

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФГБОУ ВО Пензенский ГАУ**

# **БИОТЕХНОЛОГИЯ**

*Практикум*



**Пенза 2024**

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФГБОУ ВО Пензенский ГАУ**

**Кафедра биологии, биологических технологий и ветеринарно-  
санитарной экспертизы**

**Д.Ю. Ильин, Г.В. Ильина, С.А. Сашенкова**

**БИОТЕХНОЛОГИЯ**

*Практикум*

*для студентов технологического факультета,  
обучающихся по специальности 36.05.01 Ветеринария*

**Пенза 2024**

УДК 577 (075)  
ББК 30.16 (Я 75)  
И46

Рецензент – кандидат биологических наук, доцент кафедры ветеринарии ФГБОУ ВО Пензенский ГАУ А.В. Остапчук

Печатается по решению методической комиссии технологического факультета Пензенского ГАУ от 18 марта 2024г., протокол № 2.

Ильина, Г.В.

**И46 Биотехнология:** практикум / Д.Ю. Ильин, Г.В. Ильина, С.А. Сашенкова; Пензенский государственный аграрный университет – Пенза: ПГАУ, 2024. – Текст: электронный.  
1CD (160)

Практикум составлен в соответствии с программой курса «Биотехнология» для студентов, обучающихся по специальности 36.05.01 Ветеринария. В первом разделе приводятся теоретические сведения по основным разделам биотехнологии с учетом специфики специальности обучающихся. Во второй части практикума содержатся методические указания по выполнению лабораторных работ.

© Д.Ю. Ильин,  
Г.В. Ильина,  
С.А. Сашенкова,  
2024  
© ФГБОУ ВО  
Пензенский ГАУ,  
2024

## Содержание

Введение.....	5
Часть 1 Основные вопросы и понятия биотехнологии. Теоретические сведения.....	7
Глава 1.1 История формирования биотехнологии.....	7
Глава 1.2 Виды и синтез биопрепаратов. Микробиологический синтез и высокие технологии.....	22
Глава 1.3 Биотехнологические основы культивирования микроорганизмов. Первичные и вторичные метаболиты.....	35
Глава 1.4 Технологические основы выделения и концентрирования биопрепаратов и продуктов микробного синтеза.....	58
Глава 1.5 Основы приготовления гипериммунных сывороток.....	68
Глава 1.6 Биотехнологические принципы приготовления диагностических препаратов.....	79
Глава 1.7 Генные и клеточные технологии.....	88
1.7.1 Генная инженерия.....	88
1.7.2 Клеточные технологии.....	106
1.7.3 Тканевые технологии.....	121
1.7.4 Трансгенные животные. Клонирование.....	124
Часть 2 Методические указания для выполнения лабораторных работ.....	129
Лабораторная работа №1 Биотехнология. определение, этапы развития. цели и задачи биотехнологии.....	129
Лабораторная работа №2 Объекты и методы биотехнологии	133
Лабораторная работа №3 Строение микробной клетки. Основные элементы клетки.....	138
Лабораторная работа №4 Химический состав бактериальной клетки. Метаболизм бактерий. Брожение и дыхание. Рост и размножение микроорганизмов.....	143
Лабораторная работа №5 Методы культивирования микроорганизмов.....	151

Лабораторная работа №6 Устройство светового микроскопа. Люминесцентная микроскопия. Устройство электронного микроскопа.....	159
Лабораторная работа №7 Устройство автоклава. Правила упаковки посуды для стерилизации. Стерилизация питательных сред.....	167
Лабораторная работа №8 Термостат, его устройство и назначение. Назначение и устройство сухожарового шкафа.....	174
Лабораторная работа №9 Получение трансгенных животных.....	181
Лабораторная работа №10 Трансплантация эмбрионов КРС.	188
Лабораторная работа №11 Методы определения рН среды...	196
Лабораторная работа №12 Установки для поверхностного и глубинного культивирования микроорганизмов.....	199
Лабораторная работа №13 Контроль сырья для микробиологических процессов. Работа с диагностическими сыворотками и бактериофагами.....	204
Словарь терминов (гlossарий).....	213
Список рекомендуемой литературы.....	218

## **Введение**

Сегодня биотехнология стремительно выдвигается на передний край научно-технического прогресса. Бурное развитие молекулярной биологии и генетики позволило использовать потенциал живых организмов в интересах хозяйственной деятельности человека. Острая практическая потребность в новых технологиях, призванных ликвидировать нехватку продовольствия, энергии, минеральных ресурсов, улучшить состояние здравоохранения и охрану окружающей среды определяет решающий вклад биотехнологии в решение этих глобальных проблем человечества. Биотехнология, в сущности, не что иное, как использование культур клеток микроорганизмов, животных и растений, метаболизм и биосинтетические возможности которых обеспечивают выработку специфических веществ.

Взаимодействие ветеринарной медицины с биотехнологией способствует решению различных задач, направленных на предупреждение болезней животных и их лечение, выпуск полноценных и безопасных в ветеринарном отношении продуктов животноводства и защиту населения от болезней, общих для человека и животных. В настоящее время широко внедрены в практику методы искусственного оплодотворения, множественная и эмбриональная трансплантация у животных, что позволяет воспроизводить генетический материал высокого качества с существенным влиянием на состав продукции молока (жир, белок, наличие аминокислот и др.), мяса (мягкость, мраморность), шерсти (длина, толщина, однородность, шелковистость). Кроме того, биотехнология активно используется для контроля и поддержания здоровья животных, в том числе за счет производства вакцин путем биотехнологических процессов, внедрения молекулярных инструментов для выявления возбудителей таких заболеваний, как вирусные болезни у крупного рогатого скота, классическая чума свиней, туберкулез, сальмонеллез, бруцеллез и микоплазмоз. Это направление способствует увеличению продуктивности животных и улучшению их здоровья, лучшей адаптации к климатическим условиям, а также повышению эффективности сельскохозяйственного производства в целом.

В курсе «Биотехнология» изучаются теоретические основы биотехнологии и основы биотехнологических производств, биотехнологические аспекты производства профилактических, диагностических и терапевтических препаратов, в том числе генноинженерных вакцин, моноклональных антител, иммобилизованных ферментов; основные и вспомогательные элементы технологии производства и контроля качества биопрепаратов; методы подготовки технологического оборудования к работе, выделения, концентрирования, высушивания и приготовления готовых лекарственных форм препаратов из продуктов микробного синтеза, способы масштабирования и оптимизации биотехнологических процессов.

## **Часть 1 Основные вопросы и понятия биотехнологии.**

### **Теоретические сведения**

#### **Глава 1.1 История формирования биотехнологии**

Человек с древнейших времен использовал биотехнологии в виноделии, пивоварении или хлебопечении. Но процессы, лежащие в основе этих производств, долго оставались загадочными. Их природа прояснилась лишь в конце XIX — начале XX века, когда были разработаны методы культивирования микроорганизмов, пастеризации, выделены чистые линии бактерий и ферменты. Для обозначения наиболее тесно связанных с биологией разнообразных технологий раньше использовали такие наименования, как «прикладная микробиология», «прикладная биохимия», «технология ферментов», «биоинженерия», «прикладная генетика», «прикладная биология». Это привело к возникновению новой отрасли – биотехнологической.

Биотехнология как наука формировалась и эволюционировала по мере развития человеческого общества. Видимо правомерно отнести, возникновение современной биотехнологии, начавшей свое формирование на базе существующих отраслей микробиологической промышленности, к началу 50-х годов прошлого века, а весь предшествующий данному периоду этап, назвать предысторией формирования биотехнологии, восходящей к древним цивилизациям. В этой связи третий съезд Европейской ассоциации биотехнологов в Мюнхене (1984 г.) доброжелательно воспринял предложение голландца Е. Хаувинка о выделении 5 периодов (эр) в развитии биотехнологии:

1 Допастеровская эра (до 1865 г.) – использование спиртового и молочнокислого брожения для изготовления вина, пива, хлеба. Получение кисломолочных продуктов и уксуса.

2 Послепастеровская эра (1866-1940 гг.) – производство этанола, бутанола, ацетона, органических кислот и бактериальных вакцин. Аэробная очистка канализационных вод. Производство кормовых дрожжей.

3 Эра антибиотиков (1941-1960 гг.) – производство пенициллина и других антибиотиков путем глубинной ферментации. Культи-



вирование растительных клеток и получение вирусных вакцин. Микробиологическая трансформация стероидов.

4 Эра управляемого биосинтеза (1961-1972 гг.) – производство аминокислот с помощью микробных мутантов. Получение чистых ферментов. Промышленное использование иммобилизованных ферментов и клеток. Анаэробная очистка канализационных вод и получение биогаза. Производство бактериальных полисахаридов.

5 Эра современной биотехнологии (после 1972 г.) – использование генной и клеточной инженерии в целях получения агентов биосинтеза. Получение моноклональных антител, гибридов из протопластов и мерисистемных культур. Трансплантация эмбрионов.

Если говорить об этапах развития биотехнологии, то до последней трети 19 века длился первый эмпирических этап, при котором главную роль играл многовековой опыт биотехнологического производства.

Огромную роль в разработке научных основ биотехнологии сыграли работы одного из величайших естествоиспытателей 19-го века – Луи Пастера (1822-1895). Начав свою научную карьеру с чисто химических работ, наиболее известной из которых является исследование винных кислот, послужившее толчком к развитию стереохимии, в 50-х годах 19-го века Пастер занялся изучением брожения. Луи Пастер впервые установил огромную роль микроорганизмов, как первопричину разнообразных химических превращений и заболеваний живых существ, также он доказал, что спиртовое брожение вызывается дрожжами, а молочнокислое брожение – молочнокислыми бактериями.

В 1857 г. появляется его работа, в которой Пастер доказывает, что спиртовое брожение сахара есть процесс, тесно связанный с жизнедеятельностью дрожжевых грибов, которые питаются и размножаются за счет бродящей жидкости, при этом часть сахара тратится на постройку дрожжевых клеток и образование побочных продуктов – глицерина и янтарной кислоты. Пастер опроверг господствовавшие тогда взгляды Либиха на брожение как на механико-химический акт. Изучение масляного брожения привело к открытию важного факта: было показано, что микробы масляного брожения могут развиваться только в отсутствие воздуха. Были установлены

два типа бактерий - аэробные, требующие для своей жизни воздух, и анаэробные, развивающиеся без него. Позже Пастер опроверг теорию самозарождения микроорганизмов. Его работы по вопросу самозарождения имели очень большое значение для развития и применения антисептических методов в хирургии. Пастер всегда переходил от теории к практике. Изучив спиртовое, масляное и молочное брожение и сделав важное обобщение о брожении как жизни в отсутствие воздуха, он занялся вопросами, имеющими важное промышленное значение – изучением болезней вина и условий образования уксуса. Он выработал оптимальные правила для образования уксуса и выяснил причины вредных изменений, которым подвергается вино. Для предохранения вина от вредных изменений Пастер предложил его повторно нагревать. Позже такое нагревание стали использовать для увеличения сроков хранения пива и молока – этот процесс получил название "пастеризации". Велика роль Пастера в разработке вакцин против многих инфекционных болезней, в частности, сибирской язвы и бешенства. В 1888 г. Пастер создал и возглавил научно-исследовательский институт микробиологии (Пастеровский институт). Работы Пастера оказали, настолько большое влияние на развитие микробиологии (термина "биотехнология" тогда не существовало), что почти столетний период с 60-х годов 19-го века до 40-х годов 20-го века часто называют пастеровской эрой. Пастер установил, что микробы играют основную роль в процессах брожения и показал, что в образовании отдельных продуктов участвуют их конкретные виды. На основе работ Пастера и его учеников в это время были созданы производства этанола, бутанола, ацетона, глицерина, лимонной кислоты, многих вакцин, организованы процессы биологической очистки сточных вод.

В конце XIX века, благодаря трудам Пастера, были созданы предпосылки для развития микробиологии, что также сказалось и на прогрессе биотехнологии. Были предприняты первые попытки наладить производство пищевых концентратов из дрожжей.

Важным достижением этого же периода является приготовление жидких и твердых питательных сред для культивирования микроорганизмов (Р. Кох), поскольку удалось доказать индивидуальность микробов и получать их в чистых культурах. В этот же период

было начато изготовление прессованных пищевых дрожжей, а также продуктов метаболизма бактерий – ацетона, бутанола, лимонной и молочной кислот. Во Франции приступили к микробиологической очистке сточных вод.

В 19 веке было также установлено, что вместо живых организмов можно использовать продукты их жизнедеятельности – ферменты. Еще в 1814 году петербургский академик К.С. Кирхгоф открыл явление биологического катализа и пытался биокаталитическим путём получить сахар из доступного отечественного сырья (до середины XIX века сахар получали только из сахарного тростника). В 1891 году японский биохимик Такамина получил первый патент в США на использование ферментных препаратов в промышленных целях: учёный предложил применить диастазу для осахаривания растительных отходов. Такой важный раздел как разработка и производство вакцин и сывороток для предупреждения инфекционных заболеваний человека и животных начал развиваться после эпохальных открытий Пастера, Коха и Беринга, сделанных в конце 19 века.

Во время первой мировой войны в Германии в промышленных масштабах выращивали дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, которые добавляли в колбасу и супы, компенсируя 60% довоенного импорта пищевых продуктов.

Начало следующему этапу развития той отрасли знаний, которую сейчас называют биотехнологией, положила работа английского микробиолога А. Флеминга (1928), отметившего способность нитчатого гриба зеленой плесени (*Penicillium notatum*) вызывать гибель стафилококков.

Дальнейшая работа привела к выделению в чистом виде первого антибиотика пенициллина, открывшего эру антибиотиков (1940-1960 гг.). Открытие Флеминга было подкреплено работами Флори и Чейна по промышленному получению пенициллина (1940 г). За пенициллином последовало получение стрептомицина, тетрациклинов, эритромицина и других антибиотиков, начала развиваться микробиологическая промышленность. Особенно мощный толчок в развитии промышленного биотехнологического оборудования был отмечен в период производства антибиотиков.

Нельзя не сказать об использовании микроорганизмов для минерализации различных отходов. Процесс минерализации органических отходов, основанный на использовании активного ила, был разработан в 1914 г. С тех пор он был существенно модернизирован и используется во всём мире для переработки стоков. При современной переработке стоков в анаэробных условиях смешанной микрофлоры, попутно получают биогаз (состоит, в основном, из метана и углекислого газа). Такая переработка энергетически эффективна, так как позволяет сохранить и концентрировать энергию, содержащуюся в различных отходах. При этом регенерируется более 80 % свободной энергии. С помощью этого процесса можно получать значительную часть необходимой энергии.

После второй мировой войны появились новые направления в биотехнологии. В сельском хозяйстве – новые методы селекции растений и животных (включая клонирование). В химическом производстве – получение органических кислот (например, лимонной), ферментов для моющих средств.

В энергетике – крупномасштабное производство этанола как жидкого топлива. В пищевой промышленности – создание новых методов переработки и хранения пищевых продуктов, получение пищевых добавок, аминокислот, использование белка, синтезированного одноклеточными организмами и ферментов при переработке пищевого сырья. В мире с помощью микробиологического синтеза производится более 150 тыс. тонн глутамата натрия и 15 тыс. тонн лизина. Микроорганизмы стали использоваться в получении металлов, путем выщелачивания руд. В медицине – стали применять лечебные ферменты, стероиды, новые антибиотики.

Биотехнология – наукоемкая отрасль. Целью биотехнологических исследований является максимальное повышение эффективности каждого из этапов биотехнологического производства и поиск микроорганизмов, с помощью которых можно получить нужные вещества. В 60-70е гг. прошлого века все эти исследования касались только исходной обработки сырья, устройства биореакторов и получения конечного продукта. Благодаря этому был усовершенствован инструментальный контроль процесса ферментации и значительно

расширены возможности крупномасштабного культивирования, что позволило повысить эффективность производства.

В 1953 г. в качестве самостоятельной науки о себе заявила молекулярная биология. Это было связано с открытием Д. Уотсоном и Ф. Криком знаменитой двойной спирали дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) и постулированием матричного механизма ее синтеза. В течение постантибиотической эры (1960-1975 гг.) были созданы технологии получения аминокислот, витаминов В2 и В12, биогаза, микробиологического белка на парафинах, иммобилизованных ферментов. В 70-х годах 20-го века появился термин "биотехнология". Начало современного этапа развития биотехнологии было положено в 1972 г. публикацией американского биохимика Пола Берга с сотрудниками.

До 70-х годов традиционная биотехнология, как научная дисциплина, была не слишком известна и представлялась скорее, как инженерная химия с микробиологическим уклоном. Т.е. в то время биотехнология занималась производством коммерческих продуктов, образуемых микроорганизмами в результате их жизнедеятельности. Тогда же было дано формальное определение биотехнологии, как «Наука о научных и инженерных принципах переработки материалов живыми организмами с целью создания товаров и услуг» или еще более точное определение: «биотехнология – наука о промышленном производстве товаров и услуг при участии живых организмов, биологических систем и процессов».

В настоящее время идет этап молекулярно-биотехнологической революции. Формально началом можно считать 15 октября 1980 г., когда фирма Genentech впервые предложила обществу свои акции. Это была небольшая компания в Калифорнии, успешно работавшая над проблемой получения рекомбинантных ДНК в течение 4 лет. Ученым компании удалось выделить фрагменты гена (последовательности ДНК), кодирующие человеческий инсулин, и перенести их в генетические элементы (клонировующие векторы), способные реплицироваться в клетках обычной кишечной палочки (*E. coli*). Эти бактериальные клетки работали как биологические фабрики по производству человеческого инсулина, который после соответствующей очистки мог использоваться как лекарственный препарат для боль-

ных диабетом, дающих аллергическую реакцию на свиной инсулин. Еще 10 лет назад такое развитие событий представлялось нереальным, но сегодня это стало вполне привычным. Энтузиасты предрекали, что генно-инженерные микробы вытеснят химические удобрения, будут уничтожать разливы нефти; появятся растения с передающимися по наследству устойчивостью к вредителям и исключительно высокой питательной ценностью; будут созданы сельскохозяйственные животные, более эффективно усваивающие пищу, быстро прибавляющие в весе. Казалось, что колько скоро конкретные биологические свойства обуславливаются одним или несколькими генами (единицами наследственности), создание организмов с новым генетическим устройством не составит труда. Прошло немногим более 15 лет, и многие наиболее разумные проекты стали реальностью.

Основные достижения биотехнологии:

1917 г. – Карл Реки ввел термин «биотехнология»;

1943 г. – произведен пенициллин в промышленном масштабе;

1944 г. – Эвери, МакЛеод и МакКартти показали, что генетический материал представляет собой ДНК;

В 1950 г. – Ж. Моно разработал теоретические основы управляемого культивирования микробов, которое доработали М. Иерусалимский, М. Стефенсон и др.;

1953 г. – Уотсон и Крик определили структуру молекулы ДНК;

В 60-е годы были сформулированы основные принципы конструирования биореактора для массового культивирования микроорганизмов в промышленных целях – **ферментера**.

1961 г. – учрежден журнал «Biotechnology and Bioengineering»;

1961-1966 гг. – расшифрован генетический код;

1970 г. – выделена первая рестрицирующая эндонуклеаза;

1972 г. – в США П. Берг создал первую рекомбинантную молекулу ДНК, Коррама и др. синтезировали полноразмерный ген тРНК;

1973 г. – Бойер и Коэн положили начало технологии рекомбинантных ДНК;

1975 г. – Колер и Мильштейн описали получение моноклональных антител. Впервые, путём гибридизации соматических кле-

ток, получены гибридомы, секретирующие моноклональные антитела;

1976 г. – изданы первые руководства, регламентирующие работы с рекомбинантными ДНК;

1976 г. – разработаны методы определения нуклеотидной последовательности ДНК;

1978 г. – фирма Genentech выпустила человеческий инсулин, полученный с помощью *E. coli*. Впервые продемонстрирована экспрессия генов гормоном мозга человека – соматотропина и поджелудочной железы – инсулина в бактериальных клетках; инсулин стал первым созданным генноинженерными методами продуктом, который поступил в продажу и используется людьми, страдающими сахарным диабетом;

1980 г. – Верховный суд США слушал дело «Даймонд против Чакрабари», вынес вердикт, что микроорганизмы, полученные генно-инженерными методами, могут быть запатентованы;

1981 г. – поступили в продажу первые автоматические синтезаторы ДНК;

1982 г. – разрешена к использованию первая вакцина для животных, полученная по технологии рекомбинантных ДНК. Поступил в продажу человеческий инсулин, продуцируемый клетками кишечной палочки. Также разработаны генно-инженерные препараты: интерфероны, интерлейкин, соматотропный гормон;

1983 г. – показана впервые экспрессия гена растений в растениях других видов. Для трансформации растений применены гибридные Ti-плазмиды;

1986 г. – прошло полевое испытание в США и Франции первое трансгенное растение – устойчивый к гербициду табак;

1988 г. – выдан патент США на линию мышей с повышенной частотой возникновения опухолей, полученную генно-инженерными методами. Создан метод полимеразной цепной реакции (ПЦР);

1990 г. – в США утвержден план испытания генной терапии с использованием соматических клеток человека;

1990 г. – официально начаты работы над проектом «Геном человека»;

1994-1995 гг. — опубликованы подробные генетические и физические карты хромосом человека;

1996 г. — определена нуклеотидная последовательность всех хромосом эукариотического микроорганизма *Saccharomyces cerevisiae*;

1997 год — продемонстрирована возможность получения потомства млекопитающих путём оплодотворения яйцеклеток, лишённых ядер, ядрами соматических клеток; этот способ получил название «клонирование» и первым клонированным млекопитающим была овца «Долли».

Развитие и преобразование биотехнологии обусловлено глубокими переменами, происшедшими в биологии в течение последних 25–30 лет. Основу этих событий составили новые представления в области наследственности и методические усовершенствования, которые приблизили человечество к познанию превращений ее материального субстрата и проложили дорогу новейшим промышленным процессам. Помимо этого, ряд важнейших открытий в других областях также повлиял на развитие биотехнологии.

Современная биотехнология — это междисциплинарная наука и отрасль производства, которая базируется на использовании биологических объектов и систем при получении пищевых продуктов, энергии, медицинских препаратов; при очистке сточных вод, переработке отходов и др. Как уже отмечалось выше, биотехнология возникла на стыке многих наук. Фундамент биотехнологии составили такие науки, как микробиология, вирусология, физиология, биохимия, генетика, селекция, цитология, молекулярная биология, генетическая инженерия, клеточная инженерия, энзимология, иммунология, биофизика, экология, медицина, сельскохозяйственные науки, химия, физика, математика, кибернетика и др.





*Рисунок 1 – Междисциплинарная природа биотехнологии. Связь биотехнологии с другими науками*

Можно выделить, по крайней мере, четыре направления, определивших развитие биотехнологии. Прежде всего, это наиболее «старая» область - микробиология. Микробиология – наука о микроорганизмах. Микроорганизмы – это мельчайшие организмы, различимые только под микроскопом. Основные преимущества промышленного культивирования микроорганизмов: простота их организации, высокая скорость роста и размножения, большое разнообразие физиологических и биохимических свойств, способность развиваться в условиях непригодных для жизни других организмов, способность разлагать сложные органические соединения (белки, углеводы, в том числе целлюлозу и т.п.), вещества, токсичные для человека и животных (например, метанол, сероводород и т.п.), ксенобиотики (вещества неприродного происхождения). На настоящем этапе именно микробиологические процессы в наибольшей степени развиты до уровня промышленного использования. Это, прежде всего, крупнотоннажное производство микробной биомассы, антибиотиков и других лекарственных веществ, аминокислот. Второе направление биотехнологии – инженерная энзимология. Инженерная энзимология – это отрасль биотехнологии, базирующаяся на использовании каталитических функций ферментов (или ферментных систем) в

изолированном состоянии или в составе живых клеток для получения соответствующих целевых продуктов. Биообъект (в данном случае) – фермент (или комплекс ферментов), на практике обычно используются иммобилизованные ферменты (иммобилизованные клетки), благодаря чему стабилизируется и пролонгируется их ферментативная активность. Иногда инженерную энзимологию отождествляют с биотехнологией. В этом содержится большая доля истины, так как все реакции в клетках катализируются ферментами. Однако термин «инженерная» привносит свою специфику, заключающуюся в акценте на создание конструкции, в данном случае – на конструирование биокатализаторов с заданными свойствами с последующим их использованием в биотехнологическом процессе. Два других направления биотехнологии – генная инженерия и клеточная инженерия – самые молодые, но очень перспективные области биотехнологии. Первое состоит в искусственном конструировании молекул ДНК, несущих всю генетическую информацию о данном организме, т.е. заключающих в себе всю программу его роста и развития. Таким образом, можно направленно влиять на наследственность и получать новые виды с необходимыми свойствами. В основе клеточной инженерии лежит культивирование клеток и тканей высших организмов – растений и животных. Клеточная инженерия – это метод конструирования клеток нового типа на основе их культивирования, гибридизации и реконструкции, базирующийся на использовании методов культуры клеток и тканей. Биотехнология рождена усилиями многих наук, познающих живую материю, и отвечает социальному заказу развивающегося человеческого общества. Осваивая все новые сферы применения, биотехнология несет в себе огромный практический потенциал улучшения материальных условий существования людей. В широком смысле биотехнология представляет собой пограничную между биологией и техникой научную дисциплину и сферу практики, изучающую пути и методы изменения окружающей человека природной среды в соответствии с его потребностями. В узком смысле биотехнология – совокупность методов и приемов получения полезных для человека продуктов и явлений с помощью биологических агентов. В состав биотехнологии входят генная, клеточная и экологическая инженерии. Современ-

менный этап научно-технического прогресса характеризуется революционными изменениями в биологии, которая становится лидером естествознания. Биология вышла на молекулярный и субклеточный уровень, в ней интенсивно применяются методы смежных наук (физики, химии, математики, кибернетики и др.), системные подходы. Бурное развитие комплекса наук биологического профиля с расширением практической сферы их применения обусловлено также социально-экономическими потребностями общества. Такие актуальные проблемы, стоящие перед человечеством второй половины XX века, как дефицит чистой воды и пищевых веществ (в особенности белковых), загрязнение окружающей среды, недостаток сырьевых и энергетических ресурсов, необходимость развития новых средств диагностики и лечения, не могут быть решены традиционными методами. Поэтому возникла острая необходимость в разработке и внедрение принципиально новых методов и технологий. Большая роль в решение комплекса этих проблем отводится биотехнологии, в рамках которой осуществляется целевое применение биологических систем и процессов в различных сферах человеческой деятельности.

В настоящее время биотехнология представляет собой уже биоиндустрию. Последняя включает в себя промышленную биотехнологию (производство белка, аминокислот, витаминов, ферментов, органических кислот), пищевую биотехнологию (производство алкогольных напитков, соков, кисломолочных напитков, хлебопекарных изделий), сельскохозяйственную биотехнологию (получение гербицидов, биоинсектицидов, производство профилактических и терапевтических препаратов для ветеринарии), экологическую биотехнологию (очистка сточных вод, переработка производственных и хозяйственных отходов), биоэнергетику (получение биогаза, этанола, водорода) и т.д. Объединяет все эти отрасли биотехнологии одно общее свойство – все вышеупомянутые процессы основаны на использовании не искусственных, а природных систем, а именно различных прокариотических и эукариотических организмов.

Генетическая инженерия – один из важнейших методов биотехнологии, предполагающий целенаправленное искусственное создание определенных комбинаций генетического материала, способ-

ных нормально функционировать в клетке, т.е. размножаться и контролировать синтез конечных продуктов. Таким образом, генетическая инженерия включает выделение из клеток отдельных генов или синтез генов вне клеток, направленную перестройку, копирование и размножение выделенных или синтезированных генов, а также их перенос и включение в подлежащий изменению геном и таким путем можно добиться включения в клетки бактерий «чужих» генов и синтеза бактериями важных для человека соединений. Развитие генетической инженерии стало возможным благодаря открытию двух ферментов: рестриктаз, разрезающих молекулу ДНК в строго определенных участках и лигаз, сшивающих определенные участки различных молекул ДНК друг с другом. Кроме того, в основе генетической инженерии лежит открытие векторов, которые представляют собой короткие, самостоятельно размножающиеся в клетках бактерий кольцевые молекулы ДНК. С помощью рестриктаз и лигаз в векторы встраивают необходимый ген, добиваясь в последствии его включения в геном клетки хозяина.

Различают следующие виды генетической инженерии:

1. Генная инженерия: её сущность состоит в целенаправленном использовании перестроек естественного генома, осуществляемых *in vivo* и *in vitro*, для изменения генетических характеристик известных вирусов и клеток, прямое манипулирование рДНК, включающими отдельные гены.

2. Геномная инженерия: её сущность заключается в целенаправленной глубокой перестройке генома акариот, прокариот и эукариот, вплоть до создания новых видов, т.е. перенос всего или большей части генетического материала от одной клетки к другой. При геномной инженерии возможно получение половых (слиянием гамет) и соматических (слиянием неполовых клеток) гибридов.

3. Хромосомная инженерия связана с переносом изолированных хромосом от клетки-донора одного организма в клетку-реципиент другого организма.

Клеточная инженерия – это технологии, основанные на возможности выращивания тканей и клеток *in vitro*; на слиянии соматических (неполовых) клеток или их протопластов. Первые научные эксперименты по культивированию клеток животных были проведе-

ны в 1907 году Р. Гаррисоном. Предложенный им метод культивирования клеток в сгустке лимфы с добавлением эмбриональных экстрактов используется и в настоящее время.

Выделяют два направления развития клеточной инженерии:

- использование клеток, переведенных в культуру, для синтеза различных соединений;
- применение культивируемых клеток для получения из них растений-регенератов.

Клеточная инженерия позволяет конструировать клетки нового типа, комбинировать отдельные фрагменты клеток (ядра, митохондрии, пластиды, цитоплазму и хромосомы и т.п.), соединять клетки различных видов, относящиеся не только к разным родам, семействам, но и царствам. Клеточная инженерия широко используется в селекции растений. Выделены гибриды томата и картофеля, яблоки и вишни. Регенерированные из таких клеток растения с измененной наследственностью позволяют синтезировать новые формы, сорта, обладающие новыми свойствами и устойчивые к неблагоприятным условиям среды и болезням. Этот метод широко используется и для «спасения» ценных сортов, пораженных вирусными болезнями. Основа современного биотехнологического производства – биотехнология микробного синтеза, т.е. синтез различных веществ с помощью микроорганизмов. В крупнотоннажных производствах – производство дрожжей и напитков, этанола, большинства органических кислот и аминокислот, растворителей, ферментов, полисахаридов и т.д. Культуры микроорганизмов применяют также при тонком биосинтезе антибиотиков, витаминов, гормонов. Широкие перспективы открывает возможность микробиологического синтеза белков человека (инсулина, соматотропина, интерферона), создание генно-инженерных вакцин. Большие возможности для успешного развития животноводства открыли технология трансплантации эмбрионов, клонирование, гибридная технология и т.д.

Поскольку биотехнология используется в различных отраслях промышленности и затрагивает многие сферы жизни человека, в мире принята следующая "цветовая" классификация биотехнологии (рис. 2).

«Красная» биотехнология – биотехнология, связанная с обеспечением здоровья человека и потенциальной коррекцией его генома, а также с производством биофармацевтических препаратов (протеинов, ферментов, антител). «Зеленая» биотехнология - направлена на разработку и создание генетически модифицированных (ГМ) растений, устойчивых к биотическим и абиотическим стрессам, определяет современные методы ведения сельского и лесного хозяйства. «Белая» – промышленная биотехнология, объединяющая производство биотоплива, биотехнологии в пищевой, химической и нефтеперерабатывающей промышленности. «Серая» биотехнология связана с природоохранной деятельностью, биоремедиацией, «синяя» – с использованием морских организмов и сырьевых ресурсов.

Термины предложены в 2003 г. на Всемирном форуме по биологическим наукам.



