



Е. П. КАМЕНСКАЯ, В. П. ВИСТОВСКАЯ

# ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

Учебное пособие



АлтГТУ  
Барнаул • 2023

Министерство науки и высшего образования  
Российской Федерации

Алтайский государственный технический университет  
им. И. И. Ползунова

**Е. П. КАМЕНСКАЯ, В. П. ВИСТОВСКАЯ**

## **ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ**

Учебное пособие

*Рекомендовано*

*Алтайским государственным техническим университетом им. И.И. Ползунова в качестве  
учебного пособия для студентов, обучающихся по направлению подготовки  
19.03.02 «Продукты питания из растительного сырья» и 19.03.01 «Биотехнология»*

ISBN 978-5-7568-1439-2



АлтГТУ  
Барнаул • 2023

Об издании – [1](#), [2](#)

© Каменская Е. П., Вистовская В. П., 2023  
© Алтайский государственный технический  
университет им. И. И. Ползунова, 2023

УДК 60(075.8)

**Каменская, Е. П. Основы биотехнологии** : учебное пособие для студентов направления 19.03.02 «Продукты питания из растительного сырья» и 19.03.01 «Биотехнология» всех форм обучения / Е. П. Каменская, В. П. Вистовская ; Алт. гос. техн. ун-т им. И. И. Ползунова. – Барнаул : АлтГТУ, 2023. – 121 с. – URL : [http://elib.altstu.ru/uploads/open\\_mat/2023/Kamenskaya\\_OsnBioteh\\_up.pdf](http://elib.altstu.ru/uploads/open_mat/2023/Kamenskaya_OsnBioteh_up.pdf). – Текст : электронный.

ISBN 978-5-7568-1439-2

В учебном пособии представлены теоретические и практический разделы, позволяющие студентам направления 19.03.02 «Продукты питания из растительного сырья» и 19.03.01 «Биотехнология», закрепить теоретические знания и приобрести практические навыки по ряду разделов дисциплины «Основы биотехнологии».

В учебном пособии представлены теоретические материалы, включающие основные вопросы, определяющие направления развития биотехнологии, с характеристикой объектов и методов биотехнологических процессов, приводится характеристика сырьевой базы биотехнологических процессов, и в качестве примера рассматривается процесс получения белковых препаратов как одного из важных конечных продуктов биотехнологического производства. Практический раздел состоит из лабораторных работ, позволяющий студентам приобрести навыки работы с хлебопекарными и пивными дрожжами, освоить методики оценки их качества. Рассматриваются процессы брожения молочного сахара, а также биотехнологические способы получения амилолитических ферментов и уксусной кислоты с использованием различных микроорганизмов-продуцентов. Приводятся пояснения, иллюстрации и словарь биотехнологических терминов, облегчающие понимание изучаемого материала, а также вопросы для самоконтроля и список рекомендуемой литературы.

Рекомендовано Алтайским государственным техническим университетом им. И. И. Ползунова в качестве учебного пособия для студентов всех форм обучения, обучающихся по направлению подготовки 19.03.02 «Продукты питания из растительного сырья» и 19.03.01 «Биотехнология». Протокол № 4 от «16» декабря 2022 г.

Рецензенты:

*Ирина Дмитриевна Бородулина*, кандидат сельскохозяйственных наук, ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет»;

*Щетинина Елена Михайловна*, доктор технических наук, ФГБОУ ВО «Алтайский государственный аграрный университет»

Учебное пособие

Минимальные системные требования

Yandex (20.12.1) или Google Chrome (87.0.4280.141) и т. п.  
скорость подключения - не менее 5 Мб/с, Adobe Reader и т. п.

Дата подписания к использованию 3.03.2023. Объем издания – 4 Мб.

Федеральное государственное образовательное учреждение высшего образования «Алтайский государственный технический университет им. И. И. Ползунова, 656038, г. Барнаул, пр-т Ленина, 46, <https://www.altstu.ru>.

ISBN 978-5-7568-1439-2

[вперед \(оглавление\)](#)

© Каменская Е. П., Вистовская В. П., 2023  
© Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова, 2023

## Оглавление

Введение .....	4
Теоретический раздел (Вистовская В. П.) .....	5
1 Основные направления биотехнологий .....	5
Контрольные вопросы (задания) .....	11
2 Объекты биотехнологий .....	13
Контрольные вопросы (задания) .....	42
3 Методы биотехнологий .....	44
Контрольные вопросы (задания) .....	50
4 Сырьевая база биотехнологии .....	51
Контрольные вопросы (задания) .....	55
5 Биотехнологическое получение белковых препаратов .....	56
Контрольные вопросы (задания) .....	62
Практический раздел (Каменская Е. П.) .....	63
Правила техники безопасности при работе в лаборатории .....	63
Требования к оформлению отчетов по лабораторным работам .....	65
Лабораторная работа № 1 Изучение биотехнологических характеристик хлебопекарных и пивных дрожжей .....	66
Контрольные вопросы .....	72
Лабораторная работа № 2 Использование биологической активации дрожжей в хлебопечении .....	74
Контрольные вопросы .....	76
Лабораторная работа № 3 Изучение процесса брожения молочного сахара .....	77
Контрольные вопросы .....	83
Лабораторная работа № 4 Получение препарата амилаз из плесневых грибов и определение его активности .....	85
Контрольные вопросы .....	86
Лабораторная работа № 5 Получение препарата сахаразы из пекарских дрожжей .....	87
Контрольные вопросы .....	88
Лабораторная работа № 6 Получение пищевой уксусной кислоты .....	89
Контрольные вопросы .....	93
Лабораторная работа № 7 Оценка параметров роста микроорганизмов в условиях периодического и непрерывного культивирования .....	94
Контрольные вопросы .....	98
Лабораторная работа № 8 Графоаналитический метод расчета условий непрерывного культивирования .....	99
Контрольные вопросы .....	99
Заключение .....	101
Глоссарий (терминологический словарь) .....	102
Список использованной литературы .....	106
Приложение А .....	109
Приложение Б .....	110
Приложение В .....	111
Приложение Г .....	112
Приложение Д .....	113
Приложение Е .....	114
Приложение Ж .....	115
Приложение З .....	118
Приложение И .....	119
Приложение К .....	120

## Введение

Биотехнология как наука является важнейшим разделом современной биологии, которая, как и физика, стала в конце XX в. одним из ведущих приоритетов в мировой науке и экономике. Современные биотехнологические процессы основаны на методах рекомбинантных ДНК, а также на использовании иммобилизованных ферментов, клеток или клеточных оргanelл. Современная биотехнология – это наука о генно-инженерных и клеточных методах и технологиях создания и использования генетически трансформированных биологических объектов для интенсификации производства или получения новых видов продуктов различного назначения.

Биотехнологическая продукция успешно завоевывает рынок. При производстве данной продукции обеспечиваются оптимальные условия для синтеза целевого продукта клетками биообъекта, ведением производства в максимально-экономичном режиме. Для выполнения последнего условия следует соблюдать указанные ниже принципы:

- принцип экономической обоснованности, например, получение L-лизина из смеси D, L-лизина;
- принцип целесообразного уровня технологических разработок, например, для получения биогаза не нужны чистые культуры);
- принцип научной обоснованности;
- принцип удешевления производства, например, использование «даровой» энергии Солнца, природных водоемов и т. д.

В настоящее время приемы биотехнологии широко используются в пищевой промышленности (новые технологии для длительного хранения продуктов, производство пищевых приправ, создание более совершенных по вкусовым и питательным качествам молочных и мясных продуктов, сыров, крупномасштабное выращивание дрожжей, водорослей и бактерий для получения белков, аминокислот, органических кислот, витаминов, ферментов и др.). Биотехнология открыла новую страницу сельского хозяйства (клонирование и отбор растений с нужными признаками, получение биоинсектицидов, клубнеобразующих бактерий, выведение новых высокопродуктивных пород животных и пр.). Особую значимость биотехнология имеет для здравоохранения (методы точной диагностики, эффективного лечения и предупреждения старости), фармацевтической (создание нового поколения лекарств, в т. ч. вакцин, антибиотиков, гормонов, интерферонов, интерлейкинов и др.) и микробиологической (выведение высокоэффективных штаммов бактерий для производства пищевого и кормового белка, глюкозы, фруктозы и пр.) промышленности. Резко возрастает роль биотехнологии в уменьшении загрязнения окружающей среды (очистка сточных вод, переработка отходов и побочных продуктов сельского хозяйства и промышленности).

## Теоретический раздел

### 1 Основные направления биотехнологий

Биотехнологию в настоящее время можно определить как междисциплинарную область научно-технического прогресса, возникшую на стыке биологических, химических и технических знаний. Развитие данного направления науки столь стремительно, что бумажное учебное издание, вышедшее 5 лет назад, можно считать историей биотехнологии, с потерей актуальности и новизны по многим вопросам [1, 3, 15].

Использование термина «биотехнология» произошло в 1919 г., в книге венгерского министра продовольствия Карла Эреки<sup>1</sup>. Однако этот термин в те годы не получил широкого распространения и только в 1961 г. к нему вновь вернулись, использовав в переименовании журнала «Биотехнология и биоинженерия»<sup>2</sup>. С этого момента биотехнология оказалась четко и необратимо связана с исследованиями в области «промышленного производства товаров и услуг при участии живых организмов, биологических систем и процессов».

История биотехнологии начинается намного раньше, отнюдь не в XIX в. Предпосылками возникновения биотехнологии можно считать первое упоминание о сборе семян для посева, а также использование искусственного отбора одомашненных животных в Месопотамии ([Приложение А](#)), датирующиеся ранее 8000 лет до н. э. Чуть позже (7000 лет до н. э.) речь уже идет о пивоварении, брожении вина, выпечке дрожжевого хлеба, получении кисломолочных продуктов, в том числе йогурта и сыра. Развитие биотехнологии началось именно с пищевых продуктов, в том числе и напитков. Неспроста популярный автор фэнтези-романов, описывающий вымышленные миры, напоминающие Европу Позднего Средневековья, «обильно» использует вино как основной напиток знати и простого люда<sup>3</sup>.

Каждая века развития биотехнологии тесно связана с событиями, произошедшими в естественных науках: изобретением микроскопа, открытием микроорганизмов как представителей живого, принятием законов наследственности, открытием механизмов действия ферментов, витаминов, антибиотиков, расшифровкой структуры ДНК и т. д.

В настоящее время биотехнология является одним из крупнейших промышленных секторов с точки зрения рыночной стоимости, охватывая продвижения в пищевой и сельскохозяйственной промышленности, а также научные исследования и разработки в области медицины, генетических исследований и биоинженерии. В этой отрасли большие деньги тратятся на фармацевтические препараты, различные приборы и диагностические средства, разработки более устойчивых культур, биотоплива, биоматериалов, а также средств контроля загрязнения. Чистая годовая прибыль (% от выручки) крупных фармацевтических компаний, к которым можно смело отнести и биофармацевтические, с 2000 по 2018 гг. выросла почти на 80 %. И этот показатель не захватывает период пандемии, вызванной SARS-CoV-2, что ожидаемо увеличит его значение. Сравнивая долю чистой прибыли 35 крупных фармацевтических компаний за этот же период с показателем 357 нефармацевтических компаний, можно указать, что она составляет 20 % (1,9 млрд. долларов США против 9,4). Согласитесь, вес доли – весьма

---

<sup>1</sup> Эреки ввел слово "биотехнология" в Венгрии в 1919 году в книге, которую он опубликовал в Берлине под названием *Biotechnologie der Fleisch-, Fett- und Milcherzeugung im landwirtschaftlichen Grossbetriebe* (Биотехнология производства мяса, жира и молока на сельскохозяйственной крупной ферме), где он описал технологию, основанную на преобразовании сырья в более полезный продукт; первое упоминание слова «биотехнология» в статье этого же автора, опубликованной в 1917 г

<sup>2</sup> Микробиолог Карл Герен Хеден порекомендовал изменить название научного журнала "Journal of Microbiological and Biochemical Engineering and Technology" (Журнал микробиологической и химической инженерии и технологий), специализирующегося на публикации работ по прикладной микробиологии и промышленной ферментации, на "Biotechnology and Bioengineering" (Биотехнология и биоинженерия);

<sup>3</sup> *"Здесь было столько вина, что можно было не просыхать сотню лет: сладкие красные вина Простора и сухие красные из Дорна, янтарное вино Пентоса и зеленый нектар из Мира, три десятка бочек борского золотого и даже вина сказочного Востока — из Миэрина, Кварта, и Асияя, что у края Тени"* – Тирион Ланнистер (Дж. Мартин).

внушительный. Биофармацевтические компании, получая прибыль от продажи препаратов, инвестируют в исследования и разработки (НИОКР) (рис.1).



Рисунок 1 – Крупнейшие мировые биофармацевтические компании, ранжированные по продажам и расходам на НИОКР в 2021 г. (в млрд. долларах США)  
Источник: Pharmaceutical Executive [35]

Термин «биотехнология» образован из слов «биос», «техне», «логос» греческого происхождения (рис. 2).

Биотехнология имеет прикладной характер и сводится к использованию живых организмов (микроорганизмов, животных и растительных клеток) или же их ферментов для синтеза, разрушения или трансформации (превращения) различных материалов с целью получения полезных продуктов для различных нужд человека. Используемое определение термина «биотехнология» требует небольшого уточнения, а именно, в качестве объектов определены живые организмы, относящиеся к клеточным формам жизни, но мы не можем не сказать, что и неклеточные формы являются важными объектами данной отрасли науки, и имя им – вирусы.

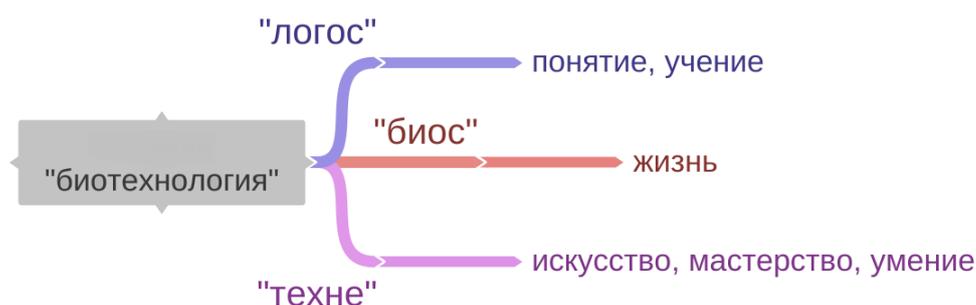


Рисунок 2 – Образование термина «биотехнология»

О становлении биотехнологии как науки написано достаточно много, и большинство авторов сходятся в одном – эмпирический период развития этого направления знаний глубоко корнями уходит в античные времена, и только в XIX в биотехнология приобретает статус науки, а в настоящее время, она имеет столько граней, что её можно сравнить с огранкой крупного алмаза, количество фасетов<sup>4</sup> которого только увеличивается. В современном научном

<sup>4</sup> Фасета – грань (площадка) в обработке алмазов

мире термин «биотехнология» сменяется на «биотехнологии», учитывая его многогранность [8].

Возвращаясь к началу возникновения биотехнологии, отметим, что во многих традиционных процессах, давно известных и применяемых человеком: пивоварении, хлебопечении, изготовлении вина, производстве сыра, приготовлении многих восточных пряных соусов, а также разнообразных способах утилизации отходов, использовались биологические объекты (пусть даже без достаточных знаний о них) и все эти процессы на протяжении многих лет совершенствовались, правда эмпирически. Начало эмпирического этапа биотехнологии теряется в глубине веков и продолжается примерно до конца XIX в.

Описывая становление и развитие биотехнологии как науки, обратимся к изысканиям голландского ученого Е. Хаувинка, разделившего историю биотехнологии на пять периодов, или эр (1984 г.):

- Допастеровская эра (до 1865 г.), характеризующаяся использованием спиртового и молочнокислого брожения при получении пива, вина, хлебопекарных и пивных дрожжей, сыра, а также получением ферментированных продуктов и уксуса.

В этот период в 1814 г. академиком К.С.Кирхгофом<sup>5</sup> было открыто явление биологического катализа, с помощью которого он пытался получить сахар из доступного отечественного сырья (до середины XIX в. сахар получали только из сахарного тростника); Л. Пастер установил, что микроорганизмы играют ключевую роль в процессах брожения, и показал, в образовании отдельных продуктов участвуют разные их виды, которые отличаются не только морфологически, но и особенностями обмена веществ. В 1857 г. было доказано, что спиртовое брожение происходит только в присутствии живых дрожжей. Таким образом, Л. Пастер заложил основы сознательного управления технологическими процессами, в которых микроорганизмы играют ведущую роль.

- Послепастеровская эра (1866 - 1940) – производство этанола, бутанола, ацетона, глицерола, органических кислот, вакцин и кормовых дрожжей из углеводов; аэробная очистка канализационных вод.

В 1891 г. в США японский биохимик Дз.Такаmine<sup>6</sup> получил первый патент на использование ферментных препаратов в промышленных целях, т. е. предложил применить диастазу для осахаривания растительных отходов. Бродильная и микробиологическая промышленность стала активно развиваться в начале XX в. В 1916-1917 гг. русский биохимик А.М. Коленев пытался разработать способ, который позволил бы управлять действием ферментов в природном сырье при производстве табака. Неоценимый вклад в дело использования достижений биохимии внес академик А.Н. Бах, создавший важное прикладное направление биохимии – техническую биохимию. Вместе со своими учениками он разработал множество рекомендаций по улучшению технологий обработки самого различного биохимического сырья, совершенствованию технологий хлебопечения, пивоварения, виноделия, производства чая и табака и т. д.

В производственном отношении основой биотехнологии в процессе ее формирования стала микробиологическая промышленность, которая приобрела принципиально новые черты: микроорганизмы стали использовать для синтеза ценнейших и сложнейших химических соединений. Перелом был связан с открытием и началом производства антибиотиков, первым

---

<sup>5</sup> Константин Сигизмундович Кирхгоф или Готтлиб Константин Сигизмунд Кирхгоф – русский химик немецкого происхождения. Исследовал осахаривание крахмала под влиянием солода; открыл фермент, содержащийся в вытяжке из проросших семян ячменя и осуществляющий осахаривание крахмала

<sup>6</sup> Такаmine Дзёкичи эмигрировал в США после 1884 г и основал свою собственную исследовательскую лабораторию в Нью-Йорке, но передал эксклюзивные права на производство *Takadiastase* (диастазы) одной из крупнейших фармацевтических компаний США, Parke-Дэвис (дочерняя компания фармацевтической компании Pfizer). Он стал миллионером за относительно короткое время и к началу 20 века его состояние оценивалось в 30 миллионов долларов ([https://wiki5.ru/wiki/Takamine\\_Jōkichi](https://wiki5.ru/wiki/Takamine_Jōkichi)).

среди которых в 1940 г. был выделен пенициллин, а вслед за ним и другие антибиотики. С открытием антибиотиков началось налаживание производства и других лекарственных веществ, продуцируемых микроорганизмами в количествах, необходимых здравоохранению.

История антибиотиков началась в 1928 г. А. Флеминг обнаружил, что все бактерии вокруг продуктов плесени *Penicillium notatum* на чашке Петри погибают. В 1940 г. английские исследователи Х. Флори и Э. Чейн выделили из культуры этого плесневого гриба антибиотик пенициллин. В нашей стране пенициллин создала в 1942 г. группа ученых под руководством З. В. Ермольевой<sup>7</sup>. Большой вклад в биотехнологические разработки внесли советские исследователи В. Н. Шапошников, В. С. Буткевич, С. П. Костычев и др. Открытие А. Флемингом, Х. Флори и Э. Чейном химиотерапевтической активности пенициллина стало важным этапом в развитии биотехнологии хозяйственно ценных веществ и дало начало эре антибиотиков. Началась интенсивная работа по поиску активных продуцентов антибиотиков, получению мутантов с измененным наследственным материалом, обладающих способностью к сверхсинтезу, а также разработка методов культивирования грибов, создания технологических схем крупномасштабного производства.

- Эра антибиотиков (1941-1960) – производство пенициллина и других антибиотиков путем глубокой ферментации, культивирование растительных клеток и получение вирусных вакцин, микробиологическая трансформация стероидов.

Кроме того, существенную роль в эти годы сыграло использование клеток животных и растений. Например, культуры клеток человека при выращивании ряда вирусов для производства вакцин; при производстве высокоспецифических белков (антител и интерферонов); в исследованиях рака и в противовирусной химиотерапии. В 1943 г. С. Э. Лурия и М. Дельбрук определили наличие мутаций среди бактерий. Этот год является годом становления генетики бактерий, а впоследствии – развития генной инженерии. В этот период в СССР активно работают научные школы академиков Н. П. Дубинина, С. И. Алиханяна, И. А. Раппопорта и др., исследующие вопросы генетики популяций, эволюционной, радиационной генетики, генетические основы селекции, различные аспекты химического мутагенеза.

В 1953 г. Сенгер установил полную структуру белка инсулина, а Дж. Уотсон и Ф. Крик описали структуру молекулы ДНК как двойную спираль, был расшифрован механизм действия генетического аппарата. В 1957 г. А. Айсакс и И. Линдеман открыли интерферон. Широко используется культура растительной ткани: получение культуры из отдельных растительных клеток, обработка каллуса<sup>8</sup> растительными гормонами. В 1958 г. молекула ДНК была впервые синтезирована в лаборатории. Эти открытия заложили фундамент молекулярной биологии и генной инженерии.

- Эра управляемого биосинтеза (1961-1975) – производство аминокислот с помощью микробных мутантов, получение чистых ферментов, промышленное использование иммобилизованных ферментов и клеток, производство бактериальных полисахаридов; анаэробная очистка канализационных вод и получение биогаза.

Аминокислоты – не только питательные вещества, но также ароматические и вкусовые агенты, и потому они широко используются в пищевой промышленности. Например, как питательную добавку в пищу чаще всего вносят лизин и метионин. Глутамат натрия и глицин употребляют как ароматические вещества для усиления и улучшения вкуса пищи. У глицина освежающий, сладкий вкус. Его вводят в сладкие напитки, и, кроме того, он проявляет там бактериостатическое действие. Цистеин предотвращает подгорание пищи, улучшает пекарские процессы и качество хлеба.

---

<sup>7</sup> Зинаида Виссарионовна Ермольева в 1942 году впервые в СССР получила пенициллин (крустозин ВИЭМ) и активно участвовала в организации его промышленного производства в СССР. Это спасло сотни тысяч жизней советских солдат во время Великой Отечественной войны

<sup>8</sup> В биотехнологии каллусом (каллиусом) называют дедифференцированные (потерявшие специализацию) клетки, являющиеся тотипотентными и способными поэтому дать начало целому растению. В биологии растений каллусом называют также клетки, образующиеся на раневой поверхности растения в виде опробковеваящей ткани, которая возникает в результате деления пограничных с раной клеток.

Производство микробного белка позволяет выпускать полноценные сбалансированные корма для выращивания птицы и скота. При этом микроорганизмы можно выращивать на различных питательных средах: на нефти, на отходах угольной, химической, пищевой, вино-водочной, деревообрабатывающей промышленности.

В 1963 г. американский биохимик М. Ниренберг расшифровал генетический код, который оказался универсальным как для бактерий, так и для высших организмов. В 1970 г. открыты ферменты рестриктазы и лигазы, позволяющие разрезать и сшивать молекулу ДНК в нужных местах. В 1975 г. были синтезированы первые моноклональные антитела (Ц. Мильштейн).

- Эра новой биотехнологии (после 1975 г.) – использование генной и клеточной инженерии в целях получения агентов биосинтеза, получение гибридов, моноклональных антител, трансплантация эмбрионов ([Приложение Б](#)).

В 1980 г. была вручена Нобелевская премия за синтез первой рекомбинантной молекулы ДНК. В 1983 г. – было получено первое генно-модифицированное растение – табак, а в 1987 г. разрешены полевые испытания генно-модифицированных растений (ГМ) (томаты и картофель). В 1984 г. была разработана технология применения анализа ДНК для идентификации человека, а с 1985 г. она стала использоваться в работе правоохранительных органов. В 1986 г. создана первая рекомбинантная вакцина для человека – вакцина против гепатита В. В 1988 г. был разработан метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). Работы с рекомбинантными молекулами ДНК позволили создать бактериальные штаммы-продуценты всех типов интерферонов, продуценты гормона роста человека и ряда животных, проинсулина человека и т. д. Не менее важное направление, сформировавшееся в эти годы, – получение гибридов, моноклональных антител, гибридов из протопластов и меристемных культур, трансплантация эмбрионов. Интенсивно развивается направление иммобилизации ферментов и клеток на специальных носителях, что обеспечивает их многократное использование. В 1997 г. в Шотландии клонировано первое млекопитающее – овечка Долли. В 2000 г. расшифрован первый полный геном растения *Arabidopsis thaliana*<sup>9</sup>. С 2000 г. увеличилось число работ по секвенированию геномов различных растений, животных, а также человека. В 2005 г. площадь, занятая ГМ-культурами, уже составляла 400 млн га. В 2009 г. ученые из Массачусетского института разработали микросенсоры, состоящие из углеродных нанотрубок, для защиты ДНК в клетках организмов людей, больных раком. Немецкие ученые продемонстрировали производственный процесс синтеза человеческой кожи.

В настоящее время с помощью микробиологического синтеза производят антибиотики, ферменты, аминокислоты, полупродукты для дальнейшего синтеза разнообразных веществ, феромоны, органические кислоты, кормовые белки и др. Можно сказать, что биотехнология изучает методы получения полезных для человека веществ и продуктов в управляемых условиях, используя микроорганизмы, клетки животных и растений или изолированные из клеток биологические структуры. Таким образом, биотехнология – понятие более широкое, чем микробный синтез, поскольку используются не только микроорганизмы, но и клеточные структуры растительных и животных тканей, протопласты, клеточные ферменты и любые биологические системы, способные к биосинтезу или конверсии. Продукция, получаемая сегодня в мире с помощью промышленных биотехнологий, используется практически во всех отраслях экономики. В энергетике это жидкие и твердые биотоплива – бутанол, этанол, биодизель, биогаз, в медицине – сырье для фармацевтической промышленности, биофармацевтические технологии и препараты, в сельском хозяйстве – кормовой белок, аминокислоты, средства защиты растений и животных, в пищевой промышленности – пищевые ферменты, сахарозаменители, компоненты для перерабатывающей промышленности. Фактически биотехнологии решают глобальную геополитическую задачу – проблему перехода от использования невозобновляемых ресурсов к возобновляемому сырью [18, 26, 40].

---

<sup>9</sup> *Arabidopsis thaliana*, кресс-салат, или арабидопсис, представляет собой небольшое цветущее растение, произрастающее в Евразии и Африке.

Основой развития современных биотехнологий являются достижения в области фундаментальных наук о жизни, в первую очередь физико-химической биологии, а также разработки новых методических подходов и исследовательских платформ. Только за последние несколько лет возникли такие научные направления, как системная и синтетическая биология, бурно развиваются высокопроизводительные методы исследований генома, транскриптома, протеома, микробиома и т. д.

Биотехнология как наука на современном этапе является синтезом разделов биохимии в соединении с геной инженерией. И в качестве пример можно привести опыт компании *Perfect Day*, разрабатывающая «настоящее» молоко, для производства которого не нужно ни единой коровы, используя технологию ферментации. Основатели стартапа предложили получать белки молока не из животных, а из дрожжей. Благодаря такой технологии мы, возможно, будем производить молоко у себя дома, или заказывать свежую порцию напитка в молоковарне из ближайшего супермаркета, настраивая параметры продукта и оформляя заказ в мобильном приложении [19, 20, 39].

Дело в том, что почти любая технология пищевых продуктов основана на биохимических процессах, поэтому изучение процесса обмена веществ в живой клетке – актуальный вопрос для развития биотехнологии. Это имеет большое значение не только для животноводства и растениеводства или переработки промышленным способом сельскохозяйственного сырья, но и для медицины, а также экологии. Современная пищевая биотехнология озабочена не только производством пищевых продуктов, но и потреблением этих продуктов с учетом персонализированных требований. Сейчас взоры исследователей обращены к человеку как объекту, содержащему в себе микробиоту, влияющую на поведение, характер, пищевые предпочтения и даже развитие заболеваний.

Быстрыми темпами развиваются такие отрасли, как современные биологические методы защиты культурных растений, биоэнергетика и биodeградируемые полимеры, а также природоохранные биотехнологии. Ведутся научные работы по созданию новых биополимеров, в будущем они могут заменить ныне популярные пластмассы. Биополимеры имеют большое преимущество в сравнении с пластмассами, так как они нетоксичны и могут разлагаться после их применения, не загрязняя при этом окружающее пространство.

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

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

Биотехнологии и геновая инженерия, более чем все остальные, связана с фундаментальными научными исследованиями. Создание организмов с «заданными параметрами», лечение генетически обусловленных болезней, производство белковой массы вне организма, внедрение в организм «биологических чипов», влияющих на жизнедеятельность – все эти направления нуждаются в дорогостоящих исследованиях, сложном оборудовании и высококвалифицированных специалистах.

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

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

Классифицировать биотехнологии можно и по определенным критериям: текущему состоянию, потенциалу развития, социально-экономическому эффекту на следующие виды ([Приложение В](#)):

Биофармацевтика – ЖНВЛП<sup>10</sup>, вакцины нового поколения, антибиотики и бактериофаги.

Биомедицина – диагностикумы *in vitro*<sup>11</sup>, персонализированная медицина, клеточные биомедицинские технологии, биосовместимые материалы, системная медицина и биоинформатика, банки биообразцов, исследования на животных.

Промышленная биотехнология – производство ферментов, аминокислот, глюкозно-фруктовых сиропов, полисахаридов, субстанций антибиотиков, биodeградируемые полимеры, комплексы по переработке древесной биомассы и др.

Биоэнергетика – производство электрической энергии и тепла из биомассы; поглощение (утилизация) эмиссии парниковых газов, образуемых в энергетических производственных циклах, промышленных и коммунальных стоков для интенсификации производства непищевой биомассы; предотвращение и ликвидация последствий вредного антропогенного воздействия на окружающую среду энергетической отраслью методами био конверсии; биоэнергетическое машиностроение; производство биотоплива и его компонентов из биомассы с заданными химмотологическими<sup>12</sup> свойствами; промышленное производство непищевой биомассы для получения топливно-энергетических ресурсов, включая технологии селекции и методы биоинженерии и пр.

Сельскохозяйственная – биологическая защита растений; сорта растений, созданные с использованием методов биотехнологии; технологии молекулярной селекции животных и птицы; трансгенные и клонированные животные; биотехнология почв и биоудобрения; био-препараты для животноводства; кормовой белок и др.

Пищевая биотехнология – пищевой белок; ферментные препараты; пребиотики, пробиотики, синбиотики; функциональные пищевые продукты, включая лечебные, профилактические и детские; пищевые ингредиенты, включая витамины и функциональные смеси и т. д. [7, 14].

Лесная биотехнология – применение биотехнологий для управления лесонасаждениями, для сохранения и воспроизводства лесных генетических ресурсов; создание биотехнологических форм деревьев с заданными признаками; биологические средства защиты леса и др.

Природоохранная (экологическая) биотехнология – биоремедиация<sup>13</sup>; экологически чистое жилье; биологические коллекции и биоресурсные центры.

Морская биотехнология – создание сети аквабиоцентров; глубокая переработка промысловых гидробионтов и продукции аквакультур; специализированные корма для аквакультур.

### Контрольные вопросы (задания)

1. Заполните таблицу ([Приложение Г](#)). При заполнении дат и событий в хронологическом порядке используйте материалы лекций, приложения и другие достоверные источники;
2. Дайте определение термина «биотехнология»;
3. Какие события допастеровской эры способствовали развитию биотехнологии как науки?
4. Охарактеризуйте события эры антибиотиков;
5. Подумайте, какие пищевые продукты первыми возникли в эмпирический период становления биотехнологии, ответ обоснуйте;
6. Как Вы относитесь к ГМ продуктам, ответ обоснуйте?

<sup>10</sup> ЖНВЛП – жизненно необходимые и важнейшие лекарственные препараты;

<sup>11</sup> *in vitro* – термин и методика выполнения экспериментов, проводимых «в пробирке» – в искусственных условиях, вне организма или естественной среды; в противовес *in vitro*, *in vivo* – эксперимент на живом организме;

<sup>12</sup> Химмотология (от химии, мотор и логия) – это прикладная наука об эксплуатационных свойствах, качестве и рациональном применении в технике топлив, масел, смазок и специальных жидкостей;

<sup>13</sup> Биоремедиация – комплекс методов очистки вод, грунтов и атмосферы с использованием метаболического потенциала биологических объектов – растений, грибов, насекомых, червей и других организмов.

7. Какие события можно отнести к послепастеровской эре?
8. Назовите основные направления современной биотехнологии, какие задачи выполняет каждое из направлений;
9. Какие научные открытия принадлежат микробиологу З.В. Ермольевой кроме производства и применения пенициллина (крустозин ВИЭМ)?
10. Перечислите объекты биотехнологий;
11. Заполните таблицу, охватывающую распределение основных продуктов биотехнологии по отраслям промышленности ([Приложение Е](#)).

## 2 Объекты биотехнологий

Главным звеном биотехнологического процесса, определяющим всю его сущность, является биологический объект, способный осуществлять определенную модификацию исходного сырья и образовывать тот или иной необходимый продукт. В качестве таких объектов биотехнологии могут выступать микроорганизмы, животные и растения, грибы (микро- и макромицеты), протозойные организмы, а также клетки и ткани растений и животных, трансгенные животные и растения, протопласты, рекомбинантные ДНК, а также многокомпонентные ферментные системы клеток и отдельные ферменты. Как уже отмечалось, к объектам биотехнологий относятся и вирусы, являясь представителями неклеточных форм, их можно отнести к микроорганизмам. Список объектов биотехнологии достаточно велик, охватить же всех живых представителей, используемых человеком в биотехнологии, задача не из легких, но мы попытаемся их обобщить и выделить из них наиболее важных [13].

Живых организмов на планете Земля по данным на 2011 г насчитывалось более 1,2 млн. видов. Исследователи данное число не смогут ни опровергнуть, ни гарантированно подтвердить, поскольку число видов живых организмов меняется так быстро, что уследить за его динамикой достаточно тяжело, и причин для этого несколько: первая – число 1,2 млн ограничено нашими знаниями, т. е. это только число описанных человеком, но реально на суше и в воде существует намного больше (по предварительным подсчетам это число колеблется от 3 до 100 млн. видов), вторая – часть видов вымирает, и эту статистику мы можем вести только в пределах уже определенных и изученных видов, не говоря о видах, так и не открытых человечеством. Строго говоря, и структурное наполнение этого числа (1,2 млн видов) весьма

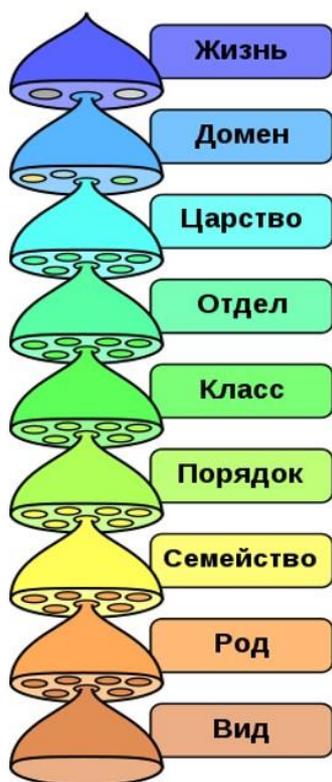


Рисунок 3 – Иерархия биологической систематики восьми основных таксономических рангов

субъективно, так как человечество начинало путь изучения живых организмов весьма избирательно, отталкиваясь от своих интересов. На данном историческом этапе мы многое знаем о животных (не исключая представителей рода *Homo*), растениях, немного о грибах, чуть-чуть о бактериях, и еще меньше о вирусах. Несмотря на 250 лет таксономической классификации и более 1,2 млн. видов, уже занесенных в каталог центральной базы данных, результаты показывают, что около 86 % существующих видов на Земле и 91 % видов в океане все еще ждут описания [28, 42].

В задачи биотехнологов входит все-таки не подсчет живых клеточных и неклеточных организмов, а использование уже известных человечеству, и в биотехнологические объекты входит относительно ограниченное число видов. Лишь перспектива обнаружения новых видов и изучение их свойств привносит оптимизм и необъятные возможности для представителей вида *Homo sapiens*. Но даже такой небогатый арсенал биологических объектов требует систематического подхода, поскольку биотехнологи используют такие разные по происхождению и устройству живые организмы из имеющегося обширного списка [43, 44].

### *Классификация живых организмов.*

Когда речь заходит о биологической систематике, многие представляют ее как каталогизацию организмов по семействам, отрядам и т. п.

*Систематика* (греч. *systematicos* – упорядоченный) – распределение организмов в соответствии с их происхождением и биологическим сходством.

Систематика живых организмов построена по иерархическому принципу. Различные уровни иерархии (ранги) имеют собственные названия (от высших к низшим).

Систематика включает три раздела: классификацию, таксономию и идентификацию организмов (рис. 3).

Для биотехнологов интересным представляется упорядочивание более крупных групп, т. е. макросистематика.

**Классификация** (лат. *classis* – группа) – распределение (объединение) организмов в соответствии с их сходными генотипическими и фенотипическими признаками по различным классификационным единицам – таксонам [32, 33, 34].

По классификации 2015 г Ruggiero (Майкл А. Руджеро) выделяют 2 домена<sup>14</sup>: Прокариоты и Эукариоты. Мы с вами условимся, что домен «Прокариоты» в зависимости от особенностей строения микроорганизмов (а они составляют большую часть домена «Прокариоты») разделены на неклеточные (доклеточные) формы и клеточные формы. Неклеточные формы объединены в отдельное царство – *Vira* и включают собственно вирусы, вириды<sup>15</sup> и прионы<sup>16</sup>.

Клеточные формы включают царства (домены) (согласно Карлу Вёзе и систематике 90-х годов):

«*Bacteria*» – прокариоты (истинные бактерии или эубактерии);

«*Archaea*» – предковые прокариоты (старое название архебактерии);

«*Eukarya*» – эукариоты (животные, растения, хромисты, грибы и простейшие) (рис. 4).

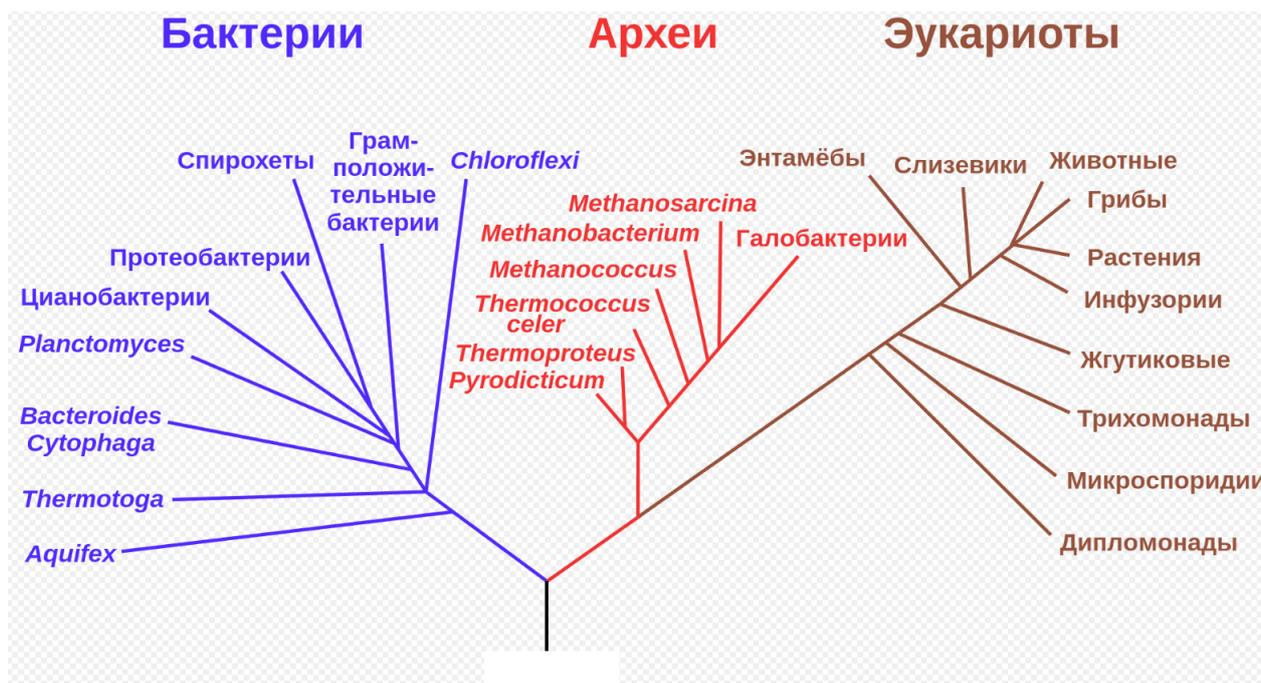


Рисунок 4 – Филогенетическое древо

**Таксономия** (от греч. *taxis* – расположение по порядку и *nomos* – закон) – принципы распределения классификации организмов в соответствии с их иерархией. В основу таксо-

<sup>14</sup> Карл Вёзе в 1977 г предложил трехдоменную классификацию, включающую домены: бактерии, археи и эукариоты

<sup>15</sup> Вириды в сравнении с вирусами не имеют белковой оболочки и представлены «голой» одноцепочечной кольцевой РНК

<sup>16</sup> Прионы относят к царству *Vira* в т.ч. из-за отсутствия клеточной структуры, но отличает их от вирусов и виридов отсутствие НК, т.о. прионы – безнуклеиновые белковые инфекционные структуры

мии организмов положены их морфологические, физиологические, биохимические и молекулярно-биологические свойства. *Таксон* – группа организмов, объединенных по определенным свойствам в рамках той или иной таксономической категории [29, 30, 31].

*Идентификация* (лат. *identifico* – отождествление) – установление принадлежности изучаемого организма к тому или иному таксону.

К началу XX века систематика казалась полностью завершенной. Однако оказалось не все так просто и однозначно. Систематику пришлось не достраивать, а перестраивать. И на уровне самых крупных групп – царств и отделов, и на уровне групп более мелких. Для революционных изменений были две причины. Во-первых, появилась возможность изучать достаточно тонкие детали строения клеток. Это изучение показало, что клетки разных живых организмов вовсе не так одинаковы, как казалось раньше. Особенности строения клеток стали рассматриваться как важный признак, характеризующий большие группы живых организмов. Во-вторых, молекулярные биологи научились определять последовательность аминокислот в белках и последовательность нуклеотидов в нуклеиновых кислотах, и это умение стали использовать в систематике. Систематика в настоящее время очень динамичная область науки, изменяющая наши представления о происхождении и родстве живых организмов<sup>17</sup>.

Согласно определению термина «систематика», указывающего на происхождение и биологическое сходство организмов, необходимо отметить, что все организмы, населяющие сегодня Землю, произошли от общего предка (не путать с первым живым организмом на планете Земля) (*last universal common ancestor, LUCA*), который жил примерно 4 млрд. лет назад. То, что он на самом деле существовал, Чарльз Дарвин предположил еще в 1859 году. Сложно представить, что может быть общего у таких, казалось бы, совершенно разных существ – эукариотических (ядерных) и прокариотических (доядерных); сложно организованных, как человек, и простых, как микоплазма.

Группа ученых из Германии, сравнивая между собой бактерий и архей (археобактерии), точнее, последовательности их генов, выяснили, что только 355 генов из проанализированных шести миллионов оказались гомологичными. Гомологичные гены имеют сходную последовательность нуклеотидов, общее происхождение и контролируют один и тот же признак. А раз так, значит, высока вероятность того, что именно они и передались потомкам от их общего предка – LUCA.

Выяснилось, что эти гены (355) отвечают за жизнь в экстремальных условиях. Было показано, что LUCA был анаэробом, термофилом и CO<sub>2</sub>-фиксирующим водородзависимым автотрофом. Иными словами, ему приходилось выживать в бескислородных условиях при температуре выше 42 °C (вернее около 400 °C), а энергию для построения тела он черпал из неорганических веществ окружающей среды.

Все ученые мира сходятся во мнении, что одной из главных задач естественных наук является проблема возникновения живой клетки. Именно с этой единицы живого все началось. На сегодняшний день человечество знает о строении и функционировании клетки, способах управления, взаимодействия с другими клетками, и даже теоретически предсказано как клетка могла «собраться», но экспериментально подтвержденных данных пока нет. Хотя мы научились удалять генетический аппарат из клетки и внедрять новый, приближаясь к истокам творения, нам предстоит узнать еще очень и очень много.

Биотехнологические процессы основываются на функционировании клетки и изолированных из них биологических структур, чаще всего ферментов. Именно поэтому необходимо знать общие закономерности жизнедеятельности клетки, чтобы управлять ростом и метаболизмом биологических агентов и получать целевой продукт с максимальным выходом при высокой интенсивности процесса. Таким образом, биотехнология начинается с познания живой клетки и законов управления процессами жизнедеятельности.

---

<sup>17</sup> Нет границ в свободном поиске. Наука – не место для догм. Учёный имеет право и обязан задавать любые вопросы, ставить под сомнение любые утверждения, искать любые доказательства, исправлять любые ошибки. Роберт Оппенгеймер. *Открытый разум* (*The open mind*. Simon and Schuster, 1955)

На рис. 5 для сравнения приведены размеры биологических объектов, представляющих некоторые виды, а также размеры их клеток, внутриклеточных частиц и молекул, находящихся в клетках.

Несмотря на такое разнообразие, клетки во многом схожи между собой по своей структуре и функциям. Поэтому можно рассматривать клетки, выдвигая на передний план черты, общие для всех видов клеток (но, конечно, специфические отличия всегда существуют).

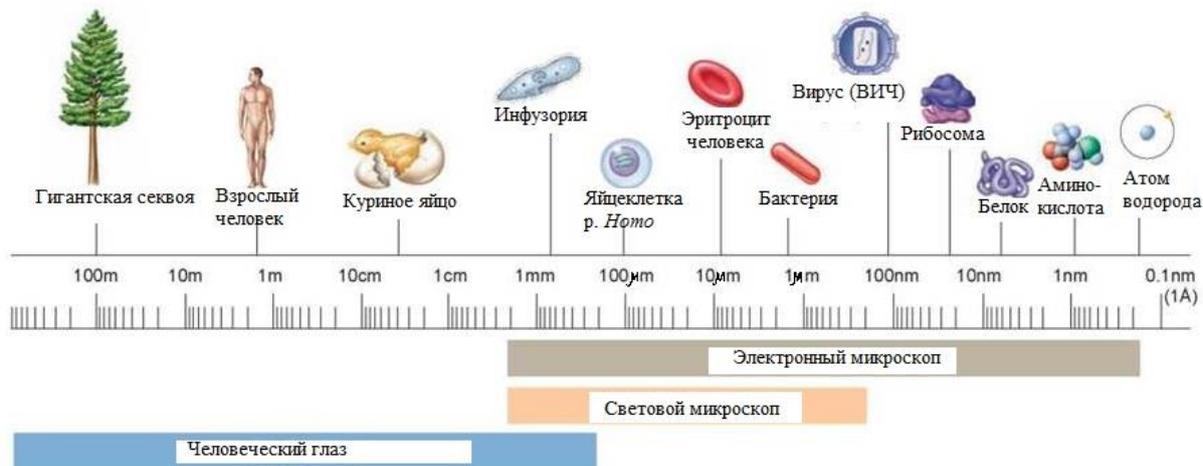


Рисунок 5 – Сравнительные размеры биологических объектов, клеток и их составляющих

По современным научным представлениям существование клетки и её функция определяется тем, что она состоит из определённого набора молекул, которые функционируют согласно законам физики и химии. Тем не менее клетку рассматривают как основную биологическую единицу, «единицу жизни», так как только начиная с клеточного уровня проявляются все характерные признаки живого организма. Живая клетка – это не какая-то однородная смесь, напротив, это высокоорганизованное образование, состоящее из отдельных, отчетливо различающихся частей, каждая из которых выполняет определенную функцию в процессе жизнедеятельности. Другими словами, клетка подобна механизму, функционирование которого обеспечивается согласованной совместной работой отдельных частей.

