

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Алтайский государственный технический университет им. И. И. Ползунова»

Г. С. Волкова, Д. В. Минаков, А. А. Минакова, Е. Ю. Егорова

ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И ПОЛУЧЕНИЯ МЕТАБОЛИТОВ ИЗ МИКРООРГАНИЗМОВ И ВЫСШИХ ГРИБОВ

Учебно-методическое пособие

*для магистров направления подготовки 19.04.01 «Биотехнология»
и аспирантов специальности 4.3.5. Биотехнология продуктов питания
и биологически активных веществ очной формы обучения*

ISBN 978-5-7568-1522-1



АлтГТУ
Барнаул • 2025

© Волкова Г.С., Минаков Д.В., Минакова А.А.,
Егорова Е.Ю., 2025

© Алтайский государственный технический
университет им. И. И. Ползунова, 2025

Об издании – 1, 2

УДК 606:579.6
ББК 28.5

Волкова, Г. С.

Основы биотехнологии культивирования и получения метаболитов из микроорганизмов и высших грибов: учебно-методическое пособие для магистров направления подготовки 19.04.01 «Биотехнология» и аспирантов специальности 4.3.5. Биотехнология продуктов питания и биологически активных веществ очной формы обучения / Г. С. Волкова, Д. В. Минаков, А. А. Минакова, Е. Ю. Егорова; Алт. гос. техн. ун-т. им. И.И. Ползунова – Барнаул: АлтГТУ, 2025. – 93 с. – URL: http://elibrary.altstu.ru/uploads/open_mat/2025/VolkMinMinEg_OBKIPMiMiVG_up.pdf. – Текст электронный.

ISBN 978-5-7568-1522-1

Авторы:

д-р техн. наук, заведующий отделом биотехнологии ферментов, дрожжей, органических кислот и биологически активных добавок Всероссийского научно-исследовательского института пищевой биотехнологии – филиала ФГБУН «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи» **Волкова Г. С.**

д-р техн. наук, доцент кафедры органической химии ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет» **Минаков Д. В.**

канд. хим. наук, доцент кафедры органической химии ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет» **Минакова А. А.**

д-р техн. наук, доцент, заведующий кафедрой «Технология хранения и переработки зерна» ФГБОУ ВО «Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова» **Егорова Е. Ю.**

Рецензенты:

Тихонов С. Л., д-р техн. наук., профессор, заведующий кафедрой «Высшая школа биотехнологий» ФГБОУ ВО «Уральский государственный лесотехнический университет»;

Маркин В.И., канд. хим. наук, доцент кафедры «Органическая химия» ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет».

Пособие рекомендовано для студентов технических специальностей при изучении дисциплин «Промышленная биотехнология», «Основы биотехнологии», «Основные вопросы пищевой биотехнологии», «Методы обработки растительного сырья», «Методы получения биологически активных веществ и фармацевтических субстанций», «Химия биологически активных веществ», может быть использовано в качестве основной литературы при выполнении экспериментальной части выпускных квалификационных работ (выписка из протокола заседания кафедры органической химии АлтГУ №7 от 13.05.2025).

Издано в авторской редакции.

Учебно-методическое 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 23.06.2025 Объем издания – 1,3 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 978-5-7568-1522-1

[Вперед \(к оглавлению\)](#)

© Волкова Г.С., Минаков Д.В., Минакова А.А., Егорова Е.Ю., 2025

© Алтайский государственный технический университет имени И.И. Ползунова, 2025

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
1 ШТАММЫ-ПРОДУЦЕНТЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ.....	5
1.1 Микроорганизмы и их значение в пищевой биотехнологии.....	5
1.2 Характеристики штамма-продуцента. Особенности сырья для культивирования микроорганизмов	9
2 ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ СПОСОБОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ, ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ ЦЕЛЕВЫХ ПРОДУКТОВ МЕТАБОЛИЗМА	25
2.1 Способы культивирования микроорганизмов, кинетика роста микроорганизмов, регулирование и оптимизация процессов культивирования	25
2.2 Непрерывный способ культивирования микроорганизмов.....	33
2.3 Способы выделения, очистки и концентрирования целевых продуктов микробного синтеза.....	34
3 НАПРАВЛЕННЫЙ МИКРОБНЫЙ СИНТЕЗ АМИНОКИСЛОТ, ФЕРМЕНТОВ, СПИРТА, ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ И ВИТАМИНОВ.....	44
3.1 Принципы биотехнологического производства веществ-метаболитов	44
3.2 Основы направленного микробного синтеза продуктов биотехнологического производства	48
4 КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИЦЕЛИЯ И ПЛОДОВЫХ ТЕЛ ВЫСШИХ БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ.....	55
4.1 ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ	55
4.2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ: МЕТОДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ВЫСШИХ ГРИБОВ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ.....	60
5 ФЕРМЕНТЫ ДЛЯ МОЛОКА ИЗ ВЫСШИХ ГРИБОВ	70
5.1 ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ.....	70
5.2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ: БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ВЫДЕЛЕНИЮ ФЕРМЕНТОВ И АНАЛИЗУ ИХ АКТИВНОСТИ.....	71
6 ХИТИН ИЗ ВЫСШИХ ГРИБОВ	77
6.1 ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ	77
6.2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ: ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ПОЛУЧЕНИЮ ХИТИНА, ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ И КОМПЛЕКСНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ	80
7 ПРАВИЛА ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ В ЛАБОРАТОРИИ БИОТЕХНОЛОГИИ.....	86
8 РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА	88
9 ТРЕБОВАНИЯ К СТРУКТУРЕ И ОФОРМЛЕНИЮ ОТЧЁТОВ ПО ЛАБОРАТОРНЫМ РАБОТАМ	91
ПРИЛОЖЕНИЕ А Титульный лист отчета по лабораторным работам	92

ВВЕДЕНИЕ

Учебно-методическое пособие включает в себя рекомендации и указания для выполнения лабораторных и практических работ по дисциплинам «Промышленная биотехнология», «Основы биотехнологии», «Основные вопросы пищевой биотехнологии», «Методы обработки растительного сырья», «Методы получения биологически активных веществ и фармацевтических субстанций», «Химия биологически активных веществ». Знание дисциплин необходимо как для освоения других дисциплин программы, так и для выполнения выпускной квалификационной работы магистра и аспиранта.

Перед работой студентам необходимо ознакомиться с правилами безопасности при работе в лаборатории биотехнологии и сдать коллоквиум, чтобы продемонстрировать свои знания в этой области.

Для подготовки к занятиям студентам следует изучить соответствующие разделы учебной литературы и подготовить «заготовку» отчета. Для этого в рабочем журнале студенты записывают краткое содержание работы, которую они собираются выполнить. После собеседования и получения разрешения от преподавателя студенты приступают к выполнению эксперимента.

Работы могут выполняться индивидуально или в парах, но каждый студент ведет свой собственный рабочий журнал, где фиксирует наблюдения и результаты эксперимента.

Отчет по работе должен быть представлен преподавателю вовремя – не позднее трех выполненных работ. Это позволяет преподавателю оценить работу студентов и обратить внимание на трудности, которые могут возникнуть в процессе выполнения практических заданий.

При освоении курсов дисциплин необходимо знать:

- штаммы-продуценты микробиологической продукции; особенности сырья для культивирования микроорганизмов; направленное изменение свойств промышленных штаммов микроорганизмов на основе методов клеточной и генной инженерии;
- теоретические основы способов культивирования, выделения и очистки целевых продуктов метаболизма;
- направленный микробный синтез аминокислот, ферментов, спирта, органических кислот и витаминов;
- технологии культивирования мицелия и плодовых тел высших грибов (поверхностное, глубинное, твердофазное);
- методы определения биологически активных веществ в грибном сырье (белки, полисахариды, каротиноиды, β -глюканы);
- технологии выделения, очистки и концентрирования ферментов для молока из высших грибов;
- методы получения, модификации и исследования физико-химических свойств хитин-глюкановых комплексов из высших грибов.

1 ШТАММЫ-ПРОДУЦЕНТЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ

Микробиологическая промышленность сегодня является частью быстро развивающейся биотехнологии, в ее основе лежит получение ценных веществ методом микробиологического синтеза. Темпы роста микробиологической промышленности обгоняют средние темпы роста других отраслей, что определяется как ростом производства традиционных продуктов, таких как аминокислоты, ферменты, так и развитием новых областей – биотоплива, химикатов, биоразлагаемых пластиков.

1.1 Микроорганизмы и их значение в пищевой биотехнологии

В настоящее время известно более 100 тысяч различных видов микроорганизмов. При столь большом разнообразии микроорганизмов весьма важной, а зачастую и сложной проблемой является правильный выбор именно того организма, который способен обеспечить получение требуемого продукта, т.е. служить промышленным целям.

Во многих биотехнологических процессах используется ограниченное число микроорганизмов, которые классифицируются как GRAS («generally recognized as safe» обычно считаются безопасными). К таким микроорганизмам относят бактерии *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, другие виды бацилл и лактобацилл, виды *Streptomyces*. Сюда также относят виды грибов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus*, дрожжей *Saccharomyces* и др.

GRAS-микроорганизмы непатогенные, нетоксичные и в основном не образуют антибиотики, поэтому при разработке нового биотехнологического процесса следует ориентироваться на данные микроорганизмы, как базовые объекты биотехнологии.

Микробиологическая промышленность в настоящее время использует тысячи штаммов микроорганизмов, которые первично были выделены из природных источников на основании их полезных свойств, а затем улучшены с помощью различных методов. В связи с расширением производства и ассортимента выпускаемой продукции в микробиологическую промышленность вовлекаются все новые и новые представители мира микробов. Следует отметить, что в обозримом будущем ни один из них не будет изучен в той же степени, как *E. coli* и *Bac. subtilis*. Причина этого – колоссальная трудоемкость и высокая стоимость подобного рода исследований.

Следовательно, возникает проблема разработки стратегии и тактики исследований, которые обусловили бы с разумной затратой труда извлечь из потенциала новых микроорганизмов все наиболее ценное при создании промышленно важных штаммов-продуцентов, пригодных к использованию в биотехнологических процессах.

Классический подход заключается в выделении нужного микроорганизма из природных условий. Из естественных мест обитания предполагаемого продуцента отбирают образцы материала (берут пробы материала) и производят посев в селективную среду, обеспечивающую преимущественное развитие интересующего микроорганизма, т.е. получают так называемые накопительные культуры.

Следующим этапом является выделение чистой культуры с дальнейшим изучением изолированного микроорганизма и, в случае необходимости, ориентировочным определением его продукционной способности.

Существует и другой путь подбора микроорганизмов-продуцентов — это выбор нужного вида из имеющихся коллекций хорошо изученных и досконально охарактеризованных микроорганизмов. При этом, естественно, устраняется необходимость выполнения ряда трудоемких операций.

Основные термины:

Клон – культура, полученная из одной клетки,

Чистая культура - совокупность особей одного вида микроорганизмов,

Штаммы - культуры, выделенные из различных природных сред или из одной среды в разное время

Главным критерием при выборе штамма является способность синтезировать целевой продукт. В общих словах микроорганизмы должны обладать высокой скоростью роста, утилизировать необходимые для их жизнедеятельности дешевые субстраты, быть резидентными к посторонней микрофлоре, т. е, обладать высокой конкурентоспособностью. Все вышеперечисленное обеспечивает значительное снижение затрат на производство целевого продукта.

В пищевой биотехнологии микроорганизмы используются в большом количестве отраслей промышленности: хлебопечение, сыроварение, пивоварение, виноделие, производство уксусной кислоты, аминокислот, витаминов, ферментов.

Наряду с полезными свойствами микроорганизмы могут оказывать отрицательное воздействие на пищевые продукты. Многие микрококки являются возбудителями порчи пищевых продуктов, некоторые стафилококки, развиваясь в пищевых продуктах, вырабатывают ядовитые вещества (токсины) и вызывают пищевые отравления. Палочки являются возбудителями порчи пищевых продуктов (например, гнилостные, маслянокислые бактерии). Имеется много возбудителей инфекционных болезней (сибирской язвы, столбняка) и пищевого отравления — ботулизма.

Молочнокислые бактерии являются вредителями в процессах бродильных производств. используются в производстве кисломолочных продуктов, в сыроделии, квашении овощей, в хлебопечении. встречаются на пищевых продуктах, могут вызвать их порчу, при которой продукты приобретают отчетливый землистый запах. имеются и патогенные виды (туберкулезная и дифтерийная палочки).

Актиномицеты являются основными продуцентами антибиотиков, получаемых в промышленных масштабах, а также витаминов группы В. в пищевых производствах наибольшее значение имеет многочисленная кишечная группа бактерий — энтеробактерии. некоторые из них постоянно населяют кишечник человека и животных (например, кишечная палочка), другие являются возбудителями инфекционных желудочно-кишечных заболеваний (дизентерии, брюшного тифа, паратифов), передающихся через пищевые продукты, а также возбудителями пищевых отравлений.

Некоторые примеры, доказывающие важную роль микроорганизмов как объектов биотехнологии:

1. Одноклеточные организмы, как правило, характеризуются более высокими скоростями роста и синтетических процессов, чем высшие организмы. Тем не менее, это присуще не всем микроорганизмам. Некоторые из них растут крайне медленно, однако представляют известный интерес, поскольку способны продуцировать различные очень ценные вещества.

2. Особое внимание как объекты биотехнологических разработок представляют фотосинтезирующие микроорганизмы, использующие в своей жизнедеятельности энергию солнечного света. Часть из них (цианобактерии и фотосинтезирующие эукариоты) в качестве источника углерода утилизируют CO_2 , а некоторые представители цианобактерий, ко всему сказанному, обладают способностью усваивать атмосферный азот (т.е. являются крайне неприхотливыми к питательным веществам). Фотосинтезирующие микроорганизмы перспективны как продуценты аммиака, водорода, белка и ряда органических соединений. Однако прогресса в их использовании вследствие ограниченности фундаментальных знаний об их генетической организации и молекулярно-биологических механизмах жизнедеятельности, по всей видимости, не следует ожидать в ближайшем будущем.

3. Определенное внимание уделяется таким объектам биотехнологии, как термофильные микроорганизмы, растущие при 60-80 °С. Это их свойство является практически непреодолимым препятствием для развития посторонней микрофлоры при относительно не стерильном культивировании, т.е. является надежной защитой от загрязнений. Среди термофилов обнаружены продуценты спиртов, аминокислот, ферментов, молекулярного водорода. Кроме того, скорость их роста и метаболическая активность в 1,5-2 раза выше, чем у мезофилов. Ферменты, синтезируемые термофилами, характеризуются повышенной устойчивостью к нагреванию, некоторым окислителям, детергентам, органическим растворителям и другим неблагоприятным факторам.

В настоящее время существуют следующие основные типы биопродуктов, получаемые методами микробной биотехнологии:

- биомассы (например, белок одноклеточных микроорганизмов);
- клеточные компоненты (ферменты, нуклеиновые кислоты и т.д.);
- первичные метаболиты (химические продукты метаболической активности, такие как этанол, молочная кислота);
- вторичные метаболиты (низкомолекулярные биологически активные вещества);
- продукты односубстратных конверсий (фруктоза, полученная из глюкозы);
- продукты многосубстратных конверсий (обработка сточных вод, утилизация лигноцеллюлозных отходов, выхлопных газов, нефтепродуктов).

Микроорганизмов, синтезирующих продукты или осуществляющих полезные для человека реакции, насчитывается несколько сотен видов. Микроорганизмы, широко используемые в промышленности и в производстве пищевых продуктов приведены в таблице 1.1.

Таблица 1.1. Микроорганизмы, используемые в промышленности для получения целевых продуктов

Организм	Тип	Продукт
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Дрожжи	Пекарские дрожжи, вино, эль, саке
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Бактерии	Йогурт, ряженка
<i>Propionibacterium shermanii</i>	Бактерии	Швейцарский сыр
<i>Gluconobacterium suboxidans</i>	Бактерии	Уксус
<i>Penicillium roquefortii</i>	Плесень	Сыры типа рокфора
<i>Aspergillus oryzae</i>	Плесень	Саке
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Дрожжи	Этанол
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Бактерии	Ацетон
<i>Xanthomonas campestris</i>	Бактерии	Полисахариды
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Бактерии	L-Лизин
<i>Candida utilis</i>	Дрожжи	Микробный белок
<i>Propionibacterium shermanii</i>	Бактерии	Витамин В ₁₂
<i>Aspergillus oryzae</i>	Плесень	Амилаза
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Дрожжи	Лактаза
<i>Saccharomycopsis lipolytica</i>	Дрожжи	Липаза
<i>Bacillus</i>	Бактерии	Протеазы
<i>Endothia parasitica</i>	Плесень	Сычужный фермент
<i>Leocanostoc mesenteroides</i>	Бактерии	Декстран
<i>Xanthomonas campestris</i>	Бактерии	Ксантан
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Плесень	Пенициллины
<i>Chehalosporium acremonium</i>	Плесень	Цефалоспорины
<i>Rhizopus nigricans</i>	Плесень	Трансформация стероидов
<i>E. coli</i> (рекомбинантные штаммы)	Бактерии	Инсулин, гормон роста, интерферон
<i>Blakeslea trispora</i>	Плесень	β-Каротин
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Бактерии	Биоинсектициды
<i>Bacillus popilliae</i>	Бактерии	Биоинсектициды

Процедура патентования штамма микроорганизма

Согласно патентному законодательству РФ штаммы микроорганизмов можно запатентовать только в качестве изобретений.

Основным отличием от процедуры патентования штамма является то, что, перед подачей заявки для защиты штамма микроорганизма, штамм требуется

предварительно задепонировать в одной из коллекций промышленных микроорганизмов. Исключением являются штаммы, полученные с помощью генноинженерных методик, т.е. рекомбинантные штаммы. При этом необходимо учитывать, что депозитором обязательно должно быть то же лицо, которое будет выступать в качестве заявителя на получение патента.

Анализ патентоспособности штамма всегда начинается с оценки промышленной применимости, то есть с анализа возможности осуществления изобретения по описанию объекта в материалах заявки. Применительно к объекту «штамм микроорганизма» этот анализ начинается с оценки возможности его принципиального получения, гарантированного неоднократного воспроизведения, а также возможности сохранения жизнеспособности заявленного штамма в течение срока действия патента и реализации заявленного назначения или проявления определенных свойств, обуславливающих технический результат изобретения. Считается, что если способ или средства для получения штамма микроорганизма недостаточно описаны в заявке, то в этом случае для реализации изобретения необходимо его депонирование.

Депонирование штамма микроорганизма – это передача его образца в коллекцию с целью регистрации, хранения, защиты от неправомерного использования, а также выдачи образца в соответствии с установленными правилами. В зависимости от задач, решаемых при депонировании, предусмотрены разные формы депонирования: хранение, гарантийное хранение и депонирование для целей патентной процедуры. Именно последний вид депонирования предусмотрен для случаев, когда планируется подать заявку на патент, и только такой вид депонирования отвечает целям патентования, так как он гарантирует сохранность депозита и др. требования.

При подаче заявки на изобретения, относящиеся к штаммам, способам или средствам на основе новых штаммов, осуществление процедуры депонирования является обязательным с точки зрения осуществимости изобретения.

Таким образом, одним из основных требований к заявкам на штаммы микроорганизмов и приравненные к ним объекты, жизнеспособность которых может быть утрачена по объективным причинам, а воспроизведение не гарантировано, является осуществление депонирования в специализированных коллекциях.

1.2 Характеристики штамма-продуцента. Особенности сырья для культивирования микроорганизмов

Параметры штамма-продуцента микроорганизма решающим образом определяют экономику процесса и саму возможность его промышленной реализации. Штаммы-продуценты часто теперь называют микробными клеточными фабриками (MCF — microbial cell factories).

Традиционные требования к промышленному штамму — это безопасность, стабильность, высокий выход продукта в расчете на единицу субстрата (g продукта на g субстрата), высокая скорость биосинтеза (g продукта/л/час), высокая конечная концентрация (g/l), отсутствие трудно отделимых примесей, способ-

ность к росту на дешевых питательных средах, минимальное образование побочных продуктов.

В связи с этим все микроорганизмы, используемые в промышленности, проходят длительные испытания на безвредность для людей, животных и окружающей среды. Важным свойством продуцента является устойчивость к инфекции, что важно для поддержания стерильности, и фагоустойчивость.

В промышленной биотехнологии применяют 3 вида штаммов микроорганизмов:

- 1) природные штаммы, улучшенные естественным и искусственным отбором (при производстве микробной биомассы);
- 2) штаммы, полученные в результате индуцированного мутагенеза;
- 3) генно-модифицированные (рекомбинантные) штаммы, обладающие самой высокой генетической нестабильностью.

Свойства штаммов-продуцентов определяют экономические параметры производства. Для конструирования штаммов микроорганизмов используются методы рационального дизайна (метаболическая инженерия) и комбинаторные методы мутагенеза и отбора (лабораторная эволюция, адаптивная эволюция, белковый и геномный шафлинг). Часто используется комбинация этих методов.

Все методы создания штаммов можно разделить на две группы. Это рациональный дизайн, часто называемый метаболической инженерией, который подразумевает целенаправленную реорганизацию геномов. Метаболическая инженерия возможна при наличии знаний о метаболических путях биосинтеза нужного вещества, о регуляции этого пути и сопряженных с ним реакций в метаболической сети.

Вторая группа методов, которую можно назвать комбинаторной, основана на введении множественных генетических изменений (мутаций) в геном и отборе из созданного разнообразия нужных вариантов. Метод очень трудоемок, но он не связан с наличием знаний о путях биосинтеза. Анализ отобранных продуктивных штаммов дает новые знания о генах, вовлеченных в сверхсинтез нужного вещества. К комбинаторным методам относятся классическая селекция, направленный мутагенез, часто называемый направленной лабораторной эволюцией, адаптивная лабораторная эволюция, шафлинг генов и геномов, т. е. объединение мутаций методами рекомбинации.

Селекция (от лат. *selectio*-выбор, отбор) – это наука о методах создания новых сортов растений, пород животных, микроорганизмов с новыми свойствами. По Н.И. Вавилову, селекция – это эволюция, направляемая волей человека.

Селекция - направленный отбор мутантов - организмов, наследственность которых претерпела скачкообразное изменение. Генеральный путь селекции - переход от простого отбора продуцентов к сознательному конструированию их геномов. На каждом из этапов из популяции микроорганизмов отбираются наиболее высокоэффективные клоны.

Таким путем за длительное время были отобраны штаммы пивных, винных, пекарских, уксуснокислых дрожжей, пропионовокислых бактерий и др. Ограниченность метода селекции, основанного на спонтанных мутациях, связана с их низкой частотой, что значительно затрудняет интенсификацию процесса. Измене-

ния в структуре ДНК происходят редко. Ген должен удвоиться в среднем 328 раз, чтобы возникла мутация. Примером отбора наиболее продуктивных мутантов при культивировании в непрерывном режиме является отбор дрожжей по признаку устойчивости к этанолу, продукту жизнедеятельности дрожжей. К значительному ускорению селекции ведет индуцированный мутагенез - резкое увеличение частоты мутаций биообъекта при искусственном повреждении генома.

Проводят тотальную проверку (скрининг) полученных клонов. Отобрав наиболее продуктивные клоны, повторяют обработку тем же или другим мутагеном, вновь отбирают наиболее продуктивный вариант и т.д., т.е. речь идет о ступенчатом отборе по интересующему признаку. Трудоемкость - основной недостаток метода индуцированного мутагенеза и последующего ступенчатого отбора. Недостатком метода является также отсутствие сведений о характере мутаций, исследователь проводит отбор по конечному результату.

Многие микроорганизмы продуцируют десятки видов органических веществ — аминокислот, белков, антибиотиков, витаминов, липидов, нуклеиновых кислот, ферментов, пигментов, сахаров и т. п., широко используемых в разных областях промышленности и медицины.

Селекция микроорганизмов (в отличие от селекции растений и животных) имеет ряд особенностей:

1) у селекционера имеется неограниченное количество материала для работы: за считанные дни в чашках Петри или пробирках на питательных средах можно вырастить миллиарды клеток;

2) более эффективное использование мутационного процесса, поскольку геном микроорганизмов гаплоидный, что позволяет выявить любые мутации уже в первом поколении; 3) простота генетической организации бактерий: значительно меньшее количество генов, их генетическая регуляция более простая, взаимодействия генов просты или отсутствуют.

В селекции микроорганизмов обычно **учитываются их естественные способности синтезировать какие-либо полезные для человека соединения** (аминокислоты, витамины, ферменты и др.). В случае использования методов генной инженерии можно заставить бактерии и другие микроорганизмы продуцировать те соединения, синтез которых в естественных природных условиях им никогда не был присущ (например, гормоны человека и животных, биологически активные соединения).

Природные микроорганизмы, как правило, обладают низкой продуктивностью содержащихся в них веществ, которые интересуют селекционера. Для использования же в микробиологической промышленности нужны высокопродуктивные штаммы, которые создаются различными методами селекции, в том числе отбором среди природных микроорганизмов.

Отбору высокопродуктивных штаммов предшествует целенаправленная работа селекционера с генетическим материалом исходных микроорганизмов. В частности, широко используют различные способы рекомбинирования генов: **конъюгацию** (обмен генетическим материалом между бактериями), **трансдукцию** (перенос гена из одной бактерии в другую посредством бактериофагов), **трансформацию** (перенос ДНК, изолированной из одних клеток, в другие),

амплификацию (увеличение числа копий нужного гена) и другие генетические процессы.

Важнейшим этапом в селекционной работе является индуцирование мутаций. Экспериментальное получение мутаций открывает почти неограниченные перспективы для создания высокопродуктивных штаммов. Вероятность возникновения мутаций у микроорганизмов (1×10^{-10} — 1×10^{-6}) ниже, чем у всех других организмов (1×10^{-6} — 1×10^{-4}). Но вероятность выделения мутаций по данному гену у бактерий значительно выше, чем у растений и животных, поскольку получить многомиллионное потомство у микроорганизмов довольно просто и сделать это можно быстро.

Для выявления мутаций служат селективные среды, на которых способны расти мутанты, но погибают родительские клетки дикого типа. Проводится также отбор по окраске и форме колоний, скорости роста мутантов и диких форм и т. д.

