

Соколова Н.А., Кочетков В.Г.

Биотехнологические методы
в промышленности и экологии

Волжский
2021

МИНИСТЕРСТВО ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ
ВОЛЖСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ (ФИЛИАЛ)
ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО ОБРАЗОВАТЕЛЬНОГО
УЧРЕЖДЕНИЯ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ВОЛГОГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Соколова Н.А., Кочетков В.Г.

Биотехнологические методы в промышленности и экологии

Электронное учебное пособие



Волжский
2021

УДК 574 (07)
ББК 28.080
С 594

Рецензенты:

кандидат биологических наук, зам. декана географического факультета,
доцент кафедры «Экология» ФГБОУ ВО МПГУ

Гамага В. В.;

кандидат педагогических наук, доцент кафедры «Эколого-биологического
образования и медико-педагогических дисциплин»

ФГБОУ ВО ВГСПУ

Маринина М. Г.

Издается по решению редакционно-издательского совета
Волгоградского государственного технического университета

Соколова Н.А. Биотехнологические методы в промышленности и экологии [Электронный ресурс] : учебное пособие / Н.А. Соколова, В.Г. Кочетков ; Министерство науки и высшего образования Российской Федерации, ВПИ (филиал) ФГБОУ ВО ВолгГТУ. – Электрон. текстовые дан. (1 файл: 8,38 МБ). – Волжский, 2021. – Режим доступа: <http://lib.volpi.ru>. – Загл. с титул. экрана.

ISBN 978-5-9948-3806-8

Учебное пособие написано в соответствии с программой преподавания курса «Биотехнологические методы в промышленности и экологии» для студентов, обучающихся по направлениям бакалавриата 18.03.01 «Химическая технология» и 18.03.02 «Энерго- и ресурсосберегающие процессы в химической технологии, нефтехимии и биотехнологии».

В учебном пособии изложены основы таких разделов биотехнологии как промышленная микробиология, генная и клеточная инженерия, инженерная энзимология. Описаны способы промышленного культивирования микроорганизмов, клеточная инженерия растений, создание трансгенных организмов, химеризация их генов, введение в вектор и их трансформация в бактерии, животные и растительные клетки. В пособие рассказывается о разнообразном применении современных достижений биотехнологии в различных отраслях производства, медицины, сельского хозяйства и экологии. Кроме краткого изложения теоретического лекционного материала, учебное пособие включает вопросы к проведению контрольной работы, список тем семестровых заданий по дисциплине и примеры тестовых заданий, используемых как для входных контролей, так и для оценивания крупных тематических блоков.

Ил.3, библиограф.: 23 назв.

ISBN 978-5-9948-3806-8

© Волгоградский государственный
технический университет, 2021
© Волжский политехнический
институт, 2021

Оглавление

Раздел 1. ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ МАТЕРИАЛ	4
Лекция 1. Биотехнологические процессы. Введение в предмет	4
Лекция 2. Промышленная микробиология	19
Лекция 3. Биоиндустрия ферментов	22
Лекция 4. Основы генетической и клеточной инженерии.....	26
Лекция 5. Биотехнологии в сельском хозяйстве	30
Лекция 6. Биотехнология в медицине и фармакологии.....	43
Лекция 7. Биотехнология в пищевой промышленности.....	52
Лекция 8. Применение биотехнологических процессов для решения проблем окружающей среды.....	56
Лекция 9. Технологическая биоэнергетика	62
Лекция 10. Биоготехнология	66
Лекция 11. Биотехнология в других отраслях промышленности	67
Раздел 2. САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ	72
2.1. Темы семестровых заданий по дисциплине «Биотехнологические методы в промышленности и экологии»	72
2.2. Вопросы к контрольной работе по дисциплине «Биотехнологические методы в промышленности и экологии»	73
2.3. Примеры тестовых заданий по дисциплине «Биотехнологические методы в промышленности и экологии»	74

Раздел 1. ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ МАТЕРИАЛ

Лекция 1. Биотехнологические процессы. Введение в предмет

План.

1. Определение биотехнологии. Структура биотехнологии. Связь с другими науками.
2. История становления биотехнологии.
3. Биотехнологический процесс и его этапы.
4. Основные задачи биотехнологии.
5. Перспективы развития биотехнологии в России.
6. Основные направления биотехнологии.

1. Каждый день мы просыпаемся и радуемся солнцу и свету, началу нового дня, который сулит нам новые открытия и впечатления. Выглянув в окно или выйдя во двор, мы видим зеленую листву деревьев, траву и даже не догадываемся, что вот точка в пространстве, где начинается биотехнологическое таинство, дающее нам мясо и творог, молоко и хлеб. Именно в зеленом листе начинается тот загадочный процесс фотосинтеза, благодаря которому существует все живое на Земле вот уже как минимум три миллиарда лет.

В листе солнечный луч, его энергия преобразуется в энергию химических связей органики, то есть глюкозы, белков и жиров. Растения, их биотехнология – это и подсолнечное масло, и хлеб, и сахар на нашем столе. А потом растения поедают животные, которые дают нам мясо и яйца, молоко и масло сливочное, сыр и творог. И мы, поедая все это, запускаем в своем организме сложнейшие биотехнологические «конвейеры», на которых белки «разберутся» до аминокислот, жиры – до составляющих их глицерина и жирных кислот, крахмал распадется на глюкозу, а нуклеиновые кислоты до нуклеотидов. Затем все эти «кирпичики» соберутся по «программам», задаваемым нашими генами, в наши белки, жиры и углеводы, а также нуклеиновые кислоты, чтобы составила неповторимая генетическая комбинация, которой нет, и никогда не будет в мире. Как доказать, что мы с генетической точки зрения уникальны? А очень просто: если бы этой уникальности не было, то не было бы и трансплантационного иммунитета, то есть реакции отторжения пересаженных органов и тканей. Только однояйцевые близнецы, являющиеся зеркальным отображением друг друга, не имеют барьера несовместимости. Все у них одинаково – и гены, и белки, поэтому, пересаженные у них органы и ткани приживаются без иммунодепрессантов, то есть веществ, которые подавляют иммунную реакцию отторжения. Можно сказать, что и биотехнология, молекулярная «машинерия» у них одинакова.

Но рождение однояйцевых близнецов – чрезвычайно редкое событие. А как бы было хорошо наладить такое «производство» органов и тканей, которые можно было бы менять в любой момент. При тяжелых заболеваниях не надо было бы искусственного сердца и сложного

устройства – диализатора для очистки крови, с чем прекрасно справляются здоровые почки. Просто пошел в больницу и заменил орган, вышедший из строя. Захотел сменить кожу – не нравятся тебе морщины или родимое пятно, – пожалуйста. Возможно, когда-нибудь так и будет.

«Словами мы познаем суть вещей», – говорил мудрый царь Соломон. Последуем совету мудрого Соломона и попытаемся понять суть биотехнологии через посредство составляющих это слово частей «биос» и «техне».

Не составляет труда распознать их греческое происхождение. С первой частью, означающей «жизнь», мы встречаемся в таких словах, как «биология» – изучение жизни, «биоценоз» – живое сообщество. Вторая часть слова «биотехнология» – «техне» – восходит к «текс» – вить, прясть, делать что-то руками. Отсюда слово текстиль, текст, контекст, тектоника, архитектура, технология.

Теперь мы можем перевести слово «биотехнология» – производство с помощью живых существ, или технология живого.

Биотехнология возникла в процессе развития технической микробиологии. Не случайно во всех биотехнологических процессах широко используются отдельные микроорганизмы или их ассоциации.

Но определения биотехнологии могут быть разные. Биотехнология (в широком смысле) – пограничная между биологией и техникой научная дисциплина и сфера практики, изучающая пути и методы изменения окружающей человека природной среды в соответствии с его потребностями.

Биотехнология (в узком смысле) – совокупность методов и приемов получения полезных для человека продуктов с помощью биологических агентов.

В Биологическом энциклопедическом словаре, изданном в 1989 г., биотехнологией называют использование живых организмов и биологических процессов в производстве. Европейская федерация биотехнологии определяет биотехнологию как использование наук о природе (биологии, химии, физики) и инженерных наук применительно к биосистемам и биоиндустрии для того, чтобы снабдить биологическое сообщество требуемыми продуктами и услугами.

Современная биотехнология состоит из трех основных разделов: промышленной микробиологии, генетической и клеточной инженерии и инженерной энзимологии.

Микробная биотехнология (промышленная микробиология) – это интегральная по своей природе область науки и техники, которая опирается на теоретические и методические положения молекулярной биологии и генетики, биохимии, физиологии и цитологии, а также использует прогрессивные химические технологии. Биотехнология занимается теми процессами, которые можно вести не в природе, а в искусственно созданных условиях производства круглогодично и повсеместно независимо от сезона, климатических и географических условий. Именно

это принципиально отличает биотехнологию от сельского хозяйства, где климатические и другие природные условия являются мощным фактором, существенно ограничивающим возможности управления. В то же время агrobiотехнология достигла больших успехов.

Существенный вклад в современную промышленную микробиологию внесла генная инженерия, которая расширила арсенал традиционных веществ микробного синтеза за счет совершенно новых продуктов клонированных генов.

Значительные успехи, достигнутые во второй половине XX в. фундаментальными исследованиями в области биохимии, биоорганической химии молекулярной биологии, создали предпосылки для управления элементарными механизмами жизнедеятельности клетки.

Это явилось мощным импульсом для развития биотехнологии. Выяснение роли нуклеиновых кислот в передаче наследственности, расшифровка генетического кода, раскрытие механизма индукции и репрессии генов, совершенствование технологии культивирования микроорганизмов, клеток и тканей растений, и животных позволили разработать методы генетической и клеточной инженерии, с помощью которых можно искусственно создавать новые формы высокопродуктивных организмов.

Новые направления физико-химической биологии значительно расширили возможности биотехнологии. Прежде всего, это относится к *генетической инженерии*, то есть к использованию клеток, главным образом микроорганизмов, генетическая программа которых целенаправленно изменена введением в них молекул ДНК, созданных в лаборатории и кодирующих синтез нужного продукта. Таким путём можно получить значительное количество относительно дешёвого конечного продукта, мало доступного при использовании других методов производства. Это обстоятельство, а также возможность сочетания различных фрагментов ДНК, в принципе позволяющая создавать необходимые генетические программы, открыли необычайно широкие перспективы.

Еще одно направление развития биотехнологии связано с *клеточной инженерией*. Культура растительных клеток может служить, прежде всего, источником свойственных данному растению вторичных продуктов. Пользуясь способностью клеток растений превращаться на специальных средах в сформированное растение, клеточные культуры применяют для получения безвирусных растений, пытаются проводить селекцию форм с нужными свойствами. Животные клетки более требовательны к условиям культивирования, им необходимы дорогостоящие среды. Всё более широкое применение находят так называемые гибридомы, полученные в лаборатории путём слияния двух различных клеток и служащие источником белков, необходимых для диагностики и лечения болезней человека, животных и растений.

Прикладную генетическую и клеточную инженерию нередко

объединяют названием «*новая биотехнология*», их появление укрепило уверенность в том, что биотехнология со временем может стать основой крупного промышленного производства.

Генетическая и клеточная инженерия рассматривается как принципиально новые направления биологической науки, которые ставят в один ряд с расщеплением атома, преодолением земного притяжения и созданием средств электроники.

Переворот в промышленном применении ферментов произвела их иммобилизация, то есть физическое или химическое соединение фермента с твёрдым носителем (керамика, стекло, полимерные гели, синтетические полимеры). При этом сохраняются каталитические свойства фермента, увеличивается его стабильность, и устраняются трудности его отделения от непрореагировавшего субстрата и продукта. *Иммобилизованные ферменты* используют при получении левовращающих аминокислот, б-аминопенициллановой кислоты (исходное вещество при производстве полусинтетических пенициллиновых антибиотиков). Всё более широкое распространение получает иммобилизация микроорганизмов. Развитие методов для изучения структуры белков, выяснение механизмов функционирования и регуляции активности ферментов открыли путь к направленной модификации белков и привели к рождению *инженерной энзимологии*.

подавляющее большинство продуктов биопромышленности получают ферментацией с помощью *микроорганизмов* (главным образом бактерий и грибов). Микроорганизмы очень разнообразны по строению и физиологическим свойствам, некоторые выдерживают температуру до 90–110 °С, а при повышенном давлении – даже 250 °С; они переносят высокую кислотность, а также большие концентрации солей и, что очень существенно, быстро размножаются (некоторые делятся каждые 8–10 минут). Хотя ферментация осуществляется живыми клетками, она основана, в конечном счёте, на биохимических превращениях исходного субстрата под действием биологических катализаторов – ферментов. Последние, в свою очередь, являются одним из продуктов микробиологического производства (некоторые выделяют из природного сырья). Ферменты используются в биохимическом производстве, несмотря на их высокую стоимость. Нашли применение амилаза и протеазы, глюкозоизомераза, пектиназа и некоторые другие. Ферменты при температурах не выше 60–70 °С и нормальном атмосферном давлении обладают высокой субстратной специфичностью. Их применяют в пищевой, текстильной, кожевенной промышленности, при производстве кормов, в тонком органическом синтезе (в частности, антибиотиков).

Потенциал биотехнологии велик. Ей дано – пусть в определенных границах – перевивать по-новому «нить жизни» – ДНК – методами генетической и клеточной инженерии, создавать биообъекты по заранее заданным параметрам на благо человечества. Но всегда ли на благо? Накопленный потенциал биотехнологии – это обоюдоострый меч, который,

подобно ядерной энергетике, компьютерной электронике и космонавтике может принести не только пользу, но и вред при бесконтрольном, неосторожном и тем более злонамеренном применении. В распространении генетической инженерии видели угрозу заражения людей невиданными болезнетворными «генетическими монстрами», создания новых зловредных сорняков и даже выведения «стандартных людей» по заранее заданным программам.

Биотехнологию подразделяют на «большую биотехнологию», требующую внушительных капиталовложений, квалифицированных специалистов, дорогостоящего сырья и оборудования, а это большинство генно-инженерных процессов, и «малую биотехнологию» (получение биогаза, выращивание микроводорослей в прудах), обходящуюся даровыми источниками энергии и сырья, низкими капиталовложениями и небольшими затратами труда.

Кроме того, имеется и еще одно разделение биотехнологических сфер:

- красная биотехнология – связанная с медициной и «лечением» генетического кода, на рынке биотехнологий ей принадлежит доля более 70%;
- зеленая – генная инженерия, работающая для сельского хозяйства;
- белая – производство биотоплива;
- серая – защита экологии, борьба с отходами;
- синяя – использование биологических ресурсов океана.

Лидеры «красной биотехнологии» – американские фирмы Genentech, Novartis, Merck&Co, Pfizer, Johnson & Johnson, Sanofi.

В области разработки и производства ГМО лидирует транснациональная компания Monsanto Company.

Белая, серая, синяя биотехнологии существенно отстают от лидеров. Их полезная деятельность дает не слишком быстрый экономический эффект, поэтому в списках лидеров они не значатся.

2. При раскопках Вавилона была обнаружена дощечка, относящаяся к VI тысячелетию до н.э., на которой описан процесс приготовления пива. С древних времён известно использование и других биотехнологических процессов в различных сферах практической деятельности человека: в виноделии, хлебопечении, сбраживании молочных продуктов. Однако научный анализ биохимических механизмов, лежащих в основе этих биотехнологических процессов, был проведён лишь в XIX в. Луи Пастером, и им же выяснена биологическая сущность биотехнологических процессов. В первой половине XX в. биотехнология пополнилась микробиологическим производством ацетона и бутанола, антибиотиков, органических кислот, витаминов, кормового белка.

Термин «биотехнология» впервые использовал венгр Карл Эреки в 1919 г. для обозначения работ, в которых продукты получают с помощью

живых организмов.

В 30-е годы в нашей стране были построены заводы по получению кормовых дрожжей на гидролизатах древесины, сельскохозяйственных отходах и сульфитных щелоках. Затем биотехнология широко использовалась для расширения «ассортимента» антибиотиков для медицины и животноводства, ферментов, витаминов, ростовых веществ, пестицидов.

Рассмотрим основные этапы биотехнологии подробнее.

Мы не знаем, когда человек начал сам возделывать растения и приручать животных, но, вероятнее всего, это случилось не ранее 10-12 тысяч лет назад, когда закончилось последнее оледенение.

Родившись в долинах полноводных рек, главным образом между реками Тигром и Евфратом, земледелие дало человеку один из первых продуктов биотехнологии – зерно. Мы называем эту область Междуречьем, а по-гречески Месопотамия (от слова «потам» – река). В Месопотамии в разное время существовали государства Шумер, Аккад, Ассирия. Именно древние шумеры изобрели клинопись на глиняных табличках, которые через много тысяч лет находят при раскопках археологи. У древних шумеров даже клинописи поначалу не было. Им, подобно египтянам, приходилось все рисовать. Расшифровать такую письменность в большинстве случаев пока не удастся, но кое-что ученым узнать удалось. Они, в частности, узнали, что в шумерских городах были школы, в которых детей учили решать задачи. С одной из таких задач и ее решением ученые столкнулись совсем недавно. На табличке был дан ход решения школьных упражнений по определению количества работников, необходимых для осуществления определенной работы, а также того провианта, который необходим для этих работников. Среди провианта числились меры зерна и кувшины ячменного пива. Нас это пиво интересует в первую очередь, поскольку это одно из древнейших свидетельств использования людьми биотехнологических процессов, ведь пиво невозможно приготовить без применения микроорганизмов, переводящих сахар в спирт. Но на той табличке ничего не говорилось о выпекании хлебов. Хлеб они, как и библейские герои, по всей видимости, ели пресный. В Библии говорится даже об особом празднике «опресноков», то есть пресных лепешек, выпекавшихся на разогретых в кострах камнях.

В то же время в Библии много говорится о пастушеских заботах ее героев. Древние пастухи были наблюдательны и прекрасно знали основы науки о наследственности, которую ученые потом назовут «генетикой» – от слова «ген», или «колени», «поколение», «род». Известнейший древнегреческий философ Платон, ученик Сократа и учитель Аристотеля, писал даже об «евгенике», то есть улучшении рода человеческого. Но вернемся к библейским пастухам. Есть в Библии одна история о пастухе Якове, который влюбился в Рахиль – дочь богатого скотовладельца. Да так влюбился, что готов был за нее отработать со стадами папаши семь лет. Но не сдержал своих слов коварный богач и заставил юношу отработать еще

семь лет. И вот тут-то Яков отомстил негоднику: он так повел скрещивание скота, что в стаде богача быстро стали накапливаться животные с неблагоприятными наследственными признаками. Где же мог научиться неграмотный пастух такому изощренному генетическому «коварству»? Похоже, что в Междуречье, где его народ долгое время находился в плену в Вавилоне. Археологи при раскопках нашли глиняную табличку, свидетельствующую о том, что в Междуречье уже шесть тысяч лет назад занимались разведением лошадей. А ассирийские жрецы, как это мы можем видеть на барельефе, занимались опылением финиковых пальм под распростертыми крылами их Бога Солнца.

Не так давно весь археологический мир заговорил об открытии величественной цивилизации в долине реки Инда. Еще древние шумеры вели активную торговлю с городами индостанского полуострова. По обе стороны Аравийского моря ученые находят одинаковые стеатитовые (стеатит – лечебный камень) печати с многочисленными изображениями быков, что свидетельствует об их разведении. С Индостана в Шумерское государство поставляли специи и шерсть, лен и растительное масло. Клинопись Шумера сообщила о многочисленных кожах, привозившихся из-за моря, а в самой долине Инда археологи раскопали глиняные змеевики, с помощью которых древние жители перегоняли спирт, продукт жизнедеятельности дрожжей.

Еще дальше на востоке, в Древнем Китае, уже три тысячи лет назад в эпоху Западной империи Чжоу жители провинции Шанси умели готовить рисовое вино. В древней «Книге песен» говорится, что «финики будем собирать в августе, а урожай риса в октябре, чтобы успеть к весне приготовить хмельной напиток, и на веселом празднике пожелать друг другу здоровья». Можно заметить, что само рисовое поле представляет собой прекрасно сбалансированную биотехнологическую систему симбиотических организмов. Рисовому кустику помогают расти и развиваться небольшой водяной папоротник, а сине-зеленые водоросли, которые способны усваивать азот непосредственно из воздуха, помогают накопить в рисовом зерне ценный белок.

Издревле в Китае культивировался шелк. Все знают, что шелк – это нить, получаемая при разматывании кокона, в котором прячется гусеница тутового шелкопряда. Кокон она делает из паутины, обматываясь ею со всех сторон. Менее известно, что паутина представляет собой практически чистый белок, причем нить его прочнее стали! Еще Аристотель писал об этом удивительном продукте биотехнологии загадочного Востока. По Великому шелковому пути ткани из него доставлялись в Египет, где очень высоко ценились на рынках Мемфиса и Александрии.

Древние Греция и Рим унаследовали все эти знания, что отразилось в языке, а потом закрепилось и в современной научной терминологии. Сегодня химики и биохимики, не задумываясь, пользуются греческим словом «энзим» и латинским «фермент» для обозначения особых «рабочих»

белков в клетках, которые и осуществляют все реакции в живом мире. В основе греческого слова лежит корень «зим» – поднимать (речь идет о поднявшемся дрожжевом тесте). Дрожжевое тесто, как хорошо всем известно, делается с помощью закваски – недаром его еще называют «квашня». В Древнем Риме, конечно же, не знали, что закваска представляет собой дрожжи (кстати, от слова «дрожать» – ведь поднявшееся тесто «дрожит»), поэтому говорили «ферментум» – брожение, кипение, взрыв, резкое увеличение в объеме. Лингвисты знают, что латинское «ферментум» восходит к древнему «бреу», от которого произошло наше слово «брожение» и немецкое «брот» – хлеб, входящее составной частью в слово «бутерброд». Сюда же можно добавить название морского ветра «бриз» и напитка «бренди».

В Александрии прекрасно знали процесс перегонки. Александр Афродизий писал, как матросы кипятили морскую воду, собирая пресные пары с помощью губок. Плиний описал другой метод конденсации летучих паров: холодный бараний мех с родниковой водой подвешивали над костром с кипящей смолой, собирая тем самым пары скипидара.

В Ветхом завете в Книге творения описывается опьянение Ноя после спасения его на знаменитом Ноевом ковчеге, на котором он пустился в плавание по бурным водам Всемирного потопа. В Древней Греции вино запрещалось пить неразбавленным. Само это слово «вино» пришло в наш язык через латынь, которая заимствовала его из греческого, где оно называлось «ойнос». Древнеримский поэт Гораций писал о знаменитом фалернском вине, которое прославилось в 42 г. до н.э. в правление консула Минатиуса Планкуса, когда случился небывалый урожай винограда. По римскому уголовному праву муж оправдывался судом, если он убивал жену, подобравшую ключи к винному погребу. В конце XVII в. появились первые бутылки, столь живо обыгранные великим Дюма в его романе «Три мушкетера». Горлышки бутылок стали заливать сургучом, что позволяло дольше выдерживать вино. Это было сделано доном Пьером Периньо в Шампани, лежащей к востоку от Парижа. Его по праву считают «отцом шампанского».

