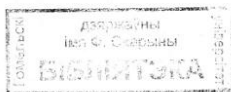


Министерство образования Республики Беларусь
Гомельский государственный университет им. Ф.Скорины
Кафедра ботаники и физиологии растений

ВВЕДЕНИЕ В БИОТЕХНОЛОГИЮ

*Конспект лекций по одноименному курсу
для студентов специальности Н.04.01.(01.09) -
"БИОЛОГИЯ"*



Минск 1997

Составитель *В.В.Валетов*

Рекомендовано к печати методическим советом биологического факультета Гомельского государственного университета им. Ф.Скорины.

ВВЕДЕНИЕ

Биотехнология - одна из древнейших сфер деятельности человека. Использование биотехнологических принципов и биологических процессов в производстве может существенно изменить многие направления развития промышленности и сельского хозяйства. Интерес к этой науке и отрасли человеческой деятельности в последние годы растет очень быстро.

Что же представляет собой современная биотехнология?

Биотехнология - это междисциплинарная наука и отрасль производства, которая базируется на использовании биологических объектов и систем в получении пищевых продуктов, энергии, медицинских препаратов; при очистке сточных вод, переработке отходов и др.

Возможность применения биологических систем и биотехнологии определяется их уникальностью в отношении "узнавания" и катализа, а также способностью ферментов катализировать широкий спектр реакций в мягких условиях (небольшой температуре и давлении).

Междисциплинарная природа биотехнологии выражается в ее связи с такими науками и обусловленности такими отраслями, как: генетика, микробиология, электроника, биохимическая и химическая технология, механика систем и аппаратов катализа.

На развитие биотехнологии существенное влияние оказывают открытия в области биокатализа ферментов, иммунологии, технологии ферментации, биоэлектрохимии.

В наши дни особенность развития многих перспективных на-

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ

правления биотехнологии в значительной степени определяется необходимостью тесного международного сотрудничества.

Большое значение биотехнологии в современном обществе обуславливает всестороннее изучение ее методов и принципов реализации, а также перспектив развития.

1. СТАНОВЛЕНИЕ И ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ РАЗВИТИЯ БИОТЕХНОЛОГИИ

В конце XIX в. трудами Л.Пастера были созданы реальные предпосылки для развития прикладной (технологичной) микробиологии, а также в значительной мере и биотехнологии.

Л.Пастер установил, что микроорганизмы играют ключевую роль в процессах брожения и показал их роль в получении отдельных продуктов. Его исследования послужили основой развития производства органических растворителей.

На первом этапе становления современной биотехнологии для получения различных химических веществ использовалась преимущественно биомасса, т.е. возобновляемый источник сырья. По мере развития нефтехимической промышленности на смену биомассе в ряде случаев для производства в биотехнологическом процессе стали использовать продукты переработки нефти.

Развитие современной биотехнологии связано с разработкой и совершенствованием ряда процессов, к которым относятся:

- 1) новые методы селекции микроорганизмов;
- 2) получение органических кислот и использование ферментов в составе мощных средств;
- 3) крупномасштабное производство этанола, как жидкого топлива;
- 4) использование белка одноклеточных;
- 5) применение ферментов при медицинской диагностике;
- 6) выщелачивание руд и контроль биоразложения.

Благодаря расширению сферы применения биотехнология делает весомый вклад в повышение уровня и качества жизни. Быстрее всего ее применение может дать результаты в медицине, сельском хозяйстве, промышленности, энергетике, производстве пищевых продуктов и переработке отходов производств.

4

2. ПОДГОТОВКА БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ. ПОДБОР ОБЪЕКТОВ. ГЕННАЯ И КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

Главное звено биотехнологического процесса - клетка. Начальным этапом биотехнологической разработки является получение чистых культур клеток и тканей. При отборе продуцентов главным критерием является целевой продукт. Кроме того, биообъект должен обладать следующими качествами:

- 1) высокая скорость роста;
- 2) использование для своей жизнедеятельности дешевых природных ресурсов;
- 3) устойчивость к заражению посторонними организмами.

Основной интерес, как объекты биотехнических процессов, представляют микроорганизмы. Одноклеточные организмы характеризуются более высокими скоростями процессов синтеза, чем высшие формы живого. Выгодным объектом являются фототрофные и термофильные микроорганизмы. Они могут быть продуцентами аммиака, водорода, белка, спиртов, аминокислот, ферментов.

Выделение и подбор объекта не обеспечивает получение высоко активных продуцентов. Возникает задача изменения свойств организмов в нужном направлении. Для этого используют методы селекции - направленный отбор мутантов. Значительные результаты получают с помощью индивидуального мутагенеза.

Однако основной путь направленной модификации биообъекта связан с генной инженерией. Различают генную, хромосомную и геномную инженерии. Работы в области генной инженерии включают четыре основных этапа:

- 1) получение нужного гена;
 - 2) встраивание гена в генетический элемент (вектор), способный к репликации;
 - 3) введение гена в организм реципиента;
 - 4) селекция клеток, которые приобрели желаемый ген (гены).
- Получение необходимых генов:
- 1) выделение из ДНК;
 - 2) путем химико-ферментативного синтеза;

5

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ

3) воссозданием на основе изолированной матричной РНК.

Перенос гена в клетку осуществляется с помощью векторов (Vector - несущий). Векторы - это преимущественно кольцевые молекулы, способные к самостоятельной репликации. Ген вместе с вектором образует рекомбинантную ДНК. Различают два основных класса векторов:

- вирусы;
- плазмиды.

Большое значение для биотехнологии имеет способность вирусов быстро проникать в клетки, что дает возможность генетической модификации клеток. Плазмиды - это автономные самореплицирующиеся генетические единицы. Это внехромосомные генетические системы.

Большинство наследственных признаков кодируется несколькими генами, следовательно, генноинженерная разработка должна включать стадии последовательной трансплантации каждого из генов.

В настоящее время генетическая инженерия охватила царство всего живого. Фенотипическое выражение встроенных генов получено не только у бактерий, но и у дрожжей, растений, животных.

