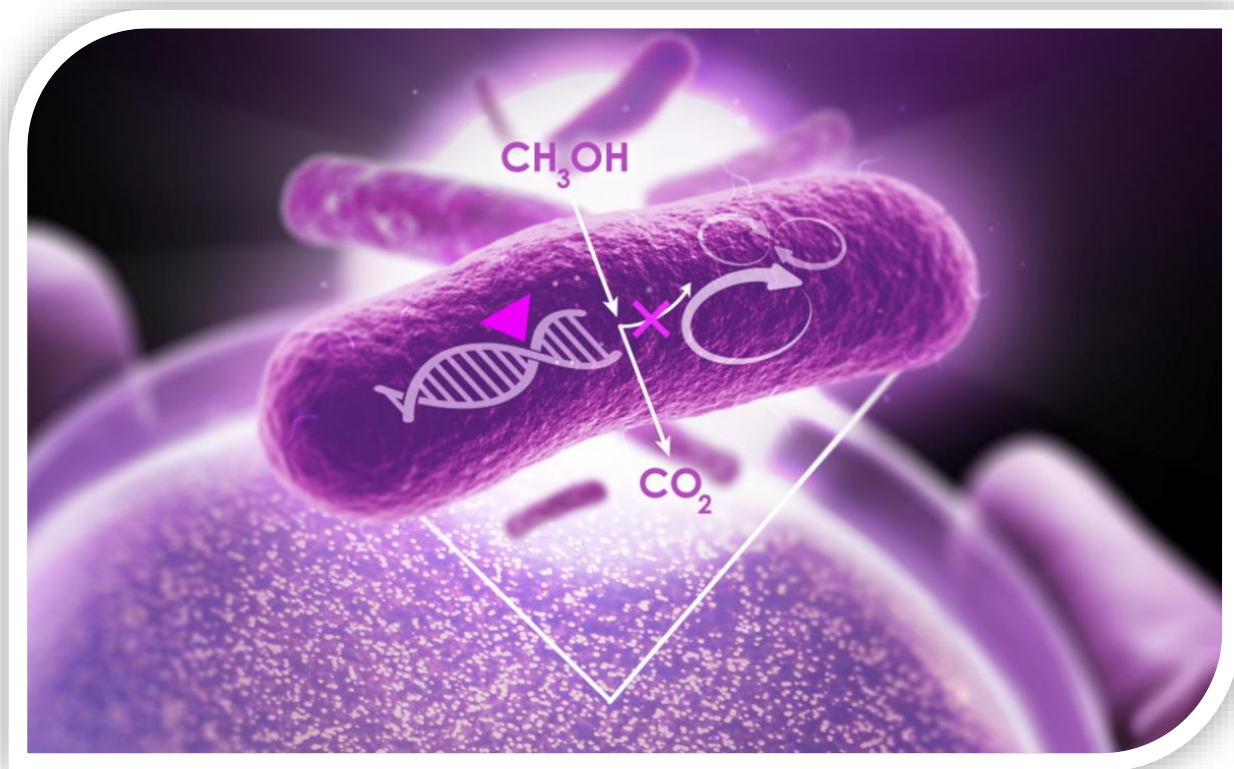


МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ
НОВОСИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
Институт экологической и пищевой биотехнологии

МИКРОБИОТЕХНОЛОГИЯ

Методические указания для практических занятий



Новосибирск 2025

УДК 579:577(07)
ББК 28.4:28.087.1,я7
М 597

Кафедра Экологии

Составитель: канд. биол. наук, доцент *Л.А. Литвина*

Рецензент канд. биол. наук, доцент *Г.В. Вдовина*

Микробиотехнология: методические указания для практических занятий / Новосибирский государственный аграрный университет; Институт экологической и пищевой биотехнологии; составитель: Л.А. Литвина – Новосибирск. – 2025. – 108 с.

Методические указания составлены в соответствии с требованиями Федерального образовательного стандарта ВО и рабочей программы дисциплины «Микробиотехнология». Методические указания предназначены для студентов очной и заочной форм обучения по направлению подготовки 19.04.01 Биотехнология. Указания содержат теоретический материал программы, задания по разделам и изучаемым темам, вопросы для самоконтроля, список рекомендуемой литературы и глоссарий.

Утверждены и рекомендованы к изданию учебно-методическим советом Института экологической и пищевой биотехнологии (протокол № 2 от 19 февраля 2025 г.).

ВВЕДЕНИЕ

Дисциплина «Микробиотехнология» предназначена для формирования у студентов системы знаний, основных понятий и категорий, имеющих отношение к получению продукции микробного синтеза. Дисциплина основана на знаниях микробиологии, которые находят реализацию в практической деятельности человека на предприятиях пищевой (хлебопечение, пивоварение, виноделие, получение кисломолочной продукции) промышленности, а также на заводах и фармацевтических предприятиях, производящих препараты для медицины, ветеринарии, животноводства, растениеводства и других сфер деятельности человека, в том числе связанных с экологической безопасностью.

В соответствии с назначением основной целью дисциплины является формирование у студентов представлений о том, что микроорганизмы это не «враги человечества», как это может показаться из-за множества болезней, вызываемых бактериями и вирусами, а продуценты большого количества ценных биологически активных веществ (витаминов, ферментов, незаменимых аминокислот, антибиотиков и др.), без которых современное общество не может обойтись.

Исходя из цели, в процессе изучения дисциплины решаются следующие задачи:

- дать представление о многогранной роли микроорганизмов в нашей жизни, обращая внимание на то, что полезная деятельность микроорганизмов используется человеком испокон веков;
- сформировать систему знаний по особенностям физиологии микроорганизмов, позволяющим им в короткие сроки в промышленных масштабах производить необходимую человеку продукцию;
- изучить требования к штаммам микроорганизмов, используемых в микробиотехнологическом производстве;
- дать представление об основах производства микробных препаратов;
- изучить состав определенных микробных препаратов и понять механизм их действия.

В результате изучения дисциплины магистр должен:

Знать:

- основных представителей микроорганизмов, используемых в микробиотехнологии;
- отбор штаммов для производства и требования к ним;
- способы подготовки питательных сред для культивирования биообъектов;
- понятие БАВ;
- принципиальную схему микробиотехнологического производства от культуры до конечного продукта.

Уметь:

- дать характеристику штамму для его использования в производстве;
- подобрать питательную среду для культивирования микроорганизма;
- привести пример принципиальной схемы получения микробного препарата.

Владеть:

- методами культивирования микроорганизмов на различных средах;
- методами получения чистых культур и исследования их свойств.

В соответствии с профессиональной компетенцией магистр должен быть «способен разрабатывать предложения по совершенствованию биотехнологии с использованием микробиологического синтеза и биотрансформации микроорганизмов, клеточных культур животных и растений».

На занятиях студентам демонстрируются слайды по изучаемым темам, предоставляется изучаемый материал в виде распечаток из источников научной литературы, рекомендованной программой. В конце занятий проходит коллективное обсуждение данной темы по вопросам для самоконтроля. Тетрадь с выполненным на занятии заданием подписывает преподаватель. В случае невыполнения задания или отсутствия студента на занятии этот вопрос решается на следующем занятии или в консультационное время, расписание которого имеется на сайте кафедры экологии.

ЗАНЯТИЕ 1. ВВЕДЕНИЕ В ДИСЦИПЛИНУ

МИКРОБИОТЕХНОЛОГИЯ

ПЛАН

1. Определение понятия «биотехнология» и направления развития этой науки.
2. Основные термины дисциплины (работа со словарем).
3. Современная филогенетическая систематика живых организмов и место в ней микроорганизмов.
4. Разнообразие биотехнологической продукции и сфер ее использования.

1. Определение понятия «биотехнология» и направления развития этой науки

Биотехнология – от [гр.](#) *βίος* – «жизнь», *τέχνη* – «искусство, мастерство, способность», *λόγος* – «слово, смысл, мысль, понятие» – **использование живых организмов и биологических процессов для производства ценных продуктов.**

Биотехнология – это научная дисциплина, изучающая свойства и возможности использования живых организмов, их систем или продуктов их жизнедеятельности для решения технологических задач, а также возможности создания живых организмов с необходимыми свойствами методом генной инженерии.

Биотехнология – это наука, изучающая получение продукции с непосредственным участием биологических объектов, которыми могут являться различные «живые системы» – микроорганизмы, органы, ткани животных, человека или растений, ферментные системы или отдельные ферменты, а также гены (то, что подпадает под определение «неживые системы биологического происхождения»). Основные направления науки – биотехнология в растениеводстве, в животноводстве и в микробиологии – микробиотехнология.

Согласно определению словаря английского языка Коллинза (*Collins English Dictionary*), биотехнология – это использование живых организмов, их частей или процессов для разработки активных и полезных продуктов и предоставления услуг,

например, обработка отходов. Термин «биотехнология» означает широкий спектр процессов: от использования дождевых червей в качестве источника белка до генетической модификации бактерий с целью получения ценных продуктов для человека, *например, гормона роста.*

В соответствии с принятой классификацией биотехнологических направлений, **более половины мирового производства биотехнологической продукции относится к продукции "красной биотехнологии" (биофармацевтические препараты и биомедицина), 12% – к "зеленой" (сельское хозяйство и охрана окружающей среды – агропищевая продукция), остальное – биоматериалы промышленного назначения ("белая" биотехнология).** "Белая" биотехнология объединяет производство биотоплива, биотехнологии в пищевой, химической и нефтеперерабатывающей промышленности". «**Голубая (синяя)**» биотехнология – это морские и водные ресурсы. "**Серая**" биотехнология связана с природоохранной деятельностью, биоремедиацией (биологической очисткой загрязненных наземных и водных экосистем с применением биопрепаратов и биосорбентов).

Биотехнология – одно из ключевых направлений качественного технологического развития в целом ряде отраслей экономики. Потенциал возможностей и спектр применения биотехнологии превратил отрасль наряду с нанотехнологиями в **ведущий фактор развития экономик отдельных государств и мирового сообщества** в целом.

В широком смысле биотехнология представляет собой пограничную между биологией и техникой научную дисциплину и сферу практики, **изучающую пути и методы изменения окружающей человека природной среды в соответствии с его потребностями!**

В узком смысле биотехнология – совокупность методов и приемов получения полезных для человека продуктов и явлений с помощью биологических агентов. В состав биотехнологии входят генная, клеточная и экологическая инженерии.

Поскольку биотехнология используется в различных отраслях промышленности и затрагивает многие сферы жизни человека, в мире принята следующая "цветовая" классификация биотехнологии:

- ✓ "**красная**" биотехнология – биотехнология, связанная с обеспечением

здоровья человека и потенциальной коррекцией его генома, а также с производством биофармацевтических препаратов (протеинов, ферментов, антител);

✓ **"зеленая" биотехнология** – направлена на разработку и создание генетически модифицированных (ГМ) растений, устойчивых к биотическим и абиотическим стрессам, определяет современные методы ведения сельского и лесного хозяйства;

✓ **"белая"** – промышленная биотехнология, объединяющая производство биотоплива, биотехнологии в пищевой, химической и нефтеперерабатывающей промышленности;

✓ **"серая"** – связана с природоохранной деятельностью, биоремедиацией;

✓ **"синяя"** биотехнология – связана с использованием морских организмов и сырьевых ресурсов;

✓ **«черная» биотехнология** – разработка биологических методов борьбы с живыми объектами.

Структура мирового производства на рынке биотехнологий представлена на рисунке 1.

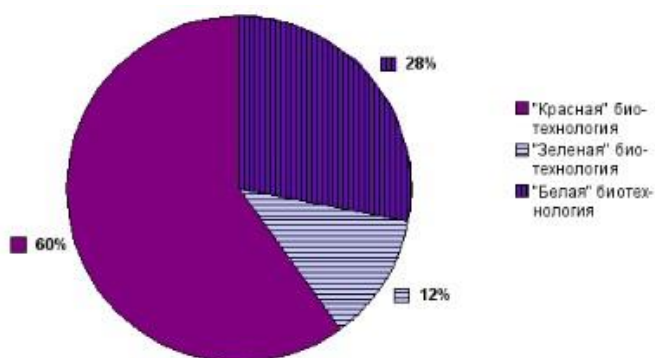


Рис. 1. Основные тенденции развития мирового рынка биотехнологий продукции

Годовой оборот мировой биоиндустрии составляет в настоящее время более 160 млрд. долларов США.

Крупнейшим биотехнологическим рынком в мире являются США, где создается половина мирового объема биотехнологической продукции. Вторым по размерам рынком является Азиатско-Тихоокеанский регион, где наиболее динамично

развивают биотехнологии Австралия, Китай, Индия и Япония. Замыкает тройку лидеров Европа.

Биотехнология является механизмом, который, используя продукты жизнедеятельности организмов и их клеток в качестве сырья, дает возможность получать огромное количество очень важных веществ, которые могут использоваться в различных сферах, но другим путем быть получены не могут.

Разрабатываются альтернативные приемы создания устойчивости животных к вирусным заболеваниям на основе получения резистентных животных вместо использования вакцин.

В животноводстве осуществляется трансплантация эмбрионов, позволяющая быстро получить ценное потомство от нужного производителя. У генетически выдающихся самок проводят стимуляцию с целью увеличения выхода яйцеклеток, которые затем извлекают на ранних стадиях развития зародышей и пересаживают менее ценным в генетическом отношении реципиентам. Кроме современных репродуктивных технологий разрабатываются геномные технологии в характеристике биоразнообразия и селекции сельскохозяйственных животных.

Во всем мире получают и широко используют **трансгенные растения**, что позволило решить проблему снабжения населения продовольствием на данном этапе, при этом проводится широкомасштабное исследование безопасности белков в сельскохозяйственных культурах, полученных методами биотехнологии. В практику внедрены новые сорта различных культур, обладающих устойчивостью к засухе, повышенной концентрации солей, морозам, вредителям и болезням. Изучаются гены экстремальной устойчивости растений к Y вирусу картофеля. Разработаны новые эффективные технологии трансгеноза (переноса генов) у растений, созданы уникальные генетические структуры для целевой генетической трансформации растений.

Большое внимание уделяется созданию трансгенных деревьев, которые можно использовать для лесонасаждений (тополь, папайя и др.). Особенность трансгенных деревьев в том, что они не производят аллергенную пыльцу и остаются стерильными, т.е. безопасными для окружающей среды. Спорным вопросом

остаётся биохимический состав лигнина в новом поколении деревьев, т.к. его изменение по сравнению с природным может повлиять на биогеохимический цикл углерода.

Таким образом, в настоящее время проводятся глубокие фундаментальные исследования в различных направлениях биотехнологии, связанные не только с получением продукции, но и с проблемами биобезопасности новых продуктов для природы и человека, обсуждаются вопросы биоэтики, агротерроризма, законодательной базы различных направлений биотехнологии.

2. Основные термины дисциплины (работа со словарем)

Микробиотехнология базируется на знании законов микробиологии, биохимии, генетики и инженерных дисциплин. В широком смысле биотехнология использует знания гораздо большего количества наук – молекулярной биологии, структурной биологии, цитологии, генетики, биохимии, синтетической биологии, нанотехнологии, генной инженерии.

Как видно из приведенного списка, составить один словарь представляется достаточно сложным. Существует ГОСТ Р 57095-2016 Биотехнологии. Термины и определения, которым можно пользоваться при изучении дисциплины. Настоящий стандарт разработан с целью установления в РФ терминов и определений в области биотехнологий.

В данных «Методических указаниях» приводится Глоссарий – «словарь узкоспециализированных терминов в какой-либо отрасли знаний с толкованием, иногда переводом на другой язык, комментариями и примерами», который непременно понадобится при изучении дисциплины.

3. Современная филогенетическая систематика живых организмов и место в ней микроорганизмов

В настоящее время на Земле известно около 2 млн видов живых организмов (по некоторым оценкам общее количество видов может достигать 5-10 млн), что чрезвычайно затрудняет ориентирование в данной изобилии. В связи с этим уже

давно сформировался особый раздел биологии, задачей которого является описание и обозначение всех существующих и вымерших видов организмов, а также их классификация по различным группам – *систематика*.

Систематика – расположение организмов по степени родства.

С тех пор, как Карл Линней (1707-1778) положил начало этому направлению в биологии, неоспоримым остается правило наименования организмов в виде бинарной номенклатуры и строгая соподчиненность систематических групп: класс — порядок — род — вид — разновидность.

В микробиологии до последнего времени систематика была камнем преткновения и так до конца она и не составлена, так как многие виды бактерий не культивируются в лабораторных условиях. Бактерии систематизировались на основе различных признаков (чаще всего морфофизиологических), но все систематики были далеки от совершенства.

Одним из надежных определителей бактерий для практических микробиологов является «Определитель бактерий Берджи», который был впервые опубликован в 1923 году американским микробиологом Дэвидом Берджи с целью систематизации структурных и функциональных особенностей бактерий для их классификации, однако в последующие годы классификация бактерий носила больше эмпирический характер. Затем издание продолжило существование от имени других ученых, но название осталось прежним.

Каждое издание (они продолжают и сейчас) было более совершенным и базировалось на новых знаниях о микроорганизмах. Возьмем «Определитель бактерий Берджи: в 2-х томах, пер. с англ. под ред. акад. РАН Г.А. Заварзина, год издания 1997 г.». В определителе в основе деления бактерий на большие четыре отдела лежит строение и биохимический состав их клеточной стенки.

В первом отделе находятся бактерии, не воспринимающие окраску по Граму (грамотрицательные) или тонкокожие, «грациозные» – *Gracilicutes*, у которых в составе клеточной стенки содержится мало специфичного для всех бактерий компонента – муреина.

Во втором отделе находятся Грамположительные бактерии, окрашивающи-

еся в фиолетовый цвет, содержащие большое количество муреина, имеющие толстую клеточную стенку и называемые «толстокожие» – *Firmicutes*.

В третьем отделе определителя объединены бактерии, не имеющие клеточной стенки, и, следовательно, формы, не содержащие муреина, не окрашивающиеся по Граму, мягкотелые – *Tenericutes*.

К четвертому отделу бактерий – *Mendosicutes* – в переводе с латинского – «бактерии с путанной клеточной стенкой», так как вместо муреина содержат псевдомуреин), относилось название Архебактерии.

Сейчас, по новой систематике, это неправильно, Археи не бактерии, хотя и прокариоты. Археи, открытые значительно раньше (1977 г.), чем издан определитель (1997 г.), как оказалось, совсем не являются бактериями и отличаются от них по множеству признаков. Положение в систематике бактерий менялось с трудом несмотря на то, что в 1977 г. была опубликована классификация метаногенных микроорганизмов, относящихся к археям, на основании сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рибосомной РНК, и была предложена новая классификация живых организмов.

Созданная американским микробиологом Карлом Вёзе (1928-2012) систематика изменила взгляд ученых на родство живых организмов в целом, а не только микроорганизмов. Нашлись признаки, по которым удалось систематизировать все известные организмы планеты.

Систематика получила название *филогенетическая*. Она включает несколько Доменов, в которых нашли место и микро- и макроорганизмы. Эта систематика представлена в виде дерева с корнем, от которого отходят три больших ветви, три Домена – Бактерии, Археи, Эукариоты. На каждой ветви имеются свои ветви и наибольшее их количество приходится на Домен Бактерии и Домен Археи, а на Домен Эукариоты – меньше. Длина у ветвей разная. Порядок ветвления и длины ветвей основаны на сравнении последовательностей рРНК. В Домене Бактерии есть ветвь, содержащая Грамположительные организмы. Согласно этой систематике, у всех организмов был общий предок – корень (рис.2).

Приведенная систематика постоянно совершенствуется. Молекулярная фи-

логенетика помогает реконструировать общего предка современных эукариот. Филогенез или филогения (от др. -греч. *φῦλον* «племя, раса» + *γένεσις* «происхождение») – историческое развитие организмов.

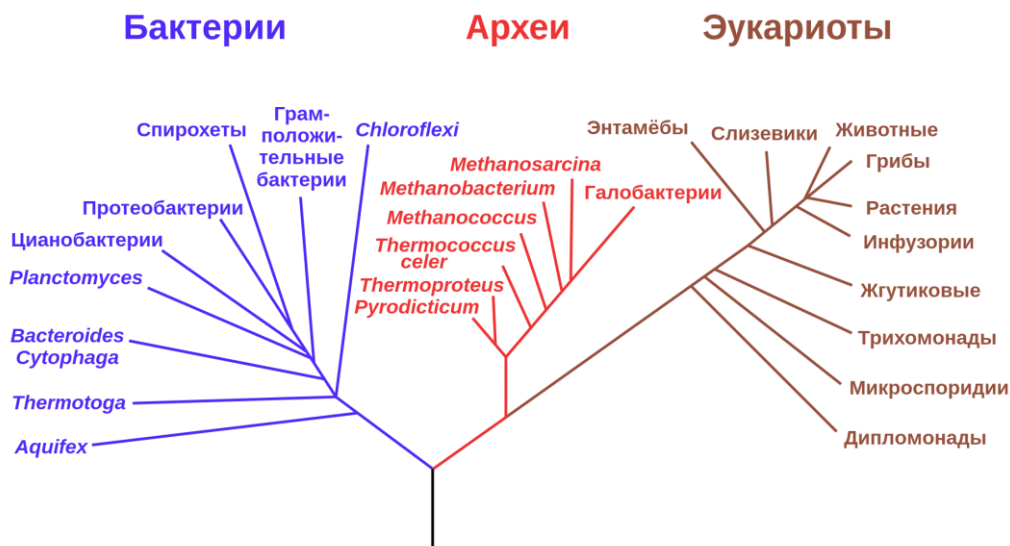


Рис 2. Филогенетическая систематика живых организмов

Такая систематика стала возможна благодаря тому, что в конце XX века у микробиологов появились молекулярно-биологические методы (полимеразная цепная реакция, секвенирование) и филогенетический анализ. Применение этих методов дало возможность выяснить генотипические характеристики представителей микромира. Определение филогенетического положения прокариот, в том числе «некультивируемых», развивалось на основе изучения нуклеотидных последовательностей 16SpРНК. Этот ген присутствует у всех прокариот, определение его первичной структуры позволяет изучать степень гомологии микроорганизмов, строить филогенетические деревья и изучать их эволюционные связи. Изучение структуры генов 16SpРНК (прокариот) и 18S (эукариот) позволило провести разделение клеточных форм жизни на три Домена *Archaea*, *Eukaria* и *Bacteria* (Woese et al., 1990).

Определители бактерий Берджи постоянно пополняются новыми сведениями о свойствах бактерий в соответствии с «ветвями» филогенетического дерева и издаются, а также доступны в сети интернет.

4. Разнообразие биотехнологической продукции и сфер ее использования

Биотехнология развивается во многих направлениях. Одно из направлений биотехнологии – клеточная инженерия, включает методологию культивирования в стерильных условиях, вне организма (*in vitro*), на питательных средах изолированных клеток, тканей и органов растений, животных и человека, направленную на решение практических задач в растениеводстве, медицине, ветеринарии и других сферах. В отличие от микробиотехнологии, там используются не микроорганизмы, а клетки эукариотических организмов, выделенные из многоклеточных организмов и живущие в изоляции на специально созданных питательных средах. Как правило, это достаточно сложный процесс по многим причинам. Клетки высших организмов в природе не живут по одной, они общаются с другими типами клеток, получая от них сигналы в виде белков или соединений гормонального типа. Поэтому создание питательных сред для них сложный и дорогостоящий процесс, в то время как микроорганизмы можно культивировать на простых средах, в том числе на отходах различных производств. Клетки эукариот при перемешивании с питательной средой менее устойчивы к механическим повреждениям, чем микроорганизмы, поэтому требуют новых технологических решений. Поскольку скорость роста эукариотических клеток значительно меньше, чем у микроорганизмов, процесс их культивирования более длителен и экономически затратен. Сложнее соблюдать стерильность, что очень важно в данном процессе.