Сырье для культивирования микроорганизмов

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

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

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

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

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

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

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

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

Потребность в тех или иных веществах определяется физиологическими особенностями данного вида микроорганизмов, но во всех случаях среда должна представлять собой водный раствор этих веществ и обеспечивать приток их в клетку в определенном количестве.

Принципы составления питательных сред

В самом приближенном виде физиологические потребности микроорганизма в питательных веществах можно выявить, определив химический состав микробной клетки, однако в этом случае не учитываются количество и состав метаболитов, выделенных клеткой во внешнюю среду, и то обстоятельство, что состав клеточного вещества микроорганизма зависит от состава среды обитания и варьирует в достаточно широких пределах. Но все же первоначальную ориентировку в выборе оптимального состава питательной среды можно сделать на основе состава клеточного вещества микроорганизма.

Среди элементов наибольшее биогенное (жизненно важное) значение имеет углерод. Он входит в состав почти всех органических соединений, образующихся в микробной клетке. Углерод прежде всего вступает во взаимодействие с кислородом, водородом, азотом, образуя в сочетании с другими элементами основу жизненно важных соединений клетки: аминокислот, белков, углеводов, нуклеиновых кислот, жиров и т.д.

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

Микроорганизмы используют питательные вещества среды не только на построение клеточного вещества, но и на обеспечение энергией всех биохимических превращений в клетке.

Микроорганизмы чувствительны к составу питательных сред. Одни соединения ими интенсивно потребляются, другие остаются нетронутыми или потребляются во вторую очередь. В процессе роста культуры состав среды меняется, что оказывает влияние на ее развитие и биосинтетическую способность.

В то же время микроорганизмы весьма неприхотливы и легко адаптируются к условиям обитания. Например, дрожжи прекрасно растут на глюкозе, сахарозе, мальтозе, но могут быть адаптированы к выращиванию на пентозах, парафинах нефти, этаноле, метаноле и т.д.

Часто сырьем для выращивания микроорганизмов служит материал, который они не в состоянии использовать без предварительной подготовки (например, целлюлоза, гемицеллюлоза, крахмал, пектин, пентозаны и т.д.). В подобных случаях при приготовлении питательной среды биополимеры предварительно гидролизуют ферментативным или химическим способом до получения усвояемой формы.

Таким образом, питательная среда должна иметь определенное значение pH, содержать водный раствор или суспензию усвояемых форм углерода, азота, необходимый набор микроэлементов и питательных солей.

Для нормальной жизнедеятельности микроорганизмов часто оказывается необходимым присутствие в питательной среде факторов роста, главным образом витаминов, источником которых могут быть автолизаты и гидролизаты дрожжей и других микроорганизмов, кукурузный экстракт, отвары растительных отходов и т.д. Ниже рассматриваются источники отдельных компонентов питательных сред.

Источники углерода. Большинство продуцентов белковых веществ и аминокислот в качестве источника углерода ассимилируют органические вещества. Исключение составляют сине-зеленые водоросли, которые используют диоксид углерода.

Непосредственным источником углерода могут быть различные углеводы несложного строения: гексозы, пентозы, низкомолекулярные олигосахариды. Полисахариды, такие как целлюлоза, гемицеллюлоза, пектиновые вещества, крахмал, маннаны, пентозаны и т.д., могут быть источниками углерода лишь после их гидролиза или при условии, что микроорганизм обладает способностью синтезировать ферменты, гидролизующие эти вещества. Микроорганизмы могут использовать органические кислоты, спирты, жирные кислоты, легкие и тяжелые углеводороды и другие углеродосодержащие соединения.

Разнообразие усвояемых форм углерода предопределяет различные пути ассимиляции и превращения этих соединений в строительные блоки клетки. Наиболее универсальными строительными блоками в клетке являются ацетальдегид, ацетат, ацетил-КоА, пировиноградная кислота. И чем короче и проще путь получения этих соединений из используемого сырья, тем выше его ценность как источника углерода. Выбор источника углерода в технологии белковых веществ и аминокислот имеет большое значение. Он часто предопределяет

состав остальных компонентов среды и даже технологию и аппаратное оформление производства, особенно если сырье нуждается в предварительной обработке.

Источники азота. Известные продуценты белков и аминокислот не усваивают газообразный азот атмосферы. Азот должен находиться в среде в химически связанном состоянии: в виде неорганических солей, кислот, органических соединений и т.д. Потребность в тех или иных азотсодержащих соединениях определяется физиологическими возможностями микроорганизмов. На основе экспериментального изучения потребности микроорганизма в той или иной форме азота определяют необходимое содержание этих веществ в питательной среде. Следует помнить, что содержание азота в среде при производстве кормовых дрожжей должно быть высоким, так как в сухой биомассе содержится 45—55% белка, в том числе около 6% азота, иными словами, требуется до 600 мг азота на 1 л среды.

Как правило, продуценты биологически активных веществ нуждаются в отдельных аминокислотах, реже — во всех 20 протеиногенных.

Органические азотсодержащие соединения и аммонийный азот обычно легко усваиваются микроорганизмами, нитраты — медленнее, так как азот нитратов должен быть сначала восстановлен и лишь затем реализован клеткой в процессе обмена веществ. Нитриты практически не используются как источник азота в среде. Следует помнить, что при потреблении аниона или катиона, в которые входит азот, будет происходить подкисление или подщелачивание питательной среды.

Даже незначительный недостаток азота в среде приводит к «ожирению» клеток, т.е. повышению содержания в них липидов за счет уменьшения белковой и аминокислотной фракций.

Источники фосфора. Фосфор вносят в среду в виде солей фосфорной кислоты, как правило, с различными естественными субстратами (отварами растительных тканей, мукой, кукурузным экстрактом и т.д.) или — реже — с синтезированными соединениями (например, фитином).

Фосфор — важный элемент питательной среды. В клетке он входит в состав АТФ, АДФ, АМФ, обеспечивая энергетический и конструктивный обмен, участвуя в синтезе белков, нуклеиновых кислот, гликолизе и других процессах. Скорость роста культуры зависит от содержания фосфора. При недостатке его в среде, особенно в начале роста микроорганизмов, наблюдаются пониженный уровень накопления биомассы, незначительный прирост липидов, обеднение клеток белком и витамином В, резкое снижение интенсивности дыхания и повышение бродильной способности дрожжей. При этом в несколько раз уменьшается содержание фосфора во всех клеточных фракциях микроорганизма.

Источники витаминов, макро- и микроэлементов. Без витаминов и ионов металлов невозможно представить обмен веществ микробной клетки. Но потребность у микроорганизмов в этих соединениях различна. По этому признаку все микроорганизмы делятся на два типа: ауксоавтотрофы, не требующие введения в среду витаминов и синтезирующие их из строительных блоков самостоятельно, и ауксогетеротрофы, не способные синтезировать ряд витами-

нов. Если продуцент – аукогетеротроф, то введение хотя бы небольших количеств витаминов необходимо: оно ускоряет его рост и развитие. К сожалению, многие продуценты являются аукогетеротрофными организмами. Для дрожжей необходим водорастворимый комплекс витаминов группы В, в который входят тиамин, никотиновая и пантотеновая кислоты, пиридоксин, инозит, биотин.

Обычно потребность микроорганизмов в витаминах устанавливают экспериментально, конкретно для каждого штамма. Как правило, недостатка в витаминах в средах нет, так как они вводятся вместе с растительными субстратами, которые являются одновременно основным источником углерода в среде. В различных видах растительного сырья, используемого в производстве белковых веществ, аминокислот и липидов, содержатся следующие количества витаминов (в мг/100 г): биотин 0,0034–0,0061, пантотеновая кислота 0,06–0,22, инозит 89–120, тиамин 0,18–0,28, пиридоксин 0,29–0,46, никотинамид 5,00–5,15. Этого количества витаминов достаточно для большинства микроорганизмов, и лишь в редких случаях приходится прибегать к введению в среды автолизатов микробных масс, кукурузного экстракта и т. п.

Многие ионы металлов, являясь составной частью активного центра ферментов или участвуя в поддержании их пространственной структуры, обеспечивают обмен веществ микроорганизмов. Ферменты, содержащие металлы, активируют процессы дыхания, окислительно-восстановительные реакции, синтез аминокислот, жирных кислот, сахаров, нуклеотидов, пиримидиновых оснований, регулируют образование сложнейших молекул белков, гликогена, нуклеиновых кислот, их трансформацию и распад.

Наибольшее влияние на рост и развитие микроорганизмов оказывают ионы железа, меди, марганца, цинка, бора, молибдена, кобальта и ряда других металлов.

Таким образом, питательная среда должна содержать определенное количество углерода, азота, фосфора, витаминов, макро-и микроэлементов.

Методы оптимизации состава питательных сред

Состав питательной среды для каждого продуцента устанавливают экспериментально. Процесс подбора питательной среды для выращивания микроорганизма и образования им максимальных количеств целевого продукта — дело трудоемкое и требующее глубоких знаний физиологии микроба. Подбор оптимальных режимов и сред может идти месяцы и даже годы в зависимости от поставленной задачи и особенностей выбранного продуцента. Состав среды и оптимальные режимы определяют двумя способами: длительным многостадийным эмпирическим подбором и использованием математических методов планирования эксперимента.

Первый способ самый распространенный, им до последнего времени пользовались специалисты отраслей промышленности, использующих микроорганизмы. На основе изучения физиологических особенностей микроорганизма определяли качественный состав среды, а количество компонентов устанавливали путем постановки серии опытов, где один компонент среды изменялся в

определенных пределах, а все остальные оставались на постоянном уровне. Это надежный метод, но он требует больших затрат времени.

Более перспективно в биологических исследованиях использование математических методов планирования эксперимента, которые позволяют быстрее найти и научно обосновать оптимальный режим культивирования и состав среды. Эффективность этих методов наибольшая, когда начинают работать с новым или с недостаточно изученным объектом. Большинство используемых в микробиологии математических методов планирования эксперимента имеет целью получение математической модели процесса. Статистический анализ значимости коэффициентов полученного уравнения и его адекватности исследуемому процессу в изучаемом диапазоне изменения переменных процесса позволяет с достаточной уверенностью находить оптимальный состав среды и оптимальные условия культивирования микроорганизма. Стационарная точка процесса, т.е. экстремум по критерию оптимальности, определяется по полученной математической модели процесса.

Техника отбора чистой культуры микроорганизмов

Отбор проб чистых культур бактерий и дрожжей, которые вырастают на поверхности плотной среды в виде мажеобразного налета или в жидкой среде, ведут в следующей последовательности.

1. Зажигают спиртовку.
2. Пробирку с культурой помещают в левую руку между большим и указательным пальцем в наклонном положении. Поверхность с налетом микроорганизмов должна быть обращена вверх и хорошо видна.
3. Петлю держат вертикально в пламени горелки и прокалывают докрасна, затем наклоняют и обжигают примыкающую к ней часть петледержателя.
4. Мизинцем и безымянным пальцем правой руки прижимают к ладони наружную часть ватной пробки, вынимают ее из пробирки и держат в таком положении, не касаясь окружающих предметов.
5. Край открытой пробки обжигают в пламени горелки.
6. Осторожно вводят стерильную петлю в пробирку с культурой и охлаждают ее о стенки пробирки или прикоснувшись к питательной среде, свободной от микроорганизмов. Немного отстранив пробирку с культурой от пламени горелки, легким движением осторожно отбирают небольшое количество микробной массы с поверхности среды или каплю жидкости с клетками. Вынимая петлю из пробирки, следят за тем, чтобы отобранный материал не касался стенок, и петля не оказалась над пламенем горелки.
7. Снова обжигают в пламени горелки край пробирки, затем легким круговым движением обжигают ватно-марлевую пробку и закрывают пробирку.
8. Пробирку с культурой ставят в штатив, а извлеченный материал используют для приготовления препарата.
9. Клетки микроорганизмов, оставшиеся на петле, сжигают в пламени горелки.

Отбор чистых культур микроскопических грибов ведут с использованием препаровальной иглы в той же последовательности, что и отбор одноклеточных

организмов. Из пробирки отбирают кусочек мицелия, слегка погружая иглу в питательную среду таким образом, чтобы не нарушить структуру мицелия.

1.3 Направленное изменение свойств промышленных штаммов на основе методов клеточной и генной инженерии

Генная инженерия является собой революционно новый способ изменения организмов путем непосредственного вмешательства в их геном.

Сущность генной инженерии заключается в том, что, понимая признаки и свойства организма, определяемые тем или иным геном, их можно изменять, удалять или добавлять новые свойства и признаки через изменение, добавление или удаление отдельных генов.

Генная инженерия – это совокупность экспериментальных процедур, направленных на получение новых комбинаций генетического материала путем проводимых вне клетки манипуляций с молекулами нуклеиновых кислот и переноса созданных конструкций генов в живой организм, в результате которого достигается их включение и активность в этом организме и у его потомства.

Основные термины:

Рекомбинантная ДНК — ДНК, полученная в результате объединения молекулы векторной ДНК, способной к репликации в определенной клетке-хозяине, с ДНК, кодирующей продукт, синтез которого желательно осуществить в этой клетке-хозяине.

Вектор — это фрагмент ДНК, обеспечивающий размножение гибридной ДНК и синтез конечных продуктов деятельности генетической системы – белков.

Ген — участок молекулы ДНК (в некоторых случаях РНК), в котором закодирована информация о биосинтезе одной полипептидной цепи с определенной аминокислотной последовательностью.

Плазмида — фактор наследственности, внехромосомная кольцевая ДНК, которая обладает способностью стабильно существовать в автономном (не связанном с хромосомами) состоянии в цитоплазме.

Ген-маркер — это ген с известной локализацией и проявлением, по деятельности которого можно судить об успешности трансформации (например, гены устойчивости к антибиотикам или гены, отвечающие за синтез белков, светящихся в ультрафиолетовом свете).

Генетическая трансформация — процесс, при котором какой-либо ген (то есть уже трансген) методами генной инженерии переносится в организм. После такого переноса организм называется генетически модифицированным, или трансгенным.

Экспрессия генов — это процесс, в ходе которого наследственная информация от гена (последовательности нуклеотидов ДНК) преобразуется в функциональный продукт — РНК или белок.

Вектор — молекула ДНК или РНК, состоящая из двух компонентов: векторной части (носителя) и клонируемого чужеродного гена. Задача вектора — донести выбранную ДНК в клетку-реципиент, встроить ее в геном, позволить идентификацию трансформированных клеток, обеспечить стабильную экспрессию введенного гена.

Основные ферменты, которые использует генная инженерия

Задача генного инженера — подобрать фермент, который выполнил бы поставленные задачи, то есть смог бы работать с определенным участком нуклеиновой кислоты.

Следует отметить, что ферменты, применяемые в генной инженерии, лишены видовой специфичности, поэтому экспериментатор может сочетать фрагменты ДНК любого происхождения в избранной им последовательности. Это позволяет генной инженерии преодолевать установленные природой видовые барьеры и осуществлять межвидовое скрещивание.

Ферменты, применяемые при конструировании рекомбинантных ДНК, можно разделить на несколько групп:

- ферменты, с помощью которых получают фрагменты ДНК (рестриктазы);
- ферменты, синтезирующие ДНК на матрице ДНК (полимеразы) или РНК (обратные транскриптазы);
- ферменты, соединяющие фрагменты ДНК (лигазы);
- ферменты, позволяющие осуществить изменение структуры концов фрагментов ДНК.

Генная инженерия. Предварительный этап. Отбор микроорганизма

При выборе микроорганизма как потенциального продуцента учитывается ряд обстоятельств.

1. Поскольку микроорганизм будет выращиваться в производственных условиях в большом количестве, желательно, чтобы он не был патогенным. Кроме того, целевой генно-инженерный продукт, выделяемый из микроорганизма, должен иметь гарантии отсутствия даже следов микробной токсичности.

2. Проникший в клетку микроорганизма вектор с чужеродным для нее геном (или кластером генов) не должен расщепляться эндонуклеазами этой клетки, т.е. генетический материал должен сохраняться. При этом рибосомы потенциального продуцента должны воспринимать информационную РНК, соответствующую чужеродному материалу.

3. Образовавшийся чужеродный для клетки белок (для биотехнолога — целевой продукт) не должен расщепляться ее протеазами, т.е. не подвергаться воздействию систем репарации клетки, гидролизующих чужеродные белки. Ослабление действия таких систем также является одним из предварительных этапов работы генного инженера с продуцентом.

4. Желательно, чтобы у потенциального продуцента чужеродного белка (целевого продукта) последний выводился из клетки в питательную среду, что значительно облегчит его последующее выделение и очистку.

Генная инженерия. Этап 2. Встраивание гена в вектор.

При создании нового рекомбинантного продуцента ключевым моментом в работе генного инженера является встраивание гена в вектор, точнее в ДНК векторной молекулы, например, в плазмиду. Это становится возможным благодаря тому, что в распоряжении генных инженеров имеется большой набор разных по субстратной специфичности эндонуклеаз, называемых рестриктазами.

Благодаря действию рестриктаз в двухнитевой ДНК появляется щель, с двух сторон которой находится по липкому концу. В эту щель может быть встроен ген – фрагмент ДНК, если он имеет односторонние участки, комплементарные односторонним липким концам, сформированным в результате действия рестриктаз на вектор. Чтобы подготовить включение гена в вектор, надо использовать рестриктазу той же специфичности. Разумеется, липкие концы не должны образовываться в самом гене.

Ген, встроенный в вектор, удерживается в нем вначале только за счет водородных связей между комплементарными липкими концами. Эта стадия получила название «отжиг». Для того чтобы ген оказался прочно встроенным в вектор, необходимо его закрепление ковалентными связями. Для этих целей служат ферменты – лигазы, замыкающие разрывы в углеводно-фосфатном каркасе ДНК. После этой стадии работы генного инженера вектор с прочно закрепленным в нем геном может вводиться в микробную клетку.

Генная инженерия. Этап 3. Введение вектора в клетку.

Прямое введение гена в клетку осуществляют несколькими способами:

- Трансфекция
- Микроинъекция
- Электропорация
- Метод «мини-клеток»
- Упаковка в липосомы

При трансфекции ДНК адсорбируется на кристаллах фосфата кальция. Образуются частицы кальциевого преципитата. Они поглощаются клеткой путем фагоцитоза.

Микроинъекция ДНК в клетки млекопитающих стала возможной с появлением прибора для изготовления микропипеток диаметром 0.1-0.5 микрона и микроманипулятора. Преимущество описываемого метода заключается также в том, что он позволяет вводить любую ДНК в любые клетки, и для сохранения в клетках введенного гена не требуется никакого селективного давления.

Электропорация основана на том, что импульсы высокого напряжения обратимо увеличивают проницаемость биомембран. В среду для электропорации добавляют клетки и фрагменты ДНК, которые необходимо ввести в клетки. Через среду пропускают высоковольтные импульсы, приводящие к образованию пор в цитоплазматической мембране, время существования и размер которых достаточны, чтобы такие макромолекулы, как ДНК, могли из внешней среды войти в клетку в результате действия осмотических сил. При этом объем клетки увеличивается. Электропорация — наиболее простой, эффективный и воспроизводимый метод введения молекул ДНК в клетки.

«Мини-клетки» представляют собой микроядра, инкапсулированные в цитоплазматическую мембрану. Они очень чувствительны к разного рода воздействиям, поэтому для слияния подбирают специальные мягкие условия. Метод трудный, капризный, эффективность низкая.

Упаковка в липосомы используется для защиты экзогенного генетического материала от разрушающего действия рестриктаз. Липосомы — сферические оболочки, состоящие из фосфолипидов. Получают их путем резкого встряхива-

ния смеси водного раствора и липидов, либо обрабатывая ультразвуком водные эмульсии фосфолипидов.

Генная инженерия. Этап 4. Проверка культуры на содержание вектора с геном.

Ген-маркер – ген, который «легко заявляет о себе», т.е. маркирует клетку и, соответственно, клон. Ген-маркер также встраивается в вектор, но с помощью другой рестриктазы. Это ген не будет иметь никакого значения в будущем биотехнологическом процессе, но он нужен для отбора продуцента целевого продукта, кодируемого рабочим геном. Можно выделить 2 группы маркерных генов, позволяющие отличить трансформированные клетки:

1. Селективные гены. Основной принцип работы такого маркера – способность трансформированных клеток расти на селективной питательной среде, с добавкой определенных веществ, ингибирующих рост и деление нетрансформированных, нормальных клеток.

2. Репортерные гены, кодирующие нейтральные для клеток белки, наличие которых в тканях может быть легко тестировано.

Методика слияния протопластов

Клеточная инженерия – «насилованный» обмен участками хромосом у прокариот или участками и даже целыми хромосомами у эукариот.

Для обмена фрагментами хромосом у прокариот необходимо предварительно получить из их клеток лишенные клеточной стенки протопласты; затем осуществить слияние протопластов с образованием диплоидов; полученные диплоиды инкубировать в течение нескольких часов для ломки и воссоединения кольцевых хромосомных нитей в разных вариантах. Затем суспензию протопластов высевают на твердую питательную среду, при этом часть диплоидов превращается в гаплоиды – способные к размножению клетки, которые образуют колонии. Их изучают и отбирают культуры, приобретающие новые качества, представляющие интерес для биотехнолога.

Развитие генной инженерии

Некоторые футурологи, утверждают, что человек, в принципе, может жить 1 000 лет и больше в том случае, если людям удастся разработать системы замены вышедших из строя органов. Они считают, что эта перспектива не так уж туманна, и уже сейчас есть намеки на то, что она может стать реальностью.

Генная инженерия в перспективе сможет побороть генетические заболевания, и здоровье человека поднимется на новую ступень. Люди избавятся от старения, и им не придется наблюдать за тем, как увядают их тела. К примеру, известно, что старение вызывается сокращением теломер в процессе деления клеток. Теломеры располагаются на концах хромосом и осуществляют функцию защиты ДНК. В конце 90-х годов двадцатого столетия учёные внебрили в клетку ген, который восстанавливает белок теломеразы, отвечающий за восстановление теломер. Таким образом, учёные сделали клетку бессмертной.

С генетической инженерией связаны надежды на расширение ассортимента микробиологических удобрений и средств защиты растений, увеличение производства метана из бытовых и сельскохозяйственных отходов. Путем выведения микроорганизмов, более эффективно разлагающих различные вредные

вещества в воде и почве, можно существенно повысить эффективность борьбы с загрязнением окружающей среды.

Генная инженерия имеет большие перспективы применения для совершенствования штаммов микроорганизмов сегодня кажутся почти неограниченными. Безусловно, будет развиваться такое направление, как создание штаммов-продуцентов белков человека, сельскохозяйственных животных и растений. Это направление связано не только с медициной и ветеринарией, но и с пищевой промышленностью. Близки к завершению работы по созданию микробиологической технологии производства ренина (фермента сычуга телят), используемого в сыроделии, сладкого белка — тау-матина (~ в 3000 раз слаще сахара) и других продуктов. Ведутся работы по совершенствованию штаммов дрожжей, используемых в пивоварении и виноделии. Этим организмам передаются гены, которые могут обеспечить усвоение пентоз, разрушение фенольных соединений, конкурентоспособность при росте в нестерильных условиях.

Заключение к главе 1

Микроорганизмы играют огромную роль в природе и в жизни человека. Они совершают круговорот веществ, который все время происходит на нашей планете. Процессы гниения, разрушающие органическое вещество, невозможны без микроорганизмов.

Микроорганизмы играют важную роль в питании человека. Простокваша, кефир, кумыс, сыр являются результатом жизнедеятельности молочнокислых бактерий. Дрожжи играют основную роль при выпечке хлеба.

Производство спирта, пивоварение, виноделие также связано с жизнедеятельностью микроскопических дрожжевых грибов.

В настоящее время все большее внимание начинают приобретать микроорганизмы как источник синтеза антибиотиков, ферментов, витаминов, белков и других веществ.

Многие биотехнические процессы осуществляются с использованием микроорганизмов. Биотехнология играет ведущую роль во многих отраслях — сельском хозяйстве, медицине, пищевой промышленности.

Задачи к главе 1:

1. В центре города должна открыться микробиологическая лаборатория. Какие нужно создать условия для ее деятельности? Какими оборудованием она должна оборудоваться?

2. Для выделения чистой культуры использовали искусственные питательные среды: они должны отвечать определенным условиям. Это, какие условия и зачем нужно это знать?

3. Для проведения бактериологических исследований необходимо подготовить стерильные чашки Петри, пипетки, колбы и др. посуду. Какой метод стерилизации используют?

Тестовые задания к главе 1

1. Кто первым увидел и описал микроорганизмы?

А) Гиппократ. В) Фракастро. С) Левенгук. D) Л.Пастер .Е) Р.Кох.

2. Микробиология- наука, которая изучает:

А) физиологию растений. В) генетику животных. С) экологию природы. Д) морфологию почвы. Е) морфологию, физиологию, генетику, экологию микробов.

3. Впервые ввел в микробиологическую практику плотные питательные среды:

А) Л.Пастер. В) Р.Кох. С) С.Виноградский. Д) И.Мечников. Е) Н.Гамалея.

4. Чтобы увидеть микробы используют:

А) микроскоп. В) телескоп. С) фонендоскоп. Д) зонд. Е) зеркало.

5. Основная задача бактериологической лаборатории:

А) изучение эпизоотической ситуации. В) лечение животных. С) разработка плановых мероприятий.

Д) анализ статистических данных. Е) диагностика болезней сельскохозяйственных животных.

6. В составе органических веществ микробной клетки наибольшее количество приходится на долю:

А) углерода. В) кислорода. С) азота. Д) водорода. Е) натрия.

7. Основную массу белка микробной клетки составляет:

А) липопротеиды. В) глюкоропротеиды. С) нуклеопротеиды. Д) ферменты. Е) хромопротеиды.

8. В составе микробной клетки наименьшее количество приходится на долю:

А) углерода. В) кислорода. С) азота. Д) водорода. Е) натрия.

9. От неблагоприятных факторов окружающей среды бациллы защищаются, образуя внутри клетки:

А) лизосому. В) рибосому. С) вакуоль. Д) спору. Е) нуклеоиды.

10. Белок микробной клетки синтезируется в:

А) мезосомах. В) нуклеоиде. С) вакуолях. Д) рибосомах. Е) цитоплазматической мембране.