*Классификация клеток и их субклеточные структуры.* Существует много разных классификаций живых клеток. Традиционно различают животные, растительные и бактериальные клетки. В многоклеточных организмах клетки различаются по их функциональной специализации. К структурным элементам, общим для животной и растительной клеток, относятся мембраны, ядро, митохондрии, рибосомы, лизосомы, аппарат Гольджи, вакуоли и эндоплазматический ретикулум. Кроме того, в соответствии с современными представлениями можно выделить следующие структурные компоненты клетки:

- 1) мембранная система;
- 2) цитоплазматический матрикс (клеточный матрикс);
- 3) клеточные органеллы;
- 4) клеточные включения.

Мембранная система представлена клеточной цитоплазматической мембраной, эндоплазматическим ретикулумом (сетью) и аппаратом Гольджи.

*Общие принципы структурно-функциональной организации клетки.* Компоненты клетки. Каждая клетка состоит из двух основных компонентов – ядра (для эукариот: животных, растений, дрожжей) или нуклеоида (для прокариот: бактерий и архей) и цитоплазмы. В ядре эукариот находятся хромосомы, содержащие генетическую информацию, которая в результате процесса транскрипции постоянно избирательно считывается и направляется в цитоплазму, где она контролирует ход многообразных процессов жизнедеятельности клетки, в частности, сбалансированные процессы синтеза, анаболизма, и разрушения, катаболизма.

(У прокариот процессы транскрипции и трансляции не разграничены (из-за отсутствия ядра) территориально, и происходят в цитоплазме.) Указанные процессы осуществляются в цитоплазме благодаря взаимодействию ее компонентов.

*Компоненты цитоплазмы.* Цитоплазма отделена от внешней (для данной клетки) среды *внешней клеточной мембраной (цитоплазматической мембраной, плазмолеммой, цитолеммой)* и содержит *органеллы и включения*, погруженные в *гиалоплазму (клеточный матрикс)* (рис. 6).

*Органеллы* – постоянно присутствующие в цитоплазме структуры, специализированные на выполнении определенных функций в клетке. Они подразделяются на *органеллы общего значения* и *специальные органеллы*:

- *органеллы общего значения* имеются во всех клетках и необходимы для обеспечения их жизнедеятельности. К ним относятся митохондрии, рибосомы, эндоплазматическая сеть (ЭПС), комплекс Гольджи, лизосомы, пероксисомы, клеточный центр, компоненты цитоскелета;
- *специальные органеллы* имеются лишь в некоторых клетках и обеспечивают выполнение их специализированных функций. К ним относят реснички, жгутики, микроворсинки, миофибриллы. Специальные органеллы образуются в ходе развития клетки как производные органелл общего значения.

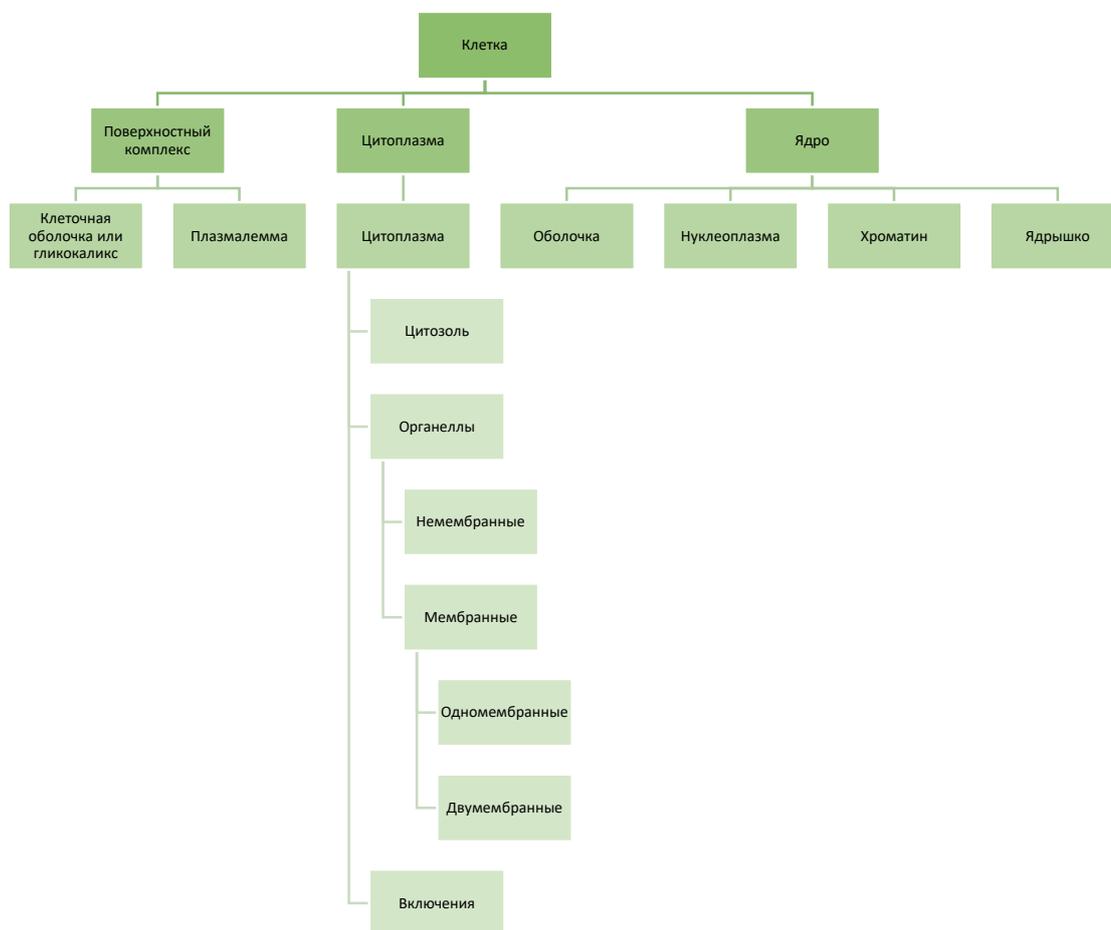


Рисунок 6 – Структурные компоненты клетки

В состав многих органелл входит цитоплазматическая *мембрана*, поэтому органеллы подразделяют также на *мембранные* и *немембранные*. К мембранным органеллам относятся митохондрии, ЭПС, комплекс Гольджи, лизосомы, пероксисомы, к немембранным – рибосомы, клеточный центр, реснички, микроворсинки, жгутики, компоненты цитоскелета.

*Включения* – временные компоненты цитоплазмы, образованные в результате накопления продуктов метаболизма клеток.

*Мембранные структуры (компоненты) клетки* – совокупное название различных структур цитоплазмы и ядра. Клеточные мембраны в различных мембранных структурах клетки организованы сходным образом, однако существенно различаются, в первую очередь, составом мембранных белков, определяющих специфику их функций.

*Гиалоплазма (клеточный сок, цитозоль, клеточный матрикс)* – внутренняя среда клетки, на которую приходится до 55 % ее общего объема. Она представляет собой сложную прозрачную коллоидную систему, в которой взвешены органеллы и включения, и содержатся различные биополимеры: белки, полисахариды, нуклеиновые кислоты, а также ионы.

*Строение и функциональное значение плазмолеммы. Структура плазмолеммы.* Мембраны (плазмолеммы) прокариот и эукариот и все внутриклеточные мембраны эукариот принципиально устроены одинаково. Плазмолемма – самая толстая из мембран (7,5-11 нм); под электронным микроскопом она, как и другие клеточные мембраны, имеет вид *трехслойной структуры*, представленной двумя электронно-плотными слоями, которые разделены светлым слоем. Ее молекулярное строение описывается *жидкостно-мозаичной моделью*, согласно которой она состоит из *липидного (фосфолипидного) бислоя*, в который погружены и с которым связаны молекулы белков.

*Липидный бислой* представлен преимущественно молекулами *фосфатидилхолина (лецитина)* и *фосфатидилэтаноламина (цефалина)*, состоящими из гидрофильной (полярной) головки и гидрофобного (неполярного) хвоста. В состав большинства мембран эукариотических, а конкретнее животных клеток (в растительных – *фитостерины*) входит также *холестерин (холестерол)*. В мембране гидрофобные цепи обращены внутрь бислоя, а гидрофильные головки – наружу. У клеток животных снаружи от мембраны отсутствует клеточная стенка (в отличие от растительной, дрожжевой и бактериальной), но присутствует надмембранное формирование – гликокаликс, состоящий из олигосахаридов, соединенных с наружным слоем фосфолипидов, либо с белками.

Клеточная стенка растений представлена плотной полисахаридной оболочкой. В состав клеточной стенки входят структурные компоненты (целлюлоза у растений, хитин у грибов). Кроме структурных компонентов в состав клеточной стенки растений входят компоненты матрикса стенки (гемицеллюлозы, пектин, белки), а также инкрустирующие компоненты (лигнин, суберин) и вещества, откладывающиеся на поверхности стенки (кутин и воск). Клеточные стенки растений пронизаны отверстиями – порами диаметром до 1 мкм. Через них проходят тяжи – плазмодесмы, благодаря которым осуществляются межклеточные контакты. Каждая плазмодесма – канал, выстланный плазмолеммой, непрерывно переходящей из клетки в клетку. Центральную часть поры занимает десмотрубка, состоящая из спирально расположенных белковых субъединиц. Десмотрубка сообщается с мембранами эндоплазматического ретикулума (ЭР) соседних клеток. Таким образом, связи между клетками могут осуществляться через цитоплазму, плазмолемму, ЭР и клеточные стенки. Единая система цитоплазмы клеток тканей и органов называется симпластом.

Клеточная стенка дрожжей относительно толстая и жесткая, в ее состав входят полисахариды – маннан и глюкан в равном соотношении, кроме полисахаридов в клеточной стенке дрожжей содержатся белки, липиды, фосфаты, глюкозамин и у большей части видов хитин. У некоторых дрожжей маннан отсутствует.

Жесткая клеточная стенка бактериальных клеток состоит из полимера пептидогликана (мурейна). Пептидогликан состоит из полисахаридных цепей, скрепленных короткими пептидными сшивками.

Наружный и внутренний слои биологических мембран отличаются друг от друга, слои несимметричны. Основные отличия связаны с разнообразием белков; соотношением насыщенных и ненасыщенных жирных кислот в составе молекул фосфолипидов; величине заряда. *Мембранные белки* составляют более 50 % массы мембраны и удерживаются в липидном бислое за счет гидрофобных взаимодействий с молекулами липидов. Они обеспечивают специфические свойства мембраны (типы белков и их содержание в мембране отражают ее функцию) и играют различную биологическую роль (переносчиков, ферментов, рецепторов и

структурных молекул). По своему расположению относительно липидного бислоя мембранные белки разделяются на две основные группы – *интегральные и периферические*.

Функции *плазмолеммы* определяются ее положением и включают:

1. Распознавание данной клеткой других клеток, и прикрепление к ним;
2. Обеспечение целостности и автономности клетки;
3. Распознавание клеткой межклеточного вещества и прикрепление к его элементам (волоконкам, базальной мембране);
4. Транспорт веществ и частиц в цитоплазму и из нее (посредством ряда механизмов);
5. Взаимодействие с сигнальными молекулами (гормонами, медиаторами, цитокинами и др.) благодаря наличию на ее поверхности специфических рецепторов к ним;
6. Движение клетки (образование псевдо-, фило- и ламеллоподий) – благодаря связи плазмолеммы с сократимыми элементами цитоскелета.

Важной функцией плазмолеммы является транспорт веществ и частиц. Мембранный транспорт веществ может включать однонаправленный перенос молекулы какого-то вещества или совместный транспорт двух различных молекул в одном или противоположных направлениях ([Приложение Ж](#)) [36].

Перейдем к важным структурам клетки, отвечающие за синтез веществ. *Синтетический аппарат клетки* включает органеллы, участвующие в синтезе различных веществ, которые могут в дальнейшем использоваться самой клеткой или выделяться ею во внеклеточное пространство. Деятельность синтетического аппарата клетки, располагающегося в ее цитоплазме, контролируется ядром благодаря активности находящихся в нем генов. В синтетический аппарат входят *рибосомы, эндоплазматическая сеть (ЭПС) и комплекс Гольджи*.

*Рибосомы* – мелкие (диаметр – 15-30 нм) плотные немембранные органеллы, обеспечивающие *синтез белка* путем соединения аминокислот в полипептидные цепочки. Синтетически активная клетка содержит несколько миллионов рибосом (например, в клетке печени их число составляет  $10^7$ ), на которые приходится около 5 % ее сухой массы.

Каждая рибосома состоит из двух асимметричных *субъединиц*: *малой*, связывающей РНК, и *большой*, катализирующей образование пептидных цепей.

*Эндоплазматическая сеть (ЭПС)* – органелла, обеспечивающая синтез углеводов, липидов и белков, а также начальные посттрансляционные изменения последних. Она имеет *мембранное строение* и состоит из системы уплощенных, удлинённых, трубчатых и везикулярных образований. Название органеллы обусловлено характером связи этих элементов друг с другом, образующих в цитоплазме непрерывную трехмерную сеть, элементы которой лишь на отдельных срезах могут иметь вид изолированных структур. Мембрана ЭПС тоньше, чем плазмолемма и содержит более высокую концентрацию белка, что связано с наличием в ней многочисленных ферментных систем. Степень развития ЭПС и особенности ее строения варьируют в различных клетках и зависят от их функции. Выделяют две разновидности ЭПС: *гранулярную ЭПС (грЭПС)* и *гладкую, или агранулярную ЭПС (аЭПС)*, которые связаны друг с другом в области перехода, называемой *переходной (транзитной) ЭПС*.

*Гранулярная ЭПС* обеспечивает биосинтез всех мембранных белков и белков, предназначенных для экспорта из клетки, и начальное гликозилирование и посттрансляционные изменения белковых молекул. Гранулярная ЭПС образована уплощенными мембранными цистернами и трубочками, на наружной поверхности которых располагаются рибосомы и полисомы, придающие мембранам зернистый (гранулярный) вид, что и отражено в названии органеллы. Мембраны грЭПС содержат особые белки, которые обеспечивают связывание рибосом и уплощение цистерн. Полость грЭПС содержит рыхлый материал умеренной плотности (продукты синтеза) и сообщается с перинуклеарным пространством. Благодаря грЭПС происходит отделение (сегрегация) вновь синтезированных белковых молекул от гиалоплазмы.

*Агранулярная (гладкая) ЭПС* представляет собой трехмерную замкнутую сеть мембранных анастомозирующих трубочек, канальцев, цистерн и пузырьков диаметром 20-100 нм, на поверхности которых рибосомы отсутствуют.

Функции аЭПС включают: синтез липидов, в том числе мембранных (ферменты липидного синтеза располагаются на наружной – обращенной в сторону гиалоплазмы – поверхности мембраны аЭПС), синтез гликогена, синтез холестерина, детоксикацию эндогенных и экзогенных веществ, накопление ионов  $\text{Ca}^{2+}$ . Помимо указанных основных функций, в некоторых типах клеток аЭПС выполняет ряд дополнительных – например, в мегакариоцитах (гигантских клетках костного мозга) ее элементы образуют демаркационные каналы, разделяющие формирующиеся тромбоциты.

Способность аЭПС к накоплению ионов  $\text{Ca}^{2+}$  обусловлена наличием: кальциевого насоса в ее мембране, который обеспечивает транспорт этих ионов из гиалоплазмы внутрь цистерн аЭПС; кальцийсвязывающих белков (кальсеквестрина в мышечных клетках, кальретикулина – преимущественно в неммышечных и др.), которые в просвете цистерн образуют комплекс с ионами  $\text{Ca}^{2+}$  и кальциевых каналов в мембране аЭПС, которые осуществляют выведение  $\text{Ca}^{2+}$  в гиалоплазму.

Строение и функциональное значение *комплекса Гольджи*. Комплекс Гольджи – сложно организованная мембранная органелла, образованная тремя основными элементами – стопкой уплощенных мешочков (цистерн), пузырьками и вакуолями, или секреторными пузырьками. Комплекс этих элементов называется диктиосомой (от греч. *diktyon* – сеть); в некоторых клетках имеются множественные диктиосомы (до нескольких сотен). В специализированных секреторных клетках комплекс Гольджи располагается надъядерно под апикальной частью клетки, через которую происходит выделение секрета механизмом экзоцитоза. Нередко он лежит у ядра вблизи центриолей, в некоторых клетках его компоненты рассеяны по всей цитоплазме.

1. *Цистерны* имеют вид изогнутых дисков («блюдец») диаметром 0,5-5 мкм и образуют стопку из 3-30 элементов, разделенных пространством 15-30 нм; выпуклой стороной стопка обычно обращена к ядру, вогнутой – к плазмолемме. Каждая группа цистерн внутри стопки отличается особым составом ферментов, определяющим характер реакций процессинга белков. Периферические отделы цистерн несколько расширены от них отщепляются пузырьки и вакуоли. Механизм, удерживающий стопку в виде единого образования, неизвестен. При наличии в клетке множественных диктиосом их цистерны связаны друг с другом системой анастомозирующих и ветвящихся трубочек.

2. *Пузырьки* – сферические окруженные мембраной элементы диаметром 40-80 нм с поддерживаемой умеренной плотности; образуются путем отщепления от цистерн.

3. *Вакуоли* – крупные (диаметр – 0,1-1,0 мкм), окруженные мембраной сферические образования, отделяющиеся от цистерны на зрелой поверхности комплекса Гольджи в некоторых железистых клетках. Они содержат секреторный продукт умеренной плотности, находящийся в процессе конденсации (конденсирующие вакуоли). Вакуоль – большая одномембранная органелла, в центральной части растительной клетки она может занимать более 30 % объема клетки, а у некоторых типов клеток растений и при определенных условиях – 80 %. Большинство растений содержат в вакуолях химические вещества, которые способны реагировать с веществами в цитозоле при разрушении клетки, образуя токсичные или ядовитые вещества. Например, в чесноке аллиин находится в цитоплазме, а фермент аллициназа (находится в цитоплазме). Они обычно отделены друг от друга, и никак не контактируют, но при разрушении вакуоли реагируют и образуют аллицин. Аллицин представляет собой маслянистую слегка желтоватую жидкость, которая придает чесноку уникальный запах.

*Полярность комплекса Гольджи*. Комплекс Гольджи представляет собой *поляризованную структуру*, в которой выделяют *две поверхности*, обладающие структурными и функциональными различиями:

(а) *цис-* (от лат. *cis* – по эту сторону), *незрелую, формирующуюся* выпуклой формы, обращенную к ЭПС и связанную с системой мелких (транспортных) пузырьков, отщепляющихся от ЭПС;

(б) *транс-* (от лат. *trans* – по ту сторону), *зрелую* – вогнутой формы, обращенную к плазмолемме и связанную с отделяющимися от цистерн вакуолями. Между цистернами цис- и транс-поверхностей располагаются цистерны медиальной части комплекса Гольджи.

*Транспорт веществ в комплексе Гольджи.* Белки проникают в стопку цистерн комплекса Гольджи из транспортных пузырьков с *цис-поверхности*, а выходят в вакуолях с *транс-поверхности*; каким образом осуществляется их перенос внутри комплекса, в ходе которого происходит их процессинг, остается неизвестным.

Функции комплекса Гольджи:

1. синтез полисахаридов и гликопротеинов (гликокаликса, слизи);
2. процессинг молекул: включение углеводных компонентов в гликопротеины, транспортируемые из грЭПС (терминальное гликозилирование), добавление фосфатных групп (фосфорилирование), жирных кислот (ацилирование), сульфатных остатков (сульфатирование), частичное расщепление белковых молекул (протеолитическая доработка). Каждый из указанных этапов процессинга веществ внутри комплекса Гольджи осуществляется в топографически определенном его компоненте (цис-, медиальных или транс-цистернах, а также сети транс-Гольджи);
3. конденсация секреторного продукта (в конденсирующих вакуолях) и образование секреторных гранул;
4. обеспечение новообразованных гранул мембраной (синтезированной в ЭПС) и упаковка в нее секреторных продуктов; в процессе секреции эта мембрана встраивается в плазмолемму, увеличивая площадь ее поверхности.

Транспорт белков из комплекса Гольджи осуществляется в составе трех важнейших потоков: в *гидролизные пузырьки* – начально в виде окаймленных пузырьков, в *плазмолемму* (в составе окаймленных пузырьков) и в *секреторные гранулы* (в виде окаймленных пузырьков, утрачивающих в дальнейшем оболочку).

*Аппарат внутриклеточного переваривания* представлен системой особых органелл – мембранных пузырьков с кислым содержимым – *эндосом* (от греч. *endo* – внутри и *soma* – тело) и *лизосом* (от греч. *lysis* – разрушение и *soma* – тело), которые обеспечивают катаболические процессы в цитоплазме клетки. Функция аппарата внутриклеточного переваривания состоит в регулируемом внутриклеточном расщеплении макромолекул внеклеточного и внутриклеточного происхождения.

Объединение эндосом и лизосом в единую систему основано на наличии в их мембране АТФ-зависимого протонного насоса, вызывающего закисление среды внутри этих органелл. Низкие значения рН активируют ферменты – кислые гидролазы, которые транспортируются особыми гидролизными пузырьками, образующимися в комплексе Гольджи.

*Эндосомы* – мембранные пузырьки с постепенно закисляющимся содержимым, которые обеспечивают перенос макромолекул с поверхности клетки в лизосомы и их частичный или полный гидролиз на стадиях, предшествующих лизосомальному уровню деградации. В связи с указанными свойствами совокупность эндосом в настоящее время считают не просто механизмом транспорта веществ в клетке (как полагали ранее), а частью системы их переваривания («внутриклеточного пищеварительного тракта»), в которую входят также лизосомы.

Процесс переноса веществ системой эндосом (по эндоцитозному пути) может протекать (а) с полным перевариванием макромолекул, (б) с их частичным расщеплением или (в) без изменений по ходу транспорта в лизосому. Способность к перевариванию в эндосомах обеспечивается благодаря тому, что кислые гидролазы вносятся в эндоцитозный путь уже на самых ранних его этапах.

*Лизосомы* – органеллы, активно участвующие в завершающих этапах процесса внутриклеточного переваривания захваченных клеткой макромолекул посредством широкого спектра литических ферментов при низких значениях рН (5,0 и ниже). Диаметр лизосом обычно составляет 0,5-2 мкм, а их форма и структура могут существенно варьировать в зависимости от характера перевариваемого материала.

В клетках животных синтез АТФ осуществляется главным образом специальными органеллами, *митохондриями*; в растительных клетках кроме митохондрий в энергообеспечении огромную роль играют хлоропласты, представляющие собой один из видов пластид. Возникновение пластид растений связывают с фототрофным типом питания. Оба органоида имеют общий план строения и выполняют сходные функции. Митохондрии и пластиды – двухмембранные органеллы эукариотических клеток.

Общим в их строении является то, что они отделены от цитоплазмы (гиалоплазмы) двумя мембранами – внешней и внутренней. Поэтому у митохондрий и пластид различают две полости (или два пространства): одну – между внешней и внутренней мембранами (межмембранные) и вторую, основную (матрикс), ограниченную внутренней мембраной. Другой же общей чертой является то, что внутренняя мембрана образует складки, мешки, гребни, глубокие впячивания, направленные внутрь матрикса. На таких мембранных гребнях и впячиваниях локализуются активные метаболические центры этих органелл – полиферментные комплексы, определяющие выполнение основных физиологических функций (окислительное фосфорилирование для митохондрий, фотофосфорилирование для хлоропластов).



Рисунок 7 – (а), (б) – просвечивающая электронная микрофотография среза сердца крысы. (б), (в) – желтым цветом обведены контуры мембран митохондрии, стрелками обозначены внутренние структуры: матрикс, межмембранное пространство (ММП) и кристы

*Митохондрии* представляют собой мембранные полуавтономные органеллы, обеспечивающие клетку энергией, получаемой благодаря процессам окисления и запасаемой в виде фосфатных связей АТФ. Митохондрии также участвуют в биосинтезе стероидов, окислении жирных кислот и синтезе нуклеиновых кислот.

Митохондрии могут иметь эллиптическую, сферическую, палочковидную, нитевидную и другие формы, которые могут изменяться в течение определенного времени. Их размеры составляют 0,2-2 мкм в ширину и 2-10 мкм в длину, а количество в различных клетках варьирует в широких пределах, достигая в наиболее активных 500-1000. В клетках печени (*гепатоцитах*) их число составляет около 800, а занимаемый ими объем равен примерно 20 % объема цитоплазмы. На светооптическом уровне митохондрии выявляются в цитоплазме специальными методами и имеют вид мелких зерен и нитей (что обусловило их название – от греч. *mitos* – нить и *chondros* – зерно) (рис. 9).

Митохондрии состоят из наружной и внутренней мембран, разделенных межмембранным пространством, и содержат митохондриальный матрикс, в который обращены складки внутренней мембраны – кристы. Наружная митохондриальная мембрана напоминает плазмолемму и обладает высокой проницаемостью для молекул массой до 10 килодальтон (кДа), проникающих из цитозоля в межмембранное пространство. Она содержит много молекул специализированных транспортных белков (например, порин), которые формируют широкие гидрофильные каналы и обеспечивают ее высокую проницаемость, а также небольшое количество ферментных систем. На ней находятся рецепторы, распознающие белки, которые переносятся через обе митохондриальные мембраны в особых точках их контакта – зонах слипания. Внутренняя митохондриальная мембрана отделена от наружной межмембранным пространством, шириной 10-20 нм, которое содержит небольшое количество ферментов. В ее состав

входят белки трех типов: (а) транспортные белки, (б) ферменты дыхательной цепи и сукцинатдегидрогеназа (СДГ), (в) комплекс АТФ-синтетазы.

*Кристы* – складки внутренней мембраны толщиной 20 нм; располагаются чаще всего перпендикулярно длиннику митохондрии, но могут лежать и продольно. Их число и площадь пропорциональны активности митохондрии. На кристах происходит *сопряжение* процессов окисления и фосфорилирования.

Форма крист – в митохондриях большинства клеток – пластинчатая (ламеллярная); в некоторых клетках встречаются кристы в виде трубочек и пузырьков – тубулярно-везикулярные кристы. Последний вариант характерен для клеток, синтезирующих стероидные гормоны (клетки коркового вещества надпочечников, фолликулярные клетки и клетки желтого тела яичника, клетки Лейдига яичка).

*Митохондриальный матрикс* – гомогенное мелкозернистое вещество умеренной плотности, заполняющее полость (внутреннюю камеру) митохондрии и содержащее несколько сотен ферментов: растворимые ферменты цикла Кребса (за исключением СДГ), ферменты, участвующие в окислении жирных кислот, ферменты белкового синтеза. В матриксе находятся также митохондриальные рибосомы, митохондриальные гранулы и митохондриальная ДНК (что отличает митохондрии от всех остальных органелл).

Митохондриальная ДНК (*мтхДНК*) – образует собственный геном митохондрий, на который приходится около 1 % общего содержания ДНК в клетке и который включает 37 генов (в ядре клеток человека насчитывают примерно 100 тыс. генов). МтхДНК – кольцевой формы двунитчатая молекула ДНК длиной 5,5 мкм и толщиной 2 нм (в каждой митохондрии имеется 2-10 таких молекул). Она сходна с бактериальной ДНК и отличается от ядерной ДНК генетическим кодом, низким содержанием некодирующих последовательностей и отсутствием связи с гистонами.

*Генетическая информация мтхДНК* обеспечивает синтез лишь 5-6 % митохондриальных белков, в частности, большей части ферментов электронтранспортной системы и некоторых ферментов синтеза АТФ.

Наследование мтхДНК у многих видов, включая человека, происходит только от матери (мтхДНК отца исчезает при образовании эмбриона).

*Пластиды* – это мембранные органеллы, встречающиеся у фотосинтезирующих эукариотических организмов (у высших растений, низших водорослей, некоторых одноклеточных организмов). Подобно митохондриям, пластиды окружены двумя мембранами; в их матриксе имеется собственная геномная система; функции пластид связаны с энергообеспечением клетки, идущим на нужды фотосинтеза. У высших растений найден целый набор различных пластид (хлоропласт, лейкопласт, амилопласт, хромопласт), представляющий собой ряд взаимных превращений одного вида пластиды в другой. Основной структурой, которая осуществляет фотосинтетические процессы, является хлоропласт.

*Хлоропласт* ограничен двумя мембранами – внешней и внутренней, которые отделены друг от друга межмембранным пространством около 20-30 нм. Каждая из мембран имеет толщину около 7 нм. Внутренняя мембрана хлоропластов, как и других пластид, образует складчатые впячивания внутрь матрикса, или стромы. В зрелом хлоропласте высших растений видны два типа внутренних мембран: 1) мембраны, образующие плоские, протяженные ламеллы стромы, 2) мембраны тилакоидов – плоских дисковидных вакуолей, или мешков.

В хлоропластах происходят фотосинтетические процессы, в результате которых связывается углекислота, выделяется кислород и синтезируются сахара.

Для хлоропластов характерно наличие пигментов хлорофиллов, которые обуславливают окраску зеленым растениям. При помощи хлорофилла зеленые растения поглощают энергию солнечного света и превращают ее в химическую. При поглощении световых лучей с определенной длиной волны изменяется структура молекулы хлорофилла, при этом она переходит в возбужденное, активированное состояние. Освобождающаяся энергия активированного хлорофилла через ряд промежуточных этапов передается определенным процессам, при-

водящим к синтезу АТФ и восстановлению акцептора электронов НАДФ (никотинамидадениндинуклеотид) до НАДФ Н. Оба вещества используются в реакции связывания CO<sub>2</sub> и синтезе сахаров.

*Цитоскелет* представляет собой сложную динамичную систему *микротрубочек, микрофиламентов, промежуточных филаментов и микротрабекул*. Указанные компоненты цитоскелета являются *немембранными органеллами*; каждый из них образует в клетке *трехмерную сеть* с характерным распределением, которая взаимодействует с сетями из других компонентов.

Основные функции цитоскелета:

1. поддержание и изменение формы клетки;
2. распределение и перемещение компонентов клетки;
3. транспорт веществ в клетку и из нее;
4. обеспечение подвижности клетки;
5. участие в межклеточных соединениях.

*Микротрубочки* – наиболее крупные компоненты цитоскелета. Они представляют собой полые цилиндрические образования, имеющие форму трубочек, длиной до нескольких микрометров (в жгутиках более 50 нм) диаметром около 24-25 нм, с толщиной стенки 5 нм и диаметром просвета 14-15 нм.

*Стенка микротрубочки* состоит из спиралевидно уложенных нитей – протофиламентов толщиной 5 нм (которым на поперечном разрезе соответствуют 13 субъединиц), образованных димерами из белковых молекул  $\alpha$ - и  $\beta$ -тубулина.

Функции микротрубочек:

1. поддержание формы и полярности клетки, распределения ее компонентов,
2. обеспечение внутриклеточного транспорта,
3. обеспечение движения ресничек, хромосом в митозе (формируют ахроматиновое веретено, необходимое для клеточного деления),
4. образование основы других органелл (центриолей, ресничек).

*Клеточный центр* образован двумя полыми цилиндрическими структурами длиной 0,3-0,5 мкм и диаметром 0,15-0,2 мкм – *центриолями*, которые располагаются вблизи друг друга во взаимно перпендикулярных плоскостях. Каждая центриоль состоит из 9 *триплетов* частично слившихся микротрубочек (А, В и С), связанных поперечными белковыми мостиками («ручками»). Каждый триплет центриоли связан со сферическими тельцами диаметром 75 нм – *сателлитами*; расходящиеся от них микротрубочки образуют *центросферу*. У делящейся растительной клетки нет центриолей.

*Реснички и жгутики* – органеллы специального значения, участвующие в процессах движения, – представляют собой выросты цитоплазмы, основу которых составляет каркас из микротрубочек, называемый осевой нитью, или аксонемой (от греч. *axis* – ось и *neta* – нить).

*Аксонема* образована 9 периферическими парами микротрубочек и одной центрально расположенной парой. Центральная пара микротрубочек окружена *центральной оболочкой*, от которой к периферическим дублетам расходятся *радиальные спицы*. *Базальное тельце*, по своему строению сходное с центриолью, лежит в основании каждой реснички или жгутика.

*Микрофиламенты* – тонкие белковые нити диаметром 5-7 нм, лежащие в цитоплазме поодиночке, в виде сетей или пучками.

Функции микрофиламентов:

1. Обеспечение сократимости мышечных клеток (при взаимодействии с миозином);
2. Обеспечение функций, связанных с кортикальным слоем цитоплазмы и плазмолеммой (экзо- и эндоцитоз, образование псевдоподий и миграция клетки);
3. Перемещение внутри цитоплазмы органелл, транспортных пузырьков и других структур благодаря взаимодействию с некоторыми белками (минимиозином), связанными с поверхностью этих структур;

4. Обеспечение определенной жесткости клетки за счет наличия кортикальной сети, которая препятствует действию деформаций, но сама, перестраиваясь, способствует изменениям клеточной формы;
5. Формирование сократимой перетяжки при цитотомии, завершающей клеточное деление;
6. Образование основы («каркаса») некоторых органелл (микроворсинок, стереоцилий);
7. Участие в организации структуры межклеточных соединений (опоясывающих десмосом).

*Микроворсинки* – пальцевидные выросты цитоплазмы клетки диаметром 0,1 мкм и длиной 1 мкм, основу которых образуют актиновые микрофиламенты. Микроворсинки обеспечивают многократное *увеличение площади поверхности* клетки, на которой происходит *расщепление и всасывание веществ*. На апикальной поверхности некоторых клеток, активно участвующих в указанных процессах (в эпителии тонкой кишки и почечных канальцев) имеется до нескольких тысяч микроворсинок, образующих в совокупности *щеточную каемку*.

Каркас каждой микроворсинки образован пучком, содержащим около 40 микрофиламентов, лежащих вдоль ее длинной оси.

*Включения цитоплазмы* – временные ее компоненты, обусловленные накоплением продуктов метаболизма клеток. Традиционно подразделяются на *трофические, секреторные, экскреторные и пигментные*.

*Трофические включения* разделяют в зависимости от природы накапливаемого вещества. *Липидные включения* встречаются в виде липидных капель (особенно крупных в жировых клетках), которые располагаются в цитоплазме по отдельности или сливаются друг с другом. Их вид на электронно-микроскопических фотографиях варьирует в зависимости от способа фиксации. На гистологических препаратах они обычно имеют вид светлых («пустых») вакуолей, так как при стандартных методах обработки ткани липиды растворяются. Липидные капли служат источником веществ, используемых в качестве энергетических субстратов; в некоторых клетках (например, продуцирующих стероидные гормоны) они могут содержать субстраты, необходимые для последующего синтеза. Из углеводных трофических включений наиболее распространены гранулы гликогена, представляющего собой полимер глюкозы. Они встречаются в виде плотных гранул диаметром 20-30 нм ( $\beta$ -частиц), которые часто образуют скопления (розетки), называемые  $\alpha$ -частицами. Гранулы гликогена часто расположены вблизи аЭПС и используются в качестве источника энергии.

*Секреторные включения* обычно имеют вид мембранных пузырьков, содержащих секретируемый клеткой продукт; в мембране могут находиться ферменты, осуществляющие конечный процессинг продукта по мере перемещения пузырька к плазмолемме. Избыток невосстановленного секреторного продукта поглощается и разрушается в цитоплазме клетки механизмом *кринофагии*.

*Экскреторные включения* по своему строению сходны секреторными, однако они содержат вредные продукты метаболизма, подлежащие удалению из клетки.

*Пигментные включения* представляют собой скопления *эндогенных или экзогенных пигментов*, которые могут окружаться мембраной. К наиболее распространенным эндогенным пигментам относятся *гемоглобин* (растворен в цитоплазме эритроцитов, переносит кислород), *гемосидерин* (продукт обмена гемоглобина, накапливается в макрофагах в виде мелких плотных частиц *ферритина*), *меланин* (синтезируется в пигментных клетках – меланоцитах, в которых он накапливается и химически созревает в окруженных мембраной гранулах – меланосомах); *липофусцин* (пигмент старения, накапливается в виде мембранных гранул с плотным содержимым, в котором определяются липидные капли).

*Ядро* является важнейшим компонентом клетки, содержащим ее *генетический аппарат*.

Функции ядра:

1. Хранение генетической информации (в молекулах ДНК, находящихся в хромосомах);

2. Реализацию генетической информации, контролирующей осуществление разнообразных процессов в клетке – от синтетических до запрограммированной гибели (апоптоза);
3. Воспроизведение и передачу генетической информации (при делении клетки).

*Ядерная оболочка (кариолема)* на светооптическом уровне практически не определяется; под электронным микроскопом обнаруживается, что она состоит из *двух мембран – наружной и внутренней*, – разделенных полостью шириной 15-40 нм (*перинуклеарным пространством*) и смыкающихся в области *ядерных пор*.

*Наружная мембрана* составляет единое целое с мембранами грЭПС – на ее поверхности имеются рибосомы, а перинуклеарное пространство соответствует полости цистерн грЭПС и может содержать синтезированный материал. Со стороны цитоплазмы наружная мембрана окружена рыхлой сетью промежуточных (*виментиновых*) *филаментов*.

*Внутренняя мембрана* – гладкая, ее интегральные белки связаны с ядерной пластинкой – *ламиной* – слоем толщиной 80-300 нм, состоящим из переплетенных промежуточных филаментов (*ламино*), образующих кариоскелет. Ламина играет очень важную роль в: (1) поддержании *формы* ядра; (2) упорядоченной укладке *хроматина*; (3) структурной организации *поровых комплексов*; (4) *формировании кариолеммы* при делении клеток.

*Ядерные поры* занимают 3-35 % поверхности ядерной оболочки. Они более многочисленны в ядрах интенсивно функционирующих клеток и отсутствуют в ядрах спермиев. Поры содержат два параллельных кольца (по одному с каждой поверхности кариолеммы) диаметром 80 нм, которые образованы *8 белковыми гранулами*. От этих гранул к центру сходятся *фибриллы*, формирующие *перегородку (диафрагму)* толщиной около 5 нм, в середине которой лежит *центральная гранула* (по некоторым представлениям, это – транспортируемая через пору субъединица рибосомы). Совокупность структур, связанных с ядерной порой, называется *комплексом ядерной поры*. Последний образует водный канал диаметром 9 нм, по которому движутся мелкие водорастворимые молекулы и ионы.

Функции комплекса ядерной поры:

1. Обеспечение регуляции избирательного транспорта веществ между цитоплазмой и ядром;
2. Активный перенос в ядро белков, имеющих особую маркировку в виде так называемой последовательности ядерной локализации – *Nuclear Localization Sequence (NLS)*, распознаваемой рецепторами NLS (в комплексе поры);
3. Перенос в цитоплазму субъединиц рибосом, которые, однако, слишком велики для свободного прохождения пор; их транспорт, вероятно, сопровождается изменением конформации перового комплекса.

*Хроматин* (от греч. *chroma* – краска) мелкие зернышки и глыбки материала, который обнаруживается в ядре клеток и окрашивается основными красителями. Хроматин состоит из *комплекса ДНК и белка* и соответствует хромосомам, которые в интерфазном ядре представлены длинными, тонкими перекрученными нитями и неразличимы как индивидуальные структуры. Выраженность спирализации каждой из хромосом неодинакова по их длине. Различают два вида хроматина – *эухроматин* и *гетерохроматин*.

*Эухроматин* соответствует сегментам хромосом, которые деспирализованы и открыты для транскрипции. Эти сегменты не окрашиваются и не видны в световой микроскоп.

*Гетерохроматин* соответствует *конденсированным*, плотно скрученным сегментам хромосом (что делает их *недоступными для транскрипции*). Он *интенсивно окрашивается* основными красителями, и в световом микроскопе имеет вид гранул.

*Тельце Барра* – скопление гетерохроматина, соответствующее одной X- хромосоме у особей женского пола, которая в интерфазе плотно скручена и неактивна. В большинстве клеток оно лежит у кариолеммы, а в гранулоцитах крови имеет вид маленькой добавочной дольки

ядра («барабанной палочки»). Выявление тельца Барра (обычно в эпителиальных клетках слизистой оболочки полости рта) используется как диагностический тест для определения генетического пола (обязателен, в частности, для женщин, участвующих в Олимпийских Играх).

*Уровни упаковки хроматина.* Начальный уровень упаковки хроматина, обеспечивающий образование *нуклеосомной нити* диаметром 11 нм, обусловлен намоткой двойной нити ДНК (диаметром 2 нм) на блоки дисковидной формы из 8 гистоновых молекул (*нуклеосомы*). Нуклеосомы разделены короткими участками свободной ДНК. Второй уровень упаковки также обусловлен гистонами и приводит к скручиванию нуклеосомной нити с формированием *хроматиновой фибриллы* диаметром 30 нм. В интерфазе хромосомы образованы хроматиновыми фибриллами, причем каждая хроматида состоит из одной фибриллы. При дальнейшей упаковке хроматиновые фибриллы образуют *петли (петельные домены)* диаметром 300 нм, каждый из которых соответствует одному или нескольким генам, а те, в свою очередь, в результате еще более компактной укладки, формируют участки конденсированных хромосом, которые выявляются лишь при делении клеток.

*Ядрышко* образовано специализированными участками (*петлями*) хромосом, которые называются *ядрышковыми организаторами*. У человека такие участки имеются в пяти хромосомах – 13-й, 14-й, 15-й, 21-й и 22-й, где располагаются многочисленные копии генов, кодирующих рибосомальные РНК (рРНК). Ядрышко исчезает в профазе митоза, когда ядрышковые организаторы «растаскиваются» в ходе конденсации соответствующих хромосом, вновь формируясь в телофазе.

*Функции ядрышка* заключаются в *синтезе рРНК* и ее сборке в *предшественники рибосомальных субъединиц*.

Ядрышко выявляется в интерфазном ядре на светооптическом уровне как мелкая плотная гранула диаметром 1-3 мкм, интенсивно окрашивающаяся основными красителями. Оно располагается в центре ядра или эксцентрично, содержит высокие концентрации РНП. Размеры и число ядрышек увеличиваются при повышении функциональной активности клетки. Особенно крупные ядрышки характерны для эмбриональных и активно синтезирующих белки клеток, а также клеток быстрорастущих злокачественных опухолей.

Под электронным микроскопом в ядрышке обнаруживают три компонента – *фибрилярный, гранулярный и аморфный*.

*Кариоплазма (ядерный сок)* – жидкий компонент ядра, в котором располагаются хроматин и ядрышко. Содержит воду и ряд растворенных и взвешенных в ней веществ: РНК, гликопротеинов, ионов, ферментов, метаболитов.

Мы рассмотрели основные структурные элементы эукариотических клеток, но нельзя не отметить и особенности строения прокариотических организмов – бактерий, а также архей, но сначала приведем основные отличия прокариотов от эукариотов.

Основные отличия прокариотов от эукариотов состоят в следующем:

- клетки прокариотов очень малы;
- диаметр большинства клеток бактерий не превышает 1 мкм, однако длина может быть значительной, например, у некоторых спирихет – до 500 мкм. Объем эукариота в 10 000 раз больше, чем объем прокариота;
- прокариоты не имеют морфологически оформленного ядра (нет ядерной мембраны и отсутствует ядрышко), его эквивалентом является нуклеоид, представляющий собой замкнутую кольцевую двунитевую молекулу ДНК, прикрепленную в одной точке к цитоплазматической мембране;
- ДНК эукариотических клеток линейная, располагается в ядре, в котором имеются хромосомы;
- прокариоты размножаются в основном простым делением пополам, в то время как эукариоты делятся при помощи митоза, мейоза или сочетанием этих двух способов;

- в клетках прокариотов отсутствуют органеллы, ограниченные от цитоплазмы специализированными внутриклеточными мембранами: эндоплазматическая сеть (ретикулум), митохондрии, аппарат Гольджи, лизосомы, хлоропласты;
- прокариотическая клетка содержит только один тип рибосом с константой седиментации 70 S (так как при ультрацентрифугировании рибосомы оседают со скоростью около 70 единиц Сведберга (S)), причем часть рибосом ассоциирована с цитоплазматической мембраной, что никогда не наблюдается у эукариотов; цитоплазма клеток эукариотов содержит 80 S рибосомы (более крупные);
- прокариоты имеют очень тонкие жгутики, около 20 нм в диаметре. Они представляют собой пассивно вращающиеся полые белковые нити. Жгутики эукариотов имеют достаточно сложное строение. Имеют толщину до 100 мкм и способны изгибаться по всей длине.

Имеется также ряд признаков или органелл, характерных для многих, но не для всех прокариотов, которые позволяют отличать их от эукариотов:

- спорообразующие формы бактерий в неблагоприятных условиях превращаются в уникальные по степени устойчивости типы покоящихся клеток – бактериальные споры;
- клеточная стенка прокариотов содержит характерный только для бактерий специфический компонент – пептидогликан (муреин);
- многочисленные инвагинации цитоплазматической мембраны, которые называются мезосомы;
- плазмиды – автономно реплицирующиеся кольцевидные молекулы двунитевой ДНК с меньшей, чем хромосома бактерий, молекулярной массой.

Клеточные структуры присутствуют в клетках растений, животных, грибов, бактерий, хотя есть и особенные структуры, характерные только для определенного живого организма, например, пластиды у растений.

*Предковые прокариоты (архебактерии).* Хотя представители архей и не входят в пул биотехнологических микроорганизмов, используемых человеком, они являются весьма перспективными благодаря своим свойствам. Изучение этих микроорганизмов дает массу идей, заимствований, и инструментов для биотехнологов.

Археи – микроорганизмы, которые процветают преимущественно в экстремальных условиях (очень высокие / низкие температуры, высокое давление, кислотность и / или соленость), хотя многие из них обитают в более «обычных» экосистемах (океанская вода, почва, кишечник и т. д.). Одна из гипотез предполагает, что разделение бактерий и архей в эволюции произошло в результате индивидуализации мембран, которые были «разнородными» у последнего универсального общего предка (LUCA) и стали более специализированными в двух современных областях микроорганизмов из-за так называемого древнего события «липидного разделения». Между археями и бактериями есть два основных различия в структуре мембранных липидов: 1) хиральность<sup>18</sup> глицериновой основы и способ соединения гидрофобных «хвостов» и 2) химическая природа этих хвостов. У бактерий и эукариот прямые (линейные) ацильные цепи жирных кислот связаны сложноэфирными связями с позициями sn-1 и sn-2 глицерина, в то время как у архей разветвленные изопреноидные углеводородные цепи связаны эфирными связями с позициями глицерина sn - 2 и sn-3. Разветвленные изопреноидные цепи у архей определяют очень плотную упаковку, высокую вязкость мембран и долговечность, и низкую проницаемость для воды и ионов, которые являются основными характеристиками мембран архей по сравнению с бактериальными или эукариотическими. Дополнительной модификацией, которая увеличивает плотность упаковки и уменьшает проницаемость мембраны, являются циклопентановые кольца в гидрофобных хвостах, которые чаще встречаются у ацидофильных микроорганизмов. Более того, археи способны адаптировать свои мембраны,

<sup>18</sup> Хиральность – несовместимость объекта со своим зеркальным отражением любой комбинацией вращений и перемещений в трехмерном пространстве. Речь идет только об идеальном плоском зеркале.