При культивировании клеток животных и человека стерильность процесса может быть нарушена не только за счет попавшей извне бактериальной инфекции, но и за счет латентных вирусов, находящихся до этого в скрытом состоянии. Особенно опасно, если после культивирования на таких клетках вирусов для создания вакцин, латентные вирусы клеток вместе с вакциной попадут в организм человека или животного. Для безопасности этих процессов стали в последние годы использовать не клетки человека и позвоночных животных, а клетки насекомых – беспозвоночных животных. Если даже в них содержатся латентные вирусы, то они безопасны для теплокровных, так как они к ним невосприимчивы.

Клеточная инженерия – это создание клеток нового типа на основе их культивирования, гибридизации и реконструкции. В растениеводстве могут создаваться

клетки растений, не существующие в природе, с большей фотосинтезирующей активностью и продуктивностью. Среди большого разнообразия генетически измененных форм растений, образовавшихся из слившихся протопластов, встречаются формы, содержащие пластиды одного родителя, а митохондрии другого, и наоборот. Таким путем получают устойчивость к гербицидам, что позволяет «избранному» растению быть невосприимчивым к смертельным для других дозам химикатов. Генетическая модификация растений подразумевает добавление определенного участка ДНК в геном растения, придавая ему новые или улучшенные характеристики. Это может включать изменение способа роста растения или придание ему устойчивости к определенному заболеванию, вызываемому патогенными микроорганизмами.

Большие успехи достигнуты клеточной инженерией при культивировании *in vitro* клеток животных и человека, например, в области иммунологии. Разработаны методы получения особых гибридных клеток, производящих индивидуальные, или моноклональные, антитела. Это позволило создать высокочувствительные средства диагностики ряда тяжелых заболеваний человека и животных. Были созданы гибридомы, то есть гибридная клеточная линия, полученная в результате слияния клеток двух видов: способных к образованию антител В-лимфоцитов, взятых из селезенки иммунизированного животного (чаще всего мыши), и опухолевых клеток миеломы. Слияние клеток производится с помощью нарушающего целостность клеточных мембран веществом, таким, как полиэтиленгликоль, или используя вирус Сёндай, реплицирующийся в цитоплазме клеток и разрушающий клеточные мембраны. Поскольку раковые клетки миеломы «бессмертны», то есть способны делиться множество раз, после слияния их с В-лимфоцитами и необходимой селекции получается гибридома (гибрид), производящая моноклональные антитела. Гибридома может поддерживаться в лабораторных условиях долгое время и продолжать быть продуцентом моноклональных антител.

В 1984 г. за открытие принципа получения моноклональных антител [Мильштейн, Кёлер и Ерне](#) получили [Нобелевскую премию по физиологии и медицине](#). Учеными между клетками были созданы гибриды, которые в природе не существуют. Этот метод включает слияние человеческих В-клеток селезенки с клетками

злокачественной опухоли – миеломы для создания гибридомных линий, которые секретируют полностью человеческие моноклональные антитела.

Другим перспективным направлением биотехнологии является технология трансгенных мышей. Этот метод включает генную инженерию мышей для получения полностью человеческих антител.

Огромное количество продукции, применяемой в разных сферах народного хозяйства, производится за счет микробиотехнологии, о чем пойдет речь на следующем занятии.

ЗАДАНИЕ

1. Ответьте на вопросы письменно.
2. Дайте подробное объяснение термину биотехнология и назовите направления развития этой науки.
3. Выберите в разделе «Словарь основных терминов и определений» десять терминов, значимых, по вашему мнению, для микробиотехнологии.
4. Приведите современную филогенетическую систематику живых организмов и укажите, в каких доменах находятся микроорганизмы, используемые в микробиотехнологии.
5. Приведите примеры биотехнологической продукции и сферы ее применения.

Вопросы для самоконтроля

1. На чем основана современная систематика живых организмов.
2. Что подразумевается под термином «биологические агенты».
3. В чем особенности культивирования *in vitro* эукариотических клеток и микроорганизмов.
4. Какие отрицательные моменты могут встречаться при использовании биотехнологии.

ЗАНЯТИЕ 2. ОБЪЕКТЫ МИКРОБИОТЕХНОЛОГИИ И СФЕРЫ ПРИМЕНЕНИЯ ЕЁ ПРОДУКЦИИ. СРАВНЕНИЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ И ХИМИЧЕСКОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

ПЛАН

1. Объекты микробиотехнологии и сферы применения её продукции.
2. Пробиотики и их особенности.
3. Симбиотики, синбиотики, метабиотики, пребиотики.
4. Сравнение химической и биотехнологической промышленности.

1. Объекты микробиотехнологии и сферы применения продукции

Объектами микробиотехнологии могут быть не только клетки микроорганизмов, но также не имеющие клеток вирусы как позвоночных животных, так и беспозвоночных. Огромное количество биотехнологической продукции существует именно за счет микробиотехнологии (молочная, хлебобулочная промышленность, пивоварение, виноделие, производство вакцин, получение микробных средств защиты растений, бактериальных удобрений).

К микробиотехнологической продукции относится множество биологически активных веществ (БАВ), среди которых наиболее известные метаболиты – ферменты, антибиотики, витамины, аминокислоты, гормоны. Эти вещества образуются за счет продуцентов.

Продуценты – очень ёмкое понятие в биотехнологии. Кратко – под этим термином понимают организм, который осуществляет биосинтез интересующего нас продукта. В качестве продуцентов в биотехнологии могут выступать различные целые организмы или их части: это могут быть растения, животные, изолированные клетки, культивируемые *in vitro*. В микробиотехнологии продуцентами могут быть представители трех Доменов – Бактерии, Археи, Эукариоты (низшие эукариотические организмы – грибы), и прокариотические микроорганизмы – как правило бактерии или бациллы (но могут быть и клетки эукариот, например, дрожжи, микроводоросли), производящие в условиях промышленного производства биомассу или

продукцию микробного синтеза – метаболиты, в виде аминокислот, ферментов, витаминов, гормонов, антибиотиков или других продуктов.

К продуцентам в микробиотехнологии, таким образом, относятся не только прокариоты (бактерии, бациллы, археи), но и эукариоты (дрожжи, мицелиальные грибы, микроскопические водоросли).

В микробиотехнологии в качестве объектов для работы используют микроорганизмы – бактерии (споровые и не образующие спор), актинобактерии, бактерии, имеющие кристаллический эндотоксин и дельта-экзотоксин, археи, безмицелиальные и мицелиальные грибы, вирусы, поражающие позвоночных и беспозвоночных животных, микроскопические водоросли. Продукция микробного синтеза широко применяется в разных отраслях промышленности, медицине, ветеринарии, сельском хозяйстве.

Например, микробные ферменты, расщепляющие белки (**протеазы**), добавляют к моющим средствам (детергентам), что значительно улучшает свойства средств; протеазы используют для осветления вин и пива, в хлебопечении; протеазы добавляют в корма животных с несформировавшейся ферментативной системой (препарат протосубтилин), способствуя усвоению белка организмом.

Ферменты группы **глюкозидаз** (группа ферментов, гидролаз, расщепляющих глюкозидную связь в молекулах олигосахаридов или полисахаридов) применяют для осахаривания крахмала и получения глюкозы, в кондитерском производстве, для осветления вин и фруктовых соков, в животноводстве для обработки грубых кормов (препарат целловиридин) и улучшения их усвояемости. **Липазы**, расщепляющие жиры, добавляются к детергентам, способствуя очищению тканей, поверхностей от жиров; липазы используют в молочной промышленности для модификации вкуса конечных продуктов; **оксидоредуктазы** (ферменты окислительно-восстановительной группы) применяют для удаления кислорода из пищевых продуктов, для удаления перекиси водорода после стерилизации молочных продуктов, и т.д.

Особое внимание необходимо уделить ферменту **ренину**, применяющемуся в сыроделии для створаживания молока и требующемуся на производствах в больших количествах. Основным источником природного ренина – перетертые желудки

молочных телят, возраст которых обычно не превышает 10 дней. В более позднем возрасте у телят, наряду с реннином, начинает вырабатываться значительное количество пепсина, который ухудшает качество сыра. Теперь, с 1990-х годов, ренин производится бактериями, созданными генными инженерами путем встраивания гена фермента ренина от животного в бактерии и заменившего сычужный фермент, получаемый из сычуга телят.

Вирусы позвоночных животных используют для производства вакцин, а беспозвоночных – для получения энтомопатогенных препаратов для контроля численности насекомых, наносящих вред сельскохозяйственным культурам.

2. Пробиотики и их свойства

Большим достижением микробиотехнологии последних десятилетий является появление в молочной промышленности продуктов, содержащих пробиотики, а в аптеках – пробиотиков, расфасованных в виде жидких форм во флаконы или лиофильно высушенных. Есть продукты, в которых пробиотики составляют их основу при производстве, а другая группа продуктов обогащается пробиотиками на конечных этапах производства.

Разработке этого направления в пищевой промышленности способствовали глубокие исследования микробиоты желудочно-кишечного тракта человека учеными-микробиологами. Начало направлению положил Илья Ильич Мечников (1845-1916), лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине 1908 года «за работу над иммунитетом» (совместно с Паулем Эрлихом).

И.И. Мечников предложил использовать болгарскую молочнокислую палочку, содержащуюся в йогурте, для поддержания здоровой микробиоты кишечника, вытеснения гнилостных микроорганизмов и продления жизни. Болгарская палочка – подвид *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* – одна из двух бактерий, используемых для производства йогурта. Ранее бактерия была известна как вид *Lactobacillus bulgaricus*, названа в честь Болгарии, в которой была впервые открыта и использована.

Бактерию впервые открыл болгарский студент медицины Стамен Григоров в 1905 году. Он изучал микробиоту болгарского айрана и описал её как состоящую

из одной палочковидной и одной сферической молочнокислой бактерии.

В 1907 году палочковидную бактерию назвали *Lactobacillus bulgaricus*, в честь Болгарии, а сферическую – *Streptococcus thermophilus*.

Первое медицинское исследование функциональных свойств болгарской палочки было проведено в России: **О дієтичеськомъ значеніи «кислаго молока» проф. Мечникова.** Клиническія наблюденія изъ СПб. Морского Госпиталя, доктора мед. Г. А. Макарова. С.-Петербургъ. Изданіе К. Л. Риккера. Невскій пр., 14. 1907.



Рис. 3. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*

Домен: [Бактерии](#)

Тип: [Фирмикуты](#)

Класс: [Бациллы](#)

Порядок: [Lactobacillales](#)

Семейство: [Lactobacillaceae](#)

Род: [Лактобациллы](#)

Вид: [Lactobacillus delbrueckii](#)

Подвид: ***Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus***

Рис. 4. Научная классификация болгарской палочки

Илья Мечников считал болгарскую палочку основным средством в борьбе против старения и самоотравления организма человека. До конца своей жизни Мечников каждый день употреблял не только молочнокислые продукты, но и чистую культуру *Lactobacillus bulgaricus*.

Пробиотики – (для жизни) – название дано И.И. Мечниковым – **живые микроорганизмы**, приносящие пользу хозяину при введении в адекватных количествах.

Согласно ГОСТ Р 52349-2005 Продукты пищевые. Продукты пищевые функциональные. Термины и определения «По другому определению это микроорганизмы, использующиеся в терапевтических целях, а также пищевые продукты и биологически активные добавки. Продукты пищевые. Продукты пищевые функциональные. Термины и определения», пробиотик – это функциональный пищевой ингредиент в виде полезных для человека непатогенных и нетоксикогенных живых микроорганизмов, обеспечивающий при систематическом употреблении в пищу в виде препаратов или в составе пищевых продуктов благоприятное воздействие на организм человека в результате нормализации состава и (или) повышения биологической активности нормальной микробиоты кишечника».

Существуют различные типы пробиотиков: **Монокомпонентные. Первое поколение**, содержащее бактерии одного вида (коли- бифидо- или лактосодержащие).

Антагонисты. Второе поколение, которое включает препараты конкурентного действия. Они не являются представителями естественной микробиоты желудочно-кишечного тракта.

Поликомпонентные симбиотики. Третье поколение, которое состоит из более одного штамма полезных микроорганизмов. Они, как правило, усиливают действие друг друга.

Сорбированные бифидосодержащие. Четвертое поколение отличается наличием активных компонентов, которые обладают выраженным иммуномодулирующим действием.

Синбиотики. Пятое поколение, содержащее облигатную (обязательную) микробиоту кишечника и вещества пребиотического действия.

При изучении в наше время микробиоты кишечника было установлено, что основную ее часть (80%) составляют бифидобактерии. Разнообразие видов бифидобактерий велико, и у каждого человека могут преобладать разные виды. Бифидобактерии активно участвуют в процессах пищеварения и всасывания в

кишечнике, в синтезе витаминов, в обмене веществ и микроэлементов, особенно кальция и железа, подавляют рост и размножение патогенной и условно – патогенной микробиоты. Бифидобактерии – анаэробные микроорганизмы, которые гибнут в присутствии кислорода, поэтому вскрытые флаконы с бифидобактериями долго не хранятся. При обогащении молочных продуктов пробиотиками последние вносятся в жидкую среду большого объема, где условия аналогичны анаэробным. Для роста бифидобактерий необходимы пара-аминобензойная кислота (ПАБК) и пантотеновая кислота. Дифференциально-диагностическая среда для определения бифидобактерий – среда Блаурока. В настоящее время описано более 10 видов и 500 штаммов бифидобактерий.

Основные особенности бифидобактерий:

1. Высокая антагонистическая активность к патогенной и условно-патогенной микробиоте.
2. Высокие адгезионные свойства к слизистой кишечника.
3. Свойство быстро размножаться и заселять слизистую кишечника.
4. Толерантность к кислороду.
5. Свойство стимулировать рост собственной микробиоты кишечника.
6. Синтез летучих жирных кислот для восстановления кишечной среды.
7. Кислотоустойчивость при прохождении через кислую среду желудка.

В зависимости от технологии производства различают две группы пробиотиков: сухие и жидкие. Сухие производятся с применением метода лиофильной сушки субстрата живых активных клеток и выпускают в форме порошков, таблеток, капсул и т.д. Преимуществами данной группы пробиотиков являются длительные сроки годности и нетребовательность к температурному режиму при хранении и транспортировке.

Недостатки, к которым приводит процесс лиофилизации:

1. Бактерии погружаются в анабиоз и им требуется некоторое время (до 8 часов) пребывания в кислой среде, чтобы прийти в активное состояние, по истечению которого большая часть бактерий уже выводится из организма человека. Кроме того, у людей с дисбактериозом кишечная среда имеет нейтральную или даже щелочную реакцию. То есть условий для выхода бактерий из

«спящего» состояния у них просто нет.

2. Бактериальные клетки теряют специфические рецепторы, которые помогают им закрепляться на поверхностях, в связи с чем снижается время их пребывания в кишечнике.

3. При производстве жидких пробиотиков микробные клетки остаются в активном состоянии и способны к колонизации желудочно-кишечного тракта уже через 2 часа после попадания в организм. Кроме того, в состав жидкого пробиотика входят и продукты метаболизма активных форм живых бактерий.

4. Механизм действия пробиотиков основан на принудительном заселении кишечника конкурентно-способными штаммами бактерий, которые осуществляют неспецифический контроль над численностью условно-патогенной микробиоты, вытесняя ее из состава кишечной популяции, при этом образуются антибиотические вещества, изменяется микробный метаболизм (увеличение или уменьшение ферментной активности), нормализация пищеварения, стимуляция иммунной системы, повышение естественной резистентности и продуктивности.

В основе препаратов пробиотиков могут быть разные штаммы – Бифидум-бактерин содержит *Bifidum bifidum*, Биовестин – *Bifidum adolescentis*, так же как и Бифилин – пищевой продукт на его основе. Более точная информация приведена ниже.

Бифидобактерии *B. adolescentis* МС-42

Этот штамм отличается высокой антагонистической активностью к целому ряду патогенных и условно – патогенных бактерий (стафилококки, впротей, шигеллы). Обладает высокими адгезионными свойствами к слизистой кишечника. После попадания в кишечник начинает активно размножаться и заселять слизистую, вытесняя патогенную микробиоту. Этот вид бифидобактерий присутствует в кишечнике детей и взрослых, поэтому его можно использовать для коррекции собственной микробиоты людей всех возрастов. Бифидобактерии *B. adolescentis* МС-42 синтезируют летучие жирные кислоты, активно восстанавливая кишечную среду, содержат бифидогенные факторы, которые стимулируют рост собственной полезной микробиоты, кислотоустойчивы, что дает возможность почти без потерь проходить через желудок. Устойчив к терапевтическим дозам антибиотиков

(стрептомицина, полимиксина, мономицина, левомецетина, стрептомицина, оксациллина, канамицина, гентамицина и бензилпенициллина) и может быть применен уже на стадии антибиотикотерапии для профилактики дисбактериоза. Штамм *Bifidobacterium adolescentis* МС-42 присутствует в жидких пробиотиках Биовестин и Биовестин Лакто.

Бифидобактерии *B. bifidum*

Штамм обладает высокой кислотоустойчивостью и антагонистичностью к патогенной и условно – патогенной микрофлоре, относится к часто встречающемуся виду бифидобактерий как у детей, так и у взрослых. Бифидобактерии *B. bifidum* способны быстро размножаться и колонизировать слизистую кишечника. Отличаются высокой ферментативной активностью, что позволяет нормализовать процессы пищеварения и всасывания.

Этот штамм содержится в пробиотике Бифидум Баг.

Бифидобактерии *B. bifidum* 791 Баг

Разновидость *Bifidobacterium bifidum* отличается высокой кислородоустойчивостью и кислотоустойчивостью. Является разработкой Государственного Научного центра Вирусологии и Биотехнологий «Вектор».

Присутствует в пробиотиках Наринэ, Форте, Бифишка, Бифидум 791 Баг с антиоксидантом.

Бифидобактерии *B. longum*

Является преобладающим штаммом в раннем возрасте. Отличается иммуностимулирующими свойствами и высокой приживаемостью в организме человека.

Встречается в пробиотике Бифидум Баг.

Бифидобактерии *B. infantis*

Штамм активно размножается с накоплением необходимого титра жизнеспособных бактерий, обладает высокой кислотообразующей активностью и антагонистичностью к патогенной микрофлоре. Проявляет антиоксидантную активность.

Присутствует в пробиотике Наринэ Форте.

Первым в XX в. у нас в качестве пробиотика для ребенка был применен **Колибактерин**, состоявший из кишечной палочки (об этом писали в газете ЛиФ,

привлекая внимание к новой группе препаратов для защиты от кишечных инфекций). Колибактерин обладает антагонизмом в отношении широкого спектра патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, включая шигеллы, сальмонеллы, протей, стафилококки, клебсиеллы и др. виды, и, тем самым, нормализует микробиоту кишечника.

Механизм действия заключается в подавлении жизнедеятельности патогенных микроорганизмов, конкурентном вытеснении условно-патогенных и др. нефизиологичных бактерий; нормализации иммунологических процессов за счет усиления синтеза иммуноглобулинов, лизоцима, интерферона, активации макрофагов и др.; продуцировании комплекса ферментов (протеазы, амилазы, липазы, целлюлозы и др.), улучшающих пищеварение; синтеза витаминов группы В (В₁, В₆, В₁₂ и др.) и аминокислот; связывание, обезвреживание и выведение из организма токсических продуктов жизнедеятельности гнилостных и др. бактерий, продуктов неполного обмена, что обеспечивает противоаллергическое действие; улучшение всасывания макро- и микроэлементов, в т.ч. железа, кальция и фосфора.

Показания для приема препарата Колибактерин

Дисбактериоз различной этиологии (в т.ч. на фоне лучевой цитотоксической терапии; после приема противомикробных препаратов или ГКС; на фоне стресса и пребывания в экстремальных условиях); острая инфекционная диарея; диарея на фоне хронических заболеваний органов ЖКТ.

Форма выпуска, упаковка и состав препарата Колибактерин:

Лиофилизат (для защиты бактерий при сушке используют желатин и сахарозу) используют при приготовлении раствора для приема внутрь в виде кристаллической или пористой массы желтоватого или бежевого, или беловато-серого цвета различной интенсивности, со **специфическим запахом**. Одна доза – не менее 10×10^9 КОЕ живых бактерий кишечной палочки штамма *E. coli* М-17. Препарат регулирует равновесие кишечной микробиоты.

В настоящее время полностью изучен данный штамм (2019 г.) Штамм *E. coli* М-17 обладает способностью ферментировать сахарозу, мальтозу, сорбит, глюкозу, лактозу, арабинозу, маннит, ксилозу, рамнозу, образует индол, обладает β-галактозидазной активностью, утилизирует цитрат натрия с глюкозой, обладает лизин- и

орнитиндекарбоксилазами.

Изучены последовательности генома производственного штамма *E. coli* M-17. Подтверждено что штамм *E. coli* M-17 обладает характерным для вида биохимическим профилем, показано, что в его геноме не представлены трансмиссивные гены антибиотикорезистентности, гены патогенности, вирулентности и интегрированные плазмиды.

Полученные данные свидетельствуют, что *E. coli* M-17 отвечает всем современным требованиям, предъявляемым к штаммам-продуцентам пробиотиков. Полногеномные последовательности штаммов *E.coli* M-17 и открытого недавно для получения препаратов штамма *E.coli* BM депонированы в Международной базе данных GenBank под номерами NZ_LBDD00000000 и NZ_LBDC00000000 соответственно.

3. Симбиотики, синбиотики, метабиотики, пребиотики

Под термином симбиотики (дословно – «живущие совместно») подразумеваются **микроорганизмы, составляющие естественный микробиоценоз человека**. Это пятое поколение пробиотиков – синбиотики, где находится несколько типов полезных бактерий и веществ, необходимых для колонизации кишечника. Они способны регулировать рост и метаболическую активность микробиоты. К этой группе относятся Флористин, Бифиформ и другие средства. Препараты-симбиотики для кишечника способствуют нормализации микробиоты и за счет этого дают множество полезных эффектов: улучшают пищеварительную функцию и всасывание полезных веществ, нормализуют моторику при диарее и запорах, уменьшают активность потенциальных патогенов.

Simbilac Forte – симбиотик нового поколения. Это надежный пробиотик для взрослых и детей, созданный специально для поддержки здоровой микробиоты. Содержит 13 миллиардов живых бактерий и полисахариды, которые необходимы для поддержания иммунного статуса в кишечнике.

Синбиотики – синбиотики объединяют пробиотики и пребиотики. Они одновременно поставляют в кишечник полезные бактерии и пищу для них. И в этом – основа их благотворного действия на микробиоту!

Синбиотики обладают синергизмом, то есть вместе они усиливают эффект от применения. Как правило, синбиотики отличаются от пробиотиков не только наличием пребиотического компонента, но и расширенным составом с большим количеством штаммов. Наиболее часто в синбиотиках используют комбинацию *Bifidobacterium* или *Lactobacillus*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus* с фруктоолигосахаридами, лактулозой, инулином, галоолигосахаридами. Они оказывают взаимно усиливающее воздействие на функцию кишечника и процесс обмена веществ.