11. Клетки бактерии измеряются в:

А) метрах. В) сантиметрах. С) нанометрах. Д) дальтонах. Е) микрометрах.

12. К прокариотам относятся организмы, содержащие:

А) ядро. В) без ядра. С) мицелий. Д) споры.

13. К эукариотам относятся организмы, содержащие:

А) ядро. В) без ядра. С) мицелий. Д) споры.

Вопросы для самоконтроля

1. Объясните сущность стабильной изменчивости как основу развития живой природы.

2. Назовите принципы биотехнологического производства веществ-метаболитов.

3. Основы генетической и клеточной инженерии

4. Приведите как можно больше отличий плесневых грибов от дрожжей
5. Основные виды пищевого сырья, его состав, биотехнологический и биогенный потенциал
6. Питательные среды. Теоретическое обоснование их использования
7. Потребность микроорганизмов в питательных веществах. Источники углерода и азота
8. Влияние физических факторов внешней среды на микроорганизмы.
9. Действие химических факторов на микроорганизмы.
10. Действие биологических факторов на микроорганизмы.
11. Каково строение гена основные его функции
12. Что такое мутации?
13. Практическое и эволюционное значение мутаций?
14. Какие мутагенные факторы вы знаете?
15. Что такое биотехнология и какова ее роль в ветеринарии и животноводстве?
16. Что такое генная инженерия и какие задачи она решает?
17. Назовите методы получения генов.
18. Как создаются рекомбинантные ДНК и с какой целью они вводятся в реципиентную клетку?
19. Что такое клеточная инженерия?

2 ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ СПОСОБОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ, ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ ЦЕЛЕВЫХ ПРОДУКТОВ МЕТАБОЛИЗМА

2.1 Способы культивирования микроорганизмов, кинетика роста микроорганизмов, регулирование и оптимизация процессов культивирования

Управление ростом культур лежит в основе биотехнологического применения микроорганизмов. Это подчеркивает важность изучения характера роста и питательных потребностей микробных культур.

Известно множество процессов культивирования микроорганизмов. Они различаются:

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

Классификация процессов культивирования микроорганизмов по способу действия (периодический, непрерывный и промежуточные) показаны на рисунке 2.1.



Рисунок 2.1. Классификация процессов культивирования микроорганизмов

При периодическом способе культивирования стерильная питательная среда засеивается исходной культурой продуцента, и далее в этой же емкости микроорганизмы при определенных условиях проходят через все стадии роста и развития популяции. Когда процесс культивирования заканчивается, емкость для выращивания освобождают, и цикл возобновляется, начиная от засева питательной среды исходной культурой продуцента. При таком способе культивирования (его можно назвать «закрытой» системой, когда хотя бы один из компонентов не может поступать в нее или выводиться из нее) скорость роста

биомассы всегда должна стремиться к нулю либо из-за недостатка питательных веществ, либо из-за накопления в среде токсических метаболитов.

В настоящее время в промышленности используют жидкие питательные среды, применение которых позволило избежать недостатков плотных питательных сред и увеличило выход процесса за счет использования больших емкостей для культивирования (ферментеров).

Применение жидких питательных сред потребовало перемешивания культуры с целью выравнивания условий роста микробов в разных частях рабочего сосуда и аэрирования (насыщения кислородом).

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

Промежуточные способы культивирования.

Продленный периодический процесс, как и периодический, предусматривает одноразовую загрузку и разгрузку ферментера. Однако цикл развития микроорганизмов в продленном периодическом процессе удлиняется либо за счет подпитки (периодического или непрерывного добавления питательной среды), либо за счет длительного удержания клеток в системе. В этом случае продлевается экспоненциальная фаза и фаза линейного роста.

Многоциклическими процессами культивирования называют такие, в которых цикл выращивания культуры повторяется многократно без многократной стерилизации емкости. Многоциклическое культивирование может быть различным. Его можно вести в одном ферментере, многократно повторяя полный цикл развития культуры без перерыва на стерилизацию. Способы, осуществляемые в одном ферментере, называют одностадийными.

Возможны и многостадийные многоциклические процессы, основанные на принципе повторного и последовательного периодического культивирования, протекающего в нескольких ферментерах, соединенных в батарею, с целью длительного использования культуры. Один из вариантов такого способа заключается в следующем: культура выращивается в одном биореакторе и в то время, когда она проходит в своем развитии экспоненциальную фазу, из нее берется инокулят (посевной материал) для засева следующего реактора. В первом реакторе культура доращивается до необходимой фазы роста. Когда культура во втором реакторе достигает экспоненциальной фазы, из нее также делается пересев в третий реактор и т.д. Поскольку культура все время пересеивается в экспоненциальной фазе, не происходит ее старения и вырождения. Кроме того, отмечается выигрыш во времени, так как одновременно работают несколько ферментеров.

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

При поверхностном культивировании посевной материал высевают на поверхность питательной среды, распределенной небольшим слоем (около 10 см) в металлических кюветах.

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

Кинетика роста периодической культуры микроорганизмов

Культуры называют периодическими, когда при росте в жидких средах в закрытых сосудах определенного объема микроорганизмы находятся в закрытой системе. Понятие микробный рост означает увеличение числа клеток микроорганизма. Под ростом отдельной клетки понимают увеличение ее длины и последующее деление на две дочерние клетки (бинарное деление).

Когда время удвоения числа клеток остается постоянным, культура находится в экспоненциальной фазе роста

Удельная скорость роста определяется ферментативными возможностями данного вида микроорганизмов, составом среды и всеми биофизическими факторами, влияющими на скорость роста. Как следствие, удельная скорость роста изменяется по экспоненциальному закону.

Исчерпание питательных веществ и накопление продуктов обмена до токсической концентрации приводят к постепенной остановке роста и переходу культуры в стационарную фазу, за которой следует фаза отмирания.

Обычно причинами гибели - лизиса клеток в культуре становятся их энергетическое истощение и действие ферментов автолиза.

В стационарной фазе происходит сложная адаптация клеток к условиям голодания и переживания и возможен скрытый рост выживших клеток на остатках лизированных клеток).

Скорость роста в начальной стадии низка, поскольку в это время происходит адаптация клеток посевного материала к новым условиям. Длительность этой фазы, называемой лаг-фазой или фазой задержки роста, зависит от количества клеток и возраста культуры, служившей посевным материалом, а также от различий в составе старой и новой сред. За это время клетки переходят из состояния адаптации к стационарной фазе роста культуры (часто именно такие, старые культуры используют для засева сред) в состояние активного роста. Длительность лаг-фазы увеличивается, если посевной материал был выращен на более богатой среде. При засеве материалом, взятым из культуры в экспоненциальной фазе роста, при одинаковом составе сред рост начинается без лаг-фазы. В определенных условиях наблюдается не экспоненциальный, а линейный рост - если лимитирующий субстрат поступает в среду с постоянной скоростью.

Микробные культуры используются во многих биотехнологических процессах. Требуемый продукт они синтезируют чаще всего в стационарной фазе роста, поэтому вначале их выращивают отдельно в оптимальных для роста

условиях и затем перенят в «неростовые» условия, обеспечивающие синтез продукта, необходимого для данного технологического процесса.

Типичная кривая роста, построенная в полулогарифмической шкале, приведена на рисунке 2.2.

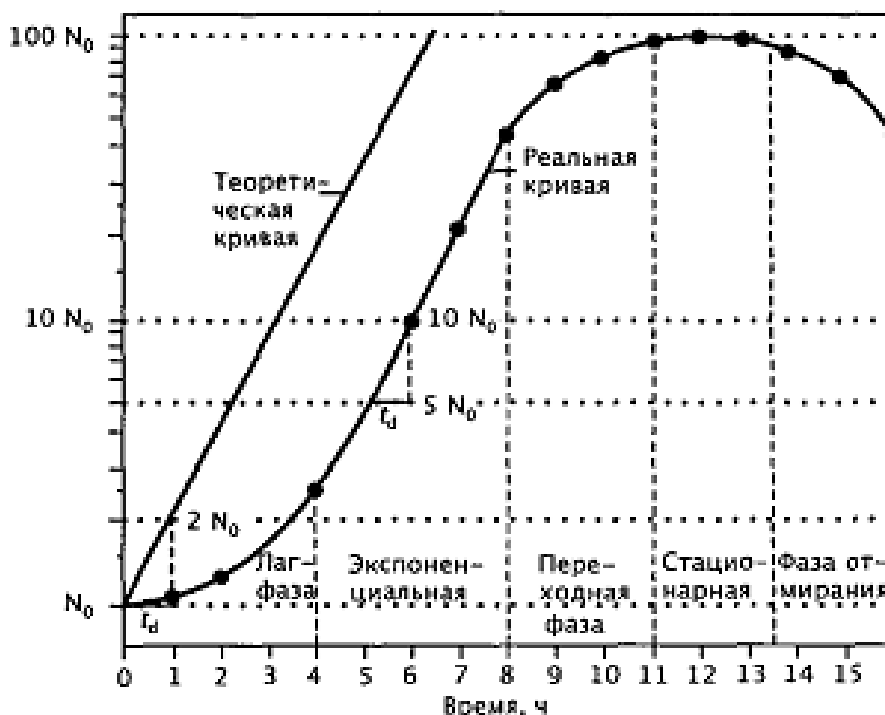


Рисунок 2.2. Типичная кривая роста периодической культуры, построенная в полулогарифмической шкале: зависимость логарифма числа клеток от времени.

Для сравнения приведена теоретическая кривая экспоненциального роста

При периодическом культивировании клетки помещают в закрытый ферментер определенного объема, содержащий питательную среду, и задают начальные условия. Постепенно увеличивается плотность популяции, снижается концентрация питательных веществ и накапливаются продукты обмена, т.е. условия существования микроорганизмов изменяются. Периодическую культуру обычно рассматривают как замкнутую систему, переживающую разные фазы развития. Каждая фаза характеризуется определенными физиологическими параметрами.

Ляг-фаза – это фаза «привыкания» клеток к среде, при этом происходит увеличение количества ДНК и РНК и индукция синтеза соответствующих ферментов. Ляг-фаза удлиняется, если брать старый посевной материал и переносить клетки в совершенно новую по составу среду. Ляг-фаза сокращается (или может совсем отсутствовать), если активные молодые клетки перенести в свежую среду того же состава и той же температуры. На средах, содержащих смесь субстратов, наблюдается диауксия, при которой после истощения одного субстрата культура переходит во вторую ляг-фазу для подготовки к потреблению другого субстрата.

В экспоненциальной (логарифмической) фазе клетки растут и делятся с максимальной скоростью. По мере истощения субстратов и накопления продуктов обмена скорость роста снижается (фаза замедления роста), и культура

переходит в стационарную фазу, в течение которой процессы деления и отмирания клеток в популяции находятся в динамическом равновесии.

В биотехнологии большое значение имеет связь основных фаз роста культуры микроорганизмов с закономерностями синтеза метаболитов (рис. 2.3).

При хемостатном (непрерывном) культивировании в ферментер постоянно подается свежая питательная среда и концентрация одного из субстратов поддерживается на уровне, лимитирующем рост. Одновременно происходит постоянный отток культуры, так что объем ее в культиваторе не изменяется. Ферментер снабжен мешалкой для равномерного распределения свежей среды.

Хемостат имитирует ситуацию, существующую в природе, в том отношении, что клетки поддерживаются в нем в условиях незначительного, но непрерывного поступления субстрата. Измеряемая концентрация субстрата не дает никакой информации о количестве субстрата, находящемся в обороте; она отражает лишь сродство к субстрату соответствующих микробных систем и его связь со скоростью поступления субстрата.

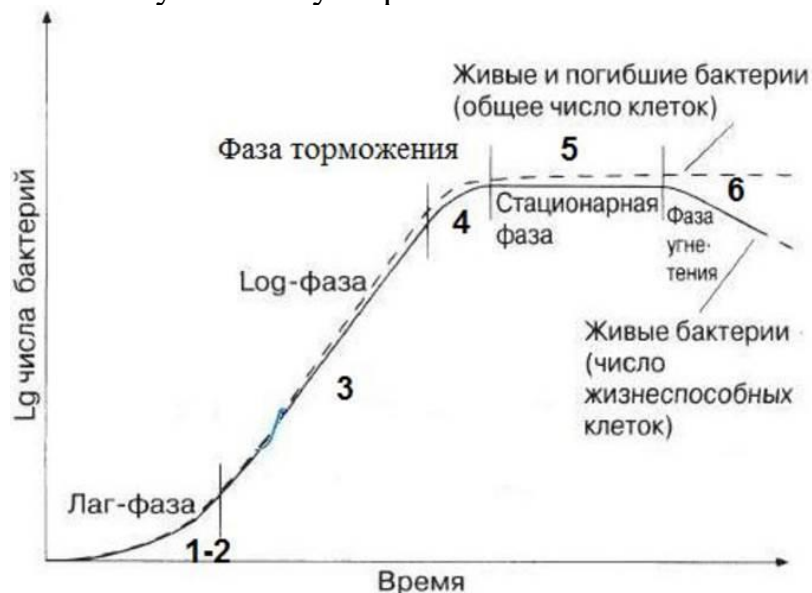


Рисунок 2.3. Кривая роста микроорганизмов: 1 и 2 (лаг-фаза и фаза ускорения роста) - подбор условий культивирования и состава питательной среды; 3 (лог-фаза) - синтез первичных метаболитов, образование биомассы; 4 и 5 (фаза торможения и стационарная) - синтез вторичных метаболитов, «урожай биомассы»; 6 (фаза отмирания) - процессы образования внутриклеточных метаболитов.

Рост и оборот субстрата не обязательно связаны между собой стабильным соотношением, но оборот субстрата может быть все менее сопряжен с ростом по мере снижения скорости поступления субстрата.

Культивирование в хемостате: обеспечивает постоянное получение молодых клеток, выросших в строго определенных условиях при известной удельной скорости роста; такие клетки необходимы для изучения различных регуляторных процессов; позволяет определять важные показатели роста, а также изучать физиологическую реакцию культуры на лимитирование питательными веществами; служит полезной моделью для описания роста во многих природных местообитаниях; позволяет выявлять предпочтительно используемые суб-

страты в их смеси, а также конкуренцию или сосуществование двух или трех видов при данных условиях роста; позволяет проводить подпитку токсичными субстратами в более высоких концентрациях; позволяет исследовать стабильные двухкомпонентные культуры.

Критериями оценки эффективности биотехнологических процессов являются: скорость роста продуцента, выход продукта, экономический коэффициент, непродуктивные затраты энергии, энергозатраты и затраты на обезвреживание отходов.

Рост - необратимое увеличение живой клеточной массы, приводящее к увеличению числа клеток микроорганизмов в результате размножения. Важнейшей количественной характеристикой этого процесса является удельная скорость роста μ , выражающая увеличение биомассы клеток в единицу времени.

Скорость роста продуцента служит одним из основных показателей, характеризующих адекватность условий ферментации. Скорость роста (увеличение биомассы) организмов с бинарным делением в хорошо перемешиваемой среде в периодической культуре будет пропорциональна концентрации микробной биомассы:

Удельная скорость роста является одним из основных параметров, определяющих физиологическое состояние продуцента; ряд других параметров может быть выражен через этот показатель. Параметр аналогичен сложным процентам (например, если удельная скорость роста равна 0,1 ч, то увеличение биомассы равно 10 % в час). Таким образом, ростовые процессы приводят к накоплению биомассы.

Эффективность биотехнологического процесса оценивается выходом продукта Y по субстрату («экономический коэффициент»), определяется как количество продукта, получаемого из данного количества субстрата по формуле 2.1:

$$Y = X/S_0 - S \quad (2.1),$$

где S и S_0 - конечная и исходная концентрации субстрата.

Данный коэффициент выражает эффективность использования субстрата для получения целевого продукта и является очень важной характеристикой, так как непосредственно связан с продуктивностью и позволяет влиять на себестоимость конечного продукта.

Для выращивания любой культуры необходимы:

- 1) жизнеспособный посевной материал;
- 2) источники энергии и углерода;
- 3) питательные вещества для синтеза биомассы;
- 4) отсутствие ингибиторов роста;
- 5) соответствующие физико-химические условия (температура, pH среды, наличие или отсутствие кислорода и др.).

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

$$d x / d t = \mu x \quad (2.2),$$

где $d x / d t$ – скорость роста;

μ – коэффициент пропорциональности, обычно называемый удельной скоростью роста;

x – концентрация биомассы (на сухой вес).

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

Обратное время удвоения

Наклон графика ($1/t_d$) зависимости $\log x$ от времени и есть обратное время удвоения. Некоторые исследователи предпочитают выражать скорость роста через $1/t_d$, а не через удельную скорость роста.

Экономический коэффициент

Экономический коэффициент (или выход биомассы) определяют из уравнения 2.3

$$\Delta x / \Delta s = Y \quad (2.3),$$

где Δx – увеличение биомассы, соответствующее потреблению субстрата в количестве Δs . Более строго, экономический коэффициент определяется пределом, к которому стремится отношение $\Delta x / \Delta s$ при $\Delta s \rightarrow 0$, т. е.

$$Y = - dx/ds \quad (2.4)$$

Знак «минус» вводится потому, что значения x и s изменяются в разные стороны. Важность экономического коэффициента состоит в том, что он выражает количественные потребности организма в пище.

Если внешние условия в бактериальной культуре поддерживаются постоянными, то экономический коэффициент тоже будет постоянной, количественно воспроизводимой величиной. Таким образом, если x_0 и s_0 – начальные концентрации биомассы и субстрата соответственно, а x и s – соответствующие концентрации во времена роста в культуре, то

$$x - x_0 = Y (s_0 - s) \quad (2.5)$$

Когда биомасса достигает своего максимума x_m , концентрация лимитирующего субстрата равна приблизительно 0, т. е. можно записать $x_m - x_0 = Y s_0$.

Следовательно, для лимитирующего субстрата график зависимости x_m от s_0 должен быть прямой линией с тангенсом угла наклона, равным Y .

Метаболический коэффициент

Скорость потребления субстрата культурой в данный момент выражается отношением

$$ds/dt = q \times x \quad (2.6),$$

где x – биомасса, а коэффициент q **известен как метаболический коэффициент, или удельная скорость метаболизма.**

Существование фазы экспоненциального роста в периодической культуре доказывает, что скорость роста может в довольно широких пределах не зависеть от концентрации субстрата. Следовательно, рост в этом случае характеризуется кинетикой нулевого порядка. Можно предположить, что кинетика потребления субстрата будет соответствовать кинетике ферментативной реакции. Тогда, если s – концентрация субстрата, а q – метаболический коэффициент, то

$$q = q_m \times s / (s + K_s) \quad (2.7),$$

где K_s , называемая константой насыщения, эквивалентна константе Михаэлиса-Ментен, а q_m – максимальное значение q , полученное при $s = K_s$

Подставив в уравнение значения q и q_m из уравнений $q = \mu/Y$ и $q_m = \mu_m/Y$, получаем

$$\mu = \mu_m \times s / (s + K_s) \quad (2.8).$$

Это уравнение часто называют отношением Моно, так как Моно в 1942 г. эмпирически установил, что это выражение хорошо соответствует зависимости скорости роста бактерий от концентрации субстрата. Значение K обратно пропорционально сродству организма субстрату.

Определение длительности лаг-периода

Максимальному уровню удельной скорости роста часто предшествует лаг-период. Длительность лаг-периода (L) для многих целей удобно определять методом Лоджа и Хиншельвуда.

Если на графике зависимости логарифма биомассы от времени прямую линию экстраполировать до уровня начальной биомассы, то отрезок, отсекаемый при этом на оси абсцисс, и будет соответствовать L . Соответственно, уравнение для роста культуры имеет вид (2.9):

$$\ln x = \mu \times (t - L) + \ln x_0 \quad (2.9)$$

Регулирование процессов культивирования микроорганизмов

К физическим методам регулирования роста микроорганизмов следует относить регуляцию роста температурой, тепловую и ультразвуковую обработку, ультрафиолетовое облучение, приводящие к гибели или подавлению роста других организмов, присутствующих в популяции, но существенно не затрагивающих выделяемые клетки. Можно также использовать преимущества в некоторых физических свойствах изучаемого микроорганизма, таких как его размеры и подвижность; это позволяет в значительной мере отделить данный организм от других в популяции.

В основе действия химических методов лежит использование токсичных веществ, которые подавляют рост оставшейся части популяции, не оказывая влияния на выделяемый микроорганизм. Кроме того, это могут быть вещества,

служащие источниками питания, используемыми преимущественно отдельными микроорганизмами в смешанной популяции.

Биологические методы включают использование специфических хозяев для выделяемого организма, а также преимуществ некоторых патогенных свойств микроорганизма (например, его инвазивность), которыми не обладают другие представители популяции. Во многих случаях для получения максимального эффекта накопления сочетают физические, химические и биологические методы.

2.2 Непрерывный способ культивирования микроорганизмов

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

Непрерывная ферментация может проходить в гомогенной системе идеального смешения, системе полного вытеснения или системе твердожидкостного типа.

Непрерывное (проточное) культивирование позволяет зафиксировать культуру в какой-то определенной фазе (обычно экспоненциальной). При этом состав среды и условия роста остаются постоянными. Этого добиваются постоянным прибавлением новой питательной среды в сосуд для выращивания и одновременным удалением такого же количества среды с клетками.

Подача свежей среды и удаление части суспензии (проток) происходит с той же скоростью, с какой растет культура. В этом случае устанавливается динамическое равновесие.

Непрерывное культивирование пока не находит широкого применения, однако в настоящее время все более популярным становится периодическое культивирование с добавлением субстрата, которое представляет собой компромисс между двумя системами. Схема непрерывного культивирования: в том случае, когда целью является получение большого количества биомассы, обычно используют простейшую, одноступенчатую систему непрерывного культивирования при которой культуру выращивают на каком-то одном определенном субстрате, обеспечивающем максимальный выход биомассы. Полунепрерывные системы основаны на принципе повторного и последовательного периодического культивирования, производимого в одном или нескольких культиваторах, соединенных в батареи.

При непрерывном культивировании микроорганизмов отсутствует смена фаз развития культуры. В таких процессах скорость потока питательной среды и отвода культуральной жидкости из системы необходимо отрегулиру-

вать, чтобы концентрация клеток оставалась постоянной. В стерильных условиях непрерывный метод обеспечивает сохранение культуры в физиологически активном состоянии длительное время.

Поддержание динамики равновесия в реакторе осуществляется двумя методами: турбидостатным и хеостатным.

По турбидостатному принципу концентрация биомассы поддерживается скоростью потока среды, а по хеостатному – концентрацией подаваемого субстрата. Известен также способ регулирования роста культуры по pH.

При **турбидостатном методе** регулирования контролируются концентрации суспензии входящей жидкости, создаваемой микробными клетками. Метод осуществляется с помощью фотоэлемента или pH-электрода, если в культуральной жидкости образуются органические кислоты.

Если в таком процессе плотность популяции определяется химическим составом среды (концентрацией лимитирующего рост фактора), его называют **хеостатным культивированием**. Изменяя концентрацию лимитирующего рост фактора, можно изменять плотность популяции. Изменяя скорость разбавления, можно получать режимы, обеспечивающие различную скорость роста популяции. При медленном протоке среды, т. е. при медленном росте культура испытывает сильную лимитацию, глубокое голодание по данному субстрату. При быстром протоке среды, т. е. при быстром росте степень голодания слабая, приближающаяся к условиям экспоненциального роста.

Хеостатный контроль проще, так как он происходит по входящему потоку. Биореактор в хеостатном режиме снабжен устройствами для вливания и выпуска питательной жидкости, имеет систему контроля скорости потока.

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

Применение многостадийных систем позволяет получать культуру при любой скорости роста – от лаг-фазы до экспоненциальной и стационарной. Многостадийные системы обычно используются для получения вторичных продуктов микробного синтеза, накопление которых в той или иной степени отстает от кинетики роста биомассы.

Многостадийное культивирование с успехом применяется при получении молочной кислоты, этилового спирта и т. д. Батарея ферментеров применяется также для переработки высоких концентраций субстрата при получении продуктов как первой, так и второй фазы роста.

2.3 Способы выделения, очистки и концентрирования целевых продуктов микробного синтеза

Все методы выделения продуктов микробиологического синтеза из культуральной жидкости делят на две группы:

1) экстракция, ионный обмен, адсорбция, кристаллизация, если целевой продукт в растворе;

2) осаждение, фильтрование, центрифугирование, сепарирование, если целевой продукт в виде твердой фазы.

Часто невозможно выделить целевой продукт при помощи одного метода, тогда применяют комбинацию нескольких методов и в процессе выделения переводят продукт из растворимой формы в нерастворимую (или наоборот).

Как правило, при выделении растворенных веществ культуральную жидкость подвергают предварительной обработке и очистке при помощи осаждения, фильтрования, центрифугирования, сепарирования и мембранных методов (электродиализ, ультра- и микрофильтрация).

Осаждение (седиментация) – это процесс расслоения дисперсных систем под действием силы тяжести и отделение дисперсной фазы в виде осадка.

Скорость осаждения биомассы из культуральной жидкости невелика и составляет порядка 10^{-6} – 10^{-7} м/с.

Для ускорения процесса осаждения применяют:

1) коагулянты – вещества, переводящие взвешенные частицы в агрегатно-неустойчивое состояние;

2)) флокулянты – вещества, способствующие разрушению коллоидных структур и образованию крупных хлопьев.

В качестве коагулянтов применяют обычно желатин, рыбный клей, казеин, в качестве флокулянтов – метил целлюлозу, пектин, альгинат натрия и др.

Центрифугирование

Это разделение неоднородных систем под воздействием поля центробежных сил. Для центрифугирования применяют центрифуги различных конструкций.

Центрифуги, имеющие высокий фактор разделения и оснащенные тарельчатым барабаном, называют сепараторами. В микробиологической промышленности сепараторы являются одним из самых распространенных типов центрифуг. Они позволяют сконцентрировать осадок до влажности 60–90 %.

В последние годы появились специальные герметичные сепараторы, позволяющие вести процесс сепарирования в автоматизированном режиме, оптимально подобранном для специфических условий конкретных культуральных жидкостей.