В 1775 г. было сделано интересное открытие: если виноградную гроздь оставить на лозе до заморозков, то это приводит к увеличению сахаристости благодаря гидролизу углеводов (гидролиз означает «лизис» – расщепление с помощью «гидры», то есть воды). Так Франция стала ведущей мировой державой винной биотехнологии, переняв эстафету от Египта, в котором мумии клали на виноградные грозди в саркофагах, и Греции, в которой Теофраст, ученик Аристотеля, описывал способы выращивания виноградной лозы, а Александр Македонский взял лозу с собой в индийский поход. И вот ближе к середине прошлого века французское вино «заболело», закисая чуть ли не на первый год после изготовления. Французские виноделы обратились к Пастеру, который до того уже успел прославиться как химик. Почему же виноделы обратились к химику? Ведь вино – это продукт живой природы. Да, это так, но в то время

господствовало мнение известного немецкого химика Ю. Либиха, который считал, что брожение вина представляет собой чисто химический процесс. Пастер великолепно справился с поставленной перед ним виноделами Франции задачей. По ходу ее решения он сделал еще одно величайшее открытие: брожение обусловлено жизнедеятельностью живых микроскопических существ, или микробов. Размножаясь неуправляемо, микробы уксуснокислого брожения «выедают» накопившийся в вине спирт и окисляют его в уксусную кислоту.

Пастер нашел простой способ, приостанавливающий нежелательное размножение микроорганизмов: необходимо то, что вы желаете защитить от биологической опасности, прогреть два-три раза до температуры 60-70°C. Этот способ получил название «пастеризация». Пастер потом полностью переключился на микробиологию, основателем которой его по праву считают. В Париже он основал знаменитый Пастеровский институт, куда собрал лучшие силы тогдашней научной Европы. У него работали Ру и Кох, он пригласил к себе нашего выдающегося исследователя И.И. Мечникова, который открыл клетку макрофаг, защищающую нас от болезнетворных микробов и вирусов. Пастеру так и не удалось выделить возбудителя бешенства (бешенство вызывает вирус, а его тогда еще не умели культивировать), но он, тем не менее, создал прививку против этого страшного заболевания. 4 июля 1885 г. Пастер – не врач – иммунизировал с помощью своей прививки маленького Жозефа Мейстера, которого искусала бешеная собака. Иммунизация прошла успешно, и Мейстер намного пережил Пастера, который умер в 1895 г. Мейстер покончил с собой только 14 июня 1940 г., когда в Париж вошли гитлеровские войска. После себя Пастер оставил директором института И.И. Мечникова, который занимал этот пост до самой своей смерти в 1916 г.

Немаловажный вклад в биотехнологические разработки внесли советские исследователи: в СССР в 30-е годы были построены первые заводы по получению кормовых дрожжей на гидролизатах древесины, сельскохозяйственных отходах и сульфитных щелоках, под руководством В.Н. Шапошникова успешно внедрена технология микробиологического производства ацетона и бутанола. Большую роль в создании основ отечественной биотехнологии внесло учение Шапошникова о двухфазном характере брожения. В 1926 г. в СССР были исследованы биоэнергетические закономерности окисления углеводов микроорганизмами. В последующие годы биотехнологические разработки широко использовались в нашей стране для расширения «ассортимента» антибиотиков для медицины и животноводства, ферментов, витаминов, ростовых веществ, пестицидов.

Биотехнология является важнейшим разделом современной биологии, которая стала в конце XX в. одним из ведущих приоритетов в науке и экономике. Мировое признание она получила, начиная с 1953 г., после выдающегося открытия Джеймса Уотсона и Френсиса Крика о структуре и пространственной организации двойной спирали ДНК.

В 1950-е годы П. Уайт (США) и Рю Готре (Франция) создали в биологии ещё одно важное направление – клеточную инженерию и связанную с ней клеточную биотехнологию. В то же время в России развернули исследования в этой области А. Курсанов и Р. Бутенко.

С момента создания в 1963 г. Всесоюзного научно-исследовательского института биосинтеза белковых веществ в нашей стране налаживается крупнотоннажное производство богатой белками биомассы микроорганизмов как корма. В 1966 г. микробиологическая промышленность была выделена в отдельную отрасль (Главное управление микробиологической промышленности при Совете Министров СССР – Главмикробиопром). Имеются ценные разработки по получению новых источников энергии биотехнологическим путем (технологическая биоэнергетика), отметим большое значение биогаза – заменителя топлива, получаемого из недр земли.

В разработку генноинженерных методов советские исследователи включились в 1972 г. Следует указать на успешное осуществление проекта «Ревертаза» – получение в промышленных масштабах обратной транскриптазы в СССР. С 1970 г. в нашей стране ведутся интенсивные исследования по селекции культур для непрерывного культивирования в промышленных целях.

Рождение нового направления в биологии – генетической инженерии – условно можно отнести к 1972 г., когда в лаборатории впервые была синтезирована рекомбинантная молекула ДНК, что окончательно закрепило биотехнологию в ряду современных наук. Работы выдающихся биологов Д. Беквита (США), Д. Гамова, К. Кораны, О. Эйвери, Ф. Жакобо, Ж. Моно (Франция), А. Баева, А. Белозерского, Ю. Овчинникова, Р. Петрова, А. Спирина, дополнили ряд важнейших открытий по идентификации генов, выделению молекул ДНК из микробных, растительных и животных клеток, расшифровке генетического кода.

3. Процессы промышленной биотехнологии разделяют на две большие группы по признаку целевого продукта: производство биомассы и получение продуктов метаболизма. Целевым продуктом первой группы является клеточная масса продуцента, вне зависимости от того, будет ли далее использоваться живая культура или биомасса нежизнеспособных клеток как источник белка, витаминов и других продуктов для кормопроизводства. Целевым продуктом второй группы являются метаболиты, а клетки продуцента не нужны или даже вредны после завершения биосинтеза; это продукты брожения, ферменты, аминокислоты, антибиотики, всевозможные виды микробных трансформаций. Биотехнологическое производство включает пять взаимосвязанных, но различных по целям и принципам достижения основных стадий:

- 1) подготовка сырья;
- 2) подготовка биологически действующего начала;
- 3) ферментация;
- 4) общий производственный цикл;

5) приготовление товарных форм продуктов.

4. Задачи биотехнологии заключаются в создании и освоении:

- новых биологически активных веществ (БАВ) и лекарственных препаратов (интерферонов, инсулина, гормонов, моноклональных антител), позволяющих осуществлять диагностику и лечение сердечнососудистых, злокачественных, наследственных, инфекционных, в том числе вирусных заболеваний;

- микробиологических средств защиты растений, бактериальных удобрений и регуляторов роста растений; новых продуктивных и устойчивых к неблагоприятным факторам внешней среды сортов и гибридов сельскохозяйственных растений;

- кормовых добавок и БАВ (кормового белка, аминокислот, ферментов, витаминов, ветеринарных препаратов) для повышения продуктивности животноводства; новых методов биоинженерии для профилактики, диагностики и терапии сельскохозяйственных животных;

- новых технологий получения продуктов для пищевой, химической и микробиологической промышленности;

- технологий переработки сельскохозяйственных, промышленных и бытовых отходов, использования сточных вод и газо-воздушных выбросов для получения биогаза и удобрений.

Трудности решения этих задач связаны с исключительной сложностью организации живого. Биообъект – это целостная система, где нельзя изменить ни один из элементов, не меня остальных, нельзя произвольно перекомбинировать их, придавая организму то или иное свойство, например, бактерии – способность к сверхсинтезу необходимой аминокислоты, культурному растению – устойчивость к фитопатогенным грибкам. Любое воздействие на биообъект вызывает не только желаемые, но и побочные эффекты; перестройка генома сказывается сразу на многих признаках организма.

5. Современная биотехнология привлекает внимание инвесторов не только в нашей стране, но и во всем мире. Эксперты и аналитики прогнозируют, что биотехнологии станут самым динамично развивающимся и самым прибыльным бизнесом нынешнего, XXI века.

Быстрыми темпами развиваются такие отрасли, как современные биологические методы защиты культурных растений, биоэнергетика и биodeградируемые полимеры, а также природоохранные биотехнологии. Ведутся научные работы по созданию новых биополимеров, в будущем они могут заменить ныне популярные ныне пластмассы.

Биополимеры имеют большое преимущество в сравнении с пластмассами, так как они нетоксичны и могут разлагаться после их применения, не загрязняя при этом окружающее пространство.

Конструирование необходимых генов даст возможность управлять жизнедеятельностью не только растений, но и животных, создавать новые организмы с иными свойствами.

Современные биотехнологии играют большую роль в качественном улучшении жизни человека, развитию экономического роста стран. Посредством биотехнологий получают новые средства для диагностики, вакцины, продукты питания, лекарства.

Биотехнология помогает в увеличении урожайности всех злаковых культур, что более чем актуально, принимая во внимание рост численности населения нашей планеты.

В некоторых странах, где значительные объемы биомассы не используются полностью, биотехнология в обозримом будущем превратит их в ценные продукты или в биологические виды топлива. Биотехнология все больше перестает быть прикладной наукой, она активно входит в обычную жизнь людей, помогая решать насущные проблемы современного человечества.

Биотехнологические способы производства позволяют снизить стоимость продуктов, сберечь ресурсы, уменьшить загрязнение окружающей среды. Мир переживает глобальный биотехнологический бум. Биотехнология из рядовой отрасли становится системообразующим фактором развития экономики отдельных государств и мировой экономики в целом. Появился даже специальный термин, обозначающий этот феномен, – биоэкономика, основанная на знаниях. В ведущих странах мира по инвестиционной привлекательности биотехнологии сегодня уступают лишь информационным технологиям. Скажем, в США 70 процентов финансирования науки расходуется на исследования в области биотехнологий, это более 100 млрд. долл. в год. В Китае эта цифра составляет свыше 1 млрд. долларов, в России – десятки миллионов долларов. В Евросоюзе проводится скоординированная, хорошо продуманная стратегия развития биотехнологии. Для ее реализации в 2000-2007 гг. было выделено более 30 млрд. евро, в 2008-2013 гг. еще более 50 млрд. Отличительная особенность европейского подхода к развитию биотехнологии – ярко выраженная экологическая направленность: к 2020 г. в ЕС до 20 % мощностей химической промышленности будет работать на биосырье, а Швеция в течение 10-12 лет планирует полностью отказаться от использования нефтепродуктов, перейдя на биотопливо.

В Китае ежегодные темпы роста биотехнологии – 16-18 %. Доход от ее развития только в 2006 г. составил 18,4 млрд. долларов. Уже сейчас страна занимает четвертое место в мире в области геномной инженерии растений, здесь функционируют около 200 научно-исследовательских центров и свыше 500 частных компаний. На ближайшие 15 лет биотехнология названа стратегическим приоритетом на государственном уровне.

Доля РФ в мировом объеме биотехнологической продукции на сегодняшний день не превышает 0,2 % (четверть века назад – 5 %). Для сравнения: доля США – 42%, Евросоюза – 22%, Китая – 10%, Индии – 2%.

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 0,1 %, а в 1985 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 белково-витаминные концентраты БВК, 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, 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 2012 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 и на основе результатов – научно разработанные рекомендации по питанию, физическим нагрузкам, образу жизни. Эта тема популярна в России и в мире.

От биоиндустрии, которая до начала 90-х гг. составляла нашу гордость, мало что осталось: с 1-2-го места в мире страна откатилась на 70-е. Большинство видов биотехнологической продукции Россия импортирует из других стран. Каждый второй выпускник вузов – специалист по молекулярной биологии – продолжает работу за рубежом.

Целая волна биотехнологической революции (связанной с агробиотехнологией) прошла мимо; РФ практически не участвовала в эпохальном свершении – расшифровке генома человека. Это был большой труд, в котором участвовало много лабораторий в разных странах мира. Одним из продуктов этих исследований стало появление технологии идентификации личности по ДНК, получение информации о родстве (установление отцовства). Но от прочтения генома ученые ожидали большего. Информация, зашифрованная в ДНК, огромна и ее изучение,

расшифровка еще сложнее, чем процедура исследований.

Свято место пусто не бывает: все, что производилось на отечественных предприятиях, закупаем сейчас в той же Америке. «Ножки Буша», например. Для быстрого наращивания массы птицы в корм вводят лизин. СССР был лидером по его производству и обгонял Америку в десять раз. Сегодня в России лизин вообще не выпускается, завозим его по импорту. Такая же ситуация и с медицинскими препаратами, производимыми на основе биотехнологий. До перестройки мы полностью обеспечивали себя антибиотиками. Сегодня почти все заводы по их производству либо устарели, либо вообще стоят.

Прежде всего, отечественная биотехнологическая промышленность должна полностью обеспечивать потребности здравоохранения всеми диагностическими и лекарственными препаратами от гепатитов, СПИДа, диабета и других заболеваний. Однако их лечение предполагает еще и использование так называемых комбинированных терапий. Поэтому при участии наших медицинских учреждений планируется создание специальные школы для обучения врачей. Пока это делают только крупнейшие западные компании, поставляющие на наш рынок свои препараты. Кроме того, отечественными предприятиями разработана программа, которая должна полностью обеспечить наше здравоохранение набором российских препаратов для лечения СПИДа. Стоимость курса будет составлять около тысячи долларов, в то время как применение импортных препаратов стоит десятки тысяч долларов. В данной ситуации государство могло бы гарантировать предприятиям, что если они вложат свои средства в создание таких препаратов, то государство будет их закупать.

Однако сейчас наступила пора принципиально иных подходов: развитие биотехнологии в РФ стало национальным проектом. В основу проекта «Развитие биотехнологии в Российской Федерации» была положена долгосрочная (до 2015 г.) комплексная программа, разработанная Обществом биотехнологов России. В ней были четко обозначены задачи общенационального уровня, которые должны решаться в приоритетном порядке. В число таких задач, отобранных путем тщательной независимой экспертизы, вошли: биоэнергетика, перевод химической промышленности на возобновляемое сырье, организация массового производства социально значимой биотехнологической продукции, прежде всего продуктов питания и лекарств, внедрение системы биоземледелия, формирование национальных биоресурсных центров. Программа охватила все сферы приложения практической биотехнологии: медицину, экологию, сельское хозяйство, лесное и рыбное хозяйство, пищевую индустрию, различные отрасли промышленности (химическую, горнодобывающую, легкую), то есть те сектора народного хозяйства, которые существенно влияют на развитие экономики и качество жизни населения. Важнейшая составляющая программы – фундаментальные исследования, нацеленные на решение проблем системной биологии, биоинформатики,

нанобиотехнологии и биобезопасности.

Деятельность в рамках перечисленных ниже программных областей направлена на содействие разработке согласованных на международной основе принципов, призванных обеспечить экологически безопасное использование биотехнологии, укрепить доверие и рассеять опасения общественности, содействовать становлению рациональных методов применения биотехнологии и обеспечить создание соответствующих стимулирующих механизмов, особенно в развивающихся странах. Речь идет о следующих областях:

- увеличение производства продуктов питания, кормов и возобновляемых сырьевых материалов; улучшение здоровья людей;
- повышение эффективности природоохранной деятельности;
- повышение безопасности и создание международных механизмов сотрудничества;
- создание механизмов, призванных содействовать разработке и экологически безопасному применению биотехнологии.

Биотехнологии – это лакмусовая бумажка, по которой уже в ближайшее время будут судить, входит ли страна в семейство цивилизованных высокоразвитых стран или нет. Надеемся, что Россия будет таковой.

6. В настоящее время биотехнологические процессы нашли целый ряд направлений, где могут успешно использоваться и используются. Это, прежде всего следующие направления:

- 1) Биотехнология и сельское хозяйство:
 - биотехнология и растениеводство;
 - биотехнология и животноводство;
- 2) Технологическая энергетика.
- 3) Биотехнология и медицина (гормоны, антибиотики, интерфероны, факторы крови, моноклональные антитела, вакцины).
- 4) Биотехнология и пищевая промышленность.
- 5) Биогеотехнология
- 6) Экологическая биотехнология.

7. Перспективы развития биотехнологий поражают воображение, а в ряде случаев вызывают страх и у людей. По поводу тех или иных исследований периодически разгораются дискуссии, и противники генной инженерии, клонирования организмов или исследования человеческого генома неоднократно требовали запретить все работы в этом направлении. Примером общественных протестов служит упоминавшаяся технология БВК.

Много страстей кипело вокруг генной инженерии. Люди опасались появления уродливых, непредсказуемых, всемогущих существ, созданных путем комбинации генов от несовместимых в природе видов. Фантастические произведения и фильмы способствовали распространению страхов.

Были и научно обоснованные возражения: генетически модифицированные организмы не изучены, употребление кукурузы и сои с модифицированными генами может вызвать болезни. В результате в Европе и России запрещено выращивание и использование ГМО.

Сейчас возникают споры о генной медицине, о клонировании организмов, об этических вопросах исследования стволовых клеток. На повестке дня – «биопринтер», при помощи которого признается возможным выращивание органов для трансплантации.

На исследования в этом направлении направляются огромные средства, прежде всего в США. Одновременно возникают опасения: вдруг возникнет тенденция выращивания клонов в качестве «идеальных доноров»?

Впрочем, на пути многих амбициозных и не слишком щепетильных в нравственном отношении проектов возникают препятствия, положенные самой природой.

Фантастические успехи от применения стволовых клеток для лечения и омоложения – и их перерождение в злокачественные опухоли; рождение клонированных животных – и их ранняя смерть, слабое здоровье.

Живая материя по-прежнему непостижима, несмотря на успехи в ее познании, и пределы человеческого вмешательства в ее основы – ограничены.

Перспективы биотехнологии на ближайшее будущее можно разделить на рекламные и научно обоснованные. К широко разрекламированным проектам относятся, например, «таблетки молодости», которые обещали выпустить на рынок как раз к 2020 году. Однако скептики говорят, что таких сенсаций было много, начиная со времен алхимии.

Более реалистично выглядит 3D принтер, наносящий клеточные культуры на матрицу с питательным раствором, и формирующий искусственные органы. Еще один медицинский проект – лечение тяжелых ожогов путем нанесения на пораженный участок стволовых клеток, которые в считанные дни образуют новую кожу.

Генетический ремонт – направление, которое развивается и будет развиваться, и в него инвестируются большие деньги.

Лекция 2. Промышленная микробиология

План

1. Микроорганизмы – продуценты первичных и вторичных метаболитов.

2. Основные стадии выращивания организмов-продуцентов и получение биотехнологической микробной продукции.

1. Микробная биотехнология (промышленная микробиология) – это интегральная по своей природе область науки и техники, которая опирается на теоретические и методические положения молекулярной биологии и генетики, биохимии, физиологии, а также использует

прогрессивные химические технологии.

Условно микробные производства можно разделить на три типа:

- основанные на использовании живой или инактивированной биомассы микроорганизмов. Сюда относится производство пекарских, винных и кормовых дрожжей, вакцин, БВК, средств защиты растений, заквасок для получения кисломолочных продуктов и силосования кормов, почвоудобрительных препаратов;

- производящие продукты микробного биосинтеза, к числу которых относятся антибиотики, гормоны, ферменты, аминокислоты, витамины;

- производства, основанные на получении продуктов брожения, гниения, например, утилизация целлюлозы и различных отходов с целью получения углеводов, биогаза, биоэтанола. Сюда же относятся получение спиртов, органических кислот, растворителей, а также биотехнология утилизации неприродных соединений.

После внесения культуры в питательную среду наблюдается лаг-фаза, когда видимого роста микроорганизмов не происходит; этот период можно рассматривать как время адаптации. Затем скорость роста постепенно увеличивается, достигая постоянной, максимальной для данных условий величины; такой период максимального роста называется экспоненциальной, или логарифмической, фазой. Постепенно рост замедляется, и наступает т.н. стационарная фаза. Далее число жизнеспособных клеток уменьшается, и рост останавливается. Следуя описанной выше кинетике, можно проследить за образованием метаболитов на разных этапах. В логарифмической фазе образуются продукты, жизненно важные для роста микроорганизмов: аминокислоты, нуклеотиды, белки, нуклеиновые кислоты, углеводы и т.д. Их называют первичными метаболитами. Многие первичные метаболиты представляют значительную ценность. Так, глутаминовая кислота (точнее, ее натриевая соль) входит в состав многих пищевых продуктов; лизин используется как пищевая добавка; фенилаланин является предшественником заменителя сахара аспартама. Первичные метаболиты синтезируются природными микроорганизмами в количествах, необходимых лишь для удовлетворения их потребностей. Поэтому задача промышленных микробиологов состоит в создании мутантных форм микроорганизмов-сверхпродуцентов соответствующих веществ. В этой области достигнуты значительные успехи: например, удалось получить микроорганизмы, которые синтезируют аминокислоты вплоть до концентрации 100 г/л (для сравнения – организмы дикого типа накапливают аминокислоты в количествах, исчисляемых миллиграммами).

В фазе замедления роста и в стационарной фазе некоторые микроорганизмы синтезируют вещества, не образующиеся в логарифмической фазе и не играющие явной роли в метаболизме. Эти вещества называют вторичными метаболитами. Их синтезируют не все

микрорганизмы, а в основном нитчатые бактерии, грибы и спорообразующие бактерии. Таким образом, продуценты первичных и вторичных метаболитов относятся к разным таксономическим группам. Если вопрос о физиологической роли вторичных метаболитов в клетках-продуцентах был предметом серьезных дискуссий, то их промышленное получение представляет несомненный интерес, так как эти метаболиты являются биологически активными веществами: одни из них обладают антимикробной активностью, другие являются специфическими ингибиторами ферментов, третьи – ростовыми факторами, многие обладают фармакологической активностью. Получение такого рода веществ послужило основой для создания целого ряда отраслей микробиологической промышленности. Первым в этом ряду стало производство пенициллина; микробиологический способ получения пенициллина был разработан в 1940-х годах и заложил фундамент современной промышленной биотехнологии.

2. Во всех случаях процесс ферментации разделяется на шесть основных этапов.

Создание среды. Прежде всего, необходимо выбрать соответствующую культуральную среду. Микроорганизмы для своего роста нуждаются в органических источниках углерода, подходящем источнике азота и различных минеральных веществах. Составление и оптимизация ростовой среды являются весьма сложным процессом, а рецепты промышленных сред – ревниво оберегаемым секретом.

Стерилизация. Среду необходимо стерилизовать, чтобы уничтожить все загрязняющие микроорганизмы. Сам ферментер и вспомогательное оборудование тоже стерилизуют. Существует два способа стерилизации: прямая инъекция перегретого пара и нагревание с помощью теплообменника.

Получение культуры. Прежде чем начать процесс ферментации, необходимо получить чистую высокопродуктивную культуру. Чистые культуры микроорганизмов хранят в очень небольших объемах и в условиях, обеспечивающих ее жизнеспособность и продуктивность; обычно это достигается хранением при низкой температуре. Ферментер может вмещать несколько сотен тысяч литров культуральной среды, и процесс начинают, вводя в нее культуру (инокулят), составляющей 1-10% объема, в котором будет идти ферментация. Совершенно необходимо все это время поддерживать чистоту культуры, не допуская ее заражения посторонними микроорганизмами.

Рост в промышленном ферментере (биореакторе). Промышленные микроорганизмы должны расти в ферментере при оптимальных для образования требуемого продукта условиях. Эти условия строго контролируют, следя за тем, чтобы они обеспечивали рост микроорганизмов и синтез продукта. Конструкция ферментера должна позволять регулировать условия роста – постоянную температуру, рН (кислотность или щелочность) и концентрацию растворенного в среде

кислорода. Обычный ферментер представляет собой закрытый цилиндрический резервуар, в котором механически перемешиваются среда и микроорганизмы. Через среду прокачивают воздух, иногда насыщенный кислородом. Температура регулируется с помощью воды или пара, пропускаемые по трубкам теплообменника.

Выделение и очистка продуктов. По завершении ферментации в бульоне присутствуют микроорганизмы, неиспользованные питательные компоненты среды, различные продукты жизнедеятельности микроорганизмов и тот продукт, который желали получить в промышленном масштабе. Поэтому данный продукт очищают от других составляющих бульона. Приходится прибегать к сложным методам выделения – экстрагированию растворителем, хроматографии и ультрафильтрации.