Пребиотики – пищевые волокна, которые стимулируют рост полезной микробиоты. С ними пробиотические микроорганизмы легче адаптируются к условиям кишечника конкретного человека (количеству кислорода, рН, температуре). Благодаря этому больше бактерий успевает закрепиться и принести пользу. Синергетический эффект обеспечивает возможность использовать комбинацию пробиотиков и пребиотиков как для профилактики, так и для комплексной коррекции работы ЖКТ.

Метабиотики – препараты, не содержащие живых бактерий, как пробиотики, а содержат продукты их обмена (метаболиты) и потому более безопасны.

К наиболее популярным метабиотикам с клинически доказанным эффектом можно отнести следующие препараты: Хилак форте, Фитолизат Гастро, Т8 Mobio, Актофлор-С, Дайго, Бактистатин, Фитотал, Полиэнтерон.

Рейтинг основан на эффективности, безопасности и соотношении цена-качество

- №1 – «Нормофлорин-Д» (Бифилюкс, Россия) ...
- №2 – «Бифиформ» (Ferrosan, Дания) ...
- №3 – «Линекс» (Lek d. d., Словения) ...
- №4 – «Хилак Форте» (Merckle, Германия) ...
- №5 – «Линекс Форте» (Sandoz, Словения) ...
- №6 – «Бифидумбактерин» (Ланафарм, Россия)

4. Сравнение химической и биотехнологической промышленности

Микробиотехнология связана с получением биомассы микроорганизмов

или получением продукции микробного синтеза в виде аминокислот, ферментов, антибиотиков, токсинов, витаминов, вакцин, современных генноинженерных вакцин, а также получением несвойственных микроорганизмам продукции эукариот (реннин, инсулин, интерферон, соматотропин, и др.).

Важный вклад микробной биотехнологии в медицину и ветеринарию состоит в **получении профилактических препаратов (вакцин), причем этот вид продукции не имеет дублера в химической промышленности.** Чтобы понять важность вакцинации, приведем несколько примеров. В развитых странах, где профилактическая служба находится на должном уровне, смертность от инфекционных заболеваний составляет всего 4-8 против 30-50% в развивающихся странах. Вакцина против черной оспы позволила полностью искоренить эту болезнь на планете. В 1955 г в США и Канаде полиомиелитом заболели 200 человек на 1 млн населения. В настоящее время распространенность этого заболевания снизилась в 4 000 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 осложнений, связанных с небезопасностью традиционных вакцин, изготавливаемых на основе живых ослабленных патогенов.

С помощью биотехнологии можно получить продукцию, полностью аналогичную природной, чего нельзя достичь химическим путем. Катализаторы в виде ферментов работают намного быстрее, чем катализаторы в химической промышленности; отсюда меньшие энергозатраты и время получения конечного продукта. В химической промышленности процессы, как правило, протекают при повышенной температуре, а порой и при высоком давлении (производство азотных удобрений), что значительно удорожает стоимость целевого продукта, а в биотехнологии процессы протекают в рамках биологических режимов. *Например*, бактериальные удобрения на основе азотфиксирующих бактерий разрывают тройную связь в молекуле атмосферного азота при обычном атмосферном давлении и способствуют усвоению растением азота не хуже химических азотных удобрений. Химические

производства всегда связаны с образованием токсичных выбросов, чего нет в биотехнологии.

Биотехнология позволяет создание организмов с заранее заданными свойствами, и это будут все равно не чуждые природе существа, а существа с улучшенными свойствами.

Производство биотехнологическим путем аминокислот, применяемых как биологически активная добавка для человека, животных, в научных целях, при культивировании микроорганизмов и клеточных культур, имеет неоспоримое преимущество перед химическим синтезом. Все существа используют левовращающие аминокислоты (*L* – треонин, *L* – лизин), которые и производятся микробным синтезом. Химическим синтезом производятся одновременно и лево- и право (*D*) вращающие аминокислоты, что требует дополнительных затрат на выделение нужного продукта.

Вместе с тем, микробиотехнологическим путем можно получить такие, казалось бы, далекие от биологии химические вещества, как ацетон, бутанол, аммиак, метанол, водород, двуокись кислорода, метан. Преимущества биотехнологий очевидно.

ЗАДАНИЕ

Ответьте письменно на вопросы для самоконтроля.

Вопросы для самоконтроля.

1. Назовите объекты микробиотехнологии и сферы их применения.
2. Изучите свойства бифидобактерий и их штаммов.
3. Ответьте, сколько поколений пробиотиков существует на данный момент?
4. Дайте характеристику синбиотикам и симбиотикам.
5. Приведите примеры пребиотиков.
6. В чем принципиальное отличие пробиотиков и пребиотиков?
7. Сравните биотехнологическое и химическое производства.
8. Какую продукцию можно получать только биотехнологическим путем?

ЗАНЯТИЕ 3. ТРЕБОВАНИЯ РОССИЙСКИХ И МЕЖДУНАРОДНЫХ СТАНДАРТОВ КАЧЕСТВА К ПРОДУКЦИИ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДСТВ

ПЛАН

1. Характеристика основных групп продукции биотехнологических производств.
2. Требования Российских стандартов качества к продукции биотехнологических производств.
3. Международные системы контроля качества биотехнологических продуктов. Понятие GLP (Good Laboratory Practice).
4. Международные системы контроля качества биотехнологических продуктов. Понятие GMP (Good Manufacturing Practice).

1. Характеристика основных групп продукции биотехнологических производств

Продукция биотехнологических производств – понятие очень широкое. Наиболее знакома всем продукция пищевой промышленности, выпускающая на основе культур дрожжей и молочнокислых бактерий разнообразный ассортимент вкусных и полезных продуктов для всех возрастных групп населения. Кроме привычных всем пищевых продуктов, микробиотехнология создает множество препаратов, которые как правило кажутся обычному человеку сделанными на предприятиях химической промышленности. Эту продукцию можно разделить на две большие группы:

- 1-ая группа – продукция, не требующая высокой степени очистки от остатков питательной среды и фрагментов микроба – продуцента;
- 2-ая группа, требующая такую очистку, так как продукция используется в медицине и ветеринарии для введения в организм парентерально.

К первой группе продукции относятся так называемые технические ферментные препараты, протеазы, расщепляющие белки, используемые для обработки шкур, «смягчения» грубых мясных волокон, а также сюда относятся:

1. «белок одноклеточных» в качестве пищевых или кормовых добавок;
2. технические ферменты для пищевой и химической промышленности;
3. биологические средства защиты растений от вредителей в виде бактериальных и грибных препаратов;
4. биологические средства защиты растений от болезней;
5. энтомопатогенные вирусные препараты для контроля численности фитофагов;
6. азотные удобрения на основе азотфиксирующих бактерий.

Вся эта продукция относится к многотоннажному производству, то есть исчисляется тысячами тонн и не требует специальных методов очистки.

Вторая группа продукции не производится в таких огромных количествах, так как требует особых условий производства и контроля на всех его этапах, тщательной очистки конечного продукта и контроля его качества в конечном итоге. Сюда относятся вакцины для медицины и ветеринарии, антибиотики, высокоочищенные ферменты и др. Для первой группы продукции характерны такие приемы как грубое фракционирование технологических смесей – то есть отделение культуральной жидкости (питательной среды, в которой выращивались микроорганизмы) от биомассы продукта (сепарация за счет фильтрации на пресс- или нутч-фильтрах, сушка продукции на распылительных сушилках и т.д.).

Со второй группой продукции обращаются более бережно – используются ультра-, мини- или нано- фильтрация, мембранные технологии, хроматография, лиофильная сушка, стерильный розлив в условиях асептики, что делает продукцию второй группы более дорогой и качественной.

2. Требования Российских стандартов качества к продукции биотехнологических производств

Под термином биотехнологическая продукция подразумевается большой спектр продуктов, в том числе лекарства и пищевые продукты, поэтому большое внимание во всем мире уделяется их производству и качеству.

Обеспечение качества производства биотехнологических продуктов в целом

базируется на системе менеджмента качества ISO 9001. В ней *качество определяется* как степень соответствия совокупности присущих характеристик объекта требованиям. То есть сначала человек субъективно задает какие-то требования к объекту – продукту или процессу. А качество – это то, насколько объективные характеристики этого продукта удовлетворяют сформулированным ранее субъективным требованиям.

Спецификации – это перечень испытаний, ссылок на аналитические методики и критерии приемлемости (допустимые нормы). Соответствие спецификациям – критическая часть стратегии обеспечения качества. Производитель обосновывает перечень спецификаций, опираясь на результаты доклинических и клинических исследований, а также исследований стабильности, о которых мы рассмотрим ниже. В ходе изучения характеристик продукта выбирают наиболее полезные параметры, критически влияющие на качество.

Для биопрепаратов особое значение приобретают другие элементы обеспечения качества: контроль исходных материалов, контроль сырья, но особенно – контроль критичных показателей и валидация процесса производства.

К основным законодательным актам, регулирующим отношения в области качества продукции и конкурентоспособности, относятся:

- Конституция РФ.
- Гражданский кодекс РФ.
- Кодекс РФ «Об административных правонарушениях».
- Федеральный Закон «О защите прав потребителей».
- Федеральный Закон «О техническом регулировании».
- Федеральный Закон «Об обеспечении единства измерений».

Нормы технического регламента носят обязательные для исполнения требования к продукции. Они принимаются с целью защиты жизни и здоровья потребителей, защиты окружающей среды. Техническое регулирование предполагает установление единых правил предъявления требований к продукции, независимость органов по сертификации от производителей и потребителей, однозначность и единственность системы и правил аккредитации, а также методов испытаний

и измерений при определении соответствия продукции. Техническое регулирование осуществляется в соответствии с принципами: применения единых правил к продукции, аккредитации, методов исследований независимости, недопустимости ограничения конкуренции и совмещения полномочий. Целью принятия технических регламентов является защита, как жизни, так и здоровья граждан, а также имущества физических и юридических лиц, государственного и муниципального имущества; охрана окружающей среды, жизни или здоровья животных и растений.

Основные технические и конструктивные характеристики продукции.

Качество пищи определяется тремя основными группами показателей, а именно ее пищевой ценностью, товарными показателями и пригодностью по санитарному состоянию.

Рассмотрим основные характеристики пищевых продуктов:

- Товарная (потребительская) характеристика – обусловлена совокупностью физических, химических, биологических и других природных свойств, приданных продукту человеком в процессе производства и хранения. *Например*, вареные колбасы – это изделия из тонко измельченного мяса говядины и свинины, предварительно выдержанного в посоле, нашприцованного в оболочку и прошедшего термическую обработку в виде обжарки и варки.

- Органолептические характеристики – являются составной частью товарной характеристики и включают в себя: состояние упаковки, внешний вид, запах, цвет, вид на разрезе, вкус, аромат, консистенцию и др.

- Пищевая ценность – это комплекс веществ, определяющих биологическую и энергетическую ценность продукта. Пищевую ценность определяют и его органолептические показатели, так как они существенно влияют на усвоение пищи организмом. То есть показатель «пищевая ценность» является интегральным показателем.

- Биологическая ценность – определяет полноценность компонентов, входящих в состав продукта, а именно: полноценность белка, содержание ненасыщенных жирных кислот в жирах, содержание витаминов и минеральных веществ.

- Энергетическая ценность – это количество энергии, которое образуется при окислении основных пищевых веществ (белков, жиров, углеводов), содержащихся

в продукте. Энергия, выделяемая при окислении 1 г. белка, составляет 4 ккал, 1 г. углеводов – 4 ккал, 1 г. жира – 9 ккал, 1 г. этилового спирта – 7 ккал. Взрослому человеку в зависимости от вида деятельности необходимо 3-4,5 тысячи ккал в день. Продукты, входящие в рацион питания, должны содержать вещества, необходимые для получения энергии. Однако необходимое количество энергии нельзя получать за счет потребления большого количества одних и незначительного количества других пищевых веществ. Необходимо чтобы соотношение основных пищевых веществ «белок: жир: углеводы» равнялось 1:1:4.

- Усвояемость – выражается коэффициентом усвояемости, показывающим, какая часть продукта используется организмом. Усвояемость зависит от органолептических характеристик, количества и качества пищевых веществ, а также возраста, здоровья организма и других факторов. При смешанном питании усвояемость белков составляет 84,5%, жиров – 94%, углеводов – 95,6%.

- Доброкачественность – определяет безвредность продуктов для организма человека. Вредное воздействие на организм человека оказывается, как отсутствием в продуктах некоторых компонентов (витамины, макро и микроэлементы), так и присутствием вредных веществ (токсинов, тяжелых металлов), болезнетворных организмов (**сальмонеллы, протеи, ботулизм**), присутствием посторонних примесей (стекла, металла, опилок), **присутствием яиц глистов, антибиотиков.**

3. Международные системы контроля качества биотехнологических продуктов. Понятие GLP (Good Laboratory Practice)

GLP – надлежащая лабораторная практика – это набор принципов, разработанных для обеспечения качества и целостности неклинических лабораторных исследований.

GLP достигает этого, управляя процессами и условиями, в которых проводятся неклинические исследования, включая то, как обслуживаются исследовательские помещения, комплекс обязательных стандартов проведения исследований новых фармацевтических и косметических продуктов, пищевых и кормовых добавок, пестицидов и др.

Надлежащая лабораторная практика (GLP) регулирует процессы и условия, при которых проводятся клинические и неклинические исследования. GLP также определяет порядок содержания этих исследовательских объектов.

Цель создания GLP – улучшить защиту здоровья человека и окружающей среды; содействовать международному признанию данных испытаний; предотвратить создание технических барьеров в торговле. Производители обязаны проводить (или заказывать) такие исследования, чтобы продемонстрировать безопасность продукта соответствующему принимающему/регулирующему органу, например, Совету по оценке лекарственных средств в Нидерландах. Только после этого новый продукт или вещество получит разрешение на продажу, позволяющее распространять его по обычным каналам.

Исследования безопасности проводятся с целью установить, что продукт не представляет риска для здоровья человека, животных и/или окружающей среды.

Цель GLP. Целью Принципов GLP является:

- повышать качество тестовых данных;
- избегать дублирования исследований;
- улучшить защиту здоровья человека и окружающей среды;
- содействовать международному принятию данных испытаний;
- предотвратить создание технических торговых барьеров.

Принципы GLP. Принципы GLP были впервые опубликованы в 1982 году Организацией экономического сотрудничества и развития (ОЭСР).

GLP- ЦЕНТРЫ – ОСНОВА НОВОЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ИНДУСТРИИ

С тех пор Европейская комиссия включила принципы в обязательное законодательство.

В России GLP – использование качественных лабораторных животных в доклинических исследованиях = адекватные результаты доклинических исследований = судьба всей программы разработки лекарственного средства = создаются специальные центры – GLP-ЦЕНТРЫ – основа новой фармацевтической индустрии.

В России особое внимание уделяется следующим аспектам:

- Поддержка отечественной системы питомников для разведения качественных лабораторных животных с отработанной системой мониторинга их здоровья -

особенно актуально для крупных животных.

- Совершенствование условий для возможности тестирования вирусного и бактериологического статуса лабораторных животных с доступностью соответствующих лабораторий.

- Подготовка квалифицированных кадров.

- Аттестация вивариев и внутренних лабораторий производителей.

- Условия содержания животных должны соответствовать международным этическим принципам.

- Облегчение возможности ввоза крупных животных из-за рубежа.

4. Международные системы контроля качества биотехнологических продуктов. Понятие надлежащая производственная практика, GMP

Надлежащая производственная практика, GMP (сокр. от англ. *good manufacturing practice*) – правила, которые устанавливают требования к организации производства и контролю качества лекарственных средств для медицинского и ветеринарного применения.

Правила GMP содержат минимальные актуальные требования к надлежащей производственной практике для методов и условий, включающих требования к системе обеспечения качества, персоналу, помещениям и оборудованию, документации, требования к производству продукции (в том числе по контракту), к контролю качества, рекламациям и отзыву продукции, проведению самоинспекцией и другим аспектам производственной деятельности, которые используются при изготовлении, упаковывании и выпуске в обращение лекарственных средств с целью устранения рисков для потребителя. Правила периодически уточняются, в них вносятся дополнения в связи с различными инцидентами. С 1980-х годов FDA (Food and Drug Administration) начало публиковать различные руководства, которые детализируют, разъясняют и интерпретируют те или иные разделы и положения действующих правил.

GMP в России

В 1974 году Главным управлением промышленности СССР утверждён руко-

водящий технический материал РТМ 64-7-81-74 «Основные требования к организации производства и контролю качества ГЛС».

В 1991 году Министерством медицинской промышленности СССР утверждён руководящий документ РД 64-125-91 «Правила организации производства и контроля качества лекарственных средств (GMP)».

В 2000 году вступил в силу стандарт отрасли ОСТ 42-510-98 «Правила организации производства и контроля качества лекарственных средств (GMP)» (ред. 25.11.2001 г.), утверждённый Министерством здравоохранения РФ 25.02.1998 г. и введён в действие приказом Минздрава РФ и Минэкономики РФ от 03.12.1999 г. №432/512.

В 2013 году Постановлением Правительства РФ от 28.01.2013 г. № 50 (ред. от 28.09.2015 г.) Министерство промышленности и торговли РФ наделено полномочиями по утверждению правил надлежащей производственной практики и выдаче заключений о соответствии производителей лекарственных средств для медицинского применения требованиям этих В 2004 году выпущен ГОСТ Р 52249-2004 «Правила производства и контроля качества лекарственных средств», утверждённый и введённый в действие постановлением Госстандарта России от 10.03.2004 г. № 160-ст.

В 2009 году выпущен ГОСТ Р 52249-2009 Правила производства и контроля качества лекарственных средств, утверждённый и введённый в действие приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии РФ от 20.05.2009 г. № 159-ст.

С 2013 года в России действуют Правила надлежащей производственной практики, утвержденные приказом Министерства промышленности и торговли РФ от 14.06.2013 г. № 916 (в ред. от 18.12.2015 г.) (зарегистрировано в Минюсте России 10.09.2013 г. №29938). Документ фактически является переводом правил GMP Евросоюза, действовавших на момент его разработки. В 2014 г. в качестве экспертной организации, привлекаемой к лицензионному контролю фармацевтических предприятий, расположенных на территории РФ, в составе комиссии Минпромторга России начал действовать ФБУ "Государственный институт лекарственных средств и надлежащих практик". В 2015 г. ФБУ "ГИЛС и НП" уполномочено

на проведение инспектирования производителей лекарственных средств для медицинского применения, производство которых осуществляется за пределами РФ, на соответствие правилам GMP в целях выдачи заключений о соответствии производителя лекарственных средств требованиям правил надлежащей производственной практики.

Приказом Минпромторга РФ №1997 от 12.12.2013 г. утверждены Рекомендации по организации производства и контроля качества лекарственных средств (письмом Минюста РФ от 12.02.2014г. № 01/10856-ЮЛ приказ признан не нуждающимся в государственной регистрации).

В 2016 году решением Совета Евразийской Экономической Комиссии от 03.11.2016 г. №77 утверждены Правила надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза (ЕАЭС). С 6 мая 2017 года правила вступили в силу, за исключением положений, касающиеся требований к **производству лекарственных препаратов для ветеринарного применения, которые вступили в силу с 1 января 2021 года**. В настоящее время действует переходный период, обеспечивающий плавный переход от национального регулирования обращения лекарственных средств к единому на территории ЕАЭС.

ЗАДАНИЕ

Изучите тему, используя раздаточный материал, и запишите ответы на вопросы для самоконтроля в тетрадь.

Вопросы для самоконтроля.

1. Приведите примеры биотехнологической продукции различных групп (пищевой, крупнотоннажной, продукции тонкой очистки).
2. Изучите особенности Российского Законодательства в отношении биотехнологической продукции.
3. Какую роль играет система GLP в производстве биотехнологической продукции?
4. Значение системы GMP при получении биотехнологической продукции.
5. Сделайте сравнительный анализ различных систем.

ЗАНЯТИЕ 4. МНОГООБРАЗИЕ ПРОЦЕССОВ, ОСУЩЕСТВЛЯЕМЫХ МИКРООРГАНИЗМАМИ В ПРИРОДЕ

ПЛАН

1. Значение процессов, осуществляемых микроорганизмами, для биосферы.
2. Микроорганизмы в круговороте азота.
3. Роль микроорганизмов в круговороте углерода.
4. Хемосинтез и его особенности.

1. Значение процессов, осуществляемых микроорганизмами, для биосферы

Жизнь на планете возможна благодаря деятельности микроорганизмов, разлагающих всю отмершую органику на составляющие элементы и возвращающих в природу необходимые для новой жизни органогены. Микробное сообщество в целом выступает как совокупность взаимодействующих между собой разнообразных в видовом отношении организмов. Рассматривая функции микроорганизмов в природе, необходимо подчеркнуть их **незаменимую роль в круговоротах веществ, а именно всех макро-** (углерод, кислород, азот, водород, кальций, фосфор, сера) **и микро-** (железо, медь, селен, йод, хром, цинк, фтор, молибден) **биогенных элементов, обеспечивающих устойчивость биосферы.**

Эти процессы называются минерализацией. Многочисленные реакции осуществляются за счет ферментативной активности микроорганизмов, обитающими в самых разных средах – в почве, воде, воздухе, на корнях растений, в глубинах океана, в организме человека и животных.

Значение существования этих микроорганизмов для биосферы трудно переоценить – именно они осуществляют круговорот всех биогенных элементов в природе. Процессы, происходящие в почве (азотфиксация, аммонификация, нитрификация, денитрификация и другие), обеспечивая распад органических веществ и их минерализацию, делают доступными соединения азота для питания растений. Процессы распада углеродсодержащих соединений, в частности клетчатки, жизненно необходимы для осуществления фотосинтеза растениями, т.к. пополняют запасы

диоксида углерода в атмосфере. Состояние почвы и наличие в ней определенных видов микроорганизмов напрямую связаны с плодородием почвы. В почве, как и в воде, наличие автохтонной микробиоты способствует самоочищению этих сред от загрязнений, вызванных антропогенным воздействием.

Но возможности микроорганизмов не бесконечны, особенно когда речь идет о ксенобиотиках – производимых человеком чужеродных для всего живого химических веществах, не входящих в природный биотический круговорот. Продукция бытовой химии, ядохимикаты, консерванты и стабилизаторы пищевой промышленности со сточными водами поступают в почву и водоемы, нанося непоправимый вред микробиоте этих сред обитания.

Микробиота воздушной среды тесно связано с микробиотой почвы и кожными покровами животных и человека. Микроорганизмы присутствуют не только на кожных покровах, но они обитают и на слизистых оболочках верхних дыхательных путей, ротовой полости, мочеполовой системы, желудочно-кишечного тракта. Все эти микробы представляют собой постоянную микробиоту животного, которая может несколько меняться в зависимости от условий жизни и кормления животных, но в целом микробиота – это определенные виды микроорганизмов, занявшие свои экологические ниши. Рубцовое пищеварение у жвачных представляет собой сложнейшую систему взаимодействия между простейшими, бактериями и грибами по переработке грубых кормов. Микробиота желудочно-кишечного тракта человека зависит от особенностей питания человека, но в целом в ней преобладают представители фирмикутов и бактериоиды. Значимость микробиома человека, связанного с иммунной и нервной системами, все больше становится предметом исследования ученых.