Области применения центрифугирования:

1) выделение биомассы из культуральной жидкости (дрожжи, бактерии, грибы);

2) отделение различных целевых продуктов микробиологического синтеза (антибиотики, ферменты, витамины и др.), переведенных предварительно в твердую фазу;

3) разделение эмульсий, образующихся при экстракции.

Главные достоинства центрифугирования и сепарирования – высокая производительность и высокая степень концентрирования – позволяют успешно конкурировать с другими способами выделения и концентрирования как в промышленных, так и в лабораторных условиях.

Фильтрация

Это разделение твердой и жидкой фаз суспензии при пропускании ее через пористую перегородку.

Конечная цель фильтрации – получение твердой или жидкой фазы (когда одна из них является отходом), а также одновременное получение твердой и жидкой фаз.

Фильтрация – гидродинамический процесс, скорость которого прямо пропорциональна разности давлений, создаваемой по обеим сторонам фильтровальной перегородки, и обратно пропорциональна сопротивлению, испытываемому жидкостью при ее движении через поры перегородки и слой образовавшегося осадка.

На процесс фильтрации влияет ряд факторов, которые можно разделить на две группы:

- 1) макрофакторы – разность давлений, толщина слоя осадка, вязкость жидкой фазы и др. – заведомо известны и контролируются приборами;
- 2) микрофакторы – размер и форма частиц осадка и пор фильтровальной перегородки, толщина двойного электрического слоя на поверхности частиц и др. – менее изучены и их характеризуют лишь косвенными методами. Именно микрофакторы оказывают решающее влияние на процесс фильтрации и затрудняют его масштабирование.

При фильтрации культуральной жидкости образуются большей частью студенистые хлопьевидные или мелкозернистые осадки, обладающие большим сопротивлением. Средняя скорость фильтрации при этом составляет всего 50 л/м² в час.

Для увеличения скорости фильтрации обычно используют два приема: предварительная обработка суспензий; применение вспомогательных фильтровальных материалов.

Предварительная обработка культуральной жидкости позволяет более полно перевести целевой продукт в жидкую или твердую фазу, обеспечить лучшее разделение фаз и получить продукт, годный для дальнейшей очистки и выделения. В результате предварительной обработки происходит коагуляция взвешенных частиц.

Наиболее распространены следующие способы предварительной обработки:

- 1) кислотная коагуляция (применяется для выделения антибиотиков, стойких к низким pH);
- 2) обработка электролитами;
- 3) тепловая коагуляция (возможна в тех случаях, когда продукт стоек к нагреванию до 70–80 °C);
- 4) образование наполнителей при добавлении химических агентов.

В качестве вспомогательных фильтровальных материалов используются фильтровальные порошки, которые вносят в фильтруемую жидкость как наполнители или предварительно наносят на рабочую поверхность фильтра в виде фунтового слоя.

Экстракция

Процесс разделения смеси твердых и жидких веществ при помощи избирательных (селективных) растворителей. Физическая сущность экстракции состоит в переходе извлекаемого компонента из одной фазы (жидкой или твердой) в фазу жидкого экстрагента при их взаимном соприкосновении. Экстрагируемые компоненты переходят из исходного раствора в растворитель вследствие разности концентраций, поэтому данный процесс относится к числу диффузионных.

Процесс экстракции проводится обычно в двухфазных системах: твердое тело – жидкость или жидкость – жидкость.

Область применения экстракции: выделение и очистка антибиотиков, витаминов и аминокислот.

Ионообмен

Представляет собой сорбционный процесс.

Ионный обмен — универсальный химический процесс, имеющий широкий спектр промышленного применения. Он включает замену ионов в растворе ионами другого типа, обычно достигаемую за счет использования ионообменных смол или мембран.

Фармацевтическая промышленность использует ионообменную хроматографию для очистки и разделения белков, аминокислот и других биомолекул.

Ионный обмен является ценным инструментом в различных промышленных применениях, обеспечивающим селективное удаление ионов, получение продуктов высокой чистоты и экологические преимущества. Однако у него также есть ограничения, включая ограничения мощности, образование отходов и затраты на техническое обслуживание. Выбор использования ионного обмена должен быть сделан на основе тщательной оценки конкретных требований и проблем рассматриваемого промышленного процесса, взвешивания его преимуществ и недостатков для определения его пригодности.

Адсорбция

Это процесс поглощения одного или нескольких компонентов целевого продукта из газовой смеси или раствора твердым веществом – адсорбентом.

Процессы адсорбции (как и другие процессы массопередачи) избирательны и обычно обратимы. Благодаря этому становится возможным выделение поглощенных веществ из адсорбента, т. е. проведение процесса десорбции.

В настоящее время разработаны ионообменные сорбенты (иониты), которые характеризуются различной избирательностью и высокой специфичностью.

Иониты – это органические и неорганические вещества, практически нерастворимые в воде и обычных растворителях, которые содержат активные (ионогенные) группы с подвижными ионами, способные обменивать эти ионы на ионы электролитов при контакте с их растворами.

Кристаллизация

Это выделение твердой фазы в виде кристаллов главным образом из растворов и расплавов. Кристаллизация антибиотиков и других биологически активных веществ основана на резком уменьшении их растворимости в результате изменения температуры раствора (обычно понижения, но иногда, например,

в случае эритромицина – повышения) или перевода их в другую плохо растворимую химическую форму. Последнее достигается изменением рН раствора или добавлением соответствующего реагента, часто с одновременным снижением температуры.

Кристаллизация является очень эффективным средством очистки от сопутствующих примесей, что является существенным преимуществом по сравнению с некоторыми другими методами разделения.

Упаривание

Это процесс концентрирования жидких растворов путем частичного удаления растворителя испарением при нагревании жидкости. В ряде случаев упаренный раствор подвергают последующей кристаллизации.

Концентрированные растворы и твердые вещества, получаемые в результате упаривания, легче и дешевле перерабатывать, хранить и транспортировать.

Мембранные методы разделения

К мембранным методам разделения относятся диализ и электродиализ; обратный осмос; микрофильтрация; ультрафильтрация. В основе этих методов лежит явление осмоса – диффузия растворенных веществ через полупроницаемую перегородку, представляющую собой мембрану с большим количеством (до 10^{10} – 10^{12} на 1 м^2) мелких отверстий – пор, диаметр которых не превышает 0,5 мкм.

Под мембраной принято понимать высокопористую или беспористую плоскую или трубчатую перегородку, выполненную из полимерных или неорганических материалов и способную эффективно разделять частицы различных видов (ионы, молекулы, макромолекулы и коллоидные частицы), находящиеся в смеси или растворе. Использование мембран позволяет создавать экономически высокоэффективные и малоотходные технологии.

Среди мембранных процессов особенно интенсивно развиваются баромембранные. Если обратный осмос изучен достаточно полно, то существенно в меньшей мере это касается микрофильтрации и тем более ультрафильтрации, несмотря на ее очевидную перспективность. Границы баромембранных методов разделения четко не определены, что, по-видимому, принципиально невозможно, поскольку микро- и ультрафильтрация и обратный осмос в широких пределах перекрываются как в отношении их физико-химического описания, так и решаемых задач. Следовательно, приведенная классификация барометрических методов разделения в значительной мере условна. Тем не менее каждый из указанных методов имеет свои характерные особенности, на основании которых предложено несколько их классификаций.

Микрофильтрация, в основном, является гидродинамическим процессом, близким к обычной фильтрации. Специфическая особенность микрофильтрации – использование мембран с диаметром пор от 0,1 до 10 мкм для отделения мелких частиц твердой фазы, в том числе микроорганизмов, в этом случае ее называют стерилизующей фильтрацией. Поэтому в отличие от процесса фильтрации при микрофильтрации явления диффузии (особенно при небольших размерах пор от 0,1 до 0,5 мкм) также играют определенную роль.

В основе ультрафильтрации лежит использование мембран с диаметром пор от 0,001 до 0,1 мкм. Ультрафильтрация применяется для разделения клеток и молекул.

Мембранные методы разделения, применительно к биологическим суспензиям, обладают рядом преимуществ:

- 1) концентрирование и очистка осуществляются без изменения агрегатного состояния и фазовых превращений;
- 2) перерабатываемый продукт не подвергается тепловым и химическим воздействиям;
- 3) механическое и аэродинамическое воздействие на биологический материал незначительно;
- 4) легко обеспечиваются герметичность и асептические условия;
- 5) аппаратное оформление компактно по конструкции, отсутствуют движущиеся детали;
- 6) процесс не обладает высокой энергоемкостью, в большинстве случаев энергия затрачивается только на перекачивание растворов.

Заключение к главе 2

Микроорганизмы культивируют на питательных средах. Правильный подбор и использование питательных сред обеспечивает успешное культивирование микробов для накопления биомассы и её биотехнологическое использование для производства диагностических и вакцинных препаратов, определения и идентификации микробов в диагностической лаборатории и научных исследованиях.

В данном разделе были изучены основные принципы культивирования микроорганизмов. Были рассмотрены особенности технологии промышленного культивирования микроорганизмов, способы культивирования микроорганизмов, смешанные и чистые культуры микроорганизмов, накопительные культуры, способы получения чистых культур.

Для успешного культивирования микроорганизмов важно не только правильно подобрать питательную среду и правильно произвести посев, но еще необходимо создать и оптимальные условия: обеспечить соответствующую температуру, влажность, аэрацию.

Задачи к главе 2

Задача №1. Определить удельную скорость роста дрожжей, если их масса равна 20 кг, а скорость роста – 0,5 кг/ч.

Задача №2. Определить время удвоения биомассы дрожжей, если их удельная скорость роста равна 0,025 ч⁻¹.

Задача №3. Рассчитать экономические коэффициенты процесса выращивания дрожжей при 12-часовом цикле, если за это время было израсходовано 1300 кг мелассы с 55%-м содержанием сахара и получено 975 кг дрожжей. При этом в биореактор для культивирования подавалось воздуха 80 м³/час. Калорийность 100 г сахара – 405,5 ккал.

Задача №4. Рассчитать экономические коэффициенты по потреблению азота, фосфора и углерода, если в питательную среду добавляли 52,65 кг $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 16,84 кг $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ и 715 кг глюкозы. Получено 975 кг дрожжей.

Задача №5. Продуцентом антибиотика пенициллина является *Penicillium chrisogenum*. На какой стадии роста культуры происходит образование антибиотика?

Задача №6. При производстве определенного вида биотехнологического продукта предварительно подбирают условия и методы культивирования продуцента. Поясните значение проводимых операций.

Задача №7 При анализе кривой роста *E. coli* выявляется ряд фаз. Поясните, что такое lag-фаза и стационарная фаза.

Тестовые задания к главе 2

1 Метод культивирования зависит от

- а) потребностей организма;
- б) для чего будет использована культура;
- в) конечной цели эксперимента;
- г) все ответы верны;
- д) все ответы неверны.

2 Все известные процессы культивирования микроорганизмов различаются по таким параметрам как

- а) состояние питательной среды;
- б) наличие среды;
- в) наличие или отсутствие перемешивания;
- г) содержание кислорода;
- д) содержание водорода;
- е) количество ферментеров.

3 Простая периодическая культура, содержащая ограниченное первоначальное количество питательного субстрата, служит примером

- а) закрытой системы;
- б) открытой системы;
- в) смешанной системы;
- г) проточной системы.

4 Получение накопительных культур

- а) позволяет получить чистые культуры;
- б) позволяет получить смешанную культуру;
- в) дает возможность оценить присутствие антибиотиков в популяции;
- г) дает возможность оценить различные воздействия факторов окружающей среды на смешанную микробную популяцию.

5 К физическим методам накопления чистой культуры следует относить

- а) регуляцию роста температурой;
- б) регуляцию роста pH;
- в) тепловую и ультразвуковую обработку;
- г) обработку формалином;
- д) обработку антибиотиками;

е) ультрафиолетовое облучение.

6 Накопительные культуры получают в

- а) закрытых системах;
- б) открытых системах;
- в) смешанных системах;
- г) проточных системах.

7 Характеристики периодического метода культивирования включают

- а) внесение посевного материала в питательную среду (инокуляция клетками среды) в ходе процесса;
- б) концентрацию микроорганизмов, которая нарастает и останавливается;
- в) концентрацию микроорганизмов, которая нарастает в ходе всего процесса;
- г) непрерывное изменение физиологического состояния клеток;
- д) неустойчивое состояние культуры;
- е) устойчивое состояние культуры.

8 Системы периодического культивирования являются

- а) закрытыми системами;
- б) открытыми системами;
- в) смешанными системами;
- г) проточными системами.

9 При изучении динамики роста культур микроорганизмов необходимо строго соблюдать некоторые условия:

- а) жизнеспособность засева;
- б) наличие в среде культивирования всех необходимых питательных веществ;
- в) наличие в среде ингибиторов, подавляющих рост клеток;
- г) поддержание в среде всех оптимальных физико-химических условий.

10 Бактерии, внесенные в питательную среду, интенсивно растут, скорость их деления невысока, к концу этой фазы клетки увеличиваются по объему, синтезируют новые ферменты:

- а) фаза стационарного роста;
- б) лаг-фаза;
- в) фаза отрицательного ускорения.

11 Рост в периодической культуре характеризуется

- а) постоянной сменой условий;
- б) увеличением концентрации субстрата;
- в) возрастанием плотности популяции;
- г) уменьшением концентрации субстрата;
- д) постоянной концентрацией субстрата;
- е) постоянной плотностью популяции.

12 Бактерии размножаются с наибольшей скоростью, число клеток увеличивается в геометрической прогрессии.

- а) фаза отрицательного ускорения;
- б) стационарная фаза;

в) фаза экспоненциального роста.

13 Рост в непрерывной культуре характеризуется

- а) постоянной сменой условий;
- б) увеличением концентрации субстрата;
- в) возрастанием плотности популяции;
- г) уменьшением концентрации субстрата;
- д) постоянной концентрацией субстрата;
- е) постоянной плотностью популяции.

14 В период фазы ускорения роста происходит

- а) высокое потребление питательных веществ;
- б) накопление продуктов обмена;
- в) усиление синтеза вещества;
- г) накопление метаболитов;
- д) все ответы верны.

15 Глубинное культивирование в ферментерах по сравнению со статическим

и поверхностным имеет ряд отличий

- а) ускоряет рост и развитие микроорганизмов;
- б) замедляет рост и развитие микроорганизмов;
- в) позволяет получать гомогенную культуру «идеального смешения»;
- г) не позволяет получать биомассу.

16 Продленный периодический процесс культивирования предусматривает

- а) одноразовую загрузку и разгрузку ферментера;
- б) многоразовую загрузку ферментера;
- в) одноразовую разгрузку ферментера;
- г) многоразовую разгрузку ферментера.

17 Система полного вытеснения представляет собой проточный вариант

- а) закрытой системы;
- б) открытой системы;
- в) смешанной системы.

18 Продленный периодический процесс культивирования предусматривает

- а) одноразовую загрузку и одноразовую разгрузку ферментера;
- б) многоразовую загрузку и многоразовую разгрузку ферментера;
- в) одноразовую загрузку и многоразовую разгрузку ферментера;
- г) многоразовую загрузку и одноразовую разгрузку ферментера.

Контрольные вопросы:

1. Особенности микробного роста на жидких питательных средах.
2. Что такое непрерывное культивирование? Как его осуществляют?

Область применения и примеры.

3. Кинетика роста микроорганизмов
4. Использование факторов внешней среды для регулирования микробиологических процессов.
5. Какие требования предъявляются к выбору биореакторов

6. Какие параметры необходимо контролировать при работе биореакторов
7. Методы регуляции биосинтеза биологически активных веществ в условиях промышленного производства
8. Особенности подбора ферментеров для реализации промышленных биотехнологических процессов
9. Механизм регуляции первичных микробных метаболитов.
10. Механизм регуляции биосинтеза вторичных микробных метаболитов
11. Принцип жидкофазной ферментации.
12. Периодический способ культивирования.
13. Многоциклические процессы культивирования, типы.
14. Полунепрерывные системы культивирования.
15. Непрерывный способ культивирования.
16. Хемостатное культивирование.
17. Турбидостатное культивирование.
18. Системы культивирования полного вытеснения

3 НАПРАВЛЕННЫЙ МИКРОБНЫЙ СИНТЕЗ АМИНОКИСЛОТ, ФЕРМЕНТОВ, СПИРТА, ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ И ВИТАМИНОВ

3.1 Принципы биотехнологического производства веществ-метаболитов

Спектр целевых продуктов, получаемых методами биотехнологии необычайно широк и разнообразен. Например, одноклеточные организмы используют для получения биомассы, являющейся источником кормового белка. Клетки, особенно в иммобилизованном состоянии, могут выступать в роли биологических катализаторов для процессов биотрансформации.

Процессами биотрансформации называют реакции превращения исходных органических соединений (предшественников) в целевой продукт с помощью клеток живых организмов или ферментов, выделенных из них. В последние годы высокая специфичность процессов биотрансформации и эффективность иммобилизованных ферментов нашли широкое применение для крупномасштабного производства аминокислот, антибиотиков, стероидов и других промышленно важных продуктов.

Продуктами биотехнологических производств являются природные макромолекулы — белки, ферменты, полисахариды, полиэферы, выделенные из клеток микроорганизмов, тканей и органов растений и животных.

Центральное звено биотехнологического процесса — живая клетка, в которой одновременно синтезируется великое множество разнообразных соединений. В норме обмен веществ в клетке осуществляется по принципам строгой экономии, что обеспечивается сложнейшей системой регуляции обмена веществ.

Задача биотехнолога состоит в обеспечении сверхсинтеза одного из продуктов метаболизма, что достигается как путем изменения генетической программы организма, так и посредством нарушения регуляторных систем метаболизма в нем.

По отношению к процессу роста низкомолекулярные продукты метаболизма живых клеток делятся на первичные и вторичные метаболиты (рис. 3.1).

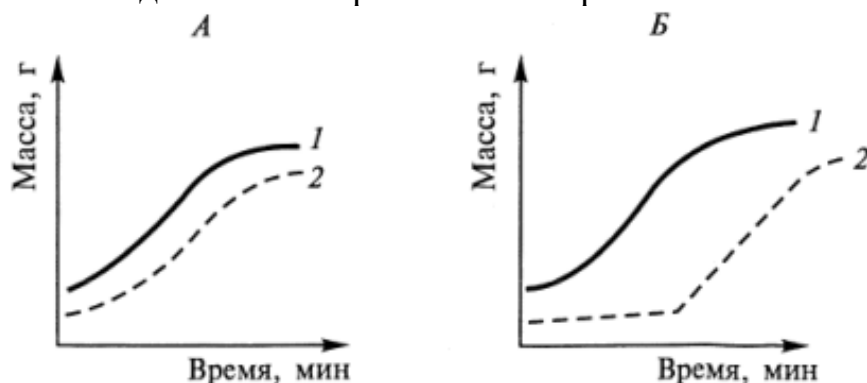


Рисунок 3.1 Динамика накопления биомассы и образования первичных (А) и вторичных (Б) метаболитов в процессе роста культуры микроорганизма.

1-биомасса, 2 - продукт

Первичные метаболиты – это низкомолекулярные соединения необходимые для роста микроорганизмов. Их молекулярная масса менее 1500 дальтон. Это аминокислоты, витамины, органические кислоты. Микробная клетка не производит избытка этих метаболитов, а, следовательно, не накапливает их, но есть микроорганизмы с нарушением обмена веществ, их используют в биотехнологии для получения необходимых веществ. Разработано две методики получения первичных метаболитов: накопление промежуточных продуктов или ограничение синтеза конечного продукта.

Вторичные метаболиты – антибиотики, пигменты, токсины, стероиды (на среде с индуктором). низкомолекулярные соединения, не требующиеся для выживания клеток и образующиеся по завершении фазы их роста. Принципы получения вторичных метаболитов основаны на особенностях их образования клетками микроорганизмов. Биосинтез вторичных метаболитов фазоспецифичен и происходит после завершения стадии роста.

При биосинтезе вторичных метаболитов установлено влияние следующих регуляторных механизмов:

1. Индукция ферментов: индуктор стимулирует синтез фермента, но в структуру вторичного метаболита не включается.
2. Регуляция по принципу обратной связи (репрессия конечным продуктом в разветвленной схеме биосинтеза).
3. Катаболическая регуляция (используется для получения пенициллина).

Микроорганизмы осуществляют множество реакций, которые катализируются различными ферментами. Все эти процессы катализируют сотни ферментов, которые в свою очередь синтезирует клетка.

Регуляция клеточного метаболизма идет на двух уровнях:

1. На уровне регуляции синтеза ферментов.
2. На уровне регуляции активности ферментов

РЕГУЛЯЦИЯ НА УРОВНЕ СИНТЕЗА

Синтез каждого фермента регулируется отдельным геном. Несмотря на постоянство генотипа микроорганизмы очень подвижны в отношении к своему составу и метаболизму в ответ на окружающую среду.

Существуют два вида ферментов:

1. Ферменты, которые синтезируются вне зависимости от окружающей среды – это конститутивные ферменты (эндоферменты) или ферменты анаболизма (синтеза). Их образование осуществляется путем регуляции по принципу обратной связи, а именно ингибирования или репрессии.
2. Ферменты, которые образуются только тогда, когда в среде присутствуют их субстраты. Это так называемые индуцибельные ферменты или ферменты катаболизма, т.е. те ферменты, которые участвуют в использовании субстратов (питательных веществ) - экзоферменты. Изменение количества индуцибельных ферментов в клетке происходит под действием индукции или катаболической регуляции.

РЕГУЛЯЦИЯ НА УРОВНЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

Регуляция на уровне активности ферментов свойственна ключевым ферментам обмена веществ. Активность повышается под действием положительного эффектора и снижается под действием ингибитора (отрицательного эффектора).

В процессе ретроингибирования (ингибирование по принципу обратной связи) активность фермента, стоящего в начале многоступенчатого превращения субстрата, тормозится конечным метаболитом:

На обмен веществ, аналогичный конечным метаболитам, оказывают эффект их аналоги. Указанное обстоятельство используется для селекции организмов с нарушением механизма обратной связи. Обход механизма ретроингибирования делает объект биотехнологического процесса нечувствительным к концентрации конечного продукта.

Борьба с ретроингибированием

1. Создание мутантных штаммов, которых фермент бы не имел аллостерического центра.

2. Удаление накапливающегося целевого продукта: ферментацию в этом случае осуществляют с сорбентом (активированным углем), на котором триптофан сорбируется.

3. Действие на аллостерический центр специальных активатором – аллостерических эффекторов, которые более активно связываются с аллостерическим центром, чем ингибитор (триптофан).

Для отбора объектов продуценты выращивают на селективной среде, содержащей подходящий аналог, что ведет к подавлению роста организма. Выжившие мутанты обладают дефектами в **механизме регуляции активности фермента** по принципу обратной связи и поэтому служат важными объектами в обеспечении сверхсинтеза целевого продукта. Если концентрация конечного продукта уменьшается до определенного очень низкого уровня, то происходит дерепрессия фермента, т. е. скорость их биосинтеза возрастает до необходимых величин

РЕГУЛЯЦИЯ СИНТЕЗА ФЕРМЕНТОВ КАТАБОЛИЗМА КЛЕТКИ

1. Индукция – это регуляция синтеза ферментов реакций разложения. Индукция относительно повышает скорость синтеза ферментов в ответ на присутствие в среде определенного химического вещества – индуктора (субстрат, его аналог, продукты реакции). Индукция обеспечивает клетке возможность использовать аминокислоты и энергию для синтеза тех ферментов, которые необходимы ей в данный момент.

2. Катаболитная регуляция – если в среде находится несколько субстратов, которые клетка способна использовать, она выбирает наилучший и вырабатывает ферменты для его использования. Обычно это глюкоза. По мере ее потребления синтезируется фермент для расщепления другого субстрата и т.д.

Сущность **катаболитной репрессии** заключается в подавлении биосинтеза ферментов, обеспечивающих метаболизм одного источника углерода другим источником углерода.

Важным условием, обеспечивающим высокую скорость того или иного метаболического пути, является концентрация субстратов. Она может зависеть от интенсивности протекания других процессов, в которых также расходуются эти субстраты (конкуренция), или скорости транспорта данных веществ через мембраны (плазматическую или органелл). Кроме того, скорость метаболических процессов определяется концентрацией кофакторов. Например, гликолиз и ЦТК регулируются доступностью ADP на уровне изменения активности ключевых аллостерических ферментов.

У эукариотических клеток важную роль в регуляции и интеграции клеточного обмена играет компартментализация, т.е. разграничение метаболизма в пространственно разделенных мембраной участках клетки (компартаментах). Избирательная проницаемость мембран определяет судьбу ряда метаболитов. Скорость трансмембранного переноса веществ, их взаимодействие с мембраной служат сигналом изменения состояния клетки, направленности в ней метаболических путей

Механизмы индукции и репрессии предохраняют клетку от напрасной траты аминокислот и энергии на образование ненужных в данных условиях ферментов. С другой стороны, если появляется необходимость, эти ферменты могут быстро синтезироваться.

Из многих тысяч ферментов микробные клетки в процессе роста способны синтезировать постоянно и не зависимо от питательной среды так называемые конститутивные ферменты (примером таких ферментов являются ферменты гликолиза, превращающие глюкозу в пируват).

Другие ферменты, называемые адаптивными или индуцибельными, образуются только тогда, когда их субстраты (или структурные аналоги субстратов) присутствуют в среде. Например, клетки *E.coli.*, которые растут на среде с глюкозой, содержат только следы ферментов метаболизма лактозы. Если же эти клетки перенести в среду, содержащую в качестве единственного источника углерода лактозу, то можно наблюдать значительное повышение активности бета-галактозидазы. Этот фермент способен гидролизовать лактозу на D-галактозу и D-глюкозу. Это пример индукции фермента. Клетка получает возможность полностью усвоить лактозу в результате последовательной индукции ферментов, которые превращают лактозу в метаболиты, непосредственно используемые клеткой.

Индукция фермента – это относительное увеличение скорости синтеза фермента в ответ на появление химического соединения – индуктора. Явление индукции ферментов впервые было изучено лауреатами Нобелевской премии Ф. Жакобом и Ж. Моно.