Переработка и ликвидация отходов ферментации. При любых промышленных микробиологических процессах образуются отходы: бульон (жидкость, оставшаяся после экстракции продукта производства); клетки использованных микроорганизмов; грязная вода, которой промывали установку; вода, применявшаяся для охлаждения; вода, содержащая в следовых количествах органические растворители, кислоты и щелочи. Жидкие отходы содержат много органических соединений; если их сбрасывать в реки, они будут стимулировать интенсивный рост естественной микробной флоры, что приведет к обеднению речных вод кислородом и созданию анаэробных условий. Поэтому отходы перед удалением подвергают биологической обработке, чтобы уменьшить содержание органического углерода.

Лекция 3. Биоиндустрия ферментов

План

1. Источники ферментов.
2. Технология культивирования продуцентов ферментов, выделения и очистки ферментов.
3. Имобилизованные ферменты: носители для иммобилизации ферментов, методы иммобилизации ферментов, иммобилизация клеток, промышленные процессы с использованием иммобилизованных ферментов и клеток.

1. Ферменты были выявлены во всех видах живых организмов. Большинство ферментов имеют значение только с научной или медицинской точки зрения, однако, некоторые из них используются в сельскохозяйственных и промышленных целях уже многие годы. Важно отметить, что животные, растения и микроорганизмы синтезируют большое количество ферментов, используемых в промышленности. Некоторые ферменты животного или растительного происхождения используются и в сельском хозяйстве, однако, чаще других используются ферменты, имеющие микробиологическое происхождение.

Источниками ферментов могут быть, например:

- растения: осоложенное зерно или клубни картофеля – амилаза; ананас – бромелин (протеаза); фиговое дерево – пинин (протеаза); папайя – папаин (протеаза);

- животные: печень – каталаза; желудок телят (сычуг) – химозин; свиной желудок – пепсин (протеаза); свиная поджелудочная железа – инсулиновые ферменты (несколько);

- грибы (плесневые и дрожжевые) – амилаза, в-глюконаза, гемицеллюлаза, протеаза, целлюлаза, пектиназа, липаза (несколько подвидов), лактаза;

- бактерии – амилаза, протеаза, изомераза, лактаза (несколько подвидов), оксидаза, каталаза, в-глюканаза, гемицеллюлаза.

2. Микробиальные ферменты производятся выращиванием микробиальных клеток в специальных условиях, чтобы клетки производили максимальный объем активных ферментов. Для сохранения целостности большого количества ферментов важно контролировать условия окружающей среды при производстве.

После прекращения роста бактериальных клеток и производства ими ферментов, они разделяются специально разработанными методами. Ферменты проходят дополнительную очистку, до нужного состояния.

В зависимости от степени обработки и набора содержащихся ферментов, ферментативные продукты обозначаются следующим образом:

Сухой _____ Экстракт ферментации

Сухой _____ Растворимые ферменты

Сухой _____ Продукт ферментации

Жидкий _____ Продукт ферментации

Систематическое микроорганизма, использованного для производства продукта, указывается на месте пропусков.

3. Ферменты – вещества белковой природы и поэтому неустойчивы при хранении, а также чувствительны к тепловым воздействиям. Кроме того, ферменты не могут быть использованы многократно из-за трудностей в отделении их от реагентов и продуктов реакции. Решить эти проблемы помогает создание иммобилизованных ферментов. Начало этому методу было положено в 1916 году, когда Дж. Нельсон и Е. Гриффин адсорбировали на угле инвертазу и показали, что она сохраняет в таком виде каталитическую активность. Сам термин «иммобилизованные» ферменты узаконен в 1971 году и означает любое ограничение свободы передвижения белковых молекул в пространстве.

Сущность иммобилизации ферментов – прикрепление их в активной форме к нерастворимой основе или заключение в полупроницаемую мембранную систему. Прикрепление фермента к носителю осуществляется адсорбционно, химической связью, или путем механического включения фермента в органический или неорганический гель (в капсулу и т. п.). При этом допускается прикрепление фермента только за счет функциональных групп, не входящих в активный центр фермента и не участвующих в

образовании фермент-субстратного комплекса. Носитель фермента, или матрица, может иметь вид зернистого материала, волокнистой структуры, пластинчатой поверхности, пленок или тканей, полых волокон, трубочек, капсул и т. д. Имеет значение размер частиц носителя. Важно иметь большую поверхность, поэтому рекомендуются небольшие частицы диаметром 0,1—0,2 мм. Носителем фермента может быть как природное вещество, так и синтетический полимер.

Преимущества иммобилизованных ферментов перед альтернативными предшественниками:

1. Гетерогенный катализатор легко отделим от реакционной среды, что дает возможность остановить реакцию в любой момент, использовать фермент повторно, а также получать чистый от фермента продукт.

2. Ферментативный процесс с использованием иммобилизованных ферментов можно проводить непрерывно, регулируя скорость катализируемой реакции и выход продукта.

3. Модификация фермента целенаправленно изменяет его свойства, такие как специфичность (особенно в отношении макромолекулярного субстрата), зависимость каталитической активности от pH, ионного состава и других параметров среды, стабильность к денатурирующим воздействиям.

4. Можно регулировать каталитическую активность иммобилизованных ферментов путем изменения свойств носителя действием физических факторов, таких как свет и звук.

Для получения иммобилизованных ферментов используется ограниченное число как органических, так и неорганических носителей. К носителям предъявляются следующие требования: высокая химическая и биологическая стойкость; высокая химическая прочность; достаточная проницаемость для фермента и субстратов, пористость, большая удельная поверхность; возможность получения в виде удобных в технологическом отношении форм (гранул, мембран); легкая активация; высокая гидрофильность; невысокая стоимость.

Классификация носителей схематично представлена на рисунке 1.

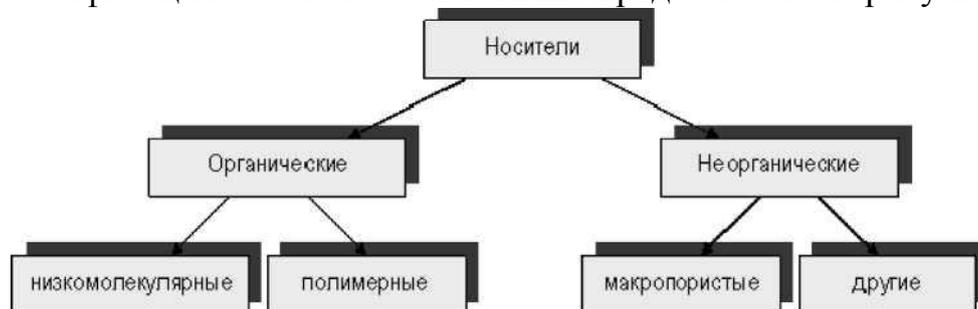


Рис. 1. Классификация носителей для иммобилизованных ферментов

Для иммобилизации ферментов наиболее широко используются природные полисахариды и синтетические носители полиметильного типа, остальные применяются значительно реже. Большое значение природных

полимеров в качестве носителей для иммобилизации объясняется их доступностью и наличием реакционноспособных функциональных групп, легко вступающих в химические реакции. Наиболее часто для иммобилизации используются такие полисахариды, как целлюлоза, декстран, агароза и их производные.

Существует два основных метода иммобилизации ферментов: физический и химический.

Физическая иммобилизация ферментов представляет собой включение фермента в такую среду, в которой для него доступной является лишь ограниченная часть общего объема. При физической иммобилизации фермент не связан с носителем ковалентными связями. Существует четыре типа связывания ферментов: адсорбция на нерастворимых носителях; включение в поры геля; пространственное отделение фермента от остального объема реакционной системы с помощью полупроницаемой перегородки (мембраны); включение в двухфазную среду, где фермент растворим, и может находиться только в одной из фаз.

Перечисленные подходы показаны на рисунке 2.

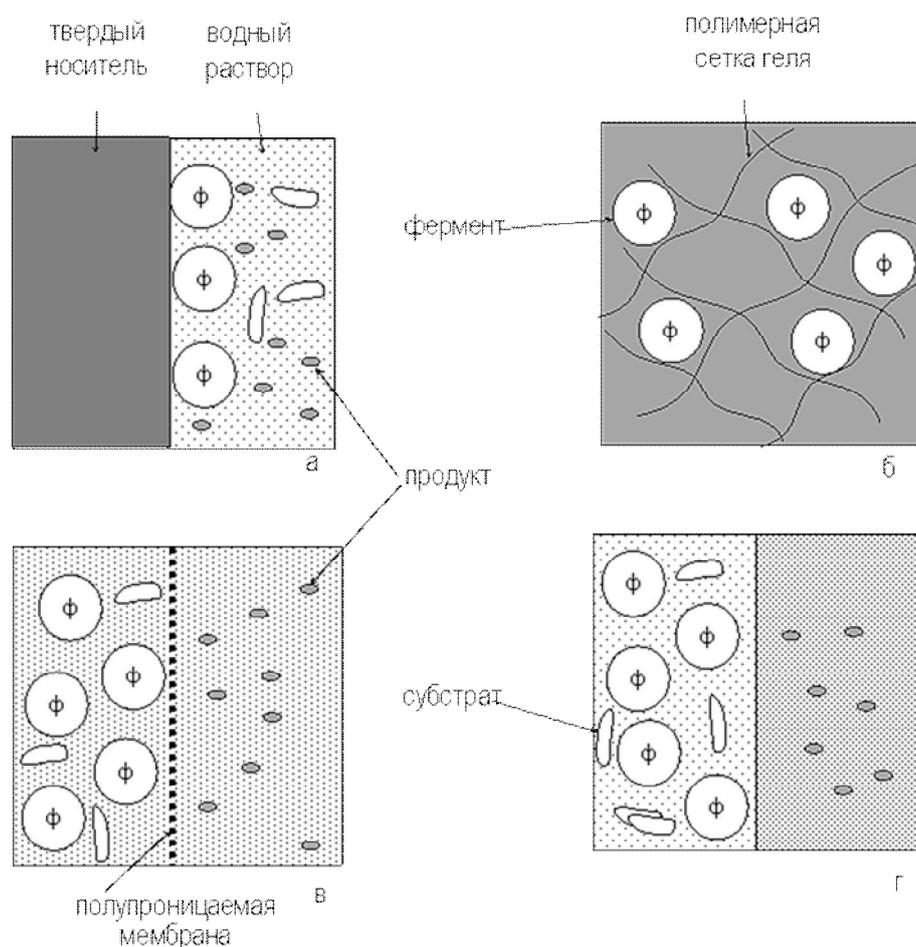


Рис. 2. Способы иммобилизации ферментов:

- а – адсорбция на нерастворимых носителях;
- б – включение в поры геля;
- в – отделение фермента с помощью полупроницаемой мембраны;
- г – использование двухфазной реакционной среды.

Применение иммобилизованных ферментов

Особенно ошутимый вклад иммобилизованные ферменты внесли в тонкий органический синтез, в анализ, в медицину, в процессы конверсии энергии, в пищевую и фармацевтическую промышленность.

В будущем важную роль в контроле окружающей среды и в клинической диагностике должны сыграть такие методы, как биолюминесцентный анализ и иммуноферментный анализ.

В медицине иммобилизованные ферменты открыли путь к созданию лекарственных препаратов пролонгированного действия со сниженной токсичностью и аллергенностью. Иммобилизационные подходы способствуют решению проблемы направленного транспорта лекарств в организме.

Заслуживает внимание и использование иммобилизованных ферментов в процессах переработки лигноцеллюлозного сырья.

Промышленные процессы с применением иммобилизованных ферментов внедрены, прежде всего, в пищевую и фармацевтическую промышленность. В пищевой промышленности с участием иммобилизованных ферментов идут процессы получения глюкозо-фруктовых сиропов, глюкозы, яблочной и аспарагиновой кислоты, оптически активных L-аминокислот, диетического безлактозного молока, сахаров из молочной сыворотки и др. В медицине иммобилизованные ферменты используются также как лекарственные препараты, особенно в тех случаях, когда необходимо локальное воздействие.

Лекция 4. Основы генетической и клеточной инженерии

План

1. Возможности генетической и клеточной инженерии.
2. Методы генной инженерии.
3. История генной инженерии.
4. Клеточная инженерия.

1. Важной составной частью биотехнологии является генетическая инженерия. Родившись в начале 70-х годов, она добилась сегодня больших успехов. Методы генной инженерии преобразуют клетки бактерий, дрожжей и млекопитающих в «фабрики» для масштабного производства любого белка. Это дает возможность детально анализировать структуру и функции белков и использовать их в качестве лекарственных средств.

В настоящее время кишечная палочка (*E. coli*) стала поставщиком таких важных гормонов как инсулин и соматотропин. Ранее инсулин получали из клеток поджелудочной железы животных, поэтому стоимость его была очень высока. Для получения 100 г. кристаллического инсулина требуется 800-1000 кг поджелудочной железы, а одна железа коровы весит 200-250 грамм. Это делало инсулин дорогим и труднодоступным для широкого круга диабетиков. В 1978 году исследователи из компании «Genentec» впервые получили инсулин в специально сконструированном

штамме кишечной палочки. Инсулин состоит из двух полипептидных цепей б и в длиной в 20 и 30 аминокислот. При соединении их дисульфидными связями образуется нативный двухцепочечный инсулин. Было показано, что он не содержит белков *E. coli*, эндотоксинов и других примесей, не дает побочных эффектов, как инсулин животных, а по биологической активности от него не отличается. Впоследствии в клетках *E. coli* был осуществлен синтез проинсулина. После очистки полученного проинсулина его расщепили и получили нативный инсулин, при этом этапы экстракции и выделения гормона были сведены к минимуму. Из 1000 литров культуральной жидкости можно получать до 200 граммов гормона, что эквивалентно количеству инсулина, выделяемого из 1600 кг поджелудочной железы свиньи или коровы.

Соматотропин – гормон роста человека, секретируемый гипофизом. Недостаток этого гормона приводит к гипофизарной карликовости. Если вводить соматотропин в дозах 10 мг на 1 кг веса три раза в неделю, то за год ребенок, страдающий от его недостатка, может подрасти на 6 см. Ранее его получали из трупного материала, из одного трупа: 4-6 мг соматотропина в пересчете на конечный фармацевтический препарат. Таким образом, доступные количества гормона были ограничены, кроме того, гормон, получаемый этим способом, был неоднороден и мог содержать медленно развивающиеся вирусы. Компания «Genentec» в 1980 году разработала технологию производства соматотропина с помощью бактерий, который был лишен перечисленных недостатков. В 1982 году гормон роста человека был получен в культуре *E. coli* и животных клеток в институте Пастера во Франции, а с 1984 года начато промышленное производство инсулина и в СССР. При производстве интерферона используют как *E. coli*, *S. cerevisiae* (дрожжи), так и культуру фибробластов или трансформированных лейкоцитов. Аналогичными методами получают также безопасные и дешевые вакцины.

На технологии рекомбинантных ДНК основано получение высокоспецифичных ДНК-зондов, с помощью которых изучают экспрессию генов в тканях, локализацию генов в хромосомах, выявляют гены, обладающие родственными функциями (например, у человека и курицы). ДНК-зонды также используются в диагностике различных заболеваний. Технология рекомбинантных ДНК сделала возможным нетрадиционный подход «белок-ген», получивший название «обратная генетика». При таком подходе из клетки выделяют белок, клонируют ген этого белка, модифицируют его, создавая мутантный ген, кодирующий измененную форму белка. Полученный ген вводят в клетку. Если он экспрессируется, несущая его клетка и ее потомки будут синтезировать измененный белок. Таким образом, можно исправлять дефектные гены и лечить наследственные заболевания.

Если гибридную ДНК ввести в оплодотворенную яйцеклетку, могут быть получены трансгенные организмы, экспрессирующие мутантный ген и передающие его потомками. Генетическая трансформация животных

позволяет установить роль отдельных генов и их белковых продуктов, как в регуляции активности других генов, так и при различных патологических процессах. С помощью генетической инженерии созданы линии животных, устойчивых к вирусным заболеваниям, а также породы животных с полезными для человека признаками. Например, микроинъекция рекомбинантной ДНК, содержащей ген соматотропина быка в зиготу кролика, позволила получить трансгенное животное с гиперпродукцией этого гормона. Полученные животные обладали ярко выраженной акромегалией. Сейчас трудно даже предсказать все возможности, которые будут реализованы в ближайшие несколько десятков лет.

2. Генетическая инженерия – конструирование *in vitro* функционально активных генетических структур (рекомбинантных ДНК), или иначе – создание искусственных генетических программ (Баев А.А.). По Э.С. Пирузян генетическая инженерия – система экспериментальных приемов, позволяющих конструировать лабораторным путем (в пробирке) искусственные генетические структуры в виде так называемых рекомбинантных или гибридных молекул ДНК.

Генетическая инженерия – получение новых комбинаций генетического материала путем проводимых вне клетки манипуляций с молекулами нуклеиновых кислот и переноса созданных конструкций генов в живой организм, в результате которого достигается их включение и активность в этом организме и у его потомства. При этом рекомбинантные ДНК становятся составной частью генетического аппарата реципиентного организма и сообщают ему новые уникальные генетические, биохимические, а затем и физиологические свойства.

Цель прикладной генетической инженерии заключается в конструировании таких рекомбинантных молекул ДНК, которые при внедрении в генетический аппарат придавали бы организму свойства, полезные для человека. Например, получение «биологических реакторов» – микроорганизмов, растений и животных, продуцирующих фармакологически значимые для человека вещества, создание сортов растений и пород животных с определёнными ценными для человека признаками. Методы генной инженерии позволяют провести генетическую паспортизацию, диагностировать генетические заболевания, создавать ДНК-вакцины, проводить генотерапию различных заболеваний.

Технология рекомбинантных ДНК использует следующие методы:

- специфическое расщепление ДНК рестрицирующими нуклеазами, ускоряющее выделение и манипуляции с отдельными генами;
- быстрое секвенирование всех нуклеотидов очищенном фрагменте ДНК, что позволяет определить границы гена и аминокислотную последовательность, кодируемую им;
- конструирование рекомбинантной ДНК;
- гибридизация нуклеиновых кислот, позволяющая выявлять специфические последовательности РНК или ДНК с большей точностью и

чувствительностью, основанную на их способности связывать комплементарные последовательности нуклеиновых кислот;

- клонирование ДНК: амплификация *in vitro* с помощью цепной полимеразной реакции или введение фрагмента ДНК в бактериальную клетку, которая после такой трансформации воспроизводит этот фрагмент в миллионах копий;

- введение рекомбинантной ДНК в клетки или организмы.

3. Генная инженерия появилась благодаря работам многих исследователей в разных отраслях биохимии и молекулярной генетики. На протяжении многих лет главным классом макромолекул считали белки. Существовало даже предположение, что гены имеют белковую природу. Лишь в 1944 году Эйвери, Мак Леод и Мак Карти показали, что носителем наследственной информации является ДНК. С этого времени начинается интенсивное изучение нуклеиновых кислот. Спустя десятилетие, в 1953 году Дж. Уотсон и Ф. Крик создали двуспиральную модель ДНК. Именно этот год принято считать годом рождения молекулярной биологии.

На рубеже 50 - 60-х годов были выяснены свойства генетического кода, а к концу 60-х годов его универсальность была подтверждена экспериментально. Шло интенсивное развитие молекулярной генетики, объектами которой стали *E. coli*, ее вирусы и плазмиды. Были разработаны методы выделения высокоочищенных препаратов неповрежденных молекул ДНК, плазмид и вирусов.

Формально датой рождения генетической инженерии следует считать 1972 год, когда в Стенфордском университете П. Берг, С. Коэн, Х. Бойер с сотрудниками создали первую рекомбинантную ДНК, содержащую фрагменты ДНК вируса SV40, бактериофага и *E. coli*.

Историю развития генетической инженерии можно условно разделить на три этапа. Первый этап связан с доказательством принципиальной возможности получения рекомбинантных молекул ДНК *in vitro*. Эти работы касаются получения гибридов между различными плазмидами. Второй этап связан с началом работ по получению рекомбинантных молекул ДНК между хромосомными генами прокариот и различными плазмидами, доказательством их стабильности и жизнеспособности. Третий этап – начало работ по включению в векторные молекулы ДНК (ДНК, используемые для переноса генов и способные встраиваться в генетический аппарат клетки-реципиента) генов эукариот, главным образом, животных.

4. Клеточная инженерия – совокупность методов, используемых для конструирования новых клеток. Включает культивирование и клонирование клеток на специально подобранных средах, гибридизацию клеток, пересадку клеточных ядер и другие микрохирургические операции по «разборке» и «сборке» (реконструкции) жизнеспособных клеток из отдельных фрагментов.

Начало клеточной инженерии относят к 1960-м гг., когда возник метод гибридизации соматических клеток. К этому времени были

усовершенствованы способы культивирования животных клеток и появились способы выращивания в культуре клеток и тканей растений. Соматическую гибридизацию, т.е. получение гибридов без участия полового процесса, проводят, культивируя совместно клетки различных линий одного вида или клетки различных видов. При определённых условиях происходит слияние двух разных клеток в одну гибридную, содержащую оба генома объединившихся клеток.

Преимущество клеточной инженерии в том, что она позволяет экспериментировать с клетками, а не с целыми организмами. Последнее гораздо сложнее, а иногда и невозможно, особенно в случае млекопитающих животных и человека или при получении отдалённых гибридов. Методы клеточной инженерии в медицине, сельском хозяйстве или биотехнологии часто применяют в сочетании с генной инженерией.

Лекция 5. Биотехнологии в сельском хозяйстве

План

1. Биотехнология и растениеводство.
2. Биотехнология и животноводство.
3. Использование эффективных микроорганизмов в сельском хозяйстве (ЭМ-технология).

1. Культурные растения страдают от сорняков, грызунов, насекомых-вредителей, нематод, фитопатогенных грибов, бактерий, вирусов, неблагоприятных погодных и климатических условий. Перечисленные факторы наряду с почвенной эрозией и градом значительно снижают урожайность сельскохозяйственных растений. Известно, какие разрушительные последствия в картофелеводстве вызывает колорадский жук, а также гриб *Phytophthora* – возбудитель ранней гнили (фитофтороза) картофеля. Кукуруза подвержена опустошительным «набегам» южной листовой гнили, ущерб от которой в США в 1970 г. был оценен в 1 млрд. долларов.

В последние годы большое внимание уделяют вирусным заболеваниям растений. Наряду с болезнями, оставляющими видимые следы на культурных растениях (мозаичная болезнь табака и хлопчатника, зимняя болезнь томатов), вирусы вызывают скрытые инфекционные процессы, значительно снижающие урожайность сельскохозяйственных культур и ведущие к их вырождению.

Биотехнологические пути защиты растений от рассмотренных вредоносных агентов включают:

- 1) выведение сортов растений, устойчивых к неблагоприятным факторам;
- 2) химические средства борьбы (пестициды) с сорняками (гербициды), грызунами (ратициды), насекомыми (инсектициды), нематодами (нематоциды), фитопатогенными грибами (фунгициды), бактериями, вирусами;
- 3) биологические средства борьбы с вредителями, использование

их естественных врагов и паразитов, а также токсических продуктов, образуемых живыми организмами.

Наряду с защитой растений ставится задача повышения продуктивности сельскохозяйственных культур, их пищевой (кормовой) ценности, задача создания сортов растений, растущих на засоленных почвах, в засушливых и заболоченных районах. Разработки нацелены на повышение энергетической эффективности различных процессов в растительных тканях, начиная от поглощения кванта света и кончая ассимиляцией CO₂ и водно-солевым обменом.