Рисунок 2 – Сегменты мировой биотехнологической индустрии

## Глава 1.2 Виды и синтез биопрепаратов. Микробиологический синтез и высокие технологии

**Микробиологическим синтезом** называется синтез самых разнообразных веществ с помощью микроорганизмов. В настоящее время микроорганизмы применяют в различных высоких технологиях: для производства антибиотиков, кормового белка и аминокислот, биологически активных соединений (витаминов, гормонов, ферментов, стимуляторов роста) и т. д. Превращение одних веществ в другие с помощью микроорганизмов называется **биоконверсией**. Применяя методы **генетической и клеточной инженерии**, современная биотехнология осуществляет широкое конструирование генетически модифицированных организмов (ГМО), в том числе микроорганизмов, растений и животных. В дальнейшем предполагается использование ГМО в природных условиях (в сельском хозяйстве, рыбоводстве, для биологической борьбы с вредителями сельского и лесного хозяйства и т. д.). Однако перед генетической инженерией стоит ряд этических и технологических проблем. При выпуске ГМО в окружающую среду они могут взаимодействовать с разнообразными организмами, сообществами и экосистемами конкретных территорий, в то время как процесс и исход таких взаимодействий не всегда поддается прогнозированию. В частности, существует опасность внедрения «искусственных генов» в геном природных организмов в результате скрещивания ГМО и «диких» форм. Из-за возможных непредсказуемых последствий необходимы исследования, направленные на изучение биобезопасности ГМО.

Огромная масса продуктов, которые мы потребляем, – биопродукты, полученные с помощью микроорганизмов. Эти продукты (хлеб, сыр, простокваша, вино и т. д.) еще и сегодня производят по технологии, разработанной нашими далекими предками и уходящей корнями в глубь тысячелетий, когда человек не осознавал природу этих процессов.

В настоящее время благодаря достижениям современной науки микроорганизмы используются осознанно и интенсивно: создаются новые их виды, превышающие по производительности своих природных аналогов в десятки и сотни раз; разрабатываются симбиоти-

ческие композиции, состоящие из нескольких видов микроорганизмов; используются высокоорганизованные клетки растений и животных, способных работать в подобранных питательных средах вне организма.

**Все препараты, получаемые микробиологическим синтезом, делятся на 3 группы:**

- биопрепараты, содержащие в товарном продукте в качестве основного активного компонента жизнеспособные микроорганизмы (средства защиты растений, закваски, бактериальные удобрения и т.д.);
- биопрепараты, в состав которых входит инактивированная биомасса (кормовые дрожжи, грибной мицелий т. д.);
- биопрепараты, получаемые на основе очистки продуктов метаболизма микроорганизмов.

Для получения продуктов микробного синтеза в каждом отдельном случае используются модифицированные, специальные технологии, включающие особенности питательных сред, режимов культивирования, выделения и концентрирования продуктов. Тем не менее, все процессы биосинтеза имеют общую схему:



*Рисунок 3 – Общая схема процессов биосинтеза*



В биотехнологии «производительная сила» – это **штамм - продуцент**, поэтому именно его свойства определяют характер промышленного производства того или иного продукта. Используются как природные штаммы, выделенные из естественных источников, так и мутантные. В процессе производства полезные свойства штамма должны быть не только сохранены, но и усилены. Недостаточная чистота культуры приводит к снижению скорости роста технологических и экономических показателей производства, ухудшению качества целевого продукта. Только применение чистых культур производственных микроорганизмов гарантирует получение продукции высокого качества.

**Белок животного происхождения** – наиболее дефицитный компонент пищи. Мировая потребность в нем в настоящее время удовлетворяется лишь на 40 %. В связи с этим необходим поиск (в том числе и методами промышленно биотехнологии) ресурсов белка для пищевых целей.

Одним из современных способов получения белковых веществ является микробиологический синтез, поскольку по скорости роста микроорганизмы превосходят сельскохозяйственные культуры в сотни, а животных — в тысячи раз. Кроме того, для микробиологического синтеза не требуется больших земельных площадей, он не зависит от погодных и климатических условий и не загрязняет окружающую среду ядохимикатами.

Микробные белки близки по составу к белкам животного происхождения, и их применение в кормопроизводстве улучшает качество и усвояемость традиционных растительных кормов. Например, 1 т кормовых дрожжей обеспечивает экономию 5 т зерна и увеличивает продуктивность в животноводстве на 15-30 %. Современный средний завод по производству микробного белка мощностью 50 т/год, занимающий площадь 0,2 га, может обеспечить потребность белке до 10 млн человек. Сельскохозяйственные технологии для таких масштабов производства требуют либо наличия до 16 тыс. га земельных угодий, засеянных пшенице, либо содержания фермы, производящей 400 поросят в день.

В 1960-е гг. появился термин «белок одноклеточных организмов» (обычно употребляют его сокращенное название аббревиатуру

БОО, от single cell protein – SCP), которым обозначают целые неживые высушенные клетки водорослей, дрожжей, бактерий или грибов, используемые в качестве белкового продукта для кормовых и пищевых целей. В отечественной литературе этот белок называют белково-витаминным концентратом или БОО. Все эти названия несколько условны, так как в биомассах, помимо белков, существенную долю занимают другие компоненты – сахара, липиды, нуклеиновые кислоты.

Для синтеза белка микроорганизмы способны использовать различные углерод содержащие субстраты: углеводы, жидкие углеводороды; газообразные углеводороды; оксидаты углеводородов; углекислый газ, включая смеси с водородом.

Независимо от вида используемого сырья, типовая схема микробиологического производства белка включает получение и подготовку сырья, получение посевного материала, ферментацию, выделение, инактивацию, сгущение микробной биомассы, последующее высушивание и стандартизацию готового продукта.

Промышленное получение белка с использованием микроорганизмов обычно осуществляется в ферментаторах, работающих по принципу **хемостата**. В среду с размножающимся микроорганизмом непрерывно подают водный раствор минеральных солей и органический субстрат, конкретный для осуществляемого процесса. Культуру перемешивают, аэрируют и охлаждают. Причем целесообразно использовать термотолерантные штаммы, что позволяет вести выращивание при максимально возможной температуре. С одной стороны, это снижает вероятность инфицирования, с другой – уменьшает затраты на охлаждение, так как расходы на эти цели тем ниже, чем больше разность температур между охлаждающим агентом и средой.

Специфика того или иного этапа зависит от особенностей культивируемого микроорганизма. Так, например, выращенные клетки дрожжей отделяют от водной среды сепарированием, а клетки грибов – фильтрацией. Термическую обработку проводят, как правило, при 80–90 °С. Сметанообразную массу после отмирания клеток высушивают в распылительной сушилке, полученные хлопья или порошок гранулируют и упаковывают. Для технолога важно, чтобы ферментатор работал с высокой производительностью,

т. е. его массообменная характеристика использовалась максимально. В то же время избыток субстрата нежелателен, так как создаются условия для неполной его утилизации, что соответственно затрудняет очистку сточных вод, и повышается вероятность попадания его в готовый продукт. В качестве сырья могут быть использованы гидролизаты растительного сырья (древесина, лузга подсолнечника, рис, кукурузные кочерыжки, стебли хлопчатника, богасса и т.д.), углеводороды и т.д. В этом аспекте было выделено два направления:

-ориентация на чистые виды сырья, желательно индивидуальных соединений; -использование различных отходов.

Оба заслуживают пристального внимания, так как в первом случае можно получить продукт постоянного качества, а во втором – создать безотходные технологии, снижая местное загрязнение среды.

Микроорганизмы, используемые в пищевой промышленности, часто входят в состав конечного продукта (хотя доля их там обычно невелика). Особенность белка одноклеточных организмов заключается в том, что он практически целиком состоит из микробной биомассы и в его производстве нередко принимают участие микробы, которые ранее в пище отсутствовали. По этой причине к белку одноклеточных организмов предъявляются повышенные требования (в том числе требование биобезопасности) учреждениями, контролирующими качество пищевых продуктов. Поэтому производство БОО направлено преимущественно на выработку кормов для животных, а не белков, непосредственно идущих в пищу. Корма для животных должны содержать некоторое количество белка (до 15-20 % – в зависимости от их вида и способа содержания). Для их производства можно использовать более широкий круг субстратов, в том числе и органические вещества отходов, что экономически выгодно.

К БОО-продуктам, производимым промышленностью на корм животным, относятся **прутин (Pruteen)** фирмы ICI (биомасса бактерий, выращенных на метаноле), **топрина (Toprina)** фирмы ВР (дрожжи, выращенные на алканах) и грибная масса, получаемая по технологии фирмы **Finnish Pekilo**. При ее производстве в качестве субстрата используют сульфитный щелок – отход бумажной про-

мышленности. Все эти БОО представляют собой слабоокрашенные порошки.

Число БОО-продуктов, используемых в пище, немногочисленно. Это дрожжевой экстракт (гидролизат пекарских дрожжей), применяемый в небольшом количестве как вкусовая и витаминная приправа Единственный новый официально разрешенный вид белковой пищи микробного происхождения – это **микопротеин**, производство которого налажено в Англии фирмой Ranks Hovis Mc Dougal.

Грибной белок микопротеин – это пищевой продукт, состоящий в основном из мицелия гриба. Его производят методом непрерывного выращивания выделенного из почвы штамма *Fusarium graminearum*. Субстратом для него являются глюкоза и другие питательные вещества, а источниками азота – аммиак и аммонийные соли. После завершения стадии ферментации культуру подвергают термообработке (для уменьшения содержания рибонуклеиновой кислоты), а затем уже отделяют мицелий методом вакуумного фильтрования.

### **Получение ферментных препаратов.**

**Ферменты** — это высокомолекулярные вещества белковой природы, активность которых зависит от состава и последовательности аминокислот. Поэтому промышленное их получение химическим синтезом в больших объемах не всегда возможно и желательно. Как правило, ферменты производят с помощью микроорганизмов или экстрагируют из растительных и животных клеток. Особенно много выпускают протеаз, глюкоамилаз, аамилаз и глюкозоизомераз. Микроорганизмы синтезируют большой спектр энзимов, а потому все активнее заменяют растительные и животные ферменты: амилазы грибов и бактерий вытеснили аналогичные ферменты солода и ячменя в пивоварении и хлебопечении; протеазы из аспергилловых грибов – животные и растительные протеазы из *Bacillus licheniformis*, используемые для размягчения мяса, заменили панкреатические протеазы в процессе дубления кожи и производстве моющих средств; реннин из Мисог успешно используется в сыроварении вместо сычужного фермента.

Типовые схемы получения ферментов включают:

- получение активных продуцентов (музейной культуры) и поддержание их в активном состоянии;
- получение посевного материала (ПМ);
- приготовление питательных сред;
- производственное культивирование;
- получение стандартного ферментного препарата и его стабилизация осуществляются путем очистки, концентрирования, высушивания и стандартизации.

#### *Получение антибиотиков.*

Антибиотики относятся, как уже отмечалось, ко вторичным метаболитам. Продуценты в процессе роста быстро проходят тропофазу (стадию быстрого роста), во время которой синтез антибиотиков незначителен, и переходят в идиофазу (замедления роста) — период синтеза идиолинов.

В настоящее время из культур многих микроорганизмов выделено большое количество антибиотиков (более 3000), но практическое применение нашли не более 150.

Промышленное получение антибиотиков включает следующие этапы.

**1.Подготовка среды.** В каждом конкретном процессе для того или иного штамма создается своя среда.

**2.Подготовка посевного материала.** Чистую культуру клонируют на агаризованной среде в пробирке, после чего переносят в колбы с жидкой питательной средой, богатой необходимыми веществами. Через две генерации при глубинном выращивании на шейкере в течение 48—72 ч (для каждой генерации) делают посев из колбы второй генерации в инокулятор объемом 10–15 дм<sup>3</sup>. Развившуюся культуру пересевают в другой инокулятор объемом от 100 до 500 дм<sup>3</sup>, а затем переносят в ферментатор.

**3.Ферментация.**

**4.Отделение биомассы, выделение и очистка антибиотика.**

**5.Сушка, или обезвоживание, антибиотика.**

**6.Контроль стерильности, фасование.**

Способы контроля:

- посевом антибиотика, предварительно инаktivированного, в питательную среду соответствующего состава при ежедневном наблюдении за возможным ростом микроорганизмов;
- выявлением устойчивых к ним форм микроорганизмов и определением чувствительной к ним микрофлоры.

**7. Фармакологический контроль** предполагает испытание препарата антибиотика на токсичность, специфичность и патогенность.

После тщательного и всестороннего контроля определения максимально переносимой дозы (МПД), т. е. дозы, которая приводит к гибели 50 % подопытных животных (LD50) и к гибели всех животных (LD100), препарат рекомендуют к применению. Далее препарат фасуют, маркируют и отправляют в продажу.

Витамины – это низкомолекулярные органические вещества, способные в очень низких концентрациях оказывать сильное и разнообразное воздействие на живые организмы. Они принимают активное участие в метаболизме человека и высших животных, оказывая влияние на различные физиологические процессы (цикл трикарбоновых кислот, распад и синтез жирных кислот, синтез аминокислот и др.). Природным источником многих витаминов являются растения и микроорганизмы.

В производстве многих витаминов ведущие позиции занимает химический синтез. Кроме того, для получения от дельных витаминов огромное значение имеет микробный синтез, например при производстве кормовых препаратов витаминов. Микробиологическим путем получают некоторые витамины группы В, а также эргостерин и каротин- являющиеся, соответственно, предшественниками витамина D2 и провитамина А.

#### *Получение витамина B12.*

Витамин B12 необходим для роста и развития многих животных и микроорганизмов. Способность к его синтезу широко распространена среди прокариотических микроорганизмов. Активно продуцируют витамин B12 *Propionibacterium*, а также *Pseudomonas* и смешанные культуры метанобразующих бактерий.

Микробиологический синтез — единственный способ получения витамина B12 — осуществляют в две стадии на основе пропио-

новокислых бактерий, способных к самостоятельному синтезу коэнзима В12 (аденозилкобаламина 5,6 ДМБ).

Первую стадию культивирования проводят в течение 80 ч в анаэробных условиях и при слабом перемешивании (до полной утилизации сахара). Полученную биомассу центрифугируют и сгущенную суспензию инкубируют во втором аппарате еще в течение 88 ч, аэрируя культуру воздухом ( $2 \text{ м}^3/\text{ч}$ ). Питательная среда содержит сахара (обычно глюкозу, 1-10 %), добавки солей железа, марганца, магния и кобальта (10-100 мг/л), кукурузный экстракт (3-7 %) и азот в виде  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Ферментацию проводят при  $30^\circ\text{C}$  и pH 6,5-7,0. На второй стадии происходит образование ДМБ. После завершения ферментации витамин извлекают из клеток нагреванием в течение 10-30 мин при  $120^\circ\text{C}$ . При последующей обработке горячей клеточной суспензии цианидом происходит образование CN-кобаламина. Продукт сорбируют, пропуская раствор через активированный уголь и окислы алюминия, а затем элюируют водным спиртом или хлороформом. После выпаривания растворителя получают кристаллический витамин В12, выход которого достигает 40 мг/л.

Для нужд животноводства витамин В12 получают на основе смешанной ассоциации, состоящей из четырех культур углеводсбраживающих, аммонифицирующих, сульфатвосстанавливающих и собственно метанобразующих бактерий, которые взаимосвязанно расщепляют органический субстрат до  $\text{CO}_2$  и  $\text{CH}_4$ .

#### *Получение витамина В2.*

Название витамина В2 – рибофлавин – происходит от сахара рибозы, входящего в состав молекулы витамина в виде многоатомного спирта D-рибита. Он широко распространен в природе и в значительных количествах синтезируется растениями, дрожжами, грибами, бактериями.

Животные, не синтезирующие этот витамин, должны получать его в составе комбикормов, поскольку при его дефиците в организме нарушаются процессы белкового обмена, замедляется рост. Препараты рибофлавина используют в медицине для лечения ряда заболеваний, а в животноводстве – в качестве добавки в корма. Микроор-

ганизмы синтезируют рибофлавин и две его коферментные формы – ФАД и ФМН.

Продуцентами витамина В2 являются бактерии (*Brevibacterium ammoniagenes*, *Micrococcus glutamaticus*), дрожжи (*Candida guilliermondii*, *C. flaveri*), микроскопические (*Ashbya gossypii*, *Eremothecium ashbyii*) и плесневые (*Aspergillus niger*) грибы.

Промышленное получение рибофлавина осуществляют химическим, микробиологическим и комбинированным синтезом. В последнем случае синтезированная микроорганизмами рибоза химически трансформируется в В2.

Для медицинских целей микробиологический рибофлавин получают на основе гриба *Aspergillus*.

#### *Получение эргостерина.*

Эргостерин является исходным продуктом при производстве витамина D2 и кормовых препаратов дрожжей, обогащенных этим витамином. Витамин D2 (эргокальциферол) образуется при облучении ультрафиолетом эргостерина, который в значительных количествах синтезируют бурые водоросли, дрожжи, плесневые грибы. Наиболее активные продуценты эргостерина – *Saccharomyces*, *Rhodotoryla*, *Candida*.

В промышленных масштабах эргостерин образуется при культивировании дрожжей и мицелиальных грибов на средах, содержащих избыток сахаров и недостаток азота, при высокой температуре и хорошей аэрации. Более интенсивно эргостерин образуют дрожжи рода *Candida* на средах с углеводородами. Кристаллический препарат витамина D2 получают при культивировании плесневых грибов (*Penicillium*). Для получения кормовых препаратов проводят облучение суспензии или сухих дрожжей (*Candida*). Так, тонкий слой суспензии дрожжей облучают ультрафиолетовыми лампами с длиной волны 280-300 нм.

#### *Получение интерферонов.*

Интерфероны служат одним из самых эффективных средств лечения вирусных инфекций, но они видоспецифичны и могут быть получены только из клеток человека. Технология выделения и очистки интерферонов малоэффективна, прежде всего из-за крайне малого выхода конечного продукта. Поэтому получение генно-



инженерного продукта является перспективной альтернативой традиционным методам выделения интерферонов.

Ген  $\alpha$ -интерферона получили химико-ферментативным методом. Одной из трудностей, которую пришлось преодолеть, было то, что интерферон синтезируется в виде предшественника с дополнительной (сигнальной) последовательностью аминокислотных остатков. Бактериальные клетки не имеют протеиназ, превращающих предшественники в зрелые белки, поэтому надо было синтезировать ген, кодирующий только зрелый интерферон. Такой ген был получен и введен в клетку *E. coli*. Физико-химические свойства  $\alpha$ -интерферона, выделенного из бактерий, оказались близки к свойствам интерферона, выделенного из крови доноров.

Значительным событием явилась удачная попытка введения генов интерферонов в дрожжевые клетки. Замена бактериальной клетки в качестве реципиента на дрожжевую сыграла огромную роль для всей генно-инженерной техники вообще и для получения интерферонов в частности.

Интерфероны выпускают в качестве лекарственных препаратов в виде капель в нос, мазей или растворов для инъекций. В настоящее время как у нас в стране, и за рубежом выпускают коммерческие препараты – человеческий лейкоцитарный, лимфобластный (Велферон) и фибробластный (Ферон), а также интерфероны, полученные генноинженерными методами: рекомбинантные  $\alpha$ -интерферон (Роферон, Реальдерон и др.), Ринтерферон и  $\gamma$ -интерферон (Гаммаферон).

Типы современных биотехнологий: технологии низкого и высокого уровня, экстенсивные и интенсивные, безотходные, безопасные, ресурсо- и энергосберегающие, трудоемкие, наукоемкие, прорывные. Современные биотехнологии различных направлений и различных уровней неразрывно связаны между собой в единую научно-производственную систему.

**Технологии низкого уровня** – это технологии традиционные, в известной мере устаревшие. К таковым относятся технологии биологической очистки сточных вод, получения биотоплива, некоторые виды микробиологического синтеза. Они характеризуются низкой наукоемкостью, т. е. базируются на использовании рабочих систем,

полученных методами традиционной селекции. Такие технологии широко используются в традиционном сельскохозяйственном производстве, в частности в растениеводстве.

Технологии низкого уровня с минимальными затратами материальных ресурсов, энергии и человеческого труда называют **экстенсивными** (например, повышение плодородия почв путем вывоза на поля навоза и торфа, заправки пожнивных остатков и/или сидератов – специально выращенных бобовых растений).

Более эффективны **интенсивные технологии низкого уровня**, и в первую очередь технологии внедрения новых сортов растений, пород животных и штаммов микроорганизмов. Качество сортов (пород, штаммов) определяется их повышенной продуктивностью при увеличении затрат человеческого труда, сырьевых и энергетических ресурсов, все более активном внедрении средств механизации, автоматизации и химизации

Прорывные, принципиально новые технологии могут быть опасны для человека и окружающей среды, поскольку последствия их применения непредсказуемы. Внедрение прорывных технологий, как правило, сопровождается появлением новых видов продуктов и новых видов отходов. Любой новый пищевой или промышленный продукт должен проходить всестороннюю проверку на аллергенность, канцерогенность и мутагенность, на совместимость с другими продуктами, на безопасность для окружающей среды и т. д.

На основе прорывных технологий **создаются биотехнологии высокого уровня** (или просто высокие биотехнологии). В противоположность технологиям низкого уровня, высокие биотехнологии характеризуются высокой наукоемкостью, т. е. использованием систем, полученных самыми современными методами генетики, микробиологии, цитологии, экологии, молекулярной биологии.

**Высокие биотехнологии также подразделяют на экстенсивные и интенсивные.** Экстенсивные высокие биотехнологии характеризуются относительно низкими затратами сырьевых и энергетических ресурсов. К технологиям подобного типа относится большинство микробиологических производств, технологических процессов по подготовке и переработке промышленного сырья,

а также часть производства продукции на основе тканево-клеточных культур. Эти технологии частично интенсифицируются за счет компьютеризации производства.

**Интенсивные высокие биотехнологии** (в противоположность экстенсивным) реализуются с привлечением специалистов высочайшей квалификации, с использованием уникального оборудования и самых современных материалов. Эти биотехнологии применяют в медицине, а также для создания организмов с заранее заданными свойствами. Нужно отметить, что интенсификация высоких технологий, в отличие от интенсификации технологий низкого уровня, заключается в повышении качества ресурсного и информационного обеспечения.

Технологии разных уровней неразрывно связаны между собой: с одной стороны, высокие технологии базируются на технологиях низкого уровня, для их осуществления требуется определенный ресурсный, энергетический и информационный фундамент, с другой – достижения высоких технологий используются на низших уровнях биотехнологических производств.

Высокие технологии представляют собой величайшее достижение человеческого разума. Однако по ряду параметров они не только не превосходят технологии низкого уровня, но даже и уступают им. В частности, высокие технологии требуют все больших вложений всех видов ресурсов, они не решают проблемы получения экологически чистой продукции, а само биотехнологическое производство может представлять угрозу для человека и окружающей среды.

### **Глава 1.3 Биотехнологические основы культивирования микроорганизмов. Первичные и вторичные метаболиты**

Культивирование микроорганизмов и клеток различных тканей связано с особенностями ассимиляции, диссимиляции, роста и размножения представителей трех царств живой природы: животных, растений и микроорганизмов. Культуры представителей указанных семейств различны по форме и содержанию. При решении ряда вопросов биотехнологии ветеринарных препаратов обычно имеют дело с культурами микроорганизмов (бактерий, грибов, вирусов), а также с культурами тканевых клеток, полученных из органов или тканей животных, или человека.

Микроорганизмы поистине являются вездесущими, и они по своей способности заселять объекты внешней среды считаются в экологическом отношении самыми распространенными организмами. Первая наиболее полноценная среда для микроорганизмов была приготовлена учеником Л. Пастера Ролэном в 1869 году для грибов рода *Aspergillus*. Хотя в распоряжении Л. Пастера не было метода чистых культур, но ему с учениками удалось, пользуясь элективными средами, доказать потребность микроорганизмов в главных и второстепенных компонентах среды и в источниках энергии. В 1870 году Р. Кох ввел в практическую микробиологию метод чистых культур, гарантировавших получение на предложенных им плотных питательных средах чистых культур только определенных видов бактерий.

На первых этапах микробиологических исследований культивирование микроорганизмов осуществляли в пробирках или колбах путем выращивания их на поверхности плотных или жидких сред. Для более объемного промышленного культивирования микроорганизмов с целью получения из них различных биопрепаратов стали переходить на использование стеклянной посуды большой емкости (матрасы, бутыли). Причем, в такой посуде выращивали микроорганизмы главным образом на плотных агаровых средах.

На поверхностях различных материалов микроорганизмы образуют скопления, именуемые колониями. Способ выращивания микроорганизмов на поверхности плотных питательных сред называется

**поверхностным культивированием.** Выращивание микробов на плотных питательных средах в бактериологических лабораториях различного направления является одним из основных методов изучения свойств микроорганизмов.

Дело в том, что на плотных питательных средах различные микроорганизмы образуют различные по величине, форме и другим признакам колонии. Колонии представляют собой скопления особей одного вида микроорганизмов, образующихся в результате размножения из одной или нескольких клеток. Колонии бывают плоскими, выпуклыми, куполообразными, вдавленными. Поверхность их бывает гладкой (S-форма, от английского слова smooth – гладкий), шероховатой (R-формой, от английского слова rough – шероховатый). Между S- и R-формами колоний имеются и переходные: О- и М-формы (промежуточные и слизистые). Края колоний могут быть ровными, зазубренными, волокнистыми, бахромчатыми. По величине колонии подразделяются на крупные (4–5 мм в диаметре), средние (2–4 мм), мелкие (1–2 мм) и карликовые (меньше 1 мм). Колонии отличаются и по консистенции, плотности, окраске. Они бывают прозрачными и непрозрачными, окрашенными и бесцветными, влажными, сухими и слизистыми.

Метод поверхностного культивирования микроорганизмов широко используется в лабораториях и биологической промышленности для следующих целей:

- выделение чистых культур из объектов внешней среды;
- определение контаминации производственных штаммов микроорганизмов, из которых готовят биопрепараты;
- приготовление в лабораторных и промышленных условиях некоторых вакцин и большинства антигенов.

Микробиологические манипуляции с биологическим агентом и питательной средой осуществляются в соответствии с конкретным биотехнологическим процессом, разработанным для промышленного культивирования вакцинного (аттенуированного) или производственного (вирулентного) штамма микроорганизма. Основные технологические операции при этом можно систематизировать в виде некоторой иерархии уровней обеспечения параметров культивирования микроорганизма и управления процессом метаболизма со-

зданной биотехнологической системы путем контролирующих операций.

Лишь на основе знания теории питания микроорганизмов, закономерностей их роста и накопления в питательной среде можно обеспечить микробиологический контроль за процессами метаболизма в микробной популяции (культуре) и таким образом обеспечить максимальную эффективность этого этапа работы в биотехнологическом процессе производства биопрепаратов.

**Культивирование** бактерий представляет собой процесс увеличения концентрации некоторых или всех компонентов популяции.

Сводная схема основных методов культивирования микроорганизмов приведена на рисунке 4.



*Рисунок 4 – Основные методы культивирования микроорганизмов*

Обычно характеристики этого процесса устанавливаются путем измерений тех или иных его показателей. Ранее более широкое применение находило культивирование микроорганизмов на поверхности плотных питательных сред. Применение жидких питательных сред позволило избежать некоторых недостатков, связанных с культивированием поверхностным способом, требуя постоянного пере-

мешивания культуры с целью выравнивания условий роста организма в различных частях рабочего объема сосуда. Эту систему можно уже назвать динамической в отличие от описанной выше статической при стационарном культивировании. В качестве характеристик **периодического метода культивирования** рассматривают:

1) внесение посевного материала в питательную среду (инокуляция клетками среды) в начале процесса и получение культуры по достижении заданной фазы развития популяции;

2) концентрацию микроорганизмов в периодической культуре, которая нарастает и останавливается либо из-за лимитирования субстратом, либо из-за ингибирования токсичными продуктами жизнедеятельности;

3) непрерывное изменение физиологического состояния клеток, вызванное изменениями условий, производимыми жизнедеятельностью самих клеток;

4) периодическая система может поддерживать размножение клеток только в течение ограниченного времени. После фазы экспоненциального (логарифмического) роста популяция начинает испытывать недостаток элементов питания и угнетается продуктами метаболизма, что ведет к нарушению физиологического состояния клеток;

5) периодические культуры находятся в неустойчивом состоянии, что является серьезным недостатком, особенно когда их применяют при изучении свойств микроорганизмов.

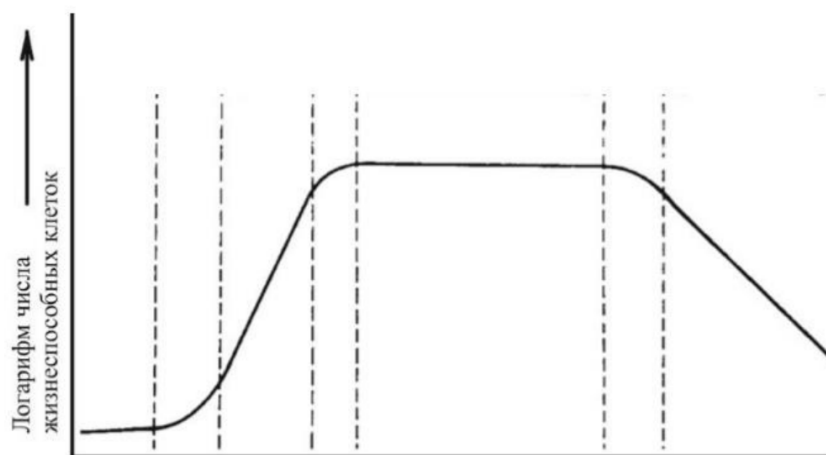
Практически все системы периодического культивирования являются закрытыми, поскольку микроорганизмы в них размножаются и проходят все фазы развития без притока питательной среды и оттока культуральной жидкости. То есть периодическая культура – популяция клеток в ограниченном жизненном пространстве. В период сбалансированного роста удвоение биомассы сопровождается удвоением всех других учитываемых параметров популяции, например, количества белка, ДНК, РНК и внутриклеточной воды. Иными словами, культуры, растущие сбалансировано, сохраняют постоянный химический состав. Поэтому при сбалансированном росте легко определить скорость роста бактериальной популяции в каждый момент времени, если измерить прирост любого компонента клетки по

отношению к исходному количеству этого компонента. Другими словами, в культуре, растущей сбалансировано, скорость прироста вещества клетки в данный момент пропорциональна числу или массе имеющихся в это время бактерий. Коэффициент пропорциональности ( $\mu$ ) называют удельной скоростью роста. Она различна для разных культур и даже для одной культуры удельная скорость может меняться в зависимости от условий выращивания клетки. При изучении динамики роста культур микроорганизмов необходимо строго соблюдать некоторые условия:

- 1) жизнеспособность засева;
- 2) наличие в среде культивирования всех необходимых питательных веществ;
- 3) отсутствие в среде ингибиторов, подавляющих рост клеток;
- 4) поддержание в среде всех физико-химических условий на оптимальном уровне.

Почему же необходимо соблюдать все эти условия? Рост – это согласованное увеличение количества всех химических компонентов, формирующих клеточные структуры. Обычно сопровождается увеличением массы и размеров клетки. Однако это необязательно, т.к. клетка может накапливать запасные резервные вещества, т.е. мы можем наблюдать увеличение массы клетки, но роста при этом наблюдаться не будет. Однако, в подходящей среде, к которой бактерии полностью адаптированы, они будут находиться в состоянии сбалансированного роста. В простой гомогенной периодической культуре можно выделить несколько фаз роста (рис. 5), построив график, по оси абсцисс отложив время, а по оси ординат – десятичный логарифм числа жизнеспособных клеток.





*Рисунок 5 – Основные фазы кривой роста периодической культуры микроорганизмов*

Типичная кривая роста имеет S-образную форму.