3.2 Основы направленного микробного синтеза продуктов биотехнологического производства

Микробный синтез осуществляется внутри клетки. Затем многие метаболиты выводятся из клетки в среду.

Характерная особенность микроорганизмов — их способность к сверхсинтезу, т. е. избыточному образованию некоторых продуктов обмена веществ (многих аминокислот, нуклеотидов, витаминов), превышающему потребность микробной клетки. Способность к сверхсинтезу того или иного соединения свойственна определённым видам микроорганизмов, которыми, как правило, и пользуются в качестве продуцентов при производстве соответствующих метаболитов. При этом применяют не только культуры, отобранные из природных источников, но и специально выведенные искусственным путём штаммы, у которых сверхсинтез — следствие нарушений обмена веществ.

Нарушение в обмене веществ, приводящее к сверхсинтезу метаболитов, часто бывают следствием изменения в геноме клетки микроорганизма продуцента. Спонтанные изменения генетической природы организма — продуцента основаны на процессах рекомбинации генетического материала *in vivo* (амплификация, конъюгация, трансдукция, трансформация и пр.). Для выделения из природных популяций высокопродуктивных штаммов микроорганизмов используют методы селекции, т. е. направленного отбора организмов со скачкообразным изменением геномов. Методы слепого многоступенчатого отбора случайных мутаций чрезвычайно длительны и могут занимать целые годы. Для возникновения мутаций интересующий ген должен удвоиться $106—108$ раз.

Более эффективен метод искусственного повреждения генома. Таким методом является индуцированный мутагенез, основанный на использовании мутагенного действия ряда химических соединений (гидроксиламин, нитрозамины, азотистая кислота, бромурацил, 2-аминопурин, алкилирующие агенты и др.), рентгеновских и ультрафиолетовых лучей. Мутагены вызывают замены оснований в составе ДНК, а также индуцируют мутации, приводящие к сдвигу рамки считывания информации.

Несмотря на трудоемкость методов селекции, они не потеряли своего значения для создания высокоэффективных микроорганизмов — продуцентов и оказались перспективными для оценки влияния на объекты различных факторов среды — ионов тяжелых металлов, кислот, щелочей и др.

Достижения в области молекулярной биологии и молекулярной генетики позволили биотехнологам начиная с 70-х годов прошедшего столетия перейти от слепого отбора штаммов мутантов к сознательному конструированию геномов, используя для этой цели прогрессивную технологию рекомбинантной ДНК.

Камнем преткновения часто является неполное знание биохимических путей синтеза того или иного соединения и недостаточная разработанность генетики многих промышленных штаммов. Именно поэтому до сих пор не создан указанным методом ни один штамм — продуцент антибиотиков, очень ограничено число штаммов — продуцентов первичных и вторичных метаболитов.

Изучение метаболома отдельных микробиологических культур, создание метаболических профилей, а также детальное изучение метаболитов микроорганизмов на разных стадиях роста расширит возможности микробиологического синтеза.

Для того, чтобы получить какое-либо вещество микробиологическим путем, необходима соответствующая культура микроорганизмов, необходимо знать физиологию микроорганизмов этой культуры (т. е. комплекс процессов, протекающих в клетке, и условия, определяющие их протекание в необходимом направлении). В промышленности биологические процессы осуществляются не только с помощью микроорганизмов, но и при помощи клеток или тканевых культур растений и животных, а также при использовании изолированных ферментов.

Провести микробиологический синтез на практике означает культивировать избранную культуру микроорганизмов в питательной среде определенного состава, строго соблюдать технологию, а также ограничить или полностью исключить нежелательную микрофлору. **Микробиологический синтез использует способность некоторых организмов размножаться с большой скоростью и выделять избыточные количества продуктов обмена веществ (аминокислот, витаминов и др.), во много раз превышающие потребности микробной клетки.**

Такие микроорганизмы-продуценты выделяют из природных источников или получают мутантные штаммы, более активные, чем природные. В последние годы в качестве продуцентов применяют культуры, полученные методами генной инженерии, в которых функционирует чужеродный для них ген. Исходным сырьем для микробиологического синтеза органических соединений служат дешевые источники азота (нитраты) и углерода (углеводороды, углеводы, жиры).

Промышленный биотехнологический процесс, в котором для производства коммерческих продуктов используют клеточные системы или микроорганизмы, обычно включает три ключевые стадии:

- подготовительную (обработка сырья, используемого в качестве источника питательных веществ, и приготовление, если это необходимо, питательных сред);
- биотехнологическую (рост микроорганизмов в большом биореакторе (ферментация) с последующим образованием нужного метаболита, например антибиотика, аминокислоты или белка (биотрансформация));
- получения готовой продукции (очистка целевого продукта от компонентов культуральной среды или от клеточной массы).

Подготовительная стадия необходима для приготовления сырья, используемого в биотехнологическом процессе. В зависимости от целевого продукта, при этом предусматриваются:

- *приготовление среды*, включающей необходимые компоненты питания для организмов, и ее стерилизация (для асептических биотехнологиче-

ских процессов, при которых нежелательно попадание посторонней микрофлоры);

- *подготовка и стерилизация газов* (обычно воздуха) путем очистки от пыли, влаги и присутствующих в воздухе микроорганизмов, включая споры;
- *подготовка посевного материала*, в том числе культивирование микроорганизмов, изолированных клеток растений или животных;
- *подготовка биокатализатора* — либо фермента в свободном или закрепленном на носителе виде, либо биомассы микроорганизмов, выращенных до состояния, в котором проявляется их активность;
- *предварительная обработка сырья*.

Биотехнологическая стадия — основная в биотехнологическом производстве. Именно на этой стадии с использованием того или иного биологического агента (микроорганизмов, изолированных клеток, ферментов или клеточных органелл) происходит преобразование сырья в тот или иной целевой продукт. Главной целью является получение определенного органического вещества.

Получение готовой продукции — заключительная стадия технологического процесса биотехнологического производства. Чаще всего целевой продукт находится либо в самой биомассе, либо в жидкости. В зависимости от свойств биомассы и жидкости, для их разделения могут быть использованы различные методы:

- — *отстаивание* — разделение под действием гравитационных сил;
- — *фильтрация* — пропускание суспензии через фильтрующий материал, на котором задерживаются частицы твердой фазы — биомасса.
- — *сепарация, центрифугирование* — разделение под действием центробежных сил. Наиболее часто используют для отделения дрожжей или бактерий в производстве кормовой биомассы;
- — *микрофильтрация, ультрафильтрация* — пропускание суспензии через мембраны с весьма малым размером пор, обеспечивающее удерживание клеток микроорганизмов на мембране и получение чистого раствора. При ультрафильтрации отделяются не только клетки, но и крупные молекулы растворенных веществ;
- — *коагуляция* — добавление в суспензию реагентов, способствующих образованию и осаждению более крупных клеточных частиц и отделению их от жидкости методом отстаивания;
- — *флотация* — захват микроорганизмов пузырьками пены и выделение их из пенной фракции.

Целевые продукты биосинтеза могут быть внеклеточными и внутриклеточными.

Для внутриклеточных продуктов сначала необходимо разрушить оболочку клеток. Это можно осуществить *дезинтеграцией клеток*, разрушив клеточную оболочку физическими методами (с помощью мелющих тел, путем замораживания и продавливания, воздействием ультразвуком, методом декомпрес-

сии — резкого сброса давления) или химическими и биотехнологическими методами. Используют также *гидролиз* (разрушение клеточных оболочек под действием химических реагентов и температуры), *ферментолиз* (разрушение клеточных оболочек под действием ферментов при повышенной температуре) или *автолиз* (разновидность ферментолиза, когда используют собственные ферменты клетки).

После проведения какой-либо из вышеперечисленных операций дальнейшее выделение целевого продукта осуществляют методами, общими для внеклеточных и внутриклеточных продуктов. Основными из них являются:

- *экстракция* — переход целевого продукта из водной фазы в не смешивающуюся с водой органическую жидкость (экстрагент).
- *осаждение* — выделение целевого продукта путем добавления к жидкости реагента, взаимодействующего с растворенным продуктом и переводящего его в твердую фазу;
- *адсорбция* — перевод растворенного в жидкости продукта в твердую фазу путем его сорбции на специальных твердых носителях (сорбентах);
- *ионный обмен* — в твердую фазу переходят ионы (катионы или анионы), а не молекула целевого продукта или примеси;
- *отгонка, ректификация* — выделение растворенных в культуральной жидкости легкокипящих продуктов, например, этилового спирта;
- *ультрафильтрация, нанофильтрация и обратный осмос* — выделение высокомолекулярных соединений (белков, полипептидов, полинуклеотидов). Обратный осмос и нанофильтрация позволяют отделять даже небольшие по размеру молекулы;
- *центрифугирование, ультрацентрифугирование* — выделение вирусов, клеточных органелл, высокомолекулярных соединений.

Очистка необходима для получения биопродуктов высокой степени чистоты. Основной целью является удаление примесей, что достигается с помощью экстракции, адсорбции, ионного обмена, ультрафильтрации, обратного осмоса, ректификации и ферментолиза, которые были рассмотрены ранее. Кроме перечисленных, используют и другие процессы, такие, как:

- *хроматография* — процесс, напоминающий адсорбцию. На твердом сорбенте собираются растворенные вещества, часто близкие по структуре (например, смеси белков, нуклеотидов, сахаров, антибиотиков). При адсорбции они десорбируются вместе, а вот при хроматографии они выделяются из сорбента как бы по очереди, что позволяет отделить их друг от друга;
- *диализ* — процесс, в котором через полупроницаемую пленку могут проходить низкомолекулярные вещества, а высокомолекулярные остаются;
- *кристаллизация* — процесс, основанный на различной растворимости веществ при разных температурах. Медленное охлаждение позволяет формировать кристаллы из растворов целевых продуктов, причем чистота их обычно очень высока. Таким образом, например, получают кристаллы пенициллина. Можно даже получить еще более чистый продукт, если кристаллы растворить в

воде или растворителе, а потом снова кристаллизовать (т. е. провести процесс *перекристаллизации*).

Концентрирование продукта повышает его выход. Известно, что после биотехнологической стадии содержание продукта обычно составляет примерно 0,1—1 %, после стадии отделения биомассы — 0,1—2 %, после стадии выделения — 1—10 %, после стадии очистки — 50—80 % и, наконец, после стадии концентрирования — 90—100 %.

На стадии концентрирования применяют такие процессы, как выпаривание, сушка, осаждение, кристаллизация, фильтрация, ультрафильтрация, гиперфильтрация или нанофильтрация, обеспечивающие как бы отжим растворителя из раствора.

Получение готовой формы продукта завершает биотехнологическое производство. Продукт приобретает товарную форму за счет проведения процессов *гранулирования* (формирование гранул из порошка или прямо из раствора), *дражирования*, *таблетирования* (формирование драже, таблеток), *розлива* или *фасовки*, *ампулирования* (затаривания в ампулы).

Заключение к главе 3

Известно, что рост клетки, ее нормальное функционирование и даже само выживание зависит от того, насколько эта клетка обладает способностью управлять процессами биосинтеза, а также вносить качественные преобразования в работу метаболического аппарата, отвечая на изменение условий среды. Такие функции клетки потребовали развития и наследственного закрепления весьма сложных и тонких регуляторных механизмов, обеспечивающих прежде всего экономичность метаболических процессов и, конечно, высокий уровень их координации.

Часто цели биотехнологов, направленные на усиление образования того или иного продукта, или синтез нового продукта, естественно встречают сопротивление клетки, желающей сохранить свою стабильность, что влечет за собой изменение регуляторных механизмов клетки.

Задачи к главе 3

Ситуационная задача №1.

В среду, где находятся бактерии кишечной палочки, добавлена лактоза. Используя знания теории оперона Ф.Жакоба и Ф.Моно, объясните какие механизмы регуляции будут работать в бактериальных клетках?

1. Как устроен лактозный оперон?

2. Как он работает по типу индукции?

3. Какое значение в работе имеет зона терминатор?

4. Почему при работе оперона образуется полицистронная и-РНК?

5. Каков механизм репрессии оперона при избыточном образовании конечного продукта?

Ситуационная задача №2.

Одной из важных функций поверхностного аппарата клеток является транспорт веществ. Знание поверхностного аппарата помогло понять механизмы транспорта ионов и веществ, в том числе лекарственных, используемых в медицинской практике.

1. Как устроен поверхностный аппарат животных клеток?
2. Какие функции он выполняет?
3. Что такое гликокаликс и какова его роль?
4. Приведите примеры активного и пассивного транспорта веществ.

Тестовые задания к главе 3

1. Селекция – процесс ...
 - А) одомашнивания животных
 - Б) изменения живых организмов человеком для своих потребностей
 - В) изучения многообразия и происхождения культурных растений
2. В селекции микроорганизмов широко используется:
 - А) экспериментальный мутагенез
 - Б) стихийный отбор
 - В) получение гетерозиса
 - Г) самоопыление
3. Направление биотехнологии, основанное на культивировании клеток и тканей высших организмов — растений и животных, называется
 - А) методом выведения микроорганизмов, синтезирующих разные вещества
 - Б) микробиологическим синтезом
 - В) клеточной инженерией
 - Г) генной инженерией
4. Метод слияния клеток, позволяющий получить гибриды между видами, не скрещивающимися в природе, называется
 - А) микробиологическим синтезом
 - Б) генной инженерией
 - В) биотехнологией
 - Г) методом гибридизации соматических клеток
5. Метод выращивания клеток на специальных питательных средах называется методом
 - А) гибридизации соматических клеток
 - Б) культивирования клеток и тканей
 - В) искусственного изменения генотипа
 - Г) гетерозиса
6. Исследованиями по перестройке генотипа занимается
 - А) клеточная инженерия
 - Б) микробиологический синтез
 - В) генная инженерия
 - Г) метод культивирования клеток и тканей
7. Наука об использовании биологических объектов в народном хозяйстве называется
 - А — биофизикой

В — биохимией
Б — генетикой
Г — биотехнологией

Вопросы для самоконтроля

1. Принципы биотехнологического производства веществ-метаболитов.
2. Направленный синтез нутриентов и пищевых БАВ
3. Методы регуляции биосинтеза биологически активных веществ в условиях промышленного производства.
4. Механизмы внутриклеточной регуляции и биосинтез целевых биологических продуктов
5. Механизм регуляции первичных микробных метаболитов.
6. Механизм регуляции биосинтеза вторичных микробных метаболитов
7. Почему белковую молекулу называют полимером? Что является ее мономером?
8. Какие функции белков вам известны?
9. Какие типы нуклеиновых кислот вы знаете? Назовите их функции.

4 КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИЦЕЛИЯ И ПЛОДОВЫХ ТЕЛ ВЫСШИХ БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ

4.1 ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

В первой половине двадцать первого века объемы производства грибов значительно выросли. В 2023 году стоимость мирового производства культивируемых грибов оценивалась примерно в 110 миллиардов долларов США, что почти соответствует стоимости производства кофе. Основной прирост отмечается в Китае, Японии, США, Индии и в странах Европы, в которых в промышленных масштабах выращивают шампиньон двуспоровый (*Agaricus bisporus*, около 32% мирового производства грибов), вешенку обыкновенную (*Pleurotus ostreatus*), шиитаке (*Lentinus edodes*), еноки (*Flammulina filiformis*), трютовик лакированный (*Ganoderma lucidum*), чешуйчатку съедобную (*Pholiota nameko*), грифолу курчавую (*Grifola frondosa*) и др. Лидером по культивированию высших грибов является Китай, занимающий 87% рынка с объемом производства около 40 млн. тонн в год (рис. 4.1а).

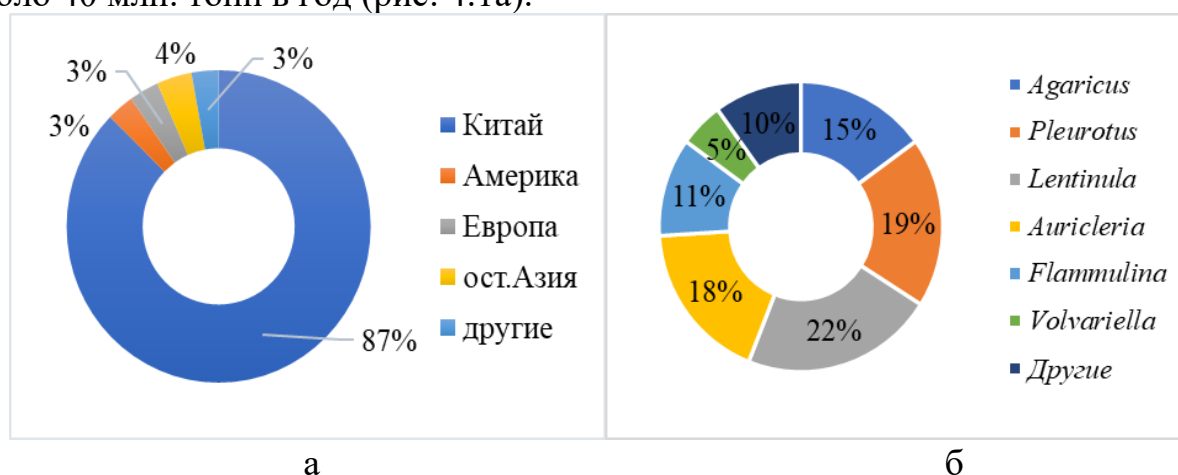


Рисунок 4.1. Мировое производство высших грибов

а) структура культивирования грибов по странам мира;

б) примерная структура мирового производства съедобных грибов

Соответственно возросло глобальное потребление грибов на душу населения: за последнее десятилетие – примерно с 1 до более 4 кг/год, причём на грибы *Agaricus*, *Pleurotus*, *Lentinula*, *Auricleria* и *Flammulina* приходится до 85% мирового производства (рис. 4.1б).

В России также наблюдается тенденция к росту производства грибов, с ежегодным приростом около 110 тыс. тонн. Основной причиной такой динамики называется рост информированности потребителей о роли компонентов грибов в структуре рациона и так называемом «здоровом питании».

Выращенные в коммерческих целях грибы доступны в свежем, замороженном или консервированном виде. Они являются полезными и универсальными ингредиентами, которые можно добавлять во многие блюда – пиццу, запеканки, салаты, супы и др. Например, в Японии свежие и сушеные шиитаке (*Lentinula edodes*) используются в приготовлении блюда – «Якудзен». Это блюдо можно приготовить разными способами: отварить, пожарить на гриле, нани-

зять на шампур или запечь в алюминиевой фольге с различными приправами. Концентраты, полученные из свежих плодовых тел или сухих порошкообразных грибов, используются в приготовлении напитков.

Культивируемые грибы используются не только в пищевых целях, но и в качестве сырья для получения лекарственных препаратов и биологически активных добавок к пище. Около 80% лекарственных препаратов и функциональных пищевых ингредиентов получают из плодовых тел, 15% – из мицелия, и 5% производят из культуральной жидкости. Несмотря на повышение требований к качеству и стандартизации продукции, доля биотехнологических препаратов на рынке постоянно увеличивается. Одним из основных условий использования грибов в качестве пищевого сырья, лекарственных препаратов и БАД является их непрерывное производство в больших количествах стандартизированного качества.

В числе высших грибов, характеризующихся способностью образовывать плодовые тела, выделяют несколько отделов: аскомицеты (*Ascomycota*), базидиомицеты (*Basidiomycota*) и дейтеромицеты (*Deuteromycota*). К наиболее перспективным относят высшие грибы отдела *Basidiomycota* – около 30% всех видов грибов, включая 80 семейств, 550 родов и примерно 10 000 видов.

Диагностическим признаком базидиомицетов является наличие базидий, несущих базидиоспоры. Типичная базидия высших базидиомицетов асептатна и имеет четыре одноклеточные гиалиновые или окрашенные гаплоидные базидиоспоры (баллисто- или статизмоспоры), распространяющиеся преимущественно по воздуху. Типичный жизненный цикл включает прорастание базидиоспор с образованием перегородчатого первичного (гаплоидного) мицелия. В дальнейшем при диплоидизации гомо- или гетероталличный первичный мицелий превращается во вторичный (дикариотический) мицелий. Перед развитием базидиоспор в молодой базидии происходит слияние ядер и мейоз. Характерная макроскопическая базидиома обычно мясистая и принимает разнообразные формы. По характерным признакам высшие базидиомицеты подразделяют на наземные или гипогенные, буроугольные или сапробиозные, микоризные и патогенные, а также съедобные, лекарственные, галлюциногенные и ядовитые грибы.

Высшие базидиальные грибы используются медициной и пищевой промышленностью Китая, Японии, Кореи, США, Канады, стран Европы, России. В отечественной медицине экстракт чаги (*Inonotus obliquus*) применяют как противоопухолевое и мочегонное средство. Важно отметить потенциальную значимость новых видов съедобных и лекарственных грибов, культивируемых в промышленных масштабах, например, *Tremella* spp., *Coprinus comatus*, *Hypsizygus* spp., *Dictyophora* spp., которые перспективны для разработки функциональных продуктов питания. Значительный интерес представляют поиск новых биологически активных соединений из высших базидиомицетов и изучение их пищевой и лекарственной ценности.

4.1.1 Твердофазное и глубинное культивирование высших грибов

Грибы – эукариотические организмы, осуществляющие биологические процессы, основанные, по существу, на тех же принципах, что и биологические процессы у высших эукариот. Это интересные и полезные микроорганизмы, которые демонстрируют высокий уровень секреции белка, продукции метаболитов и метаболической универсальности.

По этим причинам они все чаще используются для крупномасштабного производства ферментов и широкого спектра химических и фармацевтических препаратов, а также других продуктов, таких как биологических агентов в биоконверсии отходов производств (сельскохозяйственного производства, деревообрабатывающей промышленности).

Твердофазное культивирование используется с древних времен, но культивирование этим методом было модернизировано в результате исследований, проведенных за последние 25 лет. Применяя современные концепции микробиологии, биохимии и биохимической инженерии, можно получить более контролируемые процессы, которые можно применять для более сложных целей. Твердофазная ферментация определяется как микробная культура, которая развивается на поверхности и внутри твердой матрицы, а также в отсутствии свободной воды.

Твердофазное культивирование – это биотехнологический процесс, который протекает в массе измельченного и влажного твердого субстрата, имеющего различную форму и размеры частиц. Этот метод культивирования предназначен для биоконверсии растительного сырья в более ценные продукты, такие как: плодовые тела, кормовые добавки, вторичные ферменты и метаболиты.

Получение плодовых тел методом твердофазного культивирования можно разбить на 6 основных этапов:

- *приготовление субстрата (измельчение, увлажнение, термообработка);*
- *инокуляция (внесение мицелия в субстрат);*
- *инкубация (заращение субстрата мицелием);*
- *инициация плодообразования;*
- *плодообразование;*
- *плодоношение.*

Выход биомассы грибов в объемном и хорошем состоянии зависит прежде всего от качественно приготовленного субстрата.

Субстраты должны содержать все необходимые питательные вещества (крахмал, целлюлоза, сахара в качестве источников углерода; мочевины, белки как источник азота, а также минеральные вещества) в правильном соотношении для роста грибов.

Увеличение мицелиальной культуры грибов зависит не только от состава питательной среды, но и от условий культивирования. Условия, которые регулируют, влияют на рост и метаболизм высших базидиомицетов в культуре, являются температура, влажность субстрата, pH питательной среды, аэрация. Для большинства грибов нижний предел, при котором прекращается рост клеток, –

0-3°C, а верхний не превышает +40°C. Однако, отсутствие роста у грибов при температуре ниже нуля не означает их гибель. Лучший диапазон pH для мицелия большинства видов грибов слабокислая (5,0-7,0). Рост мицелия подавляется в крайне низких pH.

Культивирование, как правило, проводят на агроостатках, включая лигноцеллюлозные материалы, а также отработанное пивоваренное зерно, отходы бумажной и деревообрабатывающей промышленности. Преимущество твердофазного культивирования на естественных твердых субстратах заключается в снижении производственных затрат за счет использования сельскохозяйственных отходов, что дополнительно способствует решению экологических проблем, вызванных их утилизацией.

На сегодняшний день имеется две основных технологии подготовки субстрата: *аэробная ферментация и стерилизация субстрата*.

Стерилизация субстрата приводит к повышению урожайности за счет увеличения доступности субстрата из-за неполного гидролиза его составляющих элементов при термообработке.

Важным преимуществом твердофазного культивирования по сравнению с другими методами является то, что концентрированный продукт можно получить из дешевого субстрата, такого как сельскохозяйственные или деревообрабатывающие отходы, с небольшой предварительной обработкой или обогащением. С другой стороны, использование неопределенной среды, такой как опилки, может затруднить очистку продукта. Также, твердофазное культивирование обладает таким преимуществом, по сравнению с глубинным, как использование меньшего количества энергии (и-за отсутствия механического перемешивания).

Несомненно, каждый метод имеет свои недостатки и твердофазное культивирование не исключение. К недостаткам данного метода можно отнести: длительное время культивирования; затрудненное наблюдение за параметрами ферментации (температура, pH); а также, из-за высокой концентрации твердых частиц, отсутствие аэрации. Увеличение температуры за счет выделения метаболического тепла может приводить к комкованию субстрата в нижних слоях и уменьшению влажности в верхних слоях, что тормозит рост грибов.

С помощью методов глубинного культивирования возможно получение лекарственных препаратов из биомассы грибов. Этот метод набирает все большее развитие.

Получение таких препаратов основывается на научных исследованиях, которые показали, что в мицелии, при глубинном культивировании, сохраняются важные биологически активные вещества (БАВ).

Отличие глубинного культивирования от твердофазного, заключается в том, что мицелий растет в толще аэрируемой питательной среды и имеет одинаковые условия. Постоянная аэрация и механическое перемешивание позволяет накапливать продукты обмена, а также мицелий разрастается гораздо быстрее. Соответственно, глубинное культивирование позволяет сократить время ферментации и увеличить количество получаемого продукта.

Основное различие между методом глубинного и твердофазного культи-

вирования заключается в количестве свободной жидкости в субстрате. В случае глубинного культивирования количество растворенных твердых веществ редко превышает 5-10 % по весу (около 50-100 г/л), тогда как при твердофазном культивировании твердые вещества обычно составляют от 60 до 80 % от общего количества массы субстрата.