1.1. Выведение новых сортов растений. Традиционные подходы к выведению новых сортов растений – это селекция на основе гибридизации, спонтанных и индуцированных мутаций. Методы селекции не столь отдаленного будущего включают генетическую и клеточную инженерию.

Генетическую инженерию предлагают использовать для выведения азотфиксирующих растений. В природных условиях азотфиксирующие клубеньковые бактерии, представители рода *Rhizobium*, вступают в симбиоз с бобовыми. Комплекс генов азотфиксации (*nif*) из этих или иных бактерий предлагают включить в геном злаковых культур.

Разрабатываются подходы к межвидовому переносу генов, обуславливающих устойчивость растений к нехватке влаги, жаре, холоду, засоленности почвы. Перспективы повышения эффективности биоконверсии энергии света связаны с модификацией генов, отвечающих за световые и темновые стадии этого процесса, в первую очередь генов, регулирующих фиксацию CO₂ растением.

Гены устойчивости к некоторым гербицидам, выделенные из бактерий и дрожжей, были успешно перенесены в растения табака. Разведение устойчивых к гербицидам растений открывает возможность их применения для уничтожения сорняков непосредственно на угодьях, занятых сельскохозяйственными культурами. Проблема состоит, однако, в том, что массивные дозы гербицидов могут оказаться вредными для природных экосистем.

Некоторые культурные растения сильно страдают от нематод. Обсуждается проект введения в растения новых генов, обуславливающих биосинтез и выделение нематоцидов корневыми клетками. Важно, чтобы эти нематоциды не проявляли токсичности по отношению к полезной прикорневой микрофлоре.

1.2. Клонирование. Важное место в выведении новых сортов растений занимает метод культивирования растительных клеток *in vitro*. Регенерируемая из таких клеток «молодая поросль» состоит из идентичных по генофонду экземпляров, сохраняющих ценные качества избранного клеточного клона. В Австралии из культивируемых *in vitro* клеточных клонов выращивают красные камедные деревья (австралийские эвкалипты), отличающиеся способностью расти на засоленных почвах. Предполагается, что корни этих растений будут выкачивать воду из таких почв и тем самым понижать уровень грунтовых вод. Это приведет к снижению засоленности

поверхностных слоев почвы в результате переноса минеральных солей в более глубокие слои с потоками дождевой воды. В Малайзии из клеточного клона получена масличная пальма с повышенной устойчивостью к фитопатогенам и увеличенной способностью к образованию масла (прирост на 20-30 %). Клонирование клеток с последующим их скринингом и регенерацией растений из отобранных клонов рассматривают как важный метод сохранения и улучшения древесных пород умеренных широт, в частности хвойных деревьев. Растения-регенеранты, выращенные из клеток или тканей меристемы, используют ныне для разведения спаржи, земляники, брюссельской и цветной капусты, гвоздик, папоротников, персиков, ананасов, бананов.

С клонированием клеток связывают надежды на устранение вирусных заболеваний растений. Разработаны методы, позволяющие получать регенеранты из тканей верхушечных почек растений. В дальнейшем среди регенерированных растений проводят отбор особей, выращенных из незараженных клеток, и выбраковку больных растений. Раннее выявление вирусного заболевания, необходимое для подобной выбраковки, может быть осуществлено методами иммунодиагностики, с использованием моноклональных антител или методом ДНК/РНК-проб. Клонирование клеток – перспективный метод получения не только новых сортов, но и промышленно важных продуктов. При правильном подборе условий культивирования, в частности при оптимальном соотношении фитогормонов, изолированные клетки более продуктивны, чем целые растения. Имобилизация растительных клеток или протопластов нередко ведет к повышению их синтетической активности.

Таким образом, биотехнология открывает широкие перспективы в области выведения новых сортов растений, устойчивых к неблагоприятным внешним воздействиям, вредителям, патогенам, не требующих азотных удобрений, отличающихся высокой продуктивностью.

1.3. Биodeградация пестицидов. Пестициды обладают мощным, но недостаточно избирательным действием. Так, гербициды, смываясь дождевыми потоками или почвенными водами на посевные площади, наносят ущерб сельскохозяйственным культурам. Помимо этого, некоторые пестициды длительно сохраняются в почве, что тоже приводит к потерям урожая. Возможны разные подходы к решению проблемы:

- 1) усовершенствование технологии применения пестицидов, что не входит в компетенцию биотехнологии;
- 2) выведение растений, устойчивых к пестицидам; биodeградация пестицидов в почве.

К разрушению многих пестицидов способна микрофлора почвы. Методами генетической инженерии сконструированы штаммы микроорганизмов с повышенной эффективностью биodeградации ядохимикатов, в частности штамм *Pseudomonas ceparia*, разрушающий 2,4,5-трихлорфеноксиацетат. Устойчивость того или иного пестицида в почве меняется при добавлении его в сочетании с другим пестицидом. Так,

устойчивость гербицида хлорпрофама увеличивается при его внесении совместно с инсектицидами из группы метилкарбаматов. Оказалось, что метилкарбаматы ингибируют микробные ферменты, катализирующие гидролиз хлорпрофама.

Микробная трансформация пестицидов имеет и обратную сторону. Во-первых, быстрая деградация пестицидов сводит на нет их полезный эффект. Во-вторых, в результате микробного превращения могут образоваться продукты, сильно ядовитые для растений. При использовании гербицида тиобенкарба в Японии наблюдали подавление роста и развития риса. Установлено, что подавляет не сам гербицид, а его дехлорированное производное S-бензил-N,N-диэтилтиокарбамат. Чтобы предотвратить образование такого производного, тиобенкарб применяют в комбинации с метоксифеном, ингибитором дехлорирующего фермента микроорганизмов.

1.4. Биологическая защита растений от вредителей и патогенов. Из широкого спектра биологических средств защиты растений ограничимся рассмотрением средств борьбы с насекомыми-вредителями и патогенными микроорганизмами. Именно в этих областях имеются наибольшие перспективы.

К традиционным биологическим средствам, направленным против насекомых, принадлежат хищные насекомые. В последние годы арсенал «оружия» инсектицидного действия пополнен грибами, бактериями, вирусами, патогенными для насекомых (энтомопатогенными). Многие виды насекомых-вредителей (тля, колорадский жук, яблоневая плодожорка, озимая совка и др.) восприимчивы к заболеванию, вызываемому грибом *Beauveria bassiana*. Препарат боверин из лиофильно высушенных конидий гриба сохраняет энтомопатогенность в течение года после обработки почвы или растений. Препарат пецилолин из гриба *Poecilomyces fumoso-roseus* применяют для борьбы с вредителями кустарников, например, смородины.

Важным источником бактериальных энтомопатогенных препаратов служит *Bacillus thuringiensis*. Эти препараты обладают высокой устойчивостью и патогенны для нескольких сотен видов насекомых-вредителей, в том числе для листогрызущих насекомых – вредителей яблонь, винограда, капусты, лесных деревьев. Гены, отвечающие за синтез одного из токсинов *B.thuringiensis*, были изолированы и перенесены в растения табака. Необходимо, чтобы такие «энтомопатогенные» растения не содержали веществ, токсичных для человека и животных.

Вирусные препараты отличаются высокой специфичностью действия, длительным (до 10-15 лет) сохранением активности, устойчивостью к колебаниям температуры и влажности. Из многих сотен известных энтомопатогенных вирусов наибольшее применение находят вирусы ядерного полиэдроза, которые обладают высокой эффективностью действия на насекомых-вредителей. Насекомых выращивают в искусственных условиях, заражают вирусом, из гомогенатов погибших насекомых готовят препараты. Применяют отечественные препараты вирин-ЭКС (против капустной совки), вирин-ЭНШ (против непарного шелкопряда). В

последние годы для культивирования вирусов широко применяют культуры клеток насекомых.

Комбинация из нескольких биологических средств нередко действует на вредителей более эффективно, чем каждый в отдельности. Смертность соснового шелкопряда резко возрастает, если вирус цитоплазматического полиэдроза применяют в сочетании с препаратами из *Bac. thuringiensis*. Эффективна комбинация биологических и химических средств защиты растений от насекомых.

Среди новых средств защиты растений – вещества биогенного происхождения, ингибирующие откладку яиц насекомыми или стимулирующие активность естественных врагов насекомых вредителей: хищников, паразитов.

Разнообразны средства защиты растений от фитопатогенных микроорганизмов:

1. Антибиотики. Примерами могут служить триходермин и трихотецин, продуцируемые грибами *Trichoderma sp.* и *Trichotecium roseum*. Эти антибиотики используются для борьбы с корневыми гнилями овощных, зерновых и технических культур.

2. Фитоалексины, естественные растительные агенты, инактивирующие микробных возбудителей заболеваний. Эти соединения, синтезируемые в тканях растений в ответ на внедрение фитопатогенов, могут служить высокоспецифичными заменителями пестицидов. Фитоалексин перца успешно применяли при фитофторозе. Могут быть использованы также вещества, стимулирующие синтез фитоалексинов в растительных тканях.

3. Использование микробов-антагонистов, вытесняющих патогенный вид и подавляющих его развитие.

4. Иммунизация и вакцинация растений. Вакцинные препараты стремятся вводить непосредственно в прорастающие семена.

5. Введение в ткани растений специфического агента (d-фактора), снижающего жизнеспособность возбудителя.

Биологические средства – важная составная часть комплексной программы защиты растений. Эта программа предусматривает проведение защитных мероприятий агротехнического, биологического и химического плана наряду с использованием устойчивых сортов растений. Задачей комплексной программы является поддержание численности вредителей растений на экологически сбалансированном уровне, не наносящем ощутимого вреда культурным растениям.

1.5. Биологические удобрения. Биологические (бактериальные) удобрения применяют для обогащения почвы связанным азотом. Большое распространение получили препараты нитрагин и азотобактерин – клетки клубеньковых бактерий и азотобактера, к которым добавляют стабилизаторы (мелассу, тиомочевину) и наполнитель (бентонит, почву). Азотобактерин обогащает почву не только азотом, но и витаминами, и фитогормонами, гиббереллинами и гетероауксинами. Препарат

фосфобактерин из *Bacillus megaterium* превращает сложные органические соединения фосфора в простые, легко усвояемые растениями. Фосфобактерин также обогащает почву витаминами и улучшает азотное питание растений.

Растения синтезируют ряд соединений, регулирующих их рост и развитие (фитогормоны, биорегуляторы). К их числу принадлежат ауксины, гиббереллины, цитокинины. Созревание плодов стимулирует этилен. Эти биорегуляторы находят применение в сельском хозяйстве. К числу новых, обнаруженных в последние годы биорегуляторов относят пептиды, имеются перспективы их применения в сельском хозяйстве.

2.

2.1. Биотехнология для животноводства. Большое значение в связи с интенсификацией животноводства отводится профилактике инфекционных заболеваний сельскохозяйственных животных с применением рекомбинантных живых вакцин и генноинженерных вакцин-антигенов, ранней диагностике этих заболеваний с помощью моноклональных антител и ДНК/РНК-проб.

Для повышения продуктивности животных нужен полноценный корм. Микробиологическая промышленность выпускает кормовой белок на базе различных микроорганизмов – бактерий, грибов, дрожжей, водорослей. Богатая белками биомасса одноклеточных организмов с высокой эффективностью усваивается сельскохозяйственными животными. Так, 1 т кормовых дрожжей позволяет получить 0,4-0,6 т свинины, до 1,5 т мяса птиц, 25-30 тыс. яиц и сэкономить 5-7 т зерна. Это имеет большое народнохозяйственное значение, поскольку 80% площадей сельских угодий в мире отводятся для производства корма скоту и птице.

Одноклеточные организмы характеризуются высоким содержанием белка – от 40 до 80 % и более. Белок одноклеточных богат лизином, незаменимой аминокислотой, определяющей его кормовую ценность. Добавка биомассы одноклеточных к недостаточным по лизину растительным кормам позволяет приблизить их аминокислотный состав к оптимальному. Недостатком биомассы одноклеточных является нехватка серосодержащих аминокислот, в первую очередь метионина. У одноклеточных его приблизительно вдвое меньше, чем в рыбной муке. Этот недостаток присущ и таким традиционным белковым кормам, как соевая мука. Питательная ценность биомассы одноклеточных может быть значительно повышена добавкой синтетического метионина.

Производство кормового белка на основе одноклеточных – процесс, не требующий посевных площадей, не зависящий от климатических и погодных условий. Он может быть осуществлен в непрерывном и автоматизированном режиме.

В нашей стране производится биомасса одноклеточных, в особенности на базе углеводородного сырья. Достигнутые успехи не должны заслонять проблемы, возникающей при использовании углеводородов как субстратов для крупномасштабного производства белка,

– ограниченность их ресурсов. Важнейшими альтернативными субстратами служит метанол, этанол, углеводы растительного происхождения, в перспективе водород.

Очищенный этанол на мировом рынке стоит почти вдвое дороже метанола, но этанол отличается очень высокой эффективностью биоконверсии. Из 1 кг этанола можно получить до 880 г дрожжевой массы, а из 1 кг метанола – до 440 г. Биомасса из этанола особенно богата лизином – до 7 %.

Перспективными источниками белка представляются фототрофные микроорганизмы, в особенности цианобактерии рода *Spirulina* и зеленые одноклеточные водоросли из родов *Chlorella* и *Scenedesmus*. Наряду с обычными аппаратами для их выращивания используют искусственные водоемы. Добавление к растительным кормам биомассы *Scenedesmus* позволяет резко повысить эффективность усвоения белков животными.

Таким образом, существуют разнообразные источники сырья для получения биомассы одноклеточных. Некоторые субстраты (этанол) дают столь высококачественный белок, что он может быть рекомендован в пищу. Цианобактерии рода *Spirulina* издавна используют в пищу ацтеки в Центральной Америке и племена, обитающие на озере Чад в Африке.

2.2. Животные в биотехнологии

С давних времен человек методом искусственного отбора создавал и породы сельскохозяйственных животных для питания и других хозяйственных нужд. Современные методы генетики и селекции позволили многократно ускорить этот процесс. Селекция проводилась для увеличения продуктивности, плодовитости, стойкости к заболеваниям, неблагоприятным условиям среды, для повышения жирномолочности коров и многого другого. Однако основой всех этих работ был собственно геном того вида, который использовался в селекционной работе, и все возможности всегда были ограничены этими рамками. В последние десятилетия XX века был предложен способ перешагнуть через этот барьер и придать сельскохозяйственным животным свойства и признаки, которыми они не обладали ранее. Этот способ – создание трансгенных организмов. В наши дни и трансгенные растения, и трансгенные животные уже перестали быть редкостью. Сегодня границы их использования обсуждаются не только в научной литературе, но и в средствах массовой информации. Эта область биотехнологии так или иначе касается многих сторон жизни современного общества, но в данной лекции не будут затронуты социальные, этические или юридические аспекты создания и использования трансгенных животных – это предмет отдельного обсуждения. Здесь будет дан только обзор современного состояния этой области, возможности использования трансгенных животных и перспективы развития этого направления исследований на ближайшие годы.

В современной биотехнологии широко используют трансгенные микроорганизмы, в геном которых введены различные гены эукариот. Трансгенные растения несут гены, обеспечивающие повышенную соле- и

засухоустойчивость, устойчивость к вредителям и болезням. Но если растения с такими качествами могут быть получены и с помощью методов традиционной селекции, хотя и с большей затратой сил и времени, то трансгенные животные часто являются единственной надеждой тяжелобольных людей на получение необходимых им лекарств.

В ранних работах трансгенными животными называли только тех, которые были получены путем микроинъекции чужеродной ДНК в зиготу и которые несут чужеродный ген в составе своего генома. Часто в этом значении термин «трансгенные животные» употребляется и сейчас. Однако в последнее время к этой категории относят всех животных, полученных в результате генноинженерных воздействий, в том числе животных, созданных при помощи эмбриональных стволовых клеток, и животных с выключенными генами, так называемых нокауты. Иногда к трансгенным животным относят и тех, которые были подвергнуты соматической трансфекции, то есть которым чужеродный ген введен был непосредственно в определенный орган или ткань взрослого организма.

Трансгенные животные, несущие чужеродный ген гормона роста.

Такие животные отчасти уже история трансгеноза млекопитающих. После получения гигантской трансгенной мыши делались попытки в такой же мере увеличить размеры и более крупных млекопитающих, но эти работы оказались неудачными. Животные с повышенным уровнем продукции гормона роста не увеличились в размерах, но у них наблюдались разнообразные нарушения в росте и строении костей скелета, например, акромегалия. Однако эти работы сыграли свою роль для изучения функционирования чужеродного гена в организме трансгенного животного и нашли применение в создании быстрорастущих трансгенных рыб.

Трансгенные животные-биореакторы

Биореакторами называют организмы – продуценты лекарственных белков. Биореакторами могут быть любые живые организмы – бактерии, грибы, растения, животные – и даже клеточные культуры. У каждого из таких организмов-биореакторов есть достоинства и недостатки. Бактерии, например, легко модифицируются методами генной инженерии, быстро размножаются, и их удобно использовать в промышленных биотехнологических установках. Таким методом производят генноинженерный инсулин человека. Однако для нормального функционирования белков человека очень важны те изменения, которые происходят на посттрансляционном уровне: гликозилирование, ацетилирование, фосфорилирование, карбоксилирование и некоторые другие преобразования. Большая часть биохимических механизмов, обеспечивающих эти процессы, отсутствует у прокариот, и белки, синтезируемые ими с матриц генов человека, не полностью идентичны белкам из клеток человеческого организма. Другая сложность связана с выделением и очисткой лекарственного белка – бактериальные клетки идут в переработку целиком, и поэтому трудно избавиться от всех посторонних примесей в конечном продукте. Трансгенные дрожжевые культуры и

культуры клеток человека не имеют этих недостатков, но продуктивность таких систем в настоящее время ниже, чем та, которая уже получена у экспериментальных трансгенных животных. Достаточное количество качественных и дешевых лекарственных белков человека, особенно факторов свертываемости крови – фибриногена, антитромбинов, альбумина, иммуноглобулинов – могло бы спасти многих пациентов. Эта задача и легла в основу работ по получению трансгенных животных – продуцентов белков человека. Стратегия этих работ такова: получить трансгенное животное, у которого чужой ген экспрессируется в клетках молочной железы и продукт работы этого гена выделяется в молоко. Тогда получение лекарственного белка сведется к процессу, известному человеку уже много тысяч лет, – к дойке. Сейчас есть аппараты, дающие возможность подоить козу, овцу, свинью, кролика и даже мышь. Мыши с их коротким сроком беременности и роста – удобный объект для анализа экспрессии введенной генной конструкции, на них отработывают те методики, которые потом используют для получения крупных трансгенных животных. Вот далеко не полный список белков человека, уже полученных от трансгенных мышей, и их концентрация в молоке: б-1-антитрипсин (мг/мл), интерферон (нг/мл), фактор свертываемости крови IX (мкг/мл), сывороточный альбумин (мг/мл), трофобластин (мкг/мл), урокиназа (мг/мл), интерлейкин-2 (мкг/мл), супероксиддисмутаза (мг/мл), некоторые иммуноглобулины и многие другие белки. Список более крупных трансгенных млекопитающих, выделяющих продукт активности чужеродного белка в молоко, значительно короче: кролики – интерлейкин-2 (нг/мл) и тканевый активатор плазминогена (мкг/мл), овцы б-1-антитрипсин (мг/мл) и фактор свертываемости крови IX (нг/мл), козы – тканевый активатор плазминогена (мкг/мл). Отсутствие в этом списке коров, наиболее перспективных продуцентов белков человека, объясняется легко. Первые мыши, выделяющие трансгенный белок в молоко, были получены в 1990 году, а все крупные трансгенные животные – в последующие 15 лет. Для получения же трансгенной коровы нужен более долгий срок. Появления коров-биореакторов следует ожидать в ближайшие годы. В настоящее время активно ведутся работы по получению животных, продуцентов рекомбинантных иммуноглобулинов человека – они появятся в ближайшие годы, и область их применения почти безгранична. Так какое же количество трансгенных животных необходимо получить, чтобы обеспечить потребность в лекарственных белках человека? Когда пытаются соотнести возможную продукцию белка человека и потребность в нем, то результаты анализа удивляют. Так, для того чтобы обеспечить всю мировую потребность в факторе свертываемости крови IX, нужно получать в год около 85 кг этого белка, а для фактора свертываемости крови VIII это количество и того меньше – около 7 кг. При уровне продукции трансгена в 1 мг на мл молока (а сегодня это вполне реальный уровень) корова, производящая около 6 тыс. л молока в год, может произвести около 6 кг

лекарственного белка. Всю потребность в факторе VIII сможет обеспечить одна или две коровы-биореактора, а для получения фактора IX в количестве, достаточном для всех больных гемофилией в мире, необходимо всего лишь маленькое стадо из 15-20 трансгенных коров. Потребность медицины в других белках, получаемых из крови человека, больше. Так, для фибриногена это около 3 т. Такое количество сможет обеспечить стадо в 500 трансгенных коров – одна животноводческая ферма.

Создание животных – генетических моделей наследственных заболеваний человека

Многие болезни имеют наследственные причины. И это касается не только моногенных заболеваний, происходящих из-за мутации в каком-нибудь одном определенном гене. Часто причиной заболевания является целый комплекс нарушений генома. К этой группе относятся большая часть заболеваний сердечно-сосудистой и нервной систем, многие эндокринные заболевания. Часто трудно установить конкретную причину заболевания, соотнести обнаруженные у пациента генетические дефекты с его анамнезом. В последние годы для решения этих вопросов все чаще привлекаются трансгенные модели наследственных заболеваний человека. После того, как обнаружен ген, предположительно ответственный за данное заболевание, могут быть созданы два типа модельных животных: мыши с функционирующим трансгеном и мыши с потерей функции данного гена. На моделях первого типа можно исследовать влияние количества копий гена и уровня его экспрессии на проявление заболевания, а также разрабатывать новые методы лечения. Второй тип модельных животных – это мыши, у которых выключен ген, аналогичный тому, который вызывает данное заболевание у человека. На этой модели исследуют конкретные функции генов, что особенно важно для анализа причин мультигенных заболеваний.

Разработка методов генной терапии на основе изучения трансгенных животных

На первый взгляд кажется, что слова «терапия» и «трансгенные технологии» несовместимы. К любому вмешательству в геном человека нужно подходить с гораздо большей осторожностью, чем к вмешательству в геном других видов животных и растений, но существуют ситуации, когда именно такие методы могут спасти больного. Одна из таких ситуаций – раковое заболевание. Надежды на излечения больных от СПИДа также связывают с генной терапией. При этом используется соматическая трансфекция – метод, когда генетические конструкции вводятся в определенные клетки и ткани организма пациента. По данным Американской ассоциации здравоохранения за 1999 год только в США до клинических испытаний было допущено около 200 генотерапевтических разработок. Как и все другие методы лечения, генотерапевтические методы разрабатываются и проходят испытания на модельных трансгенных животных. При дальнейшем развитии трансгенных технологий возможно появление совершенно новых отраслей их использования. В основе

большой части этих прогнозов – создание трансгенных животных, у которых одни гены нокаутированы, а другие, наоборот, введены в состав генома.

Получение модифицированного молока

Первый вариант – создание животных, продуцирующих молоко, по своему составу максимально приближенное к материнскому молоку человека. Для этого надо выключить несколько генов коровы и ввести в ее геном несколько генов человека. При работе с эмбриональными стволовыми клетками это выглядит вполне выполнимым – возможно, первые такие животные появятся в ближайшие годы.