I Лаг-фаза (фаза задержанного роста). При внесении клеток из культуры, находящейся в стационарной фазе, в свежую среду того же состава они приобретают способность к возобновлению роста только после определенного периода, в течение которого происходит изменение их химического состава. То есть в клетках бактерий в эту фазу идут в основном процессы, связанные с приспособлением их к условиям культивирования (среда, температура, pH и др.). Продолжительность периода адаптации может быть различной, но обычно она прямо пропорциональна длительности предшествующей стационарной фазы. В свежей среде длительность лаг-фазы зависит:

1) от изменений состава и концентрации питательных компонентов при внесении инокулята;

2) от количества и возраста посевного материала. Внесение небольшого количества инокулята в большой объем свежей среды может привести к диффузии из клеток витаминов, кофакторов и ионов, которые необходимы для поддержания активности многих внутриклеточных ферментов. Если клетки инокулируют из богатой среды в минимальную, то продолжительность лаг-фазы значительно зависит от объема инокулята, поскольку он содержит микроэлементы, попадающие при инокуляции в ростовую среду;

3) от возраста инокулята. Это связано с тем, что в процессе развития в клетках накапливаются токсические вещества и недостаточ-

но питательных веществ, необходимых для первоначального роста. Как правило, при переносе клеток из бедной среды в богатую с увеличением возраста инокулята лаг-фаза удлиняется. Чем старше культура, которую используют для инокуляции новой питательной среды, тем больше продолжительность лаг-фазы. Однако при значительном количестве молодого материала культура может развиваться без лаг-фазы;

4) от предшествующих условий культивирования инокулята (посевного материала). Если источники энергии и углерода в новой среде отличаются от тех, которые были в предшествующей культуре, то приспособление к новым условиям среды может быть связано с синтезом новых ферментов, которые ранее не были нужны и поэтому не синтезировались (а образование новых ферментов будет индуцироваться новым субстратом).

Наконец, изменения состава питательных компонентов, а также их концентрации при переносе инокулята в свежую среду могут оказывать воздействие на длительность лаг-фазы, влияя на регуляцию активности ферментов и морфологическую дифференцировку клеток. Если клетки переносят с бедной среды в богатую, то питательные компоненты и время расходуются на повышение активности ферментов, необходимых для повышения активности метаболизма в целом. Если же клетки переносят с богатой среды на среду с более низким уровнем питательных веществ, то они способны немедленно, хотя и с низкой скоростью, вступить в экспоненциальную фазу роста. Если проанализировать количественный состав бактериальной клетки в течение лаг-фазы, то можно отметить, что во время нее происходит быстрое увеличение количества РНК (в 8-12 раз). Это подтверждает тот факт, что в эту фазу происходит синтез индуцибельных ферментов, нужных для использования нового субстрата среды. Длительность лаг-периода (L) для многих целей удобно определять методом Лоджа и Хиншельвуда. Если на графике зависимости логарифма биомассы от времени (рис. 6) прямую линию экстраполировать до уровня начальной биомассы, то отрезок, отсекаемый при этом на оси абсцисс, и будет соответствовать L.

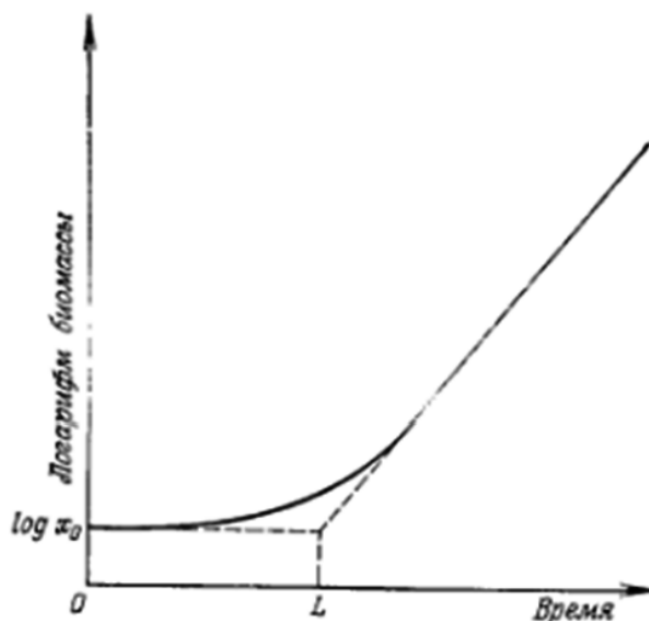


Рисунок 6 – Определение длительности лаг-периода

II Начальная фаза размножения или фаза ускорения роста, когда клетки начинают делиться сначала медленно, а затем все быстрее. Длительность этого периода для большинства микроорганизмов составляет 2 часа и зависит от температуры, состава питательной среды, качества посевного материала. Многие авторы эти две фазы рассматривают вместе. Число клеток остается постоянным по причине отсутствия в этот период клеточного деления. Общее состояние микробных клеток характеризуется как состояние приспособления к питательной среде. В этот период усиливается синтез вещества клеток, они увеличиваются в размере, в них образуется большое количество индуцибельных ферментов.

III Фаза экспоненциального роста. Продолжительность этой фазы зависит от запасов питательных веществ в среде, от условий аэрации, от перемешивания и др. факторов. Характеризуется постоянной максимальной скоростью деления клеток или скоростью роста. Эта скорость зависит от вида бактерий. Например, бактерии *E. coli* при 37 °C делятся примерно каждые 20 минут, для сальмонелл продолжительность этой фазы равна 20-30 мин., для стрептококков и стафилококков – 25-35 мин, а для бактерий *Nitrobacter* и *Nitrosomonas* – 5-10 ч. На продолжительность генерации влияют температура, pH среды, состав среды и т. д. Высокая скорость развития мик-

роорганизмов сохраняется на всей экспоненциальной стадии. Однако эта зависимость наблюдается в течение ограниченного времени. По мере роста культуры в среде постепенно потребляются питательные вещества, накапливаются продукты обмена, затрудняется транспорт питательных веществ (в первую очередь кислорода) и метаболитов вследствие увеличения плотности популяции. Во время экспоненциальной фазы все клетки имеют приблизительно один размер, содержание белков в них постоянно. Клетки содержат максимальное количество РНК. Во время экспоненциальной фазы клетки наиболее жизнеспособны и обладают высокой биохимической активностью. Экспоненциальный рост с высокими скоростями обычно не поддерживается в микробной популяции длительное время. В норме он ограничивается вследствие истощения доступных источников питания, или накопления токсичных продуктов обмена веществ в ростовой среде, или из-за некоторых изменений в физических свойствах среды. В результате этого скорость роста снижается и, в конечном счете, рост прекращается.

IV Фаза отрицательного ускорения. Переход из экспоненциальной фазы в стационарную включает период несбалансированного роста, когда разные клеточные компоненты синтезируются с разными скоростями. В эту фазу скорость размножения замедляется, а время генерации увеличивается. Наступление данной фазы обусловлено истощением питательной среды и накоплением в культуральной жидкости токсических веществ, которые начинают ингибировать развитие культуры. Кроме того, в эту фазу происходит наивысшее накопление микробной массы в единице объема. Такой переход связан не только с нехваткой субстрата, но также с большой плотностью популяции и низким парциальным давлением кислорода.

V Стационарная фаза. Изменения в физическом и химическом составе среды приводят к переходу культуры в стационарную фазу, в которой увеличения количества клеток не происходит, но клетки еще нуждаются в источниках энергии для поддержания своей жизнедеятельности. Поэтому в стационарной фазе химический состав клеток отличается от их состава в экспоненциальной фазе. Клетки меньше по размеру и менее чувствительны к физическим и химиче-

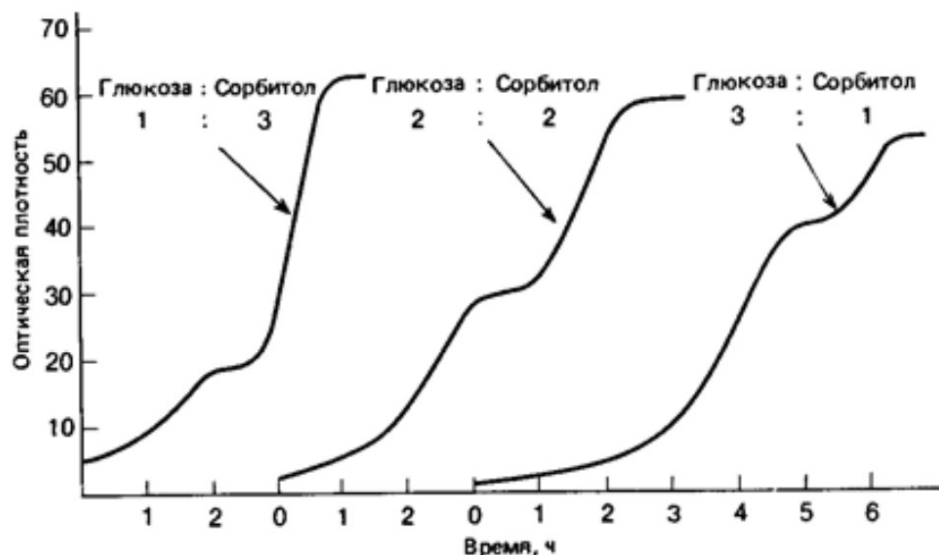
ским воздействиям. В стационарной фазе количество биомассы остается постоянным. В этот период в клетке и в среде нередко накапливаются продукты вторичного метаболизма (антибиотики, пигменты, бактериоцины и др.). Продолжительность этой фазы может быть от нескольких часов до недели в зависимости от вида микроорганизмов. В стационарную фазу роста поведение клеток в бактериальной популяции регулирует такое явление как апоптоз. Суть его сводится к тому, что при исчерпании питательного субстрата голодающая популяция разделяется на две субпопуляции, одна из которых гибнет и подвергается автолизу, а клетки другой субпопуляции, используя продукты автолиза как субстрат, продолжают развиваться и размножаться. Механизм генетического контроля апоптоза у бактерий *E. coli* осуществляется особым опероном *maz*, состоящим из двух генов: *mazE* и *mazF*. Продукт гена *mazF* – стабильный цитотоксический белок-киллер, а продукт гена *mazE* – нестабильный белок MazE, регулирующий белок-киллер. Истощение фонда аминокислот в питательной среде приводит к блокированию оперона *maz*, в результате чего синтез белка MazE прекращается, а белок-киллер вызывает гибель и автолиз части популяции. За счет этого пополняется фонд аминокислот, синтез белка MazE у оставшихся живых клеток активируется, и они продолжают размножаться.

VI-VIII Фазы отмирания: логарифмической гибели клеток, постоянной скорости отмирания и замедленной скорости отмирания. К гибели клеток приводит ряд факторов, важнейшим из которых является исчерпание запасов энергии в клетке. Наблюдается резкое экспоненциальное уменьшение числа жизнеспособных клеток. Скорость отмирания зависит от видовых особенностей организма, а также условий культивирования. Например, энтеробактерии отмирают медленно в отличие от некоторых видов бактерий рода *Bacillus*, которые отмирают быстро. Причины отмирания клеток могут быть разными. Это и накопление органических кислот (как у бактерий родов *Escherichia*, *Lactobacillus*), и автолиз (лизис под действием собственных факторов), и накопление антибиотиков, бактериоцинов, и другие причины. В этот период в культуре наблюдается значительное уменьшение клеток. У них уменьшается биохимическая и антигенная активность. Учитывая это, для изготовления

ряда биопрепаратов отбирают культуры микроорганизмов чаще всего в фазе отрицательного ускорения роста или в начале стационарной фазы роста, когда концентрация живых микробных клеток приближается или равна концентрации мертвых микробных клеток.

Микроорганизмы, которые в условиях окружающей среды, подходящих для роста, теряют способность к росту, должны быть либо мертвыми, либо покоящимися клетками. Отметим существенную разницу между этими двумя понятиями: покоящиеся клетки в определенных условиях могут регенерировать в нормальные растущие клетки или их «вегетативные» формы, а мертвые клетки не могут. Примерами покоящихся форм служат споры бактерий и грибов и цисты простейших. Образование покоящихся форм, как правило, представляет собой свойственный некоторым родам процесс, продолжительность которого длиннее, чем минимальное время удвоения у вегетативных форм. Такое изменение типа клеток в чем-то аналогично дифференцировке тканей у высших животных и растений, хотя было бы неоправданно заходить в этой аналогии слишком далеко, и дифференцировки тканевых клеток здесь мы касаться не будем. Отмирание микроорганизмов может происходить при воздействии неблагоприятных факторов, таких, как высокая температура, токсические соединения, истощение, или «ошибки» в автосинтезе. В растущей культуре покоящиеся и мертвые клетки ведут себя одинаково, не внося никакого вклада в рост популяции. Для некоторых целей вполне достаточно качественной характеристики роста, то есть простого наблюдения, имеет ли место вообще рост культуры. В случае ориентировочной оценки кривой I (возрастания биомассы одноклеточных микроорганизмов) выделяют только четыре фазы: лаг-фазу (соответствует начальной стационарной фазе), фазу ускоренного размножения – логарифмическую, стационарную фазу (соответствует заключительной стационарной фазе) и фазу отмирания. Для бактерий фазы размножения часто (но менее точно) называют фазами роста. При графическом изображении процесса размножения клеток прокариот в ряде случаев могут выявляться две лаг-фазы, предшествующие логарифмической фазе. Это связано с регуляторными процессами в клетках, селективно и последовательно потребляющих вначале доступный субстрат, а затем – менее доступный.

Так, клетки *E. coli* вначале потребляют глюкозу из смеси ее с сорбитолом, и лишь после исчерпания моносахарида используют многоатомный спирт. Это явление называют диауксией (от греч. δι (σ) – дважды, αὐξάνω – увеличиваю, расту), двухфазным или двуциклическим ростом (рис. 7).



*Рисунок 7 – Двухфазный рост микроорганизмов E. coli в питательных средах, содержащих глюкозу и сорбитол в разных соотношениях*

У нитчатых грибов отсутствует логарифмическая фаза, хотя она не исключается для растущих вершущек гиф. В поверхностных культурах выявляется прямолинейная зависимость между возрастом культуры и кубическим корнем из показателя массы мицелия. У таких организмов растущие мицелиальные вершущки конкурируют за питательные вещества более выражено, чем погруженные культуры одноклеточных организмов. Но для того, чтобы иметь дальнейшую более полную информацию, необходимо измерять рост количественно. Если рост периодической культуры прослеживается по увеличению бактериальной массы, то для получения точной информативной картины роста культуры клеток анализируются разные количественные параметры роста: скорость роста, экономический коэффициент, выход бактериальной биомассы, время генерации и другие.

При определении параметров роста исследуют рост простой гомогенной периодической культуры. Предполагается, что такая система состоит из хорошо перемешиваемой, засеянной питательной среды.

Новым этапом в культивировании микроорганизмов явился примененный в 1933 году Ключевым и Пергиным способ встряхивания колб с жидкой средой на качалках с принудительной подачей стерильного воздуха. На этой основе был разработан так называемый **глубинный метод выращивания микроорганизмов**. Метод глубинного выращивания микроорганизмов был предложен вначале для культур аэробных грибов, в дальнейшем он стал использоваться для выращивания других микроорганизмов с целью производства антибиотиков, витаминов, ферментов, вакцин, антигенов и других биопрепаратов. Все возрастающее значение получения культур микроорганизмов в больших количествах побудило интерес к созданию промышленных установок большой емкости с принудительной аэрацией культуры микробов и автоматической регуляцией всех технологических процессов. Такие установки или реакторы назывались еще ферментерами, так как в них выращивались микроорганизмы с использованием их ферментативных свойств при получении антибиотиков, ферментов и других веществ микробного синтеза.

С применением **интенсивной аэрации** скорость размножения микроорганизмов бывает еще выше. Так, на синтетических средах накопление микроорганизмов бактерий кишечной группы за 14 часов культивирования с применением принудительной аэрации составляет 25 млрд/мл, на мясных средах 50–60 млрд/мл, в то время как при культивировании этих же микробов и на тех же средах без аэрации, то есть в стационарных (состоянии покоя) условиях, количество микробов не превышает 1–2 млрд/мл.

Для выращивания микроорганизмов в промышленных условиях в настоящее время применяют реакторы с барбатерами и металлическими мешалками для диспергирования воздуха. Размешиваний питательной среды и ее аэрацию следует рассматривать как единый процесс, так как равномерно аэрировать всю культуральную жидкость в больших емкостях, не прибегая к размешиванию, невозможно.



Глубинный способ культивирования в биопромышленности является основным при производстве большинства биопрепаратов. Он осуществляется, как правило, в реакторах (ферментерах) большой емкости.

Их подразделяют на две группы: по конструкции и по принципу перемешивания культуральной жидкости (рис. 8).

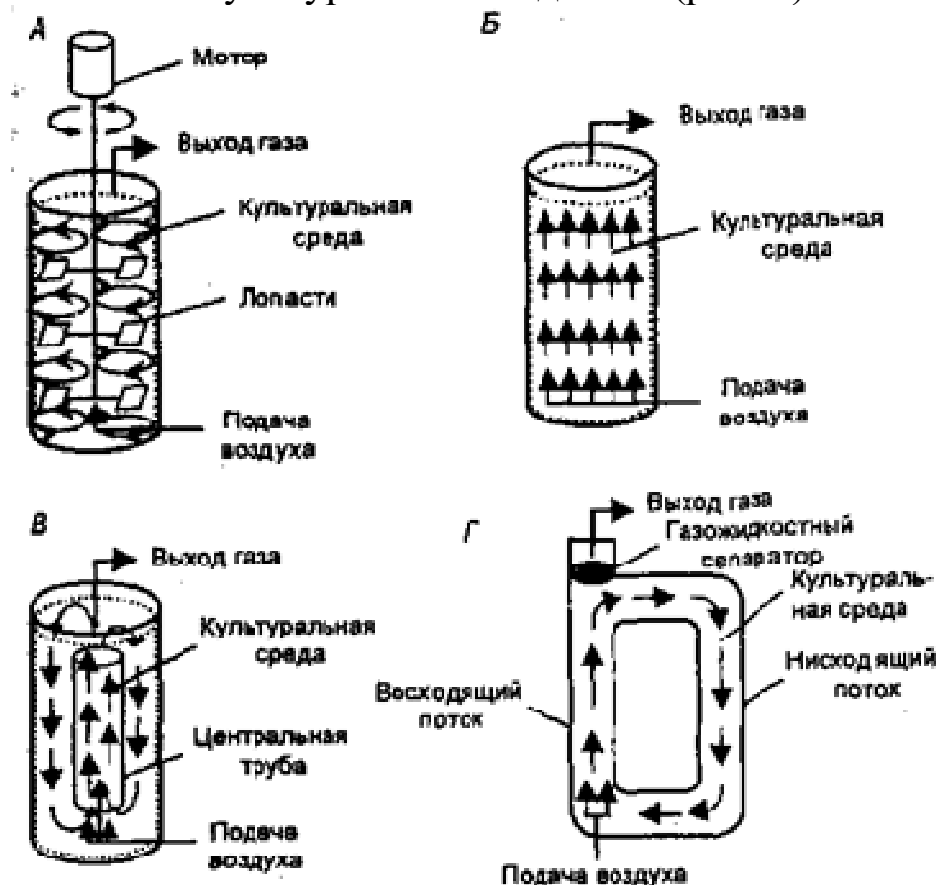


Рисунок 8 – Упрощенные схемы биореакторов различных типов: А – реактор с механическим перемешиванием; Б – барботажная колонна; В – эрлифтный реактор с внутренней циркуляцией; Г – лифтный реактор с внешней циркуляцией. Стрелки указывают направление потока культуральной среды

В биореакторах, относящихся к **первой группе**, перемешивание клеток происходит путем аэрирования воздухом. Это **барботажный** тип биореактора, при котором процесс перемешивания суспензии осуществляется поднимающимися пузырьками воздуха.

В случае барботажных биореакторов обычно получают хорошие ростовые характеристики для большого числа клеточных культур. Однако сложность поддержания суспензии в гомогенном состоянии при высоких концентрациях биомассы клеток сужает сферу их применения.

Несколько больших значений максимальной концентрации клеточной биомассы можно достичь при применении **эрлифтных** биореакторов, в которых создаются направленные циркуляционные потоки. В эрлифтных биореакторах перемешивание суспензии осуществляется за счет применения специальной конструкции, создающей градиент плотности (как правило, это конструкция с внутренним цилиндром).

**Вторая группа биореакторов** представляет собой аппараты с применением механических перемешивающих устройств. Биореакторы этого типа позволяют изучать растительные клеточные популяции в очень широком диапазоне концентраций биомассы клеток. Вместе с тем стрессовое воздействие перемешивающего устройства на клеточную популяцию часто ограничивает их применение.

Технологический процесс глубинного выращивания микроорганизмов в реакторах складывается из следующих этапов:

- подготовка реактора к посеву;
- отбор штаммов микроорганизмов и работа с ними;
- приготовление культуры для засева питательной среды;
- посев культуры в реактор с питательной средой для получения производственной раскладки микроорганизмов;
- выращивание микроорганизмов и контроль за ходом процесса культивирования.

Глубинное культивирование в ферментерах по сравнению со статическим и поверхностным имеет ряд достоинств:

- 1) ускоряет рост и развитие микроорганизмов за счет устранения «голодной зоны» вокруг микробной клетки;
- 2) позволяет получать гомогенную культуру «идеального смешения».

Клетки в такой системе равномерно распределены по объему ферментера и в каждый момент времени находятся в одинаковых условиях, т. е. питательные субстраты и продукты метаболизма рас-

пределены также равномерно. «Идеальное смещение» особенно важно для изучения процессов роста и развития микробной популяции в целом. Применение динамических глубинных систем культивирования позволило более рационально получать не только биомассу и эндометаболиты, но и экзопродукты микробного синтеза, выделяемые клеткой в окружающую среду. Получивший первоначальное распространение в производстве дрожжей и антибиотиков в дальнейшем метод глубинного культивирования зарекомендовал себя как наиболее пригодный для промышленного и лабораторного выращивания микроорганизмов. Периодические процессы культивирования находят применение в технической микробиологии при получении продуктов второй фазы роста и при культивировании патогенных бактерий в производстве вакцин и анатоксинов. Дальнейшее усовершенствование процесса глубинного культивирования было направлено на разработку систем контроля условий культивирования.

**Продленный периодический процесс культивирования**, как и периодический, предусматривает одноразовую загрузку и разгрузку ферментера. Однако цикл развития микроорганизмов в продленном периодическом процессе удлиняется либо за счет подпитки (периодической или непрерывной), либо за счет длительного удержания клеток в системе (диализная культура). Известно, что зависимость концентрации микроорганизмов и удельной скорости роста от времени в продленном периодическом процессе более растянута во времени по сравнению с таковыми в периодическом процессе. При этом продлевается как экспоненциальная фаза, так и, в особенности, фаза линейного роста. Существует несколько способов создания продленного периодического культивирования. **Первый способ** – это культура с добавлением источников питания, в результате происходит рост, лимитированный субстратом. При этом экономический коэффициент в культуре с подпиткой выше по сравнению с простой периодической культурой. Подпитка переводит периодический процесс в продленный периодический и используется в основном для получения продуктов биосинтеза, что существенно увеличивает производительность процесса. **Второй способ** – процесс диализа. В периодической культуре, как известно, постепенно

накапливаются продукты метаболизма, которые приостанавливают рост. Для увеличения выхода продуктов или с целью повышения концентрации биомассы применяют процесс диализа. Суть этого метода заключается в том, что культура развивается в пространстве, ограниченном полупроницаемой мембраной, а продукты диффундируют во внешний раствор. Наиболее простым диализным методом является культивирование в целлофановых мешках, погруженных в питательную среду. Метод был разработан рядом авторов для получения экзотоксинов и позволил получать высокоактивные препараты, но не нашел широкого практического применения из-за сложности осуществления его в производственных масштабах и невозможности получения токсина в больших количествах. К третьему способу создания продленного периодического процесса относят культивирование микроорганизмов в диализной системе с протоком среды, поскольку проток удлиняет период роста и развития микробной популяции, но система не является непрерывной из-за отсутствия оттока биомассы. В диализной системе с протоком среды общая биомасса увеличивается до тех пор, пока плотность культуры не станет такой, что дальнейшее перемешивание биомассы будет невозможным. Таким образом, метод дает возможность выращивать культуру до достижения высокой плотности биомассы. Диализные культуры применяют в основном для концентрирования недиффундирующего продукта, для уменьшения концентрации диффундирующего продукта, ингибирующего рост, и повышения выхода биомассы, для накопления и отделения от клеток диффундирующего продукта.

**Многоциклическими процессами культивирования** называют такие, в которых цикл выращивания культуры повторяется многократно без многократной стерилизации емкости. Зависимость концентрации микроорганизмов и удельной скорости роста от времени в каждом цикле многоциклического процесса имеет характер, аналогичный таковому в периодическом процессе. Многоциклическое культивирование может быть различным – как **одностадийным**, так и **двухстадийным**. Его можно вести в одном ферментере, многократно повторяя полный цикл развития культуры без перерыва на стерилизацию. В одном ферментере можно повторять и укорочен-

ченный цикл, заканчивая его, например, экспоненциальной фазой роста. Процессы, осуществляемые в одном ферментере, называются 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. Существует несколько вариантов многоциклического многостадийного культивирования. Суть одного из них заключается в том, что культуру выращивают в одном реакторе; при прохождении в своем развитии экспоненциальной фазы, из нее берется инокулят 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. Многоциклические процессы культивирования микроорганизмов применяют как для получения биомассы, так и продуктов микробного синтеза – токсинов, антибиотиков, внеклеточных ферментов, аминокислот. Применение подобного метода позволяет сократить в несколько раз затраты труда на производство продукта по сравнению с получением его периодическим способом.

**В полунепрерывных системах культивирования** полная загрузка и разгрузка ферментера осуществляются однократно, однако в процессе роста культуры часть ее сливается, а освободившийся объем заливается свежей питательной средой. Таким образом, функционирует **сливно-доливная** система. Следовательно, полунепрерывное культивирование характеризуется частотой и объемом сливаемой выросшей культуры, и добавлением свежей питательной среды в рабочую емкость ферментера. Установившиеся режимы полунепрерывного культивирования характеризуются колебанием концентрации микроорганизмов около одной и той же постоянной величины и постоянством средней удельной скорости роста популяции. Полунепрерывное культивирование микроорганизмов осуществляется в открытой динамической гомогенной одностадийной

системе в любом ферментере для периодического культивирования, оснащенной системой перемешивания и аэрации. Различные варианты полунепрерывных систем используются в производстве дрожжей, водорослей, антибиотиков, лимонной кислоты и др.

В отличие от периодического культивирования в **непрерывных процессах** питательная среда подается непрерывно, удаление биомассы и продуктов ее жизнедеятельности также осуществляется непрерывно. Установившиеся режимы непрерывного культивирования характеризуются постоянством концентрации микроорганизмов и удельной скорости роста популяции. **Непрерывное культивирование** проводится в открытой динамической системе, которая может быть как гомогенной, так и гетерогенной. Эта система способна к длительной работе в постоянном установившемся режиме.

В системе **идеального смешения** микроорганизмы растут в культуральной среде, постоянной по своему составу, и, следовательно, в каждый данный момент времени находятся в одном и том же физиологическом состоянии, т. е. в состоянии установившегося динамического равновесия, которое называют «steady state». По количеству ферментеров (стадий, ступеней) гомогенные системы могут быть **одностадийными, двухстадийными и многостадийными**. Основным аппаратом для выращивания непрерывной гомогенной культуры является **ферментер идеального смешения** с устройством для потока среды и слива культуры, поддерживающий постоянный уровень среды. Питательная среда подается в ферментер обычно с помощью насоса. Концентрация всех продуктов внутри ферментера и в вытекающей жидкости одинакова, а скорость разбавления равна удельной скорости роста в состоянии установившегося равновесия. Указанные процессы имеют технологические преимущества по сравнению с периодическими, поскольку теоретически их можно осуществлять неограниченно длительное время. На практике они обычно прерываются в связи с инфицированием культуры посторонней микрофлорой.

Любой параметр, который изменяется в периодической культуре и на который существует датчик, может быть использован для управления ростом по типу **турбидостата**. Необходимо отметить, что управляющими параметрами могут быть комплексные парамет-

ры, например, содержание кислорода и углекислоты в отходящем воздухе, характеризующее дыхательный коэффициент. Непрерывно-проточное культивирование может осуществляться в одном ферментере (**одностадийный процесс**) или в двух и более ферментерах (**многостадийный, многоступенчатый процесс**). В промышленности одностадийный процесс культивирования применяется для получения микробной массы или тех продуктов, кинетика накопления которых повторяет кинетику роста биомассы. 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.

**Периодическое культивирование** — это аналог выращивания клеточных культур в колбах на качалке. Периодическую культуру можно рассматривать как замкнутую систему, которая в своем развитии проходит четыре фазы — *начальную, экспоненциальную, стационарную и отмирания*. Условия существования культуры во всех этих фазах различны.

**Преимущества периодических систем:**

- малая стоимость аппарата и системы управления;
- гибкость, т.е. возможность наработки в одном биореакторе разных продуктов;
- время культивирования можно произвольно менять;

- процесс менее подвержен инфицированию, мутациям ток вследствие отсутствия протока и притока из-за относительно малого времени ферментации;
- процесс удобен для получения малых количеств продукта;
- условия культивирования можно поддерживать в оптимуме как в фазе роста биомассы, так и в фазе биосинтеза продукта, причем оптимальные условия для биомассы и продукта могут быть разными;
- процесс удобен для реализации биосинтеза вторичных метаболитов.

#### **Недостатки:**

- необходимость приготовления посевного материала;
- велико непродуктивное время ферментации;
- в связи с частой стерилизацией быстрее изнашиваются измерительные приборы, особенно датчики величины pH.
- производительность по биомассе и продукту часто ниже, чем при непрерывном процессе

**Проточное (непрерывное)** культивирование характеризуется постоянным добавлением в биореактор свежей питательной среды и постоянным отбором либо суспензии (**открытое проточное культивирование**), либо отработанной среды (**закрытое проточное культивирование**).

В практике микробиологических исследований широко применяют две разновидности открытого проточного культивирования: **хемотратный и турбидостатный методы**.

**Хемотратный метод культивирования** клеток базируется на использовании биореактора, в который с постоянной скоростью подается питательная среда и одновременно же скоростью (например, слив по уровню) отбирается клеточная суспензия. При этом объем выращиваемой суспензии остается постоянным.

Проведение метода непрерывного культивирования микроорганизмов в условиях максимального выхода продукции может быть достигнуто с применением математического эксперимента (МПЭ). Но для этих целей необходимо использовать ЭВМ.

**Турбидостатный** метод предусматривает измерение концентрации клеточной биомассы в биореакторе и ее автоматическое под-



держание на постоянном уровне путем изменения скорости потока. Работа турбидостата основана на поддержании постоянной плотности суспензии, или постоянной мутности. Датчик мутности регулирует через управляющую систему поступление питательного раствора. В сосуде для культивирования все питательные вещества содержатся в избытке, и скорость роста культуры приближается к максимальной.

Турбидостат используют при скоростях потока, близких к максимальной удельной скорости роста, тогда как хеостат иногда становится неустойчивым и может произойти полное вымывание культуры из биореактора. Работа с турбидостатами технически сложнее, чем с хеостатами.

Микроорганизмы в процессе развития образуют разные соединения первичного метаболизма, такие, как углеводы, белки, липиды, витамины и другие вещества, необходимые для роста и развития; а также вторичные метаболиты. Их содержание и состав зависят от генетических характеристик объектов, стадии онтогенеза и условий произрастания.

Организация биотехнологического процесса, будь то синтез микробных метаболитов или получение микробной биомассы, начинается с изучения физиологии культивируемого микроорганизма. Цель любой биотехнологии – на базе понимания биохимических и физиологических процессов в пределах генетически детерминированных свойств конкретного вакцинного штамма или патогенного производственного штамма возбудителя инфекционной болезни максимально обеспечить накопление в питательной среде конечного целевого продукта.

Помимо **первичных метаболитов**, у некоторых организмов (преимущественно растений) осуществляется синтез называемых **вторичных метаболитов**, к которым относятся алкалоиды, терпеноиды, стероиды, фенольные соединения, цианогенные гликозиды и др. Эти низкомолекулярные вещества во многих случаях характерны для отдельных видов растений, а их синтез в значительной степени видоспецифичен, чем синтез первичных метаболитов (рис. 9).