Основные проблемы на пути конструирования микроорганизмов с заданными свойствами сводятся к следующему:

- 1) продукты генов, попадая в нужную для них внутриклеточную среду, могут быстро разрушаться ферментными системами;
- 2) в ряде случаев продукт трансплантируемого гена не высвобождается в культуральную жидкость, а накапливается внутри клетки.

Большой интерес вызывает генетическая инженерия растений, которая осуществляется на клеточном, тканевом и организменном уровнях. Магистральные пути ее развития включают:

- 1) повышение эффективности фотосинтеза;
- 2) обогащение дополнительными питательными веществами с помощью генов, взятых у других растений;
- 3) изменение азотного обмена;
- 4) придание устойчивости к гербицидам и другим неблагоприятным факторам среды.

Генетическая инженерия растений включает манипуляции не только с геномом ядра, но и хлоропластов, митохондрий. Манипуляции со структурой белков в результате модификации кодирующих их генов составляет суть белковой инженерии.

В биотехнологии представляет интерес клеточная инженерия. Ее основой является гибридизация соматических клеток - слияние неполовых клеток.

Соматическая гибридизация в сравнении с генной инженерией имеет более широкие возможности в аспекте скрещивания филогенетически отдаленных организмов, получения асимметричных гибридов (полный набор генов одного из родителей и частичный другого), получения гибридов путем слияния трех и более родительских клеток, гибридизации клеток, несущих различные программы развития. В последнем случае появляются гибридомы (слияние нормальной клетки со злокачественной). Получение гибридом - весьма перспективное направление клеточной инженерии. Основная ее цель - "обессмертить" клетку, продуцирующую ценные вещества.

Актуальным в биотехнологии является сохранение ценных штаммов продуцентов. Для этого применяют следующие способы:

- 1) лиофильное высушивание (обезвоживание под вакуумом после замораживания);
- 2) высушивание на воздухе в песке на активированном угле;
- 3) сохранение спор (для спорообразующих организмов);
- 4) криоконсервация - глубокое замораживание клеток и хранение их в жидком азоте (-196°C).

Серьезной проблемой является утрата ценных свойств биологического объекта при переводе его в биореактор. Значительные трудности при культивировании клеток вызывает попадание в биореактор посторонней микрофлоры.

Актуальным следует считать изучение свойств и динамики развития клеточной популяции с целью создания научно обоснованного метода их поддержания в высокоэффективном состоянии.

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ

3. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ БИООБЪЕКТА

На этапе культивирования биообъекта биотехнология тесно смыкается с экономикой, что находит отражение в основных принципах этого этапа:

1) экономическая обоснованность (внедрение биотехнологии в те процессы, которые не могут быть эффективно реализованы иными средствами и с наименьшими затратами);

2) целесообразность уровня технологических разработок (масштаб производства следует соотносить с необходимостью в производстве продукта);

3) научная обоснованность биотехнологического процесса (проведение расчетов параметров среды, конструкции биореакторов и режима работы);

4) удешевление производства.

Эффективный синтез целевого продукта обеспечивается в значительной степени особенностями питательной среды. Важнейшей частью питательной среды является вода. Питательные вещества образуют в среде истинные или коллоидные растворы. Отдельные компоненты могут находиться в твердом состоянии - они могут всплывать на поверхность раствора (частицы угля, серы), образовывать осадки, распределяться по объему в виде взвеси.

При твердофазном культивировании вода только увлажняет твердую поверхность субстрата.

Питательные среды могут иметь различный состав: неопределенный (биогенные добавки, химические соединения и др.);

синтетический (из чистых химических соединений). Целесообразно употребление природного материала.

Питательные среды для автотрофов могут не содержать органических веществ. Простые среды - для культивирования цианобактерий. Источником энергии служит свет, углерода - CO₂, азота - азот атмосферного воздуха. Происходит освоение газообразных питательных сред (наряду с твердо- и жидкофазным культивированием).

Биотехнологический процесс осуществляется в биореакторах, где происходят реакции синтеза и превращения субстратов.

Современный биореактор обладает следующими системами:

- 1) эффективное перемешивание и гомогенизация питательной среды;
- 2) обеспечение доступа и быстрой диффузии газообразных агентов (система аэрации);
- 3) теплообмен (система поддержания температуры внутреннего объема биореактора и ее контроля);
- 4) пеногашение;
- 5) стерилизация сред, аппаратуры и воздуха;
- 6) контроль и регулирование процессов.

Как сложные многопараметровые установки, биореакторы могут быть классифицированы по размерам и целевому назначению - лабораторные, опытно-промышленные, промышленные; по режиму работы - периодического и непрерывного действия; по условиям культивирования - аэробные и анаэробные. Биореакторы могут использоваться для поверхностного и глубинного культивирования, для жидких, твердых и газообразных питательных сред.

Система перемешивания и аэрации

По способу перемешивания и аэрации биореакторы подразделяются на аппараты с механическим, пневматическим и циркуляционным перемешиванием.

Аппараты механического перемешивания имеют механическую мешалку, которая состоит из центрального вала и 6-8 лопастей. Мешалка обычно многоярусная.

В аппаратах пневматического перемешивания используется газ. Пневматические биореакторы характеризуются плавным перемешиванием и хорошо зарекомендовали себя.

Биореакторы циркуляционного типа (гидродинамического) содержат устройство, создающее направленный ток жидкости по замкнутому контуру. Аппараты такого типа часто заполняют твердыми частицами (насадкой). Такие частицы улучшают перемешивание.

Аэрация осуществляется подачей воздуха снизу через трубу с отверстиями. Разбрызгиванию воздуха (или другого аэрируемо-

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ

го газа) в виде мелких пузырьков способствует механический вибратор.

Теплообмен

Теплообмен осуществляется системой труб с охлаждающим или нагревающим агентом, которая оплетает корпус биореактора или проходит внутри его. В качестве охлаждающего вещества обычно используется вода, а нагревающего - вода и пар.

Пеногашение

Различают механические, химические и акустические виды пеногашения. Широко применяются два первых вида, нередко в комбинации.

Механические пеногасители включают устройства (лопасти, диски, барабаны), сбивающие пену, которая может образовываться при биотехнологических процессах.