Создание трансгенных животных, источников органов для пересадки человеку

В мире существует огромная потребность в донорских органах. Многие больные, годами надеющиеся на пересадку почки или сердца, так и не успевают дождаться своей очереди. Решением этой проблемы могла бы быть пересадка человеку органов животных. Так, например, органы свиньи подходят человеку по своему строению, размеру и многим биохимическим показателям. Но такие пересадки невозможны, так как эти органы будут немедленно отторгнуты иммунной системой пациента. Для того чтобы избежать этого, надо сконструировать трансгенную свинью, у которой нокаутированы собственные гены гистосовместимости, и вместо них введены гены гистосовместимости человека. Эти гены располагаются компактно в локусах гистосовместимости, и при проведении генного нокаута можно выключить сразу несколько генов.

Клонирование трансгенных животных

Создание трансгенных животных – очень трудоемкий процесс. Так, по статистике, одно трансгенное животное удается получить на 40 инъектированных зигот мыши, или на 100 зигот овцы или козы, или на 1500 зигот коровы. Из этих трансгенных животных не более 50 % экспрессируют трансгенный белок. При получении животных продуцентов белков человека только у некоторых особей уровень экспрессии трансгена в клетках эпителия молочной железы достаточно высок. Возможен и такой вариант – ген экспрессируется, но трансгенный белок по каким-либо причинам не выделяется в молоко. Если даже удастся получить трансгенное животное, идеальное по всем параметрам, то его потомки далеко не всегда наследуют его качества. Поэтому большой интерес биотехнологов вызывают работы по клонированию млекопитающих. Эта методика в будущем может дать возможность снова и снова клонировать идеальное животное-продуцента и полностью обеспечить потребности медицины и фармакологии в необходимых человеческих белках. Скорее всего, для трансгенных животных будут найдены и другие области применения.

3. За последние 50 лет возникло множество проблем – таких как деградация пахотных земель, рост заболеваемости и появление новых болезней растений, изменение качества сельскохозяйственной продукции. Эти проблемы ставят под сомнение наши достижения и требуют

пересмотра как отдельных агротехнических приемов, так и самой стратегии сельскохозяйственной деятельности.

Более 100 лет назад Вернадский доказал, что плодородие почвы производится и поддерживается «живым веществом», состоящим из миллиардов микроорганизмов, которые мы привыкли делить на полезные и вредные, полагая полезными те, что производят питательные вещества для растений, а вредными – порождающие болезни и губящие урожай. Существующие сегодня методы агрономии игнорируют первых и направлены на подавление вторых. Однако бактерии, как и все в природе, существуют сообществами, в которых продукт жизнедеятельности одних служит пищей другим. Бактерии способны существовать только при определенном балансе разных видов себе подобных. Традиционно считалось, что между разными видами микроорганизмов существуют антагонистические отношения, и они либо уничтожают друг друга, либо борются за источники питания. На истощенных и больных почвах так и происходит. Здоровые же почвы характеризуются стабильным во времени балансом различных видов микроорганизмов, которые дополняют друг друга по свойствам, что носит название симбиоза. Таким образом, борясь с патогенными микроорганизмами при помощи пестицидов и гербицидов, которые, по сути, являются ядами, мы наносим вред всей колонии бактерий, а не только болезнетворным. Теперь у нас осталось только два пути для восстановления плодородия почв: либо прекратить какую-либо деятельность на земле, и она лет через 70-80 восстановится сама, либо взять из здоровой почвы гармоничную культуру бактерий и создать им условия для развития и «заражения» своим здоровьем почв, которые в этом нуждаются.

Этот шаг был сделан микробиологами из разных стран, в том числе и из России. В поисках средств восстановления почвы и переработки промышленных и бытовых отходов ученые обратились к микроорганизмам. Японским микробиологом Тэро Хига была разработана ЭМ-технология (ЭМ – эффективные микроорганизмы), способная регенерировать даже самые бедные почвы. В основу технологии легла идея использования смешанной культуры бактерий, которая применяется как инокулят (затравка), для увеличения микробного разнообразия почв. ЭМ-культуры не содержат генетически измененных микроорганизмов, составлены из смешанных культур, которые имеются в естественной среде во всем мире.

Как было выяснено в ходе опытов, громадное большинство микроорганизмов, составляющих «живое вещество», способно активно приспосабливаться к лидирующей в данный момент группе бактерий. Следовательно, внесенные в почву с любыми исходными данными анабиотические бактерии группы ЭМ «заражают» своими свойствами остальные группы микроорганизмов, давая возможность за 2-3 года восстановить плодородный слой. Почвы, насыщенные эффективными микроорганизмами, исключительно плодородны. Такие почвы, без всяких химикатов, пестицидов и искусственных удобрений, демонстрируют

постоянное и непрерывное улучшение.

Известно, что в почве присутствуют все питательные вещества, необходимые растениям для развития, однако они находятся в неусвояемой для растений форме. К примеру, бактерии, грибки, микроводоросли и прочая живность при наличии перегнойного одеяла активно фиксируют азот, накапливая его в себе, переводя в усвояемую форму и отдавая почве – до 15 кг азота на сотку. В перегнойной почве может быть до 80 кг азота на сотку, а для получения урожая достаточно 1,5.

Нашей задачей могло бы стать не стремление заменить эту функцию бактерий внесением минеральных удобрений, а помощь микроорганизмам в их деятельности, то есть создание благоприятных условий для жизни. При этом необходимо учитывать следующие факторы:

- рыхление, безусловно, является благоприятным фактором для жизнедеятельности растений и микроорганизмов, так как обеспечивает доступ кислорода и воды, необходимых для дыхания и растворения минеральных веществ;

- бактерии делятся на аэробных и анаэробных, то есть тех, которым воздух необходим и для которых губителен. Это означает, что при глубокой отвальной вспашке мы губим и тот, и другой вид микроорганизмов.

В России ЭМ-технологии начали применять в 1998 году. Сегодня она опробована в различных регионах. Ученые приступили к созданию специализированных культур бактерий, соответствующих разным типам почв, разным агротехническим задачам. В настоящее время существуют такие отечественные препараты, основанные на ЭМ-технологиях, как «Байкал», «Экстрасол», которые неоднократно подтвердили свою эффективность. Эффективные микроорганизмы – точный живой инструмент взаимодействия с окружающей средой, инструмент, который при вдумчивом, внимательном отношении способен творить чудеса.

Применение биопрепаратов нового поколения не только повышает продуктивность растений, но и улучшает их качество, позволяет получить более раннюю продукцию, повышает сохранность продукции.

Все микробные препараты имеют широкий спектр действия, но наибольшую эффективность они дают на овощных и кормовых культурах. Их использование позволяет снизить нормы применения минеральных удобрений и ядохимикатов, что позитивно сказывается на содержании нитратов и нитритов в продукции и снижает пестицидную нагрузку на экосистемы.

В России производство микробных препаратов, в основном для бобовых культур, началось в 20-30 годах XX века. В настоящее время применяются препараты комплексного действия: ризоторфин, ризоэнтерин, ризогрин, флавобактерин, агрофил, биоплант-К и др. Для оптимизации почвенной среды применяют бактогумин, бамил, ЭМ-1, ЭМ- 2, фитофлора-С и др., активирующие почвенно-микробиологические процессы.

Для защиты растений от вредителей применяют энтобактерин, лепидоцид, битоксибациллин, бактокулицид, бактероденцид и др. Они безопасны для человека и теплокровных животных.

Лекция 6. Биотехнология в медицине и фармакологии

План.

1. Антибиотики.
2. Гормоны.
3. Интерфероны, интерлейкины, факторы крови.
4. Моноклональные антитела и ДНК- или РНК-пробы.
5. Рекомбинантные вакцины и вакцины-антигены.
6. Ферменты медицинского назначения.
7. Генная терапия.

1. Известно, что проблемы охраны здоровья человека в значительной степени зависят от обеспечения необходимыми медикаментами. Биотехнология предлагает новые подходы к разработке и производству лекарственных, профилактических и диагностических медицинских препаратов, а также позволяет производить в достаточных количествах широкий спектр лекарственных средств, которые ранее были малодоступны.

Среди примерно 50 новых видов лекарств, вакцин и диагностикумов, появляющихся на рынке ежегодно, 10-15 получены с помощью биотехнологических методов, в стадии клинического изучения находится более 350 новых биопрепаратов, причем большинство из них предназначены для лечения болезней, которые считаются неизлечимыми. По производству биотехнологических медицинских препаратов на первом месте стоит Северная Америка – 63%, в странах Западной Европы производится 25%, в Японии – 7%.

К самому большому классу лекарств, получаемых путем микробного синтеза, относятся антибиотики. По разнообразию и показаниям к применению они занимают первое место среди продукции мировой фармацевтической промышленности. Сегодня известно более 6000 видов антибиотиков, более 100 из которых находят применение в медицинской практике, в том числе при лечении таких тяжелых заболеваний, как туберкулез, менингит, плеврит, пневмония. Отдельные антибиотики применяют при лечении онкозаболеваний. Объем мирового рынка антибиотиков увеличивается в последнее время на 10-12% в год и составляет более 23 млрд. долларов.

Антибиотики – это специфические продукты жизнедеятельности, обладающие высокой физиологической активностью по отношению к определенным группам микроорганизмов и к злокачественным опухолям, избирательно задерживающих их рост или полностью подавляющих развитие. Далеко не все из этих соединений допущены для применения в медицине. Причины неослабевающего внимания к поиску новых антибиотиков связаны с токсичностью существующих антибиотиков,

аллергическими реакциями, вызываемыми ими, нарастанием устойчивости патогенных микроорганизмов к применяемым препаратам и, помимо этого, с необходимостью изыскания средств борьбы с возбудителями, против которых недостаточно эффективны известные ныне антибиотики. Основные пути поиска включают:

1. Испытание новых продуцентов. Так, с начала 80-х годов исследуют миксобактерии, продуцирующие большое количество антимикробных агентов.

2. Химическая модификация антибиотиков. Противомикробные макролиды токсичны для человека. Например, гептаен амфотерицин В, используемый по жизненным показаниям при тяжелых микозах, вызывает необратимые поражения почек. Получены метиловые эфиры амфотерицина, менее токсичные и сохраняющие противогрибковую активность. При модификации пенициллинов и цефалоспоринов используют иммобилизованные ферменты.

3. Мутасинтез. Применяют мутантные штаммы, у которых блокирован синтез отдельных фрагментов молекулы антибиотика. В среду культивирования вносят аналоги этих фрагментов. Микроорганизм использует эти аналоги для биосинтеза, в результате чего получают модифицированный антибиотик.

4. Клеточная инженерия. Получают гибридные антибиотики, например, с новыми комбинациями агликона и сахаров.

5. Генетическая инженерия – введение в геном микроорганизма информации о ферменте, необходимом для модификации продуцируемого антибиотика, например, его метилирования при помощи метилаз.

Важной задачей является повышение эффективности биосинтеза известных антибиотиков. Значительных результатов удалось добиться за десятилетия селекции штаммов-продуцентов с применением индуцированного мутагенеза и ступенчатого отбора. Например, продуктивность штаммов *Penicillium* по синтезу пенициллина увеличена в 300-350 раз.

Многообещающим подходом служит инкапсулирование антибиотиков, в частности их включение в липосомы, что позволяет прицельно доставлять препарат только к определенным органам и тканям, повышает его эффективность и снижает побочное действие. Этот подход применим и для других лекарственных препаратов.

Вместо антибиотика в организм человека может вводиться его продуцент, антагонист возбудителя заболевания. Этот подход берет начало с работ И.И. Мечникова о подавлении гнилостной микрофлоры в толстом кишечнике человека посредством молочнокислых бактерий. Важную роль в возникновении кариеса зубов, по-видимому, играет обитающая во рту бактерия *Streptococcus mutans*, которая выделяет кислоты, разрушающие зубную эмаль и дентин. Получен мутант *Strept. mutans*, который при введении в ротовую полость почти не образует коррозивных кислот, вытесняет дикий патогенный штамм и выделяет летальный для него

белковый продукт.

2. Второй класс лекарственных веществ, производимых биотехнологическим путем, – гормоны. К традиционным микробиологическим продуктам относятся стероидные гормоны – кортизон, преднизолон, которые широко применяют при лечении различных аллергических заболеваний, в том числе такого тяжелого, как бронхиальная астма, а также ревматоидного артрита и других недугов. Спектр гормональных препаратов, производимых путем микробного синтеза, значительно пополнился за счет пептидных гормонов, представляющих генно-инженерные продукты.

Биотехнология предоставляет медицине новые пути получения ценных гормональных препаратов. Особенно большие сдвиги произошли в последние годы в направлении синтеза пептидных гормонов.

3. Интерфероны выделяются клетками человека и животных в ответ на инфицирование вирусами. Они обладают антивирусной активностью. Механизм действия интерферонов до конца не выяснен. Предполагается, что Интерфероны препятствуют проникновению вирусных частиц в клетку. Интерфероны стимулируют деятельность иммунной системы и препятствуют размножению клеток раковых опухолей. Все аспекты действия интерферонов важны с точки зрения их терапевтического применения. Различают б-, в, г и е-интерфероны, образуемые соответственно лейкоцитами, фибробластами соединительной ткани, Т-лимфоцитами и эпителиальными клетками. Наибольшее значение имеют первые три группы. Интерфероны состоят из 146-166 аминокислотных остатков, в и г-интерфероны связаны с остатками сахаров (гликозилированы). До введения методов генетической инженерии интерфероны получали из донорской крови – до 1 мкг неочищенного интерферона из 1 л крови, т. е. примерно одну дозу для инъекции.

В настоящее время б-, в и г-интерфероны успешно получают с применением генноинженерных штаммов *E. coli*, дрожжей, культивируемых клеток насекомых (*Drosophila*) и млекопитающих. Генноинженерные интерфероны могут быть очищены с использованием моноклональных антител.

Интерлейкины – сравнительно короткие (около 150 аминокислотных остатков) полипептиды, участвующие в организации иммунного ответа. Интерлейкины, основные лечебные средства при иммунных расстройствах, получают путем клонирования соответствующих генов в *E. coli* или культивирования лимфоцитов *in vitro*. Английская компания Celltech Ltd и японская Sakuo Company предлагают синтезированный генноинженерными бактериями интерлейкин-1 наряду с другим тьюлипептидным агентом – фактором некроза опухолей – для лечения ряда опухолевых заболеваний.

Получаемые биотехнологическим путем факторы свертывания крови, особенно фактор VIII (с помощью культивируемых клеток млекопитающих) и фактор IX (с помощью генноинженерного штамма *E. coli*), необходимы

для терапии форм гемофилии наследственной болезни, при которой кровь теряет способность свертываться. К числу ценных с клинической точки зрения факторов, полученных в биореакторах с культурами животных клеток, следует отнести фактор роста В-лимфоцитов, фактор активации макрофагов, Т-заместительный фактор, активатор тканевого плазминогена.

4. Моноклональные антитела – продукты В-гибридомных клеток – используют для диагностики различных заболеваний. Обладая высокой специфичностью действия, они обеспечивают идентификацию не только вида возбудителя, но и его серотипа. С помощью моноклональных антител можно тестировать различные гормоны, метаболиты, белковые факторы. Наиболее быстрый метод индикации основан на применении антител, иммобилизованных на мембранных электродах – аналогах ферментных биосенсоров. Они позволяют диагностировать беременность, выявлять предрасположенность к диабету, ревматоидному артриту, идентифицировать наследственные заболевания, сопровождающиеся утратой тех или иных ферментов и других белковых компонентов. Моноклональные антитела широко используют для диагностики рака и определения его форм.

Моноклональные антитела имеют не только диагностическое, но и лечебное значение. При аутоиммунных заболеваниях, когда иммунные клетки «ополчаются» против собственных органов и тканей, моноклональные антитела соответствующей специфичности могут связывать антитела, наносящие вред организму больного. Для лечения рака предлагают использовать моноклональные антитела, конъюгированные с токсичными для раковых клеток соединениями. Моноклональные антитела доставляют яд точно по адресу, избегая поражения здоровых клеток. Поэтому к моноклональным антителам можно присоединять очень сильные токсины, например, рицин – яд из клещевины, одной молекулы которого достаточно для поражения одной клетки. В современной фармацевтической промышленности моноклональные антитела используют для очистки лекарственных препаратов.

Диагностическое значение имеют короткие фрагменты ДНК и РНК, несущие радиоактивную или иную метку, так называемые ДНК- или РНК-пробы. С их помощью можно установить наличие в организме определенных типов нуклеиновых кислот, соответствующих болезнетворным агентам, злокачественным опухолям, а также проверить геном пациента на наличие у него тех или иных генетических аномалий. Метод основан на комплементарном взаимодействии проб с участками ДНК или РНК, выделенными из исследуемых клеток и фиксированными на носителе. Взаимодействия нуклеотидных цепочек пробы с ДНК (РНК) из образца регистрируют по радиоактивной метке или иным способом.

5. Важный вклад микробной биотехнологии в медицину состоит в получении профилактических препаратов, причем этот вид продукции не имеет дублера в химической промышленности. Чтобы понять важность вакцинации, приведем несколько примеров. В развитых странах, где

профилактическая служба на должном уровне, смертность от инфекционных заболеваний составляет всего 4-8 против 30-50% в развивающихся странах. Вакцина против оспы позволила полностью искоренить эту болезнь. Правда, в последние несколько лет стала появляться информация о новых заболеваниях оспой. Но произошло это после того, как многие стали отказываться от вакцинации. В 1955 году в США и Канаде полиомиелитом заболели 200 человек на 1 млн населения. В настоящее время распространенность этого заболевания снизилась в 4000 раз (1 человек на 20 млн населения). Также быстро снизилась заболеваемость корью, краснухой, дифтерией после введения соответствующих вакцин в практику. Большие перспективы в получении новых вакцин открывает генная инженерия. При этом необходимый защитный антиген можно получить с помощью непатогенного микроорганизма и, таким образом, избежать опасностей, связанных с токсичностью обычных вакцин. Вакцинация – один из основных способов борьбы с инфекционными заболеваниями. Путем поголовной вакцинации почти ликвидирована натуральная оспа, резко ограничено распространение бешенства, полиомиелита, желтой лихорадки. На повестке дня – изготовление вакцин против гриппа, гепатитов, герпесов, свинки, кори, острых респираторных заболеваний. Большое экономическое значение имеет разработка вакцин против болезней сельскохозяйственных животных – ящура, африканской болезни лошадей, овечьей болезни «синего языка», трипаносомозов и др. Традиционные вакцинные препараты изготавливают на основе ослабленных, инактивированных или дезинтегрированных возбудителей болезней.

Поверхностные белки вирусов обычно обладают выраженными иммуногенными свойствами, то есть вызывают формирование иммунного ответа в зараженном организме. При попадании вируса в организм и развитии инфекционного заболевания в иммунной системе индуцируются процессы, направленные на инактивацию свободного вируса и уничтожение зараженных клеток, способных выделять инфекционный вирус. Эффективность развития иммунного ответа при использовании того или иного подхода определяется только экспериментально, сначала на лабораторных животных и лишь затем на людях. В настоящее время ясно, что для эффективной иммунопрофилактики необходима стимуляция возможно большего числа иммунных механизмов в правильном соотношении.

Иммунный организм или совершенно устойчив к инфицирующему микроорганизму, или обуславливает протекание заболевания в легкой форме.

Поэтому большое внимание медицина и ветеринария уделяют разработке методов эффективной и безопасной иммунизации (вакцинации) людей и домашних животных. Существуют разные типы вакцин, каждый из которых имеет определенные достоинства и недостатки. Коротко охарактеризуем эти типы вакцин.

Цельновирионные вакцины. В качестве живых вирусных вакцин обычно используют так называемые аттенуированные (ослабленные) варианты вирусов, которые являются утратившими большинство свойств патогенности мутантами исходно патогенных штаммов. В редких случаях удается найти близкородственный слабопатогенный вирус, вакцинация которым обеспечивает иммунную защиту от другого опасного вируса (наиболее яркий пример: предложенная Дженнером вакцинация вирусом оспы коров против натуральной оспы). Главным преимуществом живых вакцин является то, что они активируют все компоненты иммунной системы, вызывая сбалансированный иммунный ответ. Кроме того, такие вакцины относительно дешевы, так как для иммунизации требуется небольшая доза вируса, поскольку он размножается в зараженном организме. Недостаток живых вакцин заключается в том, что они обычно сохраняют некоторый уровень остаточной патогенности, хотя он может быть и очень низким. Тем не менее, у детей и лиц с дефектной иммунной системой они могут в некоторых случаях вызывать тяжелые формы заболевания. Одной из проблем при массовом производстве аттенуированных вакцин является их возможная генетическая нестабильность, приводящая к возвращению свойств патогенности. Поэтому партии вакцин необходимо тщательно проверять на лабораторных животных. Кроме того, для живых вакцин серьезной проблемой может быть их биологическая нестабильность при хранении и использовании в практической медицине (или ветеринарии). Более того, как показывает опыт, иногда живые вакцины в процессе наработки на культурах клеток могут загрязняться другими вирусами, поэтому требуется строгий контроль качества получаемых препаратов вакцин.

Трудности, возникающие при получении и использовании живых вакцин, удается преодолевать в случае инактивированных вакцин, которые представляют собой препарат патогенного вируса, инактивированного (убитого) формальдегидом, в-пропиолактоном или каким-либо другим химическим соединением. Инактивация направлена на вирусный геном и по возможности не должна затрагивать белковый каркас вирусной частицы. В данном варианте риск заражения при вакцинации практически отсутствует, не требуется проводить сложную, длительную и не всегда удачно завершающуюся работу по получению аттенуированных штаммов.

Инактивированные вакцины, как правило, проще сохранять. Основным недостатком инактивированных вакцин является то, что они уступают аттенуированным живым вирусам в отношении индукции Т-клеточного иммунитета. Кроме того, для эффективной индукции В-клеточного (гуморального) иммунитета необходимо вводить относительно большие дозы инактивированной вакцины с определенной периодичностью, что может приводить с течением времени к аллергизации организма. При инактивации вируса часть антигенов может полностью или частично разрушаться, что также снижает качество вакцины. Следует отметить, что при препаративной наработке патогенных вирусов,

предназначенных для получения инактивированных вакцин, предъявляются повышенные требования по обеспечению безопасности, как самого персонала, так и окружающей среды, то есть требуются дорогостоящие, специально оборудованные помещения.

Вакцины на основе вирусных антигенов. Как отмечено выше, живые и инактивированные вакцины могут иметь определенные недостатки, в частности патогенное или аллергенное воздействие на некоторых вакцинируемых. Поэтому ученые пытаются разрабатывать более безопасные варианты противовирусных вакцин. Наиболее продуктивным при этом является направление исследований по использованию очищенных вирусных белков. Такие вакцины называют субъединичными.

Субъединичные вирусные вакцины обычно являются набором протективных вирионных белков или отдельным поверхностным протективным белком, выделенным из препарата вирионов (вирусных частиц). Под протективной активностью антигена понимается его способность обеспечить развитие устойчивости иммунизируемого организма к последующему инфицированию данным вирусом.

Иммуногенность, или способность вызывать в организме образование антител, зависит от наличия на поверхности молекулы белка так называемых эпитопов (антигенных детерминант), обладающих наибольшим сродством к связывающей области специфического иммуноглобулина (антитела).

Современные биотехнологические разработки предусматривают создание рекомбинантных вакцин и вакцин-антигенов. Вакцины обоих типов основаны на генноинженерном подходе.