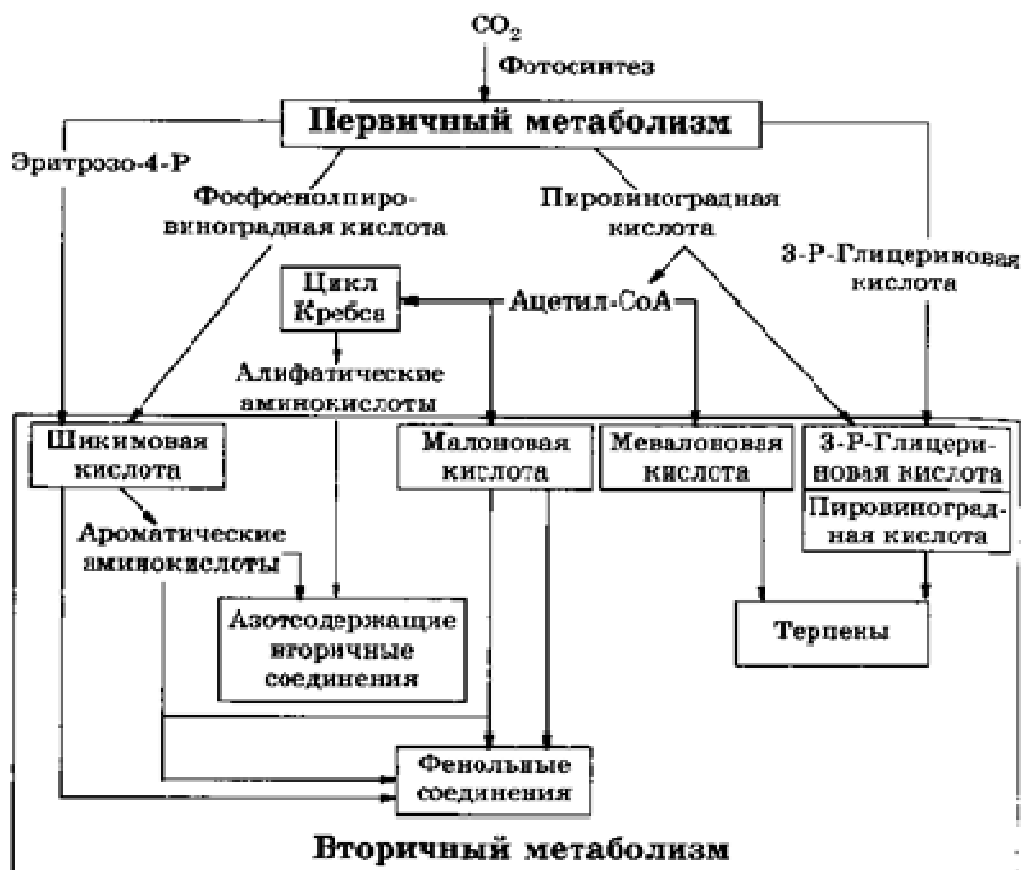


Рисунок 9 – Основные пути синтеза вторичных соединений и их связь с первичным обменом веществ

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

- подготовительную;
- биотехнологическую;
- получения готовой продукции (очистка целевого продукта от компонентов культуральной среды или от клеточной массы).

## **Глава 1.4 Технологические основы выделения и концентрирования биопрепаратов и продуктов микробного синтеза**

В культуральной жидкости после окончания процесса ферментации содержатся микроорганизмы, продукты их жизнедеятельности, остатки питательной среды, пеногаситель, растворимые и нерастворимые вещества. Целевым продуктом биосинтеза могут быть непосредственно сами микроорганизмы, либо их метаболиты, растворенные в культуральной жидкости или находящиеся внутри клеток микроорганизмов.

Почти во всех случаях для получения целевого продукта необходимо отделить взвешенную фазу – массу микроорганизмов от культуральной жидкости.

Культуральные жидкости обычно являются сложными смесями и содержат большое число компонентов, многие из которых обладают близкими физико-химическими свойствами.

Наряду с растворенными минеральными солями, углеводами, белками и другими органическими веществами культуральные жидкости содержат в значительном количестве полидисперсные коллоидные частицы и взвеси. Следовательно, они являются не только многокомпонентными растворами, но и суспензиями. Дисперсная фаза этих суспензий состоит из мицелля или клеток микроорганизмов, а также из твердых частиц, содержащихся во многих питательных средах - муки, хлопьев из кукурузного экстракта и т.п. Содержание микроорганизмов в культуральной жидкости, как правило, очень низкое. В 1 л содержится обычно 5-10 г сухой биомассы. Отделение такого количества взвешенной фазы-трудная технологическая задача, которую приходится решать путем концентрирования биомассы различными способами (флотирование, сепарирование, упаривание).

В производственных условиях приходится затрачивать значительное количество энергии на обработку больших объемов труднофильтруемых суспензий.

Способы отделения клеточной биомассы микроорганизмов от культуральной жидкости можно разделить на:

- механические (отстаивание, фильтрование, центрифугирование);
- теплотехнические (сушка).

В зависимости от конечной цели выбирают различные сочетания этих способов. При выборе схемы концентрирования и извлечения биомассы проводят предварительную экономическую оценку выбранного способа с учетом товарной формы биопрепаратов, концентрации микроорганизмов в культуральной жидкости и др.

Большинство целевых продуктов микробиологического синтеза нестабильны и подвержены влиянию различных факторов. Белки, например, исключительно чувствительны к нагреванию, изменению рН среды, к многим физическим и химическим воздействиям.

Очень часто выделить целевой продукт с помощью одного метода практически невозможно. Поэтому применяют комбинацию нескольких методов.

При выборе метода выделения и концентрирования того или иного продукта микробиологического синтеза необходимо учитывать следующие факторы:

1. Физико-химические свойства культуральной жидкости.
2. Свойства выделяемого продукта (термолабильность, стойкость к различным химическим агентам и др.).
3. Требования к конечной форме продукта (степень чистоты и степень концентрирования).
4. Технологические и технико-экономические показатели (выход продукта, производительность оборудования, необходимость дальнейшей обработки и др.).

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 с помощью одного метода, тогда применяют комбинацию нескольких методов и в процессе выделения переводят продукт из растворимой формы в нерастворимую (или наоборот). Как правило, при выделении раство-

ренных веществ культуральную жидкость приходится подвергать предварительной обработке и очистке с помощью осаждения, фильтрования, центрифугирования, сепарирования и мембранных методов (электродиализ, ультра- и микрофильтрация).

Обычно биотехнологическая стадия завершается выходом одного жидкостного и одного газового потоков, иногда – только одного жидкостного или переработанного твердого продукта, например при созревании сыра или биокомпостировании отходов.

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 (обычно при очистке сточных вод);

- **фильтрация** – пропускание суспензии через фильтрующий материал, на котором задерживаются частицы твердой фазы – биомасса. Такой способ применяют в производстве антибиотиков, особенно в тех случаях, когда микроорганизм – продуцент имеет мицелиальный характер. Фильтрование – это разделение твердой и жидкой фаз суспензии при пропускании ее через пористую перегородку.

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

Фильтрование – 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 фильтрования влияет ряд факторов, которые можно разделить на две группы:

1. Макрофакторы – разность давлений, толщина слоя осадка, вязкость жидкой фазы и др. Эти факторы заведомо известны и контролируются с помощью приборов.

2. Микрофакторы – размер и форма частиц осадка и пор фильтровальной перегородки, толщина двойного электрического слоя на

поверхности частиц и др. Эти факторы менее изучены и их характеризуют лишь косвенными методами. Именно микрофакторы оказывают решающее влияние на процесс фильтрования и затрудняют его мас-штабирование.

При фильтровании культуральной жидкости образуются большей частью студенистые хлопьевидные или мелкозернистые осадки, обладающие большим сопротивлением. Средняя скорость фильтрации при этом составляет всего 50 л/м<sup>2</sup> в час.

Для увеличения скорости фильтрования обычно используют два приема:

1. Предварительная обработка суспензий.

2. 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 грунтового слоя.

– **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

ние 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 (путем замораживания и продавливания, воздействием ультразвуком, методом декомпрессии – 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). Наиболее известно выделение жироподобных веществ жидкими углеводородами (типа бензина). Прими- и многие другие виды экстрагентов (хлороформ, эфир, ацетат). Иногда экстракцию осуществляют непосредственно из биомассы микроорганизмов. Экстракция – процесс разделения смеси твердых и жидких веществ с помощью избирательных (селективных) растворителей (экстрагентов). 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 разно-

сти 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.

Преимущества метода:

1. Низкие затраты.
2. Высокая скорость экстракционных процессов.

Недостаток метода: использование вредных, взрывоопасных органических растворителей;

– **осаждение** – выделение целевого продукта путем добавления к жидкости реагента, взаимодействующего с растворенным продуктом и переводящего его в твердую фазу. Осаждение (седиментация) – это процесс расслоения дисперсных систем под действием силы тяжести и отделение дисперсной фазы в виде осадка.

Простейший случай седиментации - отстаивание применяют в следующих случаях:

1. При диаметре частиц более 3 мкм, когда броуновское движение не оказывает существенного влияния на процесс отстаивания.
2. При выделении стабильных продуктов, когда фактор времени не имеет решающего значения.
3. При более низких, чем при других методах, затратах.
4. В особых случаях, когда необходимо разделить частицы на фракции по размеру или плотности на основании их различных скоростей осаждения.
5. Если необходимо предварительно разделить суспензию на две фракции - осадок и надосадочную жидкость, которые в дальнейшем можно обрабатывать на различном оборудовании.

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 флокулятов – метилцеллюлозу, пектин, альгинат натрия и др.;

– **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 смеси. Ионнообмен представляет собой сорбционный процесс. Адсорбция – это процесс поглощения одного или нескольких компонентов целевого продукта из газовой смеси или раствора твердым веществом – адсорбентом. Процессы адсорбции (как и другие процессы массопердачи) избирательны и обычно обратимы. Благодаря этому становится возможным выделение поглощенных веществ из адсорбента, то есть проведение процесса десорбции. Первые сорбционные методы выделения и очистки биологически активных веществ и антибиотиков были основаны на применении молекулярных сорбентов (активированные угли, окись алюминия и др.). Молекулярные сорбенты, которые одинаково хорошо сорбируют выделяемое вещество и ряд примесей. В настоящее время разработаны ионнообменные 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. Наиболее перспективны синтетические ионнообменные смолы (КУ-2, КБ-4, КБ-ЧП-2, КМД, АВ-17, ЭДЭ-10 и др.). В зависимости от наличия ионогенных групп иониты можно разделить на 2 основных класса:

1. Ионнообменные сорбенты, содержащие кислотные группы - катиониты (нерастворимые кислоты).

2. Ионнообменные сорбенты, содержащие основные группы - аниониты (нерастворимые основания).

Иониты нашли широкое применение в технологии производства антибиотиков на этапе их сорбции из культуральной жидкости;

– **отгонка, ректификация** – выделение растворенных культуральной жидкости легкокипящих продуктов, например этилового спирта;

– **ультрафильтрация, нанофильтрация и обратный осмос** – выделение высокомолекулярных соединений (белков, пептидов, полинуклеотидов). Обратный осмос и нанофильтрация позволяют отделять даже небольшие по размерам молекулы;

– **центрифугирование, ультрацентрифугирование** – выделение вирусов, клеточных органелл, высокомолекулярных соединений. 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. Сепараторы позволяют сконцентрировать осадок до влажности 60–90%.

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.

Недостатки центрифугирования:

1. Сложность конструкции, высокая энергоемкость и стоимость.

2. Сложность эксплуатации (ненадежность, вибрация, шум, необходимость периодической разборки и мойки).

3. Воздействие на клетку центробежной силы, нагрев, трудность герметизации и обеспечения асептических условий ведения процесса.

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.

**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, сахаров, антибиотиков). При адсорбции они сорбируются 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. Путем диализа осуществляют очистку вакцин и ферментов от солей и низкомолекулярных растворимых примесей;

– **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). 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 не только способом получения антибиотиков в твердом виде, но и очень эффективным средством очистки от

сопутствующих примесей, что является существенным преимуществом по сравнению с некоторыми другими методами разделения. Метод кристаллизации нашел применение в технологии получения антибиотиков (тетрациклина, эритромицина и др.), витаминов, полисахаридов;

**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 упаривание, сушка, осаждение, кристаллизация, фильтрация, ультрафильтрация, гиперфильтрация или нанофильтрация, обеспечивающие как бы отжим растворителя из раствора. 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.

Обычно упаривание в производстве антибиотиков осуществляют при температуре 60-70°C под вакуумом, поэтому данный метод недопустим при переработке термолабильных биологически активных веществ.

**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).

## Глава 1.5 Основы приготовления гипериммунных сывороток

Гипериммунные или специфические сыворотки, предназначенные для решения указанных задач, представляют собой сыворотки крови животных, систематически иммунизированных бактериальными и вирусными антигенами (рис. 10).



*Рисунок 10 – Сыворотки очищенные лошадиные разведенные*

Гипериммунные сыворотки содержат антитела, обладающие строго специфическими действиями на бактериальные токсины, патогенные бактерии или вирусы, против которых иммунизировали животных.

Первая Нобелевская премия по медицине была присуждена в 1901 году Эмилю фон Берингу и Шабосабуро Китазато за разработку метода лечения дифтерии с помощью антисыворотки. После работ Луи Пастера по созданию вакцин было известно, что после переболевания или вакцинации животные или человек становятся невосприимчивы к последующему заражению этим же возбудителем и сформировалось понимание, что это обусловлено в значительной мере веществами, которые выработало переболевшее животное.

С 1901 года начали разработку промышленного производства антитоксических противодифтерийных сывороток. Первоначально использовали сыворотку реконвалесцентов или лошадиную антисыворотку, лошадей при этом иммунизировали нативной дифтерийной

культурой. Однако полученные лошадиные антисыворотки обладали значительной анафилактичностью, что снижало эффективность этих антисывороток.

Промышленное производство и применение антисывороток привело к открытию сывороточной болезни. Неоднократное парентеральное введение антисывороток другого вида приводило к анафилактическому шоку. Впервые сывороточную болезнь наблюдал Смит в 1905 году, когда он внутрибрюшинно повторно вводил морским свинкам лошадиную сыворотку, то у них, спустя несколько минут или часов, появлялось беспокойство, одышка, гипотермия и животное погибало от анафилактического шока.

В 1923 г. Г. Рамон (ветеринарный врач) получил дифтерийный анатоксин обработкой токсина формалином (0,3-0,4% при  $t = 37^{\circ}\text{C}$  в течение 30 дней), при этом токсин теряет токсиногенность, но сохраняет антигенные свойства. Это значительно продвинуло технологию производства, так как для иммунизации стали использовать фактически чистый препарат анатоксина и снизили реакции на введение. Вскоре Г. Рамон заметил, что если на месте введения токсина образуется воспалительный очаг – абсцесс, то такие лошади имели более высокий титр антител. Он объяснил возникновение абсцессов заносом микроорганизмов при инъекциях и решил вызывать при инъекциях стерильные абсцессы. Для этих целей он использовал ряд ингредиентов, таких как крахмал, крошки хлеба и др. Эти вещества получили в последствии название **адьювантов**, что означает помогающий. Под адьювантами понимают вещества разнообразной химической природы, неспецифически стимулирующие иммунный ответ к различным антигенам.

В качестве адьювантов используют:

- неорганические вещества – гидроокись алюминия, фосфат алюминия, алюмокалиевые квасцы, аэросил и др. – стимулируют преимущественно гуморальный иммунитет;
- растительные - сапонины (ISCOM) органические вещества – минеральные масла, альгинаты, сапонин, ДЭАЭ- декстран;
- бактериальные клетки – коклюшные бактерии – *Bordetella pertussis*, вакцинный штамм микобактерий туберкулеза – БЦЖ.

К адьювантам предъявляются следующие требования: они должны быть не токсичными в используемых дозах, не вызывать побочных реакций в организме, сами не должны обладать антигенной активностью, стимулировать развитие длительного гуморального иммунитета.

Антитоксические сыворотки применяют для лечения заболеваний, в патогенезе которых ведущим фактором является интоксикация. Своевременная нейтрализация токсина при введении сыворотки предотвращает развитие заболевания – столбняк, ботулизм, дифтерию, газовую гангрену.

За единицу измерения антитоксинов принята антитоксическая единица, т.е. минимальное количество антитоксической сыворотки способное нейтрализовать одну единицу токсина. За единицу токсина принимается минимально смертельное количество токсина.

Производство лечебно-профилактических сывороточных препаратов представляет сложный и многогранный процесс с длительной технологией.

Различают два источника получения специфических сывороток:

- гипериммунизация животных других видов (гетерологичные сыворотки);
- вакцинация доноров (гомологичные сыворотки).

Различают три группы лечебно- профилактических сывороток: антитоксические, антибактериальные, противовирусные.

В ветеринарии применяют:

- антитоксические сыворотки против – анаэробной дизентерии и инфекционной энтеротоксемии овец;
- антибактериальные – против сибирской язвы, рожи свиней, лептоспироза, геморрагической септицемии, диплококковой инфекции, паратифа и колибактериоза;
- противовирусные – против болезни Ауески, бешенства (антирабическая сыворотка), противоящурный иммунолактон и сыворотки, вирусного гепатита утят.

По направлению применения гипериммунные сыворотки различают: лечебные, профилактические диагностические.

Диагностические сыворотки по использованию в различных реакциях подразделяют на: нейтрализующие, преципитирующие, агглютинирующие, лизирующие, связывающие комплемент (для постановки РСК).

Для изготовления лечебно-профилактических гетерологичных сывороток используют крупных животных – лошадей, волов, быков, коров, мулов, так как от них можно получить большое количество крови. Наиболее подходящим видом считают лошадей, так как они отличаются высокой иммунологической реактивностью к большинству необходимых антигенов. От них также, в сравнительно короткий срок, можно получить сыворотку, содержащую высоко аффинные специфические антитела в достаточно высоких титрах. Преимуществом их является и то, что они удобны в отношении технических манипуляций и ухода.

Для изготовления диагностических сывороток, требующихся в значительно меньших количествах, используют более мелких животных – овец, коз, кроликов, реже морских свинок и крыс, а также птиц – петухов, уток, голубей. Животные должны приобретаться из хозяйств, благополучных по инфекционным заболеваниям, свободных от лейкоза и быть здоровыми, в возрасте от 1 года до 3 лет.

На качество сывороток влияют множество факторов: индивидуальные особенности животных-продуцентов, в частности их способность к иммунобиологической перестройке при создании у них **грудиммунитета**, содержание и кормление животных в период их подготовки и эксплуатации. Существует прямая связь между качеством антигена, силой антигенного раздражения и уровнем накопления специфических антител в крови животных.

Животных, применяемых для получения сывороток, завозят из стационарно благополучных по заразным заболеваниям районов. Они должны быть клинически здоровыми, средней и выше средней упитанности, свободными от кожных препаратов. Всех завезенных животных выдерживают в карантине 45 суток. За это время их всесторонне обследуют с ежедневным (утром и вечером) двукратным измерением температуры тела и проверяют пораженность гельминтами и при необходимости дегельминтизируют. Лошадей исследуют на сеп, трихомоноз, бруцеллез, туберкулёз, пироплазмидозы



и инфекционную анемию. Крупный рогатый скот - на туберкулёз, бруцеллез, лептоспироз. Свиней – на туберкулёз, бруцеллез. Овец – на бруцеллез, туберкулёз, паратуберкулёз и другие инфекционные заболевания согласно требованиям НТД. При отборе животных-продуцентов надо учитывать их физиологические и иммунологические показатели. На активность лечебно-профилактических и диагностических сывороток влияют порода, пол, конструкция и возраст животного.

Лошадей используют в возрасте от 3 до 12 лет, помеси донской и казахской пород, массой 450-500 кг. Волон – в возрасте от 3 до 8 лет, массой не менее 350 кг, красно-степной, калмыцкой, симментальской, швицкой астраханской пород. Свиней – в возрасте 5-6 месяцев, массой не менее 80 кг, крупной белой породы. Овец, баранов и валухов – в возрасте 2-3 лет и массой 30-45 кг (для получения диагностических сывороток и сывороточных сред). Введение антигенов и периодическое кровопускание приводит к нарушению обмена веществ и анемии, в последующем к снижению титров антител, большое внимание нужно уделять вопросам полноценного, сбалансированного кормления животных-продуцентов.

Рационы для них должны содержать по 11-12 кормовых единиц и по 1000-1200 грамм перевариваемого протеина, они должны включать сочно-витаминные корма и быть сбалансированными по минеральному составу. Для восстановления крови после взятия немало важное значение имеет правильно организованное минеральное кормление животных-продуцентов: на 1 кг сухого кормового рациона лошадей должно приходиться: железа 145-165 мг, меди-15-18 мг, кобальта 1,2-1,4 мг, марганца - не менее 9 мг. Для восстановления красной крови лошадям вводят в рацион эритроциты, фибрин, кормовые антибиотики, проращенный овес. Кормят животных-продуцентов 3-5 раз в день. Крупных животных содержат индивидуально, мелкий рогатый скот и свиней – группами.

**Грундиниммунизация (грунди́рование)** – это метод отбора животных-продуцентов, обладающих высокой реактивностью организма и способных выработать антитела против введенного антигена в высоких титрах. При отборе животных – продуцентов, их проверяют на наличие антител к тому или иному антигену серологиче-

скими методами. Например, отбор лошадей-продуцентов для производства противодифтерийной сыворотки проводят по титру естественного противодифтерийного антитоксина в крови животных. Если антител в крови животных не обнаруживают, их грундируют, то есть вводят антиген и по нарастанию титра антител, в результате грундиммунизации, отбирают лошадей- продуцентов сыворотки. При проведении грундиммунизации животным дважды вводят убитый антиген или живые аттенуированные микроорганизмы (убитые или живые вакцины), с интервалом в 2-3 недели, внутримышечно или подкожно.

До начала грундиммунизации и через 7-8 суток после последнего введения антигена у животных берут кровь и определяют в ее сыворотке наличие антител к тому антигену, с помощью которого в последующем готовят гипериммунную сыворотку. Выявление в сыворотке крови антител в титрах 1:800 и выше указывает на то, что данное животное может быть использовано как продуцент гипериммунной сыворотки, т.е. такое животное обладает высокой реактивностью организма, и иммунная система его способна вырабатывать антитела в необходимых титрах.

Предварительное, правильно проведенное грундирующее животных обеспечивает повышение (в 5 раз и более) титров специфических антител при последующей гипериммунизации тем же антигеном, увеличивает выход высокоактивного препарата и создает условия получения сывороток в более короткие сроки. Всех животных, у которых при грундиммунизации не обнаруживают достаточного уровня антител или обнаруживают в титре ниже необходимого 1:800, подвергают выбраковке.

**Гипериммунизация** – это метод парентерального введения животным нарастающих доз соответствующих антигенов с целью получения наивысшей ответной иммунологической реакции организма, максимального увеличения в крови животных специфических антител, которое должно обеспечивать лечебный, профилактический и диагностический эффект препаратов.

При гипериммунизации в сыворотке крови животных, обычно нарастает количество общего белка, увеличивается количество гамма- и бета-глобулиновых фракций, уменьшается содержание альбу-

минов. Если в нормальной сыворотке крови лошади альбумины составляют 50% общего количества белков, то в иммунной сыворотке их бывает 35% и ниже. Успех гипериммунизации животных- производителей во многом зависит не только от тщательного их подбора, качества антигена и адъювантных веществ, но и от правильно выбранной схемы гипериммунизации, правильно выбранной технологии выполнения этих схем иммунизации, а также технологии кровопускания и обескровливания производителей в конце их эксплуатации.

Антигены вводятся обычно подкожно и внутримышечно в несколько мест с таким расчетом, чтобы точки инъекции находились вблизи лимфатических узлов. При этом в иммуногенез быстрее вовлекается большое количество лимфоузлов, что повышает общую и иммунологическую реактивность организма. Цикл гипериммунизации обычно длительный и составляет 1-2 и более месяцев. В каждом случае цикл иммунизации во многом зависит от вида гипериммунной сыворотки.

Например, для получения гипериммунной противосибиреязвенной сыворотки используют лошадей в возрасте от 3 до 10 лет. Вначале здоровым животным вводят четырехкратно вакцину Ценковского №2 для создания стойкого иммунитета (грундинмунизация), а потом лошадей подвергают гипериммунизации вирулентным возбудителем сибирской язвы. Всего используют 12 штаммов, комбинируя их по четыре в виде смеси для каждой иммунизации.

Гипериммунизацию лошадей начинают с малых доз: 0,5; 2,5 и 5,5 мл с интервалом в трое суток. Затем культуры сибирской язвы вводят с интервалами в 3-4 суток и в дозах 10,0; 20,0; 40,0; 80; 100; 110; 130; 140; 150 мл. Обычно бывает достаточным ввести антиген 13 раз, и сыворотка лошадей – производителей становится активной.

При введении доз в объёме от 10 до 80 мл к культуре добавляют 0,2% квасцов, а к дозам, от 100 до 150 мл-0,1% квасцов.

При повышении у животных температуры интервал между инъекциями увеличивают до 4–5 суток. В каждом конкретном случае схемы иммунизаций могут быть разными. Разнообразие схем иммунизации определяются следующим:

- различием методов введения антигена;
- дозировкой антигена;

- количеством инъекций;
- интервалами между инъекциями;
- объектом и кратностью циклов кровопусканий.

Введение антигенов обычно не вызывает резких отклонений в состоянии здоровья животных, лишь иногда наблюдается местные и общие реакции. Эффективность иммунизации животных повышается при дробном введении антигенов одновременно в различные участки тела животного. По окончании гипериммунизации, когда в сыворотке крови животного установлен максимальный титр специфических антител, у него берут кровь обычно через 7-8 суток после последней инъекции антигена.

Приведем пример получения антирабической сыворотки (применяется для лечения людей): метод Института Пастера Франция, рекомендован ВОЗ.

С 1-го дня по 60-й – 20 мл вакцины, инактивированной  $\beta$  – пропиолактоном, через день (30 инъекций).

С 61-го дня по 72-ой- 4 инъекции по  $\frac{1}{4}$  мозга кролика, зараженным фиксированным вирусом с интервалом в 3 дня.

С 73-го дня по 88-ой- 4 инъекции по  $\frac{1}{2}$  мозга кролика, зараженным фиксированным вирусом с интервалом в 4 дня.

С 89-го по 98-ой – 2 инъекции по целому мозгу кролика зараженным фиксированным вирусом с интервалом в 5 дней. Всего 40 инъекций 106-й день – первое кровопускание.

136 день- инъекция целого мозга кролика зараженным фиксированным вирусом. 144 –й - второе кровопускание.

Таким образом, период иммунизации длится 98 дней, а первое кровопускание проводится спустя 8 дней, бустер дозу вводят спустя 30 дней, через 8 дней делают второе кровопускание.

Количество забираемой крови зависит: от массы животного; от реакции животного на взятие крови с учетом начального и последующих циклов; количества предполагаемых кровопусканий в данном цикле; титра антител; состояния здоровья животного. Обычно при каждом крововзятии берут кровь из яремной вены из расчета 800 мл на каждые 50 кг массы животного (или 13% к общей массе крови животного). Установлено, что двукратное кровопускание стимулирует образование иммуноглобулинов, повышает синтез пропердина,

лизоцима и бета-лизинов, увеличивает бактерицидность сыворотки крови и фагоцитарную активность лейкоцитов, повышает превентивные (защитные) свойства сыворотки и сопротивляемость организма инфекции. Тотальное обескровливание проводят тогда, когда решается вопрос о прекращении использования животных как продуцентов. Обычно это делают в момент максимального накопления антител и появления тенденции снижения их синтеза.

Сыворотку получают методом цитрирования крови с последующим сепарированием и дефибринированием плазмы, на 1 л крови добавляя 35 мл 10% цитрата натрия. Для дефибринирования на 1 л плазмы +1,5 мл 30%  $\text{CaCl}_2$  и шуттелируют и при 4-8°C 20 час и фильтруют. Сыворотку крови консервируют 0,5 %-ным раствором фенола и отстаивают в специальных емкостях в течение двух месяцев. Отстоявшуюся сыворотку фильтруют, а затем стерилизуют. В последующем сыворотку расфасовывают во флаконах емкостью по 100 мл. Флаконы закрывают пробками и для герметичности их обкатывают алюминиевыми колпачками. На флаконы наносят этикетку и часть продукции сдают на контроль. Гипериммунные сыворотки, получаемые из крови путем удаления форменных элементов и фибрина, называются нативными в отличие от сывороток, подвергнутых дополнительной очистке и концентрации специальными методами. Очистка сывороток проводится с целью удаления иммунологически неактивных белковых фракций, например, альбуминов, альфа глобулинов и др. Выделенные фракции растворяют в меньшем объеме растворителя, по сравнению с исходным объемом, что позволяет препарат сконцентрировать и вводить в меньших дозах.

Необходимость в получении концентрированных сывороток связана:

- со значительными объемами выпускаемых лечебных сывороток, исчисляемыми сотнями тонн. Для расфасовки сывороток требуется большое количество флаконов, пробок, колпачков, ящиков для упаковки и эта процедура значительно снижает затраты на транспортировку;

- с необходимостью повышать специфическую активность антисывороток, снижая при этом вводимую дозу. Первоначально иммуноглобулины высаливали т.е. осаждали сульфатом натрия или

аммония, реже риванолом, в настоящее время осаждают этиловым спиртом. Концентрирование и очистку антитоксических сывороток производят методом Диафрем-3 – то есть обработкой пепсином. При такой обработке удаляется до 80-85 % балластных белков сыворотки.

Лечебный эффект от применения гипериммунных сывороток наступает очень быстро. Своевременное применение не даст развиться болезни. Однако длительность иммунитета небольшая: 10-14 дней для гетерологичных препаратов и до 20 дней для гомологичных. Повторное введение гетерологичных глобулинов приводит к быстрому исчезновению пассивного иммунитета. Для изготовления диагностических сывороток выделяют фракцию иммуноглобулинов G, используя более сложные методы – ионообменную хроматографию, гель фильтрацию. Сывороточные препараты и иммуноглобулины контролируют на безвредность, специфическую активность, апиrogenность (на кроликах или Лал-тестом), на стерильность. Безвредность контролируют на лабораторных животных. Пример контроля противорожистой сыворотки: 5 белым мышам (п/к 0.5 мл) и 2 морским свинкам масс. 250-300 г. по 10 мл. Все должны выжить в течение 10 дней от возбудителя рожи *Erysipelothrix rhusiopathiae*.

Контроль стерильности на тиогликолевой среде или на МПА, МПБ, МППБ – по 5 пробирок, агар Сабура 5 чашек. Посевы по 1 мл 10 дней 37° и 20°- агар Сабура. Все должны стерильными.

Контроль специфической активности – 15 белым мышам массой 17-20 г вводят внутрибрюшинно 0,01, 0,02, 0,03 мл по 5 мышей на дозу сыворотки глобулина, через 2 часа 0,1,-0,2 мл вирулент культуры (ЛД). Все животные живые, а контрольные погибают.

Пирогенность – 3 кролика, в ушную вену вводят препарат 1 мл на кг массы кролика, через 1,2,3 часа она у кроликов должна быть не выше 40,0 °С, а сумма темпа повышения у трех не выше 1,6 градуса. Для постановки Лал-теста используют амеболизаты. Этот тест проводит аккредитованная лаборатория.

Для приготовления иммунных сывороток чаще всего используют лошадей, крупный рогатый скот (волы), при производстве сыворотки против рожи используют свиней. С целью приготовления

диагностических иммунных сывороток чаще всего используют кроликов, птиц, реже овец, коз.

На получение высокоактивных лечебно-профилактических и диагностических сывороток влияют: качество применяемых антигенов, в частности их чистота, объем и концентрация; неспецифические раздражители и адъюванты; индивидуальные особенности животных-продуцентов, в частности их способность к иммунобиологической перестройке при создании у них грундимунитета, для чего необходим тщательный отбор животных-продуцентов; метод и схемы гипериммунизации; содержание и кормление животных в период их подготовки к эксплуатации.

Технология производства гипериммунных сывороток объединяет ряд подразделений, главным из которых является сывороточный цех. Структура цеха должна включать в себя карантинное отделение, иммунизационные клиники, антигенные лаборатории и отделения получения, концентрации и очистки сывороток.