Химические пеногасители представляют собой поверхностно-активные вещества, которые внедряются в стенки пузырей, становятся центрами их неустойчивости. Эффективными химическими пеногасителями являются соевое, рапсовое и горчичное масло, рыбий жир.

Стерилизация

Стерилизацию производят двумя методами: термический, при котором обычно используется перегретый пар, и фильтрационный - мембранными фильтрами.

Технология процессов отрабатывается поэтапно. В лабораторных биореакторах (их объем 0,5-100 л) происходят следующие процессы:

- 1) оценка скорости роста клеток, утилизация субстрата и образование целевого продукта;
- 2) определение коэффициентов массопередачи, скорости газообмена;
- 3) установление коэффициентов химических реакций, связывающих потребление субстрата и кислорода с получением целевого и побочного продукта.

10

Опытно-промышленные биореакторы (их объем от 100 л до 5 м³) используются для поисковых путей биотехнологии.

Следует помнить, что при переходе от лабораторного к опытно-промышленному и промышленному (объем до 100 м³) биореактору приходится осуществлять определенные изменения в режиме работ, что определяется увеличением их объемов.

Периодический процесс культивирования включает:

- 1) стерилизацию сред, биореактора и вспомогательного оборудования;
- 2) загрузку аппарата питательной средой;
- 3) внесение посевного материала (клеток, спор и др.);
- 4) рост культуры;
- 5) синтез целевого продукта;
- 6) отделение, очистку готового продукта;
- 7) мойку биореактора и подготовку к новому циклу.

Широко применяют периодическое культивирование с подпиткой. В процессе работы реактора через определенные промежутки времени порциями или непрерывно добавляют питательные вещества. Иногда дополнительно вносят биообъект.

Существует отъемно-доливочное культивирование. В этом случае из биореактора изымается часть его объема и пополняется эквивалентным объемом среды.

При непрерывном культивировании биообъект постоянно поддерживается в экспоненциальной фазе роста. Обеспечивается непрерывный приток питательной среды в биореактор и отток из него культуральной жидкости, которая содержит клетки и продукты их жизнедеятельности.

Многие биотехнологические процессы основаны на взаимодействии трех фаз - жидкой, твердой и газообразной. Имеются процессы, где роль жидкой фазы сведена к минимуму.

В зависимости от преобладающей фазы биореакторы бывают жидко-, твердо- и газофазные.

Процесс культивирования биообъектов сложен и требует определенной конструкции биореактора.

11

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ

4. ОТДЕЛЕНИЕ, ОЧИСТКА И МОДИФИКАЦИЯ ПРОДУКТОВ. ИММОБИЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ

Завершающая стадия биотехнологического процесса - выделение целевого продукта - осуществляется в зависимости от того, накапливается продукт в клетке, выделяется в культуральную жидкость или же продуктом является сама клеточная масса.

Первый этап на пути очистки целевого продукта - сепарация (разделение культуральной жидкости и биомассы). Методы сепарации - флотация, фильтрация и центрифугирование. Методы разрушения клеток подразделяются на физические, химические, химико-ферментативные. Наиболее эффективны методы физического разрушения:

- 1) ультразвук;
- 2) с помощью вибраторов;
- 3) встряхивание со стеклянными бусами;
- 4) продавливание через узкие отверстия под давлением;
- 5) раздавливание замороженной клеточной массы;
- 6) растирание;
- 7) замораживание - оттаивание.

При химических и химико-ферментативных методах используют толуол, бутанол, антибиотики, что приводит к разрушению клеточной стенки.

Отделение и очистку целевого продукта из культуральной жидкости проводят путем осаждения, экстракции и адсорбции.

Осаждение ведется физическим (нагревание, охлаждение, разбавление или концентрирование раствора) или химическим воздействием (в присутствии катионов металлов, химических веществ).

Экстракцию подразделяют на твердо-жидкофазную (продукт из твердой фазы переходит в жидкую) и жидко-жидкофазную (из одной жидкой фазы в другую).

Экстракцию органическими растворителями часто применяют для извлечения антибиотиков, витаминов, липидов, некоторых гидрофобных белков. Многие фосфолипиды извлекаются пу-

тем экстракции хлороформом. Эффективность экстракции может быть повышена:

- 1) многократной экстракцией;
- 2) выбором растворителя;
- 3) нагреванием экстрагирующего агента;
- 4) понижением давления в аппарате.

Применяют криоэкстракцию - метод холодной экстракции.

Адсорбция рассматривается как частный случай экстракции. Путем адсорбции (адсорбенты - древесный уголь, глины и др.) выделяют антибиотики, витамины.

Методы разделения веществ, в основном, включают хроматографию и электрофорез.

Концентрация продукта

За отделением продукта следует его концентрация. Основные методы - обратный осмос, фильтрация, выпаривание.

Обратный осмос - к раствору прилагают внешнее давление, которое превышает осмотическое. Растворитель вытекает через полупроницаемую мембрану против концентрации растворенного вещества, т.е. происходит дальнейшее концентрирование раствора.

Фильтрация - отделение продукта с помощью мембранных фильтров. Некоторые фильтры используют для отделения лишь сравнительно крупных частиц - иммуноглобулинов, коллоидных агрегатов; мембраны с более мелкими порами задерживают молекулы органических кислот.

Фильтрация происходит при умеренно повышенном давлении и не требует особых условий (изменение кислотности, ионной силы раствора или перевод продуктов в другую фазу). Этим объясняется перспективность этого метода.

Метод выпаривания - наиболее древний. Он обладает недостатком, связанным с необходимостью нагревания растворов. В производственных условиях чаще используют вакуум - выпарные аппараты. Перспективный метод выпаривания чувствительных к нагреванию веществ состоит в использовании дисковых и пленочных выпарных аппаратов. Выпаривание может быть ограничено стадией густого сиропоподобного раствора целевого продукта.

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ

Далее выделяется стадия сушки. Для этого используют метод ленточной сушки. Имеются барабанные сушилки, в которых обезвоживают микробные суспензии. Особо чувствительные к нагреванию продукты обрабатывают в вакуум-сушилках.