Для получения рекомбинантных вакцин обычно используют хорошо известный вирус коровьей оспы (осповакцины). В его ДНК встраивают чужеродные гены, кодирующие иммуногенные белки различных возбудителей (гемагглютинин вируса гриппа, гликопротеин D вируса герпеса, поверхностный антиген вируса гепатита В, антиген малярийного плазмодия). Получаются вакцины против соответствующих инфекций, хорошо зарекомендовавшие себя в опытах на животных. К их достоинствам относится возможность создания поливалентных вакцинных препаратов на основе объединения участков ДНК различных патогенов «под эгидой» ДНК вируса осповакцины. Открывается возможность одномоментной комплексной иммунизации, скажем, крупного рогатого скота против всех опасных инфекций данной местности.

Вакцины-антигены получают, клонируя гены возбудителя болезни в *E. coli*, дрожжах, клетках насекомых и млекопитающих. Клонирован ген поверхностного антигена НBS-вируса гепатита В (сывороточного гепатита), ген белка оболочки вируса ящура. Вирус ящура существует в виде многих серотипов, методом белковой инженерии удалось скомбинировать иммуногенные компоненты различных серотипов в рамках одной вакцины-антигена. Вакцины-антигены высокостабильны при хранении и перевозке, сравнительно просты в изготовлении (в том числе и при крупномасштабном

производстве), содержат минимальное количество белка и поэтому малоопасны как аллергены. Они гарантированы от остаточной инфекционности. Проблемой является низкая иммуногенность вакцин-антигенов. Одной из причин может быть то, что вакцина не включает всех компонентов возбудителя, необходимых для создания иммунитета к нему. Так, вирус, покидая клетку, часто «одевается» ее мембраной. Компоненты этой мембраны, отсутствующие в генно-инженерном белке, могут обладать иммуногенными свойствами.

Генно-инженерные вакцины. Генно-инженерные поливалентные живые вакцины. С появлением в середине 70-х годов текущего столетия методов генетической инженерии стала реальной возможностью встройки в геномы вирусов чужеродных генов, направляющих синтез желаемых белков. В 1980 году проведены первые генноинженерные эксперименты на вирусе простого герпеса человека, в 1981 году – на аденовирусе человека, а в 1982 году – на вирусе осповакцины. Возникла идея конструирования гибридных вирусов, способных при заражении человека или животных синтезировать не только свои белки, но и протективные белки других патогенных вирусов, для которых нет эффективных вакцин. Такие гибридные вирусы получили название живых поливалентных вакцин (поливалентные, так как защищают одновременно от двух или более инфекций). Разработка живых поливалентных противовирусных вакцин открывает новые, ранее недоступные возможности иммунопрофилактики различных инфекционных заболеваний. Вирусы, в геном которых встраивают чужеродные гены, называют векторными вирусами или векторами. Несомненно, что при создании живых поливалентных вакцин в качестве векторных наиболее целесообразно использовать вирусы, уже применяемые в качестве живых вакцин.

Важным направлением исследований является создание живых вакцин для домашних и диких животных.

В последние годы большое внимание уделяется разработке ветеринарных живых вакцин на основе таких поксвирусов, как вирус оспы птиц для птицеводства и вирус болезни Орф для овцеводства. Полученные результаты указывают на большую перспективность развития данного направления исследований и позволят существенно повысить продуктивность животноводства и птицеводства.

ДНК-вакцины. При создании живых поливалентных вирусных вакцин одной из основных проблем является преодоление возможных побочных эффектов вакцинации. Во-первых, необходимо свести к минимуму реактогенность получаемого гибридного вируса. Во-вторых, при вакцинации гибридным вирусом формируется полноценный иммунный ответ не только на целевой синтезируемый антиген, но и на все антигены векторного вируса. Поэтому повторное использование того же вектора, но для вакцинации против другого заболевания может быть затруднено.

Одновременно несколько групп ученых опубликовали в 1993 году результаты своих работ, подтвердивших перспективность этого нового

направления исследований, получившего название ДНК-вакцины.

6. Среди лекарственных средств особое место занимают ферменты. Так, известно применение протеолитических ферментов при лечении заболеваний пищеварительных органов. Эти же ферменты используют при лечении ожоговых поражений и различных ран для удаления некротических тканей. При лечении патологий обмена веществ применяют также липазы. Протеиназы с фибринолитическим действием используют для растворения тромбов. С помощью таких препаратов, как стрептокиназа и урокиназа, лечат тромбоз коронарных сосудов сердца, легких, конечностей.

Известно около 200 наследственных заболеваний, обусловленных дефицитом какого-либо фермента или иного белкового фактора. В настоящее время делают попытки лечения этих заболеваний с применением ферментов.

В последнее время четко определились три основных направления исследований в области медицинской энзимологии: энзимопатология, энзимодиагностика и энзимотерапия.

Область исследования энзимопатологии, хотя и включает название патологии, на самом деле является теоретической, фундаментальной частью медицинской энзимологии. Она призвана изучать молекулярные основы развития патологического процесса, основанные на данных нарушения механизмов регуляции активности или синтеза индивидуального фермента, или группы ферментов.

Чаще всего развитие болезни непосредственно связано с наследственной недостаточностью или полным отсутствием синтеза одного-единственного фермента в организме больного. Например, развитие галактоземии, то есть непереносимость молочного сахара, связано с отсутствием синтеза в клетках печени фермента, катализирующего превращение галактозы в глюкозу. Следствием подобной аномалии является накопление галактозы в тканях и развитие катаракты в раннем детстве, поражения тканей печени и мозга, нередко приводящие к гибели ребенка; лечение в этом случае сводится к исключению из диеты молочного сахара.

Помимо наследственных заболеваний, энзимопатология успешно решает и проблемы патогенеза соматических болезней, не столько причинных факторов, вызывающих развитие болезни, сколько механизмов развития наиболее распространенных болезней человека.

Второе направление научных исследований в области медицинской энзимологии – энзимодиагностика – призвано заниматься разработкой ферментных тестов, основанных на определении активности (уровня) ферментов и изоферментов в биологических жидкостях организма больного (сыворотка крови, желудочный или дуоденальный сок, спинномозговая жидкость, моча и др.). Эти исследования развиваются в двух направлениях: во-первых, по пути поиска органотропных или тканетропных ферментов, специфичных для определенного органа, группы органов или целостного

организма человека; во-вторых, по пути совершенствования уже описанных в литературе методов определения активности ферментов в биосредах.

Диагностическая энзимология достигла огромных успехов, помогая врачу не только в постановке правильного диагноза заболевания и выяснения степени тяжести болезни, но и в определении правильности избранного метода лечения.

7. Генную терапию на современном этапе можно определить, как лечение наследственных, мультифакториальных и ненаследственных (инфекционных) заболеваний путем введения генов в клетки пациентов с целью направленного изменения генных дефектов или придания клеткам новых функций. Первые клинические испытания методов генной терапии были предприняты 22 мая 1989 года с целью генетического маркирования опухоль-инфильтрующих лимфоцитов в случае прогрессирующей меланомы. Первым моногенным наследственным заболеванием, в отношении которого были применены методы генной терапии, оказался наследственный иммунодефицит. В 1997 году число допущенных к клиническим испытаниям протоколов уже составляло 175, более 2000 пациентов приняли участие в их реализации. Большинство таких проектов (около 80%) касаются лечения онкологических заболеваний, а также ВИЧ-инфекции (СПИДа). Вместе с тем и в современных исследованиях по генной терапии необходимо учитывать, что последствия манипулирования генами или рекомбинантными ДНК *in vivo* изучены недостаточно.

Обзор данных позволяет прийти к заключению, что, несмотря на усилия многих лабораторий мира, все уже известные и испытанные *in vivo* и *in vitro* векторные системы далеки от совершенства.

В мире каждый сотый ребенок рождается с серьезным наследственным дефектом, и количество таких дефектов неумолимо растет. Наследственные отклонения, как правило, приводят к физическим или умственным нарушениям и преждевременной смерти. Для большинства из известных в настоящее время более чем 4000 наследственных заболеваний не найдено достаточно эффективных способов лечения. Спасением от наследственных заболеваний могло бы стать введение в организм больного неповрежденной копии мутантного участка ДНК. Произойдет изменение генетического материала организма, или его генотипа, и как следствие – исправление врожденной ошибки обмена веществ. Наследственное заболевание будет излечено при помощи генотерапии.

Можно надеяться, что через небольшое количество лет генотерапия станет стандартным методом лечения отдельных форм рака. Будут активно развиваться разделы генотерапии, направленные на предотвращение инфекционных и онкологических заболеваний.

Лекция 7. Биотехнология в пищевой промышленности

План

1. Биотехнологии в пищевой промышленности в целом.
2. Биотехнология в молочной промышленности.

1. Статистические данные ООН по вопросам продовольствия и сельского хозяйства свидетельствуют о том, что проблема обеспечения населения нашей планеты продуктами питания внушает серьезные опасения. По этим данным, более половины населения Земли не обеспечено достаточным количеством продуктов питания, примерно 500 млн. людей голодают, а около 2 млрд. питаются недостаточно или неправильно. К концу XX в. население нашей планеты с учетом контроля рождаемости составило 7,5 млрд. человек. Следовательно, тяжелое уже сейчас положение с продуктами питания может принять в недалеком будущем для некоторых народов угрожающие масштабы.

Пища должна быть разнообразной и содержать белки, жиры, углеводы и витамины. Источники энергии – жиры и углеводы в определенных пределах взаимозаменяемы, причем их можно заменить и белками, но белки нельзя заменить ничем. Проблема питания людей, в конечном счете, заключается в дефиците белка. Там, где сегодня люди голодают, не хватает, прежде всего, белка. Установлено, что ежегодный дефицит белка в мире, по самым скромным подсчетам, оценивается в 15 млн. т.

Эффективным источником белка могут служить водоросли. Увеличить количество пищевого белка можно и за счет микробиологического синтеза, который в последние годы привлекает к себе особое внимание. Микроорганизмы чрезвычайно богаты белком – он составляет 70-80 процентов их веса. Скорость его синтеза огромна. Микроорганизмы примерно в 10-100 тысяч раз быстрее синтезируют белок, чем животные. Здесь уместно привести классический пример: 400-килограммовая корова производит в день 400 граммов белка, а 400 килограммов бактерий – 40 тысяч тонн. Естественно, на получение 1 кг белка микробиологическим синтезом при соответствующей промышленной технологии потребуются средств меньше, чем на получение 1 кг белка животного. Да к тому же технологический процесс куда менее трудоемок, чем сельскохозяйственное производство, не говоря уже об исключении сезонных влияний погоды – заморозков, дождей, суховея, засух, освещенности, солнечной радиации.

Применяя обычные технологические линии по производству синтетических волокон, можно получать из искусственных белков длинные нити, которые после пропитки их формообразующими веществами, придания им соответствующего вкуса, цвета и запаха могут имитировать любой белковый продукт. Таким способом уже получены искусственное мясо (говядина, свинина, различные виды птиц), молоко, сыры и другие продукты. Они уже прошли широкую биологическую апробацию на животных и людях, и вышли из лабораторий на прилавки магазинов США, Англии, Индии, стран Азии и Африки. Только в одной Англии их производство достигает примерно 1500 тонн в год. Интересно, что белковую часть школьных обедов в США уже разрешено на 30 процентов заменять искусственным мясом, созданным на основе соевого белка.

Из 20 аминокислот, входящих в состав белков, 8 аминокислот люди не могут синтезировать, и их относят к незаменимым. Это изолейцин, лейцин, лизин, метионин, треонин, триптофан, валин, фенилаланин. Аминокислоты – это не только питательные вещества, но также ароматические и вкусовые агенты, и потому они широко используются в пищевой промышленности.

Как питательную добавку в пищу чаще всего вносят лизин и метионин. Глутамат натрия и глицин употребляют как ароматические вещества для усиления и улучшения вкуса пищи. У глицина освежающий, сладкий вкус. Его вводят в сладкие напитки, и кроме того, он проявляет там бактериостатическое действие. Цистеин предотвращает подгорание пищи, улучшает пекарские процессы и качество хлеба. Благодаря некоторым бактериям удается получать около 100 г/л глутаминовой аминокислоты. Ежегодно в мире производят микробиологическим способом 270 000 т этой аминокислоты, основная часть которой идет в пищевую промышленность. По объему продукции второе место после глутаминовой кислоты занимает лизин – 180 000 т/год. Другие аминокислоты производят в гораздо меньших количествах.

Аминокислоты в большом количестве применяют как добавку к растительным кормам, которые дефицитны по метионину, треонину, триптофану и особенно по лизину.

Если в животных белках содержится 7-9 % лизина, то в белках пшеницы – только около 3 %.

Внесение в корма лизина до содержания 0,3 % позволяет сократить их расход больше, чем на 20 %. За последние 8 лет количество аминокислот, добавляемых в корма, выросло в 14 раз. Во многих странах метионин добавляют к соевой муке – белковой добавке кормов. Главная область практического применения аминокислот – обогащение кормов. На основе аминокислот готовят искусственный подсластитель – метиловый эфир L-аспартил-L-фенилаланина, который в 150 раз слаще, чем глюкоза.

2. Спектр продуктов питания, получаемых при помощи микроорганизмов, обширен. Это продукты, получаемые в результате брожения – хлеб, сыр, вино, пиво, творог и так далее. До недавнего времени биотехнология использовалась в пищевой промышленности с целью усовершенствования освоенных процессов и более умелого использования микроорганизмов, но будущее здесь принадлежит генетическим исследованиям по созданию более продуктивных штаммов для конкретных нужд, внедрению новых методов в технологии брожения.

Получение молочных продуктов в пищевой промышленности построено на процессах ферментации. Основой биотехнологии молочных продуктов является молоко. Молоко (секрет молочных желез) – уникальная естественная питательная среда. Благодаря своему составу молоко представляет собой прекрасный субстрат для развития микроорганизмов. В сквашивании молока обычно принимают участие стрептококки и молочнокислые бактерии. Путем использования реакций, которые

сопутствуют главному процессу сбраживания лактозы, получают и другие продукты переработки молока: сметану, йогурт, сыр и т.д. Свойства конечного продукта зависят от характера и интенсивности реакций ферментации. Те реакции, которые сопутствуют образованию молочной кислоты, определяют обычно особые свойства продуктов. Например, вторичные реакции ферментации, идущие при созревании сыров, определяют вкус отдельных их сортов. В таких реакциях принимают участие пептиды, аминокислоты и жирные кислоты, находящиеся в молоке.

Все технологические процессы производства продуктов из молока делятся на две части:

- 1) первичная переработка – уничтожение побочной микрофлоры;
- 2) вторичная переработка.

Первичная переработка молока включает в себя несколько этапов. Вторичная переработка молока может идти двумя путями: с использованием микроорганизмов и с использованием ферментов. С использованием микроорганизмов выпускают кефир, сметану, творог, простокваши, казеин, сыры, биофруктолакт, биолакт, с использованием ферментов – пищевой гидролизат казеина, сухую молочную смесь для коктейлей и т.д.

Молочнокислое брожение бывает гомоферментативным и гетероферментативным. При гомоферментативном брожении основным продуктом является молочная кислота. При гетероферментативном брожении образуются диацетил (придающий вкус сливочному маслу), спирты, эфиры, летучие жирные кислоты. Одновременно идут протеолитические и липолитические процессы, что делает белки молока более доступными и обогащает дополнительными вкусовыми веществами.

Для процессов ферментации молока используются чистые культуры микроорганизмов, называемые заквасками. Исключение составляют закваски для кефиров, которые представляют естественный симбиоз нескольких видов молочнокислых грибов и молочнокислых бактерий. Этот симбиоз в лабораторных условиях воспроизвести не удалось, поэтому поддерживается культура, выделенная из природных источников.

Культуры для заквасок выделяются из природных источников, после чего проводится направленный мутагенез и отбор штаммов, отвечающих перечисленным выше требованиям. Биотехнологии на основе молока включают, как правило, все основные стадии биотехнологического производства, которые можно рассмотреть на примере сыроварения.

Производство сыра, или сыроделие (сыроварение) – один из древнейших процессов, основанных на ферментации. Сыры бывают самые разнообразные – от мягких до твердых. На первом этапе идет подготовка молока (первичная обработка). На втором – готовится культура молочнокислых бактерий. Микроорганизмы подбираются в определенной пропорции, обеспечивающей наилучшее качество. Набор бактерий также зависит от температуры термообработки. Третья стадия – стадия ферментации, – в сыроварении в некоторых случаях происходит в два

этапа, до и после стадии выделения. Сначала молоко инокулируют определенными штаммами микроорганизмов, приводящими к образованию молочной кислоты, а также добавляют сычужный фермент реннин. Реннин ускоряет превращение жидкого молока в сгусток (створаживание) в несколько раз. Эта реакция активируется молочной кислотой, вырабатываемой бактериями. После образования сгустка сыворотку отделяют, а полученную творожистую массу подвергают термообработке и прессуют в формах. Далее сгусток солят и ставят на созревание. Иногда полученная масса проходит дополнительную обработку, которая заключается в следующем: заражение спорами голубых плесневых грибов при производстве рокфора; нанесение на поверхность спор белых плесневых грибов при производстве камамбера и бри. Некоторые сыры после выделения должны подвергнуться дальнейшей ферментации (стадия созревания). Микроорганизмы и ферменты в ходе этого процесса гидролизуют жиры, белки и некоторые другие вещества молодого сыра. В результате их распада образуются вещества, придающие сырам характерный вкус.

Процессы ферментации при производстве многих молочных продуктов, таких как сметана, творог, многие сыры идут в ферментерах открытого типа. Как правило, они занимают немного времени. К одним из самых простых относят производство кефира, простокваш, сметаны и масла. Например, при производстве сметаны к сливкам добавляют 0,5-1,0 % закваски, используемой при производстве масла. Далее продукт выдерживают, пока концентрация кислоты не достигнет 0,6 %. В заключение хотелось бы добавить, что процессы получения молочнокислых продуктов весьма просты и доступны для воспроизводства в домашних условиях. Они не требуют строгих условий соблюдения стерильности, протекают, как правило, при комнатной или чуть повышенной температуре. Собственно, изначально они были одними из первых "домашних" биотехнологий, которые были позднее поставлены на промышленную основу.

Лекция 8. Применение биотехнологических процессов для решения проблем окружающей среды

План

1. Биотрансформация ксенобиотиков и загрязняющих окружающую среду веществ.

2. Очистка сточных вод биотехнологическими методами.

2.1. Аэробная очистка сточных вод.

2.2. Анаэробная очистка сточных вод.

1. При удалении ксенобиотиков из окружающей среды важны несколько факторов: устойчивость ксенобиотиков к различным воздействиям; растворимость их в воде; летучесть ксенобиотиков; pH среды; способность ксенобиотиков поступать в клетки микроорганизмов; сходство ксенобиотиков и природных соединений, подвергающихся

естественной биодegradации.

Для биодegradации ксенобиотиков лучше использовать ассоциации микроорганизмов, так как они более эффективны, чем отдельно взятые виды. При этом типы связей в подобной ассоциации могут быть различны. Один вид микроорганизмов может непосредственно участвовать в разложении ксенобиотиков, а другой – поставлять недостающие питательные вещества.

Особенно трудно разлагаются такие биоциды, как детергенты, пластики и углеводороды. Самыми способными к борьбе с загрязнителями различного типа являются представители рода *Pseudomonas* – они практически «всеядны». Клетки этих микроорганизмов содержат оксидоредуктазы и гидроксилазы, способные разлагать большое число молекул углеводородов и ароматических соединений, таких как бензол, ксилол, толуол. Гены, кодирующие эти ферменты, находятся в составе плазмид. Например, плазида ОСТ отвечает за разложение октана и гексана, ХУЛ – ксилола и толуола, НАН – нафталина, САМ – камфары. Плазмиды САМ и НАН обеспечивают собственный перенос, индуцируя скрещивание бактериальных клеток; остальные плазмиды могут быть перенесены только в том случае, если в бактерии введены другие плазмиды, обеспечивающие скрещивание.

В 1979 г. Чакрабартти после успешных скрещиваний получил штамм, содержащий плазмиды ХУЛ и НАН, а также гибридную плазмиду, полученную путем рекомбинации частей плазмид САМ и ОСТ (сами по себе они несовместимы, т.е. не могут сосуществовать как отдельные плазмиды в одной бактериальной клетке). Этот штамм способен быстро расти на неочищенной нефти, так как он метаболизирует углеводороды гораздо активнее, чем любой из штаммов, содержащих только одну плазмиду. Штамм может быть особенно полезен в очистных водоемах для сточных вод, где можно контролировать температуру и другие внешние факторы. Эти микроорганизмы удобно использовать для очистки нефтяных пятен на суше или море при различных авариях. Для большей эффективности создают микроэмульсию, содержащую бактериальные штаммы и капсулы со смесью основных питательных элементов – азота, фосфора и калия внутри. Добавление этих веществ стимулирует размножение бактериальных штаммов. Применение такого метода позволяет очистить от 70 до 90 % загрязненной поверхности, за это же время очищается всего порядка 10-20 % необработанной поверхности.

Преимущество бактериальной очистки по сравнению с химической в том, что она не вызывает появления нового загрязняющего агента в окружающей среде. Плотность фитопланктона после бактериальной очистки повышается. Некоторые микроорганизмы способны изменять молекулу ксенобиотика и делать ее доступной и привлекательной для других микроорганизмов («кометаболизм»).

Одним из сильных загрязнителей является ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота). Причина в том, что ЭДТА связывает

тяжелые металлы, способствуя их накоплению в почве. Бактерии родов *Pseudomonas* и *Bacillus* способны за две недели разрушить все связи комплекса Fe-ЭДТА. Эти бактерии успешно применяются для очистки бытовых сточных вод, куда попадают детергенты моющих средств. Кроме *Pseudomonas*, биodeградацию ксенобиотиков могут осуществлять и представители родов *Acinetobacter*, *Metviosinus*.

Однако в некоторых случаях внесение этих микроорганизмов в почву может изменить экосистему местности. Избежать этого можно, ограничивая время жизнедеятельности бактерий. Например, облучая штаммы ультрафиолетом, получили мутант, ауксотрофный по лейцину. Бактерии размножают в питательной среде, содержащей лейцин. Суспензией микроорганизмов в питательной среде пропитывают древесную стружку, которую разбрасывают по загрязненной территории. Количество лейцина рассчитывается на время, достаточное для уничтожения вредных примесей, поэтому после очистки мутантные штаммы гибнут.

Еще эффективнее, чем бактерии, справляются с почвенными загрязнителями грибы. Они могут разрушать такие вещества, как пентахлорбензол, пентахлорофенол. В одном из экспериментов грибами обработали около 10000 т почвы с территории деревоперерабатывающего комплекса. В этой почве содержание пентахлорофенола достигало 700 мг/кг, но за год деятельности оно снизилось до 10 мг/кг, что является допустимой нормой. Бактерии смогли бы переработать эту почву лишь за 4-5 лет. Грибы активны и зимой, разрушают высокомолекулярные полиароматические углеводороды, действуют внеклеточно, выделяя неспецифические ферменты. Стоимость грибной и бактериальной очистки одинаковы, но применение грибов позволяет сокращать сроки деградации и существенно удешевляет ее.

2.1. При очистке сточных вод выполняют четыре основные операции:

1. При первичной переработке происходит усреднение и осветление сточных вод от механических примесей (усреднители, песколовки, решетки, отстойники).

2. На втором этапе происходит разрушение растворенных органических веществ при участии аэробных микроорганизмов. Образующийся ил, состоящий главным образом из микробных клеток, либо удаляется, либо перекачивается в реактор. При технологии, использующей активный ил, часть его возвращается в аэрационный тенк (аэротенк).

3. На третьем (необязательном) этапе производится химическое осаждение и разделение азота и фосфора.