чтобы они лучше соответствовали условиям их роста, используя несколько типов изменений структуры липидов. Наконец, большинство гипертермофилов содержат болалипиды и представляют собой липиды, связанные «хвост к хвосту», или археолы. Эта модификация обеспечивает дополнительную прочность мембран, в отличие от двухслойной мембраны археолы образуют жесткую монослойную структуру ([Приложение Д](#)) [33, 45, 46].

Несмотря на эти необычные механические свойства, напоминающие гелеобразное состояние, мембраны архей считают жидкокристаллическими в очень широком диапазоне температур (0-100 + °С), что, как полагают, жизненно важно для каждой живой клетки. В то же время очень высокая прочность и в то же время «маневренность» являются наиболее фундаментальными физическими свойствами мембран архей.

Наиболее распространенными представителями археобактерий являются анаэробные бактерии, образующие метан путём восстановления диоксида углерода. Эти бактерии называются метаногенами. Другие группы – это галофилы и термоацидофилы. Галофилы – бактерии, для жизнедеятельности которых необходимы высокие концентрации солей. Термоацидофилы – бактерии, для роста которых необходима высокая температура +80 ÷ +90 °С и очень кислая среда (рН=2).

Археобактерии обладают кольцевой ДНК. Главное отличие археобактерий от истинных бактерий заключается в наличии прерывистых генов<sup>19</sup>, что в свою очередь, объединяет их с эукариотами.

Плазматические мембраны архей оказались чрезвычайно прочными и почти непроницаемыми для воды и ионов, в отличие от мембран бактерий и эукариот. Кроме того, они остаются жидкими в диапазоне температур 0-100°С. Именно эти свойства, скорее всего, определили эволюционную судьбу архей, и бионанотехнологи могут перенять их у природы.

Разветвленная структура определяет плотную упаковку и низкую водопроницаемость мембран, подобных археям, и в то же время обеспечивает жидкокристаллическое состояние, которое жизненно важно для живых клеток.

*Прокариотические истинные бактерии.* Структурную организацию прокариотических клеток обычно рассматривают на примере кишечной палочки (*Escherichia coli*), модельного микроорганизма и микробиологов, и биохимиков, и биотехнологов. Клетки кишечной палочки имеют вытянутую форму, длина их составляет 1-2 мкм, диаметр 0,5-1 мкм. Клетки кишечной палочки имеют сложную жесткую оболочку, состоящую из полисахаридов, белков и липидов. Полисахариды и белки, соединённые ковалентными связями, образуют сетчатый мешок, который и обеспечивает прочность клеточной оболочки. Внутренняя часть оболочки состоит из специфической плёнки – цитоплазматической мембраны, толщина которой около 8 нм.

Часто мембраны образуют складчатые участки, имеющие в разрезе вид слоёного пирога. Эти структуры называются мезосомы. Предполагается, что в мезосомах протекают специфические биохимические реакции. С мембранами связано большое количество ферментов, прежде всего ферменты, катализирующие процессы окисления. Первичная функция клеточной оболочки состоит в обеспечении физической защиты клетки; кроме того, оболочка обеспечивает обмен веществами между внеклеточным и внутриклеточным пространством.

Во внутриклеточном пространстве, цитоплазме, отсутствуют какие-либо отсеки, ограниченные мембранами. В цитоплазме можно обнаружить сгустки из слаборазличимых переплетающихся нитей. В зависимости от условий роста клетка кишечной палочки может содержать более одной молекулы ДНК. Место, в котором сосредоточены молекулы ДНК, называют ядерным районом (такой термин используется из-за отсутствия мембраны, которая бы отделяла этот район от остальной части цитоплазмы).

---

<sup>19</sup> Если представить себе гены в виде текста, содержащего генетическую информацию, то у бактерий он непрерывен, а у высших организмов расчленен множеством вставок из других текстов. При изучении структурных генов у эукариот было установлено, что многие из них, кроме отрезков ДНК, кодирующих аминокислоты в полипептидной цепи, включают в свой состав «лишние», «молчащие» участки ДНК, которые не кодируют аминокислоты. Они были названы *интронами*, а участки генов, кодирующие аминокислоты, - *экзонами*. Интроны могут быть также обозначены как мДНК (молчащая ДНК), а экзоны - как кДНК (кодирующая ДНК).

Истинные бактерии имеют кольцевую ДНК, длина которой практически полностью занята генами и служебными фрагментами. Прерывистые гены отсутствуют.

В цитоплазме обнаруживаются специальные частицы, на которых происходит синтез белка, – рибосомы. Активно метаболизирующая клетка кишечной палочки содержит 10 000 – 15 000 рибосом, распределённых по цитоплазме. Помимо растворённой кольцевой ДНК и рибосом цитоплазма содержит тысячи других растворённых веществ, в том числе белков, которые невидимы под электронным микроскопом. Часто в клетках находятся довольно крупные включения, в которых запасаются питательные вещества.

Мельчайшими и простейшими прокариотическими клетками считаются микоплазмы.

Они представляют собой сферу диаметром около 300 нм. Клеточная оболочка их состоит из одной цитоплазматической мембраны. В цитоплазме находится плотно упакованная ДНК и около 400 рибосом. В отношении питания микоплазмы очень капризны и почти всегда являются паразитами в клетках эукариот.

Среди учёных идут споры, какое минимальное количество ДНК, белков и других макромолекулярных структур достаточно для обеспечения жизнедеятельности клетки. Это до сих пор неизвестно, но, видимо, в клетке микоплазмы их достаточно.

Микробиологи понимают, что лишь робко зачерпывают ложкой из глубокого моря микробного разнообразия, которое существует в природе.

*Царство Vira* объединяет неклеточные формы и включает вирусы (в том числе и фаги), вириды и прионы [33].

Термин «вирус» (от лат. *virus* – яд) был введен в 1899 г. М. Бейеринком. Открыты вирусы русским ученым Д. И. Ивановским в 1892 г. при исследовании мозаичной болезни листьев табака (вирус табачной мозаики). В настоящее время вирусы определяют как особый тип биологических систем – мельчайшие самопродуцирующиеся неклеточные структуры, которые способны функционировать в восприимчивых к ним клетках (животных, человека, растений, бактерий).

Особенности вирусов в сравнении с прокариотами и эукариотами:

- не имеют клеточного строения;
- имеют ультрамикроскопические размеры (вирусы измеряются в нанометрах);
- содержат только один тип нуклеиновой кислоты (либо ДНК, либо РНК);
- не имеют собственных белоксинтезирующих систем;
- являются облигатными (абсолютными, строгими) внутриклеточными паразитами, размножаясь только в живых клетках;
- не способны к росту и бинарному делению;
- размножаются (репродуцируются) дизъюнктивным (разобщенным) способом: в инфицированной вирусом клетке отдельно и в разное время синтезируются нуклеиновые кислоты вирусов и их белки, затем происходит их сборка в вирусные частицы.

Средой обитания вирусов являются только живые клетки: клетки человека, животных, растений или клетки бактерий (для бактериофагов).

Все вирусы существуют в двух качественно разных формах: внеклеточной и внутриклеточной.

Вирион – внеклеточная (покоящаяся) форма вируса. Включает в себя все составные элементы (нуклеиновую кислоту, капсид, суперкапсид, структурные белки и, у некоторых вирусов, функциональные белки (ферменты). Это – наиболее изученная форма вируса.

Вирус – внутриклеточная (репродуцирующаяся) форма вируса.

*Классификация и таксономия вирусов.* В соответствии с классической классификацией вирусов ICTV<sup>20</sup>, основанной на их филогенетическом родстве, вирусы объединены в царство

---

<sup>20</sup> Классификацию регулярно обновляет Международный комитет по классификации вирусов (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV)

*Vira*, которое подразделено по типу нуклеиновой кислоты, образующей геном, на два подцарства – Рибовирусы (РНК-вирусы) и Дезоксирибовирусы (ДНК-вирусы).

Но существуют и другая классификация – классификация вирусов Балтимора. В 2021 году наука, изучающая вирусы, отметила необычный юбилей, ровно 51 год назад американский ученый Дэвид Балтимор предложил классификацию вирусов, основанную на молекулярном составе их геномов и этапах экспрессии генов. В данной классификации главную роль играет не сама форма нуклеиновой кислоты, которой представлен вирусный геном в вирионе, а этапы пути от генетического материала вириона к белку, и в отличие от классификации ICTV классификация вирусов по Балтимору не указывает на родственность вирусов. Балтимор подразделил все известные на тот момент вирусы на шесть классов:

1. вирусы, геномы которых представлены двухцепочечной ДНК;
2. вирусы с геномами из одноцепочечной ДНК;
3. вирусы с геномами из двухцепочечной РНК;
4. вирусы с геномами из одноцепочечной РНК положительной полярности;
5. вирусы с геномами из одноцепочечной РНК отрицательной полярности;
6. вирусы, способные к обратной транскрипции, у которых РНК-геном положительной полярности с помощью специального фермента в клетке переходит в форму двуцепочечной ДНК (дцДНК).

Эта система оказалась так проста и изящна, что несмотря на стремительное развитие вирусологии на рубеже веков и в новом тысячелетии, благодаря усовершенствованию методов секвенирования, по-прежнему активно используется учеными.

Вид вируса бинарного названия, как у бактерий, не получил. Однако на практике чаще всего вирусы подразделяют в соответствии с типом хозяина, поскольку вирусы поражают позвоночных и беспозвоночных животных, растения и бактерии. Например, *Microhyala letovirus I* – вид вирусов из семейства коронавирусы, его хозяином является лягушка *Microhyala fissipes*.

Актуальность вирусов обусловлена тем, что большая часть из них вызывает инфекционные заболевания человека, а некоторые (папилломавирусы, некоторые герпесвирусы) проявляют онкогенное действие, вызывая развитие злокачественных опухолей и лейкозов.

*Морфологию и структуру вирусов* изучают с помощью электронной микроскопии, так как их размеры малы, сравнимы с толщиной оболочки бактерий, что не позволяет их наблюдать в световом микроскопе. (Световые микроскопы предназначены для изучения только тех микроорганизмов, которые имеют размеры не менее 0,2 мкм (бактерии, простейшие и т. п.).

Размеры вирионов измеряют в нанометрах (1 нм равен 0,001 мкм). Кроме электронного микроскопа, размеры вирусов определяют также методом ультрафильтрации через фильтры с известным диаметром пор (свечи Шамберлана, коллоидные мембраны) и методом ультрацентрифугирования (седиментация в ультрацентрифуге).

Размеры вирионов различных вирусов варьируют в широких пределах: от 15-18 до 300-400 нм. Самые мелкие – парвовирусы и вирусы полиомиелита (17-25 нм), самые крупные – вирусы натуральной оспы (250-300 нм), средние – вирус гриппа и др. (120-200 нм).

Различают простые и сложные вирусы. К простым относятся вирусы полиомиелита, гепатита А и др., к сложным – вирусы кори, гриппа, герпеса, коронавирусы, ВИЧ и др.

Простые вирусы состоят из нуклеиновой кислоты и белковой оболочки – капсида (от лат. *capsa* – футляр).

Капсид состоит из повторяющихся морфологических субъединиц – капсомеров. Нуклеиновая кислота и капсид взаимодействуют друг с другом и вместе называются нуклеокапсидом (сердцевина вириона).

Сложные вирусы помимо нуклеиновой кислоты и белков капсида содержат суперкапсид (липопротеидную мембрану). На оболочке вируса могут быть расположены гликопротеиновые «шипы» – суперкапсидные белки. Под оболочкой некоторых вирусов находится матричный белок (М-белок).

Основные функции капсида и суперкапсида – защита вирусного генома от внешних воздействий, обеспечение адсорбции вириона к клетке, проникновение его в клетку путем взаимодействия с клеточными рецепторами. С ними связаны антигенные и иммуногенные свойства вируса.

Форма вирионов может быть различной: палочковидной (вирус табачной мозаики), пулевидной (вирус бешенства), сферической (вирусы полиомиелита, ВИЧ), нитевидной (филовирусы), в виде сперматозоида (многие бактериофаги).

*Типы симметрии.* Вирионы имеют спиральный, икосаэдрический (кубический) или смешанный (сложный) тип симметрии капсида (нуклеокапсида).

*Спиральный* тип симметрии обусловлен винтообразной структурой нуклеокапсида (у вирусов гриппа, вируса бешенства, вируса табачной мозаики и др.). При этом капсиды вирионов состоят из структурных субъединиц, уложенных в виде спирали вокруг оси. При таком расположении субъединиц образуется полый канал, внутри которого компактно уложена молекула вирусной нуклеиновой кислоты. Ее длина может во много раз превышать длину палочковидного вириона. Например, длина вируса табачной мозаики (ВТМ) 300 нм, а его РНК достигает величины 4000 нм, или 4 мкм. При этом РНК настолько связана с капсидом, что ее нельзя освободить, не повредив последний. Организация по принципу спиральной симметрии придает вирусам палочковидную форму.

*Икосаэдрический* (кубический) тип симметрии – обусловлен образованием изометрически полого тела из капсида, содержащего вирусную нуклеиновую кислоту (вирусы гепатита А, герпеса, полиомиелита, аденовирусы). При этом нуклеиновая кислота окружена капсомерами, образующими фигуру икосаэдра – многогранника. Организация по принципу кубической симметрии придает вирусам сферическую форму. Принцип кубической симметрии – самый экономичный для формирования замкнутого капсида, так как для его организации используются сравнительно небольшие белковые блоки, образующие большое внутреннее пространство, в которое свободно укладывается нуклеиновая кислота.

*Смешанный* (сложный) тип симметрии – включает оба типа симметрии. Например, у некоторых бактериофагов головка организована по принципу кубической симметрии, отросток – по принципу спиральной симметрии.

*Химический состав вирусов.* Основными компонентами вирусов являются нуклеиновые кислоты и белки. У сложных вирусов дополнительно присутствуют липиды и углеводы.

*Нуклеиновые кислоты.* Вирусы имеют уникальный геном. В составе вирусов только один тип нуклеиновой кислоты – либо ДНК, либо РНК. Поэтому вирусы классифицируют на ДНК-содержащие и РНК-содержащие. Обе нуклеиновые кислоты являются носителями генетической информации и инфекционности. Последнее свойство усиливается, если вирусная нуклеиновая кислота соединяется с белком. Нуклеиновые кислоты могут быть однонитевыми и двунитевыми.

*Вирусная ДНК.* По своей структуре вирусные ДНК могут быть двунитевые и однонитевые, могут иметь линейную или кольцевую форму. В геномах, представленных двунитевыми ДНК, информация закодирована на обеих нитях ДНК, что свидетельствует о максимальной экономии генетического материала у вирусов как генетических паразитов.

*Вирусная РНК.* У РНК-содержащих вирусов генетическая информация закодирована в РНК таким же кодом, как в ДНК всех других вирусов и клеточных организмов.

Типичной для РНК-содержащих вирусов является однонитевая РНК. При этом она может быть линейной и кольцевой. Однако у ряда вирусов имеется двунитевая РНК.

Вирусы с однонитевой РНК из-за различия в функциях генома подразделяют на две группы: с «плюс»-нитевым (позитивным) геномом и «минус»-нитевым (негативным) геномом.

У вирусов с позитивным РНК геномом РНК обладает способностью транслировать закодированную в ней информацию на рибосомы клетки хозяина и таким образом выполнять не только наследственную функцию, но и функцию информационной РНК. Поэтому такие вирусы являются инфекционными, могут заражать другие клетки. К этой группе вирусов относятся пикорнавирусы, тогавирусы, ретровирусы, коронавирусы и др.

У вирусов с негативным РНК геномом РНК не обладает функцией иРНК, а выполняет только наследственную функцию. РНК таких вирусов не вызывает инфекционного процесса, так как они не могут непосредственно связываться с рибосомами. В инфицированной клетке в этом случае осуществляется синтез комплементарной копии на матрице РНК, которая и обеспечивает трансляцию. Это происходит только в присутствии вирусного белка – фермента транскриптазы, который обязательно находится в структуре «минус»-нитевых вирусов (в клетках ее аналога нет). К этой группе вирусов относятся ортомиксовирусы, рабдовирусы и др.

Некоторые РНК-содержащие вирусы могут содержать как «плюс»-, так и «минус»-нити РНК. Особым свойством обладает геномная РНК ретровирусов, имеющих в своем составе ревертазу (обратную транскриптазу) или РНК-зависимую ДНК-полимеразу. С помощью этого уникального вирусспецифического фермента на ее матричной основе последовательно синтезируются вначале одна нить ДНК, затем и другая, которые, замкнувшись в кольцо, интегрируют с клеточным геномом, после чего с участием РНК-полимеразы клеток происходит переписывание информации на РНК.

*Вирусные белки* подразделяют на структурные и функциональные. Первые входят в состав вириона (капсида) и поэтому придают вирусу определенную форму, вторые – не входят в состав вириона, а появляются только в инфицированной клетке и представляют собой ферменты, участвующие в процессе репродукции вирусов.

У простых вирусов структурные белки представлены капсидными белками, которые выполняют функции: защитную (образуют футляр, защищая геном вируса), «адресную» (обеспечивают адсорбцию вируса на чувствительных к ним клетках), антигенную (на них развивается иммунный ответ с образованием антител, которые способны нейтрализовать вирус).

У сложных вирусов, имеющих внешнюю оболочку (суперкапсид), капсидные белки также выполняют защитную функцию. Однако они не принимают прямого участия в адсорбции вируса и проникновении в клетку хозяина.

Существенной особенностью капсидных белков является строго упорядоченная структура, обеспечивающая построение капсида из субъединиц – капсомеров, состоящих из идентичных полипептидных цепей, способных к самосборке. Таким образом достигается экономия генетического материала вируса. В противном случае для синтеза разных капсидных белков потребовалась бы информация, закодированная в гораздо большем количестве генов.

Внешняя оболочка сложных вирионов состоит из белков, которые входят в состав гликопротеидов и гликолипидов. У многих вирионов они располагаются в виде шиповидных отростков на поверхности суперкапсида. Гликопротеидные шипы обладают антигенными свойствами. Многие из них ответственны за адсорбцию на специфических рецепторах клетки и принимают участие в слиянии с клеточной мембраной, обеспечивая тем самым проникновение вириона в клетку хозяина. Также в составе суперкапсида имеются гликолипиды. Липидный и углеводный состав вириона определяется клеткой хозяина, но модифицируется суперкапсидными белками. Липиды стабилизируют структуру сложных вирионов.

*Ферменты вирусов.* В отличие от прокариотов и клеток всех других организмов, вирусы лишены ферментов, участвующих в многочисленных метаболических реакциях. Однако многие вирусы содержат в составе капсидов одну или две группы ферментов, которые участвуют в процессах репликации и транскрипции или в проникновении вирусной нуклеиновой кислоты в клетку хозяина и выходе образовавшихся вирионов (нейраминидаза, АТФ-аза и др.).

Ферменты вирусов подразделяют на вирионные и вирус - индуцированные. Вирионные – ферменты транскрипции и репликации (ДНК- и РНК-полимеразы), обнаруженные у многих вирусов (обратная транскриптаза ретровирусов), а также эндо- и экзонуклеазы, АТФ-аза, нейраминидаза отдельных вирусов.

Вирусиндуцированные – ферменты, структура которых закодирована в вирусном геноме. К ним относятся РНК-полимераза пикорна-, тога-, орто- и парамиксовирусов, а также ДНК-полимераза покс- и герпесвирусов.

Наряду с собственными ферментами вирусы используют и клеточные, которые не являются вирусспецифическими. Однако их активность может модифицироваться в процессе репродукции вируса.

*Типы взаимодействия вируса с клеткой.* Вирусы – облигатные внутриклеточные паразиты, способные только к внутриклеточному размножению. В вирусинфицированной клетке возможно пребывание вирусов в различных состояниях: воспроизводство многочисленных новых вирионов; пребывание нуклеиновой кислоты вируса в интегрированном состоянии с хромосомой клетки (провирус); существование в цитоплазме клетки в виде кольцевых нуклеиновых кислот, напоминающих плазмиды бактерий. Поэтому диапазон нарушений, вызываемых вирусом, весьма широк: от выраженной продуктивной инфекции, завершающейся гибелью клетки, до продолжительного взаимодействия вируса с клеткой в виде латентной инфекции или злокачественной трансформации клетки.

Различают три типа взаимодействия вируса с клеткой: продуктивный, abortивный и интегративный:

продуктивный тип – завершается образованием нового поколения вирионов и гибелью (лизисом) зараженных клеток (цитолитическая форма). Некоторые вирусы выходят из клеток, не разрушая их (нецитолитическая форма);

abortивный тип – не завершается образованием новых вирионов, так как инфекционный процесс в клетке прерывается на какой-либо промежуточной стадии;

интегративный тип (виrogenия) – характеризуется встраиванием (интеграцией) вирусной ДНК в виде провируса в хромосому клетки и их совместным сосуществованием (совместная репликация). При этом нуклеиновая кислота вируса не способна к автономной репродукции. Частным случаем виrogenии является лизогения.

*Бактериофаги* – бактериальные вирусы, вызывающие разрушение (лизис) бактерий и других микроорганизмов. Бактериофаги размножаются в клетках, лизируют их и переходят в другие клетки.

Впервые явление бактериофагии наблюдал в 1917 г. французский микробиолог Ф. Д'Эрелль. Изучая возбудителя дизентерии, он наблюдал лизис бактериальной культуры при внесении в нее фильтрата испражнений больных людей. Лизирующее начало сохранялось при многократном пассировании культуры дизентерийных бактерий и даже становилось более активным. Агент, растворяющий бактерии, ученый называл бактериофагом («пожиратель» бактерий от лат. *phagos* – пожирающий), а действие бактериофага, заканчивающееся лизисом бактерий, – феноменом бактериофагии.

Вместе с тем Д'Эрелль правильно оценил биологический смысл открытого им феномена. Он высказал предположение, что бактериофаг является инфекционным агентом, лизирующим бактерии, вследствие чего в окружающую среду поступают дочерние фаговые частицы. На твердых средах, засеянных смесью фага с бактериальной культурой, в местах лизиса бактерий появляются стерильные пятна или негативные колонии фагов. Посев этой же бактериальной культуры на жидкую среду приводит к просветлению среды. Позднее было показано, что фаги являются бактериальными вирусами, имеющими в качестве хозяев бактерии определенных видов. Номенклатура бактериофагов основана на видовом наименовании хозяина. Например, фаги, лизирующие дизентерийные бактерии, получили название дизентерийных бактериофагов, сальмонеллы – сальмонеллезных бактериофагов, дифтерийные бактерии – дифтерийных бактериофагов и т. д.

В истории микробиологии изучение феномена бактериофагии занимает особое место. Простота культивирования, короткий период генерации, высокий выход фагового потомства и возможность точного его количественного учета способствовали успешному изучению многих проблем молекулярной генетики и общей вирусологии. В частности, в системе «фаг □ бактериальная клетка» впервые было открыто явление лизогении, получившее позднее название интегративной инфекции.

Структура. Фаги состоят из головки и хвоста (отростка), по форме напоминают сперматозоид. У некоторых фагов отросток очень короткий или совсем отсутствует. Размеры фагов варьируют от 20 до 200 нм: диаметр головки достигает обычно 60-95 нм, длина отростка – 250 нм, ширина – 10-25 нм. В головке фага находится нуклеиновая кислота, окруженная белковой оболочкой (капсидом). Размеры молекулы ДНК во много раз превышают величину самого фага. Наиболее изучены фаги кишечной палочки, имеющие сложное строение (рис. 8). Они состоят из головки, хвоста (отростка) и базальной пластинки с отходящими от нее нитями. Головка имеет вид многогранника (кубический тип симметрии), отросток представляет собой полую жесткую трубку, окруженную чехлом с капсомерами спирального типа укладки. Базальная пластинка и нити осуществляют процесс адсорбции фага на бактериальной клетке.

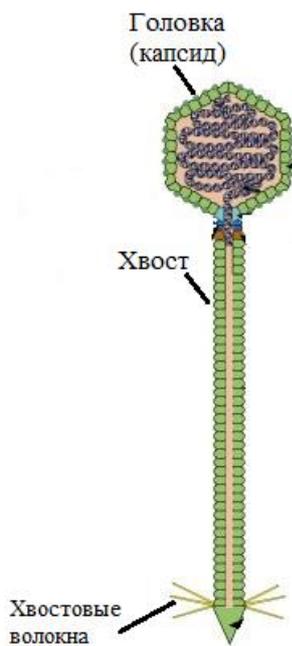


Рисунок 8 – Основные структуры бактериофага (на примере фага лямбда)

*Химический состав.* Фаги, как и другие вирусы, состоят из нуклеиновой кислоты и белка. Большинство их них содержат двунитевую ДНК, которая замкнута в кольцо, однако некоторые – и однонитевую ДНК. Некоторые фаги содержат РНК.

В частицах некоторых фагов под чехлом дистальной части отростка содержится фермент лизоцим. Внутри головки у некоторых фагов обнаружен внутренний белок, в состав которого входят полиамины (спермин, путресцин). Этот белок играет определенную роль в суперспирализации фаговой ДНК, которая только в таком виде может разместиться в сравнительно небольшой головке.

*Резистентность к факторам окружающей среды.* Фаги более устойчивы к действию физических и химических факторов, чем многие вирусы человека. Большинство из них инактивируются при температуре свыше 65-70 °С. Они хорошо переносят замораживание и длительно сохраняются при низких температурах и высушивании. Сулема (0,5%-й раствор), фенол (1%-й раствор) не оказывают на них инактивирующего действия. В то же время 1%-й раствор формалина инактивирует фаг через несколько минут. Ультрафиолетовые лучи и ионизирующая радиация также вызывают инактивирующий эффект, а в низких дозах – мутации.

*Практическое применение бактериофагов.* Строгая специфичность бактериофагов позволяет использовать их для фаготипирования и дифференцировки бактериальных культур, а также для индикации их во внешней среде, например, в водоемах.

Метод фаготипирования бактерий широко применяется в микробиологической практике. Он позволяет не только определить видовую принадлежность исследуемой культуры, но и ее фаготип (фаговар). Это связано с тем, что у бактерий одного и того же вида имеются рецепторы, адсорбирующие строго определенные фаги, которые затем вызывают их лизис. Использование наборов таких типоспецифических фагов позволяет проводить фаготипирование исследуемых культур с целью эпидемиологического анализа инфекционных заболеваний – установления источника инфекции и путей ее передачи.

Также по наличию фагов во внешней среде (водоемах) можно судить о содержании в них соответствующих бактерий, представляющих опасность для здоровья человека. Данный метод индикации патогенных бактерий также применяется в эпидемиологической практике. Его эффективность повышается при постановке реакции нарастания титра фага, которая основана на способности специфических линий фагов репродуцироваться на строго определенных бактериальных культурах. При внесении такого фага в исследуемый материал, содержащий искомый возбудитель, происходит нарастание его титра. Широкое использование реакции нарастания титра фага осложняется трудностью получения индикаторных наборов фагов и другими причинами.

Применение фагов с лечебными и профилактическими целями проводится сравнительно редко. Это связано с большим количеством отрицательных результатов, которые объясняются следующими причинами:

- строгой специфичностью фагов, лизирующих только те клетки бактериальной популяции, которые снабжены соответствующими рецепторами, вследствие чего фагорезистентные особи, имеющиеся в каждой популяции, полностью сохраняют свою жизнеспособность;
- широким применением более эффективных этиотропных средств – антибиотиков, не обладающих специфичностью бактериофагов.

В настоящее время выпускаются препараты дизентерийного, сальмонеллезных, колипротейного, стафилококкового и других бактериофагов, а также наборы для фаготипирования брюшнотифозных бактерий, стафилококков и др. Последние широко применяются с эпидемиологическими целями для установления источника инфекции. Так, например, в случае выделения от разных больных бактериальных культур, принадлежащих не только к одному виду, но и к одному фаготипу, можно считать, что они заразились из одного и того же источника инфекции. В случае выделения разных фаготипов следует искать несколько источников инфекции.

Препараты бактериофагов применяются для лечения дизентерии, сальмонеллеза, гнойной инфекции, вызванных антибиотикорезистентными бактериями. При этом в каждом случае предварительно определяют чувствительность выделенных возбудителей к данному препарату бактериофага.

Сальмонеллезные фаги применяются для профилактики одноименного заболевания в детских коллективах.

*Вироиды* (англ. *viroids*, от *virus* и греч. *eidōs* – сходство) – новая группа инфекционных агентов, вызывающих у растений поражения, сходные с вирусными, однако эти возбудители отличаются от вирусов рядом признаков.

Вироиды были открыты в 1971 г. Теодором О. Динером. Он же предложил термин «вириод», то есть «вирусоподобный». Первым идентифицированным вириодом был вириод веретеновидности клубней картофеля (*potato spindle tuber viroid*, PSTV).

Отличительные признаки вириодов в сравнении с вирусами: отсутствие белковой оболочки – вириоды представлены «голой» инфекционной одноцепочечной РНК, которая имеет кольцевую структуру, малые размеры (молекулярная масса всего 120 000-160 000).

В настоящее время вириоды – самые примитивные биологические единицы, их размеры составляют примерно одну восьмидесятую от размера типичного вируса.

*Таксономия.* Таксономический статус группы вириодов не определен. По данным Международного комитета по таксономии вирусов (2015 г.), семейства вириодов рассматриваются

в числе семейств вирусов, не относящихся к определенному порядку. В 2016 г. было предложено включить вириды в состав царства *Acyota*, содержащего бесклеточные живые организмы.

**Структура виридов.** Вириды – низкомолекулярные (примерно 250-400 нуклеотидов) односпиральные, ковалентно связанные кольцевые молекулы РНК, не имеющие белковой оболочки. Некоторые вириды находятся в ядре или ядрышке инфицированной растительной клетки, другие – располагаются в хлоропластах. В зависимости от особенностей вторичной структуры РНК вириды разделены на три основные модели: палочковидная, квазипалочковидная и разветвленная (рис. 9):

палочковидная структура – представляет собой двуспиральные участки РНК, разделенные короткими внутренними одноцепочечными петлями (вириод веретеновидности клубней картофеля);

квазипалочковидная – отличается наличием в структуре «терминальных шпилек» в левой части молекулы, которые отходят от центральной (коровой) части (вириод солнечного ожога авокадо);

разветвленная – сложная структура (вириод латентной мозаики персика, хлоротической крапчатости хризантем и др.).

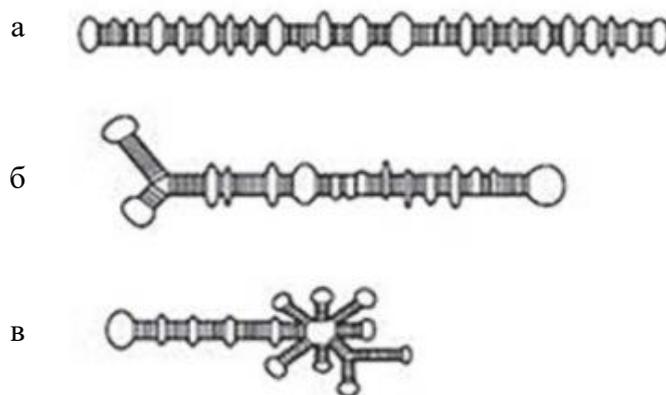


Рисунок 9 – Схема вторичной структуры виридов: а – палочковидная, б – квазипалочковидная, в – разветвленная

Так как РНК виридов не кодирует каких-либо белков, вириды не могут реплицироваться сами по себе. Предполагается, что для этих целей они используют ДНК-зависимую РНК-полимеразу клетки хозяина, то есть фермент, который обычно используется для синтеза РНК на матрице ДНК. Однако в инфицированной виридом клетке этот фермент использует не ДНК клетки-хозяина, а РНК вирида – как матрицу для синтеза новых РНК вирида.

**Классификация** виридов основана на нуклеотидной последовательности и наличии так называемой центральной консервативной области (ЦКО). Если нуклеотидные последовательности сравниваемых виридов совпадают на 90 % и более, их считают вариантами одного вида, менее чем на 90 % — разными видами. Все вириды разделены на два семейства: *Pospiviroidae* и *Avsunviroidae*.

Вириды семейства *Avsunviroidae* не имеют ЦКО, способны катализировать саморасщепление мультимеров, образующихся в ходе репликации, и реплицируются в хлоропластах. К этому семейству относятся вириды, вызывающие латентную мозаику персика, хлоротическую крапчатость хризантем, вириод солнечного ожога авокадо и др.

Вириды семейства *Pospiviroidae* имеют ЦКО, реплицируются в ядрах и (или) ядрышках, но не способны саморасщепляться. К семейству *Pospiviroidae* относятся вириды,

вызывающие веретеновидность клубней картофеля, желтую крапчатость винограда, морщинистость плодов яблони и др.

*Патогенность.* Вироиды являются патогенами только для растений. К настоящему времени изучено более 30 возбудителей виroidных заболеваний, многие из которых поражают экономически важные культуры – картофель, томаты, цитрусовые, виноград, фруктовые и декоративные растения. Некоторые виroidы (возбудители экзокортиса цитрусовых, веретеновидности клубней картофеля, болезни каданг-каданг кокосовых пальм, карликовости хризантем, латентной мозаики персика) существенно (иногда на 100 %) снижают урожай, ухудшают товарные качества продукции и во многих странах входят в список организмов, имеющих карантинное значение.

Растение, зараженное виroidом, может не проявлять никаких симптомов. Однако тот же самый виroid может вызывать серьезную болезнь у другого вида растений. Основы патогенности виroidов до конца не изучены, однако известно, что для ее проявления необходимы некоторые участки виroidной РНК. Известно, что виroidы вызывают болезнь, активируя механизмы РНК-сайленсинга в растительной клетке (сайленсинг генов от англ. *gene silencing* – выключение гена). Механизмы РНК-сайленсинга в норме работают для защиты клетки от вирусов, чей геном представлен двуцепочечной РНК. При РНК-сайленсинге клетка распознает РНК и селективно разрушает ее. Вироиды могут вмешиваться в этот процесс, комплементарно связываясь (гибридизуясь) со специфическими молекулами РНК клетки-хозяина. Образование гибридных двуцепочечных РНК из РНК виroidа и клетки запускает РНК-сайленсинг, направленный на разрушение гибридного комплекса. В результате разрушается мРНК клетки-хозяина и происходит сайленсинг ее определенных генов. Невозможность экспрессировать важный ген обуславливает болезнь у растения-хозяина. Однако существуют предположения и о других механизмах действия виroidов на растительные клетки.

*Идентификация виroidов.* Некоторые виroidы находятся в ядрышке инфицированной растительной клетки, другие располагаются в хлоропластах. Поскольку у виroidов нет белковой оболочки, они не проявляют выраженных иммуногенных свойств, и поэтому их нельзя идентифицировать серологическими методами.

Основным методом идентификации виroidов является полиакриламидный гель-электрофорез (PAGE). В последнее время применяют также ПЦР.

Вызывая заболевания экономически важных культурных и декоративных растений, виroidы оказывают большое влияние на мировое сельское хозяйство. К настоящему моменту виroidные заболевания распространены на всех континентах. В 2014 г. Европейско-средиземноморская организация по защите растений включила в список патогенов растений, требующих объявления карантина, три вида виroidов из семейства *Pospiviroidae*: виroid каданг-каданга кокосовой пальмы, виroid карликовости хризантемы и виroid веретеновидности клубней картофеля. Еще один вид – виroid апикальной карликовости помидоров – попал в список патогенов, вызывающих серьезные опасения.

В настоящее время виroidы также используются для изучения эволюционных связей между РНК- и ДНК-геномами. Они являются идеальными биологическими молекулами для изучения связей структуры и функций молекул РНК. Так, виroid карликовости хризантемы может использоваться для моделирования виroidных заболеваний с целью их изучения и разработки методов борьбы. Его можно быстро и легко ввести в клетки листа хризантемы с помощью агробактерий. В качестве модельной экспериментальной системы для виroidов семейства *Pospiviroidae* обычно используется виroid веретеновидности клубней картофеля, а для изучения виroidов семейства *Avsunviroidae* больше всего подходит бессимптомный латентный виroid баклажана.

Открытие виroidов как новой группы патогенов растений – одно из крупнейших событий в биологии второй половины XX в. Развитие методов исследований и многочисленные работы по изучению виroidов привели к выявлению и описанию свойств новых возбудителей виroidных заболеваний.

Однако многие вопросы, касающиеся природы виroidов, их размножения, механизмов патогенеза растений, окончательно еще не выяснены.

*Прионы* – принципиально новая группа возбудителей инфекционных заболеваний животных и человека, для которых характерны дегенеративные изменения в центральной нервной системе (губчатые энцефалопатии) и которые заканчиваются фатально.

Термин «прион» – образован как анаграмма трех английских слов – *Proteinacious infectious particle*, означающих «белковая инфекционная частица». Образован по аналогии со словом «вирион». Термин «прион» предложил в 1982 г. американский биохимик Стенли Прузинер, в 1997 г. ему была присуждена Нобелевская премия за изучение прионов.

Прионы отнесены к царству *Vira*. С вирусами их объединяет ряд свойств: отсутствие клеточной структуры, малые размеры (проходят через бактериальные фильтры с диаметром пор 25-100 нм), неспособность размножаться на искусственных питательных средах, способность к репродукции только в живых клетках, штаммовая вариабельность, инфекционность, патогенность.

В то же время ряд свойств присущи только прионам. В отличие от канонических вирусов, они представлены низкомолекулярным белком, не содержат генетического материала (отсутствуют ДНК, РНК), могут реплицировать себя в отсутствие нуклеиновой кислоты, устойчивы к действию многих вирулицидных факторов, а материалом, полученным от погибших животных и людей, невозможно заразить клеточные культуры. Не вызывают воспаления и иммунного ответа в инфицированном организме, не способны к индукции интерферона и не чувствительны к нему.

Таким образом, прионы – безнуклеиновые белковые инфекционные структуры. На электронных фотографиях прионы представлены в виде скоплений мелких палочек, агрегатов, пучков с волокнистой структурой.

*Структура прионов.* Существуют две формы (изоформы) прионного белка: нормальная и инфекционная (патологическая) (рис. 10). Нормальная обозначается PrP<sup>C</sup> (от *prionprotein of cell*), а инфекционная – PrP<sup>Sc</sup> (Sc – от слова *scrapie* – почесуха. Эта болезнь овец – первое описанное прионное заболевание).

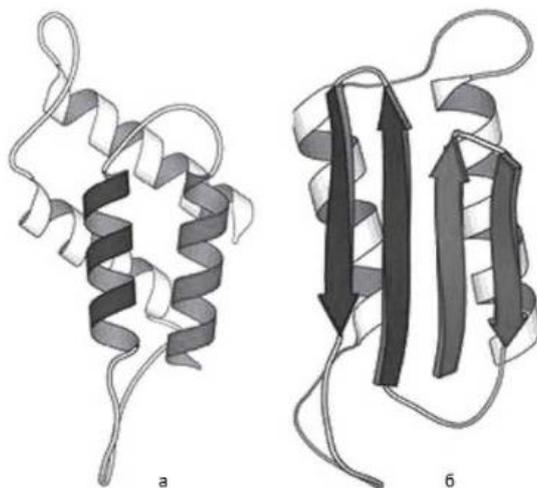


Рисунок 10 – Изоформы прионного белка: а – нормальная, б – патологическая

Нормальная изоформа прионного белка (PrP<sup>C</sup>) находится в нормальных клетках, обнаруживается в организме всех млекопитающих, включая и человека. Ген, кодирующий PrP, содержится в двадцатой хромосоме человека – то есть он имеется в ДНК любого человека и не представляет опасности. Особенно высока его концентрация в нейронах головного мозга. Это короткоживущий белок (период полураспада 5-6 часов), появляется на поверхности клетки, чувствителен к протеазе. В настоящее время полагают, что эта форма прионного белка выполняет ряд важных функций: регулирует суточные циклы гормонов, передачу нервных импульсов, поддерживает циркадианные ритмы и метаболизм меди в ЦНС, принимает участие в механизме старения мозга и нервной системы.

Инфекционная (патологическая) изоформа прионного белка (PrP<sup>Sc</sup>) способна превращать нормальный белок (PrP<sup>C</sup>) в инфекционную форму, изменяя его конформацию (то есть третичную структуру). Это, в свою очередь, изменяет взаимодействия PrP с другими белками, что и приводит к патологии.

Таким образом, процесс накопления инфекционного (патологического) прионного белка происходит не в результате синтеза в зараженном организме молекул PrP<sup>Sc</sup>, а вследствие конформационных изменений уже синтезированных перед этим нормальных молекул PrP<sup>C</sup> под влиянием инфекционного белка.

Риск преобразования нормальной формы прионного белка в инфекционную форму минимален, большинство людей живут без риска прионных заболеваний. Однако даже одна ошибка в синтезе белка может привести к развитию этого процесса.

Таким образом, прионы – это обычные белки, которые приобрели необычную структуру. Это позволяет им менять структуру аналогичных белков, также превращая их в прионы, то есть происходит процесс, подобный заражению.

Для начала заболевания необходимо появление первого поврежденного белка – это может произойти либо в результате спонтанной ошибки при его синтезе (за счет мутаций в гене, кодирующем белок), либо инфекционным путем (при употреблении в пищу недостаточно хорошо прожаренного или сваренного мяса (в котором должна присутствовать форма PrP<sup>Sc</sup>), при переливании крови, при трансплантации органов и тканей, при введении гормонов гипофиза животного происхождения и др.). Как результат – нормальные молекулы белка, контактируя с патологическими, сами превращаются в них, изменяя свою пространственную структуру (механизм трансформации остается не совсем ясным до настоящего времени).

Таким образом прион, как самый настоящий инфекционный агент, заражает нормальные молекулы, запуская цепную реакцию, разрушительную для клетки.

При патологии в головном мозге накапливается модифицированная (патологическая) форма прионного белка. Она отличается от нормальной формы рядом свойств: устойчивостью к протеолизу (действию нуклеаз и протеаз), излучениям, высокой температуре; способностью к агрегации в амилоидные фибриллы, гидрофобностью. Патологическая форма прионного белка накапливается в плазматических везикулах клетки, что приводит к последующему нарушению функций синапсов и развитию глубоких неврологических дефектов. Позднее PrP<sup>Sc</sup> высвобождается во внеклеточное пространство и откладывается в амилоидных бляшках.

Таким образом, причины конформационного перехода PrP<sup>C</sup> в PrP<sup>Sc</sup>:

- спонтанная (мутации в гене, кодирующем белок), которые могут приводить к спорадическим формам прионных болезней;
- инфекционная (поступление в организм патологической формы PrP<sup>Sc</sup> извне), которые могут приводить к развитию приобретенных форм прионных заболеваний.

Установлено, что белок в прионной конформации представляет собой агрегат в виде высокоупорядоченных фибрилл, к концам которых может присоединяться нормальный клеточный растворимый белок, и само это связывание, по-видимому, и является тем фактором, который вызывает изменение конформации. При этом белок, находящийся в агрегированном состоянии, не способен далее осуществлять свою нормальную клеточную функцию.

*Происхождение прионов.* В настоящее время нет единой версии относительно происхождения прионов. Некоторые исследователи полагают, что в норме в организме постоянно возникает некоторое количество прионных белковых образований, которые тут же ликвидируются. Нарушение по каким-то причинам способности к «самоочищению» клеток (спонтанные изменения под действием внешнего фактора, мутации клеток) приводит к нарастанию концентрации «неправильных» белков выше допустимого уровня, после чего процесс выходит из-под контроля. Подобный механизм объясняет появление болезни куру в генетически изолированной популяции (оторванном от цивилизации племени), а ритуальный каннибализм – механизм ее распространения.

Установление природы прионов, как нового класса инфекционных агентов, относится к числу величайших открытий XX в. Как и любые исследования в области биологии, изучение прионных белков расширяет границы наших знаний о живом. С практической точки зрения результаты помогут понять, как развивается ряд опасных, пока еще неизлечимых заболеваний. Возможно, изучение прионов позволит получить и инструмент для борьбы с ними. Например, если до конца понять, как из нормального белка получается аномальный, и научиться контролировать этот процесс, то возможно будет запускать этот процесс и в обратную сторону – то есть превращать патологические белки в здоровые.

Мы постарались описать клеточные и неклеточные объекты, большая часть из которых является или будет являться предметом приложения различных направлений биотехнологии. В зависимости от вида объекта можно выделить микробиотехнологию, фитобиотехнологию и зообиотехнологию. Современная биотехнология является преимущественно микробиотехнологией, так как наиболее часто в качестве ее объектов применяются микроорганизмы, но доминирование микробиотехнологии не так однозначно. Чаще всего подобное доминирование связывают с определенными условиями ведения биотехнологического процесса, а именно быстрым размножением микроорганизмов в питательных средах. Относительная простота строения генетического аппарата и наличие плазмид у бактерий также играет на руку микробиотехнологии, позволяя ей пользоваться инструментами геной инженерии.

Наибольший интерес для биотехнологии представляют микроскопические грибы, к которым относятся дрожжи, плесневые и другие микроорганизмы, применяемые в хлебопечении, пивоварении и в молочной промышленности. Они используются также для получения спиртов, органических кислот, антибиотиков, различных биологически активных веществ и кормового белка. Микроскопические грибы, характеризующиеся высоким разнообразием видов и форм, широко применяются для производства кормовых добавок, богатых белками и витаминами, а также для получения антибиотиков. В ряде стран из грибов получают белки пищевого назначения – микопротеины.

Водоросли, являющиеся водными организмами, отличаются от высших растений тем, что не имеют органов и тканей, а представляют собой слоевища, состоящие из недифференцированных (одинаковых) клеток. Как и другие растения, водоросли обладают способностью к фотосинтезу и богаты различными углеводами и пигментами. Один из видов водорослей – морская капуста используется в пищу. Из водорослей добывают агар-агар и альгинаты – полисахариды, используемые для изготовления микробиологических сред и в пищевой промышленности.

У высших растений особое значение для биотехнологии имеет одна из тканей, называемая меристемой. Клетки меристемы способны к делению, благодаря чему осуществляется рост, а также образование тканей и органов растений. Они не утрачивают способности делиться и после удаления из растения. При выращивании на специальных питательных средах меристемные клетки дают массу делящихся клеток – *каллус*, который можно длительно культивировать, получать из него новые растения или использовать для извлечения нужных веществ. Наиболее сложным, но в то же время и неизмеримо более эффективным, является выращивание отдельных растительных клеток в жидких средах (в суспензионных культурах). Благодаря способности растений улавливать световую энергию солнца и использовать ее в синтезе органических веществ, растения служат поставщиками питательных веществ для других организмов. Растения составляют большую часть биомассы Земли, поэтому производство и переработка растительного сырья для удовлетворения различных потребностей человека используется с древнейших времен. Являясь богатейшими и незаменимыми источниками разнообразных углеводов, липидов, витаминов и многих других физиологически активных и лекарственных веществ, растения служат прежде всего для их получения. При этом до настоящего времени, несмотря на выдающиеся достижения биотехнологии, используются традиционные способы извлечения биогенных соединений: экстракция, перегонка, фильтрация. Однако все

большую роль приобретают технологии получения биологически активных веществ из клеточных культур (биостимуляторы из женьшеня, противораковое средство таксол из коры тиса и др.), а также производство продуктов из генетически модифицированных растений.