Пути модификации продукта

Модификация необходима в тех случаях, когда биотехнологический процесс дает лишь "заготовку" целевого продукта. Так, антибиотик, продуцируемый микробной культурой, может быть превращен путем химического воздействия в различные медицинские препараты. В некоторых случаях достаточно, чтобы организм синтезировал определенную структуру вещества, к которой химическим путем присоединяют необходимые активные центры. Иногда биообъект участвует лишь на одной стадии в цепи превращений, ведущих к синтезу целевого продукта.

Модификация - необходимый этап в получении ряда ферментов, гормонов. Речь идет о перестройке веществ биотехнологического процесса с целью придания им специфических свойств.

Стабилизация продукта

Мероприятия, направленные на сохранение свойств целевого продукта в период его использования и хранения, включают различные физико-химические воздействия на продукт. Значительно повышает устойчивость сушка продукта, к повышению стабильности ведет и обезвоживание ряда ферментов. Стабилизация ферментов достигается также добавлением глицерина или углеводов, которые образуют многочисленные водородные связи с аминокислотными остатками, препятствуя спонтанной или индуцированной нагреванием денатурации.

Стабильность ферментов возрастает также при добавлении ионов Ca^{++} , Mg^{++} , Na^+ .

Принципиально новые возможности для стабилизации ферментов, клеток биообъекта открывает их иммобилизация. Эти проблемы решает инженерная энзимология, которая разрабатывает приемы химической модификации ферментов, их перенос в неводную среду и обработку с целью стабилизации.

Иммобилизация - ограничение конформационных перестроек и подвижности ферментов. Иммобилизация основана на физико-химических принципах, позволяющих закрепить структуру фермента таким образом, чтобы активный центр его молекулы сохранял свою каталитическую активность в течение длительного времени.

Способы модификации - прикрепление ферментов к поверхности синтетических носителей (адсорбция, химическое связывание); включение ферментов в гели, мембранные капсулы, полые волокна; поперечная сшивка молекул.

Процессы с использованием иммобилизованных ферментов экономически эффективны. Получение фруктозы из глюкозы значительно дешевле при переходе на технологию, основанную на иммобилизованных препаратах.

При иммобилизации ферменты из разряда гомогенных катализаторов (находящихся в одной фазе, что и субстраты реакции) переходят в разряд гетерогенных, образующих особую фазу, отдельную от реагента. Фермент и реагент могут быть разделены, что позволяет:

- 1) остановить реакцию в нужный момент;
- 2) регенерировать фермент после окончания реакции и использовать для нового цикла;
- 3) получить продукт реакции без примеси фермента, что имеет большое значение для пищевой и фармацевтической промышленности.

В последнее время наблюдается определенная переориентация с иммобилизованных ферментов на иммобилизованные клетки. Это связано с тем, что, во-первых, клетки осуществляют как одно-, так и многостадийные процессы; во-вторых, при использовании целых клеток не требуется проводить отделения и очистки фермента.

Метод иммобилизованных ферментов не имеет альтернативы, если речь идет о внеклеточных ферментах.

В ряде биотехнологических разработок иммобилизации подвергают грибные споры. Большое внимание уделяется соиммобилизации, в частности, ферментов и клеток. При этом возможно два варианта:

клетки имеют ту же каталитическую активность, что и совместно с ними иммобилизованный фермент; клетки и фермент катализируют различные реакции.

5. ЭНЕРГИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ

В основе запасаения энергии (фотосинтез) и переработки биологического сырья в более ценное топливо лежат биологические процессы. Важным источником энергии является биомасса, полученная путем преобразования энергии солнца в потенциальную энергию органического вещества. Ранее основным путем использования растительного сырья в качестве топлива было прямое сжигание, главным образом, древесины и в меньшей мере остатков урожая и навоза. В настоящее время на разных стадиях разработки находится ряд биотехнологий энергетической модификации этого сырья.

Основным поставщиком биомассы, идущей на топливо, является лесное и сельское хозяйство. Для получения большого количества биомассы нужен тщательный отбор и выведение сортов растений, способных эффективно использовать условия окружающей среды при минимальных энергозатратах. Реализовать эти возможности помогает технология рекомбинантных ДНК.

Для продвижения в этой области необходимо:

1) разработать методы выявления положительных изменений в фотосинтезе и приспособить сложные лабораторные тесты к полевым условиям;

2) предложить методы усиления генетической изменчивости;

3) тщательно исследовать геном растений;

4) выявить типы изменений в организации хлоропластов;

5) разработать новые способы селекции.

Работы по увеличению продуктивности растений для получения энергии будут успешными, если мы установим генетические пределы продуктивности и гены, ответственные за эти свойства.

Растительная масса используется для производства жидких энергоносителей, масел, биогаза. В основе получения энергии из растительного сырья лежат процессы сбраживания. Сбраживание сахара в этиловый спирт является важнейшим промышлен-

ным способом крупномасштабного производства жидкого горючего из биомассы растительного сырья. Сбраживание - это лишь одна из стадий процесса. Помимо него, сюда относятся выращивание, уборка, перегонка, обезвоживание, денатурация, изготовление смесей.

Энергетическим источником является также и биогаз - это в основном смесь метана и углекислоты. Его получают при переработке сырья в анаэробных условиях при участии смешанных популяций микроорганизмов.

Одна из перспективных возможностей, предоставляемых биотехнологией, заключается в использовании целых организмов как биокатализаторов для производства водорода и аммиака за счет солнечной энергии.

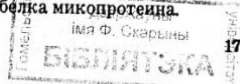
В области исследования возобновляемых источников энергии было доказано, что, если взять мембраны, содержащие хлорофилл, и добавить к окружающему раствору ферменты, то на свету будет происходить разложение воды (фотолиз) на водород и кислород.

Одним из интересных аспектов исследуемой проблемы является использование биологических мембран для генерации электропотенциалов. Таким путем можно создать солнечную батарею, что обеспечит превращение химической энергии в электрическую.

6. ПИЩЕВЫЕ ПРОДУКТЫ И БИОТЕХНОЛОГИЯ

Все органические вещества, которые применяются в пищевой промышленности, могут преобразовываться микроорганизмами. Это говорит о их значительной роли в производстве продуктов питания. Хотя их роль не только созидательная, а может быть и разрушительной. Размножение микроорганизмов в ряде случаев приводит к нежелательным изменениям качества продукта. При этом нередко образуются вещества, обладающие токсическими свойствами.