4. Для переработки ила, образующегося на первом и втором этапах, обычно используется процесс анаэробного разложения. При этом уменьшается объем осадка и количество патогенов, устраняется запах и образуется ценное органическое топливо – метан.

На практике применяются одноступенчатые и многоступенчатые системы очистки. Одноступенчатая схема очистки сточной воды

представлена на рис. 3.

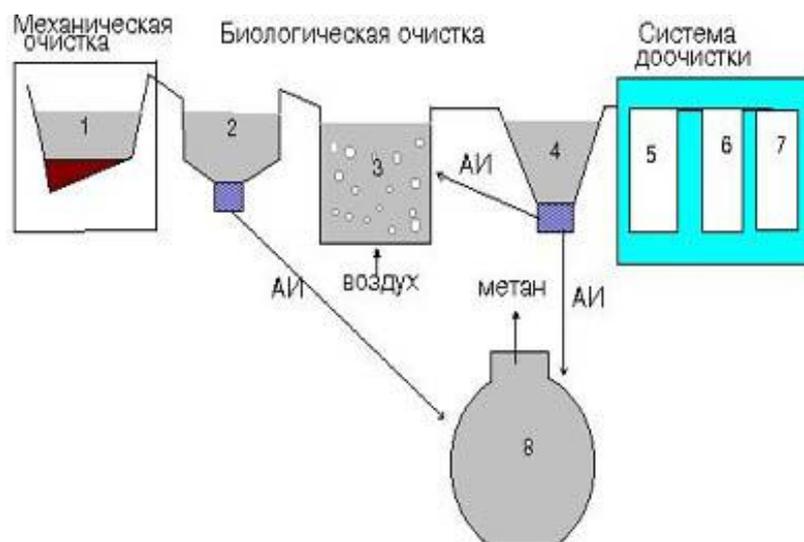


Рис. 3. Принципиальная схема очистных сооружений:

АИ – активный ил; 1 – пескоуловители; 2 – первичные отстойники; 3 – аэротенк; 4 – вторичные отстойники; 5 – биологические пруды; 6 – осветление; 7 – реагентная обработка; 8 – метатенк;

Биологическая очистка воды происходит в аэротенках. Аэротенк представляет собой открытое железобетонное сооружение, через которое проходит сточная вода, содержащая органические загрязнения и активный ил. Суспензия ила в сточной воде на протяжении всего времени нахождения в аэротенке подвергается аэрации воздухом. Интенсивная аэрация суспензии активного ила кислородом приводит к восстановлению его способности сорбировать органические примеси.

В основе биологической очистки воды лежит деятельность активного ила (АИ) или биопленки, естественно возникшего биоценоза, формирующегося на каждом конкретном производстве в зависимости от состава сточных вод и выбранного режима очистки. Активный ил представляет собой темно-коричневые хлопья, размером до нескольких сотен микрометров. На 70% он состоит из живых организмов и на 30% – из твердых частиц неорганической природы. Живые организмы вместе с твердым носителем образуют зооглей – симбиоз популяций микроорганизмов, покрытый общей слизистой оболочкой. Микроорганизмы, выделенные из активного ила относятся к различным родам: *Actinomyces*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Bacterium*, *Corynebacterium*, *Desulfomonas*, *Pseudomonas*, *Sarcina* и др. Наиболее многочисленны бактерии рода *Pseudomonas*, о всеядности которых упоминалось ранее. В зависимости от внешней среды, которой в данном случае является сточная вода, та или иная группа бактерий может оказаться преобладающей, а остальные становятся спутниками основной группы.

Существенная роль в создании и функционировании активного ила

принадлежит простейшим. Функции простейших достаточно многообразны; они сами не принимают непосредственного участия в потреблении органических веществ, но регулируют возрастной и видовой состав микроорганизмов в активном иле, поддерживая его на определенном уровне. Поглощая большое количество бактерий, простейшие способствуют выходу бактериальных экзоферментов, концентрирующихся в слизистой оболочке, и тем самым принимают участие в деструкции загрязнений. В активных илах встречаются представители четырех классов простейших: саркодовые (*Sarcodina*), жгутиковые инфузории (*Mastigophora*), реснитчатые инфузории (*Ciliata*), сосущие инфузории (*Suctorina*).

На формирование ценозов активного ила могут оказывать влияние и сезонные колебания температуры, обеспеченность кислородом, присутствие минеральных компонентов. Все это делает состав или сложным и практически невозпроизводимым. Эффективность работы очистных сооружений зависит также от концентрации микроорганизмов в сточных водах и возраста активного ила. В обычных аэротенках текущая концентрация активного ила не превышает 2-4 г/л.

Увеличение концентрации ила в сточной воде приводит к росту скорости очистки, но требует усиления аэрации для поддержания концентрации кислорода на необходимом уровне. Таким образом, аэробная переработка стоков включает в себя 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 экскретируемых продуктов;

- б) «выедание» первичной популяции организмов вторичными потребителями. В идеале это должно приводить к полной минерализации отходов до простых солей, газов и воды. На практике очищенная вода и активный ил из аэротенка подаются во вторичный отстойник, где происходит отделение активного ила от воды. Часть активного ила возвращается в систему очистки, а избыток активного ила, образовавшийся в результате роста микроорганизмов, поступает на иловые площадки, где обезвоживается и вывозится на поля. Избыток активного ила можно также перерабатывать анаэробным путем. Переработанный активный ил может служить и как удобрения, и как корм для рыб, скота.

Система полной доочистки может состоять из множества элементов, которые определяются дальнейшим назначением сточной воды. Возможно применение биологических прудов, где биологически очищенная вода проходит осветление и насыщается кислородом. Пруды также относятся к системе биологической очистки, в которой под воздействием биоценоза активного ила происходит окисление органических примесей. Состав биоценозов биологических прудов определяется глубиной нахождения данной группы микроорганизмов. В верхних слоях развиваются аэробные

культуры, в придонных – факультативные аэробы и анаэробы, способные осуществлять процессы метанового брожения или восстановление сульфатов. Насыщение воды кислородом происходит за счет процессов фотосинтеза, осуществляемого водорослями, из которых особенно широко представлены *Clorella*, *Scenedesmus*, встречаются эвгленовые, вольвоксовые и т.д. В прудах также в той или иной мере представлена микро- и макрофауна: простейшие, черви, колдоватки, насекомые и др. В биопрудах из воды хорошо удаляются нефтепродукты, фенолы и другие органические соединения. В некоторых случаях воду после биологической очистки подвергают реагентной обработке – хлорированию или озонированию.

Интенсифицировать процессы биологической очистки можно путем аэрации суспензии активного ила чистым кислородом. Этот процесс можно осуществить в модифицированных аэротенках закрытого типа – окситенках, с принудительной аэрацией сточной воды. В отличие от аэротенков в биофильтрах (или перколяционных фильтрах) клетки микроорганизмов находятся в неподвижном состоянии, так как прикреплены к поверхности пористого носителя. Образовавшуюся таким образом биопленку можно отнести к иммобилизованным клеткам. В этом случае иммобилизована не монокультура, а целый консорциум, неповторимый по качественному и количественному составу и различающийся в зависимости от его местонахождения на поверхности носителя. Очищаемая вода контактирует с неподвижным носителем, на котором иммобилизованы клетки и за счет их жизнедеятельности происходит снижение концентрации загрязнителя. В качестве носителей можно использовать керамику, щебень, гравий, керамзит, металлический или полимерный материал с высокой пористостью. Для биофильтров характерно наличие противотока воды, которая поступает сверху и воздуха, подающегося снизу. Оторвавшиеся частицы микробной пленки после отделения их во вторичном отстойнике не возвращаются обратно в биофильтр, а идут на иловые площадки или в анаэробную преработку.

Преимущество применения биофильтров состоит в том, что формирование конкретного ценоза приводит к практически полному удалению всех органических примесей. Недостатками этого метода можно считать: нереальность использования стоков с высоким содержанием органических примесей; необходимость равномерного орошения поверхности биофильтра сточными водами, подаваемыми с постоянной скоростью; сточные воды перед подачей должны быть освобождены от взвешенных частиц во избежание заиливания.

2.2. Как уже упоминалось, избыток активного ила может перерабатываться двумя способами: после высушивания как удобрение или же попадает в систему анаэробной очистки. Такие же способы очистки применяют и при сбрасывании высококонцентрированных стоков, содержащих большое количество органических веществ. Процессы брожения осуществляются в специальных аппаратах – метатенках.

Распад органических веществ состоит из трех этапов: растворение и

гидролиз органических соединений; ацидогенез; метаногенез.

На первом этапе сложные органические вещества превращаются в масляную, пропионовую и молочную кислоты. На втором этапе эти органические кислоты превращаются в уксусную кислоту, водород, углекислый газ. На третьем этапе метанообразующие бактерии восстанавливают диоксид углерода в метан с поглощением водорода. По видовому составу биоценоз метатенков значительно беднее аэробных биоценозов. Но этот процесс имеет большее отношение к биоэнергетике.

Лекция 9. Технологическая биоэнергетика

План

1. Биоэнергетика.
2. Получение биогаза.
3. Биоэтанол.
4. Фотогальванические элементы.

1. Растительный покров Земли составляет более 1800 млрд. т сухого вещества, что энергетически эквивалентно известным запасам энергии полезных ископаемых. Леса составляют около 68% биомассы суши, травяные экосистемы – примерно 16%, а возделываемые земли – только 8%.

Для сухого вещества простейший способ превращения биомассы в энергию заключается в сгорании – оно обеспечивает тепло, которое в свою очередь превращается в механическую или электрическую энергию. Что же касается сырого вещества, то в этом случае древнейшим и наиболее эффективным методом превращения биомассы в энергию является получение биогаза (метана).

2. Метановое «брожение», или биометаногенез, – давно известный процесс превращения биомассы в энергию. Он был открыт в 1776 г. Вольтой, который установил наличие метана в болотном газе. Биогаз, получающийся в ходе этого процесса, представляет собой смесь из 65% метана, 30% углекислого газа, 1% сероводорода и незначительных количеств азота, кислорода, водорода и закиси углерода. Болотный газ дает пламя синего цвета и не имеет запаха. Его бездымное горение причиняет гораздо меньше неудобств людям по сравнению со сгоранием дров, навоза жвачных животных или кухонных отходов. Энергия, заключенная в 28 м³ биогаза, эквивалентна энергии 16,8 м³ природного газа, 20,8 л нефти или 18,4 л дизельного топлива.

Биометаногенез осуществляется в три этапа: растворение и гидролиз органических соединений, ацидогенез и метаногенез. В энергоконверсию вовлекается только половина органического материала – 1800 ккал/кг сухого вещества по сравнению с 4000 ккал при термохимических процессах, но остатки, или шлаки, метанового «брожения» используются в сельском хозяйстве как удобрения. В процессе биометаногенеза участвуют три группы бактерий. Первые превращают сложные органические субстраты в масляную, пропионовую и молочную кислоты; вторые

превращают эти органические кислоты в уксусную кислоту, водород и углекислый газ, а затем метанообразующие бактерии восстанавливают углекислый газ в метан с поглощением водорода, который в противном случае может ингибировать уксуснокислые бактерии. В 1967 г. Брайант и др. установили, что уксуснокислые и метанообразующие микроорганизмы образуют симбиоз, который ранее считался одним микробом и назывался *Methanobacillus omelanski*.

Для всех метанобактерий характерна способность к росту в присутствии водорода и углекислого газа, а также высокая чувствительность к кислороду и ингибиторам производства метана. В природных условиях метанобактерии тесно связаны с водородобразующими бактериями: эта трофическая ассоциация выгодна для обоих типов бактерий. Первые используют газообразный водород, продуцируемый последними; в результате его концентрация снижается и становится безопасной для водородобразующих бактерий.

Метановое «брожение» происходит в водонепроницаемых цилиндрических цистернах (дайджестерах, метантенках). Конструкция метантенков может быть разнообразной. В тех случаях, когда используются отходы домашнего хозяйства или жидкий навоз, соотношение между твердыми компонентами и водой должно составлять 1 : 1 (100 кг отходов на 100 кг воды), что соответствует общей концентрации твердых веществ, составляющей 8-11 % по весу. Смесь сбраживаемых материалов обычно засевают ацетогенными и метаногенными бактериями или отстоем из другого дайджестера. Против закисления используют известь. Оптимальное «переваривание» происходит в условиях, близких к нейтральным (рН 6,0-8,0). Максимальная температура процесса зависит от мезофильности или термофильности микроорганизмов (30-40 °С или 50-60 °С); резкие изменения температуры нежелательны.

С точки зрения питательных потребностей бактерий избыток азота (например, в случае жидкого навоза) способствует накоплению аммиака, который подавляет рост бактерий. Для оптимальной переработки соотношение C/N должно быть порядка 30 : 1 (по весу). Это соотношение можно изменять, смешивая субстраты, богатые азотом, с субстратами, богатыми углеродом. Так, C/N навоза можно изменить добавлением соломы или жома сахарного тростника. Желательно перемешивать суспензию сбраживаемых веществ, чтобы воспрепятствовать расслаиванию, которое подавляет брожение. Твердый материал необходимо раздробить, так как наличие крупных комков препятствует образованию метана. Обычно длительность переработки навоза крупного рогатого скота составляет две-четыре недели. Двухнедельной переработки при температуре 35 °С достаточно, чтобы убить все патогенные энтеробактерии и энтеровирусы, а также 90% популяции *Ascaris lumbricoides* и *Ancylostoma*.

Биогаз состоит из 62 % метана и 38 % углекислого газа; последний предполагают использовать в теплицах для ускорения фотосинтеза культивируемых растений. Отходы переработки, содержащие только 12 %

твердого вещества, скармливают рыбам. Это помогло сэкономить половину гранулированных кормов из злаков, которые обычно употребляют при разведении рыб. Как показали эксперименты, богатые белками, минеральными солями и витаминами отходы крупного рогатого скота и овец можно использовать в качестве корма для скота, заменяя ими до 25 % сухого вещества поглощаемой пищи.

Производство биогаза имеет следующие достоинства: это источник энергии; отходы процесса служат высококачественными удобрениями и в довершение сам процесс способствует поддержанию чистоты окружающей среды. Чтобы обеспечить крупномасштабное развитие и экономическую выгоду предприятий по производству биогаза, необходимо решить целый ряд биохимических, микробиологических и социальных проблем.

3. Биотехнология в состоянии внести крупный вклад в решение проблем энергетики посредством производства достаточно дешевого биосинтетического этанола, который кроме того является и важным сырьем для микробиологической промышленности при получении пищевых и кормовых белков, а также белково-липидных кормовых препаратов. Крупнейшие мировые производители спирта (по данным на 2000г.): Бразилия – 10,6 млрд. л; США – 6,5 млрд. л; Китай – 3 млрд. л; Индия – 1,7 млрд. л; Россия – 1,3 млрд. л. Стратегическую роль в бразильской экономике спирт приобрел в середине 70-ых годов с введением программы *Proalcool*, запущенной в 1975 году после мирового нефтяного кризиса в начале 70-ых. В Бразилии производится два вида этилового спирта: негидрированный – используется в качестве добавки к бензину в пропорции 20-24 % и не требует изменений в двигателе; гидрированный – используется в качестве топлива и требует специального двигателя, работающего на спирте. Бразилия является первой страной, начавшей использовать негидрированный спирт в качестве добавки к топливу.

Источником углеводов также могут служить водоросли. У широко распространенной зеленой водоросли *Botryococcus braunii* (обитающей в пресной и солоноватой воде умеренных и тропических зон) углеводороды в зависимости от условий роста и разновидностей могут составлять до 75 % сухой массы. Они накапливаются внутри клеток, и водоросли, в которых их много, плавают на поверхности. После сбора водорослей эти углеводороды легко отделить экстракцией каким-нибудь растворителем или методом деструктивной отгонки. Таким путем может быть получено вещество, аналогичное дизельному топливу и керосину. Выход углеводов при создании оптимальных условий культивирования может достигать 60 т/га/год для культуры водорослей, выращиваемой в толще воды в природных или искусственных условиях. Для определения перспективности использования *B.braunii* необходимо провести следующие исследования: определить условия, обеспечивающие максимальную скорость роста и образования углеводов в лабораторных и полевых условиях; выяснить, можно ли добиться скорости роста *B.braunii*, сопоставимой с известной для других водорослей; разработать

соответствующие методы выращивания, сбора и переработки; оценить применимость получаемого продукта как альтернативного источника топлива и смазочных веществ. Исследования, связанные с выделением и возможностью утилизации углеводов *B.braunii*, могут также способствовать лучшему пониманию вопроса о происхождении нефти.

4. Клеточные мембраны некоторых галобактерий также рассматриваются как альтернативные источники получения энергии. Были получены фотогальванические элементы на основе бактериородопсина, генерировавшие электрический ток. Кроме того, отличным экологически чистым и возобновляемым источником энергии является фотоводород, который получают с использованием мембран хлоропластов.

Специфический механизм превращения энергии существует у галофильных бактерий. *Halobacterium halobium* используют энергию света, поглощаемую пурпурным пигментом бактериородопсином, находящимся в мембране клеток. Этот белок с необычными свойствами был выделен и описан в 1973 году У. Стохениусом и Д. Остерхельтом. С его помощью бактерии улавливают энергию Солнца. Поглощение света вызывает химические и физические превращения в молекуле пигмента, приводящие к переносу протонов с одной стороны мембраны на другую, при этом создаётся электрохимический градиент. Разность потенциалов может быть использована для генерирования электрического тока.

Бактериородопсин несложно выделить из бактерий. Для этого бактерии помещают в воду, где они переполняются водой и лопаются. Мембраны, содержащие бактериородопсин, не разрушаются в воде из-за прочной упаковки молекул пигмента, которые образуют белковые кристаллы – так называемые фиолетовые бляшки. В них молекулы бактериородопсина объединены в триады, а триады – в правильные шестиугольники. Бляшки крупные, легко отделяются центрифугированием. После промывания осадка получается паста фиолетового цвета. На 75 % она состоит из бактериородопсина и на 25 % из фосфолипидов, заполняющих промежутки между белковыми молекулами. Бактериородопсин устойчив к факторам внешней среды: не утрачивает активность при нагревании до 100 °С, хранится в холодильнике годами, устойчив к кислотам и химическим окисляющим агентам. Устойчивы и фосфолипиды фиолетовых бляшек.

H.halobium можно культивировать в водоемах с высокой концентрацией хлористого натрия и других минеральных солей. Из 10 литров бактериальной культуры получают 0,5 грамма мембран, содержащих 100000 молекул пигмента. Бактериородопсин осаждают с помощью катионов кальция или другим способом. Пигмент можно фиксировать на подложках, обладающих физическими и химическими свойствами для транспорта протонов, и создавать на их основе системы, генерирующие электрический ток. При освещении таких систем на мембране обнаруживается электрический потенциал, то есть бактериородопсин функционирует как генератор электрического тока. В

лаборатории В.П. Скулачева были созданы фотогальванические элементы для генерирования тока силой 800 мкА. В них применялись мембранные фильтры, пропитанные фосфолипидами с бактериородопсином и хлорофиллом. Такие фильтры, соединенные последовательно, могут служить в качестве электрической батареи.

Лекция 10. Биоготехнология

План

1. Понятие биоготехнологии.
2. Биотехнология выщелачивания металлов.
3. Биотехнология обессеривания углей.
4. Борьба с метаном в угольных шахтах.
5. Повышение нефтеотдачи пластов.
6. Биоготехнология и поиск нефтяных и газовых месторождений.

1. Биоготехнология – использование геохимической деятельности микроорганизмов в горнодобывающей промышленности, в практической деятельности человека, связанной с рациональным использованием горных богатств и их безотходной переработкой.

Современная биоготехнология представляет собой совокупность прикладных аспектов геологической микробиологии – рудной, нефтяной, угольной. Проблемы, которые решаются с помощью микроорганизмов, свидетельствуют о больших возможностях биоготехнологии.

2. Биоготехнология выщелачивания металлов

Предполагает использование главным образом тионовых (окисляющих серу и серосодержащие соединения) бактерий для извлечения металлов из руд, рудных концентратов и горных пород. При переработке сложных руд, содержащих зачастую свыше 20 полезных элементов, а также руд с низким содержанием металлов, традиционные методов не применимы, так как они нерентабельны и не решают остро вставших проблем рационального использования природных ресурсов и охраны окружающей среды от загрязнения. Тысячи и даже миллионы тонн ценных металлов теряются в виде отходов, шлаков, «хвостов».

Для биоготехнологической добычи металлов можно использовать многие микроорганизмы, но основным из них, безусловно, является открытый в 1947 г. Колмером и Хинкелем вид тионовых бактерий, названный *Thiobacillus ferrooxidans*.

Технология кучного способа бактериально-химического выщелачивания обеспечивает рентабельное извлечение металлов из сульфидных руд, складываемых в виде отвалов на поверхности земли. Суть этой технологии заключается в орошении отвалов добытой руды растворами, содержащими серную кислоту, ионы железа (II и III), а также жизнеспособные клетки тионовых бактерий. Иногда для усиления процессов выщелачивания внутрь отвала подают воздух. Выщелачивающий раствор фильтруется через толщу руды и в результате микробиологических и химических процессов обогащается извлекаемыми из руды металлами.

Раствор собирают и при помощи системы коллекторов и извлекают из него металлы физико-химическими методами.

Выщелачивание металлов можно осуществлять непосредственно и из руд в месте их залегания. Этот способ позволяет добывать металлы без строительства шахт и без тяжёлого шахтёрского труда. Так получают медь и уран.

При помощи бактериального выщелачивания извлекают металлы из рудных концентратов, в которых содержится не только несколько ценных металлов, но и вредные примеси, например, мышьяк.

3. Биогeотехнология обессеривания углей

Это удаление с помощью тионовых бактерий серосодержащих соединений (бактериальное выщелачивание).

Бурые и каменные угли нередко содержат значительное количество серы: до 10-12 %, которая представлена, в основном, сульфидом железа – пиритом; меньше содержится сульфатной и органической серы. Микробное удаление серы из углей не только экономически выгодно, но и способно решить проблему сернокислотных дождей.

4. Борьба с метаном в угольных шахтах

Для борьбы с метаном в угольных шахтах применяют метанооксиляющие бактерии, которые помогают снижать концентрацию метана в угольных пластах и выработанных пространствах.

5. Повышение нефтеотдачи пластов

Мировые запасы нефти могут быть исчерпаны уже в ближайшие 50 лет. Действующие технологии позволяют извлекать только половину нефти, содержащейся в месторождениях, что обусловлено прочной связью нефти с вмещающими её породами. Микробиологические способы повышения выхода нефти могут осуществляться непосредственно или косвенно, с применением ксантана, который закачивают в нефтяные пласты для интенсификации вторичной добычи нефти.

6. Биогeотехнология и поиск нефтяных и газовых месторождений

Микроорганизмы, разлагающие углеводородные соединения, являются индикаторами нефти и газа. Над залежами нефти существует бактериальный фильтр – повышенное содержание углеводородоксиляющей микрофлоры в образцах пород почв и природных вод. Эффективность газобактериальной разведки на нефть и газ, которая существует более 50 лет, составляет в среднем 65-70 %. Причём ни на одной из площадей, охарактеризованных отрицательно микробиологическим методом, при последующей разведке признаков нефти и газа обнаружено не было. Экономический эффект применения геомикробиологического метода достигается за счёт сокращения объёма геофизической разведки и бурения на бесперспективных площадях.

Лекция 11. Биотехнология в других отраслях промышленности

План

1. Производство органических кислот, аминокислот, витаминов и

других продуктов.

2. Биоэлектроника. Биосенсоры на основе иммобилизованных ферментов.

