирюков.–М.: КолосС: Химия, 2004. – 296 с. : ил. (Для высшей школы). – Библиогр. : с. 295. – ISBN 5-9532-0231-8 9 ("КолосС"). – ISBN 5-98109-008-1 (АНО "Химия").
4. Иванова, Л. А. Пищевая биотехнология : учеб. пособие для вузов по специальности 240902 "Пищевая биотехнология" Переработка растительного сырья / Л.А. Иванова; под ред. И. М. Грачевой. – М. : КолосС, 2008. – 472 с. : ил. (Учебники и учебные пособия для студентов высших учебных заведений). – Библиогр. : с. 467. – ISBN 978-5-9532-0489-7.
5. Шмид, Р. Наглядная биотехнология и генетическая инженерия / Р. Шмид; пер. с нем. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний.–2014.–325 с.: ил.–ISBN 978-5-94774-767-6.

Учебное издание

НайденкоЕкатерина Викторовна

НикифороваТатьяна Евгеньевна

МакаровСергей Васильевич

ВВЕДЕНИЕ В БИОТЕХНОЛОГИЮ

Учебное пособие

Редактор О.А.Соловьева

Подписано в печать 20.02.2019. Формат 60x84 1/16. Бумага писчая.

Усл. печ. л. 6,28.

Тираж 50 экз. Заказ

ФГБОУ ВО «Ивановский государственный
химико-технологический университет»

Отпечатано на полиграфическом оборудовании
редакционно-издательского центра ФГБОУ ВО «ИГХТУ»
153000, г. Иваново, Шереметевский пр., 7