Спектр продуктов питания, получаемых при помощи биообъектов, обширен: от выработки хлеба, сыра, вина, пива до грибного белка микопроотеина.



РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ

Для получения молочных продуктов применяют ферментацию. В сквашивании молока основная роль принадлежит молочнокислым бактериям, лактоза молока при этом превращается в молочную кислоту. Путем использования других реакций, которые сопутствуют главному процессу или идут при последующей обработке, получают и другие продукты переработки молока - сыр, сметана, пахта (обезжиренные сливки).

Из молочных продуктов проще всего получать масло. В зависимости от сорта производимого масла используют сливки с концентрацией 30-40%. При их сбивании эмульсия масла в воде превращается в эмульсию воды в масле. Для улучшения вкуса масла применяются специальные штаммы бактерий, способные синтезировать нужные вещества, которые влияют на вкус масла.

Для производства сметаны к сливкам добавляют 0,5-1,0% закваски.

Для производства хлеба применяют дрожжи (готовят тесто из муки, добавляют воду, соль и дрожжи). Замешанному тесту дают возможность "подойти" и режут на куски нужного веса. На вкус хлеба заметно влияют помимо углекислого газа и такие продукты анаэробного брожения, как органические кислоты, спирты и эфиры.

Путем спиртового брожения получают вино, пиво, спирт. При сбраживании яблочного сока получают сидр. Штаммы дрожжей, используемые в спиртовой промышленности, должны сохранять жизнеспособность до концентрации этанола 12-15% (по объему).

Важным продуктом является уксус. Его получают в двухступенчатом процессе. Вначале осуществляют спиртовое брожение, в ходе которого сахар превращается в спирт. На следующем этапе из спирта образуется уксусная кислота.

Важным продуктом микробиологических превращений являются белковые вещества. При участии микроорганизмов происходит глубокое изменение свойств белоксодержащего сырья. В результате получают пищевые продукты, которые можно долго хранить. Бактерии играют заметную роль в производстве некоторых мясных продуктов. При этом используется кислотное брожение. Образовавшиеся кислоты способствуют сохранению продукта, формируют вкус. Кислообразующие бактерии используются и при засоле мяса.

Весьма велики возможности биотехнологии при выращивании микробной массы, которая перерабатывается в пищевые продукты. Биомасса микроорганизмов может обладать большой питательной ценностью. В значительной степени эта ценность определяется белками, которые составляют значительную долю от сухой массы клеток. Обсуждаются и исследуются перспективы увеличения доли белка микроорганизмов в общем балансе его производства в мире. Производство микробного белка связано с крупномасштабным выращиванием определенных микроорганизмов, которые собирают и перерабатывают в пищевые продукты. Их производство осуществляется методами глубинного культивирования в жидких средах.

Важным белковым продуктом является микопротеин, состоящий из мицелия гриба. При его производстве используется штамм грибов, выделенный из почвы. В качестве субстрата используется глюкоза, а источником азота служит аммиак и аммонийные соли.

В пищевой промышленности широко используют подкислители. Этот продукт получают, сбраживая мелассу и содержащие глюкозу гидролизаты.

Методами биотехнологии получают некоторые витамины и пигменты (В-каротин, рибофлавин). Не полностью исчерпаны возможности микробиологического производства пищевых красителей и веществ, усиливающих оттенки вкуса. Ферменты, получаемые из микроорганизмов, используют при производстве фруктовых соков (для разрушения мякоти, увеличения выхода сока, уменьшения вязкости, упрощения процедур осветления, стабилизации сока).

Главные усилия при ведении биотехнологического производства пищевых продуктов должны быть направлены на уменьшение или полное подавление нежелательных изменений, вызываемых биологически активными веществами.

7. МАТЕРИАЛЫ И БИОТЕХНОЛОГИЯ

Все более актуальным становится использование микроорганизмов для экстракции металлов из минералов, концентрирова-

ния и извлечения из руд драгоценных металлов, а также для получения биоматериалов.

Методы извлечения металлов из пород, содержащих минералы, путем обработки их кислотными растворами известны давно. Однако лишь в 50-60-х гг. нашего столетия выяснилось, что в процессе получения металлов из минералов решающую роль играют бактерии. В 1947 г. из шахтных дренажных вод выделили бактерию *Thiobacillus ferrooxidans*. Этот организм окисляет железо, а возможно и другие соединения. Он участвует и в переводе меди из рудных материалов в раствор. Большинство минералов сульфидной группы разрушаются именно таким путем. Технология бактериального выщелачивания используется в основном для извлечения меди и урана, но находит и более широкое применение в переработке минерального сырья.

Бактериальное выщелачивание известно, как биогидрометаллургия или биооксидативная металлургия.

Для начала процесса выщелачивания отвал смачивают водой, подкисленной серной кислотой (рН 1,5-3,0), путем распыления, полива или инъекции через трубы, помещенные внутри породы. Этот кислый раствор (выщелачиватель) создает благоприятную среду для размножения бактерий. Из выщелачиваемых отвалов вытекает раствор, содержащий до 0,8-2,2 г/л металла. Этот раствор направляют в отстойники. Медь, к примеру, получают путем осаждения с использованием железа, или экстракцией растворителями.

В горнорудной промышленности для извлечения урана, золота, серебра используют чановое выщелачивание. Урановые руды измельчают и смешивают с растворами серной кислоты в больших емкостях (30х50х6 м) для перевода металла в растворимую форму. В этих емкостях обеспечивается регулирование факторов, которые влияют на процесс (содержание O_2 , CO_2 , рН).

Бактерии легко разрушают пирит, арсенопирит и другие минералы с освобождением металлов. В биотехнологии может применяться метод избирательного выщелачивания некоторых металлов, при этом один из металлов переходит в раствор, а другой - остается в нерастворимой форме. Некоторые минералы для

увеличения их способности к флотации подвергают предварительному биологическому выщелачиванию.