Метод глубинного культивирования имеет ряд преимуществ перед твердофазной ферментацией: возможность регулировать состав комплекса биологически активных веществ; снизить продолжительность процесса в 8-10 раз; проще контролировать параметры ферментации (температура, рН среды, перемешивание). При всем этом, пищевая ценность мицелия грибов, которые были выращены способом глубинного культивирования, по содержанию в них белка, незаменимых аминокислот, витаминов сопоставима с плодовыми телами.

Преимущества и основные различия между твердофазным и глубинным способами культивирования приведены в таблице 4.2.

Таблица 4.1. Сравнение твердофазного и глубинного культивирования

Твердофазное культивирование	Глубинное культивирование
Среда относительно простая (опилки, зерно и т.д.) и неочищенная. Она может содержать все необходимые для роста питательные вещества или требовать только добавления минеральных компонентов. Предварительная обработка может быть простой, как варка или измельчение. Однако, состав и характеристики субстрата могут варьироваться	Среда обычно содержит компоненты с более высокой степенью обработки и, следовательно, она более дорогая. Необработанные компоненты могут нуждаться в обработке для извлечения и растворения питательных веществ (обычно среду обрабатывают автоклавированием, стерилизацией). С определенными средами возможен объемный рост культуры
Смешивание внутри частиц невозможно, и рост может быть ограничен диффузией питательных веществ	Можно использовать интенсивное перемешивание, и диффузия питательных веществ обычно не ограничивает процесс роста
Способность удалять метаболическое тепло ограничена, поэтому контролировать температуру субстрата сложнее	Высокое содержание воды облегчает контроль температуры
Последующая обработка может быть проще, поскольку продукты более концентрированы. Но экстракты могут быть загрязнены компонентами субстрата	Отделение культуры от среды требует удаления воды. Однако, при использовании определенных сред очистка продукта может быть проще
Культивирование таким способом занимает более длительное время	Глубинное культивирование позволяет снизить время ферментации

Таким образом, такие виды культивирования, как: твердофазное и глубинное, имеют свои преимущества и недостатки, но каждый метод позволяет получить культуру в нужном количестве, с определенными характеристиками и т.д. В зависимости от конечной цели культивирования необходимо выбирать тот или иной метод.

4.2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ: МЕТОДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ВЫСШИХ ГРИБОВ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

4.2.1 Методы получения чистых культур

Тканевый метод: Плодовые тела очищают от земляных остатков, пыли и листьев, промывают чистой дистиллированной водой и укладывают на поверхность из фильтровальной бумаги для подсыхания. После чего плодовые тела помещают в подготовленный стерильный ламинар-бокс и производят высевы на питательную среду сусло-агар (к 1 л пивного сусла добавляют 20 г питательного агара и доводят до кипения 3 раза в течение 5 минут до его полного растворения). Питательную среду разливают по коническим колбам и стерилизуют в автоклаве (ВК-75-01, производство Россия) при давлении 0,5 атм в течение 30 минут. Стерильными медицинскими ножницами вырезают кусочек мякоти из толщи плодового тела, помещают в чашки Петри с сусло-агаровой средой и культивируют в термостате при температуре 22°C. Через 3–7 суток (в зависимости от вида гриба) оценивают рост мицелия, который отсевают в чашки Петри для повышения его ростовой активности и очистки от сопутствующей микрофлоры.

Споровый метод: проводят очистку плодовых тел также, как и в тканевом методе. После чего в стерильных условиях вырезают часть шляпки плодового тела, содержащей споры, и приклеивают с помощью глицерина к верхней поверхности чашки Петри и помещают в термостат при температуре 22°C. Затем через 24 часа наблюдают осыпавшиеся споры на поверхность сусло-агара. Приклеенные части шляпок плодовых тел удаляют из чашки Петри. Прорастание спор, в зависимости от культуры грибов, происходит в течение 2-3 суток. После чего производят пересев проросшего вегетативного мицелия на свежую агаризованную среду. Оценку роста мицелия проводят по способу, описанному в тканевом методе.

Хранение культур проводят в пробирках и чашках Петри при температуре 4±1°C и периодических пересевах. Для более длительного хранения мицелий грибов помещают в пробирки типа Эппендорф с водно-глицериновой смесью и замораживают при температуре от минус 18 до минус 20°C.

Рост мицелия изучают при различных значениях температуры (от 15 до 30°C с шагом 2°C) и pH-среды (от pH 3,5 до pH 7,5 с шагом 0,5), определяя оптимальные значения для каждого штамма. Отбор наиболее продуктивных штаммов грибов проводят путем расчета показателей скорости роста (СР) и ростового коэффициента (РК) 280281.

4.2.2 Получение чистой культуры мицелия на чашках Петри

Объект: чистая культура мицелия *Lentinula edodes*

Рецепт питательной среды:

Солодовый экстракт - 5,95 г

Агар микробиологический - 2,5 г

Вода дистиллированная - 125 мл

Реактивы: солодовый экстракт, агар микробиологический, дистиллированная вода, 70%-ый этиловый спирт, 90%-ый этиловый спирт

Оборудование и материалы: ламинар-бокс, термостат, автоклав, технические весы, плитка, водяная баня или микроволновая печь, спиртовка, скальпель, коническая колба на 250 мл, ватно-марлевая пробка, чашки Петри, вата, спички.

Методика выполнения работы: агаризированную питательную среду готовили в колбах объёмом 250 мл. На электрических весах взвешивали навеску солодового экстракта 5,95 г с точностью до сотых. Солодовый экстракт аккуратно переливали в колбу, после чего заливали 125 мл дистиллированной воды и тщательно перемешивали стеклянной палочкой. Когда солодовый экстракт полностью растворился, взяли 2,5 г навеску микробиологического агара и поместили в колбу с питательной средой, аккуратно перемешали, чтобы агар не осел на стенках. Колбу с питательной средой закрыли хорошо подогнанной чистой ватно-марлевой пробкой, поверх пробки надели бумажный колпачок.

Питательную среду поставили стерилизоваться в автоклаве на 4 часа при температуре 109 °С вместе с завернутыми в бумагу чашками Петри. Благодаря интенсивному нагреву среда полностью затвердела. Среду можно растопить либо на водяной бане, либо с помощью микроволновки. микроволновкой стоит пользоваться аккуратно, проверять среду следуют каждые 15 секунд, дабы избежать чрезмерного вскипания и выброса вещества.

Работу с питательной средой обязательно проводят в условиях полной асептики в ламинар-боксе. Ламинар-бокс готовили к работе тщательно протирая внутреннюю поверхность 70% спиртом, затем стерилизовали ультрафиолетовым излучением в течение 30 минут.

После подготовки ламинар-бокса можно приступать к работе. Руки тщательно протираем 70% спиртом, по очереди вносим в ламинар-бокс чашки Петри, аккуратно распаковывая за пределами бокса, затем снимаем бумажный колпачок с колбы с расплавленной питательной средой, затем инокулянт и необходимые для работы инструменты. Всё перечисленное протирается 70% спиртом в целях дезинфекции. Аккуратно зажигаем спиртовку и ставим перед собой на середину рабочей поверхности. Все действия производятся в радиусе 15-20 см от спиртовки.

В зависимости от индивидуальной чувствительности кожи ждем некоторое время, пока колба с питательной средой не остынет достаточно, чтобы рука терпела долгое прикосновение. Главное не дать агару начать снова затвердевать. Как только оптимальная температура достигнута, открываем колбу, слегка обжигаем горлышко огнем и разливаем питательную среду по чашкам Петри в пределах досягаемости пламени спиртовки. Горлышко колбы снова обжигают, как и ватно-марлевую пробку, колбу закрывают и убирают в сторону. Чашки Петри так же закрывают и оставляют до полного застывания среды.

Используемые в исследовательской работе штаммы закупают в коллекции в виде жидких суспензий. Посев культуры мицелия на чашку Петри производят шприцем или бактериальной петлёй. Петлю прокалывают в пламени спиртовки до покраснения и остужают легким прикосновением к агару.

Для пересева культуры мицелия из одной чашки Петри с другой используют хирургический скальпель. Скальпель обрабатывают 90% спиртом, прокалывают в пламени спиртовки, затем охлаждают в небольшом сосуде с 90% спиртом и снова слегка прожигают, чтобы избавиться от избытков спирта. Из чашки Петри с посевным материалом аккуратно вырезают маленькие прямоугольные кусочки заросшего мицелием агара длиной 0,1-0,3 мм, причем выбирают по краям колонии. 1-4 таких кусочка переносят на новую агаризированную среду, располагая мицелием вниз, и закрывают чашку Петри. Если чашек с посевным материалом больше одного, скальпель заново обрабатывают после работы с каждой.

Вне зависимости от способа инокуляции, свежезасеянные чашки Петри помещают в термостат при температуре 27 °С на 3-4 суток до полного зарастания мицелием.

4.2.3 Получение посевного (зернового) мицелия

Наработка мицелия на зерновом субстрате является промежуточным этапом в получении плодовых тел *Lentinula edodes*.

Рецепт зернового субстрата:

Зерно пшеницы - 1 кг

Вода - 1,5 л

CaCO₃ - 3 г

Гипс - 12 г

Реактивы: колонизированный мицелием агар в чашке Петри (из предыдущей работы), зерно пшеницы, вода, мел (CaCO₃), гипс (CaSO₄·2H₂O),

Оборудование и материалы: кастрюля, электрическая плитка, поднос, сушильный шкаф, технические весы, коническая колба 500 мл, ватно-марлевые пробки, бумага/газеты, автоклав, ламинар-бокс, 70%-ый этиловый спирт, 90%-ый этиловый спирт, вата, спички, спиртовка, скальпель, термостат.

Методика выполнения работы: 1 кг очищенного зерна пшеницы засыпают в кастрюлю, заливают 1,5 воды и варят с использованием электрической плитки на максимальной мощности до частичного размягчения зерен. Воду сливают, приготовленные зерна равномерно распределяют по подносам и ставят в сушильный шкаф при температуре 50 °С примерно на 2 часа до испарения лишней влаги. Высушенные зерна пересыпают в глубокий сосуд.

На электронных химических весах делают навеску мела 3 г и навеску гипса 12 г, и тщательно смешивают эти компоненты с зерном. Готовым зерновым субстратом заполняют термостойкие конические колбы объемом 500 мл примерно на половину, закрывают их ватно-марлевыми пробками и защищают бумажным колпочками. Колбы с субстратом стерилизуют в автоклаве при температуре 109 °С в течение 4-5 часов.

Работу с зерновым субстратом обязательно проводят в стерильных условиях в ламинар-боксе. Ламинар-бокс готовили к работе тщательно протирая внутреннюю поверхность 70% спиртом, затем стерилизовали ультрафиолетовым излучением в течение 30 минут.

После подготовки ламинар-бокса можно приступать к работе. Руки тща-

тельно протираем 70% спиртом, по очереди вносим в ламинар-бокс колбы с зерновым субстратом, предварительно сняв бумажный колпачок, затем чашку Петри с посевным материалом, хирургический скальпель, сосуд с 90% спиртом и спиртовку. Всё перечисленное протирается 70% спиртом в целях дезинфекции. Аккуратно зажигаем спиртовку и ставим перед собой на середину рабочей поверхности. Все действия производятся в радиусе 15-20 см от спиртовки.

Скальпель обрабатывают 90% спиртом, прокалывают в пламени спиртовки, затем охлаждают в небольшом сосуде с 90% спиртом и снова слегка прожигают, чтобы избавиться от избытков спирта. Колонизированный мицелием агар в чашке Петри нарезают на 8 равных секторов. Колбу с зерновым мицелием открывают, горлышко дезинфицируют в пламени спиртовки, и помещают в неё помощью того же скальпеля кусочки колонизированного агара. В среднем с одной чашки Петри засевают две колбы с зерновым субстратом. Горлышко колбы снова обжигают, обжигают пробку, колбу закрывают и слегка встряхивают, чтобы куски мицелия оказались скрыты зерном.

Засеянные колбы с зерновым субстратом ставят в термостат при температуре 27 °C на 7-10 дней до полного зарастания мицелием.

4.2.4 Культивирование плодовых тел на растительных субстратах

Рецепт растительного субстрата:

Опилки лиственных пород деревьев – 1500 г

Отруби пшеничные – 375 г

CaCO₃ – 21,7 г

KH₂PO₄ – 10,8 г

MgSO₄·7H₂O – 10,8 г

Глюкоза – 10,8 г

Вода – 2267 мл

Реактивы: опилки лиственных пород деревьев, отруби пшеничные, колонизированный зерновой мицелий (из предыдущей работы), мел (CaCO₃), дигидрофосфат калия (KH₂PO₄), сульфат магния 7-водный (MgSO₄·7H₂O), глюкоза, кипяченая вода.

Оборудование и материалы: контейнер, пластиковые пакеты или пластиковые банки из полипропилена, электрическая плитка, автоклав, технические весы, ламинар-бокс, 70%-ый этиловый спирт, 90%-ый этиловый спирт, вата, спички, спиртовка, сушильный шкаф, скальпель, марля, скотч, камера роста грибов.

Ход работы: опилки и отруби в соотношении 4:1 замешивали в большом контейнере до полной однородности состава. В субстрат добавляли навеску 21,7 г мела и навески дигидрофосфата калия, сульфата магния 7-водного и глюкозы по 10,8 г каждая. Субстрат снова перемешали, залили кипяченой водой и тщательно перемешали в третий раз, для равномерного распределения влажности по всей массе субстрата.

Субстратные блоки на основе бужовых опилок формировали и в пластмассовых банках, и в пластиковых пакетах. Субстратные блоки на основе бере-

зовых опилок формировали только в пластиковых пакетах. Все блоки стерилизовались в автоклаве при температуре 109 °С в течение 4-5 часов.

Работу с зерновым субстратом обязательно проводят в стерильных условиях в ламинар-боксе. Ламинар-бокс готовили к работе тщательно протирая внутреннюю поверхность 70% спиртом, затем стерилизовали ультрафиолетовым излучением в течение 30 минут.

После подготовки ламинар-бокса можно приступать к работе. Руки тщательно протираем 70% спиртом, по очереди вносим в ламинар-бокс колбы с зерновым мицелием, предварительно сняв бумажный колпачок, затем субстратные блоки, длинный узкий металлический шпатель, сосуд с 90% спиртом и спиртовку. Всё перечисленное протирается 70% спиртом в целях дезинфекции. Аккуратно зажигаем спиртовку и ставим перед собой на середину рабочей поверхности. Все действия производятся в радиусе 15-20 см от спиртовки.

Металлический шпатель обрабатываем 90% спиртом и обжигаем в пламени спиртовки до ощутимого нагрева ручки, затем охлаждаем в 90% спирте и снова слегка обжигаем дабы избавиться от избытков спирта. Открываем колбу с зерновым мицелием, обжигаем горлышко, шпателем разбиваем и перешиваем сросшиеся зерна. Примерно треть от содержимого колбы высыпаем в субстратный блок и плотно его закрываем (заматываем скотчем в случае пластиковых пакетов, прикрываем крышкой поверх марли в случае пластмассовых банок).

Запечатанные блоки оставляют в слабоосвещенном (50-100 люкс) месте при комнатной температуре (21-27 °С) на 35-70 дней (в зависимости размера блоков и активности штамма) до полной колонизации субстрата мицелием. Относительная влажность засеянных блоков должна составлять не менее 90%, содержание углекислого газа - максимальное.

После полной колонизации субстрата мицелием, субстратные блоки освобождают от пластика и вымачивают в холодной воде в течение суток для индуцирования роста примордий. После этого блоки помещают в пластиковый контейнер, в котором с помощью генератора тумана поддерживают постоянную 95% относительную влажность и освещение 500-2000 люкс с помощью фитолампы. На этом этапе блоки нуждаются в периодической аэрации. Рост примордиев начинается примерно через 5-7 дней после вымачивания блока.

Завершающим этапом технологии является индукция роста здоровых плодовых тел. Как только примордия появились, относительную влажность микроклимата следует сократить до 60-80%, иначе грибы могут испортиться раньше времени. Через 5-8 суток после появления примордий плодовые тела будут готовы к сбору.

4.2.5 Определение содержания β-глюканов в плодовых телах

1. Предварительно измельченные плодовые тела обрабатывают 50%-ным этиловым спиртом в соотношении 1:10 (масса муки в граммах: объём спирта в мл, m:v), для извлечения свободных сахаров, части липидов, белков и других веществ. Экстракцию проводят при температуре 60°C в течение 30 минут, что также способствует инактивации β-глюканазы (Skendi et al., 2003). Затем суспензию центрифугируют при скорости вращения 15 тыс. об/мин в течение 15

минут и температуре +20°C (такие же параметры центрифугирования применять на всех остальных этапах работы кроме этапа нейтрализации, где для более полного отделения осадка необходимо центрифугировать при температуре +10°C). Этиловый спирт деконтировать, а полученный осадок использовать для дальнейшего исследования.

2. Высвобождение β-глюканов из алейронового слоя и эндосперма муки проводят в щелочной среде двукратной последовательной обработкой осадка 5%-ным раствором гидроксида натрия, сначала в соотношении 1:14 (m:v), а затем – 1:6 (m:v) при температуре 45°C в течение 30 минут. Для лучшего перемешивания и предотвращения образования комков муки, суспензию периодически перемешивают плоскими стеклянными палочками. После каждой щелочной экстракции проводят центрифугирование. На данном этапе происходит отделение клетчатки, а в супернатанте остаются белки, крахмал, β-глюканы.

3. Объединенные щелочные экстракты нейтрализуют соляной кислотой до pH 7,0, контролируя кислотность с помощью pH-метра.

4. К полученному раствору добавляют 10%-ную фосфорновольфрамную кислоту в соотношении 1:1,5 к массе муки (1 г муки:1,5 мл кислоты, m:v), перемешивают и смесь центрифугируют. Фосфорновольфрамная кислота способствует более полному осаждению крахмала и белка и образованию плотного осадка. При этом в супернатанте остаются аминокислоты, простые сахара и β-глюканы, а в осадок переходят олигомеры крахмала и белка.

5. Выделение β-глюканов из супернатанта осуществляют добавлением к нему двукратного объема 70%-ного этилового спирта и выдерживанием смеси в течение одного часа при температуре +20°C. При этом для лучшего перемешивания супернатант вливают в спирт, а разделение осуществляют в мерных цилиндрах на 100 см³, что способствует лучшему отделению β-глюканов от примесей.

6. β-глюканы всплывают на поверхность в виде сгустка волокон, а образовавшийся на дне рыхлый осадок, содержащий азотистые вещества и частицы крахмала, не учитывают. Всплывшие β-глюканы помещают в предварительно высушенные и взвешенные фарфоровые чашечки и высушивают при температуре 100-102°C до постоянной массы.

7. Содержание β-глюканов на сухую навеску муки (x, %) рассчитывают по формуле 4.1:

$$x = \frac{(m_1 - m_2) \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot c} \quad (4.1)$$

где, m_1 – масса фарфоровой чашечки с высушенными β-глюканами, г; m_2 – масса фарфоровой чашечки, г; m – масса муки, г; c – содержание сухих веществ в навеске муки, % чрезвычайно скудна. Содержание сухого вещества определяют взвешиванием муки до и после её высушивания до постоянной массы при температуре 100-102°C.

4.2.6 Определение содержания полисахаридов

Аналитическую пробу высушенного сырья измельчают до размера частиц, проходящих через сито с отверстиями размером 2 мм и менее. Около 1,0 г (т.н.) сырья помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 200 мл, прибавляют 80 мл воды и 8 мл концентрированной хлористоводородной кислоты, колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 60 мин. Затем колбу охлаждают до комнатной температуры под струей холодной воды и фильтруют через 5 слоев марли в мерную колбу вместимостью 100 мл. Остатки сырья в колбе промывают 10 мл воды и присоединяют в ту же мерную колбу, доводят при необходимости объем извлечения водой до метки и перемешивают (раствор А).

В коническую колбу вместимостью 50 мл помещают 10,0 мл раствора А, прибавляют по каплям натрия гидроксида раствор 40 % до получения раствора с рН 4,0 – 4,5. Раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Полученный раствор фильтруют через бумажный фильтр (раствор Б), отбрасывая первые 10 — 15 мл фильтрата.

В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 2,5 мл 1 % спиртового раствора пикриновой кислоты и 7,5 мл 20 % раствора натрия карбоната, перемешивают. В эту же мерную колбу помещают 5,0 мл раствора Б.

Колбу с содержимым нагревают на кипящей водяной бане в течение 10 мин, затем охлаждают до комнатной температуры под струей холодной воды, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают (раствор В).

В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 2,5 мл 1 % спиртового раствора пикриновой кислоты, 7,5 мл 20 % раствора натрия карбоната и 5 мл воды, помещенных в мерную колбу вместимостью 100 мл и обработанных аналогичным образом.

Оптическую плотность раствора В измеряют относительно раствора сравнения на спектрофотометре в максимуме поглощения в кювете с толщиной слоя 10 мм. Параллельно измеряют оптическую плотность стандартного образца глюкозы, обработанного аналогично испытуемому раствору. Содержание суммы полисахаридов и свободных сахаров в пересчете на глюкозу в абсолютно сухом сырье в процентах (X, %) вычисляют по формуле 1.2:

$$X = \frac{A_x \cdot 100 \cdot a_0 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 3}{A_{ст} \cdot a \cdot 25 \cdot 5 \cdot (100 - W)} \quad (4.2)$$

где A_x — оптическая плотность раствора В; $A_{ст}$ — оптическая плотность раствора стандартного образца глюкозы, обработанного аналогично испытуемому раствору; a — навеска сырья, г; a_0 — навеска глюкозы, г; W — влажность сырья, %.

Приготовление раствора стандартного образца глюкозы. Точную навеску глюкозы 0,05 г, предварительно высушенной при температуре 100–105°C до постоянной массы, растворяют в воде в мерной колбе вместимостью 100 мл, доводят объем раствора до метки и перемешивают. 10 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят водой до

метки, перемешивают. Раствор должен быть свежеприготовленным.

Натрия гидроксида раствор 40%. Навеску 40,0 г натрия гидроксида растворяют в 60 мл воды в мерной колбе вместимостью 100 мл. Охлаждают под струей холодной воды до полного остывания, доводят объем раствора в колбе водой до метки и перемешивают. Раствору дают отстояться и прозрачную жидкость сливают с осадка. Срок годности раствора 6 мес при хранении в упаковке из стекла укупоренной резиновой пробкой.

Натрия карбоната раствор 20%. Навеску 20,0 г натрия карбоната безводного растворяют в 60 мл воды в мерной колбе вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. При необходимости фильтруют. Срок годности раствора 2 мес при хранении в упаковке из стекла укупоренной резиновой пробкой.

4.2.7 Определение содержания каротиноидов

Каротиноиды экстрагировали из плодовых тел методом кислотного нагревания (Янг и др., 2014). Один грамм порошка плодовых тел *S. militaris* замачивали в 15 мл 1 М соляной кислоты (HCl) при 30 °С в течение 30 минут и центрифугировали при 5000 об/мин в течение 10 минут. Супернатант удаляли, а затем остаток дважды промывали дистиллированной водой. После разрушения клеточной стенки к разрушенным клеткам добавляли 15 мл смеси ацетона и петролейного эфира в соотношении 4:1. Далее проводили экстракцию каротиноидов в течение 10 мин при 30°С при встряхивании со скоростью 100 об/мин. Образцы подвергали центрифугированию (5000 об/мин, 10 мин), затем надосадочную жидкость использовали для определения каротиноидов. Величину поглощения определяли после разбавления колориметрически при 445 нм на спектрофотометре. Общий выход каротиноидов (мкг/г высушенной биомассы) рассчитывали по следующему уравнению 4.3:

$$\text{Содержание каротиноидов (мг/г)} = \frac{A \times V \times D}{0,16 \times W} \quad (4.3)$$

где A – показатель поглощения разбавленного экстракта при $\lambda_{\text{макс}}$, V – объем экстрагирующего реагента, D – коэффициент разбавления, 0,16 – коэффициент экстинкции каротиноидов, W (г) – масса сухого плодового тела *S. militaris*.

Количественное определение β -каротина

β -каротин использовали в качестве стандарта для количественного определения каротиноидов кордицепса. β -каротин растворяли в 60% этаноле с получением концентраций 0,50, 1,00, 1,50, 2,00, 2,50, 3,00, 3,50, 4,00, 5,00 мкг/мл. Длина волны обнаружения была установлена на 447 нм.

Стандартная кривая была получена как $Y = 0,157X + 0,0049$.

Где Y – абсорбция, X – концентрация β -каротина (мкг/мл), $r^2 = 0,9998$. Восстановление было достигнуто путем добавления стандартного бета-каротина к 60% раствору экстракта плодовых тел в этаноле для получения общих каротиноидов кордицепса.

4.2.8 Определение содержания липидов

Гравиметрическое определение жира основано на многократной экстракции жира органическим растворителем из подсушенной навески продукта с последующим удалением растворителя и взвешиванием. Экстракцию проводят в аппарате Сокслета, состоящем из экстрактора, в который помещают бумажную гильзу с исследуемым материалом, холодильника и экстракционной колбы. В качестве растворителя используют петролейный или серный эфир, а также дихлорэтан.

В процессе проведения экстракции растворитель вместе с растворенным в нем жиром стекает в экстракционную колбу. Жир остается в колбе, а пары растворителя вновь поднимаются и экстрагируют новую порцию. Таким образом, исследуемый объект, подвергаясь многократной экстракции, полностью обезжиривается. Ориентировочная продолжительность экстракции 6-8 ч.

По окончании экстрагирования гильзу вынимают из экстрактора, высушивают и взвешивают. Количество жира определяют по разности между массой гильзы с материалом до экстракции и после нее по формуле 4.4:

$$\omega = \frac{m_1 - m_2}{m_0} \times 100\% \quad (4.4)$$

где ω – содержание жира, %; m_1 – масса гильзы с материалом до экстрагирования, г; m_2 – масса гильзы с материалом после экстрагирования, г; m_0 – масса навески, г.

4.2.9 Анализ доброкачественности сырья

Содержание влаги в сырье служит одним из числовых показателей, характеризующих его доброкачественность.