Интенсивно развивающаяся фитобиотехнология основана на культивировании каллусных тканей или клеток растений. В генной инженерии используют также протопласты – клетки растений, лишенные стенок. Растительные клетки служат источниками многих лекарственных препаратов и других биологически активных веществ.

Самостоятельной ветвью биотехнологии является зообиотехнология, в которой используются клетки животных и человека. Культивирование клеток животных – наиболее трудоемкий и сложный процесс. Тем не менее, в настоящее время разработаны способы промышленного получения противовирусного белка интерферона из лимфобластов человека и моноклональных антител. Они основаны на том, что клетки-гибридомы образуются при слиянии лимфобластов человека (опухолевые клетки, способные к неограниченному росту) и моноклональных антител (которые вырабатывают лимфоциты). Именно такие гибридомы и способны синтезировать белок интерферон. Хотя, необходимо заметить, что данный промышленный способ выработки интерферона пока не конкурирует с уже ставшим традиционным способом производства с помощью плазмид *E. coli*.

Эмбриональные ткани используются для репродукции вирусов и в производстве противовирусных вакцин. Клетки и ткани животных являются также источниками высокоэффективных иммуномодуляторов, применяющихся для коррекции нарушений иммунитета. Большие надежды возлагаются на биотехнологию в решении наиболее актуальных проблем, имеющих жизненно важное значение для выживания всего человечества: производство пищевого белка и разработка новых способов получения энергии.

Некоторые простейшие выращиваются и используются для целей биоиндикации, в токсикологических исследованиях и для получения отдельных веществ.

Ткани высших животных являются источниками полноценного белка, липидных веществ и некоторых витаминов, необходимых для питания человека. Из органов и крови животных получают различные белковые препараты (альбумин, иммуноглобулины, ферменты), некоторые гормоны и другие биологически активные вещества. Поскольку сырье животного происхождения является наиболее дорогим, а выход конечных продуктов недостаточно высок, то в современных технологиях все чаще используются культуры клеток животных или человека, выращиваемых на искусственных средах (получение интерферона, моноклональных антител). Наиболее перспективным и экономичным способом производства биологически активных веществ является генная инженерия, позволяющая внедрить ген животного в клетку бактерии, которая начинает синтезировать нужное вещество. Так получают в настоящее время человеческий инсулин – гормон белковой природы, без которого невозможен нормальный обмен веществ, гормон роста и некоторые другие вещества.

### **Контрольные вопросы (задания)**

12. Назовите основные биологические объекты биотехнологий.
13. На какие царства (домены) разделяют клеточные формы, согласно систематике Карла Вёзе?
14. Какой раздел систематики изучает принадлежность изучаемого организма к тому или иному таксону?
15. Какие организмы относятся к царству Vira?
16. Какие микроорганизмы, по-вашему мнению, появились одними из первых?
17. Дайте определение понятию «живая клетка».
18. Охарактеризуйте основные компоненты живой клетки прокариот и эукариот.
19. Перечислите органеллы клетки основного значения, охарактеризуйте любые 3 органеллы. Какие из них относят к мембранным органеллам?
20. Охарактеризуйте строение и функциональное значение плазмолеммы живых организмов.

21. Перечислите виды ЭПС и их значение для клетки.
22. Чем представлен аппарат внутриклеточного переваривания?
23. Опишите органеллы клетки, синтезирующие АТФ.
24. Что представляет цитоскелет клетки?
25. Назовите временные компоненты клетки, их классификацию и отличия.
26. Охарактеризуйте генетический аппарат клетки.
27. Чем отличаются предковые прокариоты от эукариот?
28. Укажите особенности представителей царства вирусов от прокариотов и эукариотов.
29. Какие виды биотехнологий можно выделить в зависимости от объектов?

### 3 Методы биотехнологий

Методы биотехнологий связаны с революционными изменениями в биологии, вышедшей, как лидер естествознания, на молекулярный и субклеточный уровень. Методы биотехнологий подразумевают применение биологических систем и процессов в решении различных проблем: диагностика и лечение онкологических болезней, дефицит чистой воды и пищевых веществ (в особенности белковых), загрязнение окружающей среды, недостаток сырьевых и энергетических ресурсов и др. (табл. 1).

Таблица 1 – Направления биотехнологий, определяющие развитие областей науки

Направление биотехнологии	Объект технологий	Пример метода и его использование в области науки
Генетическая инженерия	Рекомбинантные ДНК	CRISPR/CAS – метод редактирования геномов высших организмов, а также исследовательский инструмент в эмбриологии [9]; Метод создания искусственного генома; Метод создания дизайнерских растительных и животных организмов; РНК-интерференция – метод подавления экспрессии генов в присутствии коротких фрагментов РНК; Секвенирование
Тканевая инженерия	Органы и ткани живых организмов	3D-печать – метод создания искусственных органов и тканей
Биокатализ	Ферменты, целые микробные клетки	Методы получения амилалитических и протеолитических ферментов, используемых в химической, пищевой и других отраслях
Иммунология	Моноклональные антитела	CAR-T – метод лечения генетически модифицированными Т-клетками онкологических болезней
Технология ферментации	Продукты питания, БАВ, отходы	Методы ферментации в пищевой промышленности: умягчение мяса, свертывание молока в сыроделии, осветление соков и т. д.
Биомедицина, биофармацевтика	ДНК, лекарства	GWAS – статистический метод, определяющий значимость различия выбранного участка гена (снипа SNP) между группами больных и здоровых людей, определяет связь между вариантами генов и фенотипическими проявлениями; ДНК-микрочипы (небольшие пластинки, на которые нанесены и прикреплены молекулы ДНК, комплементарные РНК изучаемых генов); Драг-дизайн – метод конструирования лекарственных препаратов; Квантовые точки (флуоресцентные полупроводниковые нанокристаллы) – метод с использованием наноматериала с особыми спектральными характеристиками; Оптогенетика – метод управления нервными и мышечными клетками живого организма с помощью света; Секвенирование – метод определения полной нуклеотидной последовательности; Чипы органы – метод моделирования органа, с последующим тестированием лекарства;

С незапамятных времен люди стремились улучшить качество и свойства используемых живых организмов, начав с одомашнивания и продолжив свое стремление улучшать в селекции. Для этого у растений они выбирали лучшие плоды и самые крупные зерна, бессознательно изменяя растения в нужном направлении. С развитием генетики, открывшей законы наследственности и изменчивости, появилась возможность осознанно управлять передачей необходимых признаков. Экспериментаторы поняли, что методом простого отбора человек не может получить принципиально новых свойств у разводимых организмов, так как при отборе можно выделить только те генотипы, которые уже существуют в популяции. Поэтому для получения новых сортов растений стали применять гибридизацию – скрещивание организмов с желаемыми признаками. Несмотря на то, что этот метод используется уже более века, процесс создания новых сортов остается очень трудоемким и требует многих лет напряженной работы. До сих пор селекционеры путем скрещивания пытаются улучшить особенности растений, создать более урожайные сорта и новые породы домашнего скота. Это примеры достаточно архаичных подходов, которые можно отнести к биологическим технологиям (рис. 11) [4].

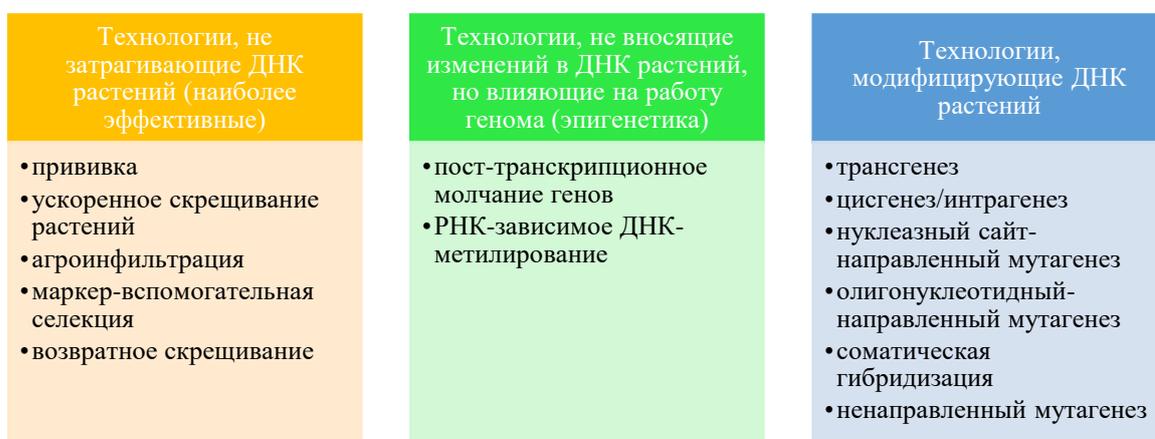


Рисунок 11 – Распространенные методы селекции растений, ориентированные на различную степень воздействия на ДНК организма (не являются методиками как таковыми, а представляют собой концепции, подчиняющие процессы трансформирования ДНК определенным правилам).

Уже традиционно к современным биотехнологическим методам относят методы клеточной и генной инженерии. В основе клеточной инженерии – создание и модификация клеток, получение новых клеток из уже существующих. Для этого в лабораториях проводятся многочисленные опыты, в ходе которых соединяются свойства разных клеток для получения новой.

Генная инженерия действует на генетическом уровне, используя найденные новые комбинации генов, с целью получения нового свойства клетки, организма [37, 38].

В результатах генной инженерии заинтересовано современное сельское хозяйство, поскольку испытывает острую необходимость в новых сортах, отличающихся устойчивостью к воздействию биотических и абиотических факторов окружающей среды, высокой продуктивностью и продолжительными сроками хранения урожая. На сегодняшний день показано, что такими качествами обладают дикие предки культивируемых растений. Чтобы передать их «полезные» гены современным сортам, необходимо проведение межвидового скрещивания, которое технологически сложнее и возможно далеко не для всех культур в силу генетической несовместимости.

Выход из этой ситуации появился с развитием генетической инженерии, которая сделала возможным перенос генов из одного организма в другой.

Генетически модифицированный организм (ГМО) – организм, генотип которого был целенаправленно изменен при помощи методов генной инженерии. Основными способами

биотехнологического изменения генома растений являются: искусственный мутагенез (физический и химический), трансгенез – введение гена неродственного организма, интрагенез – введение гена самого организма или его «выключение», а также цисгенез – введение гена близкородственного вида, с которым возможно природное скрещивание.

Искусственный мутагенез как биотехнологический метод отличается низкой эффективностью, так как мутации в геноме, появляющиеся в результате грубой обработки мутагеном, могут кроме желаемого улучшения признака привести и нежелательные характеристики, да и приобретенное желательное свойство может не передаваться по наследству следующему поколению. Так, семена растений обрабатывали жестким излучением из кобальтовых пушек с целью мутации, изменяющей ген, отвечающий за синтез белка. Но с помощью мутации невозможно изменить только один ген, который кодирует интересующий исследователя белок. Под действием химических или физических мутагенных факторов происходят нарушения структуры ДНК в разных участках, поэтому наряду с положительными можно получить и трудно прогнозируемые отрицательные результаты.

Совершенно новые возможности открывает перед биотехнологиями создание рекомбинантных ДНК, т. е. молекул со встроенными участками (генами), взятыми из другого организма – трансгенез. Известно, что скрещивание или гибридизация возможны только внутри одного вида, тогда как методом генной инженерии можно получить молекулу бактериальной ДНК с встроенным в нее геном человека или животного. Первая рекомбинантная ДНК была получена в США в 1972 г., а десятью годами позже уже поступил в продажу человеческий инсулин (гормон, которого не хватает у больных сахарным диабетом), вырабатываемый бактериями *E.coli*. В настоящее время с помощью рекомбинантных ДНК производят интерфероны и интерлейкины (факторы иммунитета, применяющиеся при лечении многих заболеваний), гормон роста и другие вещества. Методы получения рекомбинантных ДНК легли в основу нового научно-производственного направления – генной инженерии. Сущность генной инженерии состоит в целенаправленной перестройке генетического аппарата (генома) клеток для изменения их генетических характеристик. Эта задача осуществляется путем создания молекулярных химер ДНК, состоящих из фрагментов разного происхождения, например, из ДНК теленка, ДНК бактерии, или путем включения полученных искусственно ДНК, которых ранее не было в природе, в клетки-реципиенты, с целью синтеза ими определенного белка. Различают также геномную инженерию – получение клеточных гибридов и хромосомную инженерию – перенос целых хромосом из клеток одного организма в клетки другого.

Предпосылкой к исследованиям в генной инженерии послужили два открытия, сделанные в первой половине XX в. Во-первых, было установлено, что вирусы, паразитирующие в бактериях (фаги), встраивают свою ДНК в геном бактерии, во-вторых, оказалось, что в бактериях, невосприимчивых к заражению фагами, содержатся ферменты, которые разрезают двойные спирали фаговых ДНК в строго определенных местах. Эти ферменты назвали рестриктазами. Первой была выделена рестриктаза EcoRI из кишечной палочки. Рестриктаза вносит в ДНК двуцепочечный разрыв (синяя линия на рис. 12) с образованием «липких» концов. «Липкие концы», способные к соединению с комплементарными нуклеотидами других ДНК.



Рисунок 12 – Действие рестриктазы EcoRI на палиндромный участок ДНК

В настоящее время получены сотни рестриктаз из различных бактерий, обладающих специфичностью к участкам (сайтам) ДНК, имеющим палиндромное строение аналогично

сайту для рестриктазы EcoRI. С помощью рестриктаз удается вырезать из молекул ДНК отдельные гены. При этом для соединения фрагментов разрезанной цепи можно использовать другие ферменты – ДНК-лигазы, входящие в состав природных ферментных комплексов. Эти ферменты призваны исправлять (*репарировать*) повреждения в структуре ДНК. Функцию сшивки ДНК-цепи способны выполнять и ферменты *системы рекомбинации*, с помощью которой происходит обмен фрагментами ДНК в процессе образования половых клеток. Итак, благодаря описанным ферментам, стало возможно разрезать ДНК на заданные фрагменты и вновь сшивать их, создавая новые генетические конструкции. Сегодня, как и 30–40 лет назад, эти механизмы активно используют при получении новых вариантов бактериальных и вирусных геномов.

А вот для успешной работы с геномами высших организмов (таких, как растения, животные) этих инструментов оказалось недостаточно. Дело в том, что рестриктазы способны узнавать лишь короткие последовательности ДНК. Такого уровня специфичности вполне достаточно для эффективного расщепления коротких ДНК-цепей бактерий на два или несколько фрагментов, ведь узнаваемые рестриктазами участки встречаются в коротких цепях не так часто. Геномы же высших организмов содержат огромное множество коротких последовательностей нуклеотидов, узнаваемых рестриктазами, поэтому воздействие на один выбранный участок становится невозможным. Для изменения геномов сложных организмов придумали свои инструменты точечного воздействия на определенные участки ДНК: олигонуклеотид-направленный мутагенез растений, нуклеазный сайт-направленный мутагенез с использованием нуклеаз с «цинковыми пальцами», TALENs-нуклеаз и даже мегануклеаз. Наконец, открыли прокариотические иммунные системы CRISPR/Cas.

С открытием в 2012–2013 годах знаменитой технологии CRISPR/Cas9, вызвавшей огромный резонанс в обществе, ученые вплотную подошли к новому рубежу – точному исправлению или редактированию генов и геномов. Возможность для ученых с очень высокой точностью вызывать заданные, контролируемые изменения в геноме живых клеток стала настоящим прорывом и повлекла за собой глобальные изменения как в медицине, так и в селекции.

Основой этой системы стал своеобразный механизм защиты бактерий от бактериофагов: при проникновении вируса в бактерию запускается иммунная реакция, приводящая к расщеплению геномной ДНК неприятеля. На основе бактериальных CRISPR/Cas-систем ученые синтезировали упрощенные искусственные конструкции, включающие белок-киллер Cas9 и обеспечивающие невероятно точную работу по разрезанию ДНК-цепей (рис. 13).

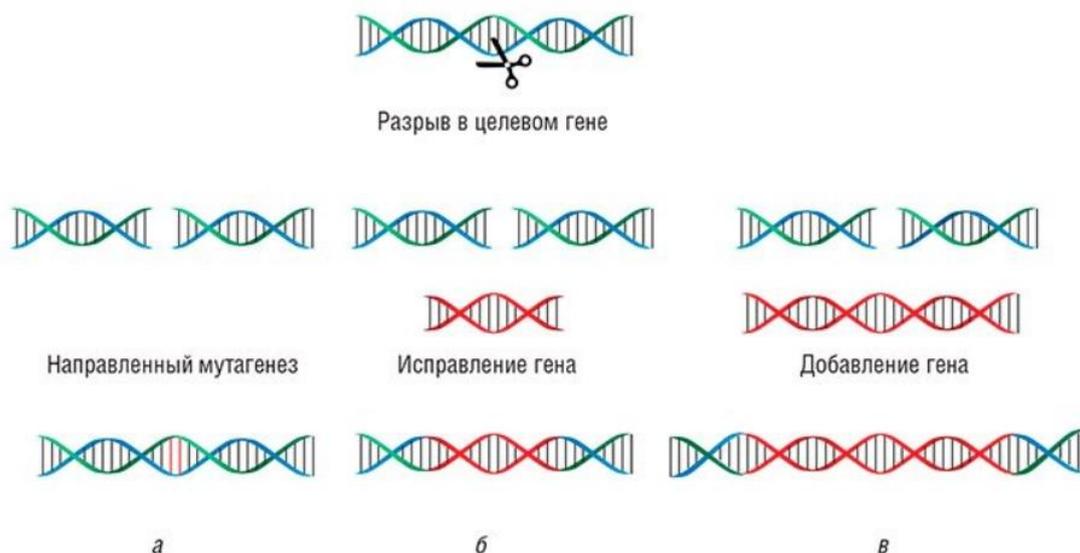


Рисунок 13 – Виды различных воздействий, проводимых с помощью CRISPR/Cas9-конструкции. А – направленный точечный мутагенез; б – замена фрагмента выбранного гена; в — встраивание нового гена

При помощи CRISPR/Cas9-конструкций стало возможным успешно проводить все виды модификаций генома: вносить точечные мутации, встраивать, исправлять, заменять или удалять крупные ДНК-последовательности и фрагменты выбранных генов. С помощью системы CRISPR/Cas9 успешно внесли точные модификации в геном пшеницы и табака, получили новые сорта риса. Решена другая интересная задача – получение растений, способных синтезировать белки человека: инсулин, необходимый для больных сахарным диабетом, и альбумин, применяемый при лечении ожогов и цирроза.

Следующее открытие, которое легло в основу технологии получения рекомбинантных ДНК – обнаружение плазмид в бактериях. Как известно, в клетках животных и высших растений основное количество ДНК сосредоточено в ядре и небольшая часть – в митохондриях (у растений также в хлоропластах). В бактериях, не имеющих клеточного ядра, ДНК, в которой записана генетическая информация, находится в составе хромосом непосредственно в цитоплазме. Но, кроме хромосомных ДНК, в бактериях содержатся, независимо от хромосомных, замкнутые кольцевые ДНК, которые также несут в себе генетическую информацию. Эта информация может передаваться из одной бактерии в другую трансмиссивными плазмидами. Процесс обмена генетической информацией между бактериями, отдаленно напоминающий механизм полового размножения растений и животных, называется конъюгацией. Перенос ДНК из одной бактерии в другую при конъюгации осуществляется через микротрубочки (пили). Они построены из специального белка пилина, ген которого локализован в плазмиде. Таким путем возможна передача свойств даже микроорганизму другого вида, что было установлено еще в 1922 г. отечественным ученым Л.А. Зильбером. Перенос генетической информации может произойти не только путем конъюгации двух клеток, но и свободная ДНК из лизированной (разрушенной) клетки может перейти в другую бактерию. Кроме того, паразиты бактерий (фаги) способны при заражении другой клетки передавать ей гены предыдущего хозяина. Процесс передачи генетического материала посредством плазмид и фагов называется трансдукцией. Значение этого механизма можно проиллюстрировать двумя примерами. Все знают об опасной болезни дифтерии, которая унесла немало жизней, особенно детских, пока не было прививок. Оказывается, опасна не сама дифтерийная палочка, а токсин белковой природы, ген которого находится в плазмиде. Не менее опасным заболеванием является холера. Ген холерного токсина также встроен в плазмиду. Переходя в кишечную палочку, плазида переносит в нее ген токсина. Токсин синтезируется в клетке кишечной палочки, при этом у человека возникает холероподобное заболевание, но вибрион холеры не обнаруживается.

Развитие нечувствительности бактерий к антибиотикам также объясняется переносом генов устойчивости посредством трансмиссионных генов от одной клетки к другой. При этом возможен обмен информацией между разными видами бактерий. Например, общие трансмиссионные плазмиды имеются у безобидной и вездесущей кишечной палочки и возбудителя чумы. Таким образом, способность микроорганизмов принимать чужеродную ДНК, а также существование плазмид, способных встраивать ее в свою структуру и переносить в другую клетку, предопределило возможность создания рекомбинантных ДНК.

При введении рекомбинантной ДНК, несущей чужеродный ген в клетки бактерий (реципиентов), последние включают их в свой генетический аппарат. Полученная из плазмиды кольцевая ДНК, способная переносить ген от одной клетки к другой, называется вектором. Векторные ДНК отбирают или специально изменяют так, чтобы они были способны размножаться в клетках-реципиентах. Кроме того, векторы должны содержать гены-маркеры, придающие клеткам-реципиентам новые признаки, по которым их можно отличить от других клеток. Такими генами могут служить гены устойчивости к антибиотикам. Для выбора генов используются библиотека генов, насчитывающей миллионы единиц (рис. 13).

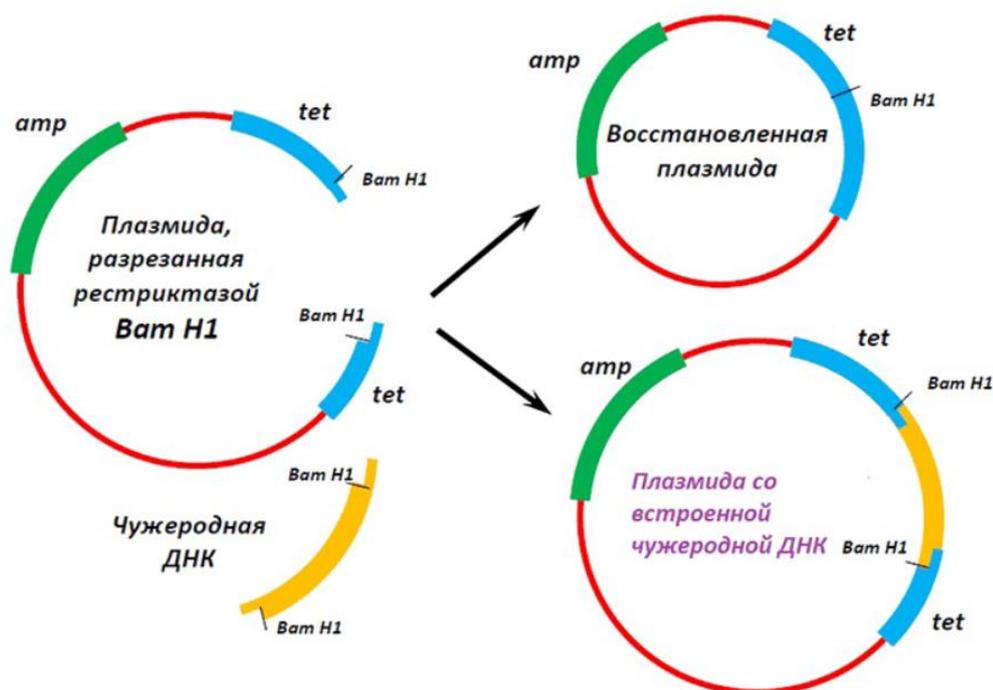


Рисунок 14 – Взаимодействие искусственной плазмиды, способной реплицироваться в клетках *Escherichia coli*, с чужеродной ДНК. Полученная генетическая конструкция служит для переноса генетического материала от одной клетки к другой.

Для контроля их встраивания и переноса используют зонды – молекулы нуклеиновых кислот, меченные радиоактивным изотопом, обычно фосфором  $^{32}\text{P}$ . Зонды содержат нуклеотидные последовательности, комплементарные участкам ДНК искомого гена. После того как убеждаются в успешности переноса рекомбинантной ДНК в клетку-реципиент, производят клонирование, т. е. из одной материнской клетки получают культуры дочерних клеток (клоны), имеющие одинаковый генетический аппарат. Клоны клеток используются в промышленных целях для биотехнологического производства белковых веществ, в том числе ферментов. В частности, налажено производство сычужного фермента (ренина), необходимого для выработки сыра.

Клонирование клеток животных и растений – более сложный процесс, однако, в настоящее время получают клоны лимфоцитов (иммунных клеток), которые синтезируют моноклональные антитела, используемые в диагностике инфекционных заболеваний. Рекомбинантные штаммы бактерий и дрожжей широко используют для микробиологического синтеза не только белков, но и таких веществ, как витамины, аминокислоты, антибиотики и другие ценные соединения. Методами генной инженерии можно усиливать природную способность определенных видов бактерий к осуществлению специфических биологических процессов и созданию высокоэффективных штаммов микроорганизмов, разрушающих токсичные субстраты или способствующих росту культурных растений.

В 1994 году появилось первое коммерческое генно-инженерное растение – томат *Flavr Savr*. Вслед за этим стали активно создаваться трансгенные растения<sup>21</sup>, устойчивые к биотическим и абиотическим факторам среды. Ученые нашли необходимые гены устойчивости в геномах бактерий и насекомых и перенесли их в растительные организмы, это способ является заимствованным у почвенной бактерии *Agrobacterium tumefaciens*, которая переносит свои гены в растительные клетки для получения необходимых метаболитов.

<sup>21</sup> Трансгенным считают такой организм, в геном которого искусственно введен ген, который не может быть приобретен при естественном скрещивании.

Другая проблема, с которой связано получение трансгенных растений, – это использование антибиотиков. Для того чтобы узнать, попал ли интересующий ученых ген в геном растительной клетки, необходим некий маркер (репортер), который отделит клетки с внедрившимся чужеродным геном от неудачных образцов. Такими репортерами и являются гены, кодирующие устойчивость к антибиотикам. Клетки, подвергшиеся изменениям, высаживают на среду с антибиотиком, и, если они остались живы, значит, ген устойчивости проник в их геном, а с ним – и наш целевой ген. Несмотря на то, что трансгенные растения являются мощным фактором развития сельского хозяйства и экономики, возможность их использования провоцирует широкое общественное обсуждение.

Принимая во внимание всеобщую обеспокоенность биологической безопасностью трансгенных продуктов питания, в настоящее время активно разрабатывается новый подход для модификации сортов растений – цисгенез.

Применение геномного секвенирования сельскохозяйственно-значимых культур, таких как кукуруза, картофель, рис, и разработка эффективных технологий выделения новых генов расширили границы возможностей улучшения сельскохозяйственных культур. В последние десятилетия описан широкий круг генов, кодирующих важные качественные и количественные признаки как самих сельскохозяйственных культур, так и их дикорастущих родственников. Эти гены выделены и перенесены в геномы элитных сортов. Полученные в результате таких манипуляций растения называют цисгенными, чтобы отделить их от понятия трансгенов.

Цисгенез – технология генетической модификации рекомбинантной ДНК, при которой манипуляция происходит с использованием ДНК того же или близкородственного вида растения, с которым возможен половой процесс. В отличие от трансгенных, такие растения не содержат гены неродственных организмов и гены устойчивости к антибиотикам. Это дает возможность ожидать, что общество с большей легкостью воспримет цисгенные растения, нежели трансгенные.

Интрагенез можно считать продолжением концепции цисгенеза, но в этом случае в ДНК растения встраивают генетическую конструкцию, состоящую из гена самого растения, совмещенного с регуляторными последовательностями других его генов. В ходе такой модификации искусственно создаются новые комбинации из уже существующих участков ДНК растений. Интрагенез позволяет усиливать определенные признаки у растений, например, способность накапливания витаминов в листьях или, наоборот, устранять или сводить к минимуму нежелательные свойства путем изменения регуляции отвечающих за них генов.

### **Контрольные вопросы (задания)**

1. Назовите технологии, не затрагивающие ДНК (растений).
2. Охарактеризуйте технологии, модифицирующие ДНК растений.
3. Чем отличаются трансгенез, цис- и интрагенез?
4. Что такое рестриктазы? Назовите основные принципы работы и применения этих ферментов.
5. Что позволяет биотехнологам использование технологии CRISPR/Cas9?
6. Как связаны понятия «трансдукция» и «вектор»?
7. Какую роль играют гены, кодирующие устойчивость к антибиотикам, в методах генетической инженерии?

#### 4 Сырьевая база биотехнологии

Самым главным направлением биотехнологии является всемерная интенсификация производственных процессов, что достигается внедрением новых высокопродуктивных биологических объектов (продуцентов), а также широким применением эффективных технологических приемов (технологических режимов). Указанная цель достигается подбором подходящего сырья (субстрата для выращивания продуцента), разработкой наилучшей конструкции биореактора (ферментёра), оптимизацией условий культивирования продуцента, обеспечением эффективного контроля за самим технологическим процессом, а также усовершенствованием способов выделения и очистки целевого продукта.

*Субстраты для культивирования биообъектов.* Питательные среды для выращивания объектов биотехнологии, т. е. продуцентов тех или иных соединений, могут быть неопределенного состава и включать различные биогенные добавки (растительные, животные или микробные) – мясной экстракт, кукурузную муку, морские водоросли и т. п. Применяются также среды из чистых химических соединений определенного состава, так называемые синтетические. Компонентный состав сред определяется питательными потребностями продуцента. Во многих процессах используют в качестве объектов организмы, ранее называвшиеся гетеротрофами, которые в настоящее время подразделяются на: органоавтотрофы (употребляющие органические вещества как источники энергии), литогетеротрофы (использующие органические вещества как источники углерода) и органогетеротрофы (для которых органические вещества служат и источниками энергии, и источниками углерода).

Питательные среды призваны обеспечивать жизнеспособность, рост и развитие соответствующих продуцентов, а также синтез целевого продукта с максимальной эффективностью. Требования к питательным средам, используемым в биотехнологии, ничем не отличаются от требований, предъявляемым к питательным средам, применяемым в микробиологии для культивирования тех или иных микроорганизмов. Для приготовления питательных сред в биотехнологии используются разнообразные субстраты, которые должны удовлетворять определенным критериям. Субстрат представляет собой сырье для получения целевого продукта и должен быть недефицитным, дешевым, по возможности легко доступным.

Элементы питания, необходимые для роста клеток в производстве биотехнологического продукта, можно подразделить на следующие группы:

- источники основных элементов;
- источники элементов, требуемых в меньших количествах;
- аминокислоты;
- витамины и гормоны;
- источники микроэлементов.

Основные источники питания, функции в биосинтезе и их обеспечение для клеток приведены в табл. 2.

Таблица 2 – Элементы питания клеток, применяемые в биотехнологическом производстве

Элемент	Источник получения	Функция
Основные элементы питания		
водород	Кислота или щелочь	Интенсивность роста. Состав биомассы и морфология
кислород	Воздух, вода	Акцептор электронов или водорода (дыхание), катаболизм
углерод	Глюкоза, мальтоза, лактоза	Энергия роста, функция поддержания жизнедеятельности и построения клеток
азот	Неорганические и органические соединения, глутамат	Синтез белка, нуклеиновых кислот и полимеров клеточной стенки

Элемент	Источник получения	Функция
Элементы питания, требующиеся в меньшем количестве		
фосфор	Неорганические фосфаты	Синтез белка, нуклеиновых кислот и полимеров клеточной стенки, катаболизм
калий	Неорганические соединения	РНК, скорость роста
сера	Сульфат, цистеин, метионин	Синтез аминокислот
Аминокислоты		
Глутаминовая кислота, L-аминокислоты, D-аминокислоты	Пептиды, гидролизаты, пептоны и т. п.	Фактор роста, синтез белка, клеточные стенки бактерий, ингибитор роста
Витамины и гормоны		
Жирорастворимые и водорастворимые витамины	Биотин, фолиевая кислота, пантотеновая кислота, тиамин, никотиновая кислота, никотинамид, пиридоксин, мезинозит, холин	Фактор роста
Микроэлементы		
Ca, Cu, Fe, Mg, Zn, Co, Mo	Соли, неорганические соединения	Интенсивность роста

При недостатке в субстрате каких-либо элементов в клетках могут включаться «запасные» механизмы биохимических процессов, направленные на выживаемость популяции. Следует отметить, что используемые в биотехнологии субстраты и получаемые продукты весьма многообразны и предназначены для специфического применения. В табл. 3 приведены субстраты, используемые в производстве фармацевтических биопрепаратов.

Таблица 3 – Основные субстраты, используемые в производстве биопрепаратов, и получаемые продукты

Субстрат	Биологический объект	Конечный продукт
Синтетические и полусинтетические сред	Клетки микроорганизмов, животных и растений	Диагностические препараты
Гидролизаты растительных полимеров	Вирусы, бактериофаги	Лечебные, бактериальные и вирусные препараты
Продукты – предшественники биотрансформации	Компоненты клеток: протопласты мембран, хлоропласты, ферменты	Моноклональные антитела, сыворотки, глобулины, бактериофаги пр.
Сыворотки. Химические веществ	Иммобилизованные клетки микроорганизмов, животных, их компоненты и внеклеточные продукты	Диагностические и лечебные препараты
Отходы (в том числе сельского хозяйства)	Продукты животноводства и растениеводства	Питательные среды, кормовые добавки, корма

Растительная биомасса и (в меньшей степени) биомасса животных организмов представляют собой достаточно хорошо утилизируемые источники углерода для биотехнологических целей. На основе этих источников основано давно существующее производство алкоголя из зерна и сыра из молока. Растительные источники могут рассматриваться как практически

неистощимые. Первичная продукция фотосинтеза (рост растений за счет использования солнечной энергии) на земле обеспечивает  $2 \times 10^{11}$  т вещества (биомассы) в год в пересчете на сухой вес. Наибольшая доля биомассы (около 44 %) образуется в виде древесины. Вызывает удивление факт, что продукция сельского хозяйства составляет лишь 6 % первичной продукции за счет фотосинтеза, хотя именно из этого количества получается основная часть пищи для людей и животных, а также многие необходимые материалы (например, для текстильной и бумажной промышленности). В будущем значительная часть традиционных сельскохозяйственных продуктов сможет производиться с использованием современной биотехнологии. В частности, новые биотехнологические подходы позволят обеспечить утилизацию большого количества отходов сельского хозяйства, которые в настоящее время не находят применения, и использовать их для приготовления питательных продуктов. Биомасса сельского и лесного хозяйства в настоящее время является значительным экономическим потенциалом во многих национальных экономиках, в первую очередь в тропических и субтропических регионах.

*Природные сырьевые материалы.* Источником природного сырья являются сельское хозяйство и отрасли лесоводства. Получаемые в этих отраслях материалы представляют собой соединения различной химической сложности и включают сахара, крахмал, целлюлозу, гемицеллюлозу и лигнин. Из первичных сырьевых материалов в процессе производства тех или иных продуктов традиционными методами получается огромное число разнообразных побочных продуктов, которые в силу достаточно высокой питательной ценности могут использоваться в биотехнологических процессах.

Наиболее подходящим и доступным, чтобы служить питательным субстратом для биотехнологических процессов, является сырье, используемое в производстве сахара – сахарная свекла и сахарный тростник. Однако в настоящее время в мире традиционное использование сахара постепенно снижается, и он заменяется более эффективными подсластителями. Складывающаяся ситуация на мировом сахарном рынке будет способствовать поискам его нового применения, и многие страны тропических областей испытают существенный экономический коллапс, если исчезнет сахарный рынок. Уже сейчас сахарный тростник используется в качестве субстрата для бразильской «топливной» программы (производство этанола как горючего для двигателей внутреннего сгорания и в первую очередь для автомобилей, поскольку они меньше загрязняют атмосферу). Бразильский пример быстро убеждает многие другие страны в перспективности такой новой технологии.

Существенную значимость представляют крахмалосодержащие сельскохозяйственные продукты, включающие различные злаки, такие, как кукуруза, рис, пшеница, картофель, различные корнеплоды, сладкий картофель и маниока. Некоторым недостатком крахмала является то, что до использования в качестве питательного субстрата он обычно должен быть разрушен до моносахаридов или олигосахаридов путем ферментативного переваривания или гидролиза. Тем не менее в настоящее время с определенным успехом разрабатываются перспективные биотехнологические процессы, основанные на использовании данного полисахарида.

Половину высушенной растительной массы как сельскохозяйственного, так и «лесного» происхождения составляет один из самых распространенных биополимеров – полисахарид целлюлоза, являющийся ценным источником энергии и углерода. Почти не вызывает ни у кого сомнения, что целлюлоза должна рассматриваться в качестве основного питательного сырья для биотехнологических процессов. Однако необходимым условием подготовки данного материала к использованию в качестве биотехнологического сырья является ее гидролиз до простых водорастворимых сахаров (глюкозы, целлобиозы). Как ни странно, но это до сих пор представляет довольно трудную задачу. Наибольшие сложности встречаются при попытках утилизации древесины, в которой целлюлоза находится в комплексе с гемицеллюлозой и лигнином. Лигноцеллюлозные комплексы характеризуются очень высокой степенью устойчивости к природным силам биодеградации. Именно это свойство и обуславливает долговечность деревьев и, естественно, построек из дерева, поскольку деревья состоят главным образом из лигноцеллюлозы.

Лигноцеллюлоза является наиболее распространенным и возобновляемым природным сырьем, доступным человеку практически во всех странах мира. Однако должны быть преодолены огромнейшие технологические трудности, прежде чем окажется экономически выгодным использование этого энергетически богатого соединения. В данный момент для того, чтобы сделать ее доступной для микробиологической деградации, необходимы весьма дорогие и энергоемкие процессы предварительной обработки. Чистая целлюлоза может быть довольно легко разрушена путем химического или ферментативного гидролиза до растворимых сахаров, которые затем легко подвергаются ферментации (сбраживанию) микроорганизмами с образованием этанола, бутанола, ацетона, одноклеточного белка (SCP), метана и многих других продуктов. В этом плане разительные успехи достигнуты в США, Швеции, Британии и дело только во времени, чтобы преодолеть вышеперечисленные трудности.

Довольно точно подсчитано, что на Земле в год фиксируется приблизительно  $3,3 \times 10^{14}$  кг  $\text{CO}_2$  и примерно 6 % этого количества, т. е. 22 миллиарда т в год приходится на долю целлюлозы. В мировом масштабе земные растения продуцируют 24 т целлюлозы на человека в год. И все было бы уже давно сделано, если бы целлюлоза была без примеси лигнина. Лигнин препятствует химическому и ферментативному разрушению целлюлозы, мешая доступу к ней реагентов и активно адсорбируя гидролитические ферменты, выводя их из строя. Сам по себе лигнин также крайне устойчив к деградационным воздействиям как химического, так и биологического характера, вследствие чего представляет серьезную проблему как загрязнитель внешней среды при производстве бумаги. Причем проблема эта в настоящий момент далека от разрешения. Причина основная сводится к сложности пространственной организации молекул этого вещества – гемицеллюлозы, основным компонентом которой является второй по распространенности растительный биополимер ксилан, состоящий из остатков ксилозы, а также небольших количеств арабинозы и глюкуроновой кислоты. Он является не только отходом при гидролизе растительного сырья, но и сам по себе может служить биотехнологическим сырьем. Химический гидролиз ксилана приводит к накоплению токсичных для микроорганизмов соединений, поэтому в последнее время разрабатываются методы ферментативного гидролиза ксилана.

Распространенным источником углерода и энергии являются компоненты нефти и газа. Наилучшим субстратом из компонентов нефти являются n-алканы (особенно жидкие) с числом углеродных атомов от 10 до 20. Их могут утилизировать большинство бактерий и дрожжи. Однако и нефть, и газ также истощаются. Поэтому биотехнологии ориентируются на возобновляемые источники сырья.

Большое внимание уделяется различным видам растительной массы: плоды, соки, клубни, травяная масса и упоминавшаяся выше древесина. Используются также отходы сельского хозяйства, деревообрабатывающей и бумажной промышленности, а также многих отраслей пищевой промышленности.

Возможность использования перечисленных сырьевых материалов является основой создания безотходных производств. Поэтому многие полагают, что в качестве доступного и, по-видимому, относительно дешевого сырья для биотехнологии окажутся различные побочные продукты одних биотехнологических процессов для других. Например, на отходах микробиологического производства этанола можно с успехом культивировать кормовые дрожжи. Или же при получении биомассы путем выращивания дрожжей на гидролизатах растительного сырья на фильтрах можно осуществлять биосинтез грибного белка. Либо на биомассе одного микроорганизма выращивать другие виды.

*Побочные продукты – биотехнологическое сырье.* Одной из главных задач биотехнологии является максимальное использование огромных объемов органических отходов, повсеместно образующихся в мировом производстве. Биотехнологическая утилизация этих отходов, во-первых, обеспечит удаление источников загрязнения (например, сточных вод), а во-вторых, обусловит превращение этих отходов в полезные целевые продукты. Продукты отходов играют важную роль в экономике и в состоянии окружающей среды. Так, многие побочные ма-

териалы пищевой промышленности оказываются экономически малозначащими и часто выбрасываются в магистральные водные системы, обуславливая мощное загрязнение внешней среды. Поэтому кажется весьма привлекательным разработать технологии их утилизации в качестве биотехнологического сырья, с извлечением двойной выгоды.

Каждый загрязняющий материал должен быть оценен относительно его пригодности для биотехнологических процессов. Только в том случае, когда продукт отхода имеется в больших количествах и образуется в течение длительного периода (т. е. при масштабном производстве), он может рассматриваться в качестве подходящего сырья для утилизации. Двумя широко распространенными видами отходов, которые нашли уже сейчас применение в биотехнологических процессах в качестве сырья для ферментации, являются меласса (черная патока) и молочная сыворотка.

Меласса представляет собой побочный продукт, появляющийся при производстве сахара, и содержит до 50 % сахаров. Меласса широко используется как питательный субстрат для ферментационных процессов в производстве антибиотиков, органических кислот и коммерческих дрожжей для хлебопечения; помимо этого, она используется в чистом виде в качестве добавки в корма животным. Ситуация в данный момент такова, что спрос на мелассу значительно превышает имеющиеся ресурсы. Сыворотка, получаемая при производстве сыра, также может быть использована в качестве питательного субстрата для ферментации.

Более сложные продукты отхода, такие, как солома и жом (отход сахарного производства), также имеющиеся в больших количествах и во многих местах, по мере улучшения процессов расщепления лигноцеллюлозных соединений все больше находят применение в биотехнологических производствах. Наибольшую часть продуктов отхода составляют отбросы животноводства (испражнения, моча), затем сельскохозяйственные отходы, отходы пищевой промышленности и, наконец, отбросы домашнего хозяйства. Утилизация многих компонентов отходов, в частности животного происхождения, не представляет серьезной проблемы при традиционном ведении сельского хозяйства. Это хорошо демонстрируется на примере Китая, где рециклизация путем компостирования отходов животноводства практикуется с давних пор. Однако при интенсивном животноводстве (особенно при широкомасштабном) возникают порой весьма трудно разрешимые осложнения.

*Химические и нефтехимические субстраты.* С развитием биотехнологических процессов в коммерческих масштабах для производства одноклеточного белка (SCP), а также ряда других органических продуктов многие питательные вещества химического и нефтехимического происхождения приобретают важную роль в качестве питательных субстратов для ферментации. Их преимущество состоит в том, что они имеются в больших количествах и практически одинакового качества в различных странах мира. Например, природный газ или нефтяной газ, метанол и этанол.

### **Контрольные вопросы (задания)**

1. Приведите классификацию организмов, используемых в качестве продуцентов.
2. Каким требованиям должны отвечать питательные среды, используемые в биотехнологиях?
3. На какие группы подразделяются элементы питания, необходимые для питания объектов, применяемых в биотехнологических процессах?
4. Какую функцию выполняет фосфор как элемент питания?
5. Что является конечным продуктом при использовании в качестве объекта вирусов и бактериофагов?
6. Какие природные источники используют в качестве сырья для биотехнологических процессов?
7. Где используют мелассу, как продукт побочного производства сахара?
8. Какие проблемы возникают при утилизации древесины?

## 5 Биотехнологическое получение белковых препаратов

Дефицит кормовых и пищевых белков, особенно в странах с недостаточно развитой экономикой, усугубляющийся бурным ростом народонаселения, поставил задачу поиска нетрадиционных способов получения белка и белковых продуктов. Попытки синтеза высокомолекулярных белков химическим путем, предпринятые еще в конце XIX века, не увенчались успехом, поэтому в настоящее время синтезируют лишь некоторые пептиды, состоящие из остатков нескольких аминокислот. Следующая причина развития биотехнологии белков объясняется все возрастающей потребностью медицины в относительно недорогих профилактических и лекарственных препаратах и диагностических средствах, имеющих белковое строение (инсулин и соматотропный гормон, вакцины, сыворотки и моноклональные антитела). И, наконец, современные технологии производства продуктов промышленного и бытового назначения (полимеры, моющие средства, пищевые продукты и добавки, лекарства и т. д.) нуждаются в высокоэффективных и специфических катализаторах – ферментах, имеющих белковое строение. Начиная с XIX века в пищу стали использовать пивные дрожжи (*Saccharomyces cerevisiae*), содержащие в среднем 52 % белка. Впервые промышленное производство дрожжей рода *Candida* для пищевых целей было осуществлено в Германии. Добавление их в продукты питания во время Первой и Второй мировых войн позволило предотвратить белковое голодание населения этой страны. В настоящее время белковые продукты получают из биомассы культур различных микроорганизмов, выращиваемых на этаноле, метаноле, метане, парафинах, крахмале и другом углеводном сырье. Питательным субстратом для роста микробов могут служить отходы деревообрабатывающей, сельскохозяйственной и нефтегазовой промышленности, а источником азота – аммиак или аммонийные соли. Получаемые продукты используются преимущественно в качестве кормовых добавок животным. В 1980 г. в Великобритании был впервые официально разрешен для употребления в пищу белок из гриба *Fusarium graminearum* (микопротеин), выращенного на глюкозе с добавкой неорганического азота. В то же время фирма Hoechst также начала производить продукт из бактерий, растущих на метаноле, который содержит 90 % белка. Наша страна в 70-80-х годах прошлого века в рамках Продовольственной программы развернула крупномасштабное микробиологическое производство белково-витаминных концентратов для корма животных. Тогда в разных регионах страны действовало более 80 промышленных установок, производящих кормовые дрожжи; на 8 крупнотоннажных заводах общей производительностью более 1 млн т в год была реализована технология получения белковых кормовых добавок. Главным видом выпускаемой продукции был паприн, получаемый из *Candida maltosa* на твердых парафинах. Он содержит около 60 % белка, не менее 4,6 % незаменимой аминокислоты лизина, а также витамины (мг/кг): тиамин – 3, рибофлавин – 120, пантотеновая кислота – 108, никотиновая кислота – 470. Была освоена промышленная технология получения кормовых дрожжей на этаноле (эприн), микробного белка на природном газе (гаприн) и на метаноле (меприн). На основе использования микробных биомасс в качестве сырья были разработаны способы производства белковых, пептидных и аминокислотных препаратов пищевого, медицинского и технического назначения, в том числе: белковые изоляты, полисахариды, липиды, цитохромы, витамины, нуклеотиды и другие. Экономическая эффективность производства микробного белка объясняется тем, что микроорганизмы, способные расти на дешевых питательных средах, в качестве которых используются главным образом промышленные отходы, содержат в своем составе от 19 до 90 % белка. При этом выход белка в расчете на израсходованный питательный субстрат значительно выше, чем при выращивании сельскохозяйственных животных. Так, на 1 кг корма можно получить 68 г говядины (14 г белка), 200 г свинины (41 г белка) или 240 г куриного мяса (49 г белка), в то время как из *F. graminearum* на 1 кг углеводов с добавкой неорганического азота получают более 1 кг сырой клеточной массы (136 г белка). Кроме того, микробная биомасса содержит незаменимые аминокислоты и высокие концентрации витаминов, что обуславливает дополнительную кормовую ценность продуктов.