В процессе эволюции сформировались определенные взаимоотношения между разными сообществами микроорганизмов, например, когда одни микроорганизмы делают доступными питательные вещества для других видов, разрушая их только частично. Типы взаимоотношений могут быть различными, их принято делить на:

- Нейтрализм (лат. *neutralis* – не принадлежащий ни тому, ни другому) – взаимоотношения, при которых микроорганизмы, развиваясь в составе одного ценоза,

не оказывают друг на друга непосредственного влияния. Косвенная взаимозависимость организмов при этом неизбежна, поскольку они являются элементами одного сообщества.

- Конкуренция (лат. *Concurrere* – сталкиваться) – взаимоотношения между организмами одного или разных видов, соревнующихся за одни и те же ресурсы внешней среды при недостатке последних. Конкуренция может быть пассивной – потребление ресурсов внешней среды, необходимых обоим организмам или активной – подавление одного другим в результате образования определенных продуктов обмена. В микробиологии понятие конкуренции обычно распространяют лишь на взаимоотношения между микроорганизмами, хотя возможны конкурентные отношения между микро- и макроорганизмами, например, почвенные микроорганизмы конкурируют с высшими растениями за элементы минерального питания.

- Синтрофия (греч. *Syn* – вместе, *trophe* – пища, питание) – способность двух или более видов бактерий осуществлять такой процесс, который ни один из них не может осуществлять по отдельности. Синтрофия является частным случаем симбиотических взаимоотношений между бактериями.

- Комменсализм (лат. *Com* – с, вместе и *mensa* – стол, трапеза), т.е. сотрапезничество, форма симбиоза, при которой один из партнеров системы (комменсал) возлагает на другого (хозяин) регуляцию своих отношений с внешней средой, но не вступает с ним в тесные отношения. Основой для комменсализма могут быть общее пространство, субстрат, кров, пища. Присутствие комменсала для хозяина остается обычно безразличным.

- Паразитизм (греч. *Parasitos* – нахлебник) – взаимодействие, при котором паразиты питаются хозяином. Паразит получает выгоду, а хозяину наносится вред.

- Мутуализм (лат. *Mutuus* – взаимный) – форма симбиоза, при которой отношения между партнерами характеризуются взаимовыгодностью и ни один из них не может существовать без другого.

- Хищничество – такое отношение двух групп организмов, при котором одна использует другую в пищу.

- Антагонизм (греч. *Antagonisma* – спор, борьба) – когда один вид задерживает или полностью подавляет рост другого. Если угнетение взаимно, это называют

аменсализм.

- Аменсализм (лат. *a* – удаление, *mensa* – трапеза) – тип межвидовых взаимоотношений, при котором один вид, аменсал, претерпевает угнетение роста и развития, без каких-либо выгод для другого вида. Его можно рассматривать как форму взаимодействия или конкурентного поведения среди других организмов.

В природе встречается большое разнообразие этих взаимоотношений (в рубце у жвачных, при получении силоса, при образовании метана бактериями, использующими водород, выделяемый другим видом бактерий при окислении этанола в ацетат). В производственных условиях при получении продукции микробного синтеза как правило используется только один вид микроорганизмов, обеспеченный всеми необходимыми питательными веществами и кислородом.

2. Микроорганизмы в круговороте азота

В природе существует несколько форм азота. Вопрос о том, как атмосферный азот N_2 , имеющий тройную связь между атомами, которая не разрушается в условиях планеты, становится доступен для живых организмов, давно интересовал ученых. Ответ дал великий русский ученый Сергей Николаевич Виноградский (1856-1953), применив новый подход к изучению микроорганизмов в естественной среде их обитания. Для культивирования таких микроорганизмов в лабораторных условиях он разработал специальные элективные, то есть избирательные питательные среды, на которых мог расти только один вид бактерий, для которого предназначалась среда. С.Н. Виноградский показал, что анаэробные почвенные клостридии, которые он назвал в честь Луи Пастера *Cl. pasteurianum*, способны усваивать (фиксировать) атмосферный азот, делая его в ходе дальнейших превращений аммиака в нитриты и нитраты, в конечном итоге, доступным для растений и животных. Почти одновременно были открыты и другие азотфиксаторы (свободно живущий аэроб *Azotobacter chroococcum*, симбиотически связанные с бобовыми растениями *Rhizobium*). Молекулярный азот составляет большую часть атмосферного воздуха, органический азот входит в состав пуриновых и пиримидиновых оснований нуклеиновых кислот, в состав аминокислот. Минеральные формы азота в почве доступны растениям. Для микроорганизмов доступны все формы азота.

3. Роль микроорганизмов в круговороте углерода

Различные виды микроорганизмов и человеческой деятельности вносят свой вклад в круговорот углерода.

Одни из видов непосредственно усваивают диоксид углерода из атмосферы, другие используют из органических соединений при дыхании и разных видах брожений. Многие виды человеческой деятельности, например, работа электростанций, транспорта и вырубка лесов включают в себя сжигание ископаемого топлива и высвобождение углекислого газа в атмосферу. Это отрицательно сказывается на климате планеты, так как нарушает баланс содержания различных газов в атмосфере, вызывая «тепловой» эффект. Важнейшим моментом в возврате микроорганизмами диоксида углерода в атмосферу является аэробное и анаэробное разложение клетчатки $(C_6H_{10}O_5)_n$, содержащей огромный запас углерода.

4. Хемосинтез и его особенности

Все живые существа на планете используют энергию солнца. Но есть и такие микроорганизмы, которые используют не энергию солнца, а химическую энергию неорганических веществ. С.Н. Виноградский (1887) обнаружил микроорганизмы, обладающие уникальными способностями, использующие энергию химических реакций (**хемосинтез**). До этого открытия единственными автотрофными организмами считались фотосинтезирующие растения, поэтому данные работы обеспечили Виноградскому мировое признание.

Хемосинтез – способ автотрофного питания, при котором источником энергии для синтеза органических веществ из CO_2 служат реакции окисления неорганических соединений. Микроорганизмы, способные к **хемосинтезу**, Виноградский называл **аноргоксиданты**, т.е. не окисляющие органические вещества. Название **хемосинтез** ввёл позже немецкий химик и ботаник В. Пфедфер (1897).

Необходимо отметить, что выделяющаяся в реакциях окисления неорганических соединений энергия не может быть непосредственно использована в процессах ассимиляции. Сначала эта энергия переводится в энергию макроэргических связей АТФ и только потом тратится на синтез органических соединений.

ЗАДАНИЕ

1. Перечислите процессы, осуществляемые микроорганизмами в природе, связанные с органическим, минеральным и атмосферным азотом.

2. Напишите уравнения реакций азотфиксации, нитрификации, денитрификации, аммонификации и названия микроорганизмов, осуществляющих эти процессы в природе.

3. Какой тип питания у каждой из этих групп?

4. В составе каких веществ во всех организмах содержится азот?

5. Приведите примеры и уравнения процессов, осуществляемых микроорганизмами в природе с соединениями углерода (уравнения дыхания, спиртового, маслянокислого, ацетобутилового, молочнокислого гомо- и гетероферментативного брожений).

6. Сделайте вывод о способах питания и получения энергии микроорганизмами.

7. Сравните возможности микроорганизмов по способам питания и получения энергии с растениями и животными.

8. Какие процессы из природы копирует микробиотехнология?

9. Что нового производит микробиотехнология по сравнению с природой?

ЗАНЯТИЯ 5, 6. МИКРОБИОТЕХНОЛОГИЯ В ИСТОРИЧЕСКОМ АСПЕКТЕ

ПЛАН

1. Эмпирическая микробиотехнология.
2. Создание первых промышленных производств.
3. Современные направления микробиотехнологии, базирующиеся на культивировании различных видов микроорганизмов и клеток эукариот.
4. Теоретические основы микробиотехнологии.

ЗАДАНИЕ

Ответьте на вопросы для самоконтроля письменно.

Вопросы для самоконтроля

1. Объясните термин «эмпирическая» биотехнология.
2. Приведите примеры эмпирической микробиотехнологии и годы ее происхождения.
3. Что общего было между хлебопечением, пивоварением, виноделием в эмпирический период?
4. Когда и в каких странах появились первые промышленные производства, основанные на деятельности микроорганизмов?
5. Назовите этапы развития биотехнологии.
6. Отличие технического периода от эмпирического.
7. Какое открытие дало начало генно-инженерному периоду (подробно!). Приведите свои примеры использования продукции микробного синтеза в различных направлениях деятельности человека (медицина, ветеринария, сельское хозяйство, экология, биоэнергетика)?
8. Приведите примеры получения штаммов, не существующих в природе.

ЗАНЯТИЕ 7. ОСНОВНЫЕ ПРЕДСТАВИТЕЛИ МИКРООРГАНИЗМОВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В МИКРОБИОТЕХНОЛОГИИ

ПЛАН

1. Особенности микроорганизмов, дающие преимущества перед клетками животных и растений для культивирования в промышленных условиях.
2. Характеристика микроорганизмов, которые могут использоваться в микробиотехнологии.

1. Особенности, дающие преимущества перед клетками животных и растений для культивирования в промышленных условиях

С момента открытия невидимого мира до начала глубоких исследований прошло почти 300 лет. Основные вопросы, волновавшие ученых тех лет – причины брожения, гниения, заболеваний и возможность самозарождения жизни, оставались без ответа. Первым, кто обратил внимание на значимость микроорганизмов в этих процессах, был французский ученый, химик по образованию Луи Пастер (1822-1895), общепризнанный основоположник микробиологии.

МИКРОБИОЛОГИЯ – в дословном переводе – **наука о жизни малых существ** (от греч. *μικρος* – малый, лат. *bios* – жизнь, др. греч. *λόγος* – лóгос – слово, смысл, понятие, наука). Микробиология – одна из трех составных частей биологии, науки о жизни, две другие части – это ботаника и зоология.

По современной филогенетической систематике малые существа находятся в трех доменах – Бактерии, Археи, Эукариоты. Вирусы рассматриваются вне этой системы, как агенты, не имеющие клеточного строения.

Поскольку среди микроскопических существ встречаются представители разных царств, необходимо подчеркнуть особенности клеточной организации этих организмов – **прокариоты** (доядерные), от лат. *Procaryota*, от др.-греч. *πρό* ‘перед’ и *κάρυον* ‘ядро’, или **эукариоты** (истинно ядерные), от лат. *Eukaryota*, от др.-греч. *εὖ*- «хорошо; полностью» + *κάρυον* «орех; ядро»); в эволюционном плане эукариоты самые совершенные клетки, стоящие на более высокой ступени эволюции по

сравнению с прокариотами. Прокариотами являются представители Домена «Бактерии» и Домена «Археи».

К Домену Бактерии относятся бактерии, бациллы, кокки, актиномицеты (теперь они называются актинобактерии), микоплазмы, риккетсии, хламидии и многие другие виды. К бактериям – микроорганизмам палочковидной формы, относятся многочисленные виды, вызывающие заболевания человека и животных – сальмонеллы, иерсинии, листерии и другие, сведения о которых рассматриваются в медицинской и ветеринарной микробиологии.

2. Характеристика микроорганизмов, которые могут использоваться в микро-биотехнологии.

Примеры существ, видимых в световом микроскопе, приводятся ниже. Среди них формы «анималькулей», впервые описанных Антони ван Левенгуком (1632-1723) – палочковидная, шаровидная и извитая формы, а также примеры вновь открытых за последующие триста лет разнообразные по форме и особенностям функционирования микроорганизмы.

Поскольку среди микроскопических существ встречаются представители разных царств, в приведенных примерах подчеркиваются особенности клеточной организации этих организмов – **прокариоты** (доядерные), от лат. *Procaryota*, от др.-греч. πρό ‘перед’ и κάρυον ‘ядро’, или **эукариоты** (истинно ядерные), от лат. *Eukaryota*, от др.-греч. εὖ- «хорошо; полностью» + κάρυον «орех; ядро»); в эволюционном плане эукариотические клетки более совершенны, чем прокариотические.

Бактерии – (от лат. *Bacterion* – трость), микроорганизмы палочковидной формы. Самый изученный объект среди прокариота – ***Escherichia coli*** (кишечная палочка), размер ее 0,3-1,0 x 1,0-3,0 мкм, открыта (выделена из кишечника ребенка) Теодором Эшерихом (1885 г.); постоянно обитает в толстом отделе кишечника теплокровных животных и человека, являясь представителем их нормальной микробиоты. В процессе своей жизнедеятельности бактерии продуцируют ценные витамины, в том числе витамин К (участвует в механизмах свертывания крови), и ферменты, расщепляющие составные части пищи или корма, что способствует их усвоению макроорганизмом. ***E.coli*** является естественным антагонистом патогенных

бактерий, не давая им заселить слизистую кишечника. Вместе с тем, отдельные разновидности (штаммы) кишечной палочки, например, *Escherichia coli O104:H4*, могут сами быть патогенными и вызывать у людей массовые кишечные инфекции, которые были описаны сравнительно недавно в Южной Корее (2005 г.) и в Германии (2011 г.).

Свойство кишечной палочки обитать в условиях толстого кишечника, а не во внешней среде, используется в санитарной микробиологии. Обнаружение *E. coli* в пищевых продуктах или на оборудовании пищевого предприятия свидетельствует об их загрязнении выделениями кишечника человека или животных, т.е. кишечная палочка является в данном случае показателем неудовлетворительного санитарного состояния. *E.coli* относят к одному из важных санитарно-показательным микроорганизмам (СПМ).

E.coli – классический объект исследования молекулярной генетики, на котором изучены наиболее принципиальные проблемы организации генетического материала у прокариот. Для работы с кишечной палочкой был получен штамм, способный размножаться вне кишечника, на питательной среде в лабораторных условиях. Такой штамм *E. coli K-12* был впервые выделен в 1922 г. и с тех пор продолжает использоваться и в наши дни. Другой штамм *E. coli B* изолирован в 1918 г., и активно использовался в работах по исследованию вирусов бактерий (бактериофагов T5 и T7 в 40-х г. XX в.). Штамм также продолжает функционировать и служить ученым сейчас.

Штамм *E. coli K12* был успешно использован Дж. Ледербергом и Э. Тейтумом в 1946 г. для доказательства существования рекомбинаций (перестройки) наследственного материала у бактерий. Позже Дж. Ледерберг построил для нее первую генетическую карту, а Ф. Жакоб и Э. Вольман – первую кольцевую карту. В 1963 г. Дж. Кернс сфотографировал кольцевой геном *E. coli* в процессе его репликации (www.bionet.nsc.ru/vogis/). *E. coli K12* хорошо приспособлена к росту в лабораторных условиях. Работа по проекту полного секвенирования генома *E. coli K12* была начата в 1991 г. под руководством д-ра Фреда Блаттнера (лаборатория генетики, Висконсинский университет, г. Медисон, США). В январе 1997 г. основ-

ные результаты были переданы в компьютерную базу данных *GenBank*, а в сентябре 1997 г. в американском журнале "Science" появилась итоговая статья коллектива участников секвенирования. Полная последовательность ДНК генома ***E. coli K12*** стала достоянием науки. Размер генома составил 4.639 L (Мб). http://www.bionet.nsc.ru/vogis/vestnik.php?f=2002&p=18_1

Кишечная палочка широко используется в генетической инженерии для создания новых штаммов, не существующих в природе, с целью получения продукции, которая в норме микроорганизмами не синтезируются (инсулин, соматотропин, интерферон), но необходимы человеку для лечения различных патологических состояний.

К бактериям – микроорганизмам палочковидной формы, относятся многочисленные виды, вызывающие заболевания человека и животных – сальмонеллы, иерсинии, листерии и другие, сведения о которых рассматриваются в медицинской и ветеринарной микробиологии.

Бациллы – (лат. *bacilli*, ед. ч. *bacillum* или *bacillus* – «палочка»), микроорганизмы палочковидной формы, образующие споры, прокариоты.

Bacillus subtilis (сенная палочка), размер 0,7-0,8 x 2,0-3,0 мкм, обычное место обитания – поверхность растений, сено, почва. Детально изучены многочисленные штаммы бактерий этого вида и среди них не обнаружены патогенные для теплокровных животных и человека. Геном ***Bacillus subtilis*** штамма 168 представлен кольцевой двухцепочечной молекулой ДНК размером 4214814 п.н. и содержит 5279 генов. ***Bac. subtilis*** является продуцентом множества биологически активных веществ ферментов (протеаз, амилаз), аминокислот, полисахаридов, антибиотиков и других соединений. Эти микроорганизмы используются в биотехнологии для промышленного получения ферментных препаратов на основе синтезируемых ими амилаз и протеаз. Препараты – амилосубтилин и протосубтилин находят применение в животноводстве, т.к. расщепляют углеводистые и белковые корма, способствуя их усвоению животными. В растениеводстве препараты из сенной палочки – натуральное средство для борьбы с грибковыми болезнями растений. В медицине и ветеринарии находят применение пробиотики, созданные на основе бацилл. В 1997 г. секвенирован геном сенной палочки, имеющий размер 4.214 L (Мб)

В санитарной микробиологии наличие сенной палочки в пищевых продуктах может быть показателем загрязнения их почвой, и может привести к порче этих продуктов и, соответственно, к пищевым отравлениям при их употреблении.

Bacillus anthracis (возбудитель сибирской язвы), размер **1,0-2,0 x 6,00-10,0 мкм**; значение микроорганизма как возбудителя сибирской язвы доказано немецким микробиологом, основоположником медицинской микробиологии, Робертом Кохом (1876 г.). Место обитания бацилл – почва, но при попадании в организм животного вызывает опасное заболевание, передающееся человеку через продукцию. Характерным признаком всех бацилл является наличие споры. Спора у бацилл не служит способом их размножения, т.к. из одной споры образуется одна клетка. Спора помогает микроорганизму сохраняться в почве сотни лет, т.к. защищает его от влияния различных неблагоприятных факторов. Спора – видовой признак микроорганизма.

Сибирская язва вызывала массовую гибель животных (эпизоотии) в Европе в XIX в. Вакцину против этого заболевания создал в 1877 г. основоположник микробиологии, а также иммунологии, французский ученый Луи Пастер (1822-1895). Разработанный им принцип аттенуации (ослабления) патогенных микроорганизмов лег в основу сделанных им вакцин против холеры кур, бешенства и подсказал путь для создания вакцин на многие годы вперед.

Кокки – шаровидной формы (от др.-греч. κόκκος – «зерно»), **прокариоты**, в зависимости от взаимного расположения клеток после деления образуют цепочки (**стрептококки**), «грозди винограда» (**стафилококки**), пакеты из 8 и более клеток (**сарцины**), группы из 4-х кокков – (**тетракокки**), пары клеток – (**диплококки**); в последнем случае кокки могут выглядеть как кофейные зерна или иметь ланцетовидную форму, что имеет диагностическое значение при их идентификации. ***Staphylococcus aureus*** – шаровидные клетки, **диаметр 0,5-1,0 мкм**.

Многие виды бактерий, имеющие эти формы, являются представителями микробиоты тела человека и животных, но в определенных условиях становятся патогенными, поэтому относятся к условно-патогенным. Стафилококк, обитатель кожных покровов и носоглотки человека, откуда может попасть в продукты, в раны, и

вызвать или пищевое отравление, или гнойный воспалительный процесс, т.к. вырабатывает сильный токсин (ядовитое вещество). В настоящее время золотистый стафилококк относится к супербактериям, резистентным к антибиотикам, и представляет угрозу не только здоровью, но и жизни человека. Коллектив ученых научно-исследовательской лаборатории «Структурная биология» Казанского университета расшифровал атомную структуру белка стафилококка и на основе одиночных мутаций в его структуре выявил потенциальные участки как мишени для разработки новых эффективных антибиотиков для борьбы с инфекцией.

<https://media.kpfu.ru/news/otkrytie-uchenykh-kfu-pozvolit-sozdat-antistafilokokkovyy-antibiotik>

Извитые формы – вибрионы, спириллы, спирохеты; все прокариоты.

Вибрионы (от лат. «*vibrio*» – изогнутый) – клетки имеют форму изогнутых палочек, по форме напоминающие запятую. Такую форму имеют клетки ***Vibrio cholerae*** (холерный вибрион), его **размер 0,2–0,4 x 1,5-4,0 мкм**. Доказана патогенность вибриона в 1883 г. Робертом Кохом, в связи, с чем за ученым закрепилось открытие микроорганизма.

Кампилобактеры – клетки имеют изгибы, подобные форме крыла чайки; к этим бактериям относится ***Helicobacter pylori*** (лат. спиралевидная бактерия, обитающая в привратнике желудка). В 1997 г. был секвенирован геном бактерии, имеющий 1.667 L (Мб). В 2005 г. ученые Робин Уоррен и Барри Маршал получили Нобелевскую премию за открытие роли этих микроорганизмов в развитии язвенной болезни, не считавшейся до этого инфекционным заболеванием.

Спириллы (лат. *Spirillum*, от лат. *spira*, др.-греч. *speira* – изгиб, извив, виток) – клетки характеризуются слабо извитыми формами, с 3–5 завитками; постоянный обитатель воды – ***Spirillum volutans*** – крупная извитая бактерия **размером 1,5-2,0 x 30,0-70,0 мкм**. **Размеры спирилл варьируют у разных видов в широких пределах: ширина от 0,6-0,8 до 2-3 мкм, длина от 1-3,2 до 30-50 мкм и более.**

Спирохеты – клетки с сильно извитыми формами – тонкие, длинные, со множеством завитков.

Спирохеты делят на:

- **лептоспиры** – завитки с загнутыми крючкообразными концами (S-образна форма) *Leptospira interrogans*, размер 0,1 x 6,0-20,0 мкм

- **боррелии** – род назван в честь французского медика и бактериолога Амадея Борреля (1867-1936) – извитые бактерии с 4-12-ю неправильными завитками. *Borrelia reccurentis* (возбудитель эпидемического возвратного тифа, передаваемого вшами), размер 0,2-0,3 x 10,0-20,0 мкм. Роль микроорганизмов в распространении заболеваний через вшей подтверждена в опытах по самозаражению русского врача-инфекциониста Г.Н. Минха (1835-1896) и известного ученого И.И. Мечникова (1845-1916).

- **трепонемы** – (14–17 равномерных мелких завитков). *Treponema pallidum* (**бледная спирохета**), возбудитель сифилиса, размер 0,2-0,3 x 6,0-14,0 мкм.

В заключении можно сказать, что извитые формы имеют различные размеры клеток: от небольших 0,2–0,4 x 1,5-4,0 у вибрионов, до 2,0–3,0 x 15,0–20,0 мкм, и даже более. Отдельные виды трепонем могут достигать в длину 200 мкм.

Среди извитых бактерий многие являются возбудителями заболеваний.

Особую группу составляют бактерии, не имеющие определенной формы – микоплазмы, установление природы которых представляло значительные трудности.

Микоплазмы – (мягкотелые, от лат. *Mollicutes*) мельчайшие из прокариот, не имеют клеточной стенки и поэтому не имеют определенной формы. *Mycoplasma pneumoniae* (микоплазмы – возбудители воспаления легких), часто видны как сферические формы, диаметром 0,15-0,20 мкм, могут иметь нитевидную форму и больший размер.