Производственные помещения и оборудование структурных подразделений сывороточного цеха зависят от количества ассортимента препаратов. По характеру технологического процесса при производстве гипериммунных сывороток требуется создание стерильных условий работы. Для этого боксовые помещения должны обеспечиваться притоком стерильного воздуха, рабочие места (столы, стулья), стены, потолок и пол подвергаться влажной уборке применением дезинфицирующих веществ и УФЛ-облучения. Это обеспечивает получение высококачественных препаратов. Остальные рабочие помещения и иммунизационные клиники должны быть оборудованы приточно-вытяжной вентиляцией.

В производственных условиях очистку и концентрацию сывороток проводят чаще всего комбинированным способом, включающим стадии ферментативного гидролиза, прогрева ферментированных сывороток в кислой среде, солевого фракционирования и дополнительной очистки от неактивных белков и использования органических растворителей, сорбентов или дополнительного выдерживания сывороток при пониженных температурах.

## **Глава 1.6 Биотехнологические принципы приготовления диагностических препаратов**

Одним из важнейших звеньев борьбы с инфекционными и паразитарными заболеваниями сельскохозяйственных животных является специфическая диагностика. От правильности ее проведения зависит выбор необходимых мер борьбы с конкретной инфекцией. Проведение диагностических исследований инфекционных заболеваний возможно лишь при наличии в лабораториях или у практических ветеринарных врачей диагностикумов, производство которых осуществляется на предприятиях биологической промышленности.

Прежде чем рассматривать основные технологические принципы приготовления диагностических препаратов, следует отметить, что таких препаратов,готавливаемых биологической промышленностью и применяемых в ветеринарной медицине, много. Все они подразделяются на четыре группы: диагностические иммунные (специфические) сыворотки; антигены-диагностикумы; бактериофаги; аллергены.

Каждая из этих групп в свою очередь подразделяется на отдельные подгруппы, типы в зависимости от технологии их получения, технологии, цели и практического применения.

Основным требованием к получению диагностических препаратов является тщательная подготовка и селекция производственных штаммов микроорганизмов с отбором колоний гладкой формы (кроме возбудителя сибирской язвы) и преобладанием необходимого антигена.

### *Диагностические сыворотки*

К диагностическим специфическим сывороткам, применяемым для обнаружения в тех или иных материалах антигенов или для определения вида и даже типа микроба или вируса, относятся агглютинирующие, преципитирующие и лизирующие (комplement-связывающие). Такая классификация основана на функциональной способности специфических гамма-глобулинов склеивать (агглютинировать), осаждать (преципитировать), растворять (лизировать) соответствующие антигены.



### *Агглютинирующие сыворотки и технология их приготовления*

Агглютинирующие сыворотки готовят путем гипериммунизации животных различными корпускулярными антигенами, введением их парентеральным путем. В качестве антигенов используют живые или убитые различными способами культуры соответствующих микробов. В связи с непостоянным содержанием антигенных компонентов у одного и того же вида бактерий желательно животных иммунизировать несколькими штаммами (2–3) этого вида микроба. Для получения поливалентных агглютинирующих сывороток прибегают к одновременному введению смеси антигенов из нескольких типов бактерий одного и того же вида. В процессе работы необходимо следить за однородностью популяции штамма, используемого для иммунизации. Лучшим способом сохранения агглютиногенных свойств является лиофильное высушивание.

В большинстве случаев для получения полноценных агглютинирующих сывороток используют в качестве антигенов культуры микробов в S-форме. Реже требуются О- или R-варианты. Для получения сывороток лучше использовать в качестве антигенов живые культуры бактерий или вирусов, в ряде случаев для иммунизации животных использовать вновь пересеянные (суточные) культуры микробов. В ряде случаев введение живых культур может вызывать тяжелую реакцию организма иммунизируемых животных и даже их гибель. Поэтому, где это допустимо, животных иммунизируют убитыми взвесями микроорганизмов.

Для получения диагностических агглютинирующих сывороток чаще всего используют кроликов. Иммунизацию в большинстве случаев проводят внутривенным способом в нарастающих дозах и интервалами в 4 суток. Обычно производят 3–4 инъекции антигена.

### *Преципитирующие диагностические сыворотки и технология их приготовления*

Преципитирующие сыворотки предпочтительно готовят для диагностики сибирской язвы. Первыми для этих целей получили преципитирующую сыворотку Асколи и Валенти в 1910 году. Они иммунизировали внутривенным способом лошадей слабовирулентной культурой возбудителя сибирской язвы. В последующие годы

методы получения качественных сывороток совершенствовались. В настоящее время в нашей стране преципитирующую сибиреязвенную сыворотку получают путем внутривенной иммунизации лошадей слабовирулентными штаммами 916-1, Ш-15, 94 и штаммом из матрикса второй вакцины Ценковского. Указанные штаммы выращиваются на гороховом агаре в течение 18–20 часов при 36–37° С. Культуры соответствующих штаммов смывают с поверхности горохового агара физиологическим раствором, тщательно шуттелируют, фильтруют и стандартизируют. Лошадей гипериммунизируют поочередным введением каждого из указанных штаммов внутривенно. Всего делают 16–17 инъекций антигена, увеличивая дозу с 5 до 70 мл. В период гипериммунизации делают контрольные исследования на накопление антител. По окончании гипериммунизации кровь от лошадей берут через 9–16 суток после последнего введения антигена из расчета 800 мл на 50 кг массы животного. Из крови получают сыворотку методом ее цитрирования с последующим сепарированием и дефибринизацией плазмы. Сыворотку консервируют 0,5%-м раствором фенола. Затем сыворотку выдерживают в специальных отстойниках в течение двух месяцев, после чего подвергают ее стерилизующей фильтрации, разливают во флаконы емкостью 50–100 см<sup>3</sup>, закрывают их резиновыми пробками и обкатывают алюминиевыми колпачками. После этого препарат подвергается биологическому контролю.

#### *Антитоксические диагностические сыворотки*

Чаще всего антитоксические сыворотки готовят с целью диагностики клостридиозов: злокачественного отека, инфекционной энтеротоксемии, ботулизма и других заболеваний, возбудители которых образуют сильные экзотоксины и имеют множество серологических типов. В качестве антигенов при получении таких сывороток используют анатоксины.

Технологическим примером получения таких сывороток является изготовление антитоксических сывороток *Cl. perfringens* типов А, В, С, D, Е и F.

В качестве продуцентов таких диагностических сывороток чаще используют валухов тонкорунных пород в возрасте двух лет. Антигенами являются очищенные и концентрированные анатоксины,

полученные с помощью соответствующих типов *Cl. perfringens*. Для каждого типа указанного микроба используют отдельных продуцентов, которых содержат в отдельных боксах. Антигены овцам вводят подкожно в возрастающих дозах с принятым интервалом 4–6 суток между инъекциями. Гипериммунизацию животных прекращают после получения сывороток с активностью, предусмотренной инструкцией по ее изготовлению. Поэтому в процессе эксплуатации у продуцентов берут кровь и в ее сыворотке определяют титры антитоксинов. Активность каждого типа антитоксических сывороток устанавливают в реакции нейтрализации специфических токсинов при введении их смесей белым мышам или крысам и выражают ее количеством антитоксических единиц.

#### *Диагностические сыворотки для постановки реакций связывания комплемента*

При ряде инфекционных заболеваний образуются так называемые комплементсвязывающие антитела. При их определении в практике используются специфические диагностические сыворотки, содержащие такие антитела. Чаще они используются для определения типа вируса, вызвавшего то или другое заболевание. Показательным примером является приготовление специфических диагностических ящурных сывороток. Он вызывается одним из вариантов вируса ящура: А, О, С, SAT-1, SAT-2, SAT-3, Asia-1. Идентификацию штамма циркулирующего вируса ящура проводят с помощью реакции связывания комплемента (РСК). Специфическую типовую и вариантную сыворотки получают от морских свинок, которых заражают вирусосодержащей суспензией соответствующего типа, с добавлением к ней сапонины и спустя 30–40 суток дополнительно гипериммунизируют тем же материалом путем двух-четырех внутримышечных инъекций. Через 7–10 суток после последней инъекции морских свинок обескровливают и из крови готовят инактивированную сыворотку. Сыворотку проверяют в РСК на активность и специфичность. В качестве антигена для изготовления сывороток используют штаммы вируса ящура, адаптированные к организму новорожденных крольчат или к культурам клеток.

#### *Моноклональные антитела и технологические приемы их получения*

Антитела строго специфичны и способны выявить минимальные различия в химическом составе и пространственной конфигурации молекул. В результате сложной антигенной структуры многих микроорганизмов при иммунном ответе на них в организме образуются неоднородные антитела, то есть в сыворотке будут содержаться смесь антител. Последние продуцируются разными линиями В-лимфоцитов и направлены к различным детерминантам антигена. Если бы определенную линию лимфоцитов удалось выделить и культивировать вне организма, как культуры клеток, то полученный клон лимфоцитов продуцировал бы однородный тип антител – моноклональные антитела. В иммунологии такая идея возникла давно. Но, к сожалению, антителообразующие лимфоциты плохо растут в культуре и зачастую отмирают. В то же время клетки злокачественной опухоли костного мозга, миеломы, обладая способностью к неограниченному росту, интенсивно продуцируют иммуноглобулины, идентичные между собой по структуре. То есть, по сути, это моноклональные антитела к неизвестному антигену.

Ученые давно стремились на основании гибридной технологии получить такие клоны гибридных клеток, которые бы сочетали энергию размножения миеломных клеток с высокой продукцией антител- лимфоцитов, то есть, чтобы они постоянно продуцировали моноклональные антитела.

Первые успехи в данном направлении были достигнуты английскими учеными Келлером и Милстейном (1975). Они получили в результате слияния клеток миеломы РЗ и лимфоцитов из селезенки мышей, иммунизированной эритроцитами в присутствии полиэтиленгликоля, гибридные клетки, которые при культивировании в селективной среде продуцировали иммуноглобулины только к эритроцитам. Такие **клетки-химеры или гибридомы**, будучи полученными путем слияния антителообразующих лимфоцитов и опухолевых клеток, наследовали способность к неограниченному росту в культуре клеток и в то же время к продукции антител определенной специфичности (моноклональных антител).

Но следует иметь в виду, что после слияния клеток двух различных линий образуется клон, антитела, которые он образует, обязательно сразу будут моноклональными в иммунологическом

смысле, так как в каждой клетке гибридного клона вначале присутствуют хромосомы обеих родительских клеток. Экспрессия этих хромосом ведет к продукции как селезеночных, так и миеломных иммуноглобулинов. Однако на ранних стадиях размножения гибридных клеток они быстро утрачивают часть хромосом. Важным при этом является выделить клоны клеток, потерявших хромосомы, присущие миеломе, но сохранившие хромосомы иммунных лимфоцитов. То есть выделяют те клоны клеток, которые синтезируют только тяжелые и легкие цепи иммуноглобулинов к заданному антигену.

#### *Антигены-диагностикумы*

Исследования сывороток больных животных на наличие в них антител, а также определение титров антител в специфических сыворотках при их промышленном изготовлении осуществляются с помощью антигенов-диагностикумов. По происхождению такие антигены подразделяются на бактериальные, риккетсиальные, вирусные.

При изготовлении бактериальных антигенов используют или живые культуры, или гомогенные стандартизированные взвеси убитых микробов. Антигены из живых культур применяются редко, так как это связано с определенными технологическими трудностями, также возможностью заражения лабораторного персонала. Диагностикумы из убитых культур являются предпочтительными.

Приготовление диагностикумов связано прежде всего с тщательной подготовкой и селекцией штаммов микроорганизмов, из которых они готовятся. Производственные штаммы должны находиться в S-форме. Это обеспечивает им хорошую агглютинативность, специфичность и образование устойчивой гомогенной взвеси. Чаще всего для получения диагностикумов определенные штаммы микроорганизмов выращивают на агаровых средах. Культуры микробов смывают с поверхности агара, а затем их инактивируют.

Исходя из наших знаний об объективно существующем разнообразии антигенной структуры возбудителей инфекционных заболеваний, в производстве биологических препаратов получают различные диагностикумы. *Антигены бывают корпускулярными и раство-*

*римыми. Корпускулярные антигены* представляют собой взвесь убитых, реже живых микробов в физиологическом растворе с определенной концентрацией консерванта. Во всех случаях антигены подвергают высокой степени очистки. Такие антигены используются для постановки РА, РСК, РДСК.

*Растворимые антигены* чаще всего готовят в виде экстрактов из агаровых культур соответствующих микробов. Они используются для постановки серологического диагноза с применением РСК при сапе, бруцеллезе, инфекционном эпидидимите баранов и других заболеваниях, а также при постановке диагноза с применением реакций иммунодиффузии (РИД) на бруцеллез, лейкоз и многие другие инфекции.

При некоторых инфекционных заболеваниях (бруцеллез, пуллороз и другие) рекомендуются и производятся промышленным способом эритроцитарные диагностикумы.

Такие антигены представляют собой 5–10%-ю взвесь эритроцитов барана, сенсibilизированных полисахаридно-полипептидной фракцией соответствующих возбудителей болезни. Они предназначены для прижизненной диагностики указанных и некоторых вирусных инфекций с применением реакции непрямой гемагглютинации (РИГА).

### *Бактериофаги*

**Бактериофаги**, выделенные из патогенных микроорганизмов, могут быть использованы как специфические лечебно-профилактические биопрепараты. Используя визуальный феномен лизиса культур микроорганизмов специфическим бактериофагом, в необходимых случаях его используют как диагностический тест. Например, в бактериологических лабораториях феномен бактериофагии используется как высокоспецифическая реакция при диагностике сибирской язвы.

Для этой цели биопредприятиями выпускается два сибиреязвенных бактериофага: К.ВИЭВ и Гамма МВА. Для их изготовления используют авирулентные штаммы возбудителя сибирской язвы. Такие культуры выращивают в МПБ или дрожжевом бульоне. Непременным условием является то, что при засеве нужно использовать молодые, 5–6-часовые, расплодки производственных штам-

мов возбудителя. Кроме того, сразу после посева штаммов *B. anthracis* в бутылки вносится бактериофаг. Содержимое бутылей перемешивается, и они ставятся в термостат на 10–18 часов. По истечении указанного срока среду фильтруют через стерилизующие пластины или патроны. В фильтрате остается только бактериофаг. После изготовления бактериофага его разливают в ампулы и подвергают контролю на стерильность, активность и специфичность.

Сибиреязвенный бактериофаг используется как диагностикум при дифференциации возбудителя сибирской язвы от антракоидов.

#### *Аллергены, технология их приготовления*

Аллергическая диагностика ряда инфекционных (чаще хронических) заболеваний животных и людей основана на феномене сохранения повышенной чувствительности организма к повторному введению того же антигена. В основе такой повышенной чувствительности лежат реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), которые проявляются спустя несколько часов, иногда суток после введения аллергена чувствительному (больному) организму. Обычно ГЗТ представляют собой клеточный феномен, в котором клетками-эффекторами, вступающими во взаимодействие с антигеном (аллергеном), являются сенсibilизированные ТгЗТ-лимфоциты лимфатических тканей и органов (лимфатических узлов, селезенки, грудного протока, перитониальной жидкости, периферической крови и т. д.). Такие реакции выявляются постановкой кожных проб соответствующим аллергеном, и они связаны с клеточными механизмами. Для возникновения ГЗТ, как показывает широкий опыт аллергической диагностики многих хронических инфекционных болезней, необходим длительный контакт организма с антигенами инфекционного агента. Состояние ГЗТ обычно развивается через 2–3 недели после заражения организма и может сохраняться годами. Уровень аллергии непостоянен, может меняться в широких пределах и даже временно исчезать под действием различных факторов, например, при истощении. Животные в состоянии аллергии отвечают на введение аллергенов общей и местной реакцией. Особенно демонстративно протекает реакция при введении аллергенов внутрикожно и нанесение их на конъюнктиву. В толще кожи образуется инфильтрат, внешне проявляющийся припухлостью различной консистенции

и болезненности. Инфильтраты возникают через несколько часов после введения аллергенов и достигают наибольшего развития через двое-трое суток. При нанесении аллергенов (туберкулина, маллеина) на конъюнктиву развивается гнойный конъюнктивит. Наибольшая интенсивность реакции наблюдается через 6–9–12 часов после нанесения аллергенов на конъюнктиву.

При подкожном и внутривенном введении аллергенов зараженные животные реагируют повышением температуры тела, учащенным дыханием, пульсом. Для диагностики туберкулеза отечественной биопромышленностью готовят два аллергена для млекопитающих – сухой очищенный туберкулин PPD – в русской транскрипции ППД (Purified Protein Derivative), и альттуберкулин (АТК). Для диагностики туберкулеза птиц готовят сухой очищенный туберкулин (ППД).



## Глава 1.7 Генные и клеточные технологии

### 1.7.1 Генная инженерия

Генная инженерия относится к новому разделу экспериментальной молекулярной биологии и биотехнологии и направлена на конструирование *in vitro* функционально-активных генетических структур – **рекомбинантных ДНК**. Появление новой методологии расширило экспериментальные границы молекулярной биологии, поскольку позволило манипулировать с чужеродной ДНК и исследовать ее функционирование в гетерологичных системах. Такой подход обогатил теорию знаниями о закономерностях механизма передачи генетической информации и послужил основой для создания принципиально новых биотехнологий. По сути, генно-инженерные методы совершили революцию в биологической науке.

Цель генной инженерии – выяснение механизмов функционирования генетического аппарата. Практические задачи - создание генно-инженерных штаммов бактерий для получения лекарственных средств, диагностикумов, вакцин; создание трансгенных растений с заданными свойствами; создание трансгенных животных для практических целей; разработка методов генной терапии человека.

Фундаментом для развития генной инженерии служат достижения в молекулярной биологии, микробиологии, биохимии и генетике. Достижения в этих базисных областях науки позволили изолировать дискретные участки ДНК – гены. До создания методологии рекомбинантных ДНК все рассуждения о природе гена, генетическом коде были теоретическими. Можно было выделить ДНК практически из любых организмов, но невозможно было выделить отдельный ген. Гены идентифицировали наблюдением за корреляцией специфических мутаций (наблюдение фенотипа).

Технология получения рекомбинантной ДНК позволила впервые в практике научных исследований выделить из организма индивидуальный ген. Это стало точкой отсчета для развития науки генной инженерии.

Почему изолировать ген так важно? Выделение гена дает возможность исследовать его структуру, выяснить закономерности организации и строения, сравнить с другими генами и определить по-

следовательность аминокислот белка, который этот ген кодирует. Знание белкового продукта позволяет сделать заключение о функции гена. И, наконец, знание структуры гена дает возможность его целенаправленной модификации.

Теоретические предпосылки для генной инженерии: к началу развития науки генной инженерии был установлен механизм информационного взаимодействия между основными макромолекулами, участвующими в передаче наследственной информации от одного организма другому. Это – **репликация**, матричный синтез ДНК, при котором цепочка ДНК расплетается, и на каждой образуются новые, комплиментарные. По такому же механизму на ДНК синтезируются комплиментарные ей РНК – транскрипция. На матрице РНК на рибосомах осуществляется синтез белка, структура которого соответствует структуре мРНК – трансляция.

Следующий шаг на пути к генной инженерии – открытие внехромосомной самореплицирующейся ДНК или мини-хромосом, которые получили название плазмиды.

Выделение и получение ферментов **рестриктаз**, которые специфически расщепляют ДНК, позволило манипулировать с фрагментами ДНК и привело к возможности изолировать индивидуальный ген. Приемы генной инженерии позволяют проводить рекомбинацию ДНК *in vitro* и только затем вводить целевую конструкцию в клетку, где происходит экспрессия гена.

История молекулярного клонирования начинается в 1972 г, когда впервые *in vitro* была получена рекомбинантная молекула ДНК из фрагментов разных ДНК. Вирусная ДНК SV40 и ДНК фага лямбда были объединены в лаборатории П. Берга (Станфордский университет, США). В 1973 г. Коэн и Бойер использовали для получения рекомбинантной ДНК плазмидную ДНК и получили первую гибридную плазмиду, которую можно ввести в бактериальные клетки и получить экспрессию чужеродной ДНК *in vivo*. Стало очевидным, что новый метод открывает неограниченные возможности. Далее следует 35-летняя история развития науки о молекулярном клонировании. В итоге, осуществлен прорыв в понимании структуры гена, получены качественно новые знания об организации наследственной информации. К ним можно отнести открытие мозаичного строения

генов эукариот в отличие от генов прокариот, идентификацию мобильных элементов, разработку информационных технологий, создание мировых баз данных для анализа и сравнения генов. Более того, появилась возможность искусственно создавать гены, кодирующие химерные полипептиды, обладающие свойствами двух или более природных белков. Впечатляющие успехи генной инженерии в практических достижениях. Данный подход открыл перспективы создания принципиально новых микробных продуцентов биологически активных веществ, а также животных и растений, несущих функционально активные чужеродные гены.

Универсального метода получения рекомбинантной ДНК не существует, общий принцип метода соответствует схеме, представленной на рисунке 11. Получают фрагменты ДНК из организма донора, которые могут содержать от одного до нескольких генов; каждый из фрагментов лигируют с векторной ДНК с образованием рекомбинантной молекулы, векторная ДНК несет маркер устойчивости к антибиотику; смесь рекомбинантных ДНК используют для трансформации в клетки-реципиенты, где плазмида реплицируется и передается потомству; рекомбинантные клетки отбирают на селективных средах; если рекомбинантные клетки продуцируют белок, идентичный донорной ДНК, это является подтверждением молекулярного клонирования.

Таким образом, стратегия молекулярного клонирования заключается в том, чтобы изолировать индивидуальный ген или гены из большого и сложного генома и «переселить» его (их) в маленький и очень простой геном.

Для клонирования генов может служить геномная ДНК, кДНК, которая синтезируется с помощью **обратной транскриптазы на матрице РНК, амплифицированная ДНК**, полученная с помощью полимеразной цепной реакции, а также синтетическая ДНК, синтезированная *in vitro* из нуклеотидов.

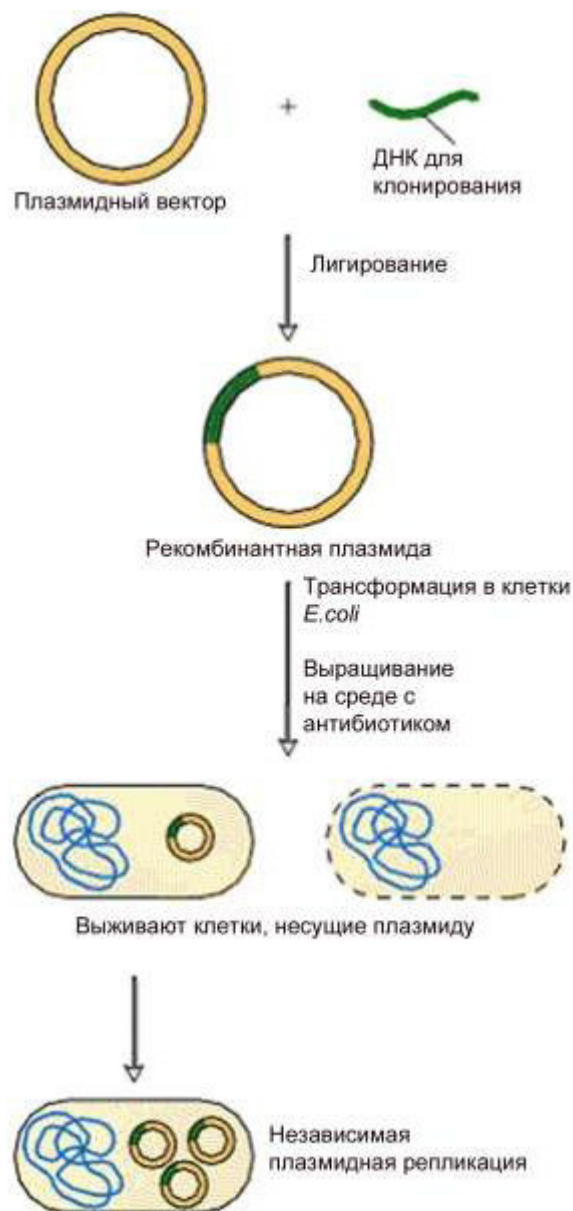


Рисунок 11 – Общая стратегия молекулярного клонирования

Если в качестве исходной ДНК используется геномная ДНК, то сначала проводят клонирование случайных участков ДНК (Shotgun-клонирование). Когда на одном из больших фрагментов обнаружен ген, проводят **субклонирование**, т.е. расщепляют фрагмент мелкощеплящими рестриктазами.

Присоединение ДНК к клонирующему вектору проводят с помощью ДНК-лигазы. Векторы последнего поколения содержат мультиклонировующий сайт (полилинкер) – сегмент ДНК, содержащий различные сайты рестрикции (обычно они перекрываются друг

с другом).

Процесс введения рекомбинантных векторов в клетки-хозяева называется трансфекцией. Трансфекция может осуществляться несколькими способами в зависимости от природы вектора: **трансформацией, конъюгацией и трансдукцией гетерологичной ДНК.**

**Трансформация** – способность бактериальной клетки поглощать молекулы ДНК из раствора. Выход трансформантов низкий и составляет  $10^{-5}$ , зависит от штамма, размера ДНК и условий эксперимента. Существует несколько способов для увеличения эффективности трансформации. Клетки подвергают температурному воздействию и обрабатывают раствором  $\text{CaCl}_2$ . В результате такой обработки происходит локальное разрушение клеточной стенки, что облегчает проникновение ДНК в клетку. Такая обработка дает максимальную частоту трансформации, примерно  $10^{-3}$ . Такой же эффект достигается при использовании для трансформации протопластов и сферопластов, в результате чего мембрана становится более доступной. К увеличению частоты трансформации приводит также обработка клеток полиэтиленгликолем в результате частичного повреждения цитоплазматической мембраны. Для увеличения частоты трансформации используют физический метод – электропорацию, что приводит к увеличению мембранной проницаемости. Смесь клеток и ДНК подвергают электрическому разряду 2-4 тыс. В, при этом в мембране образуются каналы и через них внутрь клетки проникает ДНК. Клоны, несущие рекомбинантные плазмиды, легко отобрать за счет идеального селективного маркера – антибиотикоустойчивости.

**Конъюгация** – перенос ДНК из клетки-донора в клетку-реципиент. Большинство плазмид, которые используются в работе с рекомбинантными ДНК, не конъюгативные и не способны самостоятельно переходить в клетки путем конъюгации. Поэтому их вводят в клетки вместе с конъюгативными плазмидами, предназначенными для переноса по механизму мобилизации.

**Трансдукция** – инъекция ДНК бактериофага в бактериальную клетку. В процессе инфекции бактериофаги адсорбируются на поверхности клетки и проникают в нее с частотой близкой 100% в отличие от низкоэффективной трансформации. Таким образом, если *in vitro* упаковать рекомбинантную ДНК в головки фага, то можно

ожидать ее эффективный перенос в клетку хозяина.

**Хранение.** Первичное клонирование ДНК обычно дает набор клонов, соответствующих полному геному. Такая смесь клонов, полученных в результате расщепления индивидуального генома, называется ДНК-библиотекой или библиотекой генов. ДНК может храниться в виде клонов на векторах, каждый из которых при необходимости может быть востребован.

**Идентификация клона.** Процедура направлена на поиск необходимого клона в смеси, иногда из тысяч клонированных фрагментов. Эта задача сложная, но существующая техника позволяет успешно провести идентификацию даже в случае очень больших геномов (иммунологический скрининг, пульс-электрофорез, ДНК-гибридизация, ДНК-микрочипы, скрининг по активности белка).

После клонирования ДНК ее секвенируют, проводят поиск открытой рамки считывания, затем конвертируют последовательность нуклеотидов в белковый продукт, при необходимости проводят сайт-специфический мутагенез и изучают продукты экспрессии. Если сиквенс показал, что клон содержит неполную рамку считывания, то процедуру клонирования повторяют, применяя другую рестриктазу для расщепления исходной ДНК.

В зависимости от поставленной задачи исследователи используют разные типы **молекулярных векторов**. Векторы-**амплификаторы** способны амплифицировать (размножаться) до 1-3 тыс. копий на клетку. Число копий плазмид, находящихся под ослабленным контролем, составляет 100-200 копий на клетку. Это число может увеличиться до нескольких тысяч копий на клетку, если подавить синтез белков хозяина, обработав клетки бактерий хлорамфениколом. Хлорамфеникол связывается с большой рибосомной субъединицей и ингибирует образование пептидной связи, т.е. ингибирует пептидил-трансферазу. В этих условиях репликация плазмид под ослабленным контролем продолжается, а репликация хромосомной ДНК и плазмид, находящихся под строгим контролем, прекращается. Плазмиды, способные амплифицировать при глобальной блокаде синтеза белка, не обнаружены у бактерий.

**Векторы экспрессии** – это векторы, которые содержат регуляторные элементы для эффективной транскрипции и трансляции кло-

нированных генов.

**Фьюжин-векторы (fusion)** – это векторы-химеры на основе плазмид или фагов, содержащие регуляторную часть одного гена, а структурную часть другого гена. Клонировемый ген вводят в эти векторы так, чтобы регуляторная область бактериального гена оставалась неизменной, а встраивание происходило в его структурную часть. При совпадении рамки трансляции бактериального гена с рамкой трансляции встроенного гена синтезируется химерный белок, который обладает свойствами целевого экзогенного белка. Однако не всегда рамки трансляции бактериального и встраиваемого генов совпадают. В таких случаях клонируемая последовательность будет транслироваться неправильно. Чтобы преодолеть это затруднение, создают наборы векторов, в состав которых входит одна и та же регуляторная область, но в участке встройки чужеродных последовательностей в каждом векторе имеется сдвиг рамки трансляции относительно другого вектора. Обычно такой сдвиг достигается встройкой коротких синтетических фрагментов. Используя набор из трех векторов, можно клонируемую последовательность поместить во все три возможные фазы трансляции, относительно бактериального полипептида, с которым объединяется изучаемая ДНК. Одна из конструкций обязательно будет обеспечивать правильный синтез целевого белка.

**Челночные (бинарные) векторы** – это гибридные плазмиды, которые способны реплицироваться как в клетках *B. subtilis*, так и в клетках *E. coli*. Чужеродные гены первоначально клонируют в методически более простой системе *E. coli*, для которой детально разработаны приемы генной инженерии. В этой же системе проводят целенаправленные модификации генно-инженерных конструкций, а затем отобранные и модифицированные двурепликонные гибридные плазмиды переносят в клетки *B. subtilis*. Используя двурепликонные векторы, можно изучать функционирование одной и той же генетической конструкции в клетках различных типов.

**Векторы секреции.** Одно из актуальных направлений генной инженерии бактерий – создание штаммов, секретирующих чужеродные белки. Перспективы их создания связаны с бациллами, поскольку эти бактерии эффективно секретируют различные белки в среду.

Хорошо изучена секреция альфа-амилазы, пенициллиназы, протеазы, фосфатазы и рибонуклеазы. Эффективность секреции обусловлена присутствием в структуре этих белков сигнальных пептидов. Обычно у белков бацилл они длиннее (29-34 аминокислоты) по сравнению с белками грамотрицательных бактерий и животных (15-25 аминокислот). Клонировав гены секретируемых белков, и удалив затем кодирующую последовательность зрелой формы, можно создать молекулярные векторы секреции для грамположительных бактерий рода *Bacillus*.

Исследования по созданию векторов на основе секретируемых белков бацилл показали, что не всегда конструирование эффективно. Процесс экспорта зависит не только от присутствия сигнального пептида в структуре вектора, но также от других факторов, обеспечивающих транслокацию, транспорт через клеточную стенку и фолдинг секретируемого белка. Более того, встраиваемая ДНК должна содержать промотор, участок связывания рибосом, сигнальный пептид и чужеродный ген в правильной ориентации, при этом рамка трансляции последнего должна совпадать с сигнальным пептидом. Поэтому для достижения результата обычно создают набор гибридных клонов с использованием гидролизатов ДНК, полученных различными рестриктазами.