Технологическая схема производства микробного белка включает ряд стадий: приготовление питательной среды, ее стерилизация, ферментация, сепарация биомассы, ее термообработка, сушка, фасовка и упаковка. В технологическом процессе предусмотрено также разрушение рибонуклеиновой кислоты или ее удаление из биомассы путем экстракции. Необходимость этого этапа обусловлена тем, что повышенные концентрации нуклеиновых кислот в пище приводят к избыточному образованию мочевой кислоты в организме, что является фактором риска развития подагры и мочекаменной болезни.

К особенностям микробиологического производства относятся высокие требования к стерильности и герметичности всего технологического процесса, поскольку попадание «диких» микроорганизмов в питательную среду и их размножение может привести к непредсказуемым последствиям. Потенциальную опасность представляют живые клетки продуцентов, так как некоторые из них являются условно патогенными и способны вызывать заболевания у людей со сниженным иммунитетом. Кроме того, сами микроорганизмы, фрагменты клеток и готовые продукты обладают аллергенным и иммунотропным действием, поэтому выброс их в производственную и окружающую среду приводит к нарушению механизмов иммунной защиты и повышенной заболеваемости населения. Поскольку при проектировании и эксплуатации отечественных крупнотоннажных микробиологических предприятий не были учтены необходимые меры защиты людей и окружающей среды, применялось оборудование, созданное для других отраслей промышленности, в частности, химической, которое не обеспечивало достаточной герметичности технологического процесса, то многие предприятия были впоследствии перепрофилированы или закрыты. Однако существующий дефицит кормовых белков и проблема получения недорогих пищевых белоксодержащих продуктов требуют разработки новых, более совершенных технологий производства белка.

*Применимость и токсикология одноклеточного белка.* Помимо чисто технологических и экономических сложностей, существенное влияние на развитие производства одноклеточного белка оказывают географические, политические, социологические и психологические факторы, которые порой оказываются в значительной степени определяющими. В частности, большое внимание уделяется проблемам безопасности, питательной ценности и применимости данного продукта. Природа сырьевого материала, используемого в производстве одноклеточного белка, представляет известную опасность: например, потенциальная канцерогенность углеводородов нефти и н-парафинов, наличие тяжелых металлов или других загрязняющих примесей в минеральных солях, присутствие остатков растворителей после экстракции продукта, а также токсинов (в частности, микотоксинов), образуемых некоторыми микроорганизмами (например, определенными грибами), и т. д. Поскольку организм-продуцент должен быть непатогенным и нетоксигенным, а его продукты метаболизма безвредными, строгий санитарный режим и различные процедуры контроля качества должны постоянно осуществляться в течение всего биотехнологического процесса в целях предотвращения порчи продукта, а также загрязнения его патогенными или токсигенными микроорганизмами.

Применимость одноклеточного белка как пищевого продукта для человека зависит не только от его безвредности и питательной ценности, но также и от ряда других факторов. Помимо обычного нежелания людей потреблять вещества, получаемые из микробов, процесс питания характеризуется многими неуловимыми психологическими, социальными и религиозными аспектами. У различных культур существует достаточное число специфических ассоциаций с едой, общественным положением, а также символической значимостью различных видов пищи. Должны также учитываться более явные особенности, связанные с применимостью продукта: запах, цвет, вкус, консистенция и внешний вид. Так, например, одноклеточный белок может использоваться в качестве пищи для человека, по-видимому, лишь при относительно малом его количественном содержании в обычных традиционных продуктах. Поэтому в настоящее время он может служить преимущественно как источник питания для различных видов домашних животных, птиц или рыб. И все же уже теперь некоторые промышленные процессы направлены на изготовление микробных продуктов для человека: например, грибной белок фирмы Ranks Hovis McDougall/ICI.

Какие же факторы, помимо технологических, оказывают влияние на расширение производства одноклеточного белка? Главным образом это политические и социальные аспекты использования для его получения нефтепродуктов как субстратов для культивирования продуцентов, поскольку последние могут быть существенно загрязнены канцерогенными веществами. В силу этого обширные программы, связанные с производством одноклеточного белка, в Японии, Италии и Британии в свое время были приостановлены и усилия биотехнологов были направлены на его производство из этанола или метанола либо на основе различных органических отходов, являющихся потенциально менее опасными.

*Одноклеточный белок на высокоэнергетических субстратах.* Представляющие существенное коммерческое значение как источники энергии материалы (нефтегаз, метанол, этанол, метан и n-алканы) привлекают внимание биотехнологов как субстраты ряда биотехнологических процессов, главными участниками которых являются бактерии и дрожжи. Естественно, что в разработке технологий использования подобных материалов принимают участие многие нефтяные компании, а сама проблема обсуждалась и изучается различными научно-исследовательскими учреждениями. Наиболее подробно как сырье для получения одноклеточного белка изучался метан, хотя в настоящее время в его использовании для указанной цели имеется достаточно большое количество трудностей. В противоположность этому, большое значение придается метанолу. Так, компанией ICI в Великобритании разработана крупномасштабная (75 000 л) ферментация растительного сырья для метанол утилизирующих бактерий. Компании Hoechst (Германия) и Mitsubishi (Япония) также работают над аналогичными технологиями, предназначенными для использования в качестве продуцентов биомассы дрожжевых клеток вместо бактериальных.

Продукт, выпускавшийся компанией ICI (называемый прутин), использовался исключительно для скармливания животным. Метанол как источник углерода для получения одноклеточного белка обладает многими преимуществами по сравнению с n-парафинами; в нем отсутствуют потенциальные токсичные вещества, он легко растворим в водной фазе в любых концентрациях и при культивировании на средах с метанолом в получаемой биомассе отсутствуют какие-либо остатки углерода (хотя бы потому, что он легко испаряется). Кроме того, имеют значение и другие важные моменты технического порядка.

Завод компании ICI для производства прутина является единственным в своем роде в западном мире и в настоящий момент вследствие цен на метанол не работает с надлежащим экономическим эффектом, поскольку стоимость метанола составляет примерно 50 % от стоимости продукта. В США стоимость одноклеточного белка, полученного на метаноле в 2–5 раз дороже, чем при его производстве из рыбной муки. На Среднем Востоке низкая стоимость метанола и относительно высокие цены на рыбную муку в сочетании с необходимостью производства большого количества животных продуктов делают одноклеточный белок типа ICI прутин весьма привлекательным.

Относительно благоприятная ситуация для производства одноклеточного белка на n-парафинах нефти сложилась в 70-е годы в бывшем Советском Союзе, что было связано с низкими внутренними ценами на нефть. Были построены три крупных завода по культивированию дрожжей рода *Candida* (в том числе один в Новополоцке). В лучшие годы продукция дрожжевого белка достигала 1 млн т сухой биомассы и обеспечивала потребности сельского хозяйства (добавка в корм животных) и промышленности. Но в середине 80-х все эти заводы остановились в связи с высокой себестоимостью микробного белка (цена была в 2 раза выше, чем кормовой соевый белок).

Широкий спектр исследований, выполненных в 1960-е и 1970-е годы по использованию метанола и сходных соединений в качестве субстратов для получения одноклеточного белка, дали существенный стимул совершенствованию ферментационных технологий, направленных на его производство в крупномасштабных количествах. Упомянувшееся выше аэробное производство прутина, является самым крупным из непрерывных процессов и, по существу, представляет собой крупнейшую в мире биотехнологическую систему, что в свою очередь,

вследствие необходимости строжайшей экономии, обусловило прогресс в разработках биореакторов с восходящим воздушным потоком (эрлифтных ферментёров).

Весьма подходящим сырьем для получения одноклеточного белка, предполагаемого к использованию в пищу человека, является этанол. В скором времени перспективы производства одноклеточного белка на этаноле будут определяться рядом локальных факторов: возможностями расщепления этилена, наличием излишков углеводов сельскохозяйственного происхождения, политическими ситуациями в региональной экономической самостоятельности, а также состоянием уровня мирового производства.

*Одноклеточный белок на отходах.* Рециклизация отходов растений, появляющихся в различных производствах (таких, как солома, выжимки, отходы цитрусовых, сыворотка молока, меласса, навоз животных и бытовые сточные воды), представляет существенную проблему биотехнологии. В отдельных местах количество таких отходов достигает значительных величин, что является источником серьезного загрязнения различных водных систем и вообще окружающей среды. Поэтому использование указанных органических отходов может способствовать достижению двух целей: снижению загрязнения и созданию пищевого белкового препарата. Привлекательность растительных отходов, содержащих углеводы, состоит в их низкой стоимости, в результате чего удешевляется биотехнологический процесс, а также в том, что одноклеточный белок может быть получен при относительно небольшом количестве операций.

Обоснованием для разработки технологии производства одноклеточного белка на растительных отходах является их пригодность для микробной конверсии, наличие в достаточных количествах и в течение длительного периода, а также уровень уже имеющихся технологий. Процессы, использующие продукты отходов в производстве одноклеточного белка, базируются на основании коммерческих соображений с применением различных дрожжевых организмов в подходящих ферментных системах. Субстратами для организмов-продуцентов служат: меласса (*Sacharomyces cerevisiae*), молочная сыворотка в производстве сыра (*Kluveromyces fragilis*), отходы крахмального производства с использованием двух видов дрожжей (*Endomycopsis fibuligera* и *Candida utilis*). Питательная ценность дрожжей, получаемых в данном процессе, была определена в многочисленных обширных экспериментах по скармливанию этого одноклеточного белка различным видам животных (свиньям, цыплятам и телятам). В проведенных опытах регистрировался хороший рост животных и отсутствие неблагоприятных последствий.

Заслуживает внимания продукт – Pekilo, представляющий собой грибной белок, получаемый путем ферментации углеводов мелассы, молочной сыворотки, отходов фруктов, гидролизатов древесины или сельскохозяйственного сырья. Продукт характеризуется хорошим аминокислотным составом и богат витаминами. Испытания на животных показали, что Pekilo-протеин является хорошим источником белка в питании свиней, телят, бройлеров, кур-несушек и производится при непрерывном культивировании. Используемый для его производства организм является мицелиальным грибом, а получаемый продукт обладает выраженной фиброзной структурой, что делает готовый препарат удобным для применения.

В Британии компания Ranks Novis McDoudall совместно с корпорацией ICI поставляет на рынок другой грибной белок (mycoprotein), получаемый при выращивании гриба *Fusarium* на простых углеводах. Непохожий почти ни на один из других типов, одноклеточный белок микопротеин производится для употребления в пищу людей. Продукт также производится путем непрерывной ферментации. Разработка и внедрение данного микопротеина (получаемого с помощью гриба *Fusarium* фирмой Ranks Novis McDoudall) оценивается по произведенным затратам более чем в 40 млн фунтов стерлингов, а осуществление проекта заняло свыше 20 лет. Первоначально процесс осуществлялся посредством одноразовой ферментации, но затем была разработана технология непрерывного культивирования. Кульминацией проекта считается не только продукция грибной биомассы, но и получение ценных для пищевого продукта характеристик.

Целлюлоза в сельскохозяйственных и лесных материалах, а также в различных отходах должна составить в недалеком будущем основной сырьевой компонент для многих биотехнологических процессов, включая и одноклеточный белок. Целлюлоза в ее естественной ассоциации с лигнином до сих пор является наиболее распространенным органическим веществом для биологической конверсии. Различные исследовательские учреждения настойчиво ищут пути предварительной обработки биологических материалов подобного рода с целью деградации лигнинового барьера (преимущественно физическими и химическими методами). Удаление лигнина из лигноцеллюлозы делает последнюю потенциальным источником энергии для жвачных животных, способных использовать ее в качестве пищи. Таким путем лигноцеллюлозные материалы (солома, выжимки и даже древесина) могут стать полезными кормовыми препаратами для животных.

Многие виды грибов долгое время служили пищей для человека и выращивались на лигноцеллюлозных материалах. Данные процессы являются примерами низкоэнергетических технологических систем. Процессы различаются по типу используемого субстрата или получаемого продукта, а также по степени изощренности (изобретательности) методологии процесса. В то время как большинство процессов получения одноклеточного белка основано на жидкостных ферментациях, многие из современных способов деградации целлюлозы базируются на ферментации с пониженным увлажнением, известной под термином «твердофазная ферментация».

Во многих странах некоторая часть соломы, получающейся в сельскохозяйственных производствах, традиционно используется для компостирования с лошадиным навозом для получения субстрата, пригодного при выращивании грибов (*Agaricus bisporus*). Ежегодно «грибная» промышленность Британии потребляет около 300 000 т соломы для приготовления компоста, на котором выращивают грибы. Технологии, основанные на использовании микроорганизмов и методов биохимической инженерии в целях производства больших количеств биомассы, напоминают сельскохозяйственное производство. Однако так называемый «грибной процессинг», рассматриваемый в качестве примера общей биотехнологии, считается какой-то пренебрежительной областью «новых» биотехнологических разработок, хотя большое число съедобных грибов в настоящее время выращивается искусственным путем в различных странах мира. Новинки в эту область стали проникать сравнительно недавно, однако «вознаграждение» в скором будущем окажется, по оценкам специалистов, огромным. Биотехнология, как ни странно, не всегда должна быть высоко технологичной. В развивающихся странах, где дорогостоящие системы могут оказаться неприемлемы в виду стоимости процессов и отсутствия грамотных операторов, различного рода новые биотехнологические разработки целесообразно использовать для совершенствования (улучшения) уже существующих традиционных микробиологических процессов. Основными примерами твердофазной ферментации являются многие типы обработки ряда пищевых продуктов, применяющиеся в странах Востока. В этих процессах некоторые мягкие материалы (горох, бобы, отруби и т. п.) служат объектами микробной переработки (гидролиз крахмала и белков) с целью получения продуктов улучшенного качества (например, улучшение аромата продукта, обогащение его белком и аминокислотами). Примерами традиционной пищи на Востоке являются мисо, соевый соус и др., обычно изготавливаемые в «домашних» масштабах. Однако многие из этих блюд составляют основу крупных промышленных производств, требующих существенного биотехнологического оснащения. Подобные блюда и ароматизированные соусы медленно, но верно распространяются на Запад и несомненно станут в недалеком будущем составной частью нашего ежедневного меню.

*Одноклеточный белок из сельскохозяйственного сырья.* Выше было показано, каким образом микроорганизмы могут использоваться для получения одноклеточного белка из органических отходов типа сахаров, крахмала и целлюлозы. Почему же в таком случае не выращиваются растения специально для применения в качестве субстрата, на котором можно было бы получать одноклеточный белок микробиологическим способом? Концепция производства

растительной биомассы в качестве материала для биотехнологических процессов крайне актуальна и важна. В настоящее время такого рода программы используются в большей степени для производства этанола, но вполне обоснованно полагать, что маниока, сахарный тростник и некоторые виды пальм могут явиться перспективным сырьем, которое подвержено быстрым ферментативным обработкам с достаточно высоким экономическим эффектом. Если лигноцеллюлоза окажется способной легко и экономически выгодно утилизироваться какими-нибудь микроорганизмами, то большинство районов мира получают готовые питательные субстраты, пригодные для различных биотехнологических процессов.

*Одноклеточный белок из водорослей.* Одно время существовал повышенный интерес к проблеме использования водорослей в качестве одноклеточного белка, поскольку они хорошо растут в открытых прудах и нуждаются только в CO<sub>2</sub> как источнике углерода, а также в солнечном свете как источнике энергии для фотосинтеза. Такие водоросли, как *Chlorella* и *Scenedesmus*, долгое время использовались в пищу в Японии, а *Spirulina* широко применялась в Африке и Мексике. В некоторых странах мира водоросли выращивают в прудах или лагунах для удаления с их помощью ряда органических загрязнений, а образующуюся массу собирают, высушивают и добавляют в порошкообразном виде в корм животным.

*Экономические аспекты применения одноклеточного белка.* Экономическая целесообразность одноклеточного белка определяется его конкурентной способностью по сравнению с существующими продуктами. Препараты микробного белка богаты данным веществом и могут длительное время храниться и транспортироваться на дальние расстояния. Применение одноклеточного белка предполагается в будущем преимущественно в качестве кормовых добавок в пищу животным в целях замены других белковых материалов (таких, как соевая мука или рыбная мука). Несмотря на то, что производство одноклеточного белка даже в промышленных масштабах является биологическим процессом, его внедрение не должно нарушать установившиеся в природе экологические равновесия (балансы). С этой целью в биотехнологии его получения устраняется вероятность появления каких-либо синтетических соединений и применяются (по возможности) технологии, основанные на использовании систем рециклизации, для предотвращения загрязнения окружающей среды.

Процессы получения одноклеточного белка обычно весьма объемны и энергетически очень емки и кроме того, должны осуществляться в стерильных условиях, что требует дорогого оснащения, которое должно чиститься и подвергаться стерилизации. Обязательным условием является предотвращение попадания в конечный продукт посторонней микрофлоры, особенно патогенной для человека. Для того чтобы производство одноклеточного белка было экономически выгодным, масштабы его должны достигать по крайней мере 50 000 т в год готового продукта. А это, в свою очередь, требует наличия соответствующего обеспечения сырьевым материалом, который желательнее иметь поблизости от основного производства. Довольно большие потребности в воде, которая нужна также для процессов завершающей обработки продукта и охлаждения [25].

Широкомасштабные процессы, разрабатываемые для производства одноклеточного белка, в значительной степени зависят от успехов современной биотехнологии. Поэтому в его производстве участвуют на разных этапах специалисты в области микробиологии, биохимии, генетики, химии и химической инженерии, пищевой технологии, сельского хозяйства, животноводства, экологии и токсикологии, медицины, ветеринарии и конечно экономики.

Нет никаких сомнений, что существенные импульсы развитию производства одноклеточного белка будут поступать из ужесточающегося законодательства, связанного с увеличением объема плотных и жидких отходов, загрязняющих внешнюю среду (т. е. из требований охраны окружающей среды). Кроме того, постоянно должна повышаться конкурентоспособность одноклеточного белка, будущее которого в значительной мере зависит от снижения производственных затрат и, конечно, улучшения качества. Последнее может достигаться за счет использования более дешевых сырьевых материалов, совершенствования ферментационных процессов и завершающих стадий обработки получаемого продукта, а также повышения активности продуцентов.

### **Контрольные вопросы (задания)**

1. Какие субстраты используют для производства белка? Где используют полученные белковые препараты?
2. Какие микроорганизмы используют при производстве белковых препаратов?
3. В чем заключается экономическая эффективность производства микробного белка?
4. Приведите технологическую схему производства микробного белка.
5. В чем заключаются особенности микробиологического производства?
6. Какие факторы влияют на биотехнологическое производство белка?
7. Что такое «твердофазная ферментация»?
8. Какие водоросли используют при производстве одноклеточного белка?

## Практический раздел

### Правила техники безопасности при работе в лаборатории

К работе в лаборатории допускаются студенты, прошедшие инструктаж по технике безопасности. При проведении лабораторных работ по дисциплине «Основы биотехнологии» необходимо соблюдать следующие правила техники безопасности:

- 1) Студент должен работать только в чистом халате, волосы должны быть подобраны, не падать на плечи;
- 2) Запрещается выходить за пределы лаборатории в халатах или надевать верхнюю одежду на халат;
- 3) На рабочем месте не следует держать никаких посторонних предметов. Сумки и пакеты укладывают в специально отведенное для них место;
- 4) На каждом занятии назначается дежурный, который отвечает за чистоту и порядок;
- 5) Категорически запрещается в лаборатории принимать пищу, курить и пить воду из химической посуды, а также пробовать на вкус химические реактивы;
- 6) Прежде чем приступить к работе, необходимо изучить свойства используемых и образующихся веществ, а также правила техники безопасности при работе с ними;
- 7) Перед началом работы обязательно проверяют наличие и исправность приборов, посуды, горелок и др. О замеченных недостатках, неисправностях сообщают преподавателю или лаборанту;
- 8) Горячие и раскаленные предметы ставить только на асбестовую сетку или иную термостойкую прокладку;
- 9) При работе с крепкими кислотами и щелочами необходимо:
- 10) При отмеривании и переливании кислоты и щелочи надевать защитные очки, резиновые перчатки и поверх халата прорезиненный фартук;
- 11) Не втягивать кислоту пипеткой в рот, использовать для отмеривания кислоты дозаторы или резиновую грушу;
- 12) При приготовлении растворов кислот надо наливать кислоту в воду, а не наоборот;
- 13) Все опыты с концентрированными кислотами, щелочами, газообразными веществами, органическими растворителями следует производить в вытяжном шкафу;
- 14) Отработанные кислоты и щелочи сливать через воронку в специальные бутылки;
- 15) При воспламенении горючих жидкостей (бензин, эфир, спирт и др.) следует быстро погасить горелки, выключить электронагревательные приборы, унести все находящиеся поблизости горючие вещества, а затем гасить пламя, засыпая его песком, закрывая мокрым полотенцем или одеялом;
- 16) Большое пламя гасят с помощью углекислотных огнетушителей. Не следует заливать пламя водой, во многих случаях это приводит к большему распространению пламени и расширению очага пожара;
- 17) В случае воспламенения одежды не следует бежать, надо набросить на пострадавшего халат, брезент, шерстяное или войлочное одеяло;
- 18) Запрещается работать с разбитой посудой и проводить опыты в грязной посуде. Посуду следует мыть сразу после выполнения работы;
- 19) Соблюдать правила работы с химическими реактивами; категорически запрещается использовать реактивы из банок без этикеток;
- 20) Запрещается выливать в раковины остатки кислот, щелочей, легковоспламеняющихся и горючих жидкостей, бросать в раковины бумагу, спички, песок и другие твердые вещества;
- 21) При работе с химическими реактивами необходимо избегать попадания на руки, не трогать лицо и глаза руками;
- 22) Нюхать все вещества необходимо крайне осторожно, не наклоняясь над сосудом и не вдыхая полной грудью, а направляя к себе пары или газы движением руки;

- 23) Категорически запрещается нагревать или охлаждать воду или растворы в герметически закрытых сосудах. Нельзя также герметически закрывать колбу с горячей жидкостью;
- 24) Пробирки с жидкостью при нагревании надо держать наклонно в сторону от себя и от соседа;
- 25) Для нагревания горючих и летучих реактивов нужно пользоваться водяными банями. Нельзя их нагревать на открытом огне или вблизи пламени;
- 26) Запрещается работать с огнеопасными веществами в одиночку и оставлять без присмотра включенные электроприборы;
- 27) Нельзя наклоняться над сосудом, в котором что-либо кипит или куда наливается жидкость, так как брызги могут попасть в глаза;
- 28) При закрывании тонкостенного сосуда пробкой следует держать его за верхнюю часть горла как можно ближе к пробке, руки при этом должны быть обернуты полотенцем; нельзя закрывать пробкой колбу, держа последнюю на ладони, так как колба может лопнуть и вызвать глубокие порезы;
- 29) Запрещается работать с неисправным оборудованием, уходить с рабочего места при проведении исследования и оставлять без присмотра включенные приборы и электрооборудование;
- 30) Следует соблюдать осторожность при работе со спиртовой горелкой:
- 31) После того, как сняли крышку горелки, необходимо расправить фитиль незажженной спичкой или препаровальной иглой, после чего зажечь спичку и поджечь фитиль;
- 32) Работать рядом с горящей горелкой нужно очень аккуратно, чтобы избежать воспламенения волос головы;
- 33) Во избежание взрыва нельзя зажигать одну спиртовку от другой;
- 34) Оставлять зажженные спиртовки без присмотра;
- 35) Нельзя переносить спиртовку во время работы в зажжённом виде с одного стола на другой;
- 36) После работы пламя горелки следует загасить крышкой (не дуть), затем крышку плотно завернуть;
- 37) Не касаться металлическими и другими предметами проводов и контактных частей электросети. Не включать без ведома преподавателя или лаборанта любую электроаппаратуру;
- 38) При работе с электроприборами не отключать прибор мокрыми руками, не соприкасаться металлическими и другими предметами контактных частей электросети. В случае неисправности прибора (нагревание, искрение, замыкание) его необходимо тотчас же обесточить и сообщить о случившемся преподавателю;
- 39) Запрещается переносить и ремонтировать включенное оборудование, находящееся под током;
- 40) Запрещается хранить любое оборудование в непосредственной близости от реактивов и растворов;
- 41) Твердые реактивы разрешается брать из склянок только с помощью совочков, ложечек, шпателей;
- 42) Каждый работающий в лаборатории должен знать, где находится аптечка с медикаментами, и уметь оказать первую помощь при различных травмах;
- 43) По окончании работы привести в порядок рабочее место (вымыть посуду, поставить на рабочее место реактивы, приборы и т. п., стол вымыть, протереть сухой тряпкой) и сдать дежурному;
- 44) Перед уходом из лаборатории снять халат и тщательно вымыть руки;
- 45) Дежурный перед уходом из лаборатории должен проверить, выключены ли газ, вода, электроприборы.

## Требования к оформлению отчетов по лабораторным работам

К работам в лаборатории студентов допускают после их ознакомления с правилами безопасности (с общими – в начале семестра и с частными – перед каждым занятием).

Допуск к выполнению лабораторной работы происходит при условии положительной оценки ответов студентов на устные вопросы, охватывающие тему лабораторной работы. Полнота ответов студентов оценивается в баллах.

Студенты, не подготовившиеся к занятию, к выполнению задания не допускаются и выполняют его вне расписания после повторной проверки готовности.

Каждый студент ведет рабочую тетрадь, оформление которой должно отвечать следующим требованиям:

- ✓ на титульном листе указывают предмет, по которому делаются записи, кем они делаются (курс, группа, подгруппа, фамилия, имя, отчество);
- ✓ каждое занятие отмечают порядковым номером, указывают его дату;
- ✓ в отчете по лабораторной работе указывают тему, цели работы, объект изучения, материальное обеспечение, фиксируют основные этапы исследования;
- ✓ результаты фиксируют в виде рисунков с обязательными подписями к ним и описывают текстом или оформляют в виде таблиц;
- ✓ в конце каждой работы делают вывод или заключение, в которых анализируются и объясняются полученные результаты. Выводы должны быть развернутыми и аргументированными.

Если есть необходимость, то перед началом работы делают небольшой конспект теоретического материала.

Таблицы и рисунки оформляют согласно требованиям. Рисовать можно только простым карандашом с помощью чертежных инструментов, желательно на одной стороне листа, так как рисунки, сделанные на обеих сторонах, накладываются друг на друга и со временем портятся.

При сдаче отчета студент должен уметь пояснить выполнение каждого этапа работы и ответить на вопросы преподавателя.

Оценка по лабораторной работе выставляется с учетом срока ее выполнения и качества оформления отчета. Студент получает максимальное количество баллов при оформлении отчета в соответствии с требованиями и правильных ответах на заданные вопросы.

Основанием для снижения количества баллов является:

- небрежное выполнение отчета;
- низкое качество графического материала (отсутствие указания единиц измерения на графиках и т. д.).

Отчет не может быть принят и подлежит доработке в случае отсутствия в нем:

- необходимых разделов;
- необходимого графического материала;
- выводов по результатам работы.

После сдачи правильно выполненная работа подписывается преподавателем.

## Лабораторная работа № 1. Изучение биотехнологических характеристик хлебопекарных и пивных дрожжей

Продолжительность 4 часа.

**Цель работы:** изучить биотехнологические характеристики дрожжей и их применение в пищевой биотехнологии на примере хлебопекарных и пивных дрожжей.

**Материалы и оборудование:** образцы хлебопекарных прессованных и пивных дрожжей, микроскоп, предметные и покровные стекла, бактериологические петли, фильтровальная бумага, спиртовки, раствор метиленовой сини, вода дистиллированная, спирт 96 %, весы лабораторные аналитические, водяная баня, термостат, пипетки на 5 и 10 см<sup>3</sup>, мерный цилиндр на 100 см<sup>3</sup>, колбы на 50–100 см<sup>3</sup>, бюретки на 25 см<sup>3</sup>, стаканы на 50 см<sup>3</sup>, чашка фарфоровая, пестик, шпатель, термометр, 1%-ный раствор фенолфталеина, 0,1 н. раствор гидроксида натрия, 2,5%-ный водный раствор NaCl, мука пшеничная 2-го сорта с базисной влажностью 14,5 %.

### Ход работы

#### Теоретическая часть

Дрожжи являются одноклеточными неподвижными микроорганизмами, широко распространенными в природе; они встречаются в почве, на листьях, стеблях и плодах растений, в разнообразных пищевых субстратах растительного и животного происхождения. Дрожжи относятся к царству грибов *Mycota*, отделу истинных грибов *Eumycota*. В пищевой промышленности встречаются главным образом представители истинных грибов, *классификация* которых базируется на *трех признаках*: 1) строение мицелия; 2) наличие полового способа размножения; 3) особенности полового размножения.

Дрожжи, используемые в хлебопечении и в бродильных производствах, относятся к семейству сахаромикетов, роду *Saccharomyces*. Формы клеток дрожжей разнообразны: шаровидная, полушаровидная, овальная, удлинённо-овальная, цилиндрическая, лимоновидная (апикулярная), стрелчатая, вытянутая. Размеры дрожжевых клеток варьируют в широких пределах: мелкие клетки имеют диаметр 1,5–2,0 мкм, длину 3–5 мкм; диаметр крупных клеток 8–10 мкм, длина 11–18 мкм; вытянутые клетки достигают в длину 20–25 мкм. Величина дрожжевых клеток зависит от расы, физиологического состояния дрожжей и состава питательной среды. Прессованные дрожжи содержат около 30 % сухих веществ и 70 % воды. В сухих веществах дрожжей содержится 90–95 % органических веществ и 5–10 % неорганических веществ. Среди органических веществ имеются белки и азотсодержащие вещества – 54–56 %, углеводы – 24–40 %, жиры – 2–4 % (к массе сухих веществ). Основная часть углеводов представлена гликогеном (запасное вещество), сходным по химическому строению с амилопектином крахмала. Среди неорганических веществ около половины фосфорной кислоты и 1/3 калия. Фосфорные соединения имеют важное значение в обмене веществ дрожжевых клеток, так как входят в состав промежуточных веществ спиртового брожения, а калий играет первостепенную роль в построении молекул белков и углеводов. Дрожжи богаты витаминами группы В, содержат эргостерин (провитамин D) и др. В дрожжах содержатся различные ферментные системы, участвующие в процессах гидролиза и синтеза, а также в процессах брожения и дыхания [2, 16].

Цитологические особенности дрожжевой клетки могут существенно изменяться в зависимости от ее возраста. *Молодые* активные клетки дрожжей (12–18-часовая культура) при микроскопировании имеют тонкую прозрачную оболочку и гомогенную, без видимых включений, цитоплазму, небольшую вакуоль. Молодые дрожжи интенсивно размножаются, при этом доля почкующихся клеток может достигать 70–80 %.

*Зрелые дрожжи* (24–48-часовая культура) имеют зернистую неоднородную или гетерогенную цитоплазму. Количество клеток с вакуолями увеличивается, иногда обнаруживаются клетки с двумя и более вакуолями. Процесс размножения дрожжей замедляется; процент почкующихся клеток составляет в среднем 10–15 %. Внутри клетки появляются жировые включения, которые хорошо видны без специального окрашивания при полузакрытой диа-

фрагме. В зрелых дрожжах встречается до 2–4 % мертвых клеток, которые выявляются с помощью прижизненного окрашивания суспензии дрожжей слабым раствором метиленового голубого. Доля запасных веществ – липидов, гликогена – возрастает по мере роста клетки. Для зрелой культуры дрожжей характерно наличие в клетках большого количества гликогена. Он откладывается в вакуолях как резервное вещество и расходуется по мере старения клетки. При культивировании дрожжей на богатых углеводами средах без аэрации количество клеток с гликогеном составляет 65–70 %, что свидетельствует об «упитанности» и зрелости дрожжей.

*Старые дрожжи* (48 ч и более) имеют утолщенную оболочку, которая хорошо видна при микроскопировании. Цитоплазма зернистая, гетерогенная, вакуоли крупные, по несколько в одной клетке. В популяции старой культуры присутствует большое количество клеток, содержащих липиды в виде круглых, резко преломляющих свет включений. Характерным признаком старой культуры является наличие значительного количества мертвых клеток.

Температурный оптимум для размножения дрожжей находится в пределах 25–30 °С. Низкие температуры дрожжи переносят хорошо, хотя размножение их приостанавливается (минимальная температура развития дрожжей 2–3 °С). При температуре 40 °С рост и развитие дрожжей прекращается, дрожжи отмирают.

Дрожжи чувствительны к высокой концентрации растворенных в среде веществ. При высокой концентрации сахара в среде жизнедеятельность дрожжей прекращается, так как при этом увеличивается осмотическое давление среды и наступает плазмолиз клеток. Величина предельной концентрации сахара для различных рас дрожжей неодинакова.

Культурные дрожжи относятся к ацидофилам, т. е. развиваются в кислой среде, оптимальное значение рН для дрожжей 4,5–5,0. Являются факультативными анаэробами. Дрожжи могут получать свою энергию в присутствии кислорода (аэробно) путем дыхания и в отсутствие кислорода (анаэробно) путем брожения. Широкое использование дрожжей в промышленности основано на их способности вызывать спиртовое брожение.

#### ***Использование микроорганизмов в хлебопечении***

Изготовление хлеба представляет собой цикл сложных биохимических процессов, происходящих в тесте с момента смешивания муки с водой и заканчивая его выпечкой. В состав муки, используемой для выпечки пшеничного и ржаного хлеба, входят компоненты, необходимые для развития многих микроорганизмов. Кроме крахмала в муке содержится до 2 % сбраживаемых сахаров – глюкозы, фруктозы, мальтозы, сахарозы, раффинозы. Мука хороших сортов пшеницы содержит до 14 % белка, до 2 % жиров и жироподобных веществ и до 2 % минеральных веществ, в том числе микроэлементы. Решающую роль в приготовлении хлеба наряду с ферментами муки играет жизнедеятельность микроорганизмов. Наиболее важное значение имеют дрожжи и молочнокислые бактерии, для развития которых в тесте есть все необходимые условия: влажность 40–50 %, незначительное содержание молекулярного кислорода и наличие питательных веществ.

Ведущая роль в формировании качества хлеба принадлежит дрожжам. Микробиологические процессы и связанные с ними биохимические изменения в тесте определяют пористость, окраску и сохранение свежести хлеба, придают ему вкус и аромат, несколько повышают его пищевую ценность.

Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* (рис. 15) различных рас являются главными разрыхлителями теста. Для хлебопечения особенно важны такие свойства дрожжей, как высокая потенциальная активность гликолитических ферментов, стойкость их хранения, способность переносить высокие концентрации сахаров и NaCl в среде. В хлебопечении чаще всего используют быстрорастущие расы сахаромикетов верхового брожения. У полноценных рас дрожжей подъемная сила, т. е. длительность подъема теста на стандартную высоту 70 мм в стандартной форме, должна быть не более 45 мин. На хлебозаводах применяют прессованные и сухие дрожжи.

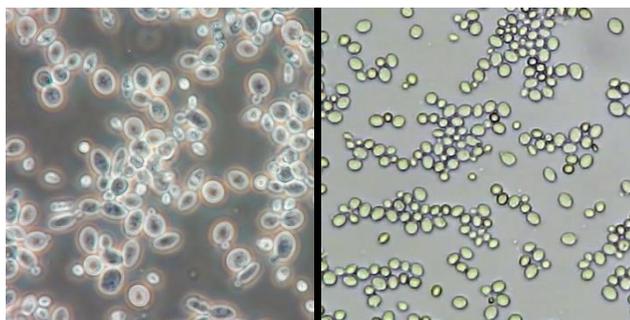


Рисунок 15 – Клетки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* под световым микроскопом

Схема приготовления жидких дрожжей из прессованных и сухих включает в зависимости от сорта хлеба заквашивание осахаренной и охлажденной до 50 °С мучной заварки молочнокислыми бактериями, например, *Lactobacillus delbrueckii*. Они ускоряют процесс брожения в тесте и обладают высокой протеолитической активностью, которая позволяет накапливать в тесте значительное количество аминного азота, положительно влияющего на скорость роста и подъемную силу дрожжей. Наряду с сахаромицетами в тесто могут спонтанно попадать дрожжи родов *Candida* и *Pichia* – *C. krusei*, *C. utilis*, *C. guilliermondii*, *P. xylosa*, *P. vini*. В пшеничных и ржаных заквасках преобладают молочнокислые бактерии, а не дрожжи. По микробиологическому составу закваски ржаные и пшеничные различаются. Молочнокислые бактерии в зависимости от влажности и температуры – в заквасках пшеничных и ржаных преобладают: в густых – *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. paracasei*; в жидких – *L. fermentum*, *L. casei*, *L. plantarum*. Дрожжи: пшеничные закваски – преимущественно *S. cerevisiae*; ржаные – преимущественно *C. milleri* и незначительно – *S. cerevisiae*, при использовании заварок – преимущественно *S. cerevisiae*.

#### **Использование микроорганизмов в пивоварении**

Отличительная особенность пивных дрожжей – функциональная способность питаться жидкими гидратными растворами сахаров (трисахарида раффинозы) и к выработке в процессе брожения спиртов и двуокиси углерода. Дрожжевая клетка на 75 % состоит из воды. В сухом веществе дрожжей содержатся 90 % органики: белков – 40-60 %; углеводов – 25-35 % и липиды. Минеральная составляющая клетки – калий, фосфор, кальций и др.

В отечественной промышленности применяют в основном пивоваренные дрожжи низового брожения *Saccharomyces carlsbergensis* (относятся к расам дрожжей *S. cerevisiae*). Эти дрожжи имеют общие свойства: овальную или эллиптическую форму, размеры (длина 8-10 мкм, ширина 4-6 мкм); являются факультативными анаэробами; споры образуют редко; размножаются почкованием (рис. 16).

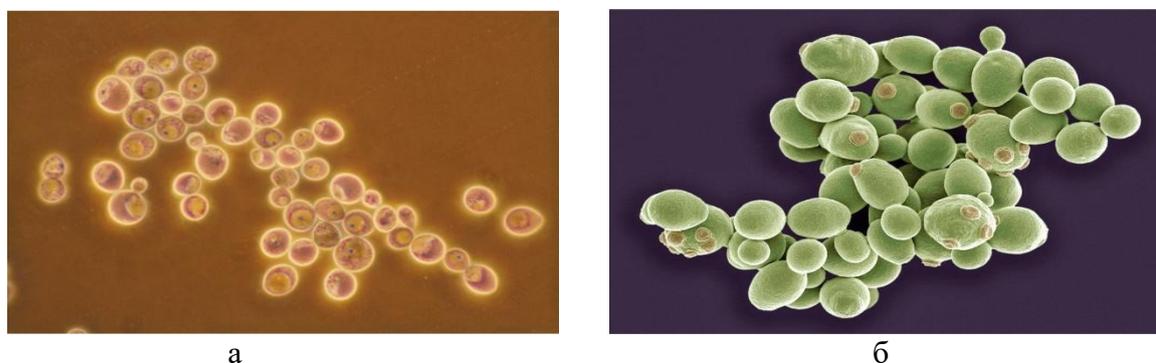


Рисунок 16 – Форма клеток пивоваренных дрожжей в световом (а) и электронном (б) микроскопах

Метаболизм дрожжей в пивном сусле оказывает тонкое влияние на вкусовые качества и характерный аромат пива, поэтому подбор культурных рас дрожжей является привилегией и очень сложной проблемой любого пивовара.

Среди чистых культур пивоваренных дрожжей имеется много штаммов или рас. Эти дрожжи встречаются лишь в условиях низового брожения, в других субстратах их нет. Штаммы пивоваренных дрожжей различаются физиологическими признаками.

Уровень жизнедеятельности дрожжей зависит от различных условий:

- *углеводного состава сусле*. Определяется наличием в сусле сбраживаемых и несбраживаемых сахаров. Содержание сбраживаемых сахаров в сусле составляет 70-80 % сухих веществ. Это мальтоза (60-70 %), мальтотриоза (15-20 %), глюкоза (10-15 %). Быстрее всего сбраживаются моносахариды, медленнее мальтоза и хуже всего мальтотриоза;
- *азотистого состава сусле*. Азотистые вещества необходимы клеткам для синтеза компонентов, обеспечивающих их рост и размножение. Наиболее ценными и важными источниками азота являются аминокислоты, пуриновые и пиримидиновые основания. От биосинтеза и распада аминокислот зависит образование ароматических веществ. Образующиеся при биосинтезе дрожжей аминокислоты придают пиву бархатистую консистенцию. При неблагоприятных условиях культивирования они могут быть причиной дрожжевого привкуса и помутнения пива;
- *температуры и наличия в среде кислорода*. При низкой температуре и анаэробных условиях размножение дрожжей замедляется, но вырастают они более крупными с большим запасом резервных веществ и высокой бродильной активностью. При повышении температуры и аэрации увеличивается потребность дрожжей в питательных веществах, размеры клеток уменьшаются, они не содержат запасных веществ и вырастают более слабыми.

Сахара сусле при производстве пива сбраживаются дрожжами в спирт. Среди дрожжей вида *Saccharomyces cerevisiae*, применяемых преимущественно в пивоварении в качестве культурных дрожжей, различают многочисленные штаммы. В пивоваренной практике эти штаммы делят на две большие группы – дрожжи верхового и низового брожения. Между ними существуют морфологические, физиологические и технологические различия (рис. 17).

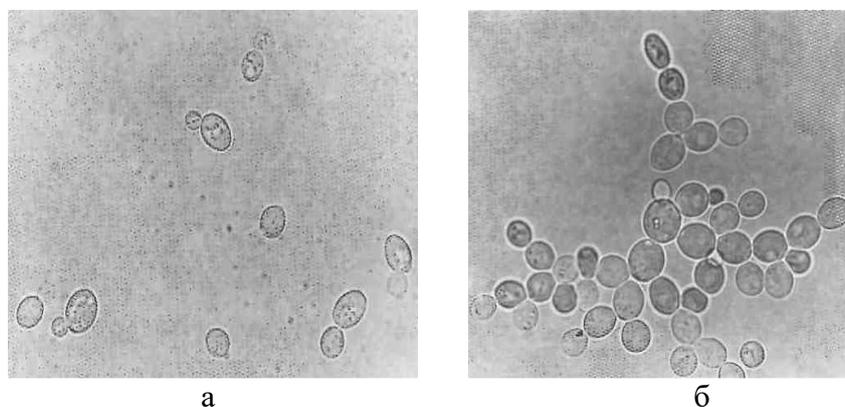


Рисунок 17 – Пивные дрожжи низового (а) и верхового (б) брожения под микроскопом

**Морфологические признаки.** Дрожжи верхового и низового брожения можно отличить под микроскопом по картине их почкования. Дрожжи низового брожения представляют собой почти исключительно отдельные клетки или их пары, тогда как дрожжи верхового брожения образуют почечные сообщества. У дрожжей верхового брожения материнская и дочерняя клетки, как правило, долго между собой связаны, благодаря чему образуются разветвленные сообщества клеток. У дрожжей низового брожения материнские и дочерние клетки после размножения отделяются друг от друга. Форма же клеток у тех и других дрожжей одинакова.

**Физиологические различия.** Важнейший физиологический отличительный признак дрожжей верхового и низового брожения состоит в сбраживании трисахарида раффинозы. Дрожжи низового брожения со своим набором ферментов могут полностью перерабатывать

раффинозу, тогда как дрожжи верхового брожения сбраживают трисахарид лишь на 1/3. Другие отличительные признаки касаются обмена веществ при дыхании и брожении, а также способности к спорообразованию. В то время как дрожжи низового брожения в основном используют обмен веществ путем брожения, дрожжи верхового брожения отличаются выраженным обменом веществ путем дыхания. В соответствии с этим после брожения прирост биомассы у верховых дрожжей больше, чем низовых. Дрожжи низового брожения беднее ферментами, чем верховые. У них ограничена способность образовывать аскоспоры, по сравнению с верховыми они образуют споры реже и спорообразование продолжается дольше.

*Технологические различия при сбраживании.* Название штаммов дрожжей верхового или низового брожения происходит от характерной картины их поведения при брожении.

Дрожжи верхового брожения в процессе брожения в основном поднимаются на поверхность, тогда как низового брожения по окончании опускаются на дно. Дрожжи верхового брожения также опускаются на дно по окончании брожения, но значительно позже низовых. К моменту сбора дрожжей в конце главного брожения они еще находятся наверху и продолжают размножаться (если используются открытые чаны).

Другим существенным признаком дрожжей низового брожения является особенность хлопьеобразования, по этому признаку пивные дрожжи низового брожения разделяют на пылевидные и хлопьевидные. У пылевидных дрожжей клетки тонко распределены в бродящем сусле и медленно опускаются на дно лишь в конце брожения. Клетки хлопьевидных дрожжей через некоторое время собираются в большие хлопья и затем быстро оседают. Способность дрожжей образовывать хлопья обусловлена генетически и передается по наследству. Дрожжи верхового брожения хлопья не образуют. Способность штаммов дрожжей образовывать хлопья имеет большое практическое значение. Хлопьевидные дрожжи дают пиво лучше осветленное, но с более низкой степенью сбраживания, чем пылевидные и дрожжи верхового брожения, тогда как верховые пылевидные дрожжи дают не такое прозрачное пиво, но с повышенной степенью сбраживания. Дрожжи верхового и низового брожения различаются также по применяемым температурам брожения. Низовыми дрожжами сбраживают сусло при температурах от 4 °С до 12 °С, а с верховыми штаммами дрожжей работают при температурах от 14 °С до 25 °С. Температуры брожения устанавливает пивовар.

К виду дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* относятся не только культурные штаммы, но также дикие дрожжи, опасные для пивоварения. Например, для пива вредителями являются винные дрожжи, а также дрожжи некоторых других видов и родов.

Попадание таких микроорганизмов в пиво называется контаминацией (инфицированием). Эти микроорганизмы, называемые, в отличие от культурных дрожжей, дикими дрожжами, попадают в пивоваренное производство главным образом с сырьем и всегда нежелательны. Они могут вызывать в пиве неприятные вкус и запах, а также помутнение.