Биогидрометаллургия способна уменьшать разрушения земной поверхности, которые вызывает разработка и обогащение руд общепринятыми методами.

Одна из возможностей бактериального выщелачивания - это использование его для удаления серы из угля перед сжиганием. Выщелачивающие бактерии легко катализируют растворение неорганической серы, которая содержится в каменном угле. Широкомасштабное практическое применение бактериального выщелачивания сдерживается по причине недостаточной изученности.

Велико значение микроорганизмов в превращениях, накоплении и иммобилизации металлов. Эти процессы основаны на возможности многими микроорганизмами накапливать металлы, в том числе связывать специфические ионы. В результате обменных реакций, протекающих у микробов, могут происходить различные превращения металлов: выделение в окружающую среду, осаждение, перевод в летучие формы, окисление или восстановление, внутриклеточное комплексобразование и др.

Современная биотехнология оказывает влияние на производство биополимеров. Термин "биополимер" относится ко всем высокомолекулярным соединениям, которые могут синтезировать различные организмы. Эти биополимеры часто синтезируются в ответ на специфические условия среды, когда соединения углерода не являются лимитирующими. Многие полисахариды, важные для биотехнологических процессов, получают из растений. Однако они имеют ряд недостатков - количество продукта зависит от урожайности, химический состав изменяется от особенностей метаболизма и факторов среды, при переработке происходят изменения продукта. При получении полисахаридов, как биополимерных соединений, при участии микроорганизмов обеспечивается контролируемый синтез и постоянство продукции. Кроме того, полисахариды микробного происхождения обладают уникальными физическими и химическими свойствами. Микроорганизмы способны синтезировать множество полисахаридов в форме внеклеточных капсул или слизи, несвязанных с клеточной стенкой.

Микроорганизмы, образующие полисахариды, обнаружены в различных средах. Синтез этого полимера идет в аэробных и анаэробных условиях. Полисахариды могут образовываться при росте микроорганизмов на метаноле, керосине, метане, этаноле, этиленгликоле. В настоящее время осуществляется промышленное производство ряда микробных полисахаридов - ксантан, декстран, политран и др.

Ксантан был первым микробным полисахаридом, который начали производить в промышленном масштабе. Он нашел широкое применение, т.к. это вещество обладает высокой вязкостью, которая может оставаться постоянной в широком диапазоне кислотности и температуры. Он применяется для повышения выхода нефти - в сочетании с поверхностно-активными веществами и углеводородами служит в качестве агента, контролирующего вязкость жидкости, которую закачивают в нефтеносные слои. Может использоваться и в пищевой промышленности для улучшения вкусовых качеств консервированных продуктов (кремов, соусов, напитков).

Декстран - полимер получают путем выращивания бактерий на сахарозе. Используется в качестве заменителя плазмы крови, для создания гидрофильного слоя на местах ожогов.

Политран - получают из гриба при выращивании на средах с кукурузным экстрактом. Применяют в керамических глазурях, латексных и типографских красках.

Использование микроорганизмов для получения промышленно ценных полисахаридов можно сделать более эффективным следующим образом:

- 1) увеличение скорости образования и повышение их выхода;
- 2) модификация;
- 3) изменение поверхностных свойств микроорганизмов;
- 4) устранение ферментативной активности, способной вызывать нежелательные модификации полисахаридов;
- 5) перенос генетических детерминант синтеза полисахаридов в технологически более удобные продуценты.

Все рассмотренные полимеры синтезируются определенными микроорганизмами в процессе роста на том или ином источнике углерода. Существуют и иные способы получения новых биополимерных материалов. Эти способы предусматривают использова-

ние микроорганизмов лишь на отдельных этапах синтеза. Речь идет, преимущественно, о биотехнологическом процессе получения полифенилена. Этот биополимер можно синтезировать из бензола. Он представляет интерес для специалистов по материаловедению благодаря своей термостабильности и высокой электропроводности.

Помимо термина биополимер все шире внедряется и такое понятие как "биоповреждение". Под биоповреждением понимают любое нежелательное изменение свойств какого-либо материала, вызванное жизнедеятельностью различных организмов. Можно выделить три типа биоповреждений:

- 1) механический - повреждения, к примеру, свинцовых труб, пластмассовых изделий насекомыми и грызунами;
- 2) химический - ассимиляционный (использование материалов в качестве субстрата питания) и диссимиляционный (продуцирование организмами какого-либо продукта, вызывающего разрушение материалов);
- 3) засорение - обрастание водорослями, ракушками предметов и судов.

Биоповреждения особо ощутимы применительно к сырью пищевых продуктов.

8. ХИМИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ

Принципы биотехнологии широко используются в производстве химической продукции.

Помимо получения химических веществ из биомассы биотехнология позволяет получать эффективные катализаторы для осуществления химических взаимопревращений.

К числу важнейших производств можно отнести получение ацетона и бутанола в результате броидильного производства. Броидильный процесс основан на переработке крахмала анаэробными спорообразующими бактериями. Превращению подвергается до 30% субстрата, в результате получается смесь растворителей (бутанол, ацетон, этанол). Остальная часть субстрата превращается в водород и углекислый газ. Твердые вещества отходов содержат большое количество витамина В₁₂ и их можно использовать как добавку к кормам животных.

Производство органических кислот

Техническая уксусная кислота используется при выработке многих химических веществ (пластмасс, инсектицидов, химических волокон и др.), а получена она может быть при микробиологической конверсии этанола. Биологическим путем получают и другие важные органические кислоты - молочную, лимонную, глюконовую, яблочную и др.

Важной группой химических веществ микробного происхождения являются антибиотики. В медицине и ветеринарии они применяются как противомикробные и противоопухолевые препараты; с их помощью контролируется рост растений и ведется борьба с болезнями. Число антибиотиков существенно увеличено путем химической модификации. Со времени открытия антибиотиков были проведены работы по расширению спектра их действия.

Важнейший способ получения антибиотиков - прямая ферментация. В этом случае используются микроорганизмы, которые образуют антибиотики из подходящих предшественников или ингибиторов метаболизма. При подавлении синтеза антибиотиков так же иногда образуются полезные вещества.