Риккетсии – *Rickettsia prowazekii* (риккетсии Провачека, кокковидные формы имеют диаметр 0,5 мкм, палочковидные – в длину 1,0-1,5 мкм, изогнутые формы значительно длиннее. Эти бактерии характеризуются внутриклеточным паразитизмом в организме человека и животных, что не характерно для обычных бактерий, из-за чего они получили название «злейшие враги человечества». Переносятся кровососущими насекомыми. Названы по имени двух исследователей, погибших при их изучении (**Ricketts** Н.Т. 1871-1910 и **Prowacek** S.J.M., 1875-1915).

Хламидии – (от лат. *Chlamydia* – одетые в плащ), *Chlamydia pneumoniae*,

возбудители хламидиозной пневмонии; **прокариоты** – но необычные бактерии, существуют в виде внеклеточных инфекционных элементарных телец (ЭТ) – размер в диаметре 0,15-0,20 мкм, и в виде внутриклеточной формы – ретикулярные тельца (РТ), размер в диаметре до 1,0 мкм. Возбудители различных хламидиозов. Эти бактерии отличаются внутриклеточным паразитизмом, не синтезируют АТФ, являясь энергетическими паразитами, имеют необычный для большинства бактерий способ существования и размножения.

Актинобактерии – (*Actinobacteria* – *actis* – луч, лучистые бактерии) (прежнее название актиномицеты или лучистые грибки). Своеобразная группа бактерий, объединяющая в себе грамположительные и грамотрицательные бактерии, часть которых способна к спорообразованию. Размер их клеток колеблется от длины 2,0-5,0 мкм до длины 7,0-12,0 мкм, иногда длина достигает 16 мкм при ширине 0,7-0,9. Своеобразие состоит в наличии у бактерий тонкого мицелия с диаметром 0,4-1,5 мкм, а также в способности размножаться спорами, что делает их похожими на грибы. Многие актинобактерии образуют пигмент. Примерами актинобактерий могут быть микобактерии, распространенные в воде и в почве. *Mycobacterium tuberculosis* (возбудитель туберкулёза), медленно растущие на питательных средах бактерии, не образующие воздушного мицелия, кислотоустойчивые, не имеющие спор. Микобактерии являются и возбудителями проказы.

Бактерии рода **Bifidum** (*B.bifidum*, *B.adolescentis* и др.) – постоянные обитатели толстого кишечника человека и животных, а также рубца жвачных (**Propionibacterium**). К спороактиномицетам относятся патогенные для человека и животных виды коринебактерий, вызывающие дифтерию, и нокардии, вызывающие микозы. В этой же группе находятся стрептомицеты (род **Streptomyces**), продуценты антибиотика, эффективного против туберкулеза. Актинобактерии используются в биотехнологии как самые многочисленные продуценты разнообразных антибиотиков. Обычная среда обитания микроорганизмов – почва.

Фузобактерии – (лат. *Fusobacteria*) – бактерии, обитающие в рубце у жвачных, в желудочно-кишечном тракте человека и животных, в ротовой полости. Анаэробы, получающие энергию за счет брожения и образующие смесь органических кислот.

Миксобактерии (лат. *Mucosoccales*) (от греч. Муха слизь и бактерии) своеобразная группа почвенных бактерий, обладающих способностью к скользящим движениям и образующих плодовые тела и микроспоры. Vegetативные клетки палочковидные (0,7-1,0-3,0-6,0 мкм), размножаются поперечным делением. При образовании плодовых тел клетки образуют устойчивые к высушиванию микроспоры, сползаясь вместе и изменяя свою форму. Каждая такая микроспора затем даёт начало вегетативной клетке палочковидной формы, размножающейся поперечным делением. К систематическим признакам миксобактерий относят размер, форму и цвет плодовых тел. Обладают относительно большими для бактерий геномами, состоящими из 9-10 миллионов пар нуклеотидов. Активно разрушают любые органические субстраты, в том числе и бактерии других видов, поэтому их называют бактериальными хищниками.

Sorangium cellulosum (*Polyangium cellulosum*) обладает геномом в 13 с лишним миллионов пар нуклеотидов, на 2007 год это был самый крупный из известных бактериальных геномов.

Цианобактерии – (лат. *Cyanobacteria*, от греч. κυανός – сине-зелёный) – крупные бактерии, ранее относившиеся к сине-зеленым водорослям; в результате изучения строения клетки отнесены к **прокариотам** и переименованы в бактерии. Своеобразная группа, включающая одноклеточные, колониальные и многоклеточные формы. Особенностью микроорганизмов является способность к фотосинтезу с выделением O₂, присущая обычно растениям. Цианобактерии содержат в клетке особые структуры – тилакоиды, в которых локализованы компоненты фотосинтетического аппарата. Цианобактерии распространены повсеместно, особенно они заметны в спокойных богатых питательными веществами водах. Некоторые виды цианобактерий производят токсины, воздействующие на животных и людей. Люди могут подвергаться воздействию токсинов цианобактерий, когда пьют заражённую воду или купаются в ней. Самые частые и серьёзные последствия для здоровья возникают при употреблении воды, содержащей токсины цианобактерий, или ее попадании в организм при рекреационном водопользовании.

Археи и их особенности

Археи – Archaea Woese and Fox (от др.-греч. ἀρχαῖος «извечный, древний,

первозданный, старый», прокариоты, считаются самыми древними на планете, но открыты были недавно (Карл Вёзе, 1977 г). Прежнее название – архебактерии, но после изучения ДНК архей, от термина бактерии по отношению к археям, отказались. Формы архей необычны для бактерий (в виде замкнутых и незамкнутых колец, шестиугольной звезды, бактерии, образующие выросты – простеки, и т.д.). Размеры архей варьируют от очень мелких в диаметре – 0,1 мкм; встречаются археи и длиной до 15 мкм. Первоначально археи считались бактериями, пока анализ ДНК не показал, что бактерии и археи – разные группы организмов. Это явилось основанием для ученых создать новую, трёх Доменную систему классификации живых существ. Открытие Архей и изучение их свойств изменило взгляд на многие аспекты биологии (см. Положение микроорганизмов в общей системе живых существ).

Археи – особенная группа микроорганизмов прокариотического типа, отличающаяся от истинных бактерий по всем важнейшим признакам (морфологии, физиологии, биохимии, генетике, экологии), что явилось основанием для выделения их в отдельную группу.

Особенности строения, биохимического состава и синтезируемых ферментов позволяют археям обитать в самых невероятных условиях, в которых жизнь кажется невозможной (археи – это экстремальные галофилы или термофилы, живут в условиях чрезмерно кислой среды, метаболизируют молекулярную серу, восстанавливают сульфаты, образуют метан). У них отсутствует типичная для бактерий пептидогликановая клеточная стенка (вместо муреина у архей – псевдомуреин). Над плазматической мембраной они имеют слой белков или гликопротеинов. Вместо D-глицерина, который находится в составе мембран бактерий и эукариот, у архей – L-изомер глицерина; простые эфирные связи между L-глицерином и фитанилом, имеющие лишь один атом кислорода; фитанил – насыщенный полиизопрен (3,7,11,15-тетраметилгексатрисил) с 4 боковыми СН₃-группами вместо неразветвленных жирных кислот длиной 16-18 атомов углерода для ранее известных мембран; жгутики бактерий содержат белок – флагеллин, а у архей – это гликопротеин. Для поддержания структуры ДНК и регуляции экспрессии ге-

нов у эукариота и архей есть специальные белки – гистоны, которых нет у бактерий. У архей, как и у эукариот в геноме есть интроны (нечитаемые последовательности), а у бактерий в ДНК интронов нет. 16S рРНК – (имеет более 1500 нуклеотидов), характерна для прокариот в отличие от 18S рРНК, характерной для эукариот, консервативна и используется для характеристики эволюционного положения вида. Последовательность нуклеотидов в этой рибосомальной РНК у прокариот и архей разная, что ставит окончательную точку в доказательстве их отличий друг от друга.

Микроорганизмы – эукариоты

Дрожжи – *Saccharomyces cerevisiae* (сахаромицеты), широко распространенные в природе одноклеточные безмицелиальные грибы, диаметром 5,0-10,0 мкм, эукариоты. Геном дрожжей был секвенирован в 1996 г. и составил 12.068 L (Мб). Считается, что они утратили мицелиальное строение в связи с переходом к обитанию в жидких и полужидких, богатых органическими веществами субстратах, превратившись за тысячи лет в «домашних микроорганизмов». Объединяет около 1500 видов, относящихся к отделам *Ascomycota* и *Basidiomycota*. Сахаромицеты относятся к аскомицетам. Дрожжи являются хемоорганогетеротрофами и используют как для получения энергии, так и в качестве источника углерода. Им необходим кислород для дыхания, однако при его отсутствии многие виды способны получать энергию за счёт брожения с выделением спиртов (факультативные анаэробы). В отличие от бактерий, среди дрожжей нет облигатных анаэробов, гибнущих при наличии кислорода в среде. При пропускании воздуха через сброживаемый субстрат дрожжи прекращают брожение и начинают дышать (поскольку этот процесс эффективнее), потребляя кислород и выделяя углекислый газ. Это ускоряет рост дрожжевых клеток (эффект Пастера). Однако даже при доступе кислорода в случае высокого содержания глюкозы в среде дрожжи начинают её сброживать. Представляют интерес в дальнейшем как объект изучения биотехнологии и использования для производства пива, вина, спирта, кисломолочных продуктов.

Грибы – многоклеточные организмы, грибы изучаются подробно микологией, но в микробиологии внимание привлекают грибы, вызывающие заболевания человека и животных – микозы, и пищевые и кормовые отравления – микотоксикозы. Основное внимание уделяется грибам рода *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Stachybotrys*, *Trichoderma*, *Alternaria*, *Candida*, *Cryptococcus*. Первый антибиотик был получен из грибов *Penicillium notatum* и грибы по-прежнему используются в биотехнологии как продуценты антибиотиков. Многочисленная группа (около 100 тыс. видов) обитающих в основном в почве многоклеточных организмов, имеющих тело (мицелий), состоящее из нитей (гифов), эукариоты, размножающихся различными способами – спорами, фрагментами мицелия, половым путем.

Исходя из строения, способов бесполого и полового размножения, химического состава оболочек, воздействию на экологию и других признаков грибы делят на несколько классов:

Хитридиомицеты (Chytridiomycetes). Это микроскопические одноклеточные грибы с несколькими ядрами. Их споры и половые клетки имеют на заднем конце по одному бичевидному жгутику. Хитридиомицеты – обитатели водоемов и почвы – широко распространены в природе.

Оомицеты (Oomycetes). Это микроскопические одноклеточные грибы с волокнистым слоевищем без перегородок и с двухжгутиковыми спорами. Они ведут как сапротрофный, так и паразитический образ жизни в пресной воде или в почве. Некоторые виды – паразитируют на различных культурных растениях, вызывают заболевания рыб и икры.

Зигомицеты (Zygomycetes). Эти грибы имеют хорошо развитые гифы без перегородок и неподвижные споры. Живут, главным образом, как сапротрофы в почве и на поверхности земли и разлагают органическое вещество на простейшие неорганические элементы. Они играют большую роль в образовании гумуса (перегноя). Среди них значительное число видов сапротрофов, широко распространенных в почвах разных типов на экскрементах; многие виды развиваются на различных пищевых остатках и продуктах. Ряд видов – паразиты насекомых.

Эндомицеты (Endomycetes). Это одноклеточные или многоклеточные микроскопические грибы, которые размножаются вегетативным способом. Они живут или как сапротрофы в почве, на остатках растений, в органах пищеварения и в помете животных или паразитируют на высших растениях.

Сумчатые грибы аскомицеты (Ascomycetes), которые имеют хорошо развитые гифы с перегородками. Клетки гиф с одним ядром. К аскомицетам относятся дрожжи, плесневые грибки (в том числе продуценты пенициллинов), некоторые съедобные грибы (трюфели, строчки, сморчки) и другие; некоторые виды аскомицетов могут быть возбудителями микозов человека.

Базидиомицеты (Basidiomycetes). Имеют хорошо развитые гифы с перегородками. В их клетки входит по два ядра. Характерный признак класса образование в гимении базидий, на которых экзогенно образуются неподвижные споры – базидиоспоры. Они живут как сапротрофы и очень редко как паразиты.

Дейтеромицеты (Deuteromycetes), несовершенные грибы. Они имеют разветвленные, многоядерные с перегородками гифы как у сумчатых или у базидиальных грибов. Бесполое размножение осуществляется конидиями. Половой процесс отсутствует. В связи с отсутствием полового размножения трудно определить к каким грибам относятся они, к сумчатым или базидиальным.

Простейшие – (лат. Protozoa, от древ.греч. πρῶτος – первый и ζῷα, формы множественного числа от др.-греч. ζῷον живое существо), относятся к микроскопическим животным, группа разнообразных по морфологии гетеротрофов, микроскопических организмов, среди которых хорошо изучены амёбы (питаются за счет пиноцитоза, передвижение осуществляется с помощью ложноножек, размножаются делением надвое). Паразитические простейшие вызывают множество заболеваний. *Plasmodium vivax* (малярийный плазмодий), диаметр 5,0-8,0 мкм. Возбудителей малярии несколько видов. Все изученные виды имеют по 14 хромосом, одну митохондрию и одну рудиментарную пластиду. Длина каждой хромосомы – от 500 килобаз до 3,5 мегабаз. Полностью просеквенирован геном четырёх видов: *P. falciparum*, *P. knowlesi*, *P. vivax* и *P. yoelli*. Общий размер генома составляет около 25 мегабаз, геном содержит около 5300 генов. Возбудители малярии – чрезвычайно опасные паразиты, вызывавшие большую смертность в мире от малярии,

которая по-прежнему не ликвидирована. Сейчас ВОЗ ставит задачу ликвидации малярии в 25 странах. Примером других паразитических простейших, изучаемых микробиологией, являются трихомонады *Trichomonas vaginalis*, лямблии *Lamblia intestinalis* (*Giardia* гиардии, или жиардии), дизентерийная амеба *Entamoeba histolytica*, лейшмании *Leishmania tropica*, вызывающие кожный лейшманиоз, трипаносомы *Trypanosoma brucei* – возбудитель сонной болезни, и др. Детальным изучением этих простейших занимается разделы медицинской и ветеринарной микробиологии. Изучением всех простейших занимается **протозоология**.

Микроскопические водоросли – относятся к группе разнообразных, растущих в морской и пресной воде или во влажной среде одноклеточных или многоклеточных организмов, способных к фотосинтезу; некоторые имеют тело (таллом) без четкой его дифференциации. Водоросли обладают хлорофиллом или каротиноидами, окрашены в разные цвета, обуславливающие их название (зеленые, бурые, красные, золотистые). Систематика водорослей не завершена, поэтому можно назвать только наиболее изученные группы – динофлагелляты, диатомовые, эвгленовые, зеленые. Размеры водорослей колеблются от долей мкм (кокколитофорида и некоторые диатомеи) до 30-50 м (бурые водоросли – ламинария, макроцистис, саргассум): В настоящее время водоросли усиленно изучаются, т.к. они – главные производители органических веществ в водной среде. Около 80% всех органических веществ, ежегодно создающихся на Земле, приходится на долю водорослей и других водных растений. Водоросли прямо или косвенно служат источником пищи для всех водных животных. Из водорослей получают: студне- и слизиобразующие вещества – агар-агар (анфельция, гелидиум), агароиды (филлофора, грацилярия), карраген (хондрус, гигартина, фурцелярия), альгинаты (ламинариевые и фукусовые), кормовую муку, содержащую микроэлементы и йод. Известны горные породы (диатомиты, горючие сланцы, часть известняков), возникшие в результате жизнедеятельности водорослей в прошлые геологические эпохи, по диатомовым водорослям определяется возраст этих пород.

Микроскопическая водоросль хлорелла *Chlorella vulgaris* (от греч. χλωρός, «зелёный» и лат. -ella – уменьшительный суффикс), размер в диаметре от 1,5 мкм

до 12 мкм, **эукариоты**, не имеют жгутиков. Хлоропласты хлореллы содержат хлорофилл а и хлорофилл b. Для процесса фотосинтеза хлорелле требуются только вода, диоксид углерода, свет, а также небольшое количество минералов для размножения. Микроскопические растения, представляют интерес для микробиологии как объекты, используемые в биотехнологии для получения новых видов пищи и кормов – белка одноклеточных. Изучением всех водорослей занимается **альгология**.

Микроорганизмы, не имеющие клеточного строения

Кроме организмов клеточной организации, в микромире были обнаружены особые «существа», не имеющие клеточного строения. Это открытие явилось потрясением для биологии, т.к. противоречило первому закону биологии – «всё живое состоит из клетки».

Вирусы. Исследования показали, что вирусы могут быть двух групп – ДНК-геномные или РНК-геномные, и содержат только один тип нуклеиновой кислоты. Кроме этого важнейшего биохимического отличия вирусов от всего живого, у них отсутствует клетка – эти не имеющие клетки существа похожи на геометрические фигуры, которые «оживают» и дают потомство в живой чужой клетке, а вне клетки они существуют в виде вириона. Вирусы реплицируются (воспроизводят себе подобных) за счет белок-синтетической системы клеток животных, растений, бактерий и других организмов, которые они поражают.

На сегодня классифицировано 6 реалмов вирусов. Реалм – высший ранг в классификации вирусов. Помимо *Riboviria*, т.е. содержащих РНК, выделяют три реалма ДНК-вирусов: *Monodnaviria*, *Duplodnaviria*, и *Varidnaviria*. Поскольку большинство вирусов, поражающих эукариот, имеют РНК-геном, большинство их относятся именно к реалму *Riboviria* (2686 видов вирусов). В каждом реалме имеются царства: всего 10 царств вирусов распределено в 6 реалмах, например, реалм *Adenaviria* содержит 1 царство, *Duplodnaviria* – 1 царство, *Varidnaviria* – 2 царства, *Monodnaviria* содержит семейства *Papillomaviridae* и *Polyomaviridae*.

Примерами могут служить следующие вирусы, вызывающие опасные заболевания человека и животных – вирус ящура, бешенства, полиомиелита, клещевого энцефалита, коронавирусы.

Вироиды – К неклеточным формам жизни можно отнести кроме вирусов, вироиды. Согласно одной точке зрения, они считаются неживыми и рассматриваются как молекулярные инфекционные агенты, которые не живут сами, а лишь изменяют жизнедеятельность клеток-хозяев. Это мельчайшие инфекционные агенты (молекулярная масса 150 000-170 000). Это низкомолекулярные кольцевые одноцепочечные РНК, не кодирующие собственные белки и не имеющие капсида (белковая оболочка). Вироиды впервые выявлены в 1971 г. Т.О. Динером, который исследовал веретеновидность клубней картофеля.

Вироиды вызывают различные заболевания растений, такие как веретеновидность клубней, карликовость, утончение покровов, обводненность тканей пораженного растения и т.п. Переносчиками являются насекомые (тля), которые питаются клеточным соком, и некоторые паразиты растений (круглые черви). Также они могут распространяться при вегетативном размножении растений и их механической обработке. Некоторые виды распространяются через семена и пыльцу.

Механизм репликации вироидов окончательно не выяснен. Считается, что в клетках растений они индуцируют синтез собственных РНК, используя ферменты растений-хозяев.

Вирусоиды – подобны вироидам, т.к. находятся в клетках растений, содержат РНК, но покрыты белком (капсидом), однако не способны сами кодировать белки и реплицироваться, они зависят от вирусов растений и поэтому их относят к сателлитам.

ЗАДАНИЕ

Найдите ответы на вопросы для самоконтроля и письменно ответьте на них.

Вопросы для самоконтроля

1. Что легче культивируется в условиях промышленного производства – клетки прокариот или эукариот и почему?
2. Какими особенностями с точки зрения физиологии обладают прокариоты перед другими организмами?

3. Дайте характеристику отличительных черт различных групп микроорганизмов, которые могут использоваться в биотехнологии.

4. Особенности представителей домена Археи и сложности работы с ними.

ЗАНЯТИЕ 8. ТРЕБОВАНИЯ К ШТАММАМ МИКРООРГАНИЗМОВ

ПЛАН

1. Понятие штамм в микробиологии.
2. Источники штаммов в разные периоды развития биотехнологии.
3. Основные требования к штаммам при получении различной продукции (пищевой, крупнотоннажной, продукции тонкой очистки).
4. Способы сохранения культур для производства.

1. Понятие штамм в микробиологии

Ответ на этот вопрос подробно рассматривается на лекции. Здесь мы напомним, что штамм – это микроорганизмы одного вида, но отличающиеся друг от друга местом или временем изоляции, или небольшим количеством фенотипических признаков. В условиях промышленного производства стабильность штамма играет важную роль, так как в противном случае невозможно будет получить конечную биотехнологическую продукцию.

2. Источники штаммов в разные периоды развития биотехнологии

До начала развития современной биотехнологии, основанной на изоляции протекающих процессов от внешней среды и стерильности производства, основным источником штаммов была природа и селекция наиболее продуктивных культур. Часто разные производители одной и той же продукции использовали разные штаммы, ориентируясь лишь на выход конечного продукта и не придавая значения свойствам штамма. В результате производство не всегда было стабильным. Интересна история поисков штаммов – продуцентов антибиотиков, использование мутагенеза и селекции в этой огромной работе по получению желаемого результата.

Все изменилось, когда ученые получили возможность создавать микроорганизмы с заранее заданными свойствами. И эту возможность им предоставили генетические инженеры, осуществляющие операции на генетическом аппарате бактерий. Один студент при ответе на вопрос как делают такие операции, сказал – «берут

большой-большой электронный микроскоп и маленький-маленький скальпель!». Эти операции на самом деле делают с помощью ферментов, на генетическом аппарате бактерии, внося в ее геном новую информацию и придавая бактерии способность производить несвойственную ей продукцию, в том числе никогда ей не производимую (инсулин, гормон роста, интерферон и др.), характерную для организма животных и человека. Для введения в бактерию чужих генов их необходимо защитить от действия внутриклеточных ферментов, которые могут ее разрушить.

Для этого новую информацию помещают в конверт (вектор), а в качестве вектора используют плазмиду (небольшая кольцевая молекула ДНК, расположенная вне основной хромосомы и реплицирующаяся независимо от неё).

Вкратце, происходит следующее. Бактерии помещаются в среду, где плазмиды выходят из клетки, их «разрезают» ферментами рестриктазами, вносят новую генетическую информацию, взятую из другой клетки. Гены встраиваются в ДНК плазмиды благодаря «липким концам». Липкий конец – конец двунитчатой молекулы ДНК, у которой одна нить длиннее ("торчащая"), чем другая ("заглубленная"). "Торчащий" участок нити может соединиться с другим комплементарным ему торчащим (липким) концом. Встроенные гены «сшиваются» с плазмидой ферментом лигазой и возвращаются вместе с плазмидой в бактерию. Теперь бактерия приобрела новую генетическую информацию и способна производить новую продукцию.

3. Основные требования к штаммам при получении различной продукции (пищевой, крупнотоннажной, продукции тонкой очистки)

Отвечая на этот вопрос раскройте требования к штаммам, основные из которых:

- источники штаммов для биотехнологических процессов;
- безопасность для потребителя и окружающей среды;
- продуктивность;
- фагоустойчивость;
- рентабельность производства.

4. Сохранность штаммов и способы сохранения культур.