### ***Практическая часть***

**Задание 1.** Определить степень инфицирования культур и морфологические характеристики клеток. Приготовить препараты хлебопекарных и пивных дрожжей «раздавленная капля», окрашенные с применением метиленовой сини. Рассмотреть окрашенные препараты в микроскоп ( $\times 40$ ), исследовать их морфологический состав и проверить чистоту культур. Зарисовать микроскопическую картину.

**Задание 2.** Определить кислотность прессованных дрожжей. Сравнить результаты с требованиями ГОСТ 54731-2011.

**Задание 3.** Определить подъемную силу прессованных хлебопекарных дрожжей с помощью ускоренного метода. Подготовить и исследовать образцы теста, приготовленные на водном растворе поваренной соли, воде, молочной сыворотке и обезжиренном молоке. Сравнить полученные результаты и сделать выводы

### ***Задание 1. Определение степени инфицированности дрожжей***

В нескольких каплях стерильной воды размешивают петлю дрожжей. Для приготовления препарата каплю дрожжевой суспензии из средней пробы наносят на предметное стекло,

добавляют каплю метиленового синего и готовят препарат раздавленная капля. При определении степени инфицирования культуры количество посторонних микроорганизмов просчитывают не менее чем в пяти полях зрения. При микроскопировании не должны быть обнаружены подвижные формы бактерий, микромицетов и диких дрожжей, неподвижные кислотообразующие бактерии допускаются в количестве не более 1-3 штук в поле зрения микроскопа.

Большее количество бактериальных клеток свидетельствует о наличии инфекции, которая может привести к значительному нарастанию кислотности, так как бактериальная инфекция зрелых дрожжей обычно бывает кислотообразующей.

#### **Определение морфологического состояния клеток**

Дрожжи должны иметь форму и размеры, соответствующие применяемой расе. Клетки должны быть равномерной величины, с тонкой оболочкой, однородной или мелкозернистой цитоплазмой, небольшими вакуолями. Наличие большого количества морфологически измененных клеток в сочетании с пониженной бродильной активностью свидетельствует о дегенерации культуры.

Оболочка в виде утолщенного ободка, зернистая цитоплазма, крупные вакуоли и отсутствие почкующихся клеток характеризуют старую культуру.

#### **Задание 2. Определение кислотности прессованных дрожжей**

Навеску дрожжей (10 г) перенести в фарфоровую ступку и растереть в 50 мл дистиллированной воды комнатной температуры.

Прибавить 3 капли фенолфталеина и оттитровать 0,1 н раствором NaOH (перемешивая содержимое пестиком) до появления слабо-розовой окраски, не исчезающей в течение 1 мин.

*Обработать результаты.*

Кислотность дрожжей в пересчете на уксусную кислоту (Н) в миллиграммах на 100 г дрожжей вычисляют по формуле:

$$H = \frac{V \cdot 6 \cdot 100 \cdot K}{10},$$

где  $V$  – объем 0,1 моль/дм<sup>3</sup> раствора щелочи, израсходованный на титрование, см<sup>3</sup>;

$6$  – объем уксусной кислоты, соответствующий 1 см<sup>3</sup> 0,1 н. раствора NaOH, мг;

$100$  – переводной коэффициент;

$K$  – поправочный коэффициент 0,1 моль/дм<sup>3</sup> раствора NaOH.

При вычислении результатов анализа доли до 0,5 отбрасывают, а доли, равные 0,5 и более, округляют до единицы.

Кислотность нормальных дрожжей обычно находится в пределах 1-2 мл нормального раствора едкого натра, что соответствует не более 55-90 мг уксусной кислоты на 100 г прессованных дрожжей. Повышение кислотности, прежде всего, свидетельствует о зараженности дрожжей кислотообразующими бактериями.

#### **Задание 3. Быстрота подъема теста (подъемная сила дрожжей)**

Дрожжи используют для разрыхления теста за счет сбраживания сахаров – глюкозы, фруктозы и мальтозы.

Способность дрожжей сбраживать глюкозу и фруктозу определяют по величине подъемной силы и зимазной активности, а способность сбраживать мальтозу – по величине мальтазной активности. Различают два типа дрожжей: дрожжи с нормальной подъемной силой, сбраживающие сахарозу быстрее, чем мальтозу, и дрожжи с повышенной подъемной силой, сбраживающие мальтозу почти так же активно, как сахарозу. Дрожжи первого типа рекомендуют использовать для приготовления обычных сортов хлеба, а второго – для приготовления высокорецептурных хлебобулочных изделий.

Чем быстрее дрожжи поднимают тесто, тем качество их считается выше. На быстроту подъема теста дрожжами влияют многие факторы: свойства данной расы дрожжей, чистота их, полноценность питательной среды, на которой они выращивались, условия выращивания (температура, рН среды, степень аэрации и т. д.), химический состав дрожжей (с уменьшением содержания белка понижается подъемная сила дрожжей) и т. д.

*Ускоренный метод определения подъемной силы прессованных хлебопекарных дрожжей (по шарик)*

Метод основан на определении скорости всплывания в воде шарика теста, замешанного в строго определенных условиях. Быстрой подъема теста считают количество минут, прошедших со времени опускания шарика теста в воду до момента его всплывания. Всплывание происходит тем скорее, чем быстрее увеличивается объем в результате накопления углекислого газа дрожжами. Плотность свежесмешанного теста около 1,4 г/см<sup>3</sup>. В процессе брожения она уменьшается, и, когда плотность шарика станет меньше единицы, он всплывает. Хорошие дрожжи поднимают шарик за 14-20 мин. Если подъем шарика происходит после 24 мин, дрожжи считаются неудовлетворительного качества.

*Проведение испытания.* От средней пробы отбирают и на лабораторных весах взвешивают 0,31 г дрожжей, переносят в фарфоровую чашку, приливают 4,8 см<sup>3</sup> приготовленного раствора поваренной соли, нагретого до 35 °С, и тщательно перемешивают шпателем или пестиком. К полученному раствору добавляют 7 г муки, замешивают тесто и придают ему форму шарика.

Шарик опускают в стакан с водой, нагретой до температуры 35 °С, и помещают в термостат с той же температурой.

*Обработка результатов.* Подъемная сила дрожжей характеризуется временем, прошедшим с момента опускания шарика в воду до момента его всплывания.

Время подъема шарика в минутах умножают на коэффициент 3,5, полученный эмпирически, для определения подъемной силы.

Повторяют эксперимент в соответствии с методикой и определяют подъемную силу дрожжей, используя для замешивания теста вместо раствора поваренной соли дистиллированную воду, молочную сыворотку и обезжиренное молоко.

Сравнивают результаты исследования и делают выводы.

### **Контрольные вопросы**

1. Каков химический состав дрожжей?
2. Опишите свойства дрожжей, важные для хлебопечения.
3. Каковы условия среды, благоприятные для развития дрожжей?
4. Назовите морфологические признаки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.
5. Охарактеризуйте благоприятные условия жизнедеятельности пивных дрожжей.
6. Каковы морфологические и физиологические особенности дрожжей верхового и низового брожения?
7. Назовите технологические различия при сбраживании среды дрожжами верхового и низового брожения.
8. Каким методом определяется подъемная сила дрожжей? Что характеризует этот показатель?
9. Почему дрожжевым организмам отводится важная роль в пищевой промышленности?
10. Какими показателями характеризуется качество прессованных дрожжей?
11. Как определяют кислотность прессованных дрожжей, в каких единицах она выражается?
12. Какие показатели характеризуют бродильную активность дрожжей?
13. От чего зависит стойкость дрожжей при хранении, как она определяется?
14. Каким способом можно определить степень инфицированности дрожжей?
15. Какие виды молочнокислых бактерий преобладают в пшеничных и ржаных заквасках?
16. Что такое культурные и дикие дрожжи?
17. Каковы морфологические признаки молодых, старых и мертвых клеток дрожжей?
18. Чем различается область применения дрожжей хлебопекарных прессованных и дрожжей хлебопекарных сушеных?
19. Чем характеризуется подъемная сила прессованных дрожжей в случае ее определения ускоренным методом?

20. Почему при определении подъемной силы используется пшеничная мука 2 сорта?
21. Почему при определении подъемной силы прессованных дрожжей шарик теста всплывает?
22. Как изменяется кислотность дрожжей при хранении?
23. В чем выражается кислотность дрожжей?

## Лабораторная работа № 2. Использование биологической активации дрожжей в хлебопечении

Продолжительность 4 часа.

**Цель работы:** активация хлебопекарных дрожжей, изучение влияния активации дрожжей на ход технологического процесса брожения теста.

### **Ход работы**

#### **Теоретическая часть**

Факторами, влияющими на рациональный ход технологического процесса и качество продукции, являются исходная биотехнологическая активность дрожжей и способность их адаптироваться к анаэробным условиям жизнедеятельности в полуфабрикатах. От этих факторов зависят бродильная активность дрожжей, углеводный и азотный обмен, образование – ферментов.

Прессованные и сушеные хлебопекарные дрожжи находятся в состоянии анабиоза, когда обмен веществ временно прекращается или настолько замедлен, что отсутствуют видимые признаки проявления жизни.

Для активации дрожжей применяют биологическую стимуляцию метаболизма в питательных смесях и стимуляцию с помощью химических, физических, магнитных, термических и других способов. Наиболее эффективным приемом является биологическая стимуляция метаболизма дрожжей с использованием жидких питательных смесей, содержащих органические вещества, в частности углеводы, органические кислоты, витамины и минеральные соли.

Для обогащения жидких питательных смесей используют продукты переработки мукомольной, молочной, мясной, хлебопекарной и консервной отраслей промышленности, а также нетрадиционное сырье – ферментативные гидролизаты, плодоовощные порошки, концентрат квасного сусла, соевую муку и другие, являющиеся источниками питательных и биологически активных веществ.

Использование высокосахаренных ферментативных гидролизатов позволяет значительно обогатить состав питательной смеси. Для получения гидролизатов применяют ферментные препараты разжижающего и осахаривающего действия.

Ферментативные гидролизаты получают путем смешивания муки (пшеничной, кукурузной или картофельной – крахмала) и воды в соотношении 1:1,5 при температуре 40–50 °С с последующей клейстеризацией крахмала и его разжижением. Для разжижения крахмала в смесь вводят термостабильную бактериальную  $\alpha$ -амилазу и нагревают до 85–90 °С при перемешивании. Клейстеризованный крахмал мук и осахаривают глюкоамилазными ферментными препаратами.

При использовании для активации дрожжей высокосахаренных ферментативных гидролизатов процесс приготовления теста интенсифицируется и сокращается цикл его созревания на 25 %, качество хлебобулочных изделий улучшается.

Для активации хлебопекарных дрожжей, помимо ферментативных гидролизатов, используют также плодоовощные порошки и нетрадиционное сырье, в частности экстракты некоторого растительного сырья, например, листьев крапивы. Преимущество использования плодоовощных порошков перед ферментативными гидролизатами заключается в том, что исключается стадия гидролиза высокомолекулярных органических соединений, поскольку порошки содержат до 80 % легкоэкстрагируемых водой питательных веществ (глюкозу, фруктозу, микроэлементы др.).

Еще один способ активации дрожжей – применение концентрата квасного сусла (ККС). ККС – это полуфабрикат, обогащенный сахарами (мальтоза, глюкоза), аминным азотом, микроэлементами и витаминами. Этот компонент питательной смеси ускоряет перестройку дрожжевых клеток с дыхательного на бродильный тип жизнедеятельности.

Целесообразно использовать для активации дрожжей комплексные питательные смеси, в состав которых могут входить ККС, соевая мука, молочная сыворотка, аммонийные минеральные соли и другие ингредиенты.

### **Практическая часть**

**Материалы, оборудование, реактивы:** весы технические; линейка; емкость и шпатель для замеса теста; термометр технический с диапазоном измерения температур 0–100 °С; мерный цилиндр вместимостью 250 см<sup>3</sup>; стаканы вместимостью 1000 см<sup>3</sup>; расстойный шкаф ШРЛ-065 СПУ; порошок из яблочных выжимок; концентрат квасного сусла; сырье для замеса теста (мука, вода, дрожжи, соль, масло подсолнечное).

#### **Порядок выполнения работы**

##### **1. Активация хлебопекарных дрожжей**

Для активации хлебопекарных дрожжей используют 2 способа.

- Использование порошка из яблочных выжимок. Порошок в количестве 0,5 % к массе муки в тесте заливают питьевой водой (10 % от объема, предусмотренного рецептурой) с температурой 34–35 °С и интенсивно перемешивают в течение 3–5 мин. В полученную смесь вносят сухие хлебопекарные дрожжи, размешивают до образования однородной суспензии и выдерживают в течение 45–60 мин при 34–35 °С.
- Использование концентрата квасного сусла (ККС). ККС в количестве 0,5 % к массе муки в тесте заливают питьевой водой (10 % от объема, предусмотренного рецептурой) с температурой 34–35 °С и перемешивают до полного растворения ККС. В полученную смесь вносят сухие хлебопекарные дрожжи, размешивают до образования однородной суспензии и выдерживают в течение 45–60 мин при 34–35 °С.

По прошествии указанного времени смесь снова тщательно перемешивают и используют для замеса теста. В качестве контроля используют регидратированные дрожжи без активации. Для этого их смешивают частью рецептурного количества воды температурой 34–35 °С до получения однородной суспензии.

##### **2. Замес теста и контроль брожения**

Замес проб теста осуществляют в соответствии с рецептурой, приведенной в таблице 4.

Таблица 4 – Рецептура пшеничного теста

Наименование сырья	Расход сырья
Мука пшеничная высшего сорта, г	300,0
Вода, мл	170,0
Соль, г	4,5
Дрожжи сухие хлебопекарные, г	3,0

Замес теста осуществляют в емкости для замеса вручную с помощью шпателя. Для этого требуемое количество воды с температурой около 35–40 °С вносят в емкость для замеса, растворяют в ней соль, вносят активированные или регидратированные дрожжи, тщательно перемешивают и вносят муку. Замес ведут до получения теста однородной консистенции. Температура теста должна быть на уровне  $31 \pm 1$  °С. Из проб теста формируют шарики и укладывают в предварительно смазанные растительным маслом стаканы вместимостью 1000 см<sup>3</sup>. Линейкой измеряют высоту теста в стаканах и направляют на брожение в расстойный шкаф при температуре  $31 \pm 1$  °С. Каждые 10 мин производят замер высоты бродящих проб теста, фиксируют продолжительность брожения проб теста до достижения и максимального объема.

Полученные данные записывают, делают выводы о влиянии активации хлебопекарных дрожжей на ход технологического процесса брожения теста.

Студентам необходимо оформить отчет с указанием цели работы, основных теоретических положений, а также описанием последовательности выполнения работы, полученных результатов и выводов.

### **Контрольные вопросы**

1. Какие факторы влияют на рациональный ход технологического процесса и качество продукции хлебопекарной отрасли?
2. Какие способы могут применяться для активации хлебопекарных дрожжей?
3. В чем заключается биологическая стимуляция метаболизма дрожжей?
4. Какое сырье используют для обогащения питательных смесей при активации дрожжей?

### Лабораторная работа № 3. Изучение процесса брожения молочного сахара

Продолжительность 4 часа.

**Цель работы:** научиться определять массовую долю лактозы в молоке рефрактометрическим методом; изучить влияние температуры культивирования и химического состава питательной среды на процесс сбраживания молочного сахара различными молочнокислыми микроорганизмами.

**Материалы и оборудование:** термостат, рефрактометр, пробирки, водяная баня, вата, бумага фильтровальная, стеклянная палочка с опаянным концом, 4%-ный раствор хлорида кальция, вода дистиллированная, цилиндр на 250 см<sup>3</sup>, пипетки на 5 и 10 см<sup>3</sup>, колбы на 50-100 см<sup>3</sup>, бюретки на 25 см<sup>3</sup>, стаканы на 100 см<sup>3</sup>, термометр, 1%-ный раствор фенолфталеина, 0,1 н раствор NaOH, закваски, соль поваренная «Экстра».

#### Ход работы

##### Теоретическая часть

Брожение – одна из разновидностей биологического окисления субстрата у гетеротрофных микробов с целью получения энергии, когда акцептором электронов или атомов водорода является органическое вещество.

Все типы брожения до образования пировиноградной кислоты идут с получением одних и тех же промежуточных продуктов и по одному и тому же пути – пути Эмбдена-Мейергофа. Дальнейшие превращения пировиноградной кислоты могут идти в разных направлениях, которые будут определяться специфическими особенностями данного микроорганизма и условиями среды. Конечными продуктами брожения могут быть молочная, уксусная, пропионовая, масляная кислоты, спирты, ароматические вещества, диоксид углерода и другие соединения. Всем истинным процессам брожения свойственно общее правило: восстановленная на первой стадии, форма НАД (за счет окисления фосфоглицеринового альдегида) снова окисляется на второй стадии, передавая водород любому акцептору. Это может быть пировиноградная кислота, ацетилфосфат, ацетальдегид, диацетил, ацетоин и т. д. Таким образом, наблюдается сопряжение стадий окисления и восстановления с точным соблюдением эквивалентности.

В основе изготовления целого ряда молочных продуктов лежат процессы глубокого распада молочного сахара под действием микроорганизмов, называемые брожением. Молочнокислое брожение является основным процессом при изготовлении заквасок, сыра и кисломолочных продуктов, а молочнокислые бактерии – наиболее важной группой микроорганизмов для молочной промышленности. Существует несколько типов брожения лактозы, различающихся составом конечных продуктов. Конечными продуктами брожения могут быть молочная, пропионовая, уксусная, масляная кислоты [5].

Начальным этапом всех типов брожения является расщепление молочного сахара на глюкозу и галактозу под влиянием фермента лактазы ( $\beta$ -галактозидазы) (рис. 18).

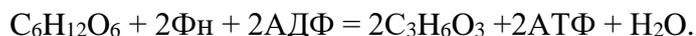


Рисунок 18 – Расщепление молочного сахара на глюкозу и галактозу

Далее брожению подвергается глюкоза. Превращение глюкозы в пировиноградную кислоту в результате ряда последовательных реакций происходит при участии 10 ферментов.

В зависимости от того, какие продукты образуются при сбраживании глюкозы (только молочная кислота или также другие органические продукты и  $\text{CO}_2$ ), молочнокислые бактерии принято подразделять на гомоферментативные и гетероферментативные [11, 12].

Гомоферментативные молочнокислые бактерии образуют практически только одну молочную кислоту (она составляет не менее 90 % всех продуктов брожения). Для гомоферментативных бактерий характерным является сбраживание глюкозы по *гликолитическому (фруктозодифосфатному) пути* Эмбдена–Мейергофа:



Из 1 моль глюкозы образуется 2 моль молочной кислоты с одновременным синтезом 2 моль АТФ. Лишь небольшая часть пирувата декарбоксилируется, превращаясь в уксусную кислоту, этанол и  $\text{CO}_2$ , а также в ацетон. Количество образующихся побочных продуктов зависит от доступа кислорода.

Большинство штампов молочнокислых бактерий преимущественно продуцируют L (+) – молочную кислоту. Болгарские палочки *L. bulgaricus* и лейконостоки – в основном D (–) форму, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum* – оба изомера в почти одинаковых количествах. Следовательно, соотношение между этими изомерами в кисломолочных продуктах будет зависеть от вида используемых для заквасок молочнокислых бактерий.

Гетероферментативные бактерии около 50 % глюкозы превращают в молочную кислоту, а остальное количество – в этиловый спирт,  $\text{CH}_3\text{COOH}$  и  $\text{CO}_2$ . У гетероферментативных молочнокислых бактерий отсутствует ключевой фермент альдолаза и триозофосфатизомераза. Начальное превращение глюкозы идет у них исключительно по *пентозофосфатному пути*:



В ходе реакций по пентозофосфатному пути из каждого моль глюкозы образуется моль молочной кислоты, моль этанола и  $\text{CO}_2$ .

В аэробных условиях возможно образование двух молекул АТФ, тогда ацетилфосфат превращается не в этанол, а в уксусную кислоту. Бифидобактерии сбраживают глюкозу до уксусной и молочной кислот (уксусной в 1,5 раза больше, чем молочной).

Молочнокислое брожение используется в молочной промышленности для изготовления простокваши, творога, сметаны, кефира, сливочного масла, ацидофильного молока и ацидофильной простокваши, сыров, квашеных овощей, при приготовлении хлебных заквасок, молочной кислоты. Молочнокислые бактерии широко применяют также при силосовании кормов, при выделке меховых шкур и в производстве молочной кислоты.

Большое значение эти бактерии имеют при квашении овощей, силосовании кормов (растительной массы) для животных, в хлебопечении, особенно при изготовлении ржаного хлеба. Положительные результаты дают исследования по использованию молочнокислых бактерий при изготовлении некоторых сортов колбас, солено-вареных мясных изделий, а также при созревании слабосоленой рыбы для ускорения процесса и придания продуктам новых ценных качеств (вкуса, аромата, консистенции и др.). Промышленное значение имеет также применение молочнокислых бактерий для получения молочной кислоты, которую используют в безалкогольных напитках. Спонтанно (самопроизвольно) возникающее молочнокислое брожение в продуктах (молоке, вине, пиве, безалкогольных напитках и др.) приводит к их порче (прокисанию, помутнению, ослизнению).

### **Практическая часть**

Возбудителями молочнокислого брожения являются молочнокислые микроорганизмы. Их активность зависит от ряда факторов: температуры, pH, химического состава питательной молочной среды, концентрации сахара, соли, жира, продуктов обмена и ряда других условий.

Для исследований используются следующие закваски:

*Закваска № 1.* Закваски на чистых культурах мезофильных молочнокислых стрептококков (*Lactococcus lactis*, *Lactococcus cremoris*) или закваска для сметаны и творога ( $T_{opt} = 30-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

*Закваска № 2.* Закваска на чистых культурах термофильных молочнокислых палочек (*Lactobacillus acidophilus*) ( $T_{opt} = 40-42\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

*Закваска № 3.* Йогуртовая закваска (*Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*) ( $T_{opt} = 40-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

*Закваска № 4.* Кефирная закваска ( $T_{opt} = 18-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

На одном занятии исследуются 2 вида заквасок на выбор. Подготовить образцы обезжиренного молока для исследования. Определить в них показатели: титруемую кислотность и массовую долю лактозы.

#### **Задание 1. Определить кислотности молока по Тернеру**

Кислотность определяют методом титрования молока 0,1 н раствором едкого натра при индикаторе фенолфталеине.

Для титрования в колбу наливают 10 мл молока, разбавляют двойным объемом дистиллированной воды и прибавляют 2-3 капли раствора фенолфталеина. Смесь перемешивают и титруют из бюретки 0,1 н раствором NaOH до появления розового окрашивания, не исчезающего в течение 2 минут. Количество щёлочи, пошедшее на нейтрализацию 10 мл молока, умножают на 10 (для расчета на 100 мл молока). Полученная величина показывает кислотность молока в градусах Тернера.

Градусы Тернера показывают количество мл 0,1 н раствора NaOH, пошедшее на нейтрализацию кислотности 100 мл молока. 1 градус Тернера соответствует 9 мг молочной кислоты.

#### **Задание 2. Определить массовую долю лактозы в молоке рефрактометрическим методом**

Данным методом на рефрактометрах типа АМ-2, ИРФ, РЛ или РЛП возможно определение лактозы в молочной сыворотке. Метод основан на способности безбелковой сыворотки, преломлять проходящий через нее свет в зависимости от концентрации лактозы. Принцип метода основан на изменении показателя преломления растворов в зависимости от количества растворенных в них сухих веществ. Коэффициент преломления зависит от природы вещества, длины волны падающего света и температуры окружающего воздуха. Чем больше концентрация раствора, тем выше значения коэффициента преломления.

*Рефрактометр пищевой лабораторный ИРФ-454.* В рефрактометре типа ИРФ-454 основные сборочные единицы смонтированы в металлическом корпусе (рис. 19). В верхней части закреплен окуляр, который может перемещаться вдоль оптической оси для установления резкости. С боковой стороны корпуса расположен маховик для перемещения изображения границы света и тени, а также маховик компенсатора с нониусом устранения окрашенности границы света и тени. С другой стороны для подсвечивания шкалы естественным светом укреплено поворотное зеркало в оправе.

На корпусе с помощью основания закреплен рефрактометрический блок, состоящий из измерительной и осветительной призм в оправе. Оправа с измерительной призмой и термометром закреплена неподвижно, а оправка с осветительной призмой отклоняется вбок.

На оправе осветительной призмы закреплена заслонка. Для подсвечивания измерительной призмы со стороны нижней грани на ее оправе установлено откидное зеркало.

Измерения проводят при дневном свете или при включенном осветителе в проходящем через прозрачную исследуемую среду свете или в отраженном свете, когда исследуемая среда существенно поглощает или рассеивает свет.

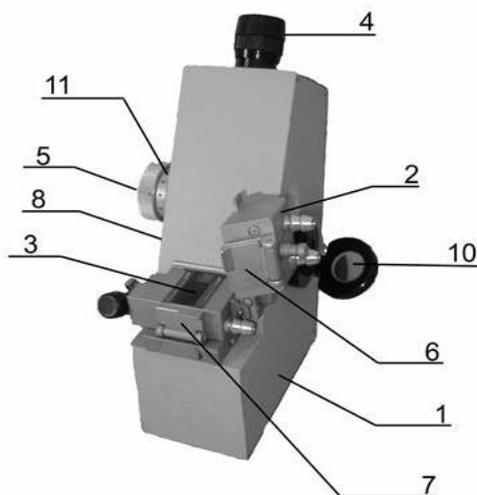


Рисунок 19 – Внешний вид рефрактометра ИРФ-454:

1 – корпус; 2 – осветительная призма; 3 – измерительная призма; 4 – окуляр; 5 – маховик; 8 – маховик компенсатора дисперсии; 6 – заслонка; 7, 10 – зеркала

### *Правила работы на рефрактометре ИРФ-454*

#### *1. Установка окуляра*

Поверните окуляр по часовой стрелке, пока перекрестие в верхней части поля не будет видно резко. Одновременно окуляр фокусируется на резкость изображения шкалы в нижней части поля зрения.

#### *2. Установка освещения*

Источником света служит электрическая лампа (25-40 Вт) или дневной свет. Рефрактометр устанавливают так, чтобы свет падал на входное окно осветительной призмы или зеркало, которым направляют свет на входное окно измерительной призмы.

#### *3. Техника определения на рефрактометре ИРФ-454*

Перед началом работы необходимо проверить правильность установки прибора на нуль по дистиллированной воде, полученные значения показателя преломления при температуре 20 °С должны быть 1,3330.

Поверхности измерительной и осветительной призм нужно протереть фильтровальной бумагой. Откиньте осветительную призму. На чистую поверхность измерительной призмы стеклянной палочкой или пипеткой осторожно, не касаясь призмы, нанесите 2-3 капли исследуемой жидкости. Плавно опустите осветительную призму. Если раствор не мутный и не слишком окрашен, в окно верхней призмы направляют луч света от осветителя, добиваясь максимальной освещенности поля зрения, наблюдаемого в окуляре; окно нижней призмы закрывают щитком. В случае исследования темноокрашенных растворов окно верхней призмы закрыто, а свет направляют на нижнюю призму. Поворотом зеркала (10) добейтесь наилучшей освещенности шкалы. Наблюдая в окуляр границу светотени, маховиком навести границу светотени точно на перекрестие визирных штрихов. Вращением компенсатора дифракции устраните окрашенность наблюдаемой границы светотени (черно-белый круг). Далее по шкале рефрактометра проводят отсчет (рис.20).

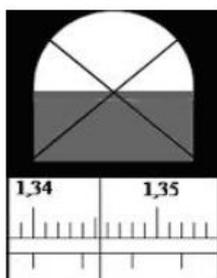


Рисунок 20 – Граница светотени на перекрестии визирных штрихов

При отсчете показаний прибора необходимо отмечать температуру, при которой проводят испытания. Если температура отличается от 20 °С, вносят соответствующую поправку по таблице 5.

Таблица 5 – Поправки на температуру к массовой доле сухих веществ, показанной рефрактометром

Температура, °С	Массовая для сухих веществ, %									
	5	10	15	20	30	40	50	60	70	75
Из показаний рефрактометра следует вычесть										
15	0,25	0,27	0,31	0,31	0,34	0,35	0,36	0,37	0,36	0,36
16	0,21	0,23	0,27	0,27	0,29	0,31	0,31	0,32	0,31	0,23
17	0,16	0,18	0,20	0,20	0,22	0,23	0,23	0,23	0,20	0,17
18	0,11	0,12	0,14	0,15	0,16	0,16	0,15	0,12	0,12	0,09
19	0,06	0,07	0,08	0,08	0,08	0,09	0,09	0,08	0,07	0,05
К показаниям рефрактометра следует прибавить										
21	0,06	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07
22	0,12	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14
23	0,18	0,20	0,20	0,21	0,21	0,21	0,21	0,22	0,22	0,22
24	0,24	0,26	0,26	0,27	0,28	0,28	0,28	0,28	0,29	0,29
25	0,30	0,32	0,32	0,34	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36	0,37

Проводят не менее трех параллельных определений.

За результат испытания принимают среднее арифметическое результатов трех параллельных определений. Результат округляют до первого десятичного знака.

*Чистка призм рефрактометра*

Поверхность призм необходимо чистить после каждого измерения следующим образом:

- откиньте осветительную призму и мягкой фланелевой салфеткой или ватой удалите жидкость с призмы (полированную грань измерительной призмы вытирайте очень осторожно);
- протрите призму ваткой, смоченной в спирте; поверхность должна быть блестящей и гладкой;
- дайте поверхности подсохнуть, проложите между призмами фланелевую салфетку или фильтровальную бумагу.

*Внимание!* После измерения никогда не оставляйте образец на призме, так как от этого прибор приходит в негодность.

*Подготовка к анализу.* Подготовка к анализу заключается в получении безбелковой сыворотки из исследуемого молока. Отмеривают пипеткой 5 мл молока в пробирку, добавляют 5-6 капель 4%-ного раствора хлорида кальция. Затем для полного осаждения белков пробирку закрывают пробкой и помещают в баню с кипящей водой на 10 мин. Затем пробирку охлаждают под проточной водой и содержимое фильтруют через складчатый фильтр. В прозрачном фильтрате определяют на рефрактометре показатель преломления при 20 °С.

Призмы рефрактометра насухо вытирают и на поверхность нижней призмы наносят 2 капли прозрачной сыворотки. Наблюдая в окуляр, вращением рукоятки устанавливают поле зрения на фокус (ясную видимость), устраняют расплывчатость и радужность окраски границы светотени. Передвижением окуляра добиваются полного совпадения граничной линии с визирным указателем и отсчитывают показатель преломления сыворотки по левой шкале рефрактометра. Затем по таблице 6 устанавливают массовую долю молочного сахара.

Таблица 6 – Соответствие показателей преломления массовой доли лактозы в молоке

Показатель преломления	Массовая доля лактозы, %	Показатель преломления	Массовая доля лактозы, %
1,3390	3,01	1,3412	4,08
1,3391	3,06	1,3413	4,13
1,3392	3,11	1,3414	4,18
1,3393	3,16	1,3415	4,23
1,3394	3,21	1,3416	4,28
1,3395	3,26	1,3417	4,33
1,3396	3,31	1,3418	4,38
1,3397	3,36	1,3419	4,44
1,3398	3,42	1,3420	4,49
1,3399	3,47	1,3421	4,54
1,3400	3,52	1,3422	4,59
1,3401	3,57	1,3423	4,64
1,3402	3,62	1,3424	4,69
1,3403	3,67	1,3425	4,74
1,3404	3,70	1,3426	4,79
1,3405	3,72	1,3427	4,84
1,3406	3,77	1,3428	4,89
1,3407	3,82	1,3429	4,95
1,3408	3,87	1,3430	5,00
1,3409	3,93	1,3431	5,05
1,3410	3,98	1,3432	5,10
1,3411	4,03	1,3433	5,15

**Задание 3. Изучить влияние температуры культивирования на процесс брожения молочного сахара**

В стаканы отмерить по 50 см<sup>3</sup> пастеризованного молока, подогретого до температуры в соответствии с табл. 7. В каждый образец внести по 10 см<sup>3</sup> исследуемой закваски, тщательно перемешать.

Таблица 7 – Постановка опыта и результаты

Закваска	Образец	Температура, °С	Кислотность, °Т	
			Через 30 минут	Через 1 час
Закваска №1	1.1	30		
	1.2	40		
	1.3	22		
Закваска №2	1.1	30		
	1.2	40		
	1.3	22		

Подготовленные образцы поместить в термостат с соответствующей температурой и культивировать в течение 1 часа. Через 30 мин от начала культивирования из каждого образца отобрать по 10 см<sup>3</sup> среды для определения титруемой кислотности. Результат занести в таблицу. В конце культивирования определить кислотность образцов, результат занести в таблицу.

Сделать выводы об активности заквасок по нарастанию кислотности в процессе культивирования при разных температурах.

#### **Задание 4. Изучить влияние химического состава питательной среды на процесс брожения молочного сахара**

Подготовить образцы питательных сред для исследования в соответствии с табл. 8. Определить в них показатели: плотность, титруемую кислотность, массовую долю лактозы. Результаты записать.

В стаканы отмерить по 50 см<sup>3</sup> каждого образца питательной среды, подогреть до оптимальной температуры культивирования микроорганизмов закваски. Исследуется один вид закваски на выбор. В каждый образец внести по 10 см<sup>3</sup> исследуемой закваски, в образцы 3.2 и 3.3 дополнительно внести поваренную соль NaCl, тщательно перемешать.

Таблица 8 – Постановка опыта и результаты

Закваска	Образец	Вид среды	Образец	С хлоридом натрия	Кислотность, °Т	
					Через 30 мин	Через 1 ч
Закваска №	3.1	Обезжиренное молоко	3.1	контроль		
			3.2	5 %		
			3.3	10 %		
	4	Молоко жирностью 2,5 %				
	5	Молоко жирностью 3,2 %				

Подготовленные образцы поместить в термостат с соответствующей температурой и культивировать в течение 1 ч. Через 30 мин от начала культивирования из каждого образца отобрать по 10 см<sup>3</sup> среды для определения титруемой кислотности. Результат занести в таблицу. В конце культивирования определить кислотность образцов, результат занести в таблицу. По нарастанию кислотности молока при молочнокислом брожении можно рассчитать, какое количество молочного сахара было сброжено.

#### **Пример расчета**

Сначала нужно рассчитать количество образовавшейся молочной кислоты. Молекулярная масса молочной кислоты равна 90. Количество миллилитров 0,1 н NaOH, потраченное на титрование 100 см<sup>3</sup> молока, следует умножить на 0,009, так как 1 см<sup>3</sup> 0,1 н NaOH нейтрализует эквивалентное количество молочной кислоты – 0,009 г молочной кислоты. Для расчета необходимо из конечного результата значения кислотности вычесть показатель кислотности исходного молока (сыворотки). Например, начальная кислотность молока перед внесением закваски составляла 16 °Т. По окончании культивирования – 60 °Т. Разница 60 – 16 = 44. Далее 44 × 0,009 = 0,396. Следовательно, образовалось 0,396 г молочной кислоты.

Из суммарной реакции молочнокислого брожения следует, что из 1 моль молочного сахара образуется 4 моль молочной кислоты. Масса 1 моль молочного сахара C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub> равна 342 г, т. е. из 342 г молочного сахара образуется 4 × 90 = 360 г молочной кислоты.

Следовательно, для получения 0,396 г молочной кислоты потребовалось молочного сахара:

$$X = \frac{342 \cdot 0,396}{360} = 0,3762$$

Результаты расчетов записать.

Сделать выводы об активности заквасок при сбраживании молочного сахара по нарастанию кислотности в процессе культивирования в зависимости от состава питательной среды.

#### **Контрольные вопросы**

1. Что такое молочнокислое брожение?
2. Назовите виды молочнокислого брожения.

3. Какие микроорганизмы вызывают гомоферментативное брожение?
4. Где используются процессы гетероферментативного брожения?
5. Как определить кислотность молока по Тернеру?
6. Назовите основные типы брожения молочного сахара. Какие факторы влияют на интенсивность брожения?
7. По какому пути идет сбраживание глюкозы при гомоферментативном и гетероферментативном брожении лактозы?
8. Назовите основных возбудителей гетероферментативного брожения лактозы.
9. Как используется молочнокислое брожение в пищевой промышленности?
10. Как рассчитать количество сброженного молочного сахара в процессе брожения?

## Лабораторная работа № 4.

### Получение препарата амилаз из плесневых грибов и определение его активности

Продолжительность 4 часа.

**Цель работы:** закрепление теоретических знаний о биотехнологических процессах при извлечении амилаз из плесневых грибов и обнаружение активности ферментативного препарата.

**Материалы и оборудование:** термостат; водяная баня; воронка стеклянная; цилиндр измерительный с носиком на 50 мл; пластинка фарфоровая; колба коническая (Эрленмейера) на 100 мл; пробирки стеклянные химические; плесневый порошок; крахмал (1 %-ный); йод (0,3 %-ный) в йодиде калия (3 %-ном).

#### **Ход работы**

##### **Теоретическая часть**

Ферменты с помощью биотехнологических методов можно выделить из различных животных, растительных тканей и микроорганизмов. Из одних только плесневых грибов было выделено около 80 различных ферментных препаратов: амилаз, протеаз, липаз, цитолитических и других.

Амилазы – ферменты, под действием которых происходит гидролиз крахмала с образованием декстринов и мальтозы. Различают три амилазы:  $\alpha$ -амилаза,  $\beta$ -амилаза и глюкоамилаза.  $\alpha$ -Амилаза – систематическое название 1,4- $\alpha$ -D-глюкан-глюкогидролаза.  $\alpha$ -амилаза содержится в слюне, пищеварительном соке поджелудочной железы, в плесневых грибах, в проросшем зерне пшеницы, ржи, ячменя. Характерной особенностью всех  $\alpha$ -амилаз является наличие в них по крайней мере одного моля прочно связанного кальция на один моль фермента. При действии на крахмал  $\alpha$ -амилазы образуются, главным образом, низкомолекулярные декстрины и незначительное количество мальтозы.

Разные амилазы различаются по своей термолабильности. Наиболее быстро при нагревании разрушается грибная  $\alpha$ -амилаза. На втором месте стоит зерновая  $\alpha$ -амилаза, фермент из проросшего зерна или солода. Наиболее устойчива к нагреванию бактериальная  $\alpha$ -амилаза.

$\beta$ -Амилаза – систематическое название 1,4- $\alpha$ -D-глюкан-мальтагидролаза.  $\beta$ -Амилаза находится в зерне пшеницы, ржи, ячменя, в соевых бобах. Оба фермента значительно различаются по характеру действия на амилозу и амилопектин крахмала.

При действии  $\beta$ -амилазы на крахмал образуются, главным образом, мальтоза и небольшое количество высокомолекулярных декстринов.

Ни  $\alpha$ -амилазы, ни  $\beta$ -амилазы в отдельности не могут полностью гидролизовать крахмал или фитогликоген с образованием мальтозы. Только при одновременном действии обеих амилаз крахмал гидролизует на 95 %.

$\alpha$ -Амилазы и  $\beta$ -Амилазы различаются своим отношением к pH,  $\beta$ -амилаза может работать при более кислой среде (оптимальный pH 4,8), чем  $\alpha$ -амилаза (pH 5,6-6,3). Вместе с тем  $\beta$ -амилаза более термолабильна (оптимальная температура 51 °C), а  $\alpha$ -амилаза выдерживает более высокую температуру (оптимальная температура 65 °C).

Экзо-1,4- $\alpha$ -глюкозидаза, ее чаще называют глюкоамилазой, имеет систематическое название 1,4- $\alpha$ -D-глюкан-глюкогидролаза. Гидролизует крахмал с образованием преимущественно глюкозы и небольшого количества декстринов. Препараты глюкоамилазы получают из плесневых грибов. С помощью этого фермента получают глюкозную патоку и кристаллическую глюкозу.

##### **Практическая часть**

#### **Задание 1. Культивирование плесневых грибов**

Плесневые грибы развиваются на синтетических питательных средах с небольшим числом компонентов. Состав одной из них (среда Чапека) такой: сахароза – 3 г,  $\text{NaNO}_4$  – 0,2 г,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,1 г,  $\text{MgSO}_4$  – 0,05 г,  $\text{KCl}$  – 0,05 г,  $\text{FeSO}_4$  (или  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ ) – 0,001 г, вода до 100 мл (pH=7).

Для получения грибной массы вносят кусочек плесени непосредственно с заплесневевшего предмета (или пользуются чистой культурой гриба *Penicillium*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus Oryzae*) в питательную среду Чапека. Колбу помещают в термостат при температуре 25 – 28 °С. Через 5-6 дней на поверхности жидкости вырастает мощная пленка гриба, вполне пригодная для выделения амилазы.

### **Задание 2. Получение препарата грибных амилаз**

Грибную массу отделяют от среды фильтрованием, распределяют ее небольшими кусочками на поверхности стекла и высушивают при температуре 37 °С. Воздушно-сухую массу затем тщательно растирают в фарфоровой ступке с трехкратным количеством кварцевого песка. Полученный тонкий однородный порошок используют для проведения опытов с амилазой.

### **Задание 3. Обнаружение действия грибных амилаз**

2г полученного препарата плесневых грибов смешивают с 50 мл воды, нагретой до 37 °С, энергично встряхивают в течение 5 мин, а затем настаивают 2 ч при той же температуре. После повторного встряхивания твердый остаток отфильтровывают. В фильтрате содержится комплекс грибных амилаз. В пробирку наливают 5 мл полученного фильтрата, прибавляют 10 мл 1 %-ного раствора крахмала, быстро перемешивают и тотчас же одну каплю содержимого пробирки, извлеченную стеклянной палочкой, смешивают на фарфоровой пластинке с 1-2 каплями раствора йода в йодиде калия. Проба окрашивается в интенсивно синий цвет. Пробирку помещают в водяную баню, нагретую до 40 °С. Через каждые 2 мин повторяют взятие проб. По мере расщепления крахмала пробы с йодом будут окрашиваться в различные цвета – синий, фиолетовый, красный и, наконец, желтый, вследствие образования декстринов разной степени сложности.

Ферменты амилазного комплекса ускоряют гидролиз крахмала с образованием разнообразных промежуточных и конечных продуктов. В препарате грибных амилаз содержится в основном  $\alpha$ -амилаза. О степени гидролиза ею крахмала можно судить по изменению окраски крахмала и декстринов с йодом. Амилоза, присутствующая в крахмале, дает синее окрашивание с йодом; амилодекстрины (молекулярная масса – 10000) – сине-фиолетовое; эритродекстрины (молекулярная масса от 4000 до 6000) красно-бурое, ахродекстрины (молекулярная масса около 3700) – почти никакого окрашивания и, наконец, мальтодекстрины (молекулярная масса около 1000) совершенно не окрашиваются йодом.

### **Контрольные вопросы**

1. Дайте краткую характеристику основным объектам биотехнологии.
2. Охарактеризуйте основные биотехнологические функции бактерий и грибов при производстве пищевых продуктов.
3. Микробная биоконверсия, продукты и технология получения пищевых продуктов.
4. На каких питательных смесях можно получить культуры микроорганизмов *Penicillium*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*?
5. Какими методами можно выделить грибные амилазы?
6. Как обнаружить амилитическую активность грибных амилаз?
7. Какие декстрины обнаруживаются в растворе при действии грибных амилаз на крахмал?
8. Какой реакцией можно обнаружить присутствие декстринов в растворе?

## Лабораторная работа № 5. Получение препарата сахаразы из пекарских дрожжей

Продолжительность 4 часа.

**Цель работы:** выделение фермента сахаразы из пекарских дрожжей и изучение активности препарата.

### **Ход работы**

#### **Теоретическая часть**

Ферментами или энзимами называют биологические катализаторы, входящие в состав всех клеток и тканей живых организмов и ускоряющие течение отдельных химических реакций.

Источником выделения ферментов являются различные животные и растительные ткани, а также микроорганизмы. Дрожжи пекарские наиболее богаты ферментами.

Ввиду того, что ферменты являются белками и легко подвергаются денатурации, все операции при их выделении и очистке следует вести в мягких условиях при температуре не выше +4 °С. Так как ферменты легко инактивируются при значениях рН ниже 5 и выше 9, в процессе их выделения и особенно очистки необходимо тщательно контролировать величину водородного показателя. Используемые в работе с ферментами жидкие химические реактивы должны быть перегнаны, а сухие – перекристаллизованы.

В связи с тем, что процедура выделения индивидуальных ферментов чрезвычайно сложна, часто работу ведут с так называемыми ферментными препаратами, представляющими собой лишь частично очищенные ферменты.

При получении ферментных препаратов вытяжки из тщательно гомогенизированного биологического материала, содержащего в своем составе соответствующий фермент, обезвоживают тем или иным способом. Одним из наиболее распространенных приемов обезвоживания препаратов с одновременным освобождением их от липидов является получение ацетоновых порошков, для чего вытяжку фермента или тканевой гомогенат обрабатывают охлажденным до –20 °С ацетоном, взятым в большом избытке. Ацетоновые порошки, приготовленные с соблюдением отмеченных выше условий, могут храниться в эксикаторе при 0 °С без потери активности в течение длительного времени и использоваться по мере надобности.

К новейшим методам обезвоживания следует отнести лиофилизацию препаратов в специальных приборах, а также использование для этой цели сефадекса. Для получения чистых препаратов ферментов широко используют такие эффективные методы, как электрофорез, гельфильтрацию через сефадексы, ионообменную хроматографию и другие.

#### **Практическая часть**

**Оборудование, реактивы:** центрифуга; термостат; баня водяная; ступка фарфоровая; пластинка стеклянная; пробирки стеклянные химические; дрожжи пекарские; песок кварцевый; тимол; ацетон; 5%-я сахароза; Фелингова жидкость; 10%-й раствор едкого натрия, 1%-й раствор сернокислой меди.

#### **Порядок выполнения работы**

100 г пекарских дрожжей тщательно растирают в ступке с кварцевым песком. Растерую массу наносят тонким слоем на стекло и высушивают в токе сухого воздуха.

Высушенные дрожжи растирают в порошок. Для извлечения сахаразы к полученному порошку приливают небольшими порциями 200 мл воды при постоянном перемешивании.

Затем массу вновь растирают в фарфоровой ступке и центрифугируют в течение 10 мин при 3000 g (или фильтруют через складчатый фильтр). Прозрачный фильтрат упаривают в вакууме при 35 °С до небольшого объема и выливают в пятикратный объем охлажденного до –20 °С ацетона, перемешивают и через несколько минут центрифугируют при 3000 g.

Образовавшийся осадок высушивают при температуре 38 °С и растирают в ступке в порошок. Полученный препарат сахаразы длительно сохраняется. В качестве антисептика к порошку добавляют кристаллик тимола, завернутый в фильтровальную бумагу.

Для проверки активности сахаразы в две пробирки наливают по 0,5 мл 0,01%-го водного раствора препарата. Содержимое одной из них кипятят в течение 3 мин для разрушения фермента, после чего пробирку охлаждают. Затем в обе пробирки добавляют по 3 мл 5%-го

раствора сахарозы и ставят в водяную баню при 40 °С на 10 – 15 мин. По истечении указанного времени в обе пробирки добавляют по 2 мл фелинговой жидкости, перемешивают и нагревают до начинающегося кипения. В контрольной пробирке, где фермент разрушен кипячением, осадка оксида меди не появляется. В пробирке с активным ферментом образуется красный осадок оксида меди, что указывает на присутствие восстанавливающих ионы меди в степени окисления глюкозы и фруктозы, образующихся при гидролизе не восстанавливающего ее дисахарида–сахарозы.