Для создания векторов для переноса чужеродной ДНК используют плазмиды, бактериофаги и вирусы. Вектор должен обладать следующими характеристиками: обеспечивать репликацию чужеродного фрагмента ДНК, иметь уникальные сайты рестрикции и содержать генетический маркер для отбора рекомбинантных клонов.

**Плазмиды** – это внехромосомные автономно реплицирующиеся молекулы ДНК, не способные к самостоятельному существованию вне клетки. У одних плазмид репликация строго зависит от соответствующих ферментных систем бактерий, это плазмиды с узким спектром хозяев, часто они присутствуют только в клетках одного вида бактерий. Другие плазмиды кодируют белки, которые обеспечивают относительную автономность их репликации. Такие плазмиды способны реплицироваться в бактериях, относящихся к разным видам. Плазмиды несут гены, которые обуславливают фенотипическое отличие содержащих их клеток от бесплазмидных (селектив-



ный маркер) (рис. 12).



*Рисунок 12 – Структура плазмидного вектора: ori –сайт инициации репликации, ampr- ген устойчивости к антибиотику, обеспечивающий селективный отбор, регион для клонирования должен содержать уникальные сайты рестрикции*

Плазмиды, не выявляемые фенотипически, называют **криптическими**. Различают плазмиды высокой и низкой копийности. Репликация первых находится под ослабленным контролем, в результате чего число их копий в клетках может составлять от 10 до 200. Репликация плазмид низкой копийности находится под строгим контролем и число их копий в клетке составляет от 1 до 10.

Итак, плазмиды обладают основными свойствами, позволяющими использовать их в качестве вектора для переноса чужеродной ДНК: небольшой размер, наличие уникальных сайтов рестрикции для молекулярного клонирования и селективного маркера для идентификации реципиентных клеток. С помощью плазмидных векторов можно клонировать фрагменты ДНК размером до 10 кб. С увеличением размера вставки вектор элиминирует при пассировании. Для работы с более крупными фрагментами ДНК в 1974 г. были разработаны векторы на основе фага лямбда *E. coli*.

**ДНК фага лямбда** – это линейная двухцепочечная молекула. С одноцепочечными 5'- концами из 12 нуклеотидов. Их называют cos-концами (cos-сайтами), они взаимокomплементарны и могут спариваться друг с другом с образованием кольцевой молекулы. В зре-

лых вирионах ДНК находится в форме линейной молекулы, попадая в клетку, ДНК циклизуется по *cis*-сайтам и функционирует в кольцевой форме.

Преимущество использования фага лямбда перед плазмидами в том, что можно клонировать до 20 кб чужеродной ДНК. Эффективность внедрения рекомбинантных фагов составляет 100% в отличие от трансформации, при которой эффективность внедрения ДНК составляет  $10^{-4}$ - $10^{-5}$ . Некоторые продукты чужеродных генов токсичны, их трудно клонировать на плазмиде. В этом случае идеально подходит вектор на основе фага лямбда не интегрирующего типа. Хозяйские клетки их быстро лизируют и токсичность для их жизнедеятельности не актуальна. И в заключение, векторы на основе фага лямбда являются эффективными векторами экспрессии для получения белковых продуктов. Они имеют сильные промоторы (PL и PR) и антитерминальный белок N, подавляющий терминацию транскрипции.

**Космиды** – это плазмиды с *cis*-сайтами фага лямбда. Космиды могут амплифицироваться как плазмидный вектор в клетках *E. coli* и быть нагруженными до 40 кб чужеродной ДНК. С другой стороны, с помощью *cis*- сайтов космиды могут быть упакованы в лямбда вирион. Космида содержит *cis*-сайты фага лямбда, полилинкер с шестью уникальными сайтами рестрикции, *oriE* – точку начала репликации *E. coli* и в качестве детерминирующего признака – ген устойчивости к антибиотику (*amp<sup>r</sup>*) (рис. 13). ДНК, предназначенную для клонирования, гидролизуют рестриктазой BamHI и фракционируют фрагменты по 40 кб. Космидный вектор сначала обрабатывают рестриктазой с образованием линейной молекулы ДНК. Препараты чужеродной и векторной ДНК смешивают и лигируют.

Продукты лигирования, которые содержат 40 кб вставку чужеродной ДНК, имеют суммарную ДНК размером 50 кб и, таким образом, способны упаковываться *in vitro* в головки фага лямбда. Фаговый фермент узнает *cis*-последовательности ДНК и катализирует упаковочную реакцию.

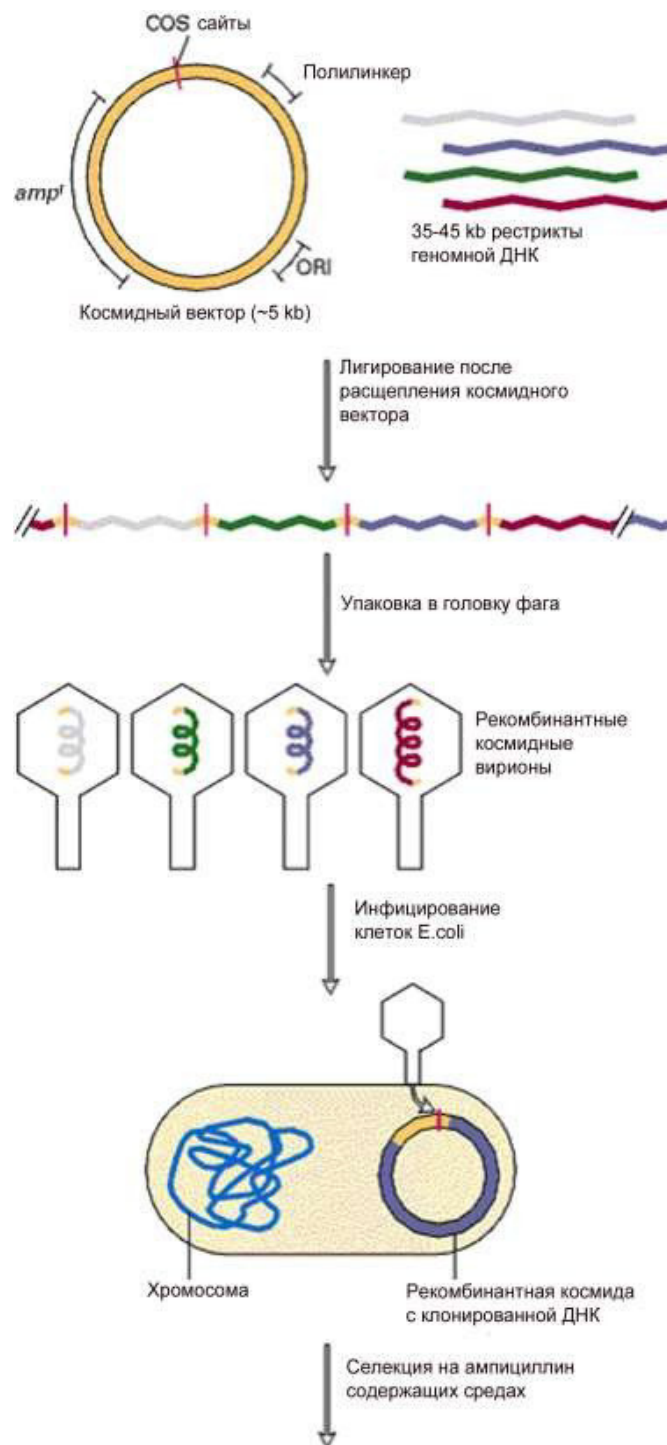


Рисунок 13 – Клонирование на космидном векторе

После сборки фаговых частиц ими инфицируют клетки *E. coli*. В бактериальной клетке линейная молекула вектора, содержащая чужеродную ДНК, циклизуется благодаря cos-сайтам. Она может долго существовать в такой стабильной конфигурации и реплицироваться как гибридная плазмида. Ген устойчивости к антибиотику

обеспечивает рост бактерий на селективной среде. Нетрансформированные клетки при этом погибают.

**Фазмиды** – это искусственные гибридные векторы, включающие ДНК фага и плазмиды. Фазмиды после встройки чужеродной ДНК могут в одних условиях развиваться как фаги, а в других как плазмиды. Исходно фазмида имеет размер до 30 кб. В ее состав входит до 70% генома фага, включая *cos*- сайты и *ori*-последовательность фага. В то же время фазмидный вектор содержит *ori*-последовательность плазмиды. Хотя фазмида содержит все гены, необходимые для литического развития фага лямбда, она не способна к образованию негативных колоний, поскольку столь малая ДНК не упаковывается в капсиды. Фазмида поддерживается в клетках *E. coli* в виде плазмидного вектора. При встраивании чужеродной ДНК *in vitro* происходит увеличение размера вектора, что придает фазмиде свойства недефектного фага. Таким образом, размер вставки составляет до 20 кб, что соотносится с размером вставки для векторов на основе ДНК фага лямбда. Фазмидную ДНК выделяют из клеток бактерий как плазмидную ДНК, гидролизуют рестриктазой, лигируют с продуктами гидролиза чужеродной ДНК, предназначенной для клонирования, а затем проводят упаковку рекомбинантной ДНК в капсиды фага лямбда.

Применение фазмидных векторов значительно упрощает процедуру получения и отбора рекомбинантных векторов, поскольку только рекомбинантные фазмиды образуют на бактериальном газоне фаговые бляшки. В отличие от космидной или фаговой векторных систем, фазмидный вектор существует в клетке в виде плазмиды, а клонотека хранится в виде суспензии гибридных фагов.

**Векторы на основе однонитевых фагов.** В плаزمидях или производных фага лямбда чужеродная ДНК находится в двухцепочечной форме. Тем не менее, имеются экспериментальные задачи, которые базируются на манипуляциях с одноцепочечной ДНК. Например, определение последовательности нуклеотидов (секвенирование), выделение комплементарной РНК или олигонуклеотид-направленный мутагенез.

**Фагмиды.** Расширить возможности использования одноцепочечных векторов удалось путем совмещения плазмид и нитевидных

фагов в одну молекулу ДНК. Такие векторы были названы фагмидами. Для получения фагмидного вектора плазмидную ДНК лигируют с репликативной формой ДНК фага, которая содержит все действующие элементы фагового генома, необходимые для его репликации, а также IR-область, необходимую для молекулярного клонирования. Созданный гибридный вектор обладает свойствами плазмид и фагов. Внутри клеток-хозяев фагмиды размножаются как плазмиды потому, что у них, как правило, отсутствуют гены, необходимые для сборки фаговой частицы. Они размножаются как фаги, если хозяин инфицирован вспомогательными фагами, которые поставляют белки для упаковки. Какая из цепи фагмиды (кодирующая (+) или матричная (-)) будет упакована в фаговый капсид зависит от ориентации ДНК фага в плазмиде. Векторные системы на основе нитевидных фагов успешно применяются для разработки новой технологии фагового дисплея белков, пептидов и антител. Ее суть заключается в том, что в составе фаговых капсидов экспрессируются целевые последовательности полипептидов, которые после сборки экспозируются на их поверхности. Вирионы с гибридными молекулами на поверхности легко тестировать, интересующий исследователя вариант выделить и размножить для дальнейшего изучения. Данное направление исследований имеет большое будущее.

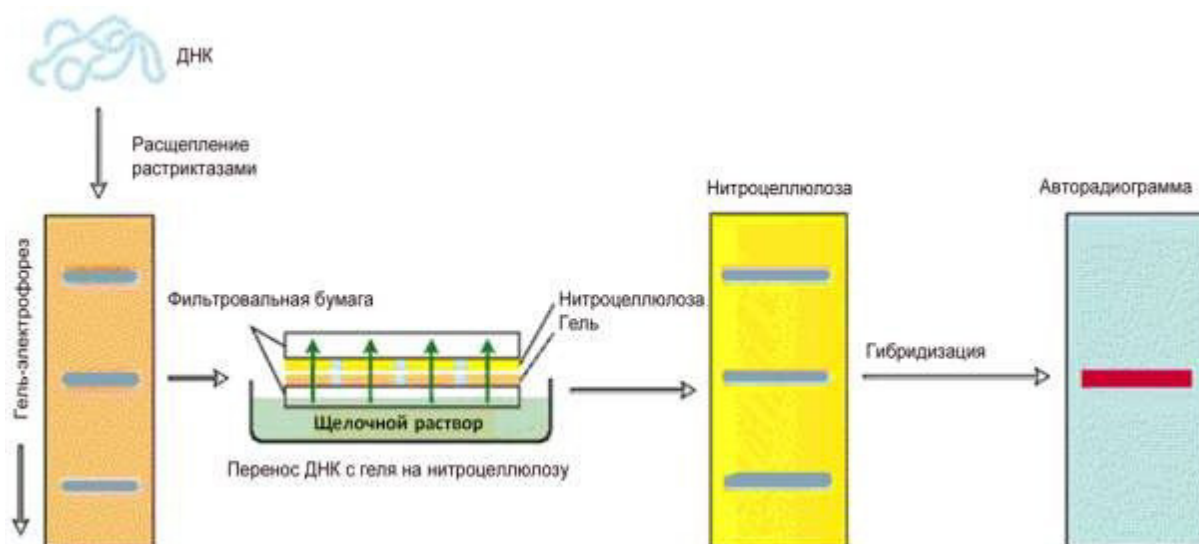
Использование бактерий как хозяев для рекомбинантной ДНК требует выполнения ряда условий. Организм клеток хозяина должен иметь генотип, соответствующий эффективной репликации вектора. Оптимальными характеристиками хозяина являются: быстрый рост на недорогих средах, отсутствие патогенности, способность принять чужеродную ДНК и поддержание ее стабильности при культивировании. Бесспорным лидером при выборе штамма-хозяина являются бактерии *E. coli*. Выбор определяют фундаментальные знания генетики и биохимии этих микроорганизмов, секвенирована полная последовательность генома этих бактерий, для них разработаны и успешно применяются генно-инженерные методы. Недостатком является потенциальная опасность, связанная с условной патогенностью *E. coli*, средой обитания которых является кишечный тракт человека. Даже непатогенные штаммы *E. coli* продуцируют эндотоксины, которые контаминируют выделяемые ими продукты, включая

лечебные препараты (инсулин, гормон роста человека). Кроме того, секретируемые белки выделяются в периплазму и это обстоятельство затрудняет очистку, т.к. разрушение клеток ведет к дополнительной контаминации конечных продуктов. Основные достоинства *B. subtilis* в том, что они не патогенны и секретируют белки в среду. Тем не менее технология клонирования для них не развита так совершенно, как для *E. coli*. Другим ограничением является нестабильность бациллярных плазмид.

Из-за разницы в строении генов прокариот и эукариот клонирование генов эукариот осуществляется путем создания библиотеки кДНК. Процедура клонирования начинается с выделения фракции мРНК. мРНК можно отделить от рибосомной и транспортной РНК за счет присутствия в ее структуре поли(А)-сегмента на 3'-конце. Для этого суммарную клеточную РНК пропускают через колонку с целлюлозой, иммобилизованной с поли(Т)-последовательностями. За счет комплиментарного взаимодействия поли(Т) мРНК задерживается в колонке, а тРНК и рРНК проходят через нее.

Когда доступны мРНК и кДНК, их можно использовать в качестве гибридизационного зонда для качественной и количественной оценки присутствия индивидуальных генов в тотальной ДНК или РНК клетки без процедуры клонирования. Для этого служит метод **блоттинг** по Саузерну, по имени ученого, который его изобрел (1975 г.). Суть метода – перенос нуклеиновых кислот из агарозных гелей на нитроцеллюлозную бумагу (рис. 14).

Сначала клеточную ДНК расщепляют рестриктазой (или рестриктазами) и фрагменты разделяют с помощью электрофореза в агарозном геле. Молекулы ДНК, разделенные по размеру, денатурируют щелочью, после нейтрализации щелочи, пластину геля покрывают листом нитроцеллюлозы, на нее помещают фильтровальную бумагу, которая должна обеспечить медленный ток буферного раствора через гель. В этих условиях ДНК диффундирует из геля и связывается с нитроцеллюлозным фильтром. После прогревания фильтра при 80°C ДНК необратимо иммобилизуется на нитроцеллюлозе. При этом расположение полос ДНК на фильтре точно соответствует их расположению в геле (реплика геля).



*Рисунок 14 – Техника Саузерн-блота для определения присутствия специфического фрагмента ДНК в смеси рестриктов*

ДНК, связанную с фильтром, можно гибридизовать с радиоактивно меченым зондом, специфичным к определенной последовательности. В качестве такого зонда используют клонированный фрагмент ДНК, синтетический олигонуклеотид, мРНК или ее ДНК-копию. Меченый зонд гибридизуется с комплиментарной ДНК, полосы выявляют после радиоавтографии нитроцеллюлозного фильтра.

По такой же схеме на нитроцеллюлозный фильтр из агарозного геля можно перенести и молекулы РНК. Этот метод назван Северным блоттингом (Northern blotting), а перенос белков из геля на фильтры – Западным блоттингом (Western blotting). В качестве пробы в последнем анализе используют не ДНК, а антитела к тестируемым белкам. Три метода – мощный инструмент в детекции специфических макромолекул.

После того как ген клонирован, начинается следующий этап анализа – **секвенирование**, или определение последовательности нуклеотидов. Последовательность нуклеотидов – определяющая характеристика гена, позволяющая дать заключение о функции.

В основе секвенирования – получение фрагментов ДНК, различающихся по длине на один нуклеотид и меченых  $^{32}\text{P}$  по 5'-концу.

Молекулы разделяют электрофорезом в ПААГе. Определяется основание на конце каждого из фрагментов и устанавливается последовательность нуклеотидов.

Подвижность полос на электрофорезе обратно пропорциональна логарифму их длины: чем короче фрагмент, тем он ближе к 5'-концу:

```

5' A C T G A
32P--
32P----
32P-----
32P-----
32P-----

```

Исторически, для секвенирования использовали два подхода – химический и ферментативный. **Химический метод** разработали А.Максам и В.Гилберт в 1976 г. Они секвенировали ДНК вируса SV40. Процедура начинается с присоединения метки к 5' концам молекулы ДНК с помощью полинуклеотидкиназы фага Т4. Препарат меченой ДНК делят на четыре части. Каждую часть обрабатывают реагентом, разрушающим одно из четырех оснований. Экспериментально подбирается такая концентрация реагента, что на 1 молекулу ДНК приходится одно повреждение. В месте повреждения образуется разрыв. Получается набор ДНК молекул длиной от метки до разрушенного основания. Если поврежденный нуклеотид, например А, находится на расстоянии 3, 8, 9 и 13 нуклеотидов от меченого фосфора, то обработка реагентом, разрушающим А ведет к образованию фрагментов длиной 3, 8, 9 и 13 нуклеотидов.

Наборы ДНК делят электрофорезом. Радиоавтограф отражает дистанцию от метки до разрушенного основания. Чтобы определить полную последовательность, процедура выполняется одновременно в четырех пробирках, в которых реагенты, разрушающие А, Т, С и G. Пробирки разделяют на электрофорезе в четырех параллельных дорожках. Полосы читаются снизу вверх и следуют поочередно уровень за уровнем по любой из 4-х дорожек. Сопоставление полос на радиоавтографе позволяет читать последовательность нуклеотидов,

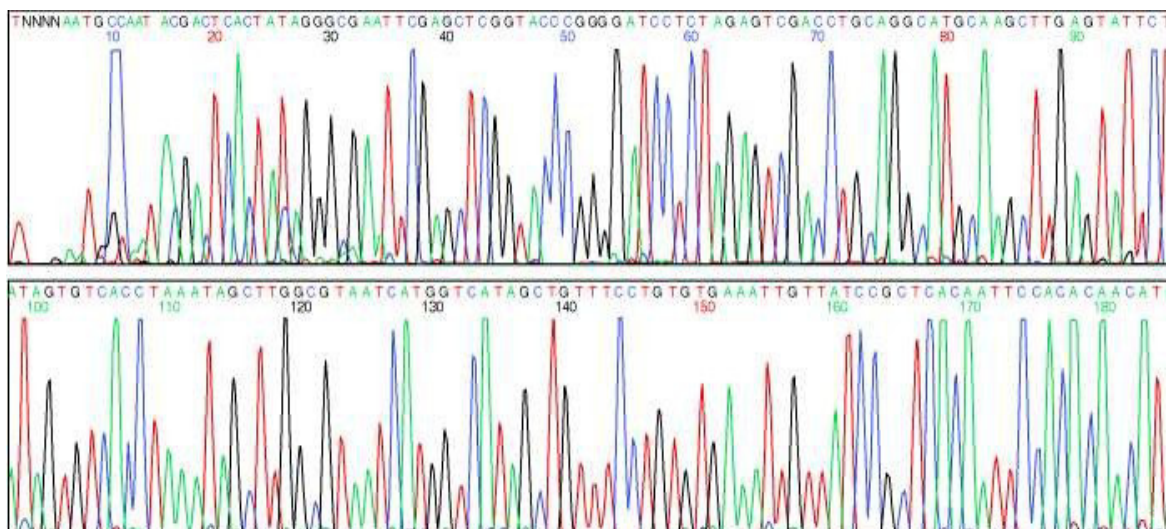


переходя от уровня к уровню снизу вверх (5' → 3').

**Ферментативный метод (дидезоксисеквенирование).** Определение нуклеотидной последовательности ДНК методом ферментативного копирования с помощью ДНК-полимеразы с остановкой удлинения цепи изобрел Ф. Сэнгер в 1977 г. Он впервые предложил применить модифицированные нуклеотиды – дидезоксирибонуклеотиды (ddNTP), у которых отсутствуют 3'- и 2'-ОН группы. Модифицированные нуклеотиды способны включаться в растущие цепи ДНК через 5'-фосфатную группу, но не способны образовывать ФДЭ-связь со следующим нуклеотидом из-за отсутствия 3'-ОН группы. Если в реакционную смесь добавляют небольшое количество модифицированных нуклеотидов, то после их встраивания в ДНК синтез прекращается и образуется набор ДНК разной длины. Таким образом, для секвенирования можно поставить четыре реакции с каждым из модифицированных нуклеотидов и разделить продукты на электрофореze.

Автоматическое секвенирование включает автоматизацию проведения секвенирующих реакций и электрофоретического разделения меченых продуктов. При этом используется флуоресцентная метка. Каждый из четырех нуклеотидов метят различными флуоресцентными красителями. Содержание всех пробирок соединяют и проводят электрофорез на одной дорожке. Дорожку сканируют в луче лазера и регистрируют положение каждой флуоресцирующей полосы. Данные вводят в компьютер, который их сопоставляет с помощью специальных программ и выводит на дисплей нуклеотидную последовательность (рис. 15).

Первый автоматический ДНК-секвенатор разработан в 1987 г. фирмой Applied Biosystems (США). Позже для автоматического секвенирования наряду с пластинами использовали капиллярный гель-электрофорез. Для него характерны высокая чувствительность и высокая скорость разделения.



*Рисунок 15 – Автоматическое секвенирование с помощью флуоресцентных красителей. Каждому из четырех нуклеотидов соответствует свой индивидуальный краситель*

Современные ДНК-секвенаторы существенно превосходят секвенирование вручную, растет скорость секвенирования, постоянно улучшается техника и программное обеспечение. Это ведет к тому, что секвенирование ДНК становится простой и доступной процедурой.

### 1.7.2 Клеточные технологии

Клеточная инженерия – раздел современной биологии, изучающий процесс и последствия переноса всего или значительной части генетического материала от одной клетки к другой. Она позволяет создавать клетки нового типа на основе их гибридизации, реконструкции и культивирования. В случае эукариотических организмов и в зависимости от объекта генетических манипуляций процесс может подразделяться на хромосомную (перенос больших групп генов или хромосом) и геномную (полный перенос генома) инженерию.

Базовым методом клеточной инженерии служит слияние (гибридизация) клеток микроорганизмов или соматических клеток животных и растений. Слияние клеток может быть проведено с использованием факторов слияния различного происхождения: физического (переменное электрическое или магнитное поле), химического (катионы, полиэтиленгликоль и др.), биологического (вирусы).

Растительные клетки перед слиянием превращают в протопласты клетки, лишенные внешней жесткой клеточной стенки. После дующий скрининг полученных гибридных клеток позволяет отобрать те из них, которые объединили геномы или фрагменты ДНК родительских клеток. Клеточная инженерия позволяет получать гибридные клетки или даже целые растения (растения-регенераты), скрещивая между собой филогенетически (т.е. эволюционно) отдаленные организмы. В случае неполного слияния клеток клетка-реципиент получает отдельные участки ядерного генетического материала или части клетки-донора (органеллы) с образованием асимметричных гибридов.

Клеточная инженерия расширяет возможности получения новых ценных штаммов микроорганизмов, сортов культурных растений и пород сельскохозяйственных животных, для создания которых ранее использовались методы классической селекции, требующие десятилетий. За последнее время создан ряд межвидовых и межродовых гибридов табака, картофеля, томата и других растений.

Использование достижений клеточной инженерии позволило разработать технологии получения безвирусных растений (например картофеля) путем регенерации целого растения из одной соматиче-

ской клетки. На рис. 16 представлена схема регенерации растения из протопластов. При получении клеток используется комплекс методов, включающий культивирование, клеточную гибридизацию и генетическую инженерию. Однако основой является гибридизация, позволяющая конструировать клетки с новыми свойствами.

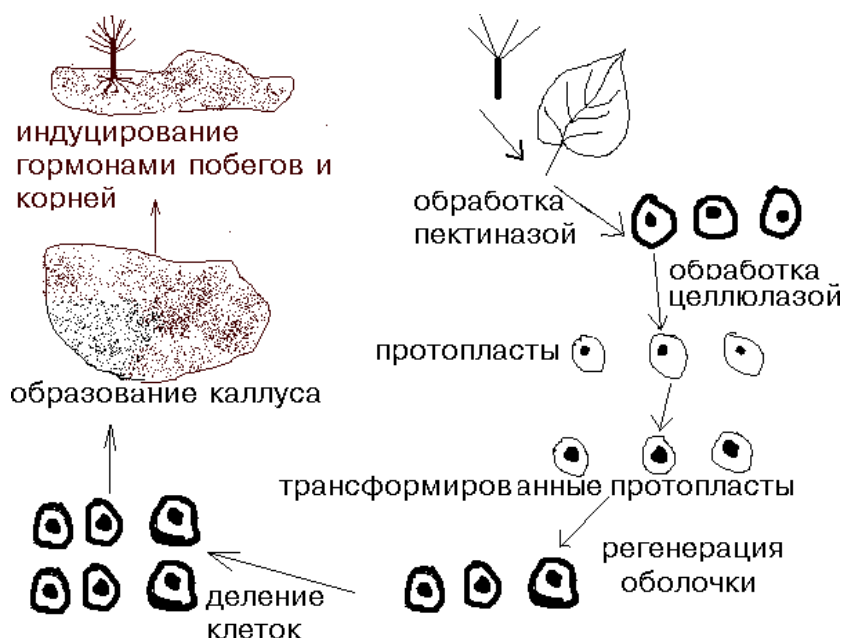


Рисунок 16 – Схема регенерации растения из протопластов

Иногда применение клеточной инженерии ограничивают только слиянием протопластов.

В настоящее время культуры клеток широко применяются для производства противовирусных вакцин. Они дополняют, а возможно, когда-нибудь и заменят использование животных для тестирования безопасности и эффективности вакцин и лекарственных препаратов. Клетки насекомых, так же как растительные клетки и клетки животных, могут быть использованы для производства живых рекомбинантных противовирусных вакцин, сконструированных, например, на основе бакуловирусов. Их применение позволяет решить проблему безопасности, возникающую при получении и применении живых вакцин традиционным методом на основе аттенуированных штаммов. Кроме того, с их помощью можно синтезировать лекарственные вещества, особенно некоторые белки животных, слишком

сложные для того, чтобы синтезировать их с помощью генетически модифицированных микроорганизмов.

В основе метода **гибридизации клеток** лежит слияние клеток, в результате чего образуются гетерокарионы, содержащие ядра обоих родительских типов. Образовавшиеся гетерокарионы дают начало двум одноядерным гибридным клеткам. Впервые были получены гетерокарионы клеток мыши и человека. Такую искусственную гибридизацию можно осуществлять между соматическими клетками, принадлежащими далеким в систематическом отношении организмам, и даже между растительными и животными клетками. Гибридизация соматических клеток животных сыграла важную роль в исследовании механизмов реактивации генома покоящейся клетки и степени фенотипического проявления отдельных генов, клеточного деления, в картировании генов в хромосомах человека и в анализе причин злокачественного перерождения клеток. Первый межвидовой гибрид был получен в 1972 г. П. Карлсоном при слиянии протопластов из клеток разных видов табака.

Гибриды, полученные при слиянии протопластов, имеют важные отличия от половых гибридов поскольку несут цитоплазму обоих родителей. Возможно создание гибридов, наследующих ядерные гены одного из родителей наряду с цитоплазматическими генами обоих родителей. Особый интерес представляют гибриды растений, несущие цитоплазматические гены мужской стерильности, устойчивости к различным патогенам и стрессорным факторам, полученным от дикорастущих видов. Слияние протопластов используют также для получения гибридов с ценными в хозяйственном отношении свойствами между отдаленными видами, которые плохо или вообще не скрещиваются обычным путем. Удалось, например, получить соматический гибрид картофеля с томатами и т.д. При слиянии протопластов создают и новые клеточные линии-продуценты нужных веществ, используемых в различных отраслях народного хозяйства и в первую очередь в здравоохранении.

Одним из способов модификации клеток является введение в них индивидуальных генов. Встраивание активного гена на место отсутствующего, или поврежденного открывает путь для лечения генетических заболеваний человека. Реконструкцию клеток прово-

дят также при слиянии клеточных фрагментов друг с другом или с интактными клетками. В результате получают клетки с различными свойствами, например, гибриды либо клетки с ядром и цитоплазмой от разных родителей. Такие конструкции используют для изучения влияния цитоплазмы в регуляции активности ядра.

Таким образом, клеточная инженерия является одним из основных методов биотехнологии.

Отдельным направлением клеточной инженерии, имеющим огромное практическое значение, является получение гибридов, то есть клеток, возникающих при слиянии родительских клеток из одного организма, но с разными программами дифференциации и развития. Это могут быть клетки из разных типов ткани или опухолевые клетки. В качестве примера можно привести слияние клеток селезенки и миеломы с образованием гибридом при получении МАт.

Традиционная технология получения иммуноглобулинов сводится к иммунизации животных-продуцентов (лошадей, баранов, кроликов, морских свинок и т.д.) соответствующими антигенами, получению от животных поликлональных сывороток. Кроме антигенов для иммунизации могут быть использованы гаптены, которые являются веществами, имеющими низкую молекулярную массу. Они способны индуцировать иммунный ответ только после соединения с подходящим белком-носителем или искусственным полимером. В этом случае антитела вырабатываются как на гаптен, так и на молекулу-носитель. При повторном попадании в организм этого же гаптена или антигена они связывается с антителами и элиминируются.

У антител, вырабатываемых организмом в ответ на антигены, имеются:

- стабильные (константные) участки, характерные для всех антител данного класса, вырабатываемых всеми организмами данного вида – изотипы;
- стабильные участки, характерные для всех антител данного класса, вырабатываемых данным конкретным организмом, но отличающиеся по аминокислотной последовательности от аналогичных участков таких же антител другого организма этого же вида – аллотипы;
- переменные участки, аминокислотная последовательность



которых специфична для антител против конкретного антигена – идиотипы.

Особым видом антител являются так называемые антиидиотипические антитела. Эти антитела синтезируются против антител, введенных в организм. Антиидиотипические антитела специфичны к варибельному участку антитела, так называемому идиотипу. Они играют важную роль в связывании и элиминации избытка антител, т.е. в иммунной регуляции количества антител. Кроме того, они зеркально повторяют пространственную конфигурацию исходного антигена, против которого было выработано исходное антитело, и служат для организма фактором иммунологической памяти, аналогом исходного антигена. Этот фактор остаётся в организме и после уничтожения исходных антигенов. В свою очередь, против антиидиотипических антител могут вырабатываться антиантиидиотипические антитела и т. д.