Способность микроорганизмов выступать в роли химических катализаторов используется для синтеза промышленно важных стероидов и их трансформаций. Большинство стероидов обладают противовоспалительным действием.

Биотехнологическим путем синтезируются многие ферменты. Первым ферментом, который нашел применение в промышленности была α -амилаза.

Ценные химические вещества могут быть получены биотехнологическим путем с использованием культур растительных тканей и клеток. Одним из первых химических веществ, полученных из культуры тканей растений, был шиконин. Культивирование тканей растений применяется также с целью биотрансформации веществ. Методы культивирования тканей растений применяются и для улучшения сортов сельскохозяйственных культур, для повышения их устойчивости к болезням и неблагоприятным условиям среды. Эти методы используются для выведения растений продуцентов масла (соя, масличная пальма) и целлюлозы.

Биотехнология оказывает существенное влияние на развитие химической промышленности на основе объединения принципов микробиологии, биохимии и химической технологии.

9. ОКРУЖАЮЩАЯ СРЕДА И BIOTECHNOLOGY

Значительное влияние промышленности, сельского хозяйства, бытовой деятельности человека на окружающую среду вызывает изменение физических, химических и биологических свойств природы. Многие из этих изменений неблагоприятны и даже опасны для жизни людей.

Современная биотехнология играет важную роль в решении экологических проблем. Масштабы новых биотехнологических процессов и их применение для оптимизации окружающей среды весьма велики. Это в первую очередь относится к переработке отходов. Построены огромные биореакторы (4-5 тыс. м³) для биотрансформации сточных вод и других веществ.

Усилия в этой области концентрируются на трех основных направлениях:

- 1) деградация органических и неорганических отходов;
- 2) возобновление ресурсов для возврата и круговорот азота, фосфора, серы и др;
- 3) получение ценных видов топлива.

В современных установках для очистки сточных вод выполняется четыре основных операции:

- 1) при первичной обработке удаляются твердые частицы;
- 2) разрушение органических веществ при участии аэробных микроорганизмов, образующих активный ил;
- 3) химическое осаждение и разделение веществ;
- 4) анаэробное разложение ила, который образуется на предыдущих этапах.

Аэробная переработка стоков - самая обширная область биотехнологического процесса. Она включает следующие стадии:

- 1) адсорбция субстрата на клеточной поверхности;
- 2) расщепление адсорбированного субстрата внеклеточными ферментами;

- 3) поглощение растворенных веществ клетками;
- 4) рост и эндогенное дыхание;
- 5) высвобождение продуктов;
- 6) "выедание" первичной популяции организмов вторичными потребителями.

В идеале все это должно приводить к полной минерализации отходов до простых солей, H_2O и CO_2 . Эффективность переработки пропорциональна количеству биомассы и времени ее переработки.

Системы аэробной переработки можно разделить на системы с перколяционными фильтрами и системы с использованием активного ила. Переработка отходов с помощью активного ила осуществляется сложной смесью микроорганизмов. Этот процесс более эффективен, чем фильтрация.

Биологический способ переработки пригоден для различных органических и неорганических соединений и устраняет их вредное воздействие на окружающую среду. Сейчас очень широко используется термин "биodeградация" и имеет несколько толкований. Под биodeградацией понимают как полную минерализацию соединений микроорганизмами, так и незначительную, приводящую к утрате некоторых характерных их свойств.

Стандартные методы оценки деградации позволяют определить термин "биodeградация" следующим образом:

- 1) первичная деградация, при которой характерные свойства исходного соединения утрачиваются и перестают выявляться специфическими свойствами;
- 2) допустимая для окружающей среды деградация, при которой происходит минимальное изменение исходного соединения;
- 3) окончательная деградация, включающая полное превращение исходного соединения в неорганические конечные продукты.

Возрастает роль анаэробной переработки отходов. Самая распространенная технология анаэробной переработки - разложение ила сточных вод. Сфера применения систем анаэробного разложения возрастает, они используются при переработке отходов животноводческих ферм и пищевых отходов. Одно из важней-

ших достоинств микробного анаэробного разложения состоит в элиминации с его помощью патогенных микроорганизмов.

Основные усилия в области анаэробной ферментации направляются на отработку этапов, лимитирующих скорость процесса.

Одной из главных задач биотехнологии, связанной с сохранением окружающей среды и природных ресурсов, является повторное использование полезных веществ, содержащихся в отходах. Получение полезных материалов и веществ из отходов имеет два аспекта:

- 1) извлечение и концентрирование полезных веществ из отходов;
- 2) превращение этих веществ в необходимый материал.

При переработке отходов получается много активного ила. Он содержит большое количество микробного белка, который после очистки можно использовать на корм скоту.

Промышленные отходы можно разделить на две категории:

- 1) отходы, полученные в результате биологических процессов (производство пищи, напитков);
- 2) отходы химической промышленности.

В первом случае отходы имеют различный состав и обычно перерабатываются путем биологического окисления. В химической промышленности образуется большое количество отходов, многие из которых с трудом поддаются разрушению и длительное время присутствуют в среде. Использование специфических микроорганизмов для расщепления ксенобиотиков (чужеродных для природы веществ и соединений) при переработке отходов еще не нашло широкого применения.

Расширение сферы применения биотехнологии в значительной мере определяется степенью изученности процессов микробиологического синтеза и деструкции.

10. ВОПРОСЫ САМОКОНТРОЛЯ

1. Что изучает биотехнология?
2. Предмет биотехнологических исследований.
3. Задачи биотехнологии.

4. Исторические предпосылки возникновения биотехнологии.
5. Какие науки злят на развитие биотехнологии?
6. Кто создал реальные предпосылки для развития биотехнологии?
7. Основные классы векторов.
8. Значение генной и клеточной инженерии для развития биотехнологии.
9. Селекция микроорганизмов.
10. Белковая инженерия.
11. Этапы работ в области генной инженерии.
12. Принцип действия и конструкция биореакторов.
13. Твердофазное и газофазное культивирование.
14. Методы сохранения продуцентов.
15. Имобилизация ферментов.
16. Этапы обработки производственного процесса в биотехнологии.
17. Этапы периодического процесса культивирования.
18. Методы разрушения клеток для отделения целевого продукта.
19. Категории промышленных отходов.
20. Биоградация отходов.
21. Биотехнология производства пищевых продуктов.
22. Значение биотехнологии для оптимизации окружающей среды.
23. Использование биомассы для производства энергии.
24. Перспективы развития биотехнологии.
25. Биотехнология как междисциплинарная отрасль.
26. Основные операции при очистке сточных вод.
27. Основные требования к продуцентам биотехнологического процесса.
28. Процесс выщелачивания металлов.
29. Роль биотехнологии в производстве медицинских препаратов.
30. Современная роль биотехнологии в производственной сфере.