Проводят реакцию Троммера на обнаружение глюкозы и фруктозы в растворе и для оценки активности выделенного из пекарских дрожжей фермента сахаразы.

*Реакция Троммера:* к 5 каплям исследуемой жидкости прибавляем 5 капель 10%-го раствора едкого натрия и 5 капель 1%-го раствора сернокислой меди, нагреваем. В присутствии глюкозы развивается желтая, переходящая в красную, окраска.

### **Контрольные вопросы**

1. Каким способом выделяют фермент сахаразу из пекарских дрожжей?
2. Какие моносахариды обнаруживаются цветной реакцией Троммера?
3. На чем основан принцип и химизм реакции Троммера?

## Лабораторная работа № 6. Получение пищевой уксусной кислоты

Продолжительность 4 часа.

**Цели работы:** изучение способности уксуснокислых бактерий *Acetobacter aceti* окислять этиловый спирт в уксусную кислоту и определение её количества.

**Материалы и оборудование:** термостат,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ , 96%-й этиловый спирт, рН-метр, складчатый фильтр, 1%-й раствор фенолфталеина, 0,1 н раствор  $\text{NaOH}$ , 10%-й раствор соды, колбы емкостью 500 см<sup>3</sup>, стерильные пипетки на 10 см<sup>3</sup>, 5%-й раствор  $\text{FeCl}_3$ ; бюретка для титрования объемом 25 мл.

### Ход работы

#### Теоретическая часть

Несмотря на значительный прогресс в области органического синтеза многие кислоты (лимонная, молочная, итаконовая, уксусная и др.) получают в настоящее время микробиологическим синтезом. Органические кислоты находят широкое применение в фармацевтической, химической, текстильной и других отраслях промышленности. Пищевая промышленность традиционно является основным потребителем лимонной, уксусной и молочной кислот, так как продукты естественного брожения более предпочтительны, чем синтетические кислоты в связи с безвредностью для организма человека содержащихся в них примесей.

В качестве сырья для получения пищевого уксуса используют виноградное или яблочное вино, сброженные соки различных фруктов и ягод или водный раствор этилового спирта. Спиртовой уксус получают в большем масштабе, чем винный. Уксус содержит кроме уксусной кислоты (6-9 %) незначительное количество сложных эфиров, придающих ему особый вкус и приятный аромат, чего лишена уксусная кислота, получаемая химическим путем.

Уксусную кислоту используют как в пищевой промышленности, так и для растворения органических красителей, производства медикаментов, пластмасс, синтетических волокон.

Для получения пищевой уксусной кислоты используется способность уксуснокислых бактерий окислять этиловый спирт до уксусной кислоты. Реакцию образования уксусной кислоты катализирует окислительный фермент алкогольоксидаза. Этот сложный многоступенчатый процесс выражается суммарным уравнением:



Схема производства уксусной кислоты представлена на рисунке 21, а основные характеристики производства уксусной кислоты – в таблице 9.

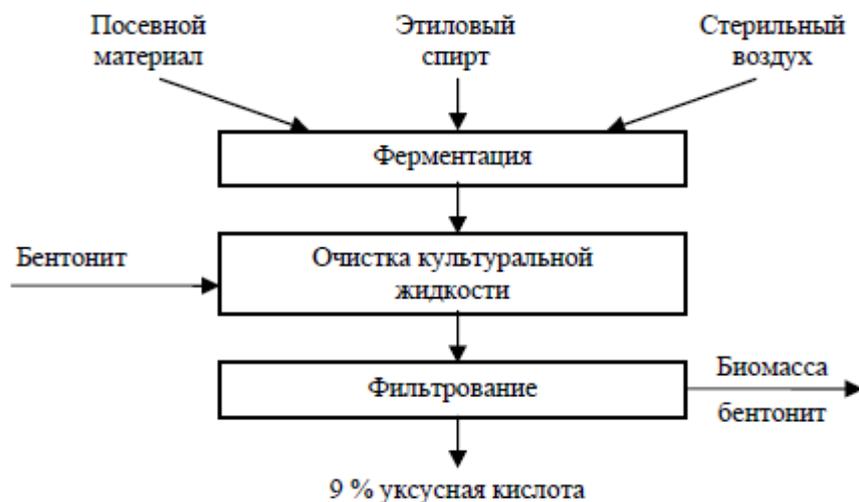


Рисунок 21 – Схема производства уксусной кислоты

Способностью превращать этиловый спирт в уксусную кислоту обладают различные виды уксуснокислых бактерий. Типичным представителем уксуснокислых бактерий является *Acetobacter aceti* (рис. 22).



Рисунок 22 – Уксуснокислые бактерии (*Acetobacter aceti*)

Это мелкие бесспорные палочки, часто соединенные в цепочки, развиваются только при доступе воздуха. При промышленном получении уксусной кислоты используют *Bacterium schutzenbachii* и *Bacterium curvum*. Это грамотрицательные спорообразующие палочки, снабженные жгутиками, размером 0,4-0,8 мкм. Важным показателем является и предельная концентрация спирта в сбраживаемой среде. Для *Bacterium schitzenbachii* она составляет 6-7 об. %, для *Bacterium curvum* – 9-14 об. %.

Таблица 9 – Основные характеристики биотехнологической стадии производства уксусной кислоты

Параметры стадии	Значение параметров
Продуценты	<i>Bacterium schutzenbachii</i> , <i>Bacterium curvum</i>
Компоненты питательной среды	Этиловый спирт, хлорид аммония, сульфат магния, монофосфат калия
рН питательной среды	3,0 ... 3,2
Температура культивирования	28→25°C
Режим аэрации	0,3 ... 0,4→0,1...0,15 м <sup>3</sup> /м <sup>3</sup> ×мин
Продолжительность культивирования	7...10 суток
Содержание уксусной кислоты в культуральной жидкости	От 6...7 % до 9...14%

Для выращивания *Acetobacter aceti* в лабораторных условиях используется минеральная среда Лойцянской состава, г/л: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>–1,0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0,5; MgSO<sub>4</sub> – 0,5. Источником углерода служит этиловый спирт, добавляемый ежедневно в количестве 0,2-0,5 % от объема среды. Среда разливается тонким слоем в конические колбы с ватными пробками. Для засева используется двух-, трехсуточная культура *Acetobacter aceti* на жидкой среде. Выращивание ведется при 30 °С в течение пяти-семи суток.

В конце опыта определяется количество образовавшейся уксусной кислоты. В стационарной культуре *Acetobacter aceti* растет на поверхности среды, образуя тонкую нежную пленку, которая по мере роста опускается на дно в виде хлопьевидного осадка. При промышленном культивировании в глубинных условиях необходимо бесперебойное аэрирование, кратковременные перерывы в подаче воздуха приводят к гибели культуры. При недостатке спирта в среде накопленная уксусная кислота переокисляется до конечных продуктов: CO<sub>2</sub> и H<sub>2</sub>O [17].

Промышленное производство уксусной кислоты включает следующие технологические стадии:

- 1) получение посевного материала;
- 2) подготовка питательной среды;
- 3) уксуснокислое брожение;

4) концентрация и розлив готового продукта.

Известны три способа производства уксусной кислоты.

*Орлеанский (французский)*, или медленный способ. Окисление ведется в специальных чанах. Исходная питательная среда состоит из 2 %-ной уксусной кислоты и 4 %-ного сухого вина крепостью 9-12 %. Заражение уксуснокислыми бактериями происходит самопроизвольно из воздуха. Брожение ведут при температуре 30-20 °С, снижая температуру к концу брожения. В конце брожения получают уксус с содержанием 5-6 % кислоты. Уксус, полученный по Орлеанскому способу, обладает, так же как и вино, «букетом», придающим ему высокое качество.

*Немецкий, или быстрый способ*. Окисление спирта происходит в особых генераторах или чанах, заполненных буковыми стружками, на которых поселяются уксуснокислые бактерии. Большая поверхность стружек создает для бактерий хорошие условия аэрации. Перед началом процесса стружки пропитывают уксусной кислотой. Затем в них вносят затор (питательную среду), приготовленную из 6 %-ного уксуса и 3 %-ного этилового спирта. После окисления получают уксус, содержащий 9 %-ную уксусную кислоту. Затор, окисляясь, одновременно фильтруется через эти же буковые стружки.

Ежедневно полученную уксусную кислоту делят на две неравные части: 2/3 его идут на приготовление нового затора и 1/3 – на расфасовку.

В промышленных условиях уксуснокислое брожение проводят *непрерывным способом* при глубинном проточном культивировании уксуснокислых бактерий в батарее последовательно соединенных аппаратов. Для этого способа наилучшим сырьем для уксуснокислых бактерий является этиловый спирт, полученный из зернокартофельного сырья.

Выращивание бактерий ведут при температуре 28-37 °С при рН среды 3,0-3,2 при концентрации спирта 7-15 %. После накопления 8%-ной уксусной кислоты развитие бактерий замедляется и при ее содержании в пределах 12-14 % рост бактерий полностью прекращается.

На жизнедеятельность уксуснокислых бактерий большое влияние оказывает реакция среды. Принято считать, что оптимальный рН для их развития находится в пределах 3-3,2, однако избыток уксусной кислоты в сбраживаемой среде угнетает жизнедеятельность бактерий-продуцентов. После накопления 8 % уксусной кислоты развитие бактерий замедляется и при содержании 12-14 % кислоты полностью прекращается. Для сохранения естественной чистоты бактериальной популяции оптимальной считается концентрация кислоты около 10 %. Важным показателем является и предельная концентрация спирта в сбраживаемой среде. Для *Bacterium schützenbachii* она составляет 6-7 об. %, для *Bacterium curvum* – 9-14 об. %.

В промышленности уксуснокислое брожение проводят в батарее, состоящей из пяти последовательно соединенных ферментаторов (ферментёров).

Перед розливом уксусную кислоту осветляют, пропуская через слой бентонита, или бентонит добавляют в уксусную кислоту и туда же вносят немного лимонной кислоты, после перемешивания производят отделение уксусной кислоты, пропуская ее через фильтр-пресс. Из 100 л безводного спирта получают 75-90 кг уксусной кислоты. Из товарных форм уксусной кислоты известны: столовый уксус (6 и 9 %), чистая пищевая (70-80 %), чистая уксусная (70-80 %), безводная или ледяная (98-99,8 %). Для получения уксусной эссенции или ледяной уксусной кислоты уксусную кислоту концентрируют с помощью ректификации.

Кроме перечисленных товарных форм в кулинарии широко используют фруктовый уксус. Фруктовый уксус отличается от обычного уникальностью лечебных свойств и удивительным набором компонентов, так как в него практически без потерь переходят все полезные вещества фруктов (макро- и микроэлементы, витамины, ферменты, аминокислоты, уксусная, пропионовая, молочная, лимонная и другие кислоты). В технологию получения фруктового уксуса входят стадии измельчения сырья, приготовления сула, спиртового брожения, фильтрации (процеживания) бражки, уксуснокислого брожения. Оптимальной для роста уксуснокислых бактерий считается температура 26-28 °С. Через два-три месяца жизнедеятельности уксуснокислых бактерий винный спирт превращается в уксус, который отличается натуральной мутностью и ароматом фруктов.

## **Практическая часть**

### **Получение уксусной кислоты на синтетической среде Лойцянской**

1. Для засева используется двух-трехсуточная культура *Acetobacter aceti* на жидкой среде.
2. Приготовить среду Лойцянской.
3. В колбы вместимостью 500 мл внести 50 мл указанной среды.
4. Определите рН среды при помощи рН-метра. Для этого прибор через адаптер подключите к сети переменного тока 220 В. Электроды (сравнения, вспомогательный и термокомпенсации) промыть дистиллированной водой, осушить и погрузить в исследуемую жидкость. Уровень погружения электрода в жидкость, для бесперебойной работы рН-метра, должен быть выше 16 мм. Включить прибор нажатием кнопки On/Off, а кнопкой mV/pH выбрать режим измерения рН. Через 30-60 с снять показания и выключить прибор кнопкой On/Off.
5. Колбы со средами, закрыв ватной пробкой и бумажным колпачком, простерилизовать в автоклаве в течение 30 мин при температуре 121 °С.
6. В охлажденную стерильную среду внести 0,5 мл посевного материала. В среду Лойцянской добавить 2-3 капли 96 %-ного этилового спирта.
7. Колбы поместить в термостат при 30 °С. В среду Лойцянской ежедневно вносить 2-3 капли 96 %-ного этилового спирта.
8. Первую колбу извлечь из термостата через семь дней (на следующем занятии).
9. По окончании выращивания *Acetobacter aceti* описать культуральные признаки (наличие пленки, ее вид, осадок, запах и т. д.) и микроскопическую картину (форму, размер бактерий, подвижность).
10. Отделить накопившуюся биомассу фильтрованием через складчатый фильтр.
11. Определить рН фильтрата при помощи рН-метра.
12. Провести качественную реакцию на уксусную кислоту. Для этого 10 мл фильтрата перенести пипеткой в стакан на 100 мл, добавить одну – две капли фенолфталеина и нейтрализовать 10 %-ным раствором соды (до появления устойчивой бледно-розовой окраски). Если в фильтрате присутствует уксусная кислота, то при добавлении нескольких капель 5 %-ного раствора хлорида железа (III), раствор приобретет красно-бурое окрашивание вследствие образования ацетата железа (III). При нагревании до кипения окрашенного раствора происходит гидролиз соли, в результате которого выпадает бурый осадок.
13. Определить количество образовавшейся уксусной кислоты в процентах. Для этого 10 мл фильтрата перенести пипеткой в плоскодонную коническую колбу на 100 мл, добавить 10 мл воды и 2-3 капли фенолфталеина, титровать 0,1 н раствором NaOH до слабозеленой исчезающей окраски. Количество образовавшейся уксусной кислоты в процентах вычислить по формуле:

$$X = \frac{0,006 \cdot a \cdot k \cdot 100}{v} (\%)$$

где  $a$  – число миллилитров 0,1 н раствора NaOH, пошедшего на титрование;  
 $v$  – объем культуральной жидкости, взятой для титрования в миллилитрах;  
 $k$  – поправка щелочи;  
0,006 – количество граммов уксусной кислоты, соответствующее 1 мл 0,1 н раствора NaOH.

14. Все полученные результаты свести в таблицу 9.

### **Получение фруктового уксуса из сухого вина**

1. Предварительно получить накопительную культуру уксуснокислых бактерий на пиве (вине). По окончании выращивания *Acetobacter aceti* описать культуральные

- признаки (наличие пленки, ее вид, осадок, запах и т. д.) и микроскопическую картину (форму, размер бактерий).
2. Приготовить сухое вино с концентрацией спирта 6-7 % об. Для этого с помощью спиртометра определить содержание алкоголя и довести его количество до требуемого путем добавления кипяченой водопроводной воды.
  3. В колбы вместимостью 500 мл цилиндром налить 100 мл подготовленного сухого вина, внести пипеткой 1 мл посевного материала и закрыть ватной пробкой.
  4. Колбы поместить в термостат при 30 °С. Далее выполнять работу согласно ранее описанным пунктам 8-14.
  5. Результаты опытов внести в таблицу 10 и сделать вывод о влиянии состава питательной среды на процесс культивирования уксуснокислых бактерий и количество образовавшейся уксусной кислоты.

Таблица 10 – Постановка опыта и результаты

Показатели	Среда Лойцянской		Сухое вино	
	0 сутки	7 сутки	0 сутки	7 сутки
Культуральные признаки				
Морфологические признаки				
pH, ед				
Качественная реакция на уксусную кислоту	–		–	
Количество уксусной кислоты, %	–		–	

### Контрольные вопросы

1. Назовите способы получения уксусной кислоты.
2. Почему органические кислоты, полученные микробиологическим синтезом, предпочтительнее использовать в пищевой промышленности, чем кислоты, полученные органическим синтезом?
3. Какие микроорганизмы являются продуцентами уксусной кислоты?
4. Приведите уравнение процесса образования уксусной кислоты.
5. Перечислите товарные формы уксусной кислоты. Чем отличаются технологии получения различных товарных форм?
6. Как производится выращивание *Acetobacter aceti* в лабораторных условиях на синтетической среде Лойцянской и на основе сухого вина?
7. Перечислите культуральные и морфологические признаки *Acetobacter aceti*.
8. Какие факторы влияют на процесс культивирования уксуснокислых бактерий и количество образовавшейся уксусной кислоты?
9. Какой способ используют для промышленного получения уксусной кислоты и чем он отличается от используемых ранее способов?

## Лабораторная работа № 7. Оценка параметров роста микроорганизмов в условиях периодического и непрерывного культивирования

Продолжительность 4 часа.

**Цель работы:** освоение методов расчета кинетических характеристик роста микроорганизмов для прогноза перспектив культивирования в непрерывных условиях.

### Ход работы

#### Теоретическая часть

**Методы культивирования.** В зависимости от способа подачи питательных веществ и отбора получаемых продуктов выделяют два основных способа культивирования: периодическое и непрерывное.

**Периодическое культивирование.** Периодическим (стационарным) называют такой метод культивирования, когда клетки микроорганизмов вносят в питательную среду и далее компоненты среды не поступают в сосуд и не удаляются из него. Простая периодическая культура, содержащая ограниченное первоначальное количество питательного субстрата, служит примером закрытой системы (например, рост микроорганизмов на чашках Петри или в колбах с питательной средой). Закрытой называют такую систему, в которой хотя бы один из существенных компонентов не может ни поступать в систему, ни покидать ее. Такое культивирование называется периодическим. В этих условиях популяция микроорганизмов проходит определенный цикл развития, выражающийся в смене периодов роста (рис. 23). Продолжительность каждого периода зависит от вида культуры, количества и качества посевного материала, состава питательной среды и условий культивирования.

Выделяют несколько фаз в развитии культуры. После введения в питательную среду инокулята (маточной культуры) обычно наблюдают *индукционный период* (лаг-фазу) (I), в течение которого не происходит сколько-нибудь заметного увеличения биомассы или численности клеток. В этот период перестраивается метаболизм клетки, синтезируются ферменты, специфичные к использованию субстратов, активизируется биосинтез белка. Индукционный период сменяется фазой *ускоренного роста* (II), в течение которой быстро накапливается биомасса и продукты разных реакций [6, 10].

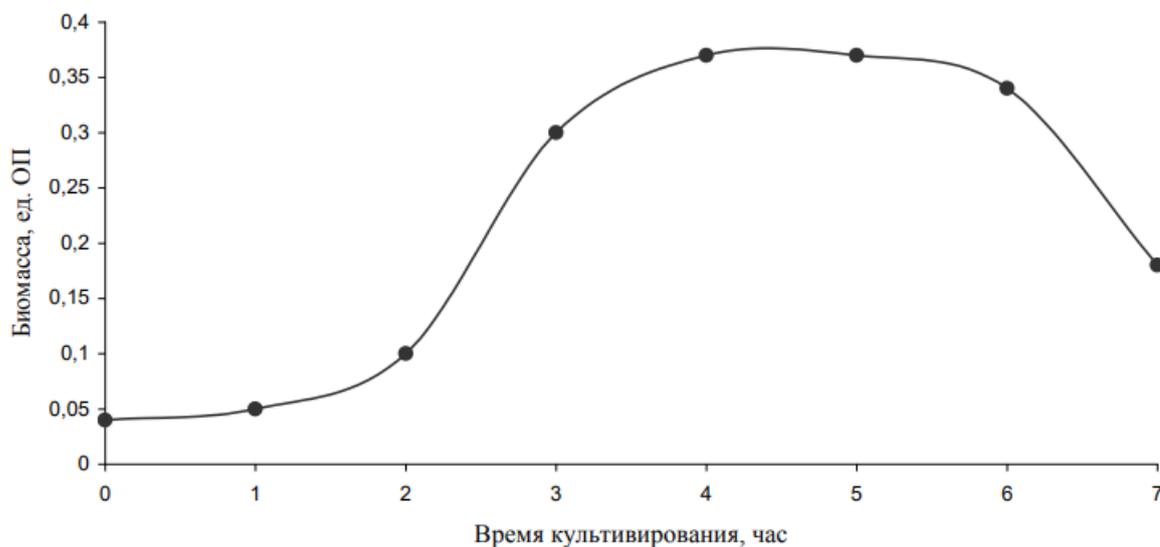


Рисунок 23 – Шесть фаз на кривой роста периодической культуры: I – лаг-фаза; II – фаза ускоренного роста; III – фаза линейного роста; IV – фаза замедления роста; V – стационарная фаза; VI – фаза отмирания

Фаза *линейного роста* (III) – время интенсивного логарифмического (экспоненциального) размножения. В этот период размножение бактерий идет с наибольшей скоростью и число клеток увеличивается в геометрической прогрессии. В результате такого интенсивного

размножения бактерий происходит поглощение необходимых питательных веществ из среды и накопление в ней токсических (ядовитых) продуктов обмена. Это замедляет ритм размножения. Фаза *экспоненциального роста* сменяется весьма непродолжительным периодом, в течение которого скорость роста культуры снижается до нуля. Это фаза *замедления роста* (IV). Затем рост культуры переходит в достаточно устойчивую и продолжительную *стационарную фазу* (V). В этих условиях культура развивается в режиме постоянства общего числа клеток. При этом скорость прироста биомассы полностью компенсируется скоростью гибели и лизиса клеток. Если система полностью истощается по субстрату, или накопление ингибирующих рост продуктов является значительным, то скорость прироста биомассы становится равной нулю. Происходят существенные физиологические изменения клеток и, как правило, наблюдается *фаза отмирания культуры* (VI), сопровождаемая часто полным лизисом клеток.

*Непрерывное культивирование* – это процесс, происходящий в так называемой открытой системе, все компоненты которой могут поступать в систему и покидать ее. Непрерывное культивирование микроорганизмов, когда происходит, с одной стороны, приток питательной среды, с другой – отток биомассы и других продуктов, чаще используется при промышленном получении различных продуктов микробного синтеза. Культивирование микроорганизмов в производственных целях связано с особенностями роста и функций микроорганизмов. Это могут быть культуры, крайне различные по форме и сложности. Простейшей формой культуры является гомогенная суспензия микроорганизмов одного вида в определенном объеме водной среды, поддерживаемая в постоянных физических условиях и содержащая минимальное число определенных компонентов: источник углерода, азота, фосфора и других элементов. Процесс непрерывного культивирования осуществляется в специальных аппаратах – ферментерах (рис. 24) [24, 27].

Скорость разбавления (коэффициент разбавления или скорость протока)  $D$  рассчитывается по уравнению

$$D = \frac{F}{V}$$

где  $F$  – скорость поступления питательной среды, л×ч<sup>-1</sup>;  $V$  – объем ферментера.

Величина  $D$  соответствует объему среды, прошедшей через ферментер за 1 ч, обратная величина  $\frac{1}{D}$  показывает время пребывания микроорганизмов в ферментере.

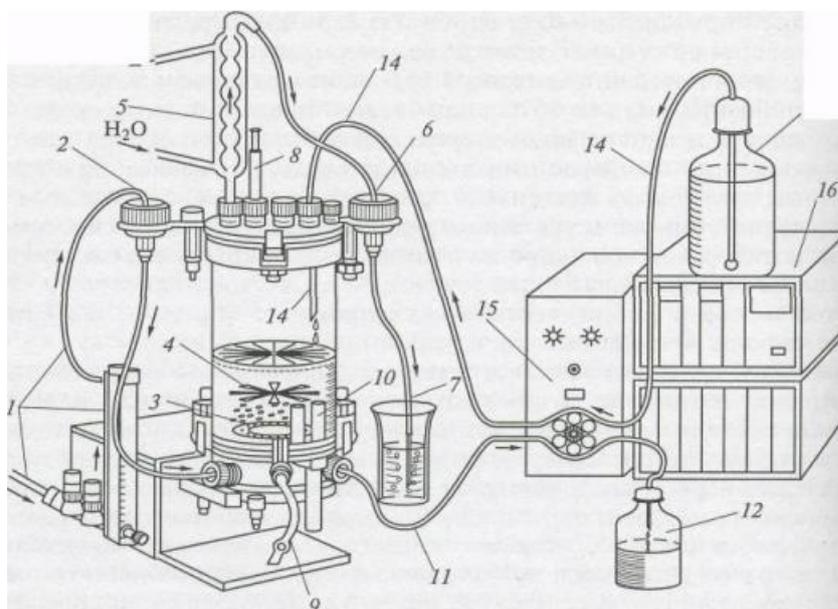


Рисунок 24 – Принципиальная схема ферментера «Ультроферм 1601» (ЛКВ, Швеция)

На рис. 24. изображена схема ферментера, работающего в режиме непрерывного культивирования микроорганизмов: 1 – подача магистрального воздуха через ротаметр; 2 – бактериальный фильтр для стерилизации поступающего воздуха; 3 – вход воздуха в ферментер через мелкие отверстия; 4 – магнитная мешалка; 5 – обратный холодильник для предотвращения испарения питательной среды; 6 – бактериальный фильтр для улавливания клеток микроорганизмов в отходящих газах; 7 – сосуд с дизраствором (5%-й раствор  $\text{NaHCO}_3$ ) для обеззараживания отходящих газов; 8 – шприц со стерильным пеногасителем; 9 – шариковый пробоотборник; 10 – система нагрева питательной среды в ферментере; 11 – отвод суспензии микроорганизмов через перистальтический насос; 12 – сосуд для сбора суспензии микроорганизмов; 13 – сосуд со стерильной питательной средой; 14 – подача стерильной питательной среды через перистальтический насос; 15 – перистальтический насос; 16 – блок управления: поддержание значения pH среды (необходим датчик pH), температуры, количества растворенного в среде кислорода (необходим датчик  $\text{O}_2$ ) [21, 22].

Контроль и управление процессами непрерывного культивирования осуществляется двумя путями: хеостатным и турбидостатным.

*Хеостатное культивирование.* Хеостат представляет собой ферментер, куда с постоянной скоростью поступает питательная среда и из которого с такой же скоростью происходит отток культуры. Обычно питательная среда содержит в избытке все компоненты за исключением какого-либо одного, например, источника азота, углерода, фосфора, магния, витаминов и т. п., который выполняет роль фактора, ограничивающего рост клеток (лимитирующий фактор). Хеостат при скорости протока (следовательно, и скорости роста) меньше  $\mu_{max}$  (максимальной скорости роста) представляет собой саморегулирующуюся систему. Эта система способна в течение продолжительного времени автоматически поддерживать постоянный уровень биомассы, скорость роста и концентрацию компонента среды, лимитирующего рост. Динамическое равновесие устанавливается при  $\mu = D$ .

Хеостатное культивирование дает возможность наблюдать особенности обмена веществ изучаемых микроорганизмов только в зависимости от скорости их роста или, напротив, сохраняя постоянную скорость роста клеток, изменять условия среды. Кроме того, этот метод позволяет долгое время поддерживать клетки в определенном физиологическом состоянии.

*Турбидостатное культивирование.* При турбидостатном выращивании в ферментере поддерживается постоянный уровень биомассы, который по оптической плотности культуры регистрируется специальным прибором, снабженным фотоэлементом. Как только уровень биомассы поднимается выше заданного, сигнал фотоэлемента приводит в действие насос, подающий питательную среду. Необходимый уровень жидкости в аппарате поддерживается при помощи специального сливного устройства. Таким образом, скорость накопления биомассы управляет скоростью притока питательной среды. Рост микроорганизмов в турбидостате осуществляется без внешнего лимитирования. При этом скорость роста приближается к  $\mu_{max}$ .

### **Практическая часть**

*1-й этап. Оценка параметров роста периодической культуры.* Результаты количественного изучения роста микробных популяций могут быть представлены более информативно и точно, если анализируются различные параметры роста: удельная скорость роста, время генерации (время удвоения биомассы), лаг-период, фаза задержки роста, экономический коэффициент и т. д.

1. Удельная скорость роста культуры рассчитывается по данным концентрации биомассы в фазах активного роста культуры по формуле

$$\mu = \frac{\ln X_1 - \ln X_0}{T_1 - T_0}$$

где  $X_0$  и  $X_1$  – значения биомассы, соответствующие времени роста  $T_0$  и  $T_1$ . Биомассу можно измерять весовым методом (г/л, мг/л), по данным нефелометрии оптической плотности (ОП) суспензии клеток микроорганизмов, в единицах ОП.

2. Время удвоения биомассы (время генерации). Каждая одиночная клетка бактерий при размножении образует 2 новые клетки, в благоприятных условиях среды обитания такие клетки будут размножаться в геометрической прогрессии, т. е. экспоненциально:

$$g = \frac{\ln 2}{\mu} \text{ или } \frac{0,693}{\mu}$$

где  $g$  – время генерации,  $\mu$  – удельная скорость роста.

3. Экономический коэффициент (или выход биомассы от потребленного субстрата) определяется из уравнения

$$Y = \frac{X}{(S - S_0)} \cdot 100$$

где  $X$  – концентрация биомассы,  $S$  – начальная концентрация субстрата в среде,  $S_0$  – остаточная концентрация субстрата в культуральной жидкости.

4. Длительность лаг-периода ( $L$ ) определяется графически. Если на графике зависимости биомассы от времени (см. рис. 22) прямую линию экстраполировать до уровня начальной биомассы, то отрезок, отсекаемый при этом на оси абсцисс, будет соответствовать  $L$ .

#### **Задание 1**

1. Построить кривую роста культуры по показателям оптической плотности (табл. [Приложения 3](#)).
2. Рассчитать параметры роста данной периодической культуры:
  - a. длительность лаг-фазы (по графику);
  - b. удельную скорость роста;
  - c. время генерации;
3. Используя данные табл. [Приложения И](#), рассчитать экономический коэффициент (выход биомассы от потребленного субстрата) для данной культуры.

*2-й этап. Определение кинетических характеристик роста культур микроорганизмов для прогноза непрерывного культивирования.*  $K_s$ ,  $\mu_{max}$ , и  $Y$  являются важнейшими параметрами, характеризующими рост микроорганизмов в непрерывной и периодической культуре. В настоящее время в промышленности для получения продуктов микробного синтеза используется метод непрерывного культивирования. Основным условием стабильного состояния культуры в непрерывном процессе является равенство удельной скорости роста ( $\mu$ ) и скорости разбавления ( $D$ ).

Скорость роста микроорганизмов определяется физиологическими особенностями штамма, условиями культивирования, природой утилизируемого углеродного субстрата и его концентрацией в среде. Высокие исходные концентрации некоторых компонентов среды могут ингибировать рост микроорганизмов. Наиболее важной характеристикой роста микроорганизмов является их теоретическая максимальная удельная скорость роста ( $\mu_{max}$ ). Она рассчитывается при выборе перспективных культур для получения биомассы или продуктов метаболизма микроорганизмов в условиях непрерывного культивирования. Чем выше  $\mu_{max}$  при росте на конкретном субстрате, тем устойчивее и продуктивнее будет идти процесс получения необходимого продукта. С практической удельной скоростью роста ( $\mu$ ) она связана математическим выражением Моно и имеет следующий вид:

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{S}{K_s + S}$$

где  $\mu$  – практическая удельная скорость роста;  $S$  – концентрация лимитирующего фактора в среде;  $K_s$  – константа насыщения (константа Михаэлиса-Ментена), равная концентрации лимитирующего фактора, при котором  $K_s = 1/2$ , величина  $K_s$  обратно пропорциональна сродству организма к субстрату.

По своей форме уравнение Моно соответствует зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата при химических реакциях (уравнение Михаэлиса-Ментена). Величину  $K_s$  можно определить в опытах, где суспензией клеток засевают среды с различными, но очень низкими концентрациями субстрата  $S$ . Через короткие интервалы времени (1, 2, 3 ч и далее) измеряют величину биомассы и вычисляют значение  $\mu$ . Далее строят график зависимости  $\mu$  от концентрации субстрата  $S$  (рис. 25). Проводят линию, параллельную оси абсцисс, на уровне самого высокого значения  $\mu$  до пересечения с осью ординат. Количественное значение  $K_s$  рассчитывается графически экстраполированием величины  $1/2 \mu_{max}$  на ось абсцисс (концентрация субстрата).

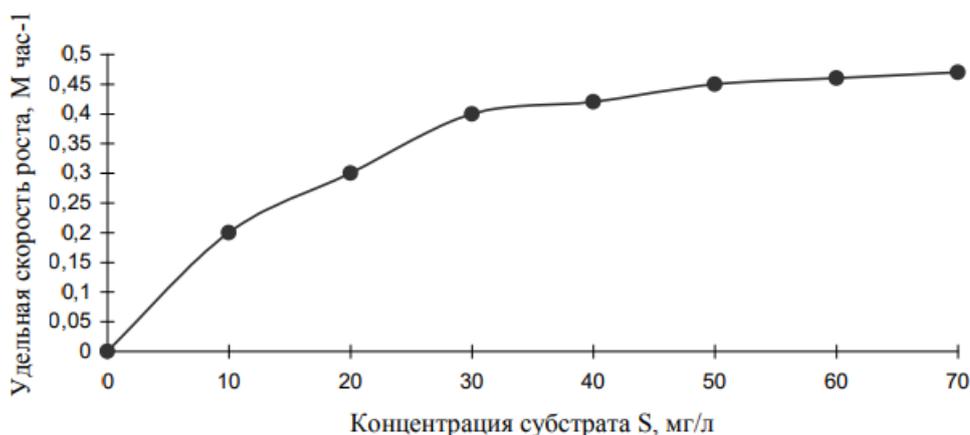


Рисунок 25 – Зависимость удельной скорости роста культуры ( $\mu$ ) от концентрации субстрата ( $S$ )

### Контрольные вопросы

1. Что такое периодическое культивирование?
2. Какие фазы выделяют в развитии культуры?
3. Чем характеризуется фаза линейного роста?
4. Какая система характерна для непрерывного культивирования?
5. От чего зависит скорость разбавления при непрерывном культивировании?
6. Что такое хемостат?
7. Приведите достоинства хемостатного культивирования.
8. Чем отличается турбидостатное культивирование от хемостатного?

## Лабораторная работа № 8. Графоаналитический метод расчета условий непрерывного культивирования

Продолжительность 4 часа.

**Цель работы:** освоение методов расчета кинетических характеристик роста микроорганизмов для прогноза перспектив культивирования в непрерывных условиях.

### Ход работы

**Теоретическая часть** (см. лабораторную работу № 5)

### Практическая часть

Принцип метода состоит в сопоставлении графиков зависимости накопления биомассы от времени культивирования (см. рис. 23) с кривой продуктивности по выходу биомассы  $dt$ . Для этого в правой половине графика зависимости образования биомассы от времени культивирования (кривая 1) наносят кривую зависимости продуктивности культуры по выходу биомассы от ее концентрации, т. е.  $dX/dt$  от  $X$  в тех же единицах оптической плотности (ед. ОП) (кривая 2).

Величина  $dX/dt$  рассчитывается по данным таблицы ([Приложение 3](#)).

*Пример:*  $X_2 = 0,3$  ед. ОП;  $X_1 = 0,15$  ед. ОП, тогда  $dX/dt = 0,15$  ед. ОП.

На кривой 2 находим точку, соответствующую максимальному значению  $dX/dt$ . При пересечении перпендикуляра с осью абсцисс находим точку, которая соответствует состоянию динамического равновесия при непрерывном культивировании  $dX/dt$  (например, 0,15 ед. ОП). Проведя параллель по найденной точке до пересечения с осью ординат, находим показатель оптической плотности, соответствующий определенной концентрации биомассы  $X$  (например, 0,5 ед. ОП). Продлив эту прямую до пересечения с кривой 1, находим фазу роста, в которой будет поддерживаться культура. Опустив перпендикуляр на ось абсцисс со шкалой времени культивирования, находим время, необходимое для выхода культуры в нужную фазу роста и начала проточного культивирования. В стационарных условиях скорость протока ( $D$ ) равна удельной скорости роста ( $\mu$ ). Их рассчитываем по формуле

$$D = \mu = \frac{dX/dt}{X} = \frac{0,15 \text{ ед. ОП/ч}}{0,5 \text{ ед. ОП}} = 0,3 \text{ ч}^{-1}$$

Таким образом, находим, что если при оптической плотности культуры, равной 0,5 в ферментере включить проток со скоростью  $0,15 \text{ ч}^{-1}$ , то производительность процесса получения биомассы будет максимальна. Культивирование будет осуществляться в режиме турбидостата.

### Задание 1

1. Построить график зависимости удельной скорости роста от концентрации субстрата для данной культуры на основании данных таблице [Приложения К](#).
2. Рассчитать значение теоретической  $\mu_{\max}$  по формуле теоретически максимальной удельной скорости роста при максимальном значении  $S$  из таблицы [Приложения К](#).
3. По данным графика определить:
  - значение константы Михаэлиса-Ментена ( $K_s$ );
  - значение практической максимальной скорости роста ( $\mu_{\max}$ ).
4. Графоаналитическим методом рассчитать скорость протока для максимальной продуктивности культуры по выходу биомассы в единицах ОП (в режиме турбидостата), время культивирования в стационарных условиях и подключения подачи питательной среды (по вариантам 1-го этапа).

### Контрольные вопросы

1. Что такое периодическое культивирование?
2. Какие фазы выделяют в развитии культуры?
3. Чем характеризуется фаза линейного роста?

4. Какая система характерна для непрерывного культивирования?
5. От чего зависит скорость разбавления при непрерывном культивировании?
6. Что такое хеостат?
7. Приведите достоинства хеостатного культивирования.
8. Чем отличается турбидостатное культивирование от хеостатного?

## Заключение

В настоящем учебном пособии авторы попытались найти наиболее доступные формы изложения достаточно объемного и сложного материала, познакомить с современным состоянием биотехнологии как научной дисциплины.

В каждом из представленных разделов даются контрольные вопросы для проверки знаний. Изложение и структура теоретического и практического разделов позволяют студентам самостоятельно разобраться в терминах, понятиях и других нюансах предмета.

Авторы надеются, что пособие вызовет у студентов научный интерес и пробудит в них творческий подход в освоении новых знаний.

Биотехнология представляется наукой, сочетающей самые передовые достижения научно-технического прогресса с определенным возвратом к прошлому, выражающимся в использовании живых организмов как источников полезных для человека продуктов. Биотехнология – междисциплинарная область научного знания, гетерогенна по своему теоретическому базису, так как исследует не какой-либо класс объектов, а решает комплексную проблему использования объекта. Большинство вопросов, решаемых биотехнологией, прямо или косвенно связано с глобальными проблемами, стоящими перед современной цивилизацией, в том числе нехватка продовольствия, особенно острая в развивающихся странах.

Биотехнология является порождением бурного, динамичного XXI века, открывая новые горизонты перед человеческим разумом. Проблемы биотехнологии весьма разнообразны, начиная от технических (например, снижение каталитической активности ферментов при их мобилизации) и заканчивая тонкими интеллектуальными проблемами, связанными с обеднением фундаментальной науки в связи с доминированием проблемно-прикладных разработок.

## Глоссарий (терминологический словарь)

**Абиотические факторы** – факторы неживой природы (воздух, вода, температура и др.), способные активно воздействовать на состояние живых организмов.

**Автоклавирование** – метод стерилизации насыщенным паром под давлением.

**Автотрофы** (от греч. *autos* – сам, *trophe* – пища, питание) – организмы, способные в качестве единственного источника углерода использовать углекислый газ и синтезировать из него необходимые органические вещества для своих клеток.

**Агар-агар**, агар – полисахарид, получаемый из красных морских водорослей семейства *Rhodophyceae* (обычно рода *Gelidium*). Водный раствор А.-а. плавится при температуре 100 °С и затвердевает при 45 °С, образуя плотные прозрачные гели. Для получения плотных сред для культивирования микроорганизмов обычно используется в концентрации 1,5–2,0 %.

**Анаболизм** – пластический обмен, или ассимиляция – совокупность химических процессов, составляющих одну из сторон обмена веществ в живом организме и направленных на образование высокомолекулярных соединений.

**Анаэробы** – организмы, способные к жизнедеятельности в отсутствие молекулярного кислорода.

**Анаэробы облигатные** – организмы, способные существовать только в условиях полного отсутствия молекулярного кислорода.

**Анаэробы факультативные** – организмы, способные существовать как в отсутствие, так и в присутствии молекулярного кислорода, переключая свой энергетический метаболизм с брожения (анаэробного дыхания) на аэробное дыхание.

**Антибиотики** (от греч. *anti* – против, *bios* – жизнь) – вещества биологического происхождения или их модификации, обладающие высокой физиологической активностью по отношению к определенным группам микроорганизмов (бактериям, грибам, водорослям, протистам) либо к тканям злокачественных опухолей, избирательно задерживая их рост или полностью подавляя развитие.

**Антисептика** (от греч. *anti* – против, *septikos* – вызывающий нагноение, гнилостный) – комплекс мероприятий, направленных на уничтожение посторонних микроорганизмов в среде.

**Асептика** – комплекс мероприятий, направленных на предупреждение попадания в среду посторонней микрофлоры. А. достигается стерилизацией питательных сред, оборудования, инструментов, включает обработку ультрафиолетовым облучением и химическими веществами, оказывающими бактерицидное или бактериостатическое действие, инструментов, оборудования и помещений; подачу стерильного воздуха в ферментеры и др.

**Аэрация** – процесс естественного или искусственного поступления кислорода в какую-либо среду (воду, почву и т. д.).

**Аэробы** – организмы, развивающиеся в присутствии свободного кислорода и использующие его в качестве конечного акцептора электронов в окислительно-восстановительных реакциях.

**Аэробы облигатные** – организмы, не способные существовать в отсутствие свободного кислорода.

**Аэробы факультативные** – организмы, способные какое-то время существовать в отсутствие свободного кислорода.

**Аэротенк** – сооружение для биологической очистки сточных вод, представляющее собой несколько проточных резервуаров, продуваемых воздухом.

**Бактерии** (от греч. *bakterion*, уменьш. от *bactron* – трость, посох) – группа микроскопических одноклеточных организмов, не имеющих обособленного ядра, роль которого чаще всего выполняет единственная хромосома.

**Биогаз** – смесь метана и двуокиси углерода, а также следов других газов, таких как водород, азот, сероводород, и водяных паров, получаемая из биомассы в анаэробных условиях.

**Биоконверсия** – превращение метаболитов в структурно-родственные соединения под действием микроорганизмов.

**Биологически активные вещества (БАВ)** – органические соединения, оказывающие влияние на метаболизм и другие функции в организме и обладающие высокой активностью и специфичностью.

**Биомасса** – масса клеток, образовавшаяся в процессе роста и развития живых организмов.

**Биотехнология** – технологическое использование биологических явлений и процессов для получения полезных продуктов, товаров и услуг; направление научной и практической деятельности человека, основанное на использовании биологических объектов в промышленных целях.

**Биотические факторы** – (от греч. *biotikos* – жизненный) – формы воздействия организмов друг на друга, как внутри вида, так и между различными видами.

**Брожение** – метаболический процесс, осуществляемый микроорганизмами, при котором образуется АТФ, а продукты расщепления органического субстрата могут служить одновременно и донорами и акцепторами водорода.

**Вирус** – инфицирующий комплекс, состоящий из РНК (ортомиксовирусы, парамиксовирусы, ретровирусы, рабдовирусы и др.) или ДНК (аденовирусы, герпесвирусы, гепаднавирусы, бакуловирусы и др.), белковой оболочки (капсида), а у ряда В. – липополисахаридной оболочки (суперкапсида). В. способны репродуцироваться только в живых клетках организма-хозяина.

**Время генерации культуры** – время, необходимое для удвоения количества клеток в экспоненциально растущей популяции одноклеточных организмов.

**Вторичные метаболиты** – вещества, синтезирующиеся в стационарной фазе роста культуры клеток и не являющиеся обязательными для роста или функционирования организма (напр., антибиотики, пигменты, токсины).

**Генетическая инженерия** – технология получения новых комбинаций генетического материала путем проводимых *in vitro* манипуляций с молекулами нуклеиновых кислот (ДНК, РНК) и переноса созданных конструкций генов в реципиентный организм.

**Генетически модифицированный организм (ГМО)** – организм, в геном которого с помощью методов генетической инженерии перенесен фрагмент чужеродной ДНК.

**Генотипическая характеристика** – определение схожести или различия организмов по степени гомологии ДНК, РНК, выражаемый в мол. % G+C.

**Гетеротрофы** (от греч. *heteros* – иной, другой, *trophe* – пища) – организмы, использующие в качестве источника углерода готовые органические вещества.

**Денатурация** – нарушение нативной (естественной) конформации биологических макромолекул, сопровождающееся разрывом нековалентных связей.

**Инокулят** – микроорганизмы или отдельные эукариотические клетки, напр. в виде клеточной суспензии, вводимые в питательную среду и дающие начало новой культуре микроорганизмов или культуре клеток соответственно.

**Каллус** (от лат. *callus* – толстая кожа) – ткань, возникшая путем неорганизованной пролиферации клеток тканей растения. К. появляется при травмах растения и функционирует не продолжительное время, защищая место повреждения и накапливая питательные вещества для регенерации данного участка или даже целого растения. К. можно получать искусственным путем и выращивать *in vitro*.

**Катаболизм** – совокупность реакций распада сложных органических веществ до более простых соединений.

**Клон** – генетически однородное потомство, полученное при размножении одной клетки.

**Колониеобразующая единица (КОЕ)** – клетка микроорганизма, способная образовывать колонию.

**Колония** – группа генетически идентичных клеток, образующаяся на поверхности плотной питательной среды в результате деления одной клетки.

**Культивирование**, инкубирование (от лат. *cultus, incubatio* – выращивание) – создание искусственных условий поддержания процессов жизнедеятельности и размножения клеток *in vitro*.

**Культура микроорганизмов чистая** – культура, полученная из одной клетки или одной колонии и содержащая микроорганизмы одного вида.

**Культуральная жидкость** – жидкость, полученная после отделения биомассы от культуральной среды. К. ж. содержит питательные вещества и продукты жизнедеятельности клеток.

**Культуральная среда** – плотная или жидкая питательная среда, используемая для выращивания биологических объектов *in vitro*.

**Ламинар** – устройство для работы в стерильных условиях, имеющее бокс, куда подается стерильный воздух.

**Лиофилизация, лиофильная сушка** (от греч. *lyo* – растворяю, *phileo* – люблю) – процесс высушивания клеток или тканей в замороженном состоянии под вакуумом.

**Мезофилы** – организмы, для которых температурный оптимум составляет 20–37 °С; напр., *E. coli, Pseudomonas putida*.

**Метаболизм** – обмен веществ в организме или отдельной клетке, является совокупностью процессов анаболизма и катаболизма.

**Микроорганизмы, микробы** (от греч. *micros* – малый) – микроскопически малые организмы (до 500 мкм), преимущественно одноклеточные – *бактерии*, одноклеточные грибы, водоросли, простейшие, клетки которых нельзя увидеть невооруженным глазом.

**Мутаген, мутагенный агент** – физический, химический или биологический агент, увеличивающий частоту мутаций по сравнению со спонтанным уровнем.

**Мутация** (от лат. *mutatio* – изменение, перемена) – любое наследуемое изменение в структуре гена, произошедшее спонтанно или индуцированное мутагенами.