Попытки культивировать *in vitro* антителопродуцирующие клетки оказались неудачными, поскольку их невозможно длительно культивировать вне организма и получать достаточное количество антител. Более того, такая система обычно продуцировала множество клонов антител.

Значительные успехи биотехнологии за последние 15 – 20 лет были достигнуты благодаря разработанному в 1975 г. С. Мильштейн, Г. Келер и Н.К. Ерне методу получения гибридом, продуцирующих моноклональные антитела (МАт). В 1984 г. за это открытие им присуждена Нобелевская премия в области физиологии и медицины. Основная идея состояла в использовании линии миеломных клеток, которые потеряли способность секретировать антитела, и путем слияния их с В-клетками, продуцирующими антитела, получить гибридомы с последующей их селекцией.

Получение МАт включает в себя ряд этапов (рис. 17):

- выделение или синтез антигенов, необходимых для иммунизации BALB С мышей (при этом антиген не обязательно должен быть высокоочищенным);
- взятие клеток селезенки у иммунизированных мышей, имеющих наиболее высокие титры антител к введенному антигену;
- слияние клеток селезенки с клетками миеломы (опухолевыми

клетками). От опухолевой клетки гибридоме передается способность к неограниченному размножению, а от лимфатической – способность к синтезу антител;

- смесь клеток высаживают на среду ГАТ для отбора гибридом.



Рисунок 17 – Схема получения моноклональных антител

Прежде всего был получен штамм опухолевых клеток, который не содержал ферментов, обеспечивающих запасной путь синтеза нуклеотидов при блокировании аминоптерином основного пути. Другие клетки, используя гипоксантин и тимидин, могли включать резервный путь синтеза нуклеотидов, следовательно, среда, содержащая гипоксантин, аминоптерин и тимидин (ГАТ), являлась селективной. На ней погибали клетки плазмоцитомы, но выживали нормальные лимфоциты и гибридомы. Поскольку лимфоциты не могут долго размножаться в культуре и гибнут, остаются только гибридомные клетки.

Следующим этапом является отбор нужных клонов. Для этого проводят их скрининг. Клоны, продуцирующие нужные антитела, могут быть размножены в культуре ткани или *in vivo*. В последнем случае их трансплантируют в брюшную полость сингенных мышей, в которой они размножаются и выделяют асцитическую жидкость, содержащую антитела. Клоны можно длительное время хранить замороженными при минус 70 °С. Все антитела, синтезированные одним клоном гибридом, имеют одинаковую специфичность.



Последний этап состоит в наработке больших количеств МАт. Их можно получить или в виде асцитной жидкости на мышах, или путем культивирования в биореакторах.

В настоящее время с помощью данной технологии получены МАт к множеству антигенов, включая возбудителей многих инфекционных болезней.

В последние годы сформировалась новая область иммунологии – инженерия антител, т.е. получение неприродных иммуноглобулинов с заданными свойствами. Для этого обычно используются два основных направления: биосинтез полноразмерных антител и получение минимальных фрагментов молекулы антител, которые необходимы для эффективного и специфического связывания с антигеном.

По первому направлению получен химерный иммуноглобулин – мышь/человек. Его переменные домены, которые и определяют специфичность, взяты из антитела мыши (IgG1), а константная часть – из человеческого IgE. По второму направлению сконструированы и экспрессированы в клетках *E.coli* гены “мини-антител”, которые не содержат константных доменов.

Существование **стволовых клеток** в некоторых тканях сначала было предсказано теоретически. Американский цитолог Э. Вильсон в 1896 г. предположил существование клеток, обеспечивающих поддержание сперматогенеза. Но предсказание и начало работ непосредственно со стволовыми клетками разделил немалый промежуток времени, что связано было с несовершенством экспериментальных методик. Стволовые клетки надо было сначала выделить из общей массы клеток зародыша, что явилось весьма нелегкой задачей, поскольку они составляют лишь сотые доли процента от общего числа клеток зародыша организма.

Стволовые клетки разделяются на **эмбриональные стволовые клетки (ЭСК)**, которые выделяют из эмбрионов на стадии бластоцисты, и **региональные стволовые клетки (РСК)**, получаемые из органов эмбрионов на более поздних стадиях или из органов взрослых особей. Поэтому их часто называют взрослыми стволовыми клетками. В различных органах и тканях взрослого организма существуют частично созревшие стволовые клетки, готовые быстро до-

зреть и превратиться в клетки нужного типа. Они называются **бластными** клетками. Например, частично созревшие клетки мозга – это нейробласты, клетки кости – остеобласты и так далее.

Дифференцировку могут инициировать как внутренние, так и внешние факторы. Стволовые клетки преобразуются в клетку того или иного органа в присутствии определенного химического вещества, дифференцированного по составу и, возможно, по концентрации для каждого отдельного вида клеток. Однако природа этих веществ и источник их происхождения пока точно не установлены.

Известно, что геномы всех клеток одного организма идентичны, но режим их работы в разных клетках различен. Следовательно, ДНК во всех клетках (кроме половых) одного организма, в том числе и стволовых, одинакова. Клетки различных органов и тканей, например клетки кости и нервные клетки, различаются включенными и выключенными генами, то есть разным регулированием экспрессии генов. Механизмов такого регулирования очень много, один из них – метилирование ДНК.

Многоклеточные организмы научились также прицельно отключать свои собственные гены с помощью РНК-интерференции (РНКи), прерывая процесс синтеза кодируемых ими белков. Работы по РНК-интерференции были выполнены в 1997 г. и опубликованы в феврале 1998 г. в журнале «Nature». Указанный механизм ингибиции очень древний. По всей видимости, биологическая эволюция создала его более миллиарда лет назад, когда нашу планету населяли только бактерии. С его помощью они получили возможность защищаться от многих вирусов. Позже эту способность у них переняли далекие потомки, грибки и растения, а потом животные и человек. Кроме того, такой механизм позволяет клетке вырезать и уничтожать подвижные элементы ее генома, которые могут перемещаться на неположенные места и давать начало опасным мутациям.

Наконец, РНКи участвует в регуляции экспрессии функциональных генов и способствует стабилизации хромосомного вещества – **хроматина**. За открытие этого механизма Нобелевскую премию 2006 г. по физиологии и медицине получили американские ученые Э. Файр и К. Мело. После открытия зрелых и незрелых клеток был обнаружен новый уровень управления клетками.

Все стволовые клетки независимо от их происхождения и источника выделения обладают уникальными свойствами. Они не специализированы, то есть не имеют каких-либо тканеспецифических маркеров, ответственных за выполнение специальных функций, но способны дифференцироваться в любые специализированные клетки и образовывать из одной первоначальной стволовой клетки линии генетически идентичных клеток. Их можно культивировать в течение длительного времени.

Отличие зрелых клеток от стволовых состоит в том, что первые обычно имеют ограниченное количество циклов деления. Процесс созревания стволовых клеток протекает в несколько стадий, что приводит к возникновению в организме популяций стволовых клеток различной степени зрелости. Образование соматических клеток из ЭСК идет в обход органогенеза и многих событий, происходящих при естественном развитии зародыша в матке. Чем более зрелой является клетка, тем меньше вероятность её превращения в клетку другого типа.

Как известно, специализированные клетки взрослого организма необратимо утрачивают способность к повторению эмбриогенеза. При культивировании *in vitro* большинство специализированных клеток, изолированных из тканей, быстро дедифференцируется, теряя фенотип и присущие им функции. Науке пока неизвестны способы получения стволовых клеток из дифференцированных. Тем не менее, это возможно благодаря процессу трансдифференцировки клеток. Разработка методов такого клеточного репрограммирования, то есть возвращения зрелых клеток организма, например клеток кожи, в недифференцированное состояние и последующей стимуляции дифференциации их в клетки необходимого типа ткани, является перспективным направлением.

Однако полное репрограммирование генома соматических клеток взрослых тканей пока технически невыполнимо. В геноме соматических клеток отсутствуют «программы» репарации. В случае возникновения аномальных клеток используется несколько вариантов апоптоза для их аутоэлиминации. После пересадки стволовых клеток они ускоряют самообновление клеток в органах, в том числе элиминацию патологически измененных клеток.

В изучении стволовых клеток особое значение, кроме РНКи, приобрели следующие молекулярно биологические подходы: протеомный анализ, генетическая трансформация, техника биочипов (microarray технология), метод генных ловушек и др.

Любой многоклеточный организм берет начало с **зиготы** – клетки, возникшей в результате слияния двух родительских половых клеток – отцовской и материнской. Однако и взрослый организм несет в себе своего рода двойники зиготы, так называемые ЭСК.

Принципиально важное свойство ЭСК в том, что эти клетки из начально не имеют специализации, но могут «выбрать» один из 200 возможных типов клеток, приняв информацию от соседних клеток в тканях организма. Можно сказать, что эмбриональная стволовая клетка лишь ждет особых сигналов, чтобы начать одно из своих превращений в специализированные клетки.

Изучение эмбриональных стволовых клеток было начато с концепции стволовой клетки, предложенной русским гистологом А. Максимовым применительно к кроветворной ткани. Он же в 1908 г. на съезде гематологического общества в Берлине предложил термин «стволовая клетка». Вторая половина XX в. ознаменовалась крупным успехом в изучении клеточного состава костного мозга и открытием в его строении мезенхимальных стволовых клеток. В 1981 г. английскому ученому М. Эвансу впервые удалось выделить недифференцированные стволовые клетки из зародыша мыши и лишь в 1998 г. американские ученые Д. Томпсон и Д. Герхарт изолировали первую линию ЭСК человека. В 1999 г. журнал «Science» признал открытие эмбриональных стволовых клеток третьим по значимости событием в биологии после расшифровки двойной спирали ДНК и программы «Геном человека».

В результате проведенных исследований определился ряд этапов, предшествующих использованию ЭСК в клинической практике:

- выделение ЭСК и получение их в виде культуры клеток с направленной дифференцировкой;
- проведение теста на их физиологическую функциональность в культуре;
- проведение теста на функциональную эффективность и безопасность на животных;

- тестирование полученных клеток на возможность развития реакции отторжения.

Хотя первые методы выделения и пассирования ЭСК появились около 20 лет назад, выделение их из зародышей остается, скорее, искусством, чем стандартной процедурой. В настоящее время ученые пытаются разработать методы выделения стволовых клеток из плаценты и жировой ткани.

Имеются лишь отдельные достоверные сообщения об успешном применении ЭСК в клинике. Как отмечает академик М.А. Пальцев, имеются следующие серьезные трудности в использовании ЭСК для лечения заболеваний:

- иммунологическая несовместимость клеток, пересаживаемых реципиенту;
- неполное соответствие условий клеточной дифференцировки *in vivo* и *in vitro*;
- невозможность обнаружения генетических дефектов до пересадки эмбриональных стволовых клеток;
- недостаточно доказательств эффективности и безопасности применения ЭСК;
- пересадка ЭСК, подобно трансплантации органов, не излечивает больного, а продлевает его жизнь;
- этические проблемы.

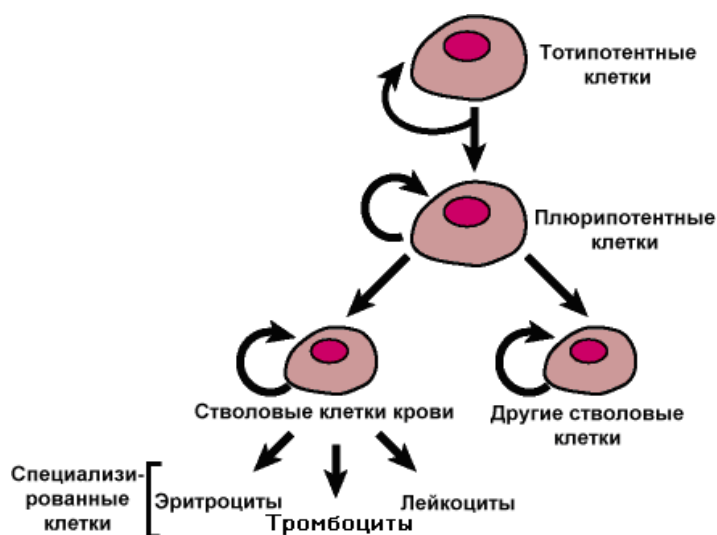
Одну из основных проблем при трансплантации ЭСК – иммунологическую несовместимость клеток – можно решить с помощью генетической инженерии. Однако изменения иммунных характеристик эмбриональных стволовых клеток с целью снижения риска развития реакции отторжения трансплантата не дают возможности обеспечить 100 %-ную безопасность пациенту. Риск появления генетических изменений в этом случае вполне реален. Тем более, что их очень сложно обнаружить до трансплантации.

Терапевтическое клонирование, при котором генетическая информация ЭСК замещается генетической информацией, взятой от пациента, также не решает проблемы, поскольку в таких клонах велика вероятность возникновения артефактов, делающих невозможным их использование в лечении.

На дифференцировку ЭСК влияют многочисленные факторы,



и полное воспроизведение необходимых условий практически невозможно. В то же время трансплантация пациенту некорректно дифференцированных клеток представляет серьезный риск, связанный с их высоким **туморогенным** потенциалом. После оплодотворения яйцеклетка начинает делиться, образуя первые тотипотентные стволовые клетки (рис. 18), способные воспроизводить любую из 200 специализированных клеток взрослого организма.



*Рисунок 18 – Схема дифференцировки эмбриональных стволовых клеток*

Клетки развивающегося эмбриона изначально тотипотентны, но теряют это свойство после нескольких клеточных делений в результате дифференцировки. Некоторые из клеток организма не дифференцируются окончательно, а становятся плюрипотентными, то есть способны давать лишь отдельные типы клеток организма. Тотипотентные клетки эмбриона называют также эмбриональными стволовыми клетками, а плюри- и мультипотентные клетки организма – взрослыми стволовыми клетками. Функция первых в организме очевидна, из одной клетки должен развиваться целый организм с большим числом клеточных типов, каждый из которых выполняет свою функцию. Взрослые стволовые клетки необходимы организму для восполнения погибших клеток в процессе жизни. Они способны заменять практически все ткани в организме. Кроме того, они спо-

собны к самоподдержанию и производству клеток-предшественников, которые затем дифференцируются.

РСК при повреждении тканей соответствующего органа мигрируют к зоне повреждения, делятся и дифференцируются, образуя в этом месте новую ткань. История изучения регионарных стволовых клеток началась более 40 лет назад. Они используются организмом для восстановления поврежденных участков только в данном месте и для определенного вида ткани (костные, мышечные, нервные ит. д.). Такие монопотентные (унипотентные) стволовые клетки созревают, образуя один фенотип клеток.

Стромальные стволовые клетки костного мозга являются универсальными. Поступая с кровотоком в поврежденный орган или ткань, под влиянием различных сигнальных веществ они превращаются в нужные специализированные клетки, которые замещают погибшие. Они не только играют важную роль в развитии плода, но и сохраняются в детском и взрослом организме. Поскольку их доля в тканях взрослого организма очень мала, то возможности органов по регенерации сильно ограничены. Когда человек рождается, то у него в костном мозге на 10 тысяч стволовых кроветворных клеток приходится одна стромальная клетка. У подростков стромальных клеток уже в 10 раз меньше. К 50 годам на полмиллиона стволовых – одна стромальная клетка, а в 70 лет отбирать пробу костного мозга просто бессмысленно – там содержится всего лишь одна стромальная клетка на миллион стволовых.

Открытие и изучение свойства пластичности РСК, стромальных и соматических стволовых клеток имело огромное значение. Исследования последних лет показали не только возможность выделения соматических стволовых клеток, но и их направленную дифференцировку *in vitro* и *in vivo*. Дифференцировка ЭСК в специализированные классы соматических клеток открывает большие возможности для изучения функциональных программ генома.

Использование эмбриональных стволовых клеток рассматривается в качестве потенциального метода терапии многих наследственных заболеваний, которые не удается лечить методами молекулярной генетики, включая средства генной терапии. Доказано, что всего 3 – 5 % генетически нормальных клеток достаточно, чтобы

восстановить утраченную биохимическую функцию поврежденной печени, скелетной мышцы или желез внутренней секреции.

Важной особенностью ЭСК является то, что внутрихромосомная рекомбинация и эндоредупликация отдельных сегментов хромосом полностью блокированы строением хроматина. Поэтому общая частота мутаций в геноме у них ниже в несколько раз, чем у соматических клеток. ЭСК оказались незаменимым объектом для изучения особенностей функционирования генов организма на всех этапах его существования. Они позволили получать живые организмы как с «выключенными», так и с вновь введенными генами. Направленное «выключение» в организме определенного гена называется генным нокаутом, или **таргетингом** (от англ. target – цель). Животные, имеющие в своем составе «нокаутированные» или дополнительные гены, служат моделью для понимания того, как отдельные гены влияют, например, на развитие тех или иных патологий у человека – сердечно-сосудистых заболеваний, нарушений функций иммунной системы, некоторых форм рака. Генный нокаут в корне изменил подход к получению живых организмов с измененными генами. Еще совсем недавно ученым приходилось кропотливо отбирать из многих сотен, а то и тысяч экземпляров особи, обладающие генами с иной структурой, возникшей в результате мутаций. В настоящее время такой путь сменился активным модифицированием генов непосредственно в составе живых клеток.

В 2007 г. английский ученый М. Эванс и американские ученые С. Оливер и М. Капекки были удостоены Нобелевской премии в области физиологии и медицины за разработку методики получения живых организмов с целенаправленно изменённой структурой генов. Отмеченная высокой наградой работа этих учёных фактически возникла на стыке двух направлений биологической науки – клеточного, которое связано с манипуляциями непосредственно с ЭСК, и молекулярной генетики. Разработанная ими методика позволила многим исследователям продвинуться вперёд в самых разных сферах биологии и медицины.

Соматические стволовые клетки – это клетки взрослого организма, которые присутствуют во всех органах и тканях. ЭСК способны реплицироваться, оставаясь недифференцированными в тече-



ние длительного времени, что для стволовых клеток из взрослых организмов невозможно. Стволовые клетки из взрослых организмов присутствуют во всех тканях и активируются при заболевании или повреждении ткани, они более дифференцированы, чем эмбриональные. В случае тяжелых повреждений в организме не хватает эндогенных стромальных клеток. Для устранения таких повреждений необходимо вырастить большое количество стромальных клеток, затем ввести их и с помощью специальных сигнальных веществ направить для восстановления поврежденных тканей. Стромальные стволовые клетки широко применяются для лечения ревматоидных заболеваний, в реконструктивной хирургии и ортопедии, в косметической хирургии, неврологии, кардиологии, диабетологии, в регенеративной медицине. Необходимость преодоления ограничений по использованию ЭСК привела к поиску альтернативных путей. В последние годы наметился значительный прогресс в области исследований соматических стволовых клеток. Преимущества их использования вместо эмбриональных очевидны: соматические стволовые клетки получают из тканей самого пациента, поэтому проблемы иммунологического отторжения не существует.

Стволовые клетки из дифференцированных (взрослых) тканей не вызывают образования тератом. Терапевтическое использование соматических стволовых клеток самого пациента, в отличие от эмбриональных стволовых клеток, не ставит серьезных этических вопросов.

Несмотря на некоторые преимущества соматических стволовых клеток, существует ряд проблем, связанных не только с их применением, но и получением:

- соматические стволовые клетки, в отличие от эмбриональных стволовых клеток, плохо растут в культуре и имеют ограничения в дифференцировке в другие типы клеток;
- несмотря на многочисленные публикации, пока не ясно, как долго можно поддерживать и коммитировать соматические стволовые клетки из дифференцированных тканей в зрелые клетки других тканей;
- использование стволовых клеток в регенеративной медицине сопряжено с проблемой их идентификации, поскольку не существует надежных маркеров, позволяющих достоверно определять соматические стволовые клетки в различных тканях.

### 1.7.3 Тканевые технологии

В современной трансплантологии в большинстве случаев используются донорские ткани и органы человека, из-за чего после трансплантации возникает ряд неизбежных осложнений. Хотя по сравнению с основным заболеванием они могут показаться незначительными, но все же некоторые из них доставляют определенные неудобства реципиенту. К ним можно отнести необходимость пожизненной **иммуносупрессии** – подавления иммунных реакций пациента для предотвращения или ослабления тканевой несовместимости (реакции «трансплантат против хозяина» и «хозяин против трансплантата») и опасность передачи пациенту инфекционных заболеваний вместе с пересаженными органами.

С учетом того, что имеется острый дефицит донорских органов, который, по-видимому, сохранится в ближайшие годы, учеными интенсивно разрабатывается новое самостоятельное междисциплинарное направление – тканевая инженерия. Основной задачей данного направления является выращивание тканей и целых органов посредством культивирования стволовых клеток и управления их дифференциацией в клетки различных видов соматической ткани. Источниками стволовых клеток являются не только недифференцированные зародышевые клетки, но и постоянно регенерирующиеся ткани взрослого человека. Например, стромальные (мезенхимальные) стволовые клетки выделяют из костного мозга, а стволовые клетки эпидермиса кожи берут из волосяных фолликулов – специализированных структур, ответственных за рост волос. При замене пораженных органов и тканей применяют принципы биологии и инженерии, с помощью которых поддерживают или улучшают функции органов и тканей. Отличие тканевой инженерии от стандартной терапии состоит в том, что сформированную ткань вводят в организм пациента с целью постоянного и специфического лечения болезни.

Принято считать, что работы в области тканевой инженерии ведут свой отсчет от пионерских исследований профессора Г. Грина (Гарвардская медицинская школа, США), который в 1975 г. предложил оригинальный способ культивирования и размножения клеток кожи человека *in vitro*. Ему удалось получить многослойные пласты

клеток, которые по своему строению были близки к нормальной коже человека, а именно ее эпидермису. В 1980 г. в США был получен патент на создание из коллагена и глюкозамингликана аналога кожи человека.

Хотя некоторые специалисты считают, что современная тканевая инженерия начала оформляться в самостоятельную дисциплину после работ Д. Уолтера и Ф. Мейера (1984), которые впервые предложили термин тканевая инженерия. Им удалось восстановить поврежденную роговицу глаза с помощью пластического материала, искусственно выращенного из клеток, взятых у пациента. Они использовали один из общих подходов, часто применяемых в настоящее время – использование клеток аутологичного типа. При трансплантации, кроме клеток аутологичного типа, используются клетки аллогенного типа, полученные от особи того же биологического вида, и ксеногенного типа, полученные от особи другого биологического вида. Указанные типы клеток заметно отличаются по основной характеристике – иммунологической совместимости.

Возможность гистотипического восстановления поврежденных тканей и органов представляет значительный интерес. Современные методы изоляции клеток и подходы к их культивированию предполагают использование как специализированных зрелых клеток, так и их предшественников на любых этапах дифференцировки. Многообещающие перспективы развития тканевой инженерии связаны с возможностью использования в качестве исходного материала не только ксено- и аллогенных источников, но и аутогенных клеток. При этом выделенные стволовые клетки можно имплантировать пациенту в виде суспензии или в структурном матриксе, или после коммитирования их *in vitro*. Такой подход в самом ближайшем будущем может стать реальной альтернативой классической трансплантологии.

Перспективы применения клеточных технологий во многих областях медицины, включая трансплантацию органов, испытание лекарственных препаратов, лечение и восстановление поврежденных тканей, очень заманчивы, но до начала полного использования потенциала клеточных технологий необходимо разрешить следующие проблемы:

- стволовые клетки должны быть доступны в достаточных количествах;
- дифференциация стволовых клеток должна быть строго направленной и специфичной;
- стволовые клетки должны быть жизнеспособны в организме реципиента;
- после трансплантации стволовые клетки должны быть способны интегрироваться в ткани реципиента;
- трансплантант должен функционировать в течение всей жизни реципиента;
- трансплантация не должна наносить какого-либо вреда реципиенту (включая иммунную реакцию отторжения). В настоящее время тканевая инженерия является самостоятельным бурно развивающимся междисциплинарным направлением в биотехнологии.

### 1.7.4 Трансгенные животные. Клонирование

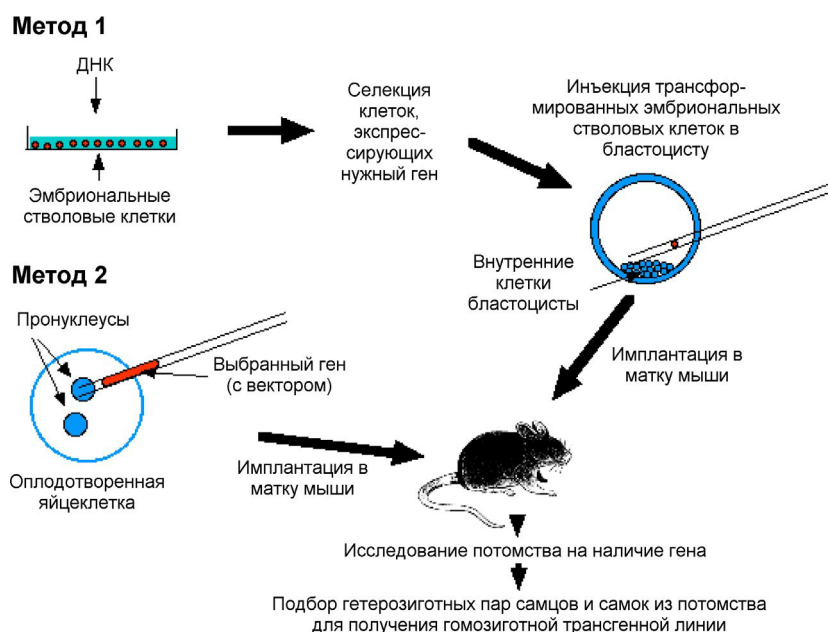
Выдающимся достижением современной генетики является создание способов направленной модификации геномов животных, растений и микроорганизмов. Имеется в виду направленное воздействие на геном – изменение структуры генов, введение в геном чужеродных генов в виде природных или искусственно созданных генных конструкций, а также конструирование новых, не существовавших в природе геномов. В 1982 г. создан Международный центр по генной инженерии и биотехнологии, объединяющий 32 государства. Исследования были начаты с трансгенеза, т.е. с переноса генов из одного организма в другой.

Главным достижением генетической инженерии является создание способов модификации геномов животных. Речь идет о направленном изменении структуры генов животного или введении в геном чужеродных природных и искусственных генов, то есть о направленном конструировании новых геномов. Для выполнения этой процедуры оплодотворенные яйцеклетки выделяют из яйцевода животного и с использованием микроманипулятора вводят ДНК (рис. 19). Введенная таким способом экзогенная ДНК способна интегрироваться в геном реципиента случайным образом и зачастую в виде множества копий. Вследствие этого экспрессия одного и того же трансгена может варьировать в широких пределах, от полного ее отсутствия до уровня, превышающего экспрессию аутентичного гена. Тем не менее этот метод активно используется для получения как лабораторных, так и сельскохозяйственных трансгенных животных.

В последующем техника введения чужеродной ДНК в геном животных усовершенствовалась так, что стало возможным вводить ДНК направленно в конкретную часть генома. Основой этой технологии послужило использование ЭСК (рис. 19).

Известно, что они сохраняют высокие плюрипотентные свойства при длительном культивировании *in vitro* и, будучи вновь введенными в эмбрион, способны формировать химеры. Эта уникальная способность ЭСК открыла широкие возможности для манипуляции с их генами. Адресное введение гена достигается благодаря возможности рекомбинации между экзогенной ДНК и ДНК реципиента. В результате

этого происходит адресное встраивание гена в ДНК-мишень ЭСК. После этого ЭСК внедряют в бластоцисту животных на ранних стадиях развития.



*Рисунок 19 – Технология получения трансгенных животных*

В результате трансгенные эмбриональные стволовые клетки принимают участие в формировании тканей развивающегося плода, который представляет собой химеру. У химерных животных до 50 % клеток составляют клетки-потомки введенных трансгенных ЭСК. Показано, что они присутствуют во всех тканях, в том числе и в зародышевом пути.

В ЭСК гены вводят с помощью ретровирусов, электропорации, липосом в виде “голой” плазмидной ДНК, в виде искусственных конструкций на основе полисахаридов и др. К настоящему времени получено более 2000 трансгенных мышей, в геноме которых находятся различные введенные генетические конструкции. Получены трансгенные козы, овцы, свиньи, коровы и другие сельскохозяйственные животные.

**Клонирование** – процесс создания клонов. Клонами в биологии называют организмы, имеющие совершенно одинаковый генотип, т.е. набор генов.

В комбинации с методами трансгенеза клонирование открывает



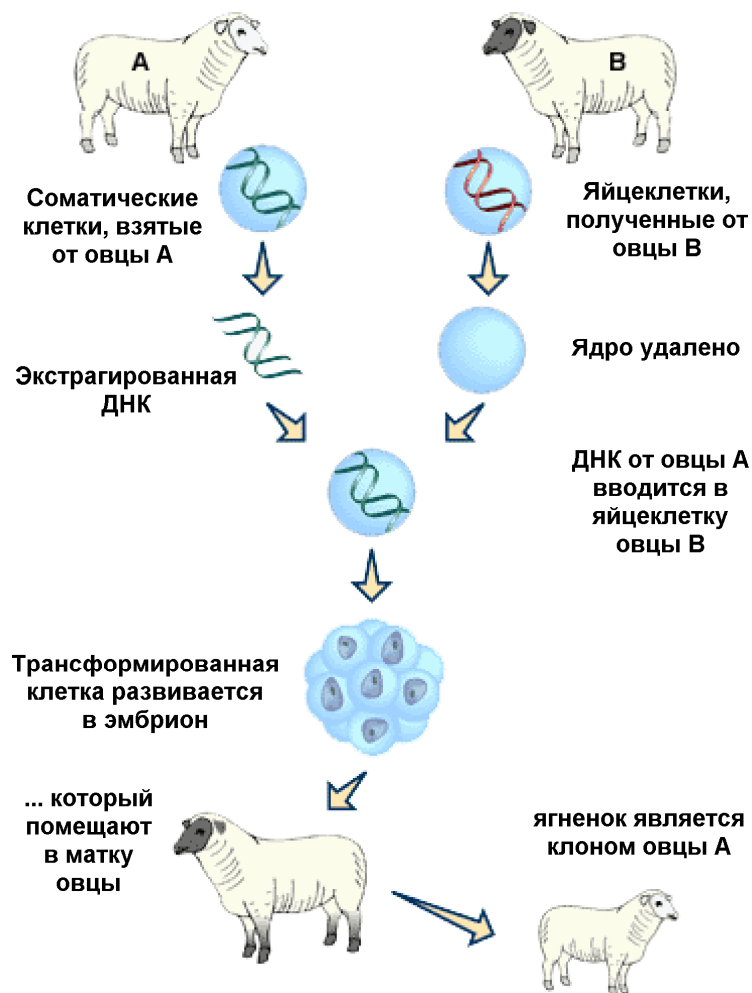
огромные возможности для генетической модификации геномов микроорганизмов, растений и животных. В процессе клонирования достигается воспроизведение того или иного живого объекта в каком-то количестве копий. Для генетиков растений получение клонов не составляет никаких проблем. Апомиксис – не что иное, как специфический способ размножения, позволяющий получать генетические копии материнского организма.

Генетики животных получают клоны, если животные размножаются партеногенезом, то есть бесполым путем, без предшествующего оплодотворения. Получают клоны и в экспериментальной эмбриологии. Если зародыш морского ежа на ранней стадии дробления разделить на составляющие его клетки – бластомеры, то из каждого бластомера разовьется целый организм. У человека известны случаи своеобразного естественного клонирования. Это так называемые однайцевые близнецы, которые возникают сравнительно редко из-за деления оплодотворенной яйцеклетки на два бластомера, каждый из которых потом развивается самостоятельно.

Новая страница в модификации геномов животных – это клонирование, основанное на переносе в энуклеированную яйцеклетку ядер соматических клеток, т. е. замене генома созревающей яйцеклетки на геном, взятый от другого животного.

История клонирования животных началась в 40-х гг. с исследований российского ученого Г. Лопашова, который разработал метод пересадки ядер в яйцеклетку лягушки. В результате развития такие модифицированные яйцеклетки превращались во взрослых особи, точные копии лягушки, от которой взяты ядра соматических клеток. Затем были получены клоны мышей, однако опыты воспроизвести не удалось. В настоящее время проведен ряд опытов по успешному получению клонов мышей.