Существует несколько методов сохранения микробных культур:

- субкультивирование (пересевы) на питательных средах;
- замораживание;
- высушивание.

Глубокое замораживание, или криоконсервация микроорганизмов (от $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$). **Криоконсервация** (от [греч.](#) κρύος – холод и [лат.](#) *conservo* – сохранять) – процесс низкотемпературного сохранения живых биологических объектов с возможностью восстановления их биологических функций после размораживания. Криоконсервация осуществляется в сосудах с жидким газом (азотом) или в стационарных морозильных камерах.

Лиофильное высушивание (из замороженного состояния) или высушивание из жидкого состояния. [Лиофильная сушка](#) (лиофилизация, криодессикация) – это процесс дегидратации, обычно используемый для того, чтобы сохранить скоропортящийся материал или сделать его более удобным для транспортировки. Лиофилизация биологических продуктов (белков, вакцин, микроорганизмов) направлена на сохранение их физической и биологической целостности после хранения в течение нескольких месяцев или даже лет. Процесс лиофилизации основан на замораживании материала с последующим уменьшением внешнего давления, что позволяет воде переходить из твердого состояния напрямую в газообразное.

Промышленная микробиология постоянно использует специфические изоляты/штаммы микроорганизмов в качестве исследовательских, пробных, опытно-конструкторских и производственных культур. Эти штаммы очень ценны и должны сохраняться в течение длительного времени без генетических и фенотипических изменений.

Чтобы уменьшить скорости метаболизма микроорганизмов, культуры лучше хранить в бытовом холодильнике при температуре $5-8\text{ }^{\circ}\text{C}$. Используя эти меры предосторожности, можно сохранять большинство бактерий в течение 3-5 месяцев без пересева.

Методы непродолжительного хранения являются одними из самых простых,

не требующих дорогостоящего оборудования и в то же время незаменимых в повседневной работе с микроорганизмами.

Субкультивирование, или метод перевиваемых культур

Субкультивирование, или периодический пересев на свежие агаризованные среды, относится к старейшим и давно уже ставшим традиционными методам поддержания и сохранения бактериальных культур как в лабораторных, так и промышленных условиях. Интервал между посевами зависит от микроорганизма, используемой среды, температурных условий хранения.

Поддерживающая среда. Предпочтительнее использовать минимальные среды, поскольку в них процессы метаболизма в микроорганизмах идут с пониженными скоростями и поэтому промежутки между посевами удлиняются. Однако для роста некоторых бактерий требуются комплексные среды. Или же для сохранения их специфических физиологических свойств необходимо присутствие в среде сложных соединений. При использовании комплексной среды могут потребоваться более частые посева, связанные с ускоренным ростом бактерий или накоплением конечного продукта метаболизма.

Температура хранения. Допускается хранение культур микроорганизмов при комнатной температуре в закрытом контейнере. Для уменьшения высыхания культур используют пробирки с завинчивающимися крышками или резиновые пробки либо обычные ватно-марлевые пробки, которые обертывают парафильмом и помещают в полиэтиленовый пакет. Чтобы уменьшить скорости метаболизма микроорганизмов, культуры лучше хранить в бытовом холодильнике при температуре 5-8 °С. Используя эти меры предосторожности, можно сохранять большинство бактерий в течение 3-5 месяцев без посева.

Режим посевов. Частоту посевов определяют экспериментальным путем, стараясь проводить их как можно реже во избежание селекции вариантов. На случай потери культуры желательно сохранять ее дубликаты. После каждого посева культуру проверяют на чистоту и периодически проводят сокращенную проверку для выявления каких-либо изменений в фенотипических свойствах бактерий. В перевиваемых культурах не следует выделять единичные колонии, поскольку при

этом повышается вероятность селекции мутантов.

Преимущества и недостатки метода. Метод периодических пересевов прост в исполнении и используется для многих микроорганизмов. Он общедоступен и позволяет легко контролировать чистоту штаммов. Недостатками же метода являются необходимость соблюдения регламентов пересевов, потребность в большом количестве посуды, питательных сред, значительные затраты времени, риск загрязнения культуры, ошибки при обозначении штаммов или наклеивании неправильной этикетки, случаи селекции, риски потерь культур и т.д. Известны случаи изменения биологических свойств микробных культур и даже их гибель. При частых пересевах штаммы-продуценты из-за спонтанной диссоциации нередко могут терять или снижать способность к выработке целевых продуктов.

Хранение под минеральным маслом

С помощью этого сравнительно простого и дешевого метода удается весьма успешно сохранять месяцами или даже годами многие виды бактерий. Впервые его применил А. Limier в 1914 г. для поддержания возбудителя гонореи. Для этого метода обычно используют стерильное минеральное масло медицинского назначения (например, вазелиновое масло с удельной плотностью 0,865-0,890 г/см³).

Техника проведения. Масло стерилизуют в сушильном шкафу при температуре 170 °С в течение 1-2 ч, поскольку автоклавирование для этой цели применять не рекомендуется. Культуры выращивают в пробирках на скошенном питательном агаре (косячках), в толще агаризованной среды (столбиках) или в жидкой питательной среде соответствующего состава. В пробирки с выросшими микроорганизмами стерильно наливают слой минерального масла высотой не менее 2 см (косячки должны быть покрыты полностью). Слой масла служит защитой культур от высыхания, одновременно понижая их метаболизм. Покрытые маслом культуры хранят в вертикальном положении в холодильнике. Для проверки сохранности культур периодически определяют их жизнеспособность. Обычно культуры пересевают 1-2 раза в год на свежую среду. Для этого используют инокуляционные иглы или петли. При обжиге иглы (петли) следует позаботиться о том, чтобы брызги масла

не попали на окружающие предметы и персонал. Пересеянные культуры снова покрывают стерильным маслом, а исходные материалы хранят до тех пор, пока не станет ясно, что заложенный на хранение штамм не загрязнен и не изменен.

Недостатки метода. Этому методу присущи такие же недостатки, как обычному субкультивированию. Кроме того, всегда велика вероятность загрязнения и потери штамма вследствие использования нестерильного масла.

Хранение в воде и водно-солевых растворах

Первые эксперименты по хранению в физиологическом растворе и дистиллированной воде были выполнены с некоторыми видами фитопатогенных бактерий и микроскопических грибов, которые оставались живыми до двух лет, но это было не во всех случаях. Сообщалось также об успешном сохранении бактерий рода *Acinetobacter* и дрожжей вида *Saccharomyces cerevisiae*. Считается, что этот метод применим для большинства микроорганизмов, если их требуется сохранить в течение, например, месяца. Микробные клетки при использовании этого метода переходят в покоящееся состояние – гипобиоз.

Техника проведения. Клетки с плотностью не более 10^9 кое/мл вносят в пробирку с индифферентной жидкостью с физиологическим ионным составом и подходящим рН. Например, оптимальный рН для месячного сохранения *E. coli* – 8 ед., для *S. cerevisiae* – 5,5 ед. Пробирки с инокулятом хранят в холодильнике при температуре 4-8 °С.

Недостатки метода. Велика вероятность загрязнения штаммов вследствие благоприятных условий (влажность и температура) для роста грибной флоры во внутреннем объеме пробирки.

Хранение высушиванием на твердых носителях

Большинство бактериальных культур гибнет при высыхании в лабораторных условиях. Однако некоторые культуры, особенно спорообразующие, если были высушены в подходящих для них носителях, сорбирующих влагу, сохраняются годами.

В практике хранения микроорганизмов используются самые разнообразные

носители – почва, песок, бумага, смолы, желатин, активный уголь, зерна злаков и многие другие. Хранение замораживанием при температурах ниже точки кристаллизации воды.

Обычное замораживание

От хранения в воде и водно-солевых растворах данный метод отличается тем, что емкости с образцами помещают в морозильную камеру холодильника при температуре от -10 до -20 °С. Такой простой прием замораживания проб в отличие от обычного нахождения микроорганизмов в водной среде позволяет заметно продлить сохранность штаммов и уменьшить вероятность их загрязнений, что бывает удобно при исследовании большого количества изолятов. Некоторые бактерии при таком способе консервации оставались живыми от 6 месяцев до 2 лет хранения, но чаще, как показывает наш опыт работы со штаммами лактобактерий, этот срок ограничивается месяцем для палочковидных форм и составляет до полугода для кокковых форм.

Недостатки метода. Такой способ хранения не рекомендуется применять для криочувствительных бактерий из-за их повреждений в эвтектических смесях концентрированных растворов электролитов и высокой вероятности генетического обмена между клетками, что может способствовать неконтролируемой селекции культуры.

Методы длительного хранения микроорганизмов

Длительное хранение клеток без утраты ценных свойств проводится методами, обеспечивающими существенное торможение протекающих у них жизненных процессов. Это достигается путем глубокого замораживания микроорганизмов или их высушивания из замороженного состояния. *Drying*-высушивание – процесс принудительного удаления жидкости (чаще всего влаги/воды, реже – иных жидкостей, например, летучих органических растворителей) из веществ, материалов, полупродуктов лиофилизации) либо непосредственно из жидкого состояния (*drying*-высушивание). Высокий эффект консервации этими методами достигается тем, что

клетки, лишаясь свободной воды в условиях субнулевых и (или) криогенных температур, переходят в состояние анабиоза.

Консервация замораживанием при низких температурах (криоконсервация)

Практически все известные группы бактерий способны длительно храниться в замороженном состоянии при низких (криогенных) температурах (температуры ниже 120 к, т.е. менее $-153\text{ }^{\circ}\text{C}$). Такую температурную область хранения обеспечивают сжиженные газы – воздух (80 к или $-193\text{ }^{\circ}\text{C}$); азот (77,4 к или $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$); неон (27,1 к или $-246\text{ }^{\circ}\text{C}$); водород (20,4 к или $-256\text{ }^{\circ}\text{C}$); гелий (4,2 к или $-269\text{ }^{\circ}\text{C}$). Исполняя роль хладоагентов, они могут относительно долго оставаться в сосудах Дьюара или сделанных по их принципу специальных хранилищах с хорошей теплоизоляцией. Испаряясь под атмосферным давлением, эти газы в сжиженном состоянии достаточно хорошо поддерживают постоянную температуру нормального кипения каждого из них.

Все же наибольшее практическое распространение для криоконсервации (от греч. *Кзувъ* – холод, мороз, лед) из-за доступности и безопасности получил жидкий азот. Поэтому криоконсервация в жидком азоте или его паре является основным для большинства коллекций культур. Этим методом консервируют самые различные биоматериалы – актиномицеты, бактерии, дрожжи, грибы, вирусы растений и животных, культуры клеток и т.д. В ряде музеев многие бактериальные культуры достаточно успешно хранятся при температурах, которые обеспечивают современные морозильники или кель-винаторы (обычно до $-86\text{ }^{\circ}\text{C}$). При этих температурах хранения скорость отмирания может быть в 1000 раз меньше, чем при $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$.

ЗАДАНИЕ

Изучите данную тему и ответьте на вопросы для самоконтроля письменно.

Вопросы для самоконтроля

1. Назовите самые известные штаммы микроорганизмов, используемых в биотехнологии.

2. Перечислите требования к штаммам для их промышленного производства.
3. Культуры микроорганизмов и способы их сохранения.
4. Отличия способов хранения культур для краткосрочного и длительного хранения.
5. Подготовьтесь к коллоквиуму (коллоквиум – форма проверки и оценивания знаний учащихся в системе образования, преимущественно в вузах).
6. Принесите тетрадь с самостоятельной работой, выполненной дома.

ЗАНЯТИЕ 9. КОЛЛОКВИУМ ПО ПРОЙДЕННЫМ ТЕМАМ

ПЛАН

1. Проверка тетрадей с самостоятельной работой, выполненной дома.
2. Собеседование по изученному материалу в соответствии с вопросами, предложенными преподавателем.
3. Ответы оцениваются преподавателем и учитываются при выставлении зачета с оценкой.

Вопросы для обсуждения

Введение в дисциплину микробиотехнология. Основные термины и понятия. Характеристика продукции микробиотехнологии. Международные и Российские системы контроля качества биотехнологических продуктов.

Микробиотехнология в историческом аспекте. Этапы развития микробиотехнологии. Современные направления микробиотехнологии.

Общие свойства микроорганизмов, отличающие их от клеток эукариот. Основные представители микроорганизмов (бактерии, бациллы, археи, грибы, водоросли, вирусы), используемых в микробиотехнологии.

Требования к штаммам микроорганизмов для промышленного производства. Принцип создания новых штаммов в генетической инженерии. Методы хранения штаммов и культур для производства.

ЗАНЯТИЯ 10, 11. ОСОБЕННОСТИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ БИОБЪЕКТОВ И ФЕРМЕНТАЦИИ

ПЛАН

1. Культивирование биообъектов.
2. Рост микробов при культивировании.
3. Понятие о первичных и вторичных метаболитах бактерий.
4. Накопительные культуры, чистые культуры, методы получения.
5. Культивирование аэробных и анаэробных микроорганизмов.
6. Рост культур на плотных и жидких питательных средах.
7. Характеристика питательных сред по составу, консистенции, назначению.
8. Требования к питательным средам (органогены, рН, стерильность, кислород).
9. Использование различного вида сырья в качестве питательных сред.
10. Приемы стерилизации в промышленной микробиотехнологии.

1. Культивирование биообъектов

Поскольку в биотехнологии существует множество объектов для культивирования (выращивания), то и методов, и условий культивирования будет много. Это касается параметров питательной среды, получаемого продукта, длительности процесса, требований к стерильности и т.д. Но всё-таки для микроорганизмов это хоть и отличающиеся между собой в зависимости от вида микроорганизма, но в принципе однотипные процессы. Совсем по-другому происходит культивирование вирусов для приготовления вакцин или в научно-исследовательских целях. Вирусы не растут на питательных средах, подобно бактериям, им нужна только живая клетка, в которой будет репродуцироваться вирус. Поэтому успехи в развитии вирусологии появились только тогда, когда научились выращивать культуры различных тканей человека или животных в искусственных условиях. Перевиваемые культуры стали сохраняться довольно длительное время и позволять изучить вирус более подробно. Как правило, берутся клетки опухолевых тканей, способные к безудержанному росту, а также эмбриональные ткани. До появления таких культур

опыты с вирусами ставились на животных или куриных эмбрионах. Позже научились культивировать клетки эукариот для многогранных целей биотехнологии.

Культивирование клеток представляет собой процесс, посредством которого *in vitro* отдельные клетки (или единственная клетка) прокариот или эукариот выращиваются в контролируемых условиях. На практике термин «культура клеток» связан, в основном, с выращиванием клеток, относящихся к одной ткани, полученных от многоклеточных эукариот, чаще всего животных. Историческое развитие технологии и методик выращивания культур клеток неразрывно связаны с выращиванием тканевых культур и целых органов.

2. Рост микробов при культивировании

При культивировании бактерий в производственных условиях популяция бактерий попадает в среду, богатую питательными веществами, клетки начинают адаптироваться к новым условиям. Первая фаза роста называется лаг-фаза, или фаза задержки роста. Возможно, что бактерии не адаптировались к среде и дальнейшее культивирование не произойдет. Как правило, такое случается редко, и популяция начнет развиваться по своим законам.

Первая фаза носит название «Лаг-фаза» – от момента посева до достижения максимальной скорости роста. В эту фазу происходит адаптация культуры к условиям питательной среды производства, начинается активный рост клеток, но активного размножения еще нет.

Продолжительность *первой фазы* зависит от многих факторов: если использован инокулят из культуры с резко отличающимися условиями выращивания, клеткам требуется время на синтез новых рибосом, РНК и адаптивных ферментов. В этом периоде не только увеличивается размер клеток, но и в 8-12 раз повышается содержание РНК.

1. Активизируются ферментные системы, возрастает количество нуклеиновых кислот, клетка готовится к интенсивному синтезу белков и других соединений. Клетки не размножаются (**скорость размножения равна нулю**). **Концентрация живых клеток постоянна и равна количеству внесенных клеток.** Продолжительность этой фазы зависит от физиологических особенностей микроорганизма и

от состава питательной среды.

2. Вторая фаза – Фаза ускорения роста. Эта фаза характеризуется началом деления клеток, увеличением общей массы и постоянным увеличением скорости роста культуры. Эта фаза обычно непродолжительна.

3. Третья фаза – Экспоненциальная (логарифмическая) фаза роста. В этот период микроорганизмы размножаются с постоянной максимальной скоростью. При этом логарифм числа клеток линейно зависит от времени. К концу этой фазы среда истощается вследствие катаболических и анаболических процессов, в среде накапливаются продукты жизнедеятельности микроорганизмов. Возникает и пространственная ограниченность, так как клетки мешают друг другу.

4. Фаза замедления роста. В этот период снижается скорость роста, небольшая часть клеток гибнет. Скорость роста выше скорости отмирания.

5. Стационарная фаза. Количество живых клеток достигает максимума. Скорость роста равна скорости отмирания клеток, поэтому концентрация жизнеспособных клеток остается постоянной.

6. Фаза ускорения отмирания. Количество отмерших клеток (скорость отмирания) становится больше количества образовавшихся клеток.

7. Фаза отмирания. Масса живых клеток значительно уменьшается, так как в среде нет питательных веществ, а запасные вещества клетки исчерпываются. При непрерывном способе культивирования микроорганизмов идет постоянный отбор питательной среды и замена ее новой.

При периодическом культивировании различают семь фаз.

3. Понятие о первичных и вторичных метаболитах бактерий

Название метаболиты связано с латинским термином метаболизм, что означает по-русски обмен веществ. Следовательно, все, что образуется в процессе обмена веществ при культивировании того или иного объекта, будет относиться к метаболитам. Но по значимости для микробной клетки метаболиты разнятся между собой. Часть из них необходима для развития и нормального функционирования самой клетки, их нельзя изъять из процесса культивирования на первых этапах и

поэтому они называются первичными по значимости. Остальные метаболиты будут вторичными, не имеющими для бактерий жизненно важной функции. Например, антибиотики, как продукт микробного синтеза, при выращивании монокультуры не имеют для микроорганизма особого значения. В условиях промышленного производства культура клеток растет как правило одна, без конкуренции с другими бактериями и ей антибиотики для защиты от других бактерий как в природе в принципе не нужны. Это будут вторичные метаболиты. Изъятие их никак не отразится на росте культуры.

4. Накопительные культуры, чистые культуры, методы получения

Начнем с определений, которые раскроют суть процессов.

Культура накопления, накопительная культура – **культура бактерий и среда для них, в которой определённый вид микроорганизмов имеет преимущество**. Примером селективных условий может быть повышенная температура (для выделения термоустойчивых форм бактерий), повышенная кислотность (для ацидофилов) или щелочность (щелочной агар для холерного вибриона), повышенная концентрация соли (для галофилов), и т. д., то есть создание преимуществ для конкретного вида перед другими видами. Этим термином пользовался великий русский микробиолог С.Н. Виноградский, исследовавший микроорганизмы в природных условиях. Он создавал так называемые селективные питательные среды, на которых могли расти микроорганизмы только одного вида. Примером селективных сред может быть среда Виноградского для анаэробных азотфиксаторов, в которой отсутствовал органический и минеральный азот, а также кислород, и выжить на такой среде могли только азотфиксаторы, использующие атмосферный азот и энергию, выделяемую при маслянокислом брожении. В природе, как правило, чаще встречаются смешанные культуры, которые мы обнаруживаем при посеве на питательные среды в виде разных по морфологии колоний.

Чистая культура – **потомство одной клетки, где все организмы одинаковы по генетическим и фенотипическим признакам. Чистую культуру выделяют из одной колонии, представляющей собой популяцию микроорганизмов**

одного вида. Такие культуры чаще всего используют в промышленных условиях.

5. Культивирование аэробных и анаэробных микроорганизмов

Культивирование микроорганизмов основано на знании физиологии микроорганизмов, а именно на типах питания и получения энергии микробной клеткой. В соответствии с потребностями и возможностями микроорганизмов при их культивировании будет использоваться разное оборудование для глубинного культивирования аэробов, анаэробов или для поверхностного культивирования.

При поверхностном культивировании микроорганизмы получают кислород непосредственно из воздуха, и на жидких средах они растут в виде пленок. Осуществляется поверхностное культивирование в специальных ваннах – кюветах. Кроме жидких сред могут для поверхностного культивирования использоваться сыпучие среды. Поверхностное культивирование бывает только прерывистое и заканчивается по мере накопления целевого продукта и истощения питательных веществ в культуральной жидкости или сыпучей среде.

При глубинном культивировании аэробов снабжение культуры кислородом должно обеспечиваться равномерно для всех клеток, находящихся в питательной среде, на разной глубине. Осуществляется глубинное культивирование в специальных аппаратах – **ферментаторах** (ферментерах), снабженных мешалками и системой подвода стерильного воздуха для обеспечения роста аэробных микроорганизмов. При глубинном культивировании возможно, как периодическое культивирование, так и непрерывное. Периодическое культивирование относится к закрытым системам, когда культивирование имеет начало процесса и окончание по мере истощения питательной среды и накопления продуктов метаболизма.

Для непрерывного культивирования культура должна находиться в аппарате, в который постоянно подводится свежая питательная среда и одновременно отводится культуральная жидкость, а также **запасы кислорода в питательной среде возобновляются при подаче аэрирующего воздуха**. Культура поддерживается на определенной фазе роста. Такая система относится к открытым системам.

6. Рост культур на плотных и жидких питательных средах

Плотные питательные среды готовятся на основе жидких с добавлением определенного процента (0,5-2,0%) уплотнителей в виде агара, желатина, казеина.

При поверхностном культивировании грибов применяются свои плотные питательные среды в соответствии с потребностями культуры, отличающиеся по составу от сред для других групп микроорганизмов.

Жидкие питательные среды широко используются при промышленном культивировании микроорганизмов. Жидкая питательная среда готовится на основе мясопептонного бульона или аналогичной по составу жидкости, применимой не только для изучения в лабораторных условиях биохимических особенностей микроорганизмов, но также для накопления биомассы или продуктов метаболизма в промышленной микробиотехнологии, и для поддержания и хранения микроорганизмов, плохо развивающихся на плотных средах.

7. Характеристика питательных сред по составу, консистенции, назначению

Питательная среда подбирается в соответствии с потребностями микроорганизма и его способом питания – автотроф или гетеротроф. Среда может подходить для культивирования многих видов микроорганизмов и тогда ее называют универсальной (например, МПА, МПБ), или элективной (избирательной) для одной группы организмов (среда Виноградского для азотфиксаторов).

По составу среды могут быть:

- естественного происхождения (клубни растений, молоко, яйца, мясо);
- искусственного приготовления (когда к естественной среде добавили соль, сахар, экстракт какого-то вещества);
- синтетические – не содержащие органических веществ).

Существует множество питательных сред, рецептура которых выверена годами практики.

8. Требования к питательным средам (органогены, рН, стерильность, кислород)

Некоторые химические элементы, необходимые в составе питательной

среды, называют «органогенами» (O, H, C, N, P, S) в связи с их ведущей ролью в формировании структуры любой клетки, а также тканей и органов у эукариот. Они составляют основную массу органических веществ клетки – белков, углеводов, липидов и нуклеиновых кислот. Иногда можно встретить в этом списке кальций как элемент, необходимый для формирования костной ткани. Вторую группу составляют «микроэлементы», необходимые в минимальных количествах (концентрация от 0,00001% до 0,01%). В эту группу входят: Fe, Zn, F, Sr, Mo, Cu, Br, Si, Cs, I, Mn, Al, Pb, Cd, B, Rb. Для культивирования микроорганизмов каждый раз опытным путем подбирается подходящая питательная среда. Есть еще такое понятие – ростовые факторы, в качестве которых в питательные среды добавляют дрожжевой или кукурузный экстракт, оказывающие положительный эффект на рост культур. Концентрация водородных ионов в среде (рН) должна соответствовать физиологии микроорганизма (ацидофил, нейтрофил, алкалофил).