3. Использование биотехнологических процессов в химической и нефтегазовой промышленности.

1. Производство аминокислот относится к одной из наиболее передовых областей биотехнологии. Аминокислоты получают путем химического синтеза или экстракцией из белковых гидролизатов.

Незаменимые аминокислоты могут получаться микробиологическим путем более эффективно, чем путем химического синтеза, так как при биологическом синтезе используемые микроорганизмы образуют аминокислоты в биологически активной L-форме. Как продуценты лизина изучаются *Brevibacterium lactofermentum* и бактерии рода *Corynebacterium*, также предложены способы биотехнологического получения изолейцина, треонина при использовании *E. coli*. Большинство исследованных штаммов микроорганизмов независимо от их систематического положения преимущественно накапливают L-аланин и глутаминовую кислоту. Значительно меньше штаммов и в меньшем количестве выделяют аспарагиновую кислоту, лейцин, валин, изолейцин, лизин. За рубежом 60 % мощностей по производству аминокислот занимают глутаминовая кислота, далее идут метионин, лизин и глицин. Глутаминовая кислота производится при участии в качестве продуцента штамма *Corynebacterium*.

С помощью микроорганизмов можно получить до 60 органических кислот. Многие из них получают в промышленном масштабе – итаконная, молочная, уксусная, лимонная, яблочная, янтарная. Эти пищевые кислоты используются как регуляторы кислотности и консерванты. Лимонную кислоту получают с помощью *Yarrowia lipolytica*, *Aspergillus niger*, молочную – *Endomycopsis fibuligera*, *Rhizopus oryzae*, *Lactobacillus casei*, янтарную – *Anaerobiospirillum succiniproducens*. Уксусную кислоту получают путем микробиологической конверсии водорода и углекислого газа бактериями *Acetobacterium woodi* и *Clostridium aceticum*.

Микроорганизмы содержат много витаминов, которые чаще всего входят в состав ферментов. Состав и количество витаминов в биомассе зависят от биологических свойств данной культуры микроорганизмов и условий культивирования. Некоторые витамины микроорганизмы синтезируют, другие, напротив, усваивают в готовом виде из окружающей среды. Культура, способная синтезировать какой-либо витамин, называется автотрофной по отношению к нему, если культура не способна синтезировать данный витамин, она является авто-гетеротрофной.

Витамины синтезируют в основном химическим путем или получают из естественных источников. Однако эргостерин, рибофлавин (В₂), витамин В₁₂ и аскорбиновую кислоту (микроорганизмы используются как селективные окислители сорбита в сорбозу при производстве витамина С) получают микробиологическим путем. Для синтеза витаминов В₁, В₂, В₆, В₁₂

и аскорбиновой кислоты также используют кефирные грибки, а бифидобактерии – группы В, РР (никотиновая кислота) и Н, однако пока эти микроорганизмы не используются как продуценты витаминов в промышленных масштабах.

Изменяя условия среды, содержание отдельных витаминов можно увеличить. Так, количество рибофлавина зависит от интенсивности аэрации и содержания железа в среде. Количество витаминов в клетках, а также их выделение из последних можно изменить при помощи микроэлементов. Существует производство рибофлавина на основе использования дрожжеподобных грибов *Eremothecium ashbyii* и *Ashbia gossypii*. Рибофлавин продуцируется также видами *Clostridium* и *Ascomycetes*. Микроводоросль *Dunaliella viridis* культивируется с целью получения в-каротина.

Микроорганизмы являются источником получения липидов специального назначения с заранее определенными свойствами. Микробные жиры заменяют растительные (а в ряде случаев и превосходят) и могут использоваться в разных отраслях промышленности, сельском хозяйстве, медицине.

Микроорганизмы являются важным источником получения полимерных материалов на основе полисахаридов. Ценным микробным полисахаридом является декстран, образуемый бактериями рода *Leucomoiistoe*. Декстран служит основой получения медицинских препаратов (кровезаменителей) и препаратов для биохимических исследований – сефадексов и др. молекулярных сит. Нуклеозиды, нуклеотиды и их производные также можно получать с помощью микроорганизмов.

Большинство пищевых красителей синтезируют химическим путем, но некоторые натуральные пигменты микроорганизмов могут быть с успехом использованы в качестве красителей для пищевых продуктов. Так, из гриба *Monascus* получен натуральный красный пищевой краситель. Из бактерий с Канарских островов получен розовый краситель для мороженого, крема, мыла. Такие красители безвредны и придают стойкий цвет продуктам, что позволяет предположить, что в будущем микробиологическому производству красителей будет уделяться больше внимания, чем в настоящее время.

2. В области электроники биотехнология может быть использована для создания улучшенных типов биосенсоров и новых приводящих устройств, называемых биочипы. Биотехнология делает возможным создание устройств, в которых белки являются основой молекул, действующих как полупроводники. Для индикации загрязнений различного происхождения в последнее время стали использовать не химические реагенты, а биосенсоры – ферментные электроды, а также иммобилизованные клетки микроорганизмов. Ферменты обладают высочайшей чувствительностью.

Биоселективные датчики создают также путем нанесения на

поверхность ионоселективных электродов целых клеток микроорганизмов или тканей. Например, *Neurospora europea* – для определения NH_3 , *Trichosporon brassicae* – для определения уксусной кислоты.

В качестве сенсоров используют также моноклональные антитела, обладающие исключительно высокой избирательностью. Лидерами в производстве биодатчиков и биочипов являются японские компании, такие как Hitachi, Sharp. Например, компания Hitachi в начале 90-х годов создает проектную группу численностью в 200 человек исключительно для работ в области биоэлектроники. Компания Sharp проводит исследования по разработке компьютеров с биокомпонентами.

Появляется новый тип полупроводников, проводящую функцию в которых осуществляют молекулы белков. Такие ферментные системы работают с большей скоростью, чем кремниевые полупроводники. Биочипы имеют небольшие размеры, надежны и способны к самосборке. Еще одна японская компания, Sony, запатентовала способ производства высококачественных акустических систем из целлюлозы, образуемой бактериями. Гелеобразная целлюлоза высушивается. Полученный материал имеет структуру сот и используется в качестве плоской диафрагмы акустических систем.

3. Согласно расчетам, в мире к 2015 году ожидается перевод 25% всей химической промышленности на биотехнологические процессы.

Биотехнология в значительной мере противоположна химической технологии. Если в современной химической промышленности для ускорения протекания химических реакций используются катализаторы, то биологические процессы ускоряются с помощью более эффективных ферментов. Если большинство химических процессов протекает при повышенном давлении и температуре, что требует больших затрат энергии, то биологические процессы совершаются в обычных условиях. Весьма различается также сырьевая база для этих технологий. Сырье для химической переработки более разнообразно, но преобладающая часть его относится к невозобновляемым ресурсам, в то время как посредством биотехнологии перерабатывается преимущественно возобновляемое растительное сырье (биомасса). Но есть и нечто общее для обеих технологий. Прежде всего, это высокая скорость технологических процессов. Ряд продуктов – спирты, органические кислоты, эфиры, ацетон и даже этилен – производится как на крупных нефтехимических предприятиях, так и на сравнительно небольших ферментативных заводах.

Рост цен на нефть в 70-80 гг. прошлого века послужил мощным стимулом для развития современной биотехнологии. Химические и фармацевтические компании наиболее развитых стран мира (и прежде всего США) начали вкладывать значительные средства на научные и прикладные исследования в эту область. К ним присоединились также государственные фонды и учреждения для высшего образования. В США, Японии и Германии были разработаны государственные программы по развитию биотехнологии.

Длительное время производство многих продуктов на базе биотехнологии оставалось убыточным на фоне больших затрат капитала. Только на НИОКР все биотехнологические компании мира затратили в 2005 г. 20,4 млрд. долларов. Чистые убытки их в том же году составили 4,4 млрд. долларов, из которых почти половина приходилась на долю США. И только в самое последнее время произошло коренное изменение этой тенденции, и почти все компании стали получать прибыль. Это дало новый толчок к росту производства.

Совершенно другие причины – экологические – обусловили внедрение биотехнологии в производство полимерных материалов. При всех достоинствах современных полимеров они обладают одним существенным недостатком – неоправданно большой долговечностью: гнилостные микроорганизмы не в состоянии разложить их, а под действием природных физических агентов это разложение протекает крайне медленно. По утверждению некоторых специалистов, выброшенные полимерные мешки и другая тара могут пролежать на открытом воздухе до 450 лет. Между тем, использование полимеров для упаковки различных товаров (прежде всего пищевых) быстро растет во всех странах мира. Только в Западной Европе ежегодно для целей упаковки используется более 18 млн. т полимеров. Вторичная переработка пластмасс уже не справляется с таким количеством отходов. Угроза захламления природы вынудила химиков-технологов в 90-е годы прошлого века заняться снижением долговечности полимеров до уровня, сопоставимого со сроком сохранности пищевых продуктов. На рубеже веков химики американских компаний «Карджилл» и «Доу кемикл» получили полимер полностью из растительного сырья в процессе ферментации – производных молочной кислоты и с использованием ее же в качестве инициатора процесса полимеризации, который удовлетворял всем требованиям потребителей. Новый полимер – полилактид – не только быстро разлагается бактериями, но и достаточно прочен. Нити из него равны по прочности полиэфирным, а пленки ничем не уступают целлофану.

Раздел 2. САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ

2.1. Темы семестровых заданий по дисциплине «Биотехнологические методы в промышленности и экологии»

1. Азотфиксирующие микроорганизмы и их роль в природе и хозяйственной деятельности человека.
2. Взаимоотношения организмов друг с другом и с макроорганизмами. Антагонизм и синергизм.
3. Биотехнологическое сырье и основы его переработки.
4. Экологическая биотехнология: основанные достижения и перспективы.
5. Геологическая деятельность микроорганизмов. Биогеотехнология.
6. Использование микроорганизмов в пищевой промышленности.
7. Особенности генетики и селекции микроорганизмов.
8. Использование микроорганизмов в медицине, ветеринарии и фармацевтической промышленности.
9. Полезные и вредные для сельского хозяйства микроорганизмы.
10. Биокатализ. Использование ферментов в медицине, молекулярной биологии и генетической инженерии.
11. Биокатализ. Ферментативные процессы в промышленности.
12. Генетическая инженерия.
13. Клонирование организмов.
14. Биоиндикация. Использование биосенсоров.
15. Цианобактерии и их роль в биосфере и деятельности человека.
16. Биокоррозия и биоразрушение конструкционных материалов.
17. Биотрансформация и биоразложение органических веществ.
18. Биологическая токсикация.
19. Вирусы. Их роль в природе и деятельности человека.
20. Биологическое оружие.
21. Радиобиология.
22. Биоинформатика.
23. Биоэтика.
24. Биоремедиация – состояние и перспективы.
25. Технологическая биоэнергетика.
26. Микрофлора воды и почвы, их санитарно-микробиологический анализ.
27. Биотехнология переработки твердых и жидких отходов.
28. Биодеструкция синтетических и природных материалов.
29. Биодеструкция высокотоксичных ксенобиотиков.
30. Использование биомаркеров в медицине и в целях пищевой безопасности.
31. Генетически модифицированные организмы и их использование в пищевой промышленности.
32. Криобиотехнологии и их использование.
33. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия.
34. Микроорганизмы и вирусы – материал для создания наноструктур.
35. Гены, генодиагностика и генотерапия.

2.2. Вопросы к контрольной работе по дисциплине «Биотехнологические методы в промышленности и экологии»

1. Объекты биотехнологии.
2. Связь биотехнологии с развитием других научных направлений.
3. Значение биотехнологии для решения народнохозяйственных проблем.
4. Плазмиды и их роль в биотехнологии.
5. Основные этапы развития современной генетической инженерии.
6. Генетическая инженерия и конструирование новых организмов-продуцентов.
7. Культуры клеток и тканей, и роль тканевой и клеточной инженерии в биотехнологии.
8. Гибридизация соматических клеток – основа клеточной инженерии.
9. Получение ферментов с помощью микроорганизмов.
10. Микробная переработка отходов и побочных продуктов сельскохозяйственного производства.
11. Производство биогаза.
12. Биотехнология и энергия.
13. Биотехнология в животноводстве.
14. Микробное выщелачивание.
15. Использование в биотехнологии иммобилизованных ферментов и клеток.
16. Этические и социальные проблемы биотехнологии.
17. Биотехнология в растениеводстве.
18. Животные в биотехнологии
19. Цели и задачи биотехнологии.
20. Преимущества развития биотехнологии перед традиционными видами технологии.
21. Фармацевтическая биотехнология (биотехнология лекарственных средств).
22. Биотехнологические процессы, их классификация и характеристика.
23. Преимущества микроорганизмов как промышленных продуцентов биологически активных веществ.
24. Сферы практического применения достижений биотехнологии.
25. Ассортимент продукции, получаемой с применением методов биотехнологии.
26. Отрасли народного хозяйства, в которых находят применение биотехнологические процессы.
27. Бактериальное выщелачивание металлов из руд. Сущность метода.
28. Продукты биотехнологии, находящие применение в медицине.
29. Понятие «вакцина». Классификация вакцин.
30. Получение нетрадиционных моторных топлив биотехнологическими методами.
31. Антибиотики. Классификация. Характеристика основных групп антибиотиков. Области практического применения.
32. Отличие человеческого инсулина от традиционно получаемого.

- Значение биотехнологических методов в получение инсулина.
33. Роль биотехнологии в пищевой промышленности. Примеры.
 34. Бактериальные удобрения. Характеристика. Примеры. Преимущества биоудобрений по сравнению с традиционными видами удобрений.
 35. Главные направления применения биотехнологии в области охраны окружающей среды. Примеры.
 36. Биотехнология кормового белка. Проблемы и перспективы.
 37. Ветеринарная биотехнология. Основные достижения.
 38. Новые разработки в сфере производства диагностических препаратов.
 39. Сравнительная характеристика ферментативного и химического катализа.
 40. Достижение генетической инженерии и сферы их практического применения.
 41. Примеры практического использования ферментов в промышленных биотехнологических производствах.
 42. Области применения рекомбинантных микроорганизмов. Характеристика.
 43. Интерлейкины. Особенности биотехнологического получения. Характеристика.
 44. Улучшение качества и повышение урожайности растений с помощью методов генетической инженерии.
 45. Использование вирусов в биотехнологии.
 46. Клеточная инженерия: понятие, сущность, основные методы, практическое значение.
 47. Понятие «клеточная биотехнология». Значение и преимущества технологии культивирования растительных клеток и тканей в контексте развития биотехнологии.
 48. Трансгенные растения. Сферы практического применения. Характеристика.
 49. Гибридомы. Перспективы применения гибридом для производства современных диагностических препаратов.
 50. Технология получения трансгенных животных. Основные проблемы. Характеристика.

2.3. Примеры тестовых заданий по дисциплине «Биотехнологические методы в промышленности и экологии»

1. Отрасль хозяйства, которая производит различные вещества на основе использования микроорганизмов, клеток и тканей других организмов, – это:
а) бионика; б) биотехнология; в) биокибернетика; г) микробиология.
2. Выращивание на питательных средах из отдельных клеток биомассы женьшеня занимается:
а) генная инженерия; б) клеточная инженерия;
в) микробиология; г) растениеводство.
3. Выберите схему правильной последовательности биотехнологических стадий:

- а) подготовка биологически действующего начала; ферментация; подготовка сырья; общий производственный цикл; приготовление товарных форм и продуктов;
 - б) подготовка сырья; ферментация; подготовка биологически действующего начала; общий производственный цикл; приготовление товарных форм и продуктов;
 - в) подготовка сырья; подготовка биологически действующего начала; ферментация; общий производственный цикл; приготовление товарных форм и продуктов;
 - г) подготовка сырья; подготовка биологически действующего начала; общий производственный цикл; ферментация; приготовление товарных форм и продуктов.
4. Методы конструирования клеток нового типа на основе их культивирования, гибридизации, реконструкции используются в:
- а) генной инженерии; б) клеточной инженерии; в) генетике; г) бионике.
5. Рекомбинантная молекула ДНК была получена:
- а) методами молекулярной биологии;
 - б) методами генетической инженерии;
 - в) методами инженерной энзимологии;
 - г) методами промышленной микробиологии.
6. Направление, занимающееся разработкой новых источников энергии биотехнологическими методами:
- а) технологическая биоэнергетика;
 - б) биогеотехнология;
 - в) экологическая биотехнология;
 - г) сельскохозяйственная биотехнология.
7. Генная инженерия:
- а) это наука о наследственности и изменчивости организмов;
 - б) исследует строение клетки;
 - в) включает приемы для выделения генов из клеток и введения их в другие организмы.
8. Преимущества получения видоспецифических для человека белков путем микробиологического синтеза:
- а) простота оборудования;
 - б) экономичность;
 - в) отсутствие дефицитного сырья;
 - г) снятие этических проблем.
9. Целями иммобилизации ферментов в биотехнологическом производстве являются:
- а) повышение удельной активности; б) повышение стабильности;
 - в) расширение субстратного спектра; г) многократное использование.
10. Выращиванием дрожжей для получения кормового белка занимается:
- а) микробиологическое производство; б) генная инженерия;
 - в) молекулярная биология; г) инженерная энзимология.
11. Выщелачивание металлов из руд возможно при помощи

микроорганизмов:

- а) тионовых; б) сульфатредуцирующих;
- в) метанооксиляющих; г) нитрифицирующих.

12. Биогeотехнология не занимается:

- а) извлечением металлов из руд;
- б) обессериванием углей;
- в) борьбой с метанолом в угольных шахтах;
- г) поиском нефтяных и газовых месторождений;
- д) поиском залежей новых рудных полезных ископаемых.

13. Метанообразующие бактерии превращают углекислый газ в метан с поглощением:

- а) водорода; б) кислорода; в) азота; г) метана.

14. Субъединичные вирусные вакцины – это такие вакцины, в основе которых:

- а) живые вирусы близкородственных видов;
- б) очищенные вирусные белки;
- в) живые ослабленные вирусы;
- г) инактивированные вирусы.

15. Область энзимологии, которая изучает молекулярные основы развития патологического процесса, основанные на нарушениях механизмов регуляции активности или синтеза ферментов:

- а) энзимодиагностика; б) энзимотерапия; в) энзимопатология.

16. К активной трансдукции способны:

- а) вирусные векторы; б) плазмиды бактерий;
- в) генетические конструкции; г) геномные ДНК бактерий.

17. Прямой перенос чужеродной ДНК в протопласты возможен с помощью:

- а) микроинъекции; б) трансформации; в) упаковки в липосомы;
- г) культивирования протопластов на соответствующих питательных средах.

18. Для введения рекомбинантной ДНК в производстве препаратов методом генетической инженерии используют:

- а) хромосомы; б) плазмиды; в) рибосомы;
- г) бактериофаги; д) лизосомы; е) ядра клеток.

19. Мишенью для физических и химических мутагенов в клетке биообъектов являются:

- а) ДНК; б) ДНК-полимераза; в) РНК-полимераза;
- г) рибосома; д) информационная РНК.

20. Использование микроорганизмов для получения витаминов, антибиотиков занимается:

- а) генная инженерия; б) клеточная инженерия;
- в) инженерная энзимология; г) микробиологическое производство.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК:

1. Баранов В.С. Генная терапия – медицина XXI века // Соросовский образовательный журнал. – № 3, 1999. – С. 3-68.
2. Беккер, М.Е. Введение в биотехнологию / М.Е. Беккер. – М.: Книга по Требованию, 2012. – 115 с
3. Березин, И.В. Химическая и биологическая кинетика / под ред. Эмануэля Н.М., Березина И.В., Варфоломеева С.Д. – М.: Моск. ун-та, 1983. – 296 с.
4. Биотехнология рационального использования гидробионтов. – М.: Лань, 2013. – 416 с.
5. Биотехнология. Принципы и применение /Хиггинс И., Бест Д., Джонс Дж. – М.: Мир, 1988. – 480 с.
6. Биотехнология – сельскому хозяйству /Лобанок А.Г., Залашко М.В., Анисимова Н.И. и др. Минск: Урожай, 1988. – 199 с.
7. Биотехнология. Теория и практика / Н.В. Загоскина и др. – М.: Оникс, 2014. – 496 с.
8. Бирюков, В.В. Основы промышленной биотехнологии / В.В. Бирюков. – Москва: Колос, 2004. – 296 с.
9. Быков В.А., Крылов И.А., Манаков М.Н. и др. Микробиологическое производство биологически активных веществ и препаратов. – М.: Высшая школа, 1987. – 142 с.
10. Грачева И.М., Гаврилова Н.М., Иванова Л.А. Технология микробных белковых препаратов, аминокислот и жиров. – М.: Пищевая промышленность, 1980. – 448 с.
11. Кирай З., Барабаш З. Результаты и перспективы использования биотехнологии в растениеводстве и защите растений. // Международный агропромышленный журнал. 1990, № 3. – С. 7 – 10.
12. Клунова, С. М. Биотехнология / С.М. Клунова, Т.А. Егорова, Е.А. Живухина. – М.: Академия, 2010. – 256 с.
13. Лутова, Л. А. Биотехнология высших растений / Л.А. Лутова. – М.: Издательство Санкт-Петербургского университета, 2010. – 240 с.
14. Общая биотехнология: учебник / В.В. Ревин, Н.А. Атыкян, Е.В. Лияськина, Д.А. Кадималиев, В.В. Шутова, Н. Желев, Р.Р. Биглов, Т.В. Овчинникова; под общ. ред. акад. А.И. Мирошникова. – Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2019. – 416 с.
15. Павлинова, И. И. Совершенствование методов биотехнологии в строительстве и эксплуатации систем водоснабжения и водоотведения / И.И. Павлинова, Л.С. Алексеев, М.А. Неверова. – М.: МГСУ, 2014. – 152 с.
16. Сазыкин Ю.О. Биотехнология Учебное пособие для вузов. 2-е изд., стер. / Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И Чакалева / под ред. Катлинского А.В. – Москва: Академия, 2008. – 256 с.
17. Сельскохозяйственная биотехнология и биоинженерия. – М.: Ленанд, 2015. – 118 с.
18. Скурко, Е.В. Генно-инженерные биотехнологии / Е.В. Скурко. – М.: Мир, 2007. – 176 с.

19. Тищенко, П.Д. Био-власть в эпоху биотехнологий / П.Д. Тищенко. – М.: Книга по Требованию, 2013. – 178 с.
20. Фаворова О. О. Лечение генами – фантастика или реальность? // Соросовский образовательный журнал. – 1997, № 2. – С. 21 – 27.
21. Хенч, Л. Биоматериалы, искусственные органы и инжиниринг тканей / Л. Хенч, Д. Джонс. – Москва: Техносфера, 2007. – 303 с.
22. Шмид, Р. Наглядная биотехнология и генетическая инженерия / Р. Шмид. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2014. – 328 с.
23. Щелкунов С. Н. Генетическая инженерия. Ч. 1. – Новосибирск: Изд-во Новосибирского ун-та, 1994. – 304 с.

Электронное учебное издание

Наталья Александровна **Соколова**
Владимир Григорьевич **Кочетков**

**БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ
В ПРОМЫШЛЕННОСТИ И ЭКОЛОГИИ**

Учебное пособие

Редактор Н.И. Матвеева

Темплан 2021 г. Поз. № 18 В.

Подписано к использованию 19.11.2021. Формат 60x84 1/16.

Гарнитура Times. Усл. печ. л. 4,94.

Волгоградский государственный технический университет.
400005, г. Волгоград, пр. Ленина, 28, корп. 1.

ВПИ (филиал) ВолгГТУ.
404121, г. Волжский, ул. Энгельса, 42а