Методика определения влажности: 1 г воздушно-сухой навески равномерно распределяли в чашечке для определения влажности, помещали в анализатор влажности МХ–50. Влажность определяли при температуре 105 °С.

Зола сырья (общая зола) состоит из смеси различных неорганических веществ, находящихся в самом растении, и минеральных примесей, которые могут попасть в сырье при сборе и сушке.

В золе чаще всего содержатся следующие элементы: К, Na, Mg, Ca, Fe, С, Si, P, реже в меньшем количестве Cu, Mn, Al и др.

Методика определения содержания золы. Навеску 3–6 г измельченного исследуемого образца помещают в предварительно доведенный до постоянной массы фарфоровый тигель. Далее необходимо тигель с навеской обуглить на электроплитке с асбестовой сеткой. После полного обугливания сырья тигли переносят в муфельную печь для дальнейшего разложения растительного сырья. Прокаливание ведут при красном калении (550–650 °С) до постоянной массы, избегая сплавления золы. По окончании прокаливания несколько остывшие, но еще горячие тигли ставят в эксикатор, охлаждают и взвешивают.

Процентное содержание общей золы x_1 в абсолютно сухом сырье вычисляют по формуле 4.5:

$$X_1 = \frac{m_1 \times 100 \times 100}{m_2 \times (100 - W)} \quad (4.5)$$

где m_1 – масса золы, г; m_2 – масса навески сырья, г; W – потеря массы сырья при высушивании, %.

За окончательный результат испытаний принимают среднее арифметическое результатов трех параллельных определений, вычисленных до десятых долей процента, допускаемое расхождение между которыми не должно превышать 0,1 %.

Контрольные вопросы

1. Какие биологические процессы у грибов делают их интересными для крупномасштабного производства ферментов и фармацевтических препаратов?
2. Какие основные этапы включает в себя твердофазное культивирование грибов для биоконверсии растительного сырья?
3. Какие преимущества и недостатки имеет твердофазное культивирование по сравнению с глубинным культивированием грибов?
4. Какие условия культивирования (температура, влажность, pH) наиболее благоприятны для роста и метаболизма грибов?
5. Какие методы используются для получения чистых культур грибов, и как они отличаются друг от друга?
6. Каковы преимущества глубинного культивирования мицелия по сравнению с поверхностным?
7. Какие биореакторы используются для глубинного культивирования грибов?
8. Каковы применения базидиальных грибов в пищевой промышленности?
9. Какие виды грибов используются для получения ферментов?
10. Какие добавки используются для улучшения структуры субстрата при культивировании грибов?

5 ФЕРМЕНТЫ ДЛЯ МОЛОКА ИЗ ВЫСШИХ ГРИБОВ

5.1 ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

5.1.1 Протеолитические ферменты высших грибов, вызывающие коагуляцию молока

В производстве кисломолочных продуктов основополагающей операцией является свертывание молока. Достаточно долгое время для этого использовали сычужный фермент, который образуется в сычуге – желудке молодых телят. В организме млекопитающих он выполняет такую же функцию, что и в производстве кисломолочных продуктов.

Сычужный фермент или ренин (химозин) находится в дефиците и имеет достаточно большую стоимость, поэтому стали использовать протеазы различного происхождения, которые близки по механизму действия к сычужному: растительного, животного, бактериального, грибного.

Ферментативное свертывание молока инициируется добавлением ферментов, которые можно разделить в зависимости от их происхождения на четыре категории: сычужные ферменты, продуцируемые жвачными животными, микробные коагулянты молока, аспарагиновые протеазы, продуцируемые грибами (коммерчески используемые известны как «микробные сычужные ферменты»), растительные коагулянты и коагулянты, продуцируемые генетически модифицированными микроорганизмами.

В технологии производства кисломолочных продуктов лежит свойство молока коагулировать в казеиновый комплекс с помощью определенных протеолитических ферментов, которые называют молокосвертывающими.

Микроорганизмы, особенно грибы, в последнее время привлекают внимание как потенциальный источник широкого спектра протеаз, включая ферменты свертывания молока. Грибы могут расти на экономичных субстратах и выделять значительное количество ферментов, что может относительно облегчить последующую обработку. Кроме того, способность грибковых протеаз оставаться активными в широком диапазоне pH и температуры делает их особенно интересными.

Протеолитические ферменты, вызывающие коагуляцию молока, называются казеиновыми ферментами. Они способны расщеплять белок казеин, который является основным белком молока. Это приводит к образованию геля или сгустка, который используется для производства различных молочных продуктов, таких как сыр, йогурт и творог.

Грибные протеазы обладают многими биохимическими характеристиками, которые делают их интересными для изучения и биотехнологического применения. Ферменты привлекательны для использования их в качестве коагулянтов, вызывающих свертывание молока.

5.2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ: БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ВЫДЕЛЕНИЮ ФЕРМЕНТОВ И АНАЛИЗУ ИХ АКТИВНОСТИ

Объект: субстрат с мицелием высшего базидиального гриба *Piptoporus betulinus* D-21.

Реактивы: оксид алюминия, буферные растворы (ацетатный, фосфатный буферы и буфер макилвейна), дистиллированная вода, этиловый спирт, желатин, 1% раствор тимолфталейна, 0,05 н раствор NaOH (титрование), 0,1 н раствор NaOH (титрование), 1 н раствор NaOH, коровье молоко жирностью не ниже 3 %, хлорид кальция, подсолнечное или оливковое масло, цитратно-фосфатный буфер, фенолфталейн, тимолфталейн, бентонит, ортофосфат меди, 80% уксусная кислота, йодид калия, свежеприготовленный 0,01 н раствор тиосульфата натрия, раствор крахмала (индикатор).

Оборудование и материалы: фарфоровая ступка и пестик, цилиндр, термостат, бумажный фильтр, коническая воронка, центрифуга, конические колбы 50 мл, 100 мл, мерные стаканчики на 50 мл, 100 мл, ротационный испаритель, водяная баня, бюретка, фильтровальная бумага, сушильный шкаф, мерный колбы 25 мл, пипетка 1, 2, 5 мл

В работе использовали культуру высшего базидиального гриба *Piptoporus betulinus* D-21, полученную тканевым способом из плодовых тел, собранных с древесины березы в лесной зоне Алтайского края. Получение воздушного мицелия проводили на питательной среде сусло-агар. Контроль чистоты культуры осуществляли методом световой микроскопии (Carl Zeiss Primo Star) на наличие/отсутствие прядек и микофильных грибов. Идентификацию вида осуществляли по получению и описанию плодовых тел в искусственной культуре. Хранение штамма осуществляли на сусло-агаре в чашках Петри при температуре $5\pm 2^\circ\text{C}$.

В качестве лигноцеллюлозных субстратов для твердофазного культивирования мицелия грибов использовались березовые опилки (размер частиц 4-10 мм) и пшеничные отруби в соотношении 5:1. В субстрат добавляли дистиллированную воду и перемешивали для создания относительной влажности 60%.

Готовые субстраты распределяли по полипропиленовым контейнерам объемом 1,2 дм³, стерилизовали при 1,0 атм в течение 1,5 часов в автоклаве ВК-75 и засеивали чистой культурой мицелия, выращенной на агаризованной среде. Субстрат, инокулированный мицелием грибов, помещали в суховоздушный термостат (ТСО-1/80 СПУ) и инкубировали при температуре $26\pm 2^\circ\text{C}$. Качество наработанных образцов мицелия проводили методом световой микроскопии с изучением микроморфологических признаков.

5.2.1 Получение экстрактов из культур высших грибов

Навеску биомассы в количестве 10 г помещают в фарфоровую ступку, растирают с 0,25 г оксида алюминия и 10-20 мл забуферной воды (10 мл соответствующего буферного раствора (ацетатный, фосфатный буферы и буфер макилвейна) и 90 мл дистиллированной воды) или дистиллированной воды. Затем

смесь выдерживают в термостате при температуре 30°C в течение 30 минут для более полной экстракции ферментов из культуры. После смесь фильтруют через складчатый бумажный фильтр. Полученный фильтрат является главным ферментным раствором, который используется для определения активностей [40].

Экстракцию бактериологической культуры отделяют центрифугированием при 4000 об/мин в течение 8 мин. В дальнейшей работе используют нативный раствор.

5.2.2 Способы очистки и концентрирования культуральной жидкости

Очистка экстракта бентонитом

Полученный грибной экстракт перемещают в центрифугу, где в течение 30 мин центрифугируют при 3000 об/мин, тем самым отделяют осадок, содержащий остатки мицелия и древесный наполнитель среды. Затем экстракт перемещают в смеситель, там же добавляют бентонит и происходит перемешивание, продолжительность которого составляет 40 минут. Далее отработанный бентонит отделяют центрифугированием при 3000 об/мин в течение 30 мин, а сам экстракт очищают дальше и определяют активности.



Рисунок 5.1. Очистка экстрактов бентонитом

Очистка экстрактов этиловым спиртом

К ферментному раствору добавляют при постоянном перемешивании 250 мл этилового спирта (концентрация 95%), осадок отделяют центрифугированием при 3000 об/мин в течение 20 мин. К надосадочной жидкости добавляют при постоянном перемешивании 1000 мл этанола, осадок собирают центрифугированием при 3000 об/мин, 20 мин. Осадок промывают этиловым спиртом и высушивают.

Микрофильтрация экстракта

Стадия микрофильтрации включает прохождение экстракта через поры размером 8 мкм. При этом экстракт становится светлее и происходит увеличение монокосвертывающей активности.

Концентрирование экстракта под вакуумом

Вакуумный испаритель представляет собой установку из, вращающейся,

колбы (180 об/мин), внутри которой находится экстракт под вакуумом, температура при этом не более 35 °С.

Использование вакуума позволяет получить более чистый и концентрированный экстракт, поскольку в результате процесса остается 10 % от первоначального раствора.

5.2.3 Определение ферментативной активности

Определение протеолитической активности

Метод определения *протеолитической активности (ПА)* основан на определении свободных карбоксильных групп в спиртовых растворах аминокислот и полипептидов.

К 10 мл раствора желатина с содержанием 5% и значением рН 7,3-7,5 добавляют 2 мл исследуемой жидкости и отбирают 1 мл реакционной смеси, которую помещают в коническую колбу объемом от 50-100 мл, содержащую 20 мл 96%-го этилового спирта и 0,2 мл 1%-ного раствора тимолфталейна для контрольного эксперимента. Пробу титруют 0,1 н. раствором NaOH, добавляют еще 4 капли щелочи после появления голубой окраски и заканчивают титрование.

Остальную смесь желатина с ферментным раствором ставят в термостат при 40°C, и через 3 ч забирают 1 мл реакционной смеси в другую коническую колбу, содержащую такой же объем этилового спирта и тимолфталейна, и проводят его титрование аналогично контрольному опыту.

Расчет протеолитической активности ПА, ед./мл, проводят по формуле 5.1:

$$ПА = \frac{AP}{t} (5.1),$$

где A – количество аминного азота, накопленного в реакционной смеси за время опыта, мг; P – коэффициент, учитывающий разведение и пересчет на 1 мл ферментного раствора ($P = 6$ для данных условий опыта); t – время гидролиза, ч (3 ч).

Величину A рассчитывают по следующей формуле 5.2:

$$A = (a - a_k) \cdot 1,4K (5.2),$$

где a – количество 0,1 н. раствора NaOH, пошедшее на титрование 1 мл опытной пробы, мл; a_k – количество 0,1 н. раствора NaOH, пошедшее на титрование 1 мл контрольной пробы, мл; 1,4 – коэффициент пересчета количества 0,1 н. раствора щелочи в миллиграммах азота аминокислот и полипептидов; K – поправка к титру щелочи.

Определение молокосвертывающей активности

Единица *молокосвертывающей активности (МСА)* определяется как объем культурального фильтрата, необходимый для сворачивания 100 мл коровьего молока за 40 минут при температуре 35°C.

В 100 мл коровьего молока жирностью 3,2% вносят 1 мл 15% хлористого кальция и затем смесь нагревают до 35°C. Далее 10 мл полученного раствора

помещают в пробирку и добавляют 1 мл экстракта. Пробирки со смесями встряхивают, помещают в термостат при температуре 35°C и считают время до образования молочного сгустка.

За единицу МСА, ед./ мл, принимают количество жидкого экстракта, которое сворачивает 100 мл коровьего молока за 40 минут при температуре 35°C.

МСА определяют по формуле (5.3):

$$МСА = \frac{40 \cdot 100 \cdot K}{\Pi \cdot 2} \quad (5.3),$$

где К – коэффициент разведения изучаемого фермента; Π – время, за которое образуется плотный молочный сгусток, в минутах; 40 – среднее время производства сыра; 2 – количество внесенного фермента мл.

Определение липолитической активности

Метод определения **липолитической активности (ЛА)** заключается в выявлении жирных кислот, образовавшихся в результате действия липазы на оливковое или подсолнечное масло, путем проведения титрования щелочью.

В колбу объемом 100 мл помещают 5 мл оливкового или подсолнечного масла и 4 мл цитратно-фосфатного буфера с рН 7,0, и закрывают пробкой. Смесь выдерживают на водяной бане при 37°C в течение 10 минут. Затем добавляют 1 мл исследуемой жидкости и тщательно перемешивают. Полученную смесь выдерживают при температуре 37°C в течение 1 часа и сразу же добавляют 30 мл этанола для остановки реакции. Раствор титруют 0,05 н раствором NaOH в присутствии 1%-ного раствора фенолфталеина до исчезновения окраски.

Для проведения контрольного опыта, выдержанную смесь масла и буфера смешивают с 30 мл этанола, затем добавляют 1 мл исследуемого ферментного раствора и титруют полученную смесь.

Разность результатов титрования опытной и контрольной проб соответствует количеству 0,05 н раствора NaOH, примененного для нейтрализации жирных кислот, сформировавшихся в процессе взаимодействия фермента с маслом.

Липолитическую активность фермента ЛА (в ед/г) определяют по формуле (5.4):

$$ЛА = \frac{A \cdot T \cdot 50}{B} \quad (5.4),$$

где ЛА – липолитическая активность, ед./г; А – разность между результатами титрований опытной и контрольной проб, мл; Т – титр щелочи; В – концентрация образца ферментного раствора, г/мл.

Определение целлюлозолитической активности

Целлюлозолитическая активность (ЦА) оценивается по убыли массы источников целлюлозы и выражаются в единицах.

Из с фильтровальной бумаги (источник целлюлозы) нарезают полоски размером 1,5×10 см. Полоски взвешивают и сушат их до постоянной массы. Затем полоски помещают в каждую пробирку с культуральной жидкостью мик-

робного штамма и выдерживают в термостате при 37°C в течение 24 часов. После этого извлекают, промывают, высушивают до постоянной массы. По разнице в потере массы полосок фильтровальной бумаги определяют целлюлозолитическую активность в единицах активности по формуле (5.5):

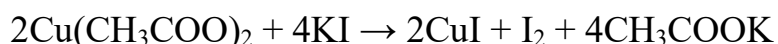
$$\text{ЦА} = (m - n) \cdot 1000 \quad (5.5),$$

где m – начальная масса бумаги, n – конечная.

5.2.4 Определение содержания аминного азота в среде

Содержание аминного азота основывается на способности аминокислот и пептидов образовывать соединения, растворимые в комплексах с медью, которые могут быть обнаружены йодометрически после перевода в соли уксусной кислоты [40].

В мерную колбу вместимостью 25 мл вносят 1-2 мл исследуемой жидкости, добавляют 1-2 капли раствора тимолфталейна, и также по каплям 1 н раствор NaOH до того момента, пока жидкость не начнет приобретать слабо-голубой цвет. Затем, заполняют колбу 10-15 мл суспензией ортофосфата меди и дистиллированной водой до метки. В результате происходит переход медных солей аминокислот в раствор. Колбу встряхивают, а затем центрифугируют или фильтруют раствор через складчатый фильтр. В колбу вливают 5 или 10 мл прозрачного раствора, подкисляют его 0,25–0,50 мл 80% уксусной кислоты и вносят 0,2–0,4 г йодида калия. В результате происходит реакция:



Йод оттитровывают свежеприготовленным 0,01 н раствором тиосульфата натрия с добавлением 2-4 капель раствора крахмала, при этом реакцию считают завершенной после исчезновения синей окраски.

Содержание аминного азота B , мг/л, рассчитывают по формуле (5.6):

$$B = \frac{0,28V_2}{V_1} \quad (5.6),$$

где 0,28 – коэффициент, который учитывает соответствие 1 мл 0,01 н раствора тиосульфата натрия 0,28 мг аминного азота; V_2 – количество 0,01 н раствора тиосульфата натрия, пошедшего на титрование, мл; V_1 – количество фильтрата, взятого на титрование, мл.

Обработка результатов и заполнение таблицы.

Таблица 5.1. Результаты лабораторной работы

Образец	Экстрагент			
	Вода	Фосфатный буфер	Ацетатный буфер	Буфер McIlvaine
ЦА, ед/г				
ЛА, ед/г				
МСА, ед/мл				
ПА, ед/мл				
Соотношение МСА к ПА				

Контрольные вопросы:

1. Какие основные типы ферментов используются для свертывания молока в производстве кисломолочных продуктов?
2. Какие преимущества имеют грибные протеазы по сравнению с традиционными сычужными ферментами в процессе свертывания молока?
3. На чем основаны методы определения МСА, ЛА, ЦА и ПА?
4. Охарактеризуйте способы очистки и концентрирования ферментов. Какие достоинства и недостатки у каждого из них.
5. Перечислите основное оборудование, необходимое для выполнения лабораторной работы.

6 ХИТИН ИЗ ВЫСШИХ ГРИБОВ

6.1 ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Специфика углеводного комплекса высших грибов заключается в том, что их полисахариды гетерогенны. Высшие базидиомицеты содержат гетерополисахариды, состоящие из фукозы, галактозы, маннозы и ксилозы, гликогеноподобные глюканы в качестве запасных компонентов, а также структурные полисахариды клеточной стенки. Клеточная стенка грибов построена из двух типов полисахаридов – жесткой фибриллярной структуры, состоящей из хитина или целлюлозы, и матриксоподобной структуры – из α -, β -глюканов и гликопротеинов.

Из всех представителей углеводного комплекса наиболее высокой биологической активностью обладает хитин-глюкановый комплекс (ХГК) – водонерастворимый биополимер, синтезируемый в клетках грибов ферментативной сшивкой хитина (N-ацетил-D-глюкозамин связанный с β -1,4-гликозидной связью) и β -D-глюкана (рисунок 6.1).

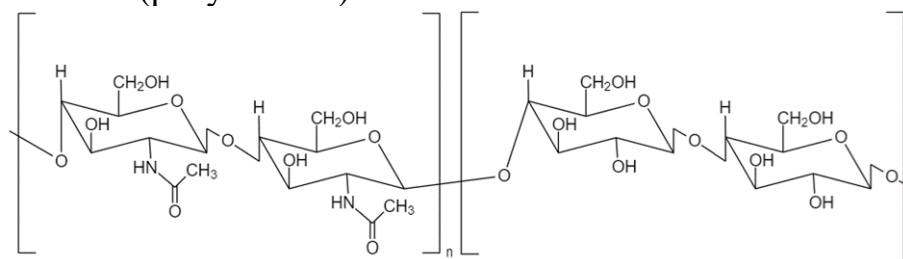


Рисунок 6.1. Структурная формула хитин-глюканового комплекса

ХГК является основным компонентом клеточных стенок грибов, обеспечивая форму, стабильность и жесткость клеточной стенки грибов. Это биосовместимый, биоразлагаемый и нетоксичный полимер, обладающий высокой набухающей и адсорбционной способностью, сочетающейся с антиоксидантными, противовоспалительными, антибактериальными, антигиперлипидемическими, антимутагенными, защищающими ДНК и ранозаживляющими свойствами. Перечисленные физико-химические и биологические свойства обеспечивают широту применения ХГК в качестве эффективного компонента энтеросорбентов и биологически активных добавок для пищевой промышленности.

Селективный гидролиз химическими или ферментативными методами позволяет получать такие производные ХГК, как хитин, хитозан и β -глюканы. Хитин и хитозан находят применение во многих областях, включая продукты питания, косметику, медицину, текстиль, биотехнологии и очистку сточных вод. Разнообразные биохимические и физические свойства, обеспечивающие эффективную стабилизацию, загущение, эмульгирование и гелеобразование, а также физиологическую активность – антиоксидантную, противоопухолевую, радиозащитную и иммунорегуляторную – обуславливают возможности использования β -глюканов при создании продуктов питания, косметических средств, продукции медицинского назначения и кормов.

Относительная простота получения производных ХГК еще более расширяет возможности его прикладного использования, однако в некоторых аспек-

тах ХГК превосходит хитин, хитозан и β -глюканы. В частности, установлено, что ХГК выделенные из различных грибов, более эффективно и избирательно сорбируют ионы переходных металлов, чем хитозан из ракообразных. Показано также, что хитозан-глюкановые комплексы более эффективны (в сравнении с хитозаном) при использовании их в качестве адъюванта для антигена гепатита В, возможно, вследствие поверхностной локализации β -глюканов в иммунных клетках. В случаях, когда у хитина отсутствовала противоопухолевая активность, его сочетание с β -глюканом приводило к улучшению его свойств.

Современный коммерческий хитин и его производные, в основном, вырабатываются рыбной промышленностью, как побочные продукты переработки – из панцирей ракообразных. Для этого требуются «жесткие» условия обработки: агрессивные растворители, высокая температура и большая длительность процесса извлечения; эти условия обработки сопровождаются попаданием значительного количества загрязняющих веществ в окружающую среду в месте производства. Кроме того, получение хитина из ракообразных подвержено сезонности и географическим ограничениям поставок, что повышает себестоимость производства. Определенное значение при использовании хитина и ХГК из ракообразных имеют также подверженность некоторых людей к аллергии на ракообразных и неприемлемость животного сырья вегетарианцами. Вышеуказанные соображения накладывают дополнительные ограничения на применение хитина ракообразных в пищевой промышленности.

Стабильное в плане поставок и при этом качественное хитин содержащее сырье в промышленных масштабах можно получать за счёт высших базидиомицетов, поскольку многие виды грибов широко распространены и культивируются во многих странах. Более того, хитиновые продукты из грибов получают в более «мягких» условиях обработки, со стабильным составом и свойствами, в отличие от ракообразных. Хитин, выделенный из грибов, не содержит аллергенов типа тропомиозина, что позволяет снизить потенциальный риск аллергических реакций на продукт. Исследования ранозаживляющих свойств ХГК из грибов на моделях термических и химических ожогов у крыс показывают, что поврежденная и обработанная ХГК кожа крыс приобретает более высокий предел прочности на разрыв в сравнении с кожей, обработанной хитином из омаров (*Nephropidae*) или камчатского краба (*Paralithodes camtschaticus*). При этом отмечается более активное стимулирование пролиферации фибробластов в концентрациях 0,01 % и 0,5 %, и эффект пролиферации клеток коррелирует с содержанием хитин- и хитозан-глюкановых комплексов в раневом покрытии. Кроме того, ХГК грибов *P. blakesleeanus* и *M. mucedo* проявляют свойства клеточных аттрактантов, которые, как предполагается, способствуют заживлению ран.

Коммерциализация раневых повязок на основе грибных полисахаридов получила своё начало в 1997 году, когда исследовательская группа из Тайваня извлекла из гриба *Ganoderma tsugae* смесь хитиновых полисахаридов, содержащую β -1-3-глюкан ($\approx 60\%$) и N-ацетилглюкозамин ($\approx 40\%$) и названную «тканым заменителем кожи» – сахахитином. Исследование сахахитина при лечении ожогов роговицы у кроликов показало, что значительная пролифера-

ция клеток роговицы и ускоренное заживление раны обусловлены ингибированием ХГК грибов распада белков.

Учитывая целый ряд преимуществ ХГК из грибов над хитином из ракообразных, высшие базидиомицеты можно считать перспективным альтернативным сырьём для получения продуктов с высокой биологической активностью.

6.2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ: ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ПОЛУЧЕНИЮ ХИТИНА, ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ И КОМПЛЕКСНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ

Объекты исследований

Высушенные плодовые тела и мицелий грибов *Armillaria mellea*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* и других видов.

6.2.1 Выделение хитин-глюканового комплекса

Оборудование, посуда и реактивы:

Магнитная мешалка; колба мерная объемом 250 мл; колба коническая объемом 500 мл; воронка стеклянная; фильтр из хлопчатобумажной ткани (хлопчатобумажная ткань бельтинг); обратный холодильник шариковый; натрия гидроксид (ч); кислота соляная концентрированная (36 %); высушенные плодовые тела грибов; изопропиловый спирт.

Приготовление 2 % раствора хлороводородной кислоты

В мерную колбу на 250 мл наливают 150 мл дистиллированной воды, мерным цилиндром отмеряют 39 мл $\text{HCl}_{\text{конц}}$ и переносят в мерную колбу, после чего доводят раствор дистиллированной водой до метки.

Приготовление 350 мл раствора 8 % NaOH

В коническую колбу на 500 мл наливают 350 мл дистиллированной воды, вносят навеску NaOH массой 30,44 г и перемешивают до полного растворения (для более быстрого растворения рекомендуется вносить щелочь при перемешивании во избежание прилипания ее к стенкам колбы).

Подготовка плодовых тел

Высушенные плодовые тела необходимо измельчить на лабораторной мельнице.

Ход работы: в коническую колбу на 500 мл, снабженную обратным холодильником и мешалкой, поместить 6 г измельченного сырья добавить 350 мл 8%-го водного раствора NaOH и выдержать при температуре 80°C в течение 1 часа. Затем отфильтровать и снова повторить процесс (стадия депротеинизации). Полученную массу промыть водой до нейтрального pH и затем к осадку добавить 250 мл 2 М HCl (стадия деминерализации) и оставить на 3ч при комнатной температуре.

Для обезжиривания полученную массу переносят в колбу и экстрагируют изопропиловым спиртом (можно оставить на сутки), отфильтрованный продукт высушивают при комнатной температуре.

После проведения процесса необходимо взвесить полученную массу, посчитать выход.