Стерильность питательной среды (полное отсутствие любых микроорганизмов и их спор) перед посевом культуры – одно из главных условий промышленного культивирования. Если в лабораторных условиях, при небольшом объеме работ могут использоваться физические и механические методы стерилизации (термическая стерилизация в автоклаве, вариант с проращиванием спор при 100 °С, фильтрование), то в промышленном масштабе нужно стерилизовать тонны среды одновременно, что усложняет этот этап.

9. Возможность использования различного вида сырья в качестве питательных сред

Питательные среды в микробиотехнологии относятся к дорогостоящим и могут сделать нерентабельным весь процесс получения биомассы и метаболитов. Поэтому стараются использовать по возможности отходы пищевых производств, что выгодно во всех смыслах – идет утилизация отходов, что является примером безотходных технологий.

10. Приемы стерилизации в промышленной микробиотехнологии

Существует понятие «острый пар», или перегретый, который вводят непосредственно перед посевом в емкость с питательной средой, которую затем охлаждают до температуры культивирования. Процесс является периодическим. Может применяться и другой метод стерилизации – непрерывный. Питательная среда находится в отдельной емкости, а перед поступлением в ферментер стерилизуется, проходя через установку постоянной стерилизации (УПС), имеющей теплоноситель и хладоагент. Скорость потока среды через установку рассчитывается таким образом, чтобы среда находилась наибольшее время в точках наибольшей температуры, обеспеченной острым паром. Время также рассчитывается с учетом закономерностей кинетики термоинактивации микроорганизмов.

При необходимости могут использоваться приемы стерилизации по аналогии с аппаратом Коха, когда температура не достигает максимальных цифр, но эффект стерилизации объясняется неоднократным нагреванием среды и созданием благоприятных условий для прорастания спор в интервале между нагревами. Проросшие споры превращаются в вегетативные формы и погибают уже при 100 °С.

В случаях, когда необходима «мягкая» стерилизация из-за чувствительности питательной среды к температуре, используют известный в микробиологии прием фильтрование (фильтрация). Такой метод относится к мембранным технологиям и основан на создании фильтров с определенным размером пор столь малым, что через них не проходят никакие бактерии. Фильтры готовятся из разных материалов – асбеста, фарфора, мембран, и применяются при необходимости. В микробиотехнологии мембранные фильтры используют и для фракционирования сложных смесей на составляющие их компоненты.

ЗАДАНИЕ

1. Изучите данные вопросы, используя краткий словарь биотехнологических терминов (глоссарий), лекционный материал, раздаточный материал и рекомендуемые источники литературы.

2. Запишите ответы в тетрадь.

Вопросы для самоконтроля

1. Что понимается под термином культивирование в микробиологии?

2. Каким законам подчиняется популяция микроорганизмов при выращивании в производственных условиях?
3. В чем разница между первичными и вторичными метаболитами?
4. Дайте определение чистой культуре по сравнению со смешанной.
5. Как осуществляется снабжение культуры кислородом при глубинном культивировании аэробов?
6. Какие условия лучше для бактерий – на плотных или жидких средах?
7. Сравните состав плотной и жидкой среды Чапека.
8. Перечислите основные требования к питательным средам.
9. Приемы стерилизации и их особенности в производстве.
10. Что может использоваться в качестве питательной среды при промышленном культивировании микроорганизмов?

ЗАНЯТИЕ 12. ПРИНЦИПИАЛЬНАЯ СХЕМА МИКРОБИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА

ПЛАН

1. Принцип работы ферментеров, используемых для микробиотехнологической переработки сырья.
2. Принцип работы аэротенков, используемых для биологической переработки сточных вод.
3. Принцип работы метантенков, используемых для биологической переработки отходов.
4. Масштабирование культуры.
5. Периодическое и непрерывное культивирование.
6. Понятие «иммобилизованные ферменты».

ЗАДАНИЕ

1. Раскройте данную тему, учитывая, что одно из занятий проводится как выездное на предприятии, где вы не только знакомитесь с оборудованием и процессом пивоварения, но и можете задать вопросы технологу.
2. Ответьте на вопросы для самоконтроля письменно.

Вопросы для самоконтроля

1. Почему термин ферментация является ключевым в микробиотехнологии?
2. Принцип работы ферментера.
3. Что собой представляет аэротенк?
4. Дайте определение метантенку и сравните его с аэротенком.
5. Почему необходимо масштабирование культуры и как это делается на предприятии?
6. Приведите примеры периодического культивирования.
7. Приведите примеры непрерывного культивирования.
8. В чем заключается преимущество иммобилизованных ферментов?

ЗАНЯТИЕ 13. ВЫЕЗДНОЕ ЗАНЯТИЕ НА ПРЕДПРИЯТИИ ПИЩЕВОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

ПЛАН

Выездное занятие на предприятие проводится с целью ознакомления магистров с работой крупного многотоннажного производителя пива «Балтика».

Пивоварение – это искусство, дошедшее до нас из глубины веков, пример первых биотехнологий, созданных человеком. Начало предприятию «Балтика» было дано в Ленинграде. Завод «Балтика» – это один из крупнейших пивоваренных заводов в России и крупнейший производитель пива в Восточной Европе. Он был основан в Санкт-Петербурге в 1990 году и с тех пор стал частью международной группы Carlsberg. Завод специализируется на производстве различных сортов пива, включая такие популярные бренды, как «Балтика», «Невское», Tuborg, Kronenbourg и другие.

На заводе «Балтика» производят широкий ассортимент напитков, включая лагеры, темное пиво, безалкогольные варианты и лимонады. Завод использует современные технологии пивоварения и имеет несколько производственных мощностей по всей России.

Компания активно участвует в социальных и экологических инициативах, стремясь снизить влияние на окружающую среду за счёт использования возобновляемых источников энергии и переработки отходов.

Все сказанное относится и к предприятию ООО «Пивоваренная компания "Балтика-Новосибирск"», на котором студенты знакомятся с оборудованием и особенностями его работы для получения продукции высокого качества.

ЗАНЯТИЕ 14. БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА, ПОЛУЧАЕМЫЕ МИКРОБИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИМ СПОСОБОМ

ПЛАН

1. Определение термина биологически активные вещества.
2. БАВ, относящиеся к первичным метаболитам, и их характеристика.
3. БАВ, относящиеся к вторичным метаболитам, и их характеристика.
4. БАВ, продуцируемые бактериями после внесения в бактерию новой генетической информации.
5. Возможность использования отходов с.-х. производства в качестве возобновляемого ресурса для микробиотехнологических производств.

ЗАДАНИЕ

1. Изучите тему, используя пройденный материал, лекции и раздаточный материал.
2. Ответы на вопросы запишите подробно в тетрадь.

Вопросы для самоконтроля

1. Дайте определение понятию биологически активных веществ в широком смысле этого термина, указав их роль в живых организмах.
2. Приведите примеры получаемых микробиологическим синтезом БАВ, относящихся к первичным метаболитам.
3. Приведите примеры получаемых микробиологическим синтезом БАВ, относящихся к вторичным метаболитам.
4. Сравните, какой процесс получения БАВ сложнее.
5. Объясните, почему бактериальная клетка может синтезировать продукцию клеток эукариот. Дайте схему изменения генетической информации.
6. Практическое значение получения инсулина, гормона роста, интерферона путем микробного синтеза.

ЗАНЯТИЕ 15, 16. МИКРОБИОТЕХНОЛОГИЯ КОРМОВОГО И ПИЩЕВОГО БЕЛКА. ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОДУЦЕНТОВ БЕЛКА

ПЛАН

1. Проблема дефицита белка на планете.
2. Синтез белка на целлюлозе.
3. Использование отходов с.-х. производства в качестве возобновляемого ресурса для производства белка микробиологическим путем.
4. Характеристика продуцентов белка.
5. Виды дрожжей, бактерий, водорослей и микроскопических грибов для производства кормового и пищевого белка.
6. Достижения советских микробиологов в получении белка.

ЗАДАНИЕ

1. Изучите материалы лекций, раздаточного материала и рекомендуемой литературы по данной теме.
2. Ответьте на вопросы для самоконтроля письменно.

Вопросы для самоконтроля

1. Приведите примеры дефицита белка на планете. В каких странах он ощущается особенно остро.
2. Какие заболевания вызывает дефицит белка у человека?
3. Объясните, почему возможен синтез белка на целлюлозе? Приведите уравнение реакции и примеры гидролиза целлюлозы химическим и микробиологическим методом.
4. Приведите примеры отходов, на основе которых возможен синтез белка.
5. Дайте характеристику культурам дрожжей, бактерий, микроскопических грибов как источников белка.
6. Характеристика водорослей как потенциальных источников белка.

ЗАНЯТИЕ 17, 18. МИКРОБИОТЕХНОЛОГИЯ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ РАСТЕНИЕВОДСТВА

ПЛАН

1. Понятие биологизация сельского хозяйства.
2. Биоудобрения вместо химических удобрений.
3. Характеристика биоудобрений на основе азотфиксирующих бактерий.
4. Биоудобрения с использованием различных групп микроорганизмов.
5. Биоудобрения на основе водорослей. Применение водорослей в разных направлениях.
6. Проведение выездного занятия на предприятии по производству микробных препаратов.

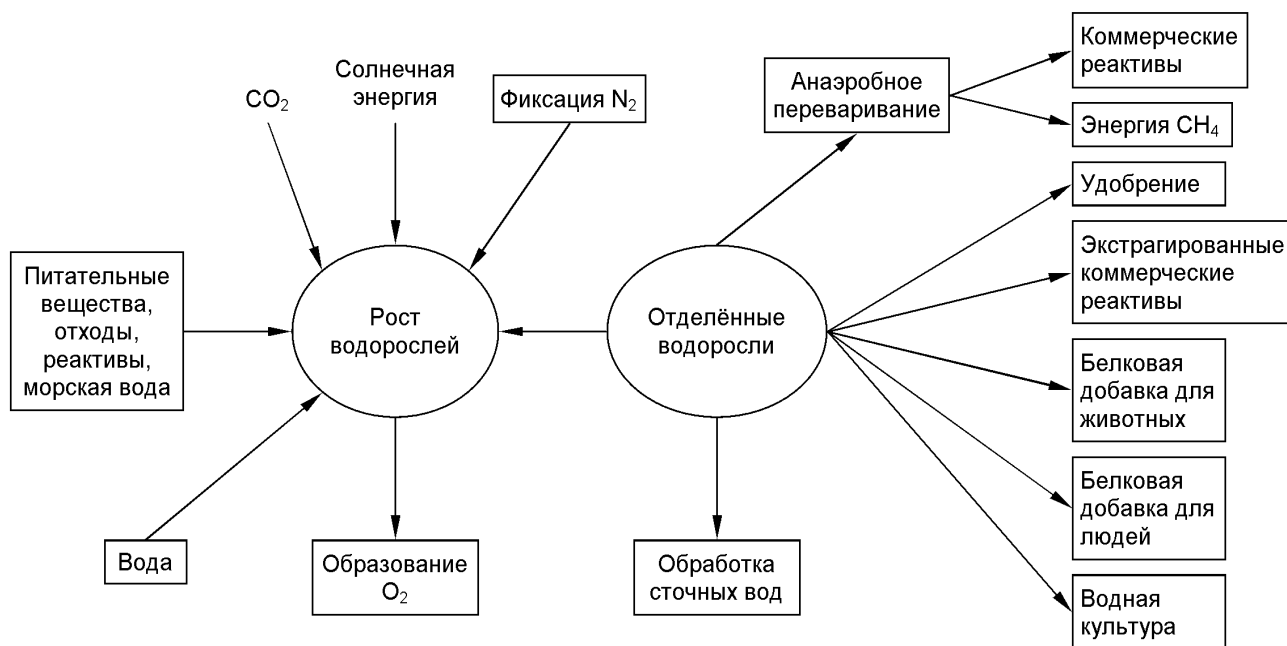


Рис. 5. Возможные способы применения массовой культуры водорослей

ЗАДАНИЕ

1. Изучите тему по лекции и раздаточному материалу.
2. Ответьте письменно на вопросы для самоконтроля.

Вопросы для самоконтроля

1. Объясните, какие способы усвоения азота существуют у бактерий и сравните их с организмами-эукариотами?
2. Общая характеристика препаратов для улучшения азотного питания растений.
3. Особенности применения препарата азотобактерин.
4. Какие микроорганизмы являются основой препарата ризоторфин?
5. Основой каких препаратов могут быть *Cl. Pasteurianum*?

ЗАНЯТИЕ 19. КОЛЛОКВИУМ ПО ПРОЙДЕННОМУ МАТЕРИАЛУ

ПЛАН

1. Собеседование преподавателя со студентами по предложенным преподавателем вопросам.
2. Проверка самостоятельных работ студентов, выполненных дома.

ЗАДАНИЕ

1. Ответьте на следующие вопросы:

1. Микроорганизмы для безотходных производств. Сформулируйте проблему и предложите пути ее решения. Классификация отходов (материал изложен в лекции).
2. Характеристика продуцентов белка.
3. Виды дрожжей, бактерий, водорослей и микроскопических грибов для производства кормового и пищевого белка.
4. Достижения советских микробиологов в получении белка.
5. Какие аппараты используются в микробиотехнологии для получения продукции? Краткая характеристика аппаратов?
6. Какой аппарат изображен на рис.6?

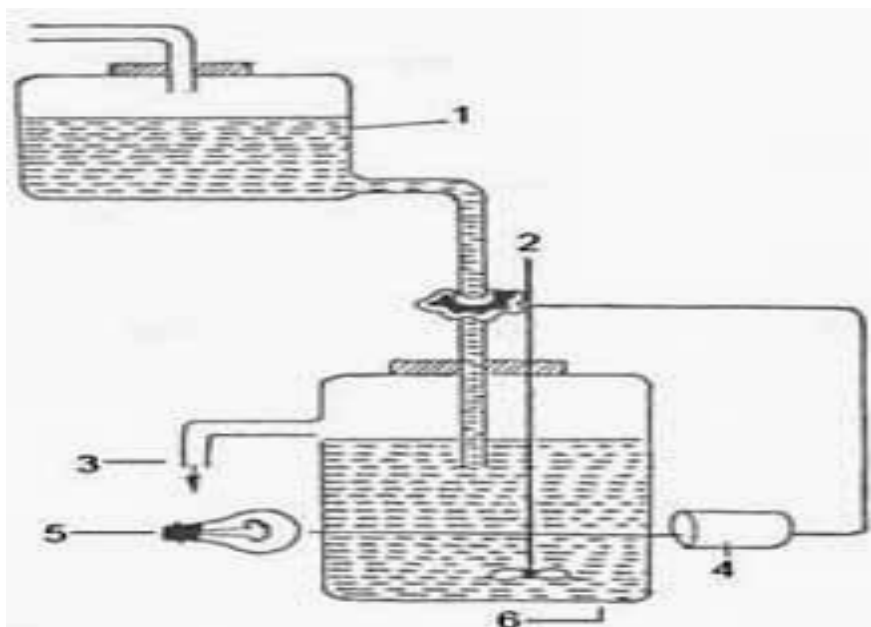


Рис. 6. Напишите название аппарата

7. Являются ли эти термины синонимами, согласно ГОСТ Р 57095-2016:

Ферментация (fermentation): Процесс биохимической переработки органического сырья с помощью микроорганизмов, отдельных ферментов или их комплексов.

Культивирование (cultivation): Выращивание микроорганизмов, животных или растительных клеток, тканей или органов в искусственных условиях на различных по составу питательных средах.

8. Какие варианты культивирования существуют в жидкой питательной среде?

9. Назовите примеры и варианты твердофазного культивирования микроорганизмов.

10. Дайте определение и примеры использования терминов флотация, микрофилترация, коагуляция в производстве продукции микробного синтеза.

11. Приведите примеры ферментных препаратов, получаемых микробиотехнологическим способом.

2 . Проверка самостоятельных работ

ЗАНЯТИЕ 20, 21. МИКРОБИОТЕХНОЛОГИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ИНСЕКТИЦИДОВ – АЛЬТЕРНАТИВА ХИМИЧЕСКИМ ПЕСТИЦИДАМ

ПЛАН

1. Положительные и отрицательные стороны применения химических пестицидов в историческом аспекте.
2. Биологические методы борьбы с насекомыми – история, примеры.
3. Преимущества использования микроорганизмов в биометодe.
4. Микроорганизмы – основа биометода (бактерии, грибы, вирусы).
5. *Bac. thuringiensis* и особенности микроорганизма.
6. Препараты, выпускаемые промышленностью на основе *Bac. thuringiensis*

Задание

При ответах на вопросы используйте слайд-шоу по данной теме.

1. История создания ДДТ.
2. Приведите примеры отрицательного действия ядохимикатов на организм человека и животных.
3. Когда и кто впервые применил микроорганизмы для защиты растений?
4. Какие микроорганизмы могут использоваться для защиты растений?
5. Механизм действия эндотоксина *Bac. thuringiensis* на насекомых.
6. Механизм действия экзотоксина *Bac. thuringiensis* на насекомых.
7. Назовите промышленные препараты, создаваемые на основе *Bac. thuringiensis*.

ЗАНЯТИЯ 22, 23. ОСОБЕННОСТИ МИКРОБИОТЕХНОЛОГИИ ВИРУСНЫХ ПРЕПАРАТОВ

ПЛАН

1. Роль вирусов в регуляции численности популяций в природе.
2. Особенности вирусов как объектов познания.
3. Культивирование вирусов в историческом аспекте.
4. Характеристика бакуловирусов.
5. Механизм действия вирусов на насекомых.
6. Технология получения вирусных препаратов.

ЗАДАНИЕ

Письменно ответьте на вопросы, используя материалы лекций, слайд-шоу, фотографии автора, сделанные при изучении вирусов насекомых.

1. Приведите примеры вирусных эпизоотий, эпифитотий, эпидемий.
2. Особенности морфологии и биохимии вирусов насекомых.
3. Понятия гранулы, полиэдры.
4. Взаимодействие вируса и клетки насекомых.
5. Накопление вирусного материала для получения энтомопатогенных препаратов.
6. Расшифруйте сокращения вирин ЭКС, вирин ЭНШ, вирин АББ. Дайте подробную характеристику препаратов.
7. Назовите свой пример вирусного препарата против насекомых.
8. Что такое ДНК-инсектициды?

ЗАНЯТИЕ 24,25. ОСОБЕННОСТИ МИКРОБИОТЕХНОЛОГИИ ВАКЦИН

ПЛАН

1. История создания вакцин.
2. Современная трактовка термина вакцина.
3. Требования к вакцинам.
4. Примеры успешного применения вакцин в мире.
5. Генно-инженерные вакцины.
6. Современные ДНК-вакцины.
7. Вакцины против **COVID-19**
8. Культивирование вирусов для создания вакцин.

ЗАДАНИЕ

Письменно ответьте на следующие вопросы:

1. Понятие «вакцина» по определению Пастера.
2. Принцип получения вакцин, провозглашенный Пастером.
3. «Вакцина» Коха и ее использование в наше время.
4. Современная трактовка термина вакцина.
5. Основные требования к вакцинам.
6. Ликвидация заболевания оспой на планете.
7. Вакцина от полиомиелита (краткая характеристика вируса).
8. Характеристика вируса ящура и вакцины от заболевания.
9. Группы вирусов по Балтимору.
10. Генно-инженерные вакцины.
11. Современные ДНК-вакцины.
12. Особенности вакцин против Covid-19.

Вопросы для самоконтроля.

При ответе на вопросы пользуйтесь лекциями, слайд-шоу по теме.

1. Кто первый и от какого заболевания человека создал вакцину?
2. Как и против каких заболеваний создал вакцины Луи Пастер?
3. В чем состоит ошибка Роберта Коха при создании вакцины?
4. Создание вакцины от туберкулеза.
5. Вакцина от черной оспы, краткая характеристика вируса.
6. Краткая характеристика вируса полиомиелита и вакцины.
7. Группы вирусов по Балтимору
8. Требования к вакцинам.
9. Генно-инженерная вакцина от гепатита В.
10. ДНК-вакцины – принцип создания.
11. Вакцины против COVID-19.

ЗАНЯТИЕ 26. ЗАКЛЮЧИТЕЛЬНОЕ ЗАНЯТИЕ

ПЛАН

1. Защита контрольных работ.
2. Ознакомление с вопросами к предстоящему зачету.
3. Подведение итогов по изученному материалу.
4. Обсуждение подготовленных рефератов и докладов на научную студенческую конференцию.

Рекомендуемая литература

1. Ксенофонов, Б.С. Основы микробиологии и экологической биотехнологии: учебное пособие / Б.С. Ксенофонов. – Москва: ФОРУМ: ИНФРА-М, 2022. – 221 с. – (Высшее образование). – ISBN 978-5-8199-0615-6. – URL: <https://znanium.com/catalog/product/1851899> (ЭБС ИНФРА-М).

2. Биотехнология. Практикум по культивированию клеточных культур: учебное пособие / М.Ш. Азаев, Т.Н. Ильичева, Л.Ф. Бакулина [и др.]. – Москва: ИНФРА-М, 2024. – 142 с. + Доп. материалы [Электронный ресурс]. – (СПО). – ISBN 978-5-16-015953-9. – Текст: электронный. – URL: <https://znanium.com/catalog/product/208337> (ЭБС ИНФРА-М)

3. Слюняев, В.П. Основы биотехнологии. Научные основы биотехнологии: учебное пособие / В.П. Слюняев, Е.А. Плошко. – Санкт-Петербург: СПбГЛТУ, 2012. – 112 с. – ISBN 978-5-9239-0487-1. – Текст: электронный // Лань: ЭБС. – URL: <https://e.lanbook.com/book/45315>

4. Введение в микробиотехнологию: лекция / Новосибирский государственный аграрный университет; Институт экологической и пищевой биотехнологии; составитель: Л.А. Литвина. – 2-е изд., исп. и доп. – Новосибирск, изд-во НГАУ, 2024. – 55 с.

5. Микробиотехнология: методические указания для выполнения самостоятельной и контрольной работы / Новосибирский государственный аграрный университет; Институт экологической и пищевой биотехнологии; составитель: Л.А. Литвина. – 3-е изд., перераб. и доп. – Новосибирск, изд-во НГАУ, 2024. – 30 с.

6. Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности: учебно-методическое пособие / Новосибирский государственный аграрный университет; Институт экологической и пищевой биотехнологии; составитель: Л.А. Литвина. – 2-е изд., исп. и доп. – Новосибирск, изд-во НГАУ, 2024. – 85 с.

7. Электронное учебное пособие по основам Микробиотехнологии / Новосиб. гос. аграр. ун-т; Биол.-технол. ф-к; сост.: Л.А. Литвина. В.Г. Маренков – Новосибирск.