11. КРАТКИЙ СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ

- Анаэробный** - способный жить и развиваться только в отсутствии кислорода.
- Аэробный** - способный жить и развиваться только в присутствии кислорода.
- Биомасса** - общая масса особей одного вида, группы видов или сообщества в целом.
- Брожение** - анаэробный процесс ферментативного расщепления органических веществ под действием дрожжей, плесневых грибов и бактерий.
- Банк генов** - набор генов данного организма, полученный в составе рекомбинантных ДНК.
- Биогеотехнология металлов** - технология извлечения металлов из руд.
- Гибрид** - организм, полученный в результате скрещивания генетически различных родительских форм (видов, пород, линий и др.).
- Геном** - совокупность генов или хромосомов организма.
- Емкость вектора** - минимальный и максимальный размер фрагмента ДНК, который может быть встроен в вектор без нарушения его функции.
- Имобилизованный фермент** - ферментный препарат, в котором молекула фермента каким-либо образом связана с носителем (адсорбирована, захвачена, включена, ковалентно присоединена и т.п.).
- Имобилизованные клетки** - клетки, включенные в какие-либо органические носители (гели, мембраны, волокна) или закрепленные на поверхности носителя.
- In vitro** - буквально "в стекле"; относится к биологическим реакциям, происходящим в искусственных условиях, в том числе к выращиванию клеток в условиях культуры.
- Клетки-продуценты** - первичные линии клеток, способные к продуцированию в питательную среду ценных продуктов.
- Клон** - группа генетически идентичных клеток, возникших неполовым путем от общего предка.

Культура каллусных тканей - выращивание в длительной культуре растительных тканей из изолированных клеток разных органов растений.

Культура клеток - выращивание клеток, как правило, одного типа, выделенных из организма человека, животного или растения, в специальных питательных средах.

Культуральная среда - любая питательная среда для выращивания в искусственных условиях бактерий и других клеток.

Миобласт - исходные клетки, из которых развиваются дифференцированные мышечные клетки.

Мутагены - физические или химические агенты, увеличивающие частоту возникновения мутаций.

Мутасинтез - синтез антибиотиков мутантами, у которых блокировано образование определенного фрагмента антибиотической молекулы.

Первичная культура - культура клеток, полученных непосредственно от организма.

Плаزمид - кольцевая молекула ДНК, автономно от хромосомы реплицирующаяся в клетке.

Протопласт - растительная (микробная) клетка, лишённая клеточной стенки с помощью фермента или механического воздействия.

Рекомбинация - обмен генетическим материалом между двумя исходными (родительскими) молекулами ДНК, приводящий к образованию рекомбинантных молекул ДНК.

Репликация ДНК - синтез дочерних нитей ДНК (реплик) на исходной молекуле ДНК (матрице); при этом увеличивается число копий хромосомы или плазмиды.

Слияние протопластов - соединение двух клеток в лабораторных условиях.

Соматические клетки - клетки тканей многоклеточных организмов, не относящиеся к половым.

Тотипотентность - способность клеток высших организмов дифференцироваться в целый организм.

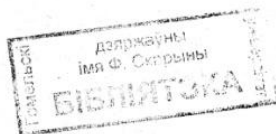
Штамм бактерий - совокупность бактериальных клеток, имеющих общее происхождение и характеризующихся одинаковыми устойчивыми признаками. То же относится к вирусам, любым клеточным культурам.

ЛИТЕРАТУРА

- Биотехнология / Под ред. А.А.Баева. - М.: Наука, 1984. - 306 с.
Биотехнология. Принципы и применение / Под ред. А.А.Баева. - М.: Мир, 1988. - 465 с.
Биотехнология, сельское хозяйство // Курьер. - Вып. 4. - 1987. - 34 с.
Вакула В.В. Биотехнология: что это такое. - М.: Молодая гвардия, 1989. - 301 с.
Зудин Д.В., Кантере В.М., Угодчиков Г.А. Автоматизация биотехнологических исследований. - М.: Высшая школа, 1986. - 111 с.
Матвеев В.Е. Научные основы микробиологической технологии. - М.: Агропром, 1985. - 225 с.
Печурин Н.С. Популяционная микробиология. - Новосибирск: Наука, 1978. - 277 с.
Приборное оснащение и автоматизация процессов ферментации в биотехнологических исследованиях. - Пуцдино, 1985. - 158 с.
Экологическая биотехнология / Под ред. А.И.Чинака. - Л.: Химия, 1990. - 382 с.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	3
1. Становление и основные направления развития биотехнологии	4
2. Подготовка биологических объектов. Подбор объектов. Генная и клеточная инженерия	5
3. Культивирование биообъекта	8
4. Отделение, очистка и модификация продуктов. Имобилизация ферментов	12
5. Энергия и биотехнология	16
6. Пищевые продукты и биотехнология	17
7. Материалы и биотехнология	19
8. Химия и биотехнология	23
9. Окружающая среда и биотехнология	25
10. Вопросы самоконтроля	27
11. Краткий словарь терминов	29
Литература	31



Редактор *Н.И.Виданова*
Техн. редактор *М.В.Жуковец* Корректор *П.Н.Савген*

Сдано в набор 10.03.97. Подписано в печать 28.03.97. Формат 60x84 1/16.
Офсетная печать. Усл. печ. л. 1,86. Уч. - изд. л. 1,53. Тираж 100 экз.
Заказ 77.

Гомельский государственный университет им. Ф.Скорины.
Лицензия ЛВ № 755.

ИПП Минэкономики РБ. 220004, Минск, пр. Шахматова, 23