**Пребиотик (*prebiotic*)** – физиологически функциональный пищевой ингредиент в виде вещества или комплекса веществ, обеспечивающий при систематическом употреблении в пищу человеком в составе пищевых продуктов благоприятное воздействие на организм человека в результате избирательной стимуляции роста и/или повышения биологической активности нормальной микрофлоры кишечника\*.

*\*Примечание: основными видами пребиотиков являются: ди- и трисахариды; олиго- и полисахариды; многоатомные спирты; аминокислоты и пептиды; ферменты; органические низкомолекулярные и ненасыщенные высшие жирные кислоты; антиоксиданты; полезные для человека растительные и микробные экстракты и другие.*

**Пробиотик (*probiotic*)** – 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 микрофлоры кишечника.

**Продуцент** (от лат. *producens* – производящий) – организм, синтезирующий какое-либо вещество или группу веществ (напр., *антибиотик*).

**Психрофилы** – микроорганизмы, хорошо развивающиеся в интервале температур 0–10 °С. Оптимальная температура их роста составляет 15 °С и ниже, а максимальная – не превышает 20 °С.

**Сепарация** – процесс разделения культуральной жидкости и биомассы клеток. Методами С. являются флотация, фильтрация, центрифугирование.

**Синбиотик (*synbiotic*)** – физиологически функциональный пищевой ингредиент, представляющий собой комбинацию пробиотиков и пребиотиков, в которой пробиотики и пребиотики оказывают взаимно усиливающее воздействие на физиологические функции и процессы обмена веществ в организме человека.

**Стерилизация** (от лат. *sterilis* – бесплодный) – система мероприятий, направленных на полное уничтожение как вегетативных клеток, так и спор *микроорганизмов* на поверхности и внутри стерилизуемого объекта.

**Титр** – количество клеток или вирусных частиц в единице объема исследуемого материала (напр., почвы, жидкости).

**Турбидостат** (от лат. *turbo* – вихрь, греч. *statos* – стоящий, установленный) – биореактор для осуществления непрерывного культивирования, при котором концентрация клеток поддерживается на определенном уровне путем изменения поступления свежей питательной среды.

**Ферментер, ферментатор, биореактор** – аппарат для осуществления различного рода ферментных реакций в стерильных условиях и при заданных параметрах среды (температура, аэрация, состав среды и др.) при участии микроорганизмов, культур клеток или изолированных ферментов.

**Ферменты, энзимы** (от лат. *fermentum* – брожение, закваска) – вещества белковой природы, которые синтезируются в клетках и во много раз ускоряют протекающие в них реакции, не подвергаясь при этом химическим превращениям.

**Фенотипическая характеристика** – внешние проявления организмов, особенности морфологических, физиологических, биохимических и других свойств живых организмов (исключая молекулярно-генетические).

**Фильтрование, фильтрация** – пропускание жидкостей или газов через фильтр. В биотехнологии применяется с целью отделения биомассы клеток или нерастворимых веществ от культуральной жидкости; является одним из методов сепарации.

**Флотация** (франц. *flottation*, от *flotter* – плавать) – метод сепарации, когда производится удаление клеток продуцента, накапливающихся в верхних слоях жидкости в ферментере.

**Функциональный пищевой продукт** (functional food) – специальный пищевой продукт, предназначенный для систематического употребления в составе пищевых рационов всеми возрастными группами здорового населения, обладающий научно обоснованными и подтвержденными свойствами, снижающий риск развития заболеваний, связанных с питанием, предотвращающий дефицит или восполняющий имеющийся в организме человека дефицит питательных веществ, сохраняющий и улучшающий здоровье за счет наличия в его составе функциональных пищевых ингредиентов.

**Хемостат** (от *хемо...* – относящийся к химии, греч. *statos* – стоящий, установленный) – биореактор для осуществления непрерывного культивирования клеток, в котором рост культуры контролируется одним лимитирующим компонентом питательной среды.

**Штамм** (от нем. *Stamm* – ствол, основа) – чистая культура микроорганизмов определенного вида, выделенных из конкретного источника либо полученных с помощью генетических манипуляций.

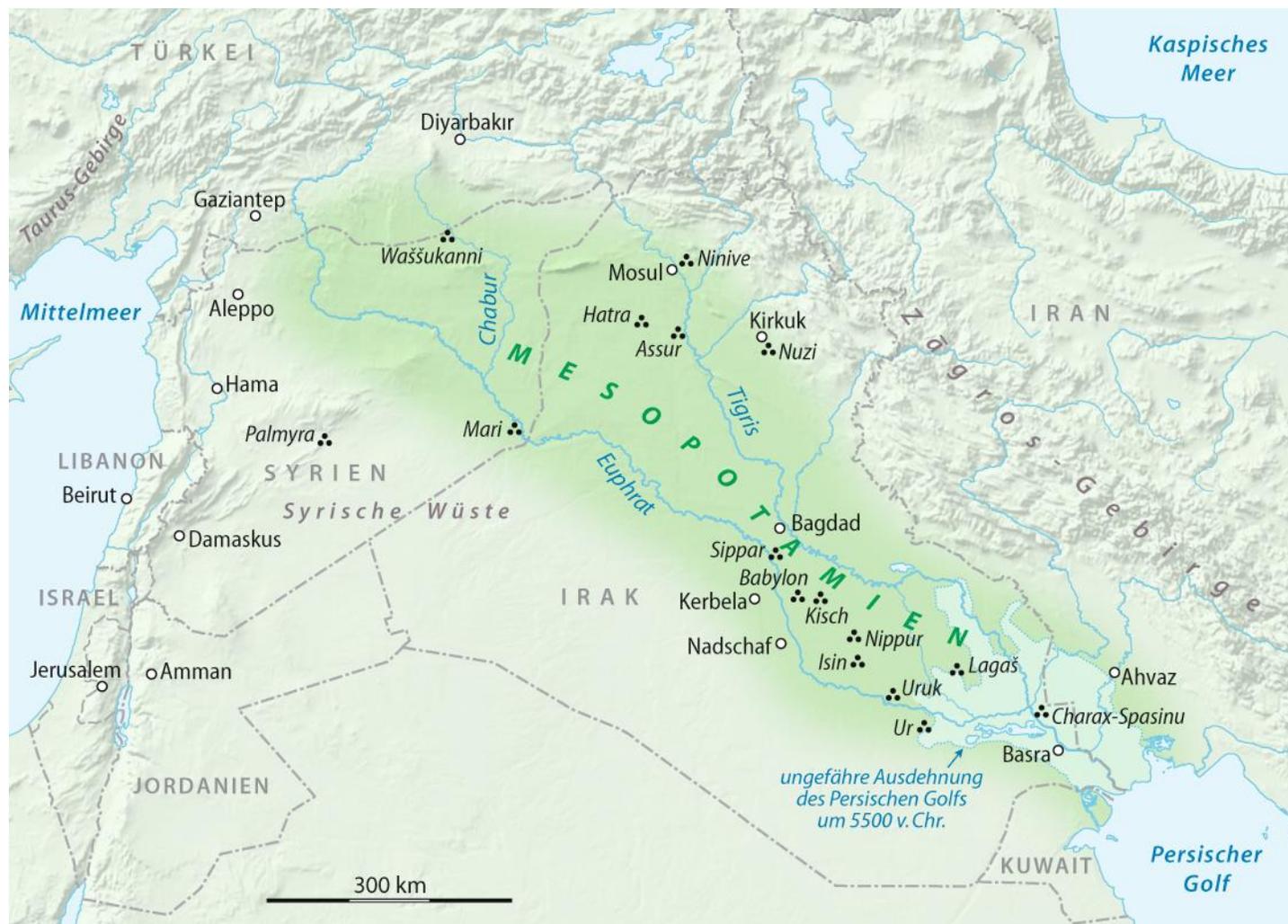
## Список использованной литературы

1. Беккер, М.Е. Биотехнология / М.Е. Беккер, Г.К. Лиепиньш, Е.П. Райпулис. М.: Агропромиздат, 1990. – 333 с.
2. Борисова, С.В. Использование дрожжей в промышленности: Учеб. пособие для вузов. /С.В. Борисова. – СПб.: ГИОРД, 2008. – 215 с.
3. Волова, Т.Г. Введение в биотехнологию: Учеб. Пособие / Т.Г. Волова. – Красноярск: ИПК СФУ, 2008. – 188 с.
4. Голенко, В.А. Научные основы биотехнологии. Часть I. Нанотехнологии в биологии: учеб. пособие: Учеб. изд. / С.К. Пятунина, В.А. Горленко. – М.: Прометей, 2013. – 264 с.
5. Джей, Дж. М. Современная пищевая микробиология / Джей, Дж.М., Лесснер, М.Дж., Д.А. Гольден. – Пер. с англ. изд. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2012. – 886 с.
6. Дусаева, Х.Б. Основы современной биотехнологии: методические указания к лабораторному практикуму / Х.Б. Дусаева. – Оренбург: РИК ГОУ ОГУ, 2006. – 43 с.
7. Евстигнеева Т.Н., Сучкова Е.П. Пищевая биотехнология: Учеб. -метод. пособие. – СПб.: Университет ИТМО, 2018. – 131 с.
8. Евтушенков А.Н., Фомичев Ю.К. Введение в биотехнологию: Курс лекций:/ А.Н. Евтушенков, Ю.К. Фомичев. – Мн.: БГУ, 2002. – 105 с.
9. Закиян С.М., Власов В.В., Медведев С.П. (2014). «Редакторы геномов». От «цинковых пальцев» до CRISPR. «Наука из первых рук» <https://scfh.ru/papers/redaktory-genomov-ot-tsinkovykh-paltsev-do-crispr>;
10. Красникова, Л.В. Микробиология / Л.В. Красникова. – СПб.: Троицкий мост, 2012. – 296 с.
11. Красникова, Л.В. Микробиология молока и молочных продуктов: Лабораторный практикум /Л.В. Красникова, П.И. Гунькова, В.В. Маркелова: Учеб. -метод. пособие. – СПб.: НИУ ИТМО; ИХиБТ, 2013. – 85 с.
12. Крусь, Г.Н. Методы исследования молока и молочных продуктов/ Г.Н. Крусь. – М.: Колос, 2000. – 368 с.
13. Музафаров, Е. Н. Биотехнология. Основы биологии: учебное пособие для вузов / Е. Н. Музафаров. – Санкт-Петербург: Лань, 2022. – 168 с. – ISBN 978-5-8114-8242-9. – Текст: электронный // Лань: электронно-библиотечная система. – URL: <https://e.lanbook.com/book/193279> (дата обращения: 30.06.2022). – Режим доступа: для авториз. пользователей.
14. Неверова, О.А. Пищевая биотехнология продуктов из сырья растительного происхождения: учебник для вузов / О.А. Неверова, А.Ю. Просеков, Г.А. Гореликова, В.М. Позняковский. – М.: ИНФРА-М, 2014. – 318 с.
15. Нетрусов, А.И. Введение в биотехнологию / А.И. Нетрусов – М.: Академия, 2015. – 288 с.
16. Матвеева, И.В. Биотехнологические основы приготовления хлеба / И.В.Матвеева, И.Г. Беляевская. – М.: ДеЛи принт, 2001. – 150 с.
17. Общая биотехнология: методические указания к лабораторным работам / сост.: В.А. Блинов, С.Н. Буршина. – Саратов: «РИК «Полиграфия Поволжья», 2004. – С. 58-60.
18. Орехов, С.Н., Биотехнология / С.Н. Орехов, И.И. Чакалева: М.: Академия, 2014. – 282 с.
19. Рогов, И.А. Пищевая биотехнология: В 4 кн. Кн. 1. Основы пищевой биотехнологии/ И.А. Рогов, Л. В. Антипова, Г. П. Шуваева – М.: КолосС, 2004. – 440 с.
20. Романова С.А. Развитие биотехнологий в России // Ремедиум. 2012. № 7. С. 8-19. ISSN: 1561-5936 eISSN: 2658-3534
21. Русь, О. Б. Введение в биотехнологию: практикум / О. Б. Русь, А. М. Ходосовская. – Минск: БГУ, 2011. – 98 с.
22. Сушкова, В.И. Безотходная конверсия растительного сырья в биологически активные вещества /В.И. Сушкова, Г.И. Воробьева – М.: ДеЛи принт, 2008. – 215 с.

23. Сучкова, Е.П. Основы биотехнологии: Учеб. -метод. пособие. – СПб.: Университет ИТМО, 2016. – 101 с.
24. Уайтхерст, Р.Дж. Ферменты в пищевой промышленности / Уайтхерст, Р.Дж., М. ван Оорст. – СПб.: Профессия, 2013. – 408 с.
25. [ГОСТ Р 52349-2005](#) Продукты пищевые. Продукты пищевые функциональные. Термины и определения. – URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200039951> (дата обращения 15.02.23)
26. Шлейкин А.Г., Жилинская Н.Т. Введение в биотехнологию: Учеб. пособие. – СПб.: НИУ ИТМО; ИХиБТ, 2013. – 95 с.
27. Оценка параметров роста микроорганизмов в условиях периодического и непрерывного культивирования: методические указания к выполнению лабораторной работы по курсу «Основы микробиологии и биотехнологии» для студентов специальности 280201.65 «Охрана окружающей среды и рациональное использование природных ресурсов» / сост. Л. А. Гаретова, О. А. Кириенко. – Хабаровск: Изд-во Тихоокеан. гос. ун-та, 2010. – 16 с.
28. Багоцкий С.В. Революция в систематике // Химия и жизнь №6, 2010 [Электронный ресурс] – URL: [https://elementy.ru/nauchno-populyarnaya\\_biblioteka/431230/Revolutsiya\\_v\\_sistematike](https://elementy.ru/nauchno-populyarnaya_biblioteka/431230/Revolutsiya_v_sistematike) (дата обращения: 18.10.2022).
29. Биологическая систематика // Википедия. [2022]. Дата обновления: 18.10.2022. URL: <https://ru.wikipedia.org/?curid=41237&oldid=126126833> (дата обращения: 18.10.2022).
30. В диких условиях – как жил последний всеобщий предок LUCA [Электронный ресурс] – URL: <https://biomolecula.ru/articles/v-dikikh-usloviakh-kak-zhil-poslednii-vseobshchii-predok-luca> (дата обращения: 18.10.2022).
31. Вихрев Н. Аденин – у Шерхана, гуанин – у Багиры // «Троицкий вариант – Наука» №1(320), 12 января 2021 года [Электронный ресурс] – URL: [https://elementy.ru/nauchno-populyarnaya\\_biblioteka/435711/Adenin\\_u\\_Sherkhana\\_guanin\\_u\\_Bagiry](https://elementy.ru/nauchno-populyarnaya_biblioteka/435711/Adenin_u_Sherkhana_guanin_u_Bagiry) (дата обращения: 11.07.2022).
32. Гигантские вирусы – 4-й домен жизни [Электронный ресурс] – URL:<https://biomolecula.ru/articles/gigantskie-virusy-4-i-domen-zhizni#source-11> (дата обращения: 11.07.2022).
33. Закинули археи эволюционный невод и вытянули... [Электронный ресурс] – URL: <https://biomolecula.ru/articles/zakinuli-arkhei-evoliutsionnyi-nevod-i-vytianuli#source-8> (дата обращения: 13.07.2022).
34. Вёзе, Карл // Википедия. [2022]. Дата обновления: 23.10.2022. URL: <https://ru.wikipedia.org/?curid=545424&oldid=126235204> (дата обращения: 23.10.2022).
35. Топ 10 биотехнологических компаний мира. Обзор и капитализация. [Электронный ресурс] – URL: <https://invest-journal.ru/top-10-biotehnologicheskikh-kompanij-mira> (дата обращения: 11.07.2022).
36. Трогоцитоз: зачем клетки делают «кусь» [Электронный ресурс] – URL: <https://biomolecula.ru/articles/trogotsitoz-zachem-kletki-delaiut-kus#source-1> (дата обращения: 11.07.2022).
37. Fred D. Ledley et. al.// Profitability of Large Pharmaceutical Companies vs Other Large Public Companies//JAMA 2020;323(9):834-843; DOI:10.1001/jama.2020.0442 [Электронный ресурс] – URL: <https://pcr.news/novosti/farmatsevticheskie-kompanii-lidiruyut-po-pribylnosti/> (дата обращения: 12.07.2022).
38. 12 методов в картинках клеточные технологии [Электронный ресурс] – URL: <https://biomolecula.ru/articles/metody-v-kartinkakh-kletochnye-tekhnologii> (дата обращения: 12.07.2022).
39. Intel индустрии питания. Как двое вчерашних студентов меняют наше представление о еде с помощью ГМО-дрожжей и молока без коров [Электронный ресурс] – URL: <https://biomolecula.ru/articles/intel-industrii-pitaniia-kak-dvoe-vcherashnikh-studentov-meniaiut-nashe-predstavlenie-o-ede-s-pomoshchiu-gmo-drozhdzhei-i-moloka-bez-korov> (дата обращения: 12.07.2022).

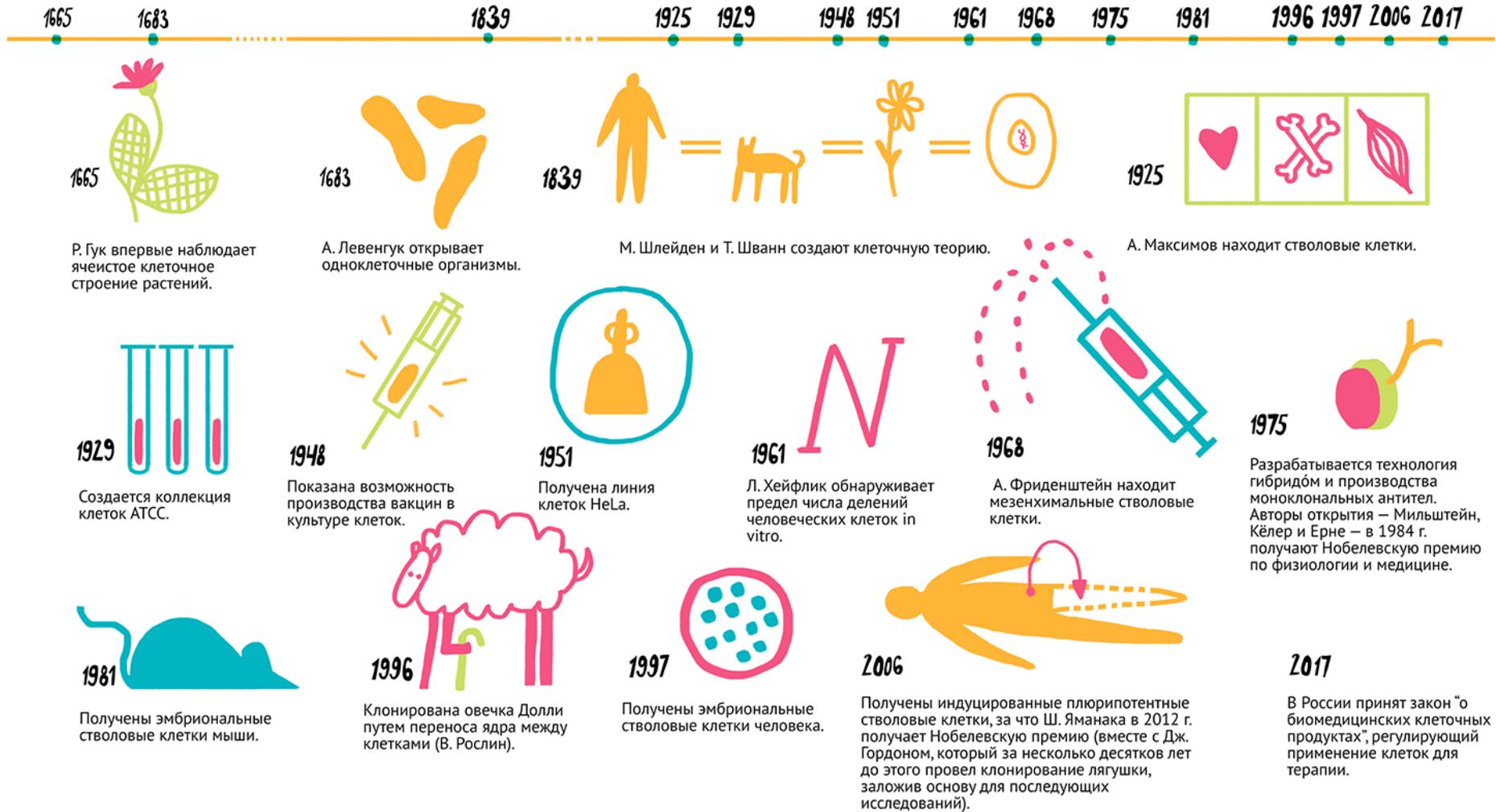
40. Микробиота и опухоли\_ новый шаг к пониманию причин канцерогенеза [Электронный ресурс] – URL: <https://biomolecula.ru/articles/mikrobiota-i-opukholi-novyi-shag-k-ponimaniyu-prichin-kantserogeneza> (дата обращения: 13.07.2022).
41. Пластисфера невидимый мир [Электронный ресурс] – URL: <https://biomolecula.ru/articles/plastisfera-nevidimyi-mir> (дата обращения: 13.07.2022).
42. Mora C, Tittensor DP, Adl S, Simpson AGB, Worm B (2011) Сколько видов существует на Земле и в океане? PLoS Biol 9(8): [Электронный ресурс] – URL: <https://journals.plos.org/plosbiology/article/info:doi/10.1371/journal.pbio.1001127> (дата обращения: 12.07.2022).
43. May RM (2011) Why Worry about How Many Species and Their Loss? PLoS Biol 9(8): e1001130. [Электронный ресурс] – URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001130> (дата обращения: 13.07.2022).
44. Мокиевский В. Сколько видов на планете [Электронный ресурс] – URL: [https://elementy.ru/novosti\\_nauki/431672/Skolko\\_vidov\\_na\\_planete](https://elementy.ru/novosti_nauki/431672/Skolko_vidov_na_planete) (дата обращения: 13.07.2022).
45. Chugunov A.O., Volynsky P.E., Krylov N.A., Boldyrev I.A., Efremov R.G. (2014). Liquid but Durable: Molecular Dynamics Simulations Explain the Unique Properties of Archaeal-Like Membranes. Sci. Rep. 4, article number: 7462; [Электронный ресурс] – URL: <https://www.nature.com/articles/srep07462> (дата обращения: 13.07.2022).
46. От Бульона до Эукариот. Первый организм и наш древнейший предок [Электронный ресурс] – URL: <https://biomolecula.ru/articles/ot-bulona-do-eukariot-pervyi-organizm-i-nash-drevneishii-predok> (дата обращения: 13.07.2022).

## Приложение А

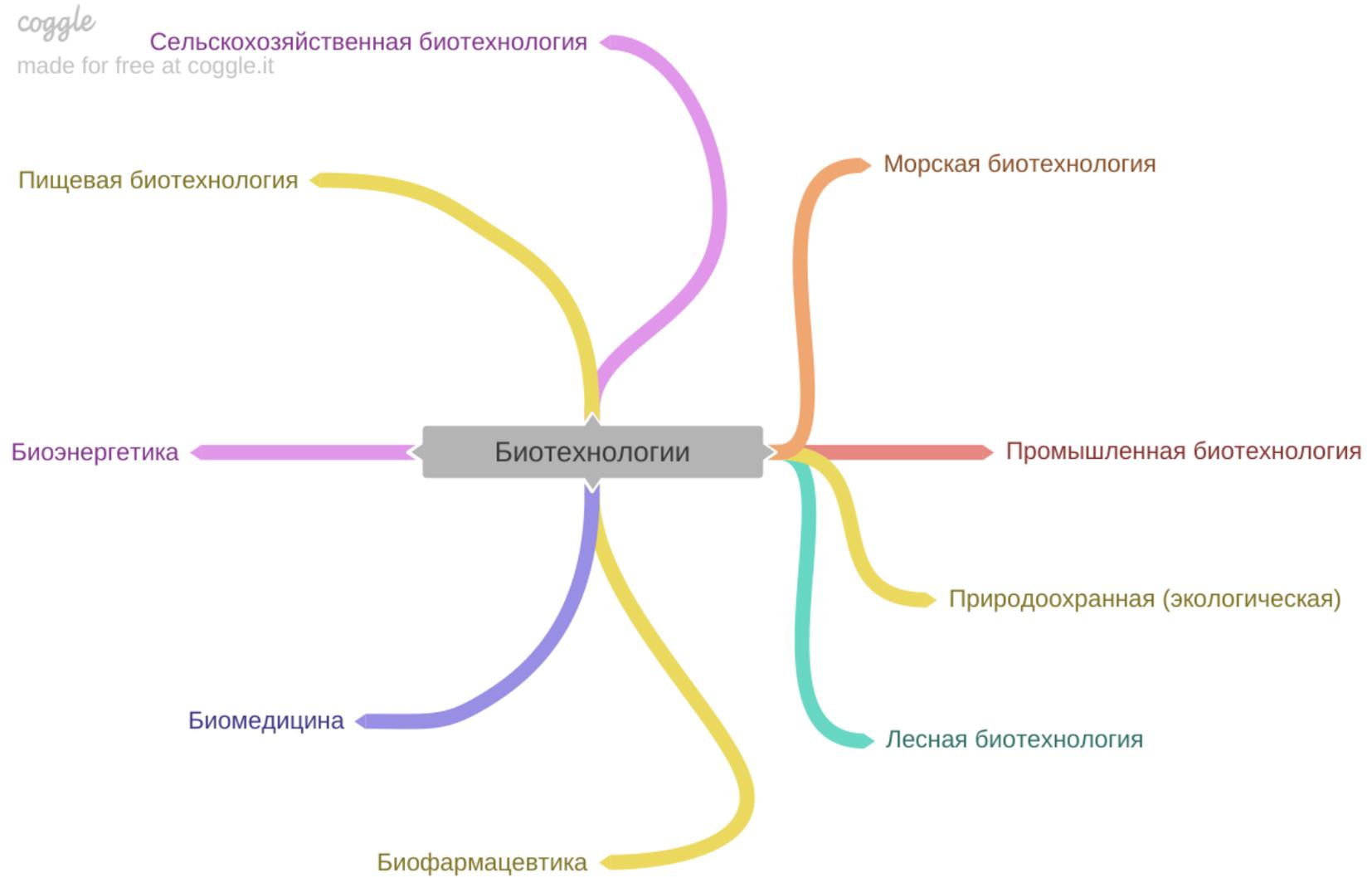


Источник: NordNordWest. self-made, using GTOPO-30 Elevation Data by USGS ([https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Karte\\_Mesopotamien.png?uselang=ru](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Karte_Mesopotamien.png?uselang=ru))

## Приложение Б



## Приложение В

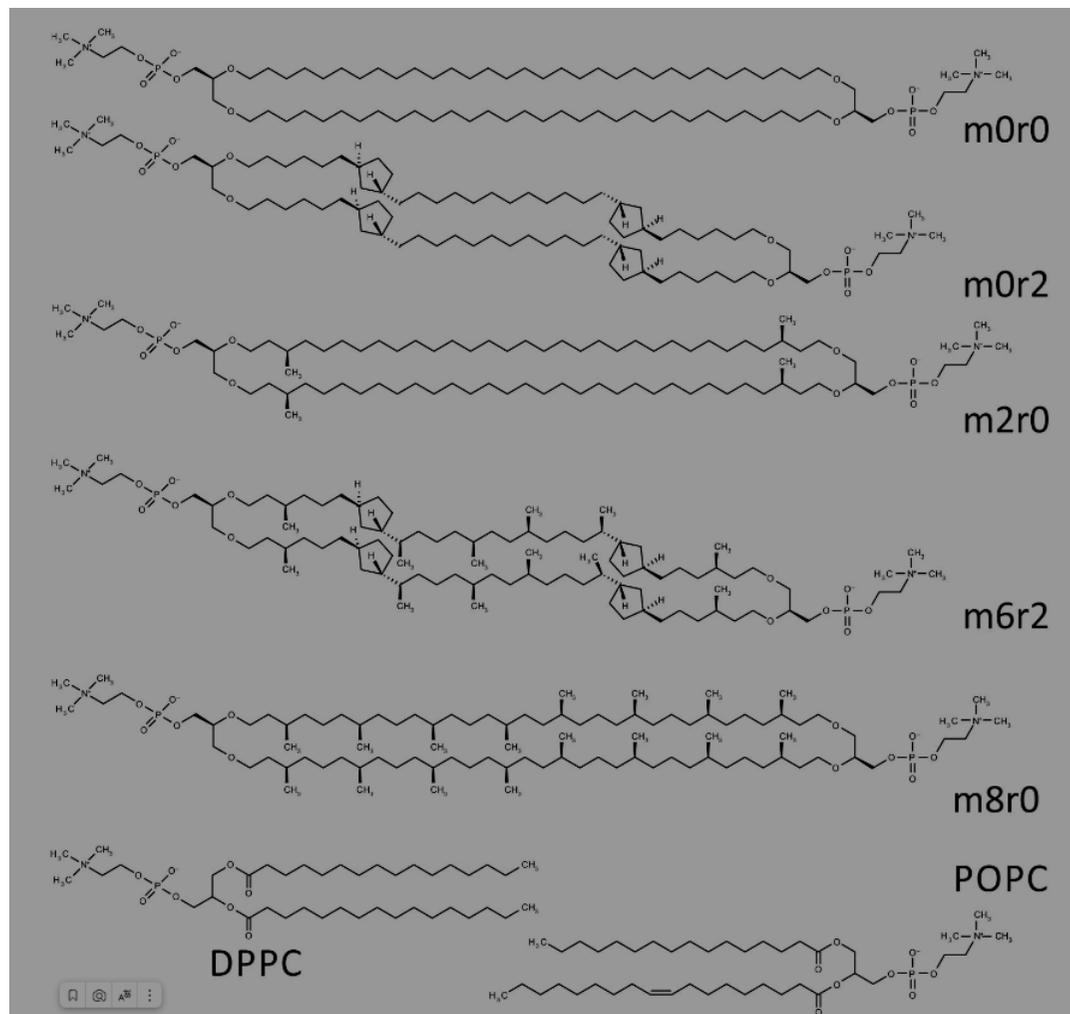


## Приложение Г

### История развития биотехнологии

Дата	Событие
1919	
1943	
1944	
1953	
1961	
1961 – 1966	
1970	
1972	
1973	
1975	
1976	
1976	
1978	
1982	
1983	
1988	
1990	
1990	
1994 – 1995	
1996	

## Приложение Д



Химические структуры молекул липидов. Пять верхних молекул являются имитаторами (миметиками) архейных болалипидов. Структура «ядра», представленная молекулой m0r0, состоит из двух прямых O-связанных алкильных цепи C32, соединенных с молекулой глицерина архейного типа эфирными связями. Во всех случаях гидрофильными головками являются фосфатидилхолины. Другие миметики (m0r2, m2r0, m6r2 и m8r0) имеют разное количество разветвляющихся модификаций гидрофобного ядра: метильные группы (обозначаются как «m» в миметических кодах) и циклопентановые кольца (обозначаются как «r»). Нижний ряд содержит фосфатидилхолины, которые были выбраны для сравнения.

## Приложение Е

Схематическое распределение основных продуктов биотехнологии (*курсивом приведен пример*)

Биотехнологический процесс (Технология)	Отрасль				
	Здравоохранение	Производство продуктов питания	Сельское хозяйство	Энергетика	Химическая промышленность
<i>Сбраживание</i>	<i>Витамины...</i>	<i>Ферменты...</i>	<i>Биопестициды...</i>	<i>Этанол...</i>	<i>Ацетон...</i>
...					

## Приложение Ж

*Пассивный транспорт* включает простую и облегченную диффузию – процессы, которые не требуют затраты энергии, по градиенту концентрации (из области высокой концентрации в область низкой концентрации). Механизмом *простой диффузии* осуществляется перенос мелких молекул через билипидный слой (например, O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub>, небольшие жирорастворимые молекулы); этот процесс малоспецифичен и протекает со скоростью, пропорциональной градиенту концентрации транспортируемых молекул по обеим сторонам мембраны. *Облегченная диффузия* осуществляется через каналы и (или) белки-переносчики, которые обладают специфичностью в отношении транспортируемых молекул. Эти каналы состоят из *собственно транспортной системы* и *воротного механизма*.

*Активный транспорт* является энергозатратным процессом, благодаря которому перенос молекул осуществляется с помощью *белков-переносчиков* против электрохимического градиента (из области низкой концентрации в область высокой концентрации). Примером механизма, обеспечивающего противоположно направленный активный транспорт ионов, служит натриево-калиевый насос (представленный белком-переносчиком Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-АТФазой), благодаря которому ионы Na<sup>+</sup> выводятся из цитоплазмы, а ионы K<sup>+</sup> одновременно переносятся в нее.

*Везикулярный активный транспорт* с помощью мембранных пузырьков – везикул. Используется для переноса крупных частиц с затратой энергии. Клетка поглощает различные субстанции путем *фагоцитоза* (то есть захвата относительно крупных твердых частиц), *пиноцитоза* (поглощения жидкости с растворенными в ней веществами) либо *эндоцитоза* (впячивания клеточной мембраны вместе со связавшимся с рецептором лигандом). В литературе фагоцитоз и пиноцитоз рассматривают как виды эндоцитоза и определяют его как процесс перемещения частиц в клетку, в противовес *эндоцитозу экзоцитоз* – процесс выведения веществ из клетки. В последнее время ученые открывают все новые способы взаимодействия живых клеток с окружающей средой и друг с другом: экзосомы, нанотрубочки, а также трогоцитоз. Но вернемся к уже знакомым для нас эндоцитозу и экзоцитозу.

*Эндоцитоз*. Транспорт макромолекул в клетку осуществляется с помощью механизма *эндоцитоза* (от греч. *endo* – внутрь и *cytos* – клетка). Материал, находящийся во внеклеточном пространстве, захватывается в области впячивания (инвагинации) плазмолеммы, края которого смыкаются с формированием *эндоцитозного пузырька* или *эндосомы* – мелкого сферического образования, герметически окруженного мембраной. Далее содержимое эндосомы подвергается внутриклеточной переработке.

*Рецепторно-опосредованный эндоцитоз*. Эффективность эндоцитоза существенно увеличивается, если он опосредован мембранными рецепторами, которые связываются с молекулами поглощаемого вещества или молекулами, находящимися на поверхности фагоцитируемого объекта – *лигандами* (от лат. *ligare* – связывать). В дальнейшем (после поглощения вещества) комплекс рецептор-лиганд расщепляется, и рецепторы могут вновь возвратиться в плазмолемму.

*Окаймленные пузырьки и ямки*. Рецепторы макромолекул в плазмолемме, перемещаясь латерально по клеточной поверхности, могут, связывая свои лиганды, накапливаться в области формирующихся *эндоцитозных ямок*. Очень часто вокруг таких ямок и образующихся из них пузырьков со стороны цитоплазмы собирается сетевидная оболочка из белка *клатрина*, которая на срезах имеет вид щетинистой каемки. В покрытых клатриновой оболочкой (*окаймленных*) ямках рецепторные белки мембраны вытесняют все остальные; таким образом ямки действуют как приспособления для накопления и сортировки молекул.

*Экзоцитоз* (от греч. *exo* – наружу и *cytos* – клетка) – процесс, обратный эндоцитозу, при котором мембранные *экзоцитозные пузырьки* приближаются к плазмолемме и сливаются с ней своей мембраной, которая встраивается в плазмолемму. При этом содержимое пузырьков (продукты собственного синтеза клетки или транспортируемые ею молекулы, непереваренные и вредные вещества и др.) выделяется во внеклеточное пространство.

**Трансцитоз** (от лат. *trans* – сквозь, через и греч. *cytos* – клетка) процесс, характерный для некоторых типов клеток, *объединяющий признаки эндоцитоза и экзоцитоза*. На одной поверхности клетки формируется *эндоцитозный пузырек*, который переносится к противоположной поверхности клетки и, становясь *экзоцитозным пузырьком*, выделяет свое содержимое во внеклеточное пространство.

**Пиноцитоз** (от греч. *pinein* – пить и *cytos* – клетка) – захват и поглощение клеткой жидкости и (или) растворимых веществ; подразделяется на *макропиноцитоз* (диаметр эндосом 0,2-0,3 мкм) и *микропиноцитоз* (диаметр эндосом 70-100 нм).

**Фагоцитоз** (от греч. *phagein* – поедать и *cytos* – клетка) – захват и поглощение клеткой плотных, обычно крупных (размером более 1 мкм) частиц; обычно сопровождается образованием выпячиваний цитоплазмы – *псевдоподий*, охватывающих объект фагоцитоза и смыкающихся над ним. Фагоцитоз характерен только для клеток животных.

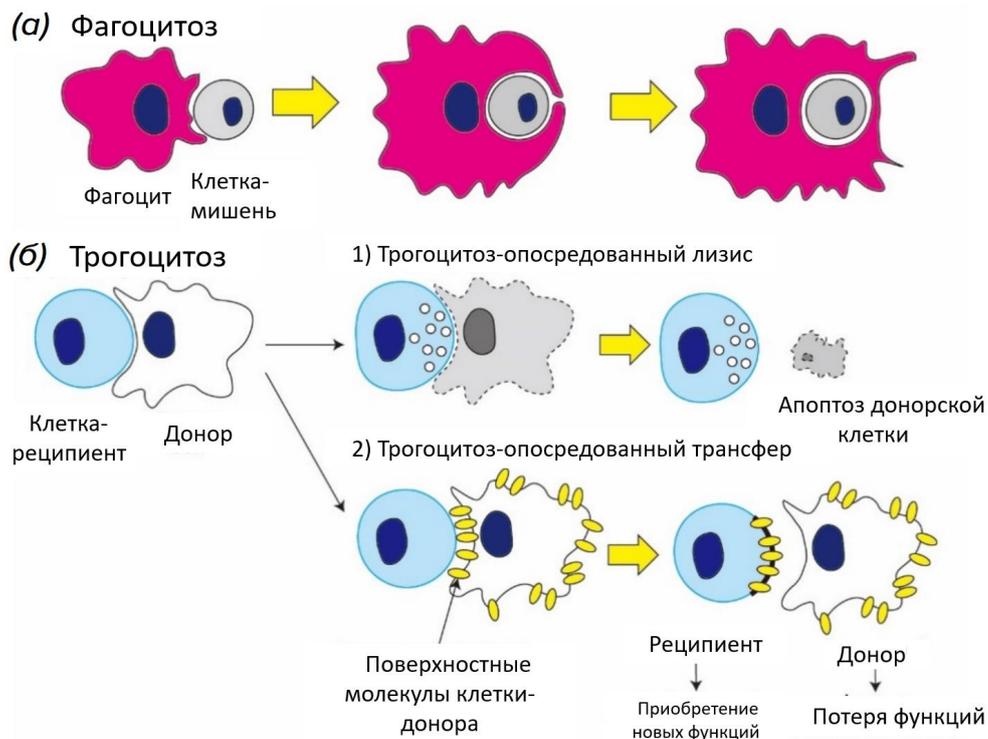
**Трогоцитоз** – в переводе с греческого *τρογω* (*trogo-*) – «грызть». Трогоцитоз описывает процесс, когда одна клетка буквально откусывает кусочек другой, живой клетки. Этот феномен помогли обнаружить маленькие одноклеточные существа. В 1971 году микробиолог Ц. Г. Кульбертсон, изучавший поведение свободноживущих патогенных амёб под микроскопом, описал, как они расправлялись с эритроцитами, «словно отщипывая кусочек за кусочком, пока в конце концов это не приводило к гемолизу красных кровяных телец». Спустя несколько лет его коллега Т. Браун наблюдал похожую картину на примере *Naegleria fowleri*, известной как «амёбы, пожирающей мозг», которая порционно поглощала клетки мышиноного эмбриона с помощью похожих на клешни псевдоподий (рис. 7). Именно он впервые употребил термин «трогоцитоз» в качестве противопоставления фагоцитозу, когда клетка поглощает какую-то довольно крупную частицу целиком.



Трофозоит (Т) *N. fowleri* «откусывает» фрагмент цитоплазмы мышиноного эмбриона (МЕ). В углу более крупным планом показаны верхушки псевдоподий, а стрелочки указывают на структуры, похожие на микрофиламенты, что свидетельствует об активной роли в данном процессе цитоскелета, давая клетке механическую силу для трогоцитоза<sup>22</sup>

<sup>22</sup> <https://biomolecula.ru/articles/trogotsitoz-zachem-kletki-delaiut-kus#source-1>

*Трогоцитоз* характеризуется как активный процесс, а не пассивный со стороны клетки; достаточно оперативный (всего несколько минут), а также предполагает физическое межклеточное взаимодействие, и, наконец, происходит между двумя живыми (по крайней мере, изначально) клетками, что отличает трогоцитоз от фагоцитоза апоптотических телец. Содержимое же откусанного может варьировать: в зависимости от типа взаимодействующих клеток, это могут быть разные поверхностные молекулы, чаще всего с фрагментом окружающей их клеточной мембраны, а иногда и с примесью цитоплазмы (рис. 8).



Различия между фагоцитозом (а) и трогоцитозом (б). Трогоцитоз – опосредованный лизис означает, что в результате данного процесса клетка, подвергаемая трогоцитозу, уходит в апоптоз, то есть погибает. Трогоцитоз можно рассматривать как трансфер, характерен для общения между иммунными клетками и подразумевает перенос трансмембранных белков от одной клетке (донор) к другой (реципиент)

### Приложение 3

Таблица – Зависимость биомассы  $X$ , единицы оптической плотности ( $ОП$ ) от времени культивирования ( $T$ ) на углеродном субстрате

Номер варианта	Культура	Субстрат	Время культивирования, ч											
			0	2	4	6	10	20	30	40	50	60	70	80
1	<i>Candida utilis</i>	Глюкоза	0,10	0,10	0,11	0,12	0,20	0,30	0,55	0,60	0,62	0,63	0,64	0,64
2	<i>Rhococcus sp.</i>	Фенол	0,05	0,05	0,07	0,08	0,09	0,13	0,20	0,25	0,32	0,34	0,34	0,33
3	<i>Pseudomonas sp.</i>	Метанол	0,07	0,07	0,08	0,10	0,12	0,17	0,22	0,33	0,40	0,43	0,43	0,42
4	<i>Saccharomyces sp.</i>	Сахароза	0,10	0,10	0,11	0,12	0,13	0,18	0,25	0,31	0,38	0,44	0,47	0,48
5	<i>Methylococcus sp.</i>	Пропионат	0,05	0,05	0,05	0,05	0,06	0,08	0,11	0,20	0,30	0,38	0,44	0,44
6	<i>Cryptococcus sp.</i>	Маннит	0,05	0,05	0,06	0,07	0,09	0,15	0,19	0,28	0,35	0,36	0,36	0,36
7	<i>Rhodopseudomonas capsulata</i>	Ацетат	0,05	0,05	0,07	0,08	0,12	0,19	0,24	0,38	0,48	0,49	0,49	0,49
8	<i>Bacillus turing.</i>	Глюкоза	0,05	0,05	0,06	0,10	0,20	0,40	0,63	0,80	0,86	0,88	0,88	0,88
9	<i>Candida scotti</i>	Мальтоза	0,07	0,07	0,08	0,11	0,15	0,29	0,51	0,78	0,88	0,90	0,90	0,90
10	<i>Mycobacterium sp.</i>	Каприловая кислота	0,06	0,06	0,06	0,07	0,09	0,14	0,18	0,25	0,30	0,33	0,33	0,33

## Приложение И

Таблица – Выход биомассы, начальная концентрация субстрата в среде и остаточные концентрации в культуральной жидкости

Но- мер вари- анта.	Культура	Субстрат	Биомасса, ед. ОП (X)	Начальная концентрация субстрата в среде, мг/л (S)	Остаточная концентрация субстрата в культуральной жидкости, мг/л (So)
1	<i>Candida utilis</i>	Глюкоза	500	1000	100
2	<i>Rhodococcus</i> sp.	Фенол	200	500	50
3	<i>Pseudomonas</i> sp.	Метанол	100	250	20
4	<i>Saccharomyces</i> sp.	Сахароза	500	2000	1000
5	<i>Methylococcus</i> sp.	Пропионат	300	2000	900
6	<i>Cryptococcus</i> sp.	Маннит	550	1000	150
7	<i>Rhodopseudomonas capsulata.</i>	Ацетат	480	2000	800
8	<i>Bacillus turingiensis</i>	Глюкоза	540	1000	80
9	<i>Candida scotti</i>	Мальтоза	400	1000	100
10	<i>Mycobacterium</i> sp.	Каприловая к-та	200	1000	500

### Приложение К

(S) Таблица – Зависимость удельной скорости роста культур ( $\mu$ ) от концентрации субстрат

Но- мер вари- анта	Культура	Субстрат	Параметры							
			Смг/л	20	40	80	120	160	200	300
1	Candida utilis	Глюкоза	Смг/л	20	40	80	120	160	200	300
			$\mu$ ч <sup>-1</sup>	0,2	0,25	0,4	0,42	0,46	0,47	0,47
2	Rhodococcus sp.	Фенол	Смг/л	100	140	160	240	600	800	1000
			$\mu$ ч <sup>-1</sup>	0,03	0,05	0,15	0,18	0,20	0,20	0,2
3	Pseudomonas sp.	Метанол	Смг/л	10	20	30	40	50	60	80
			$\mu$ ч <sup>-1</sup>	0,5	0,65	0,75	0,8	0,82	0,85	0,9
4	Saccharomy- ces sp.	Сахароза	Смг/л	50	100	150	200	300	400	500
			$\mu$ ч <sup>-1</sup>	0,06	0,10	0,12	0,13	0,16	0,18	0,2
5	Methylococ- cus sp.	Пропио- нат	Смг/л	50	100	150	200	300	400	500
			$\mu$ ч <sup>-1</sup>	0,04	0,08	0,12	0,15	0,18	0,21	0,24
6	Cryptococcus sp.	Маннит	Смг/л	20	40	60	80	100	120	140
			$\mu$ ч <sup>-1</sup>	0,03	0,06	0,15	0,18	0,2	0,21	0,21
7	Rhodopseudo- monas caps.	Ацетат	Смг/л	10	20	30	40	50	60	70
			$\mu$ ч <sup>-1</sup>	0,01	0,02	0,05	0,08	0,1	0,12	0,13
8	Bacillus tur.	Глюкоза	Смг/л	20	40	60	80	100	120	140
			$\mu$ ч <sup>-1</sup>	0,01	0,02	0,04	0,06	0,08	0,12	0,13
9	Candida scotti	Мальтоза	Смг/л	50	100	150	200	300	400	500
			$\mu$ ч <sup>-1</sup>	0,01	0,02	0,03	0,05	0,08	0,12	0,13
10	Mycobacteri- um sp.	Каприло- вая к-та	Смг/л	10	20	30	40	50	60	80
			$\mu$ ч <sup>-1</sup>	0,02	0,04	0,1	0,15	0,18	0,2	0,21

*Учебное издание*

Каменская Елена Петровна,  
Вистовская Виктория Петровна

Учебное пособие по дисциплине «Основы биотехнологии»  
для студентов направления 19.03.02 «Продукты питания из растительного сырья»  
и 19.03.01 «Биотехнология» всех форм обучения

Учебное пособие

Издано в авторской редакции

Федеральное государственное бюджетное образовательное  
учреждение высшего образования «Алтайский государственный  
технический университет им. И.И. Ползунова»,  
656038, г. Барнаул, пр-т Ленина, 46

[В начало](#)