Для поиска научной литературы:

1. «КиберЛенинка» <https://cyberleninka.ru>
2. «eLibrary» <https://elibrary.ru/>
3. «Scholar.ru» <http://www.scholar.ru/>
4. «Math-Net.ru» <http://www.mathnet.ru/>
5. «ЭБС «Университетская Библиотека Онлайн»

Глоссарий

А

Абзимы – антитела, обладающие каталитической активностью (англ. *abzyme*, *Antibody enzymes*; от англ. *a(nti)b(ody)* – антитело и лат. *zym(e)*, т.е. активностью обычных ферментов: выступают в роли протеаз и нуклеаз, осуществляют окислительно-восстановительные реакции, гидролиз эфирных связей и др.

Аmplификация (от лат. *amplificatio* – усиление, увеличение), – увеличение числа копий ДНК. Лежит в основе полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Антитела, иммуноглобулины – крупные глобулярные белки плазмы крови, выделяющиеся плазматическими клетками иммунной системы и служащие для нейтрализации клеток патогенов (бактерий, грибов, многоклеточных паразитов) и вирусов, а также белковых ядов и некоторых других чужеродных веществ. Каждое антитело распознаёт уникальный элемент патогена, отсутствующий в самом организме, – антиген, а в пределах данного антигена – определённый его участок, эпитоп.

Аэротенк – чаще всего бассейн или резервуар прямоугольного сечения, по которому протекает сточная вода, смешанная с активным илом, где происходит биологическая очистка сточной воды в присутствии кислорода (аэробная очистка сточных вод). **Виды аэротенков выделяются в соответствии со способом подачи и отвода смеси и по характеру аэрации.** По способу подачи иловой смеси – вытеснители, смесители, неполного смешения. По способу аэрации – с механической аэрацией, с пневматической аэрацией. Существует три основных типа систем аэрации, которые можно использовать на очистных сооружениях сточных вод. Процесс необходим для активации и поддержания жизнедеятельности аэробных микроорганизмов, которые используют растворенный кислород для разложения органических веществ в сточных водах. Аэротенк создает оптимальные условия для жизнедеятельности аэробных бактерий, которые эффективно разлагают органические загрязнители. В процессе аэрации происходит окисление органических и неорганических веществ, что способствует их превращению в более простые и безвредные соединения. Удаление азота и фосфора в аэротенках также используют

для процессов нитрификации и денитрификации, которые помогают удалять излишки азота и фосфора, предотвращая эвтрофикацию водоемов (насыщение водоемов биогенными элементами).

Б

Бактерии – микроскопические одноклеточные организмы (прокариоты). Они являются одной из самых ранних известных форм жизни на Земле. Существуют тысячи разных видов бактерий. Они живут в любой среде по всему миру.

Бациллы – микроскопические одноклеточные организмы (прокариоты), палочковидной, как и бактерии, формы, но способные к образованию спор.

Биологически активные вещества (БАВ) – это вещества, продуцируемые различными видами микроорганизмов в условиях промышленного производства (антибиотики, витамины, ферменты, аминокислоты, микробная биомасса), которые используются в медицине, ветеринарии, сельском хозяйстве, экологии.

Биологические агенты – это объекты биотехнологических исследований, включающие клетки микроорганизмов, животных, растений; вирусы; компоненты клеток, внеклеточные продукты; иммобилизованные клетки микроорганизмов, животных, растений, их компоненты и внеклеточные продукты (ГОСТ Р 57095-2016. Биотехнологии. Термины и определения).

Биореактор – аппарат для культивирования клеток в лабораторных условиях или в производственных условиях. Отличаются размерами (объем биореактора от 1 до 15 л для лабораторных условий и 20-100000 л для производства). Разработаны одноразовые биореакторы, что во много раз ускоряет процессы культивирования и делает их более рентабельными. Эти биореакторы уже стерильны, а после работы утилизируются. Биореакторы и ферментеры отличаются по типу перемешивания (с механическим перемешиванием), или биореакторы специального назначения (газовихревые, фотобиореакторы, эрлифтные, мембранные). В промышленных условиях чаще используют биореакторы с механическим перемешиванием. Оборудование выполнено из нержавеющей стали и соответствует стандартам GMP.

В

Вакцина – по определению основоположника микробиологии Луи Пастера, создавшего принцип получения вакцин – «вакцина – это микроб, вирулентность

которого понижена тем или другим путем». В настоящее время, в связи с созданием нового поколения вакцин, определение изменилось – «вакцина – медицинский препарат биологического происхождения, обеспечивающий организму появление иммунитета».

Вакцины в микробиотехнологии – иммунобиологические лекарственные препараты, предназначенные для формирования активного или пассивного иммунитета либо диагностики наличия иммунитета или диагностики специфического приобретенного изменения иммунологического ответа на аллергизирующие вещества.

Вирусы – неклеточные инфекционные агенты, которые могут воспроизводиться только внутри клеток. Вирусы поражают все типы организмов, от растений и животных до бактерий и архей. Обнаружены также вирусы, способные реплицироваться только в присутствии других вирусов.

Водоросли микроскопические – эукариоты, растения – гетерогенная экологическая группа, преимущественно фотоавтотрофных одноклеточных, колониальных или многоклеточных организмов, обитающих, как правило, в водной среде, в систематическом отношении представляющая собой совокупность многих отделов. Их делят на 12 отделов: сине-зелёные, прохлорофитовые, красные, золотистые, бурые, желто-зеленые, эвгленовые, зеленые, харовые и т.д. К бурым водорослям относят ламинарию, макроцистис. К зеленым – хлореллу, хламидомонаду, к эвгленовым – колациум, астазия, факус, криптоглена и т.д.

Выделенные живые культуры – живые культуры в покоящейся форме или в виде высушенного препарата.

Г

Генетически модифицированные штаммы – штаммы, измененные путем операций на генетическом аппарате микроорганизмов, в соответствии с запросами исследователя.

Генная (генетическая) инженерия – раздел молекулярной биологии, посвященный созданию искусственных генетических систем с нужными свойствами. Она представлена совокупностью методов, приемов и технологий, позволяющих

улучшать существующие наборы генов – геномы, и создавать новые, не существующие в природе.

Гибридная (англ. recombination – рекомбинация) нуклеиновая кислота (ДНК или РНК) или белок, полученные в результате объединения *in vitro* чужеродных фрагментов и содержащие новые сочетания последовательностей нуклеотидов или аминокислот соответственно.

Гибридома – гибридная клеточная линия, полученная в результате слияния клеток двух видов: способных к образованию антител В-лимфоцитов, полученных из селезёнки иммунизированного животного (чаще всего мыши), и опухолевых клеток миеломы.

Грибы микроскопические – эукариоты. Гифальные (плесневые) грибы образуют ветвящиеся тонкие нити (гифы), сплетающиеся в грибницу, или мицелий (плесень). Толщина гифов колеблется от 2 до 100 мкм.

Д

Дезинфекция – это комплекс мероприятий, направленный на уничтожение возбудителей инфекционных заболеваний и разрушение токсинов на объектах внешней среды для предотвращения попадания их на кожу, слизистые и раневую поверхность. Является одним из видов обеззараживания.

Дезинфекция в микробиотехнологии – нарушение способности микроорганизмов, находящихся в оборудовании для фильтрации, вызывать инфекцию после воздействия на них химических веществ, обладающих бактерицидным действием.

Детергент – моющее средство, детергент (лат. *detergeo* – «мою») – профессиональные химические средства и средства бытовой химии (как концентраты, так и уже готовые к применению растворы) для мытья, чистки от загрязнений и уходу за поверхностями.

Дрожжи – это одноклеточные эукариоты и относятся они к царству грибов. Но в отличие от большинства других грибов, дрожжам не свойственно образовывать мицелий. В природе существует большое разнообразие видов дрожжей, некоторые виды используются в микробиотехнологии.

И

Идиофаза – фаза (идиофаза или фаза несбалансированного роста) при получении антибиотиков. Во время идиофазы рост биомассы замедляется и происходит быстрое накопление антибиотика в культуральной жидкости.

Иммобилизованные ферменты (от лат. *immobilis* – неподвижный) – ферменты, искусственно связанные с нерастворимым в воде носителем и сохраняющие частично или полностью свои каталитические свойства. Подвижность ферментов ограничена благодаря связыванию с носителем, включению в гель или макрокапсулы.

Иммобилизация ферментов создаёт ряд преимуществ при использовании: их легко можно отделить от инкубационной среды и применять многократно; часто происходит стабилизация ферментов – повышается их термостабильность, устойчивость к агрессивным средам. На основе иммобилизованных ферментов создаются непрерывные биотехнологические процессы (производство аминокислот, антибиотиков, гормонов и др.).

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.

Инокуляция – введение живых микроорганизмов, инфицированного материала, сыворотки и т.п. в ткани растений, животных, в питательные среды.

Использование – эксплуатация, установка, в том числе на месте эксплуатации, техническое обслуживание (проверка), ремонт, капитальный ремонт или реконструкция.

К

Культивирование – выращивание микроорганизмов, растительных и животных клеток в искусственных условиях. Представляет собой процесс, посредством которого *in vitro* отдельные клетки (или единственная клетка) прокариот или эукариот выращиваются в контролируемых условиях. На практике термин «**культура клеток**» соответствует в основном выращиванию клеток, относящихся к одной

ткани, полученных от многоклеточных эукариот, чаще всего животных. Историческое развитие технологии и методик выращивания культур клеток неразрывно связаны с выращиванием тканевых культур и целых органов.

Культивирование непрерывное – процесс выращивания микроорганизмов, который осуществляется постоянно за счет удаления части культуральной жидкости с продуктами метаболизма и поступления необходимого объема новой жидкости с питательными веществами. Процесс относится к открытым. Этот метод производит большую биомассу, что приводит к более высокому выходу желаемых продуктов. Как в режиме хемостата, так и в режиме турбидостата, культуры поддерживаются при фиксированной плотности путем непрерывного удаления клеток (и среды) и одновременного добавления свежей среды.

Культивирование периодическое (прерывистое) – осуществляется в аппарате (ферментере), куда помещена питательная среда и культура микроорганизмов. Система относится к закрытым. По мере накопления целевого продукта и достижения его максимума в культуральной жидкости процесс прерывается. Продукт проходит необходимую обработку, емкость стерилизуется и процесс повторяется с новой питательной средой и культурой микроорганизмов.

Культуральная жидкость – жидкая среда, получаемая при культивировании различных прокариотических и эукариотических клеток *in vitro* и содержащая остаточные питательные вещества и продукты метаболизма этих клеток.

Л

Лигазы – ДНК-лигазы – ферменты, катализирующие ковалентное сшивание цепей ДНК в дуплексе при репликации, репарации и рекомбинации. Они образуют фосфодиэфирные мостики между 5'-фосфорильной и 3'-гидроксильной группами соседних дезоксирибонуклеотидов в местах разрыва ДНК или между двумя молекулами ДНК.

Липкие концы – ДНК, имеющая выступающие одноцепочечные участки. При этом выступающие участки двух образующихся фрагментов комплементарны друг другу. Ввиду продольной асимметрии молекулы ДНК, концы её цепей неравнозначны. Они обозначаются 3' и 5' в соответствии с нумерацией атомов в 2-Р-дезоксирибозе.

М

Метантенк – (от англ. *methane* – метан и англ. *tank* – резервуар) – устройство для анаэробного брожения жидких органических отходов с получением метана. Метантенк является одним из важных элементов очистных сооружений. В отличие от аэротенков в них поступает, как правило, не сама сточная жидкость, а концентрированный осадок, выпадающий в отстойниках. Для малых количеств сточной жидкости (как правило, до 25 м³ в сутки) обычно применяют септики, для средних количеств (до 10 000 м³ в сутки) – двухъярусные отстойники.

Микробиом – (*micro* – «маленький», *bios* – «жизнь») – сообщество микроорганизмов, населяющих конкретную среду обитания, или совокупность генов микроорганизмов этого сообщества. Синоним микробиоты и микрофлоры.

Микробиотехнология – термин состоит из двух слов – микробиология (наука о жизни малых существ) и биотехнология (сделать что-то с помощью живого). Таким образом, микробиотехнология – это получение продукции с помощью микроорганизмов.

Микробные препараты – препараты, созданные на основе микроорганизмов – белково-витаминные концентраты, аминокислоты, витамины, ферментные препараты, антибиотики, бактериальные и вирусные препараты для защиты растений от вредителей и болезней, бактериальные удобрения, а также продукты комплексной переработки растительного сырья – фурфурол, ксилит и др.

Микроорганизмы в микробиотехнологии – вирусы, микоплазмы, риккетсии, бактерии, хламидии или грибы природные, усовершенствованные или модифицированные в виде выделенных живых культур или материалов, включая живые материалы, которые сознательно инокулировали или заразили такими культурами.

Моноклональные антитела – антитела, вырабатываемые иммунными клетками, принадлежащими к одному клеточному клону, то есть произошедшими из одной плазматической клетки-предшественницы (в отличие от поликлональных антител).

О

Оборудование для защиты от патогенов и предотвращения их проникновения в окружающую среду и специально разработанные для этого оборудования

компоненты (боксы: полностью закрытая рабочая зона, в которой оператор отделен от рабочего места физическим барьером; возможность работы при отрицательном давлении; наличие проточно-вытяжной вентиляции в рабочей зоне с фильтром высокой эффективности (HEPA-фильтр).

Оборудование для проточной (тангенциальной) фильтрации, обеспечивающее разделение возбудителей заболеваний, токсинов или суспензионных культур клеток и имеющее все следующие характеристики: площадь фильтрации – 1 м² или более; возможность стерилизации или дезинфекции без предварительной разборки либо использования как многоразовых, так и одноразовых фильтрующих компонентов.

Объекты микробиотехнологии – наиболее часто используемые в практике – дрожжи, мицелиальные грибы, бактерии, бациллы, вирусы, водоросли. В настоящее время чаще всего «рабочей лошадкой» микробиотехнологии является культура кишечной палочки – *Escherichia coli*.

II

Правила GMP – ГОСТ Р 52249-2009 Правила производства и контроля качества лекарственных средств – являются аналогом европейских Правил GMP ЕС на русском языке. Правила GMP – документ, вобравший в себя сорокалетний опыт работы по GMP.

Продукция микробного синтеза – квас, пиво, вино, спирт, молочная кислота, масляная кислота, кисломолочные продукты, антибиотики, витамины, гормоны, ферменты, аминокислоты.

Программное обеспечение – набор одной или более программ, или микропрограмм, записанных на носителе любого вида.

Продуценты – как правило бактерии или бациллы (но могут быть и клетки эукариот), производящие в условиях промышленного производства биомассу или продукцию микробного синтеза – метаболиты в виде аминокислот, ферментов, витаминов, гормонов, антибиотиков и другую продукцию.

Р

Репликация – репликация ДНК – процесс синтеза дочерней молекулы ДНК на матрице родительской ДНК. Репликация ДНК является ключевым событием в

ходе деления клетки, так как именно благодаря репликации происходит сохранение хромосомного набора и точная передача генетической информации из поколения в поколение.

Рестриктазы – ферменты, разрезающие ДНК, которые распознают определенные сайты, по которым вносят разрыв. Эндорестриктазы и экзорестриктазы отличаются друг от друга. В отличие от экзонуклеаз, эндонуклеазы рестрикции расщепляют нуклеиновые кислоты не с конца молекулы, а в середине. При этом каждый такой фермент узнаёт определённый участок ДНК (сайт) длиной от четырёх пар нуклеотидов (возможно вырождение) и расщепляет нуклеотидную цепь внутри участка узнавания или вне его.

Рибозимы – молекулы РНК, только выполняющие специальные функции. Они служат катализаторами при расщеплении и сшивании других молекул РНК. У рибозимов есть интересная особенность: максимум их активности приходится на низкие температуры. Это позволяло им обеспечивать сборку новых молекул РНК на самых ранних этапах возникновения жизни.

С

Санитарная обработка в микробиотехнологии – не означает снижения содержания микроорганизмов в оборудовании без обязательного достижения потери всеми микроорганизмами инфекционности или жизнеспособности. Сравнить с понятиями стерилизация и дезинфекция.

Секвенирование геномов микроорганизмов – определение нуклеотидной последовательности генома. В результате секвенирования получают формальное описание первичной структуры линейной макромолекулы в виде последовательности мономеров в текстовом виде.

Стерилизация – полное уничтожение микроорганизмов и их спор.

Стерилизация в микробиотехнологии – уничтожение живых микроорганизмов путем использования физических (например, обработка паром) или химических способов воздействия.

Т

Технология микробного синтеза – современное промышленное производ-

ство продукции микробного синтеза: белка одноклеточных, ферментных препаратов, антибиотиков, микробиологических средств защиты растений, бактериальных удобрений, витаминов, лимонной кислоты, микробного жира, а также перспективы промышленного производства полисахаридов и нуклеозидов.

Технология – совокупность процессов обработки или переработки материалов в определённой отрасли производства, а также научное описание способов производства. Технология – специальная информация, необходимая для разработки, производства или использования контролируемой продукции. Передача специальной информации может производиться в форме передачи технических данных или оказания технической помощи.

Токсины в микробиотехнологии – специально выделенные препараты или смеси независимо от способа получения; отличаются от токсинов, которые присутствуют в таких контаминированных микроорганизмами материалах, как патологические образцы, посевные материалы, продукты питания или семенные материалы

Трансгенные мыши – с 1980-х гг началось создание трансгенных мышей с целенаправленно модифицированным геномом. Такие мыши, лишённые какого-либо гена или же несущие дополнительный ген под тем же промотором, позволяют либо лучше понять функцию интересующего нас гена, либо картировать его активность.

Турбидостат (от лат. *turbid(us)* – мутный и греч. *stat(ikos)* – останавливающий) – это установка для непрерывного гомогенного культивирования клеток, когда плотность популяции бактерий поддерживается на определенном уровне. Стабильность скорости деления клеток обеспечивается системой автоматического регулирования, контролирующей оптическую плотность культуры.

Ф

Фазы развития микробов в популяции – *первая фаза* носит название «Лаг-фаза» – от момента посева до достижения максимальной скорости роста. В эту фазу происходит адаптация культуры к условиям питательной среды производства, начинается активный рост клеток, но активного размножения еще нет;

Продолжительность *первой фазы* зависит от многих факторов: если использован инокулят из культуры с резко отличающимися условиями выращивания,

клеткам требуется время на синтез новых рибосом, РНК и адаптивных ферментов. В этом периоде не только увеличивается размер клеток, но и в 8-12 раз повышается содержание РНК;

- *вторая фаза* развития популяции – фаза логарифмического роста культуры. В эту фазу происходит активное размножение микроорганизмов, пока не достигнет максимума для данных условий культивирования;

- *третья фаза* – стационарная фаза – наблюдается в период, когда число жизнеспособных клеток достигает максимума и не увеличивается, поскольку скорость размножения бактерий равна скорости их отмирания. Поскольку скорость роста определяется концентрацией субстрата, то скорость роста начинает снижаться ещё до его полного использования;

- *четвертая фаза* – фаза отмирания, в которую отмирающие клетки превалируют над размножающимися.

Ферментация – биохимическая переработка органических веществ (сырья или продукта) при помощи внесения ферментов (катализаторов) или под воздействием микроорганизмов, синтезирующих эти ферменты.

Ферментер (ферментатор) для культивирования микроорганизмов в производственных условиях – (биореактор) – аппарат, в котором осуществляется в стерильных условиях процесс микробиологического синтеза (перемешивание культуры с питательной средой и снабжение ее кислородом). Отличие между ферментёром и биореактором – это их размеры. У ферментёра соотношение высоты к диаметру 3 к 1 и больше. У биореактора – 1,5 или 2 к 1. Это сделано для оптимальных условий культивирования. Ферментеры снабжены блоками управления.

Блоки управления процессом способны одновременно контролировать и управлять двумя или более параметрами ферментационных систем (например, температурой, рН, питательными веществами, перемешиванием, растворенным кислородом, потоком воздуха, контролем пены).

Ферменты – биологические катализаторы, ускоряющие реакции в живых системах. Ферменты специфичны и каждый фермент ускоряет определенную реакцию (фермент подходит к реакции, «как ключ к замку»). Термины *фермент* и *энзим* давно используют как синонимы: первый в основном в русской и немецкой

научной литературе, второй – в англо- и франкоязычной. Наука о ферментах называется **энзимологией**, а не ферментологией (чтобы не смешивать корни слов латинского и греческого языков).

Х

Хемостат – аппарат, позволяющий в течение длительного времени поддерживать бактериальную культуру в постоянной по химическим параметрам среде, включает системы постоянной подачи питательных веществ, а также удаления отработанной среды. Установка состоит из:

1. Биореактора – емкости, в которую помещается питательная среда и исследуемая культура микроорганизмов.
2. Системы поддержания заданных условий: температуры, освещённости, химического состава.
3. Аналитической части, которая позволяет контролировать параметры жизнедеятельности: количество микроорганизмов, химический состав среды и др.
4. Вспомогательных устройств: мешалки для гомогенизации раствора, отборника проб.

Ш

Штамм – чистая культура бактерий, грибов и иных микроорганизмов, а также вирусов, выделенная из определённого источника и идентифицированная по тестам современной классификации.

Э

Энзимология – наука, изучающая ферменты и процессы, связанные с ними. Термин энзим происходит от греч. ζύμη, ἔνζυμον «закваска». В XIX в. Луи Пастер, изучая превращение углеводов в этиловый спирт под действием дрожжей, пришёл к выводу, что этот процесс (брожение) катализируется некой жизненной силой (*ферментом*), находящейся в дрожжевых клетках, причём он считал, что эти «силы» неотделимы от структуры живой клетки дрожжей («en zyme, в закваске»). Существует 7 типов ферментов – оксидоредуктазы, транслоказы, трансферазы, гидролазы, лиазы, лигазы, изомеразы. Классификация связана с катализируемыми реакциями.

GLP – (Good Laboratory Practic, Надлежащая лабораторная практика) – система норм, правил и указаний, направленных на обеспечение согласованности и достоверности результатов лабораторных исследований. Система является утверждённым национальным стандартом РФ с 1 марта 2010 года – ГОСТ 33044-2014.

GMP – (Good Manufacturing Practic, Надлежащая производственная практика). Стандарт GMP – система норм, правил и указаний в отношении производства лекарственных средств, медицинских устройств, изделий диагностического назначения, продуктов питания, пищевых добавок и активных ингредиентов. В отличие от процедуры контроля качества путём исследования выборочных образцов таких продуктов, которая обеспечивает пригодность к использованию лишь самих этих образцов (и, возможно, партий, изготовленных в ближайшее к данной партии время), стандарт GMP отражает целостный подход и регулирует, и оценивает собственно параметры производства и лабораторной проверки.

WHO – (World Health Organization) – Всемирная Организация Здравоохранения, является органом, направляющим и координирующим международную работу в области здравоохранения, основана в 1948 г.

Литвина Лидия Алексеевна

Микробиотехнология

Методические указания для практических занятий

Печатается в авторской редакции
Оператор электронной верстки Н.Е. Карачева

Подписано в печать _____ г.
Формат 60×84 1 /16. Объем ___ уч.-изд. л., 6,75 усл. печ. л.
Тираж ___ экз. Изд.№ ____. Заказ № __.

Отпечатано в Издательском центре «Золотой колос»
630039, РФ, г. Новосибирск, ул. Добролюбова, 160, офис 106
Тел. факс (383) 267-09-10. E-mail: 2134539@mail.ru