6.2.2 Получение хитозан-глюканового комплекса

Оборудование, посуда и реактивы:

Магнитная мешалка; колба мерная объемом 250 мл; колба коническая объемом 500 мл; воронка стеклянная; фильтр из хлопчатобумажной ткани (хлопчатобумажная ткань бельтинг); обратный холодильник шариковый; натрия гидроксид (ч); кислота соляная концентрированная (36 %); хитин-глюкановый комплекс, изопропиловый спирт.

Приготовление 100 мл раствора 30 % NaOH

В коническую колбу на 250 мл наливают 100 мл дистиллированной воды, вносят навеску NaOH массой 42 г и перемешивают до полного растворения (для более быстрого растворения рекомендуется вносить щелочь при перемешивании во избежание прилипания ее к стенкам колбы).

Ход работы: к 2 г навески **хитин-глюканового комплекса**, полученной по вышеописанной методике, добавить 100 мл 30%-ного раствора гидроксида натрия и термостатировать при 100 °С в течение 2 часов. Полученную массу отфильтровать и промыть большим количеством воды до нейтрального pH, после чего оставили в воде на сутки. Полученный хитозан-глюкановый комплекс промыть изопропиловым спиртом и высушить при комнатной температуре.

После проведения процесса необходимо взвесить полученную массу, посчитать выход.

6.2.3 Получение карбоксиметилхитин-глюканового комплекса

Оборудование, посуда и реактивы

Водяная баня; плитка электрическая; ступка и пестик; колба круглодонная на 50 мл; воронка стеклянная; фильтр из хлопчатобумажной ткани; обратный холодильник шариковый; ртутный термометр, градуированный в диапазоне температур 0-100 °С; натрия гидроксид (ч); натриевая соль монохлоруксусной кислоты; изопропиловый спирт; 5% раствор уксусной кислоты;

Ход работы: навеску 5 г воздушно-сухого хитин-глюканового комплекса поместить в фарфоровую ступку, добавить 2,9 г гидроксида натрия и энергично растереть в ступке. Затем добавить 50 мл изопропилового спирта, еще раз хорошо растереть, поместить в реакционную колбу и при температуре 45°С в течение 140 минут.

Затем в смесь добавить 8,5 г предварительно измельченной натриевой соли монохлоруксусной кислоты (NaMXУК) и термостатировать 60 минут при 60°С.

Полученный продукт отделить декантацией, промыть 60%-ным этанолом, содержащим для нейтрализации избытка щелочи концентрированную уксусную кислоту до pH=5, до отрицательной реакции на щелочь по фенолфталеину и на хлорид-ионы с раствором нитрата серебра и сушить на воздухе.

6.2.4 Определение степени деацетилирования методом ИК-спектроскопии

Степень деацетилирование хитин-глюканового комплекса определяют методом инфракрасной спектроскопии с использованием ИК-спектрофотометра «Инфралюм ФТ-801» в таблетках KBr в диапазоне волновых чисел 700-1000 см⁻¹.

Подготовка образцов для регистрации ИК-спектров. Количество образца полисахарида, входящего в одну таблетку (диаметром 14 мм), составляет 2 мг, а количество бромида калия – 100 мг. Исследуемый образец (2 мг) и бромид калия (100 мг) растереть под ИК-лампой. Затем порошкообразный материал поместить в специальную матрицу из нержавеющей стали, которая подвергается давлению 200 бар в гидравлическом прессе.

Расчет степени деацетилирования. Используется формула 3.1 подсчета на основании поглощения областей 1560 и 1070 см⁻¹, характерных для колебаний амидной группы и С-О в глюкопиранозном кольце.

$$СД = \frac{0,7568 - \frac{A_{1560}}{A_{1070}}}{0,0069} \quad (6.1),$$

где A_{1560} , A_{1070} – оптическая плотность при волновых числах 1560 и 1070 см⁻¹ (базовые линии – касательные между 850-1250 см⁻¹ и 1500-1900 см⁻¹ соответственно); 0,7568 и 0,0069 – коэффициенты линейной корреляции.

6.2.5 Определение степени деацетилирования методом кондуктометрического титрования

Навеску образца 0,2 г растворить в 100 мл 0,02 М раствора соляной кислоты. Готовый раствор перенести в ячейку для титрования. Определить сопротивление раствора и затем начать титрование раствора гидроксидом натрия (0,1 М), добавляя порции по 0,1 мл при постоянном перемешивании. После добавления каждой порции раствора записывать значения сопротивления раствора.

По полученным данным построить график зависимости, по которому определить количество щелочи, необходимое для титрования кислоты, связанной с аминогруппами.

Степень деацетилирования рассчитывали по формуле 6.2:

$$СД = \frac{20319,25 \cdot C_{NaOH} \cdot \Delta V}{42,0367 \cdot C_{NaOH} \cdot \Delta V + m} \quad (6.2),$$

где C_{NaOH} – концентрация гидроксида натрия, моль/л; ΔV – объем щелочи, необходимый для титрования кислоты, связанной с аминогруппами, мл; m – навеска хитина, мг; 20319,25 – молекулярная масса звена хитина, г/моль; 42,0367 – разность между молекулярной массой хитина и хитозана, г/моль.

6.2.6 Определение содержания минеральных веществ

Доведенные до постоянной массы тигли с исследуемыми образцами (ХГК, ХтГК и др) разместить у дверцы муфельной печи (или на дверцу, если она откидывается), нагретой до 400-500 °С (темно- красное каление), и обуг- лить навески, не допуская воспламенения продуктов сухой перегонки. После прекращения выделения продуктов сухой перегонки тигли задвинуть поглубже в муфель, закрыть дверцу повысить температуру до 600-900 °С (ярко- красное каление).

Озоление вести до полного исчезновения черных частиц, пока цвет золы не станет белым или слегка сероватым. После охлаждения в эксикаторе тигли взвесить, затем повторно прокалить не менее 20 мин и снова взвесить, если масса тиглей с золой не изменилась после повторного взвешивания озоление считают законченным, а если масса их уменьшилась более чем на 0,0002 г, про- каливание повторить.

Зольность (X) в процентах каждой навески хитин-глюканового комплекса в пересчете на сухое вещество вычисляют по формуле 6.3:

$$X = \frac{m_z \times 100 \times 100}{m_n \times (100 - W)} \quad (6.3),$$

где m_z – масса золы, г; m_n – масса навески размолотого зерна, г; W – влажность размолотого хитин глюканового комплекса, %.

6.2.7 Определение содержания карбоксиметильных групп методом кондук- тометрического титрования

Навеску 0,5 г исследуемого образца поместить в бюкс и высушить в тече- ние 1 ч при температуре 100-105°С в сушильном шкафу. Затем бюкс поместить в эксикатор для охлаждения. Высушенный и охлажденный продукт взвесить в бюксе с точностью до 0,0001 г. Навеску из бюкса перенести в колбу и взвесить пустой бюкс для определения точной массы навески.

В колбу с навеской добавить 15 мл 70% раствора этилового спирта и оставить на 10 минут. После этого добавить 100 мл кипяченой дистиллирован- ной воды и 3 мл 0,5 М раствора гидроксида натрия, перемешать до полного растворения. Готовый раствор перенести в ячейку для титрования (колба на 500 мл), колбу ополоснуть 100 мл дистиллированной кипяченой водой и вылить в ячейку для титрования.

Определить сопротивление раствора и титровать 0,4 М раствором соля- ной кислотой, добавляя порции по 0,3-0,4 мл. После добавления каждой порции раствора записывать значения сопротивления.

По полученным данным построить график зависимости сопротивления от объема титранта, и содержание карбоксиметильных групп определяли по фор- муле 6.4:

$$\text{КМГ, \%} = \frac{V_2 - V_1 \times N \times 81}{g \times 1000} \times 100 \quad (6.4),$$

где V_1 – точка, в которой заканчивается титрование добавлено к раствору щелочи и начинается титрование карбоксиметильных групп, мл; V_2 – точка, где заканчивается титрование карбоксиметильных групп и начинает титроваться

избыток кислоты, мл; N – концентрация кислоты, г-экв/л; 81 – эквивалент карбоксиметильных групп; g – масса навески, г.

6.2.8 Определение антимикробной активности хитин- и хитозан-глюкановых комплексов

Метод Пастера (метод предельных разведений)

Оборудование, посуда и реактивы:

Пробирки; чашки петри; хим. стаканы; шпатель дригальского; пипетки на 10 мл; штатив; спиртовка; спички; вата; 70% этиловый спирт; изотонический раствор; шприц; хитин-глюкановый комплекс; хитозан-глюкановый комплекс; карбоксиметилхитин-глюкановый комплекс; *Bacillus subtilis*.

Приготовление питательной среды

Для количественного определения микроорганизмов используют КМА-ФАНМ. 5 г сухой навески растворили в 100 мл воды, нагрели до растворения агара.

Ход работы: для того, чтобы определить антимикробную активность хитина по отношению к *Bacillus subtilis* используют метод Пастера (метод предельных разведений). Суть метода заключается в ряде последовательных разведений жидкой питательной среде. Для получения чистой культуры бактерий готовят взвесь тест-штамма микроорганизма *B. subtilis*-выращенной на скошенной агаризованной среде. Процесс инкубации длился 24 часа в термостате при температуре 26°C.

В пробирки с бактериями добавили 1 мл изотонический раствора, для получения суспензии. Из исследуемого материала делали ряд последовательных разведений для получения концентрации клеток 10^4 КОЕ/мл. Для испытания использовали 4 пробирки, содержащих по 9 мл изотонического раствора. В первую пробирку вносили 1 мл приготовленной бактериальной взвеси, после чего делали ряд последовательных разведений.

В стерильных условиях были приготовлены чашки Петри с твердой питательной средой КМАФАНМ. Стерильной пипеткой был внесен небольшой объём накопительной культуры и аккуратно по всей поверхности среды распределен шпателем Дригальского. Всего для опыта было использовано 6 чашек Петри по две повторности для каждого образца.

В каждой чашке Петри на твердой питательной среде была сделана небольшая лунка, куда заливались исследуемые препараты. Исследования проводились на 3 образцах: ХГК, ХтГК и КМХГК с разведением микроорганизмов в $10^{-4}, 10^{-3}, 10^{-2}$.

Критерием антибактериальной активности образцов пленочного материала служил диаметр, измеренный в миллиметрах, зоны просветления вокруг лунки, на котором наблюдалось полное подавление роста бактерий. Степень чувствительности бактерий к тестируемым образцам оценивалась после измерения диаметров просветленной зоны.

Контрольные вопросы:

1. Какие методы выделения ХГК из биомассы грибов и микроорганизмов наиболее эффективны?
2. Как технологические параметры (концентрация реагентов, температура, время обработки) влияют на выход и состав ХГК?
3. Какие биологические активности (противоопухолевая, иммуностимулирующая, ранозаживляющая) характерны для ХГК и их производных?
4. Каковы перспективы применения ХГК в пищевой промышленности?
5. Чем хитин-глюкановые комплексы грибного происхождения отличаются от хитина ракообразных?
6. Какие химические модификации ХГК (например, получение хитозана) усиливают их функциональные свойства?
7. Какие современные аналитические методы (ХМС, электронная микроскопия, хроматография) используются для изучения состава и структуры ХГК?

7 ПРАВИЛА ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ В ЛАБОРАТОРИИ БИОТЕХНОЛОГИИ

Выполнение лабораторных работ, предусмотренных настоящими методическими указаниями, связано с использованием лабораторного оборудования с движущимися рабочими органами, электронагревательных приборов и спиртовой горелки, химических реактивов, органических растворителей. В связи с этим студент должен знать правила техники безопасности при работе в лаборатории, соблюдение которых необходимо для предотвращения несчастных случаев и опасных ситуаций.

1. В лаборатории запрещено находиться в верхней одежде.
2. К выполнению лабораторной работы не допускаются студенты без защитных халатов (халат любого цвета, с длинными рукавами, застёгнутый на все пуговицы).
3. Запрещено загромождать проходы между рядами и партами сумками, пакетами и т. п.
4. Запрещается помещать какие-либо предметы на электрические розетки, в том числе на розетки, расположенные на металлических стойках.
5. Запрещается прикасаться влажными руками к электрическим розеткам, выключателям, любым электроприборам.
6. Запрещается ремонтировать, чистить или переносить приборы, находящиеся под напряжением. Включённые в сеть электроприборы нельзя оставлять без присмотра.
7. Вращающиеся части оборудования должны быть закрыты (защищены). Включать оборудование при его неисправности категорически запрещается.
8. При работе с лабораторными мельницами запрещено наполнять их более чем на 30 %. Чистить мельницу необходимо с помощью специальной кисточки после отключения прибора от сети. Запрещено перемешивать продукт в мельнице с помощью пальцев или металлических приборов (ложек, вилок, палочек и т.д.), даже если прибор отключён от сети. При размоле проб растительного сырья, при их пересыпании из ёмкости в ёмкость необходимо соблюдать осторожность во избежание попадания растительной пыли на лицо, в глаза.
9. При работе с оборудованием, имеющим высокую температуру, необходимо соблюдать осторожность во избежание ожогов, пользоваться специальными щипцами или рукавицами.
10. При работе со стеклянной посудой необходимо соблюдать предельную осторожность во избежание боя посуды и порезов. Запрещается пользоваться лабораторной посудой для еды и питья.
11. Работа должна выполняться в строгом соответствии с методикой. Запрещается самостоятельно заменять посуду и реактивы, менять продолжительность нагрева проб и вносить иные изменения в методики без разрешения преподавателя.
12. При работе с концентрированными растворами кислот, щелочей, при работе с органическими растворителями запрещается наклоняться над емкостью с этими реактивами во избежание поражения глаз и дыхательных путей.

Первая помощь при возможных несчастных случаях в лаборатории заключается в следующем.

1) В случае пореза принимают меры к прекращению кровотечения. Рану следует обработать йодной настойкой или 3 %-ной перекисью водорода. На рану необходимо наложить стерильную повязку и забинтовать.

2) При тепловых ожогах нельзя смачивать обожжённое место водой. При появлении только красноты ожоги следует обработать бинтом или ватой, смоченными в 96 % этиловом спирте или 3 % растворе перманганата калия. При появлении пузырей обожжённое место обрабатывают спиртом, 3 % раствором перманганата калия или 5 % раствором танина (крепко заваренного черного чая).

Внимание! В случае любой чрезвычайной ситуации студент обязан сразу же поставить в известность преподавателя или инженера лаборатории.

Студенты, не прошедшие инструктаж по технике безопасности, с соответствующей записью в журнале, к работе в лаборатории не допускаются.

Права и обязанности студентов

1. На лабораторном занятии *студент имеет право*:

- задавать преподавателю и/или учебному мастеру вопросы по содержанию и методике выполнения работы;
- на выполнение лабораторной работы по оригинальной методике с согласия преподавателя, при безусловном соблюдении требований безопасности;
- выполнить лабораторную работу, пропущенную по уважительной причине, в согласованные с преподавателем часы, в присутствии учебного мастера;
- быть оценённым по выполненным лабораторным работам в соответствии с Положением о модульно-рейтинговой системе квалитетрии учебной деятельности студентов (МРСК).

2. *Студент обязан*:

- прибыть на лабораторное занятие во время, установленное расписанием, с необходимой предварительной подготовкой. К выполнению лабораторной работы допускаются студенты, подтвердившие готовность в объёме требований, содержащихся в методических указаниях к лабораторной работе и (или) в устных предварительных указаниях преподавателя;
- во время занятий соблюдать требования правил внутреннего распорядка Вуза и правила поведения в лаборатории;
- после выполнения лабораторной работы оформить отчёт и представить его преподавателю для проверки с последующей защитой.

3. *Студент несёт ответственность* за:

- пропуск лабораторного занятия по неуважительной причине;
- неподготовленность к лабораторной работе;
- несвоевременную сдачу отчётов по лабораторной работе и их защиту;
- порчу имущества и нанесение материального ущерба лаборатории.

В соответствии с Положением о МРСК, студент, получивший после выполнения и защиты всех лабораторных работ по дисциплине семестровый рейтинг менее 25 баллов, не допускается к экзамену по данной дисциплине.

8 РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Аркадьева, З.А. Промышленная микробиология / З.А. Аркадьева, А.М. Безбородов, И.Н. Блохина [и др.]; под ред. Н.С. Егорова. – М. : Высш. шк., 1989. – 688 с.
2. Биотехнология: учеб. пособие для вузов: в 8 кн. / под ред. Н. С. Егорова, В. Д. Самуилова. – М.: Высш. шк. – Кн. 1: Егоров Н.С., Олескин А.В., Самуилов В.Д. Проблемы и перспективы. – 1987. – 159 с.; Кн. 2: Дебабов В. Г., Лившиц В.А. Современные методы создания промышленных штаммов микроорганизмов. – 1988. – 208 с.; Кн. 8: Березин И. В. [и др.]. Инженерная энзимология. – 1987. – 143 с.
3. Бутова, С.Н. Теоретические основы биотехнологии. Биохимические основы синтеза биологически активных веществ / С.Н. Бутова, И.А. Таписева, Г.И. Эль-Регистан; под общ. ред. И.М. Грачевой. – М. : Элевар, 2003. – 554 с.
4. Тимощенко, Л.В. Основы микробиологии и биотехнологии : учебное пособие / Л.В. Тимощенко, М.В. Чубик. – Томск: Изд-во Томского политехнического университета, 2009. – 194 с.
5. Химическая технология фармацевтических субстанций : учебное пособие / А.А. Иозеп [и др.]. — Электрон. издан. — Санкт-Петербург : Лань, 2016. — 384 с. — Режим доступа: <https://e.lanbook.com/book/87576>.
6. Чиркин, А.А. Биологическая химия: учебник / А.А. Чиркин. – Минск: Вышэйшая школа, 2017. – 432 с. – URL: <http://biblioclub.ru/index.php?page=book&id=477417>
7. Шмид, Р. Наглядная биотехнология и генетическая инженерия [Электронный ресурс]: справочное пособие / Р. Шмид. – Электрон. дан. – Москва: Издательство «Лаборатория знаний», 2015. – 327 с. – Режим доступа: <https://e.lanbook.com/book/66240>
8. Шнайдер, К.Л. Микробиологический практикум: учебное пособие / К.Л. Шнайдер, М.Н. Астраханцева, З.А. Канарская. – Казань: Издательство КНИТУ, 2010. – 83 с. – URL: <http://biblioclub.ru/index.php?page=book&id=259055>
9. Методология научных исследований в пищевой биотехнологии: учебное пособие: / В. С. Колодязная, Е. И. Кипрушкина, Д. А. Бараненко [и др.]; Министерство науки и высшего образования Российской Федерации, Университет ИТМО. – Санкт-Петербург: Университет ИТМО, 2019. – 145 с.
10. Жукова, О. В. Основы технологии пищевых производств: учебное пособие / О. В. Жукова, Е. И. Першина; Кемеровский государственный университет. – Кемерово: Кемеровский государственный университет, 2018. – 88 с
11. Белокурова, Е.С. Биотехнология продуктов растительного происхождения: учебное пособие / Е.С. Белокурова, О.Б. Иванченко. – Изд-во Лань, 2019. – 230 с.
12. Мартинчик, А. Н. Микробиология, физиология питания, санитария / Мартинчик А.Н., Королев А.А., Несвижский Ю.В. – М. : Academia, 2010 – 352 с.
13. Серба, Е.М. Биотехнологические основы микробной конверсии кон-

центрированного зернового сусла в этанол / Е.М. Серба, М.Б. Оверченко, Л.В. Римарева. – М.: БИБЛИО-ГЛОБУС, 2017. – 120 с.

14. Римарева, Л.В. Теоретические и практические основы биотехнологии дрожжей / Л.В. Римарева – М. : ДеЛи принт, 2010. – 252 с.

15. Серба, Е.М. Биотехнологические основы направленной конверсии сельскохозяйственного сырья и вторичных биоресурсов для получения пищевых ингредиентов, функциональных продуктов питания и кормов / Е.М. Серба, Л.В. Римарева, Е.Н. Соколова [и др.]. – М. : БИБЛИО-ГЛОБУС, 2017. – 180 с.

16. Кнорре, Д.Г. Биологическая химия – 3-е изд., испр. / Д.Г. Кнорре, С.Д. Мызина– М.: Высшая школа. – 2000. – 479 с.

17. Березин, И.В. Исследования в области ферментного катализа и инженерной энзимологии / И.В. Березин. – М.: Наука. – 1990. – 382 с.

18. Беккер, М.Е. Введение в биотехнологию / М.Е. Беккер. – М.: 2012. – 115 с.

19. Биотехнология. Теория и практика / Н.В. Загоскина и др. – М.: Оникс, 2014. – 496 с.

20. Дебабов, В. Г. Биотехнология. В 8 книгах. Книга 2. Современные методы создания промышленных штаммов микроорганизмов. Учебное пособие / В.Г. Дебабов, В.А. Лившиц. – М.: Высшая школа, 2013. – 208 с.

21. Шмид, Р. Наглядная биотехнология и генетическая инженерия / Р. Шмид. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2014. – 328 с.

22. Волова, Т.Г. Биотехнология / Т.Г. Волова. – Новосибирск: Изд-во СО РАН, 1999. – 252 с.

23. Глик Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Глик Б., Пастернак Дж.. – М.: Мир, 2002. – 589 с.

24. Антипова, Л.В. Прикладная биотехнология / Л.В. Антипова. – СПб.: ГИОРД, 2003. – 288 с.

25. Сазыкин, Ю.О. Биотехнология: учеб, пособие для студ. высш. учеб, заведений / Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чекалева; под ред. А.В. Катлинского. - 3-е изд., стер. – М.: ИЦ «Академия», 2008. – 256 с.

26. Бирюков, В.В. Основы промышленной биотехнологии: Учеб. пособие для вузов / В.В. Бирюков. – М.: Колосс, 2004. – 296 с.

Дополнительная литература

1. Грачева, И. М. Технология микробных белковых препаратов, аминокислот и жиров / И. М. Грачева, Н. Н. Гаврилова, Л. А. Иванова. – М.: Пищевая пром-сть, 1980. – 448 с.

2. Мосичев, М. С. Общая технология микробиологических производств / М. С. Мосичев, А. А. Складнев, В. Б. Котов. – М.: Легкая и пищевая пром-сть, 1982. – 254 с.

3. Андреев, А. А. Производство кормовых дрожжей / А. А. Андреев, А. И. Брызгалов. – М.: Лесная пром-сть, 1986. – 248 с.

4. Практическая химия белка / под ред. А. Дарбре. – М.: Мир, 1989. – 623 с.

5. Быховский, В. Я. Промышленное получение витамина В12 методом

метанового брожения / В. Я. Быховский, Е. С. Панцхава. – М.: АН СССР, 1983. – 15 с.

6. Быховский, В. Я. Микробиологический синтез витамина В12 / В. Я. Быховский. – М.: АН СССР, 1984. – 18 с.

7. Егоров, Н. С. Основы учения об антибиотиках / Н. С. Егоров. – М.: Химия, 1994. – 346 с.

8. Лабораторный практикум по технологии ферментных препаратов / И. М. Грачева [и др.]. – М.: Легкая и пищевая пром-сть, 1982. – 240 с.

Интернет-ресурсы

<http://window.edu.ru/window/catalog> Единое окно доступа к образовательным ресурсам. Раздел: биохимия.

<http://www.lib.asu.ru> электронные ресурсы научной библиотеки АлтГУ

<http://www.rsl.ru> РГБ Российская государственная библиотека

<http://ben.irex.ru> БЕН Библиотека естественных наук

<http://www.gpntb.ru> Государственная публичная научно-техническая библиотека

<http://ban.ru.ru> БАН Библиотека Академии наук

<http://www.nlr.ru> РНБ Российская национальная библиотека

<http://www.elibrary.ru> Научная электронная библиотека РФФИ

<http://www.lib.msu.ru> Библиотека МГУ

9 ТРЕБОВАНИЯ К СТРУКТУРЕ И ОФОРМЛЕНИЮ ОТЧЁТОВ ПО ЛАБОРАТОРНЫМ РАБОТАМ

Отчёт по лабораторной работе оформляется в рабочей тетради каждым студентом индивидуально.

В отчёте должна содержаться следующая информация:

- дата выполнения лабораторной работы;
- номер и название лабораторной работы;
- цель работы;
- описание сущности методик (без сокращений слов);
- содержание полученного студентом индивидуального задания;
- обработка полученных результатов – расчеты, полученные результаты;
- выводы по проделанной работе. В качестве вывода по каждой работе

формулируется *заключение о соответствии* (либо несоответствии) *анализируемого образца по оцениваемому показателю требованиям НД или справочным данным*.

Для отчёта необходимо наличие титульного листа, оформленного в соответствии с приложением А. Отчёты ко всем лабораторным работам должны быть собраны вместе, например, оформлены в одной тетради либо скреплены с помощью скоросшивателя. Титульный лист делается один, общий для отчетов по всем лабораторным работам студента.

Преподаватель проверяет каждый отчёт, подписывает его и проставляет в тетрадь баллы (в соответствии с модульно-рейтинговой системой Вуза), полученные студентом при защите лабораторной работы.

ПРИЛОЖЕНИЕ А Титульный лист отчета по лабораторным работам

Форма титульного листа отчёта по лабораторной работе
Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
ФГБОУ ВО «Алтайский государственный технический
университет И.И. Ползунова»

Отчёт защищён с оценкой _____

Подпись _____

« ____ » _____ 202__ г.

ОТЧЁТ
к лабораторным работам по дисциплине
«Основы биотехнологии культивирования и получения
метаболитов из микроорганизмов и высших грибов»

Студент группы _____
№ группы, ФИО

Преподаватель _____
уч. степень, должность, ФИО

Барнаул 202__

Электронное учебное издание

Галина Сергеевна ВОЛКОВА
Денис Викторович МИНАКОВ
Анастасия Александровна МИНАКОВА
Елена Юрьевна ЕГОРОВА

ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И ПОЛУЧЕНИЯ МЕТАБОЛИТОВ ИЗ МИКРООРГАНИЗМОВ И ВЫСШИХ ГРИБОВ

Учебно-методическое пособие

*для магистров направления подготовки 19.04.01 «Биотехнология»
и аспирантов специальности 4.3.5. Биотехнология продуктов питания и биоло-
гически активных веществ очной формы обучения*

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](#)