В 1997 г. появилось сообщение о том, что в Эдинбурге (Шотландия) разработан эффективный метод клонирования млекопитающих и на его основе получена овечка Долли. Схема эксперимента представлена на рис. 20.



*Рисунок 20 – Схема клонирования, примененная при получении овцы Долли*

Ооциты были извлечены из овец породы Шотландская черномордая и помещены в культуральную среду, после чего на них была проведена операция энуклеации – удаления клеточного ядра. Ядро соматической клетки взяли для трансплантации из молочной железы лактирующей овцы, слили с энуклеированной яйцеклеткой и получили модифицированную яйцеклетку. Затем активировали её деление электрическим током и после культивирования в течение



6 дней в питательной среде трансплантировали в матку овцы – суррогатной матери. Из 236 опытов успешным оказался один, в результате которого и появилась Долли.

Эти работы, безусловно, являются выдающимся достижением молекулярной генетики, поэтому можно сделать заключение, что техническая задача получения клонов животных и человека решена, остается решить только этические проблемы.

## ЧАСТЬ 2 МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ДЛЯ ВЫПОЛНЕНИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ

### Лабораторная работа №1

#### Биотехнология. Определение, этапы развития. Цели и задачи биотехнологии

**Цель работы:** ознакомиться с основными направлениями и стадиями биотехнологического производства. Изучить основные объекты биотехнологии.

**Порядок выполнения лабораторной работы:**

1. Законспектируйте основные понятия.
2. Ответьте на контрольные вопросы.

**Биотехнология** – это наука, разрабатывающая способы производства практически важных веществ и продуктов питания с использованием живых организмов и методы конструирования новых организмов с заданными свойствами. Биотехнология – междисциплинарная область, возникшая на стыке биологических, химических и технических наук.

Современная биотехнология использует достижения наук биологического цикла, так как базируется на глубоком знании характеристик микроорганизмов, их строении, физиологии, биохимии, генетике, взаимоотношениях в ассоциациях.

На развитие биотехнологии непосредственно влияют химия, физика, математика, механика, которые связаны с кинетикой процессов, влиянием на процессы различных внешних факторов, массовым и энергопереносом. Успехи машиностроения, электроники, автоматики позволили создать новую аппаратуру и автоматизировать биотехнологические процессы.

Связь с экономическими науками обусловлена постоянной конкуренцией с альтернативными технологиями (химической, сельскохозяйственной).

**Основные направления в биотехнологии:**

1. *Создание новых биологически активных веществ и лекарственных препаратов для медицины.*

**Антибиотики** – специфические продукты жизнедеятельности, обладающие высокой физиологической активностью по отношению к определенным группам микроорганизмов и к злокачественным опухолям, избирательно задерживающие их рост или полностью подавляющие развитие. Всего известно около 5000 антибиотиков, но не все из них допущены для применения в медицине. Это связано с токсичностью существующих антибиотиков, аллергическими реакциями, вызываемыми ими, нарастанием устойчивости патогенных микроорганизмов к применяемым препаратам и др. Поэтому происходит поиск новых антибиотиков по средствам испытания новых продуцентов, химической модификации, клеточной и генетической инженерии.

**Гормоны.** Биотехнология предоставляет медицине новые пути получения ценных гормональных препаратов. Раньше гормоны получали из органов и тканей животных и человека. Требовалось много материала для получения небольшого количества продукта. В настоящее время с применением генноинженерных штаммов получают гормон роста (соматотропин), инсулин (регулирует уровень глюкозы в крови), кортизон (гормон надпочечников) и другие гормоны. Это позволяет снизить стоимость препаратов и получать их в больших количествах.

**Интерфероны** – выделяются клетками человека и животных в ответ на инфицирование вирусами. Они обладают противовирусной активностью. До введения методов генной инженерии интерфероны получали из донорской крови – до 1 мкг неочищенного интерферона из 1 л крови, т.е. примерно одну дозу для инъекции. В настоящее время интерфероны успешно получают с применением генноинженерных штаммов *Escherichia coli*, дрожжей, культивируемых клеток насекомых и млекопитающих. Интерфероны используются для лечения болезней, вызываемых вирусами герпеса, гепатитов и др.

**Рекомбинантные вакцины и вакцины-антигены.** Вакцинация – один из основных способов борьбы с инфекционными заболеваниями. Путем всеобщей вакцинации ликвидирована натуральная оспа, ограничено распространение бешенства, полиомиелита, желтой лихорадки. Большое экономическое значение имеет разработка вакцин против болезней сельскохозяйственных животных (нпр,

ящура). Традиционные вакцинные препараты изготавливают на основе ослабленных или инактивированных возбудителей болезней. Современные биотехнологические разработки предусматривают создание рекомбинантных вакцин и вакцин-антигенов. Вакцины обоих типов основаны на генноинженерном подходе.

**Ферменты медицинского назначения.** Многообразно применение ферментных препаратов в медицине. Их используют для растворения тромбов, лечения наследственных заболеваний, освобождения организма от токсических веществ и др.

*2. Создание микробиологических средств защиты растений от болезней и вредителей, бактериальных удобрений, новых высокопродуктивных сортов и гибридов сельскохозяйственных растений.*

Биотехнологические пути защиты растений от болезней и вредителей включают: выведение сортов растений, устойчивых к неблагоприятным факторам; химические средства борьбы с сорняками, грызунами, насекомыми, фитопатогенными грибами, бактериями, вирусами; биологические средства борьбы с вредителями, использование их естественных врагов и паразитов, а также токсических продуктов, образуемых живыми организмами.

*3. Создание ценных кормовых добавок для повышения продуктивности животноводства.* Для повышения продуктивности животных нужен полноценный корм. Биотехнологическая промышленность выпускает кормовой белок на базе различных микроорганизмов – бактерий, грибов, дрожжей, водорослей. Богатая белками биомасса микроорганизмов с высокой эффективностью усваивается сельскохозяйственными животными. Большое значение для животноводства имеет обогащение растительных кормов микробным белком. Для этого широко используются твердофазные процессы.

*4. Создание новых технологий получения хозяйственно ценных продуктов для использования в пищевых и других отраслях промышленности.*

**Аминокислоты** (цистеин, метионин, лизин, глутамат) – повышение питательной ценности пищи, усиление аромата мясных, рыбных, грибных изделий.

**Олигопептиды** (аспартам, тауматин, монеллин) – низкокалорийные, очень сладкие вещества.

### **Ферменты:**

- $\beta$ -Галактозидаза - производство безлактозного молока, освобождение молочной сыворотки от лактозы, приготовление мороженого;
- микробные протеазы – сыроварение, ускорение созревания теста, производство крекеров;
- фицин, трипсин, бромеланин – ускорение маринования рыбы, удаление мяса с костей;
- липазы – придание специфического аромата сыру, шоколаду, молочным продуктам, улучшение качества взбитых белков;
- глюкозооксидаза в сочетании с каталазой – удаление кислорода из сухого молока, кофе, пива, майонеза, лимонных, апельсиновых и виноградных соков.

**Витамины** (А, В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, В<sub>6</sub>, В<sub>12</sub>, С, D, Е) – повышение питательной ценности пищевых продуктов, антиоксиданты.

**Органические кислоты** (уксусная, бензойная, молочная, глюконовая, лимонная) – консерванты, ароматизаторы.

*5. Создание эффективной технологии переработки и очистки промышленных и бытовых отходов.*

Важной составной частью современной биотехнологии является очистка воды от загрязнений, а также утилизация различных промышленных и бытовых отходов.

### ***Контрольные вопросы***

1. Что такое биотехнология?
2. В чем заключается взаимосвязь биотехнологии с другими науками?
3. Каковы основные направления развития биотехнологии?
4. Сравните, что отличает современную биотехнологию в ее историческом развитии.
5. Приведите примеры биотехнологических производств.
6. Расшифруйте, что понимают под терминами «агенты» и «процессы» в биотехнологии.
7. Представьте на конкретных примерах возможности воздействия на живую природу для получения продуктов биотехнологии.

## **Лабораторная работа №2**

### **Объекты и методы биотехнологии**

**Цель работы:** изучить основные объекты и методы биотехнологии.

**Порядок выполнения лабораторной работы:**

1. Законспектируйте основные понятия.
3. Начертите схему (рис. 1).
4. Сделайте обозначения.
5. Ответьте на контрольные вопросы.

**Биообъект** – центральный и обязательный элемент биотехнологического производства, создающий его специфику.

Биообъектом может быть целостный сохранивший жизнеспособность многоклеточный или одноклеточный организм. Им могут являться изолированные клетки многоклеточного организма, а также вирусы и выделенные из клеток мультиферментные комплексы, включенные в определенный метаболический процесс. Наконец, биообъектом может быть индивидуальный изолированный фермент.

**Функция биообъекта** – полный биосинтез целевого продукта, включающий ряд последовательных ферментативных реакций или катализ лишь одной ферментативной реакции, которая имеет ключевое значение для получения целевого продукта.

Биообъект, осуществляющий полный биосинтез целевого продукта, называется продуцентом. Биообъект, являющийся индивидуальным ферментом или выполняющий функцию одной ферментативной реакции, используемой биотехнологом, называют промышленным катализатором.

Таким образом, к биообъектам относятся как макромолекулы, так и микро- и макроорганизмы.

В качестве макромолекул в промышленном производстве используются ферменты всех известных классов, но наиболее часто – гидролазы и трансферазы. Доказано, что использование ферментов в производстве в иммобилизованном виде, то есть связанных с нерастворимым носителем, наиболее рационально, так как в этом

случае обеспечиваются многократность их применения и стандартность повторяющихся производственных циклов.

Как биообъекты микробные клетки прокариот и эукариот в современном биотехнологическом производстве занимают доминирующее положение. Они являются продуцентами используемых в качестве лекарственных средств первичных метаболитов; аминокислот, азотистых оснований, коферментов, моно- и дисахаров, ферментов медицинского назначения, применяемых в заместительной терапии и т.д. Микроорганизмы образуют огромное количество вторичных метаболитов, многие из которых нашли применение, например, антибиотики и другие корректоры гомеостаза клеток млекопитающих.

Традиционными поставщиками лекарственных и диагностических средств являются представители животного мира. Довольно часто в качестве биообъектов выступают млекопитающие, птицы, рептилии, амфибии, членистоногие, рыбы, моллюски. Разнообразие образуемых ими биологически активных соединений, нашедших применение в медицине, крайне велико.

В последние годы в связи с развитием технологии рекомбинантной ДНК стремительно возрастает важность такого биообъекта, как человек, хотя на первый взгляд, это кажется парадоксальным. В принципе, человек уже давно мог быть отнесен к биообъектам, например, при получении гомологичной антисыворотки или в случае использования тканей и органов человека для их пересадки, например, костного мозга, почек и т.д.

Процессы биотехнологических производств разнообразны, но все они имеют пять общих основных стадий, которые различаются по целям и принципам их достижения. Общая биотехнологическая схема производства продуктов микробного синтеза приведена на рис. 21.

**1) Получение посевного материала.** Посевной материал представляет собой чистую культуру микроорганизмов-продуцентов, размноженную в лабораторных условиях при оптимальном составе питательной среды и режиме выращивания. Культуры микроорганизмов-продуцентов заводы получают из коллекций в пробирках на агаризованных питательных средах или в ампу-

лах. Чистая культура микроорганизма может постоянно или по мере необходимости использоваться в производстве.

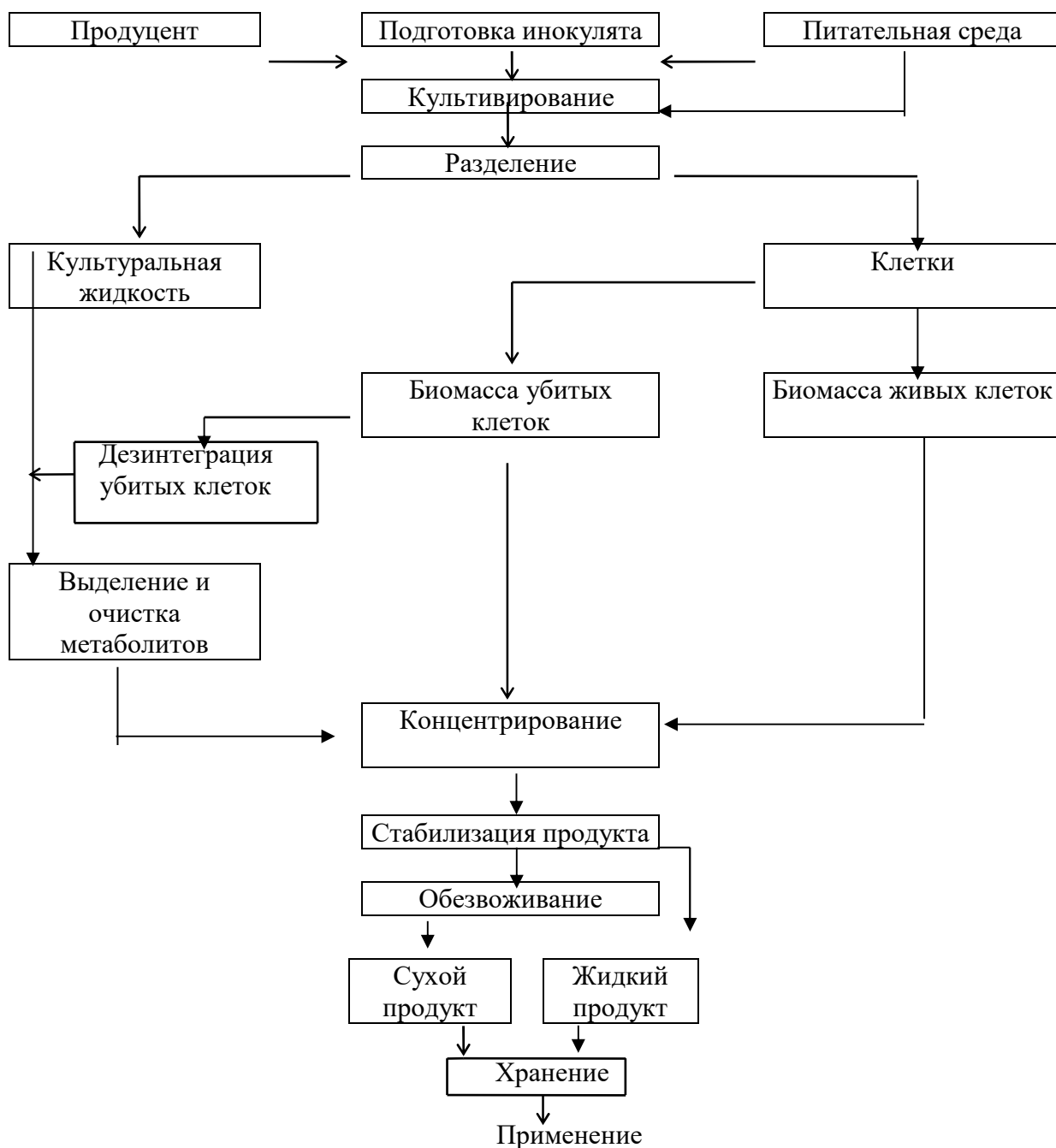


Рисунок 21 – Биотехнологическая схема производства продуктов микробного синтеза

Сначала культуру размножают в лаборатории, затем в цехе чистых культур и инокуляции, далее направляют на культивирова-



ние.

**2) Приготовление питательной среды** – включает смешивание компонентов и стерилизацию. Основу питательных сред для культивирования микроорганизмов составляют источники углерода. Существуют микроорганизмы, способные потреблять углерод только из высокомолекулярных соединений, например белков и пептидов, в то же время многие бактерии и дрожжи утилизируют простейшие углеродосодержащие соединения - метан, этанол, углекислоту. Кроме углерода клетки микроорганизмов нуждаются в источниках азота, фосфора, макро- и микроэлементов.

Вещества этого рода находятся в питательных средах в виде солей, в некоторых случаях азот и фосфор могут усваиваться из органических источников, например автолизатов и гидролизатов микробного или животного происхождения.

Смешивание питательных веществ проводится в реакторах с мешалкой. Растворимые компоненты среды предварительно растворяют в воде. Нерастворимые компоненты (например, кукурузную, соевую муку, мел) – суспензируют. Составление среды считается завершенным, если в результате произведено тщательное измельчение ее твердых компонентов.

Завершающий этап приготовления питательной среды – стерилизация. Наиболее широкое распространение получила термическая стерилизация. Важнейшей проблемой при этом является сохранение питательных свойств среды, так как большинство субстратов, особенно углеводы, оказываются термически нестабильными. Некоторые субстраты не требуют стерилизации, так как сами обладают асептическим действием: метанол, этанол, уксусная кислота и др.

**3) Ферментация** (культивирование) – это вся совокупность последовательных операций от внесения в заранее приготовленную и стерилизованную питательную среду инокулята (посевного материала) до завершения процессов роста и биосинтеза вследствие истощения питательных веществ среды. Существует два типа ферментаций: получение биомассы микроорганизмов и получение ценных веществ, возникающих в ходе роста или на последующих стадиях развития культуры.

**4) Выделение целевого продукта.** Стадия выделения и очистки продукта существенно зависит от того, накапливается продукт в клетках или он выделяется в культуральную жидкость, или же продуктом является сама клеточная масса. Разделение биомассы и культуральной жидкости - сепарация - осуществляется несколькими методами (флотация, фильтрация, центрифугирование). Если целевой продукт содержится в самих клетках, то проводят разрушение клеток – дезинтеграцию – физическими, химическими и химико-ферментативными способами.

Выделение продукта из культуральной жидкости или гомогената разрушенных клеток проводят путем его осаждения, экстракции или адсорбции. Затем выделенный продукт концентрируют ультрафильтрацией, выпариванием или обратным осмосом. После стабилизации продукта в зависимости от того, каким должен быть конечный продукт: сухим или жидким, его обезвоживают или сразу упаковывают и отправляют на хранение и далее - потребителю.

#### ***Контрольные вопросы***

1. Перечислите основные стадии биотехнологического производства.
2. Что такое посевной материал?
3. Как готовят посевной материал в производственных условиях?
4. Какие компоненты входят в состав питательных сред?
5. Что такое ферментация?
6. Какими методами осуществляется разделение биомассы от культуральной жидкости?
7. В каком случае необходима дезинтеграция клеток?
8. Какие способы концентрирования продукта Вам известны?

## **Лабораторная работа №3**

### **Строение микробной клетки. Основные элементы клетки**

**Цель работы:** изучить прокариотическую бактериальную клетку и эукариотическую животную клетку.

#### **Порядок выполнения лабораторной работы**

1. Законспектировать основные понятия.
2. Зарисовать строение прокариотической и эукариотической клеток.

Все живые организмы делятся на две основные группы: прокариоты и эукариоты. В основе этой классификации лежат многочисленные структурные различия, из них наиболее основными являются:

- 1) наличие или отсутствие ядра, содержащего хромосомную ДНК;
- 2) строение и химический состав клеточной стенки;
- 3) наличие или отсутствие субклеточных цитоплазматических органелл.

В прокариотической клетке, например бактериальной, хромосомная ДНК находится непосредственно в цитоплазме, клетка окружена ригидной клеточной стенкой, в состав которой часто входит пептидогликан, но не хитин или целлюлоза; в клетке нет субклеточных цитоплазматических органелл. В эукариотической клетке имеется ядро, отделенное от цитоплазмы ядерной мембраной, хромосомная ДНК находится в ядре; клеточная стенка, если она есть, может содержать хитин или целлюлозу, но не пептидогликан; в цитоплазме содержатся различные субклеточные органеллы (митохондрии, аппарат Гольджи, хлоропласт в клетках растений) (рис. 2).

**Бактерия *Escherichia coli*** – один из наиболее хорошо изученных организмов. За последние пятьдесят лет удалось получить исчерпывающую информацию о ее генетике, молекулярной биологии, биохимии, физиологии и общей биологии. Это грамотрицательная непатогенная подвижная палочка длиной менее 1 мкм. Ее средой обитания является кишечник человека, но она также может высеваться из почвы и воды. Благодаря способности размножаться про-

стым делением на средах, содержащих только ионы  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$  и  $\text{SO}_4^{2-}$ , микроэлементы и источник углерода (например, глюкозу), *E. coli* стала излюбленным объектом научных исследований. При культивировании *E. coli* на обогащенных жидких питательных средах, содержащих аминокислоты, витамины, соли, микроэлементы и источник углерода, время генерации (т. е. время между образованием бактерии и ее делением) в логарифмической фазе роста при температуре  $37^\circ\text{C}$  составляет примерно 22 мин.

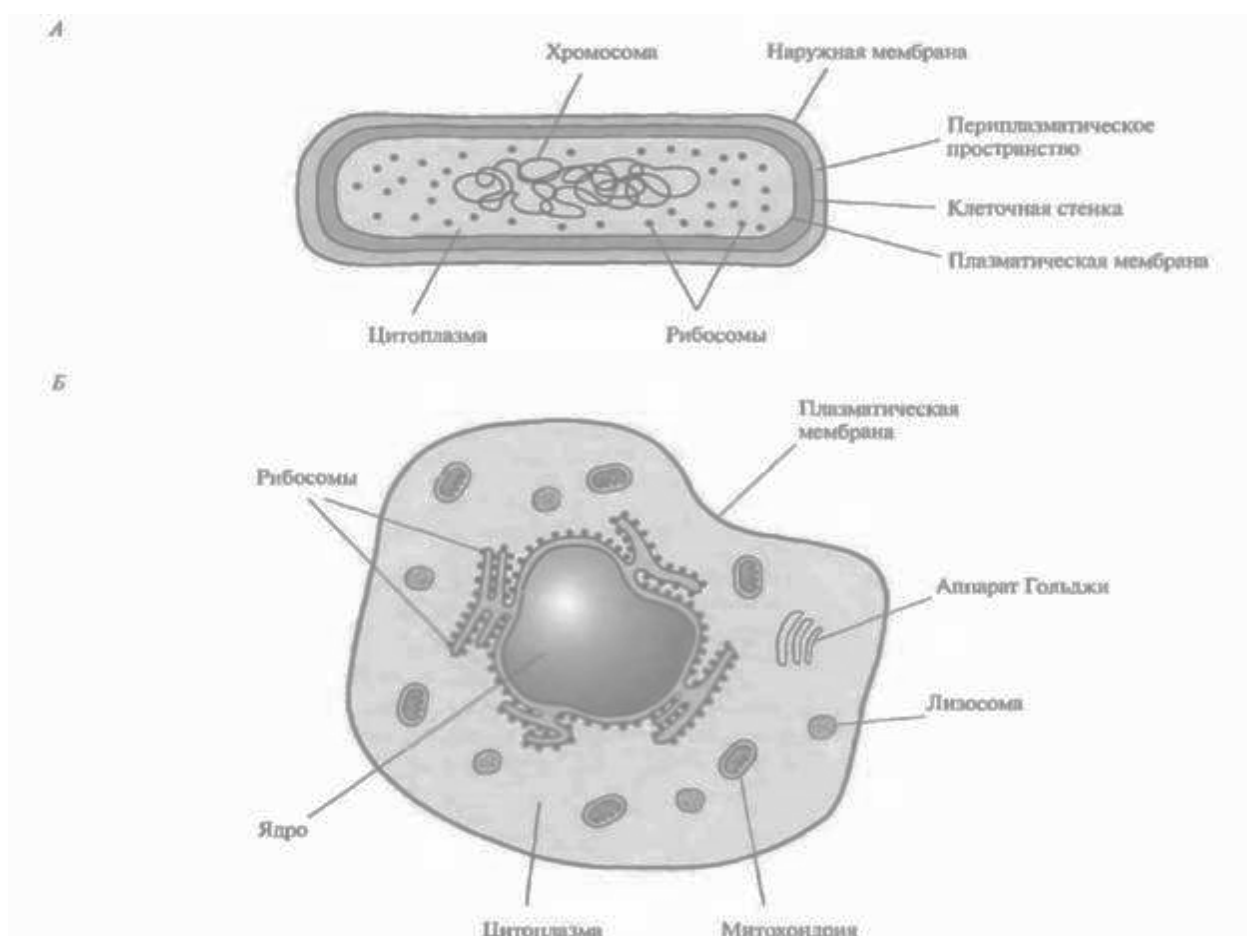


Рисунок 22 – Схематическое представление прокариотической бактериальной клетки (А) и эукариотической животной клетки (Б)

Для каждого живого организма существует определенный температурный интервал, оптимальный для его роста и размножения. При слишком высоких температурах происходит денатурация бел-

ков и разрушение других важных клеточных компонентов, что ведет к гибели клетки. При низких температурах биологические процессы существенно замедляются или останавливаются совсем вследствие структурных изменений, которые претерпевают белковые молекулы. Исходя из температурного режима, который предпочитают те или иные микроорганизмы, их можно подразделить на термофилы (от 45 до 90 °C и выше), мезофилы (от 10 до 47 °C) и психрофилы, или психротрофы (от -5 до 35 °C). Микроорганизмы, активно размножающиеся лишь в определенном диапазоне температур, могут быть полезным инструментом для решения различных биотехнологических задач.

Например, термофилы часто служат источником генов, кодирующих термостабильные ферменты, которые применяются в промышленных или в лабораторных процессах, а генетически видоизмененные психротрофы используют для биodeградации токсичных отходов, содержащихся в почве и воде, при пониженных температурах. *E. coli* можно культивировать как в аэробных (в присутствии кислорода), так и в анаэробных (без кислорода) условиях. Однако для оптимальной продукции рекомбинантных белков *E. coli* и другие микроорганизмы обычно выращивают в аэробных условиях. Если целью культивирования бактерий в лаборатории является синтез и выделение определенного белка, то культуры выращивают на сложных жидких питательных средах в колбах. Для поддержания нужной температуры и обеспечения достаточной аэрации культуральной среды колбы помещают в водяную баню или термостатируемую комнату и непрерывно встряхивают. Такой аэрации достаточно для размножения клеток, но не всегда для синтеза белка. Рост клеточной массы и продукция белка лимитируются не содержанием в питательной среде источников углерода или азота, а содержанием растворенного кислорода: при 20 °C оно равно примерно девяти миллионным долям. Это становится особенно важно при промышленном получении рекомбинантных белков с помощью микроорганизмов. Для обеспечения условий, оптимальных для максимальной продукции белков, конструируют специальные ферментеры и создают системы аэрации.

**Дрожжи** *Saccharomyces cerevisiae* – это непатогенные одноклеточные микроорганизмы с диаметром клетки примерно 5 мкм, которые во многих отношениях представляют собой эукариотический аналог *E. coli*. Их генетика, молекулярная биология и метаболизм детально изучены. *S. cerevisiae* размножаются почкованием и хорошо растут на такой же простой среде, как и *E. coli*. Их способность к превращению сахара в этанол и углекислый газ издавна использовалась для изготовления алкогольных напитков и хлеба. В настоящее время ежегодно во всем мире расходуется более 1 млн. тонн *S. cerevisiae*. Дрожжи *S. cerevisiae* представляют также большой научный интерес. В частности, они являются наиболее удобной моделью для исследования других эукариот, в том числе человека, поскольку многие гены, ответственные за регуляцию клеточного деления *S. cerevisiae*, сходны с таковыми у человека. Это открытие способствовало идентификации и характеристике генов человека, отвечающих за развитие новообразований. Широко используемая генетическая система дрожжей (искусственная хромосома) является неизменным участником всех исследований по изучению ДНК человека.

Синтезированный бактериальной клеткой эукариотический белок часто приходится подвергать ферментативной модификации, присоединяя к белковой молекуле низкомолекулярные соединения – во многих случаях это необходимо для правильного функционирования белка. К сожалению, *E. coli* и другие прокариоты не способны осуществлять эти модификации, поэтому для получения полноценных эукариотических белков используют *S. cerevisiae*, а также другие виды дрожжей: *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces diastaticus*, *Schizisaccharomyces pombe*, *Yarrowia lipolytica*, *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*. Наиболее эффективными продуцентами полноценных рекомбинантных белков являются *P. pastoris* и *H. polymorpha*.

При всех различиях между типами эукариот методические подходы к культивированию клеток насекомых, растений и млекопитающих имеют много общего. Сначала берут небольшой кусочек ткани данного организма и обрабатывают его протеолитическими ферментами, расщепляющими белки межклеточного материала (при работе с растительными клетками добавляют специальные ферменты,

разрушающие клеточную стенку). Высвободившиеся клетки помещают в сложную питательную среду, содержащую аминокислоты, антибиотики, витамины, соли, глюкозу и факторы роста. В этих условиях клетки делятся до тех пор, пока на стенках емкости с культурой не образуется клеточный монослой. Если после этого не перенести клетки в емкости со свежей питательной средой, то рост прекратится. Обычно удается переносить (перевивать, субкультивировать) и поддерживать до 50-100 клеточных генераций исходной (первичной) клеточной культуры, затем клетки начинают терять способность к делению и гибнут.

Часто некоторые клетки перевиваемых первичных клеточных культур претерпевают генетические изменения, в результате которых ускоряется их рост. Культуры клеток, которые при этом приобретают селективные преимущества, оказываются способными к неограниченному росту *in vitro* и называются устойчивыми клеточными линиями. Одни клеточные линии сохраняют основные биохимические свойства исходных клеток, другие нет. У большинства клеток, способных к неограниченному росту, имеются значительные хромосомные изменения, в частности отмечается увеличение числа одних хромосом и потеря других. В молекулярной биотехнологии устойчивые клеточные линии иногда используют для размножения вирусов и для выявления белков, которые кодируются клонированными последовательностями ДНК. Кроме того, они применяются для крупномасштабного производства вакцин и рекомбинантных белков.

### ***Контрольные вопросы***

1. Кто такие прокариоты?
2. Кто такие эукариоты?
3. Перечислите основные свойства *Escherichia coli*.
4. Что означает термин «грамотрицательный»?
5. Перечислите основные свойства *Saccharomyces cerevisiae*.

## **Лабораторная работа №4**

### **Химический состав бактериальной клетки. Метаболизм бактерий. Брожение и дыхание. Рост и размножение микроорганизмов (занятие 4-х часовое)**

**Цель занятия:** познакомиться с динамикой биохимических процессов в микробной клетке. Усвоить понятия, связанные с различными сторонами метаболизма.

**Порядок выполнения лабораторной работы:**

1. Законспектируйте основные понятия.
2. Начертите схему (рис. 23 и график, отражающий этапы развития культуры (рис. 3)). Сделайте обозначения.
3. Заполните таблицу 1.
4. Ответьте на контрольные вопросы.

Бактериальная клетка на 80-90% состоит из воды и только 10% приходится на долю сухого вещества. Вода в клетке находится в свободном или связанном состоянии. Она выполняет механическую роль в обеспечении тургора, участвует в гидролитических реакциях. Удаление воды из клетки путем высушивания приводит к приостановке процессов метаболизма, прекращению размножения, а для многих микроорганизмов губительно. В то же время особый способ высушивания микроорганизмов в вакууме из замороженного состояния (лиофилизация) обеспечивает сохранение жизнеспособности большинства микроорганизмов. Лиофилизация используется для приготовления проб, пригодных для длительного хранения.

В сухом веществе бактерий 52% составляют белки, 17% - углеводы, 9% - липиды, 16% - РНК, 3% - ДНК и 3% - минеральные вещества.

**Белки** являются ферментами, а также составной частью клетки, входят в состав цитоплазматической мембраны (ЦПМ) и ее производных, клеточной стенки, жгутиков, спор и некоторых капсул. Некоторые бактериальные белки являются антигенами и токсинами бактерий. В состав белков бактерий входят отсутствующие у человека D-аминокислоты, а также диаминопимелиновая кислота.



**Углеводы** представлены в бактериальной клетке в виде моно-, ди-, олигосахаров и полисахаридов, а также входят в состав комплексных соединений с белками, липидами и другими соединениями. Полисахариды входят в состав некоторых капсул, клеточной стенки; крахмал и гликоген являются запасными питательными веществами. Некоторые полисахариды принимают участие в формировании антигенов.

**Липиды** или **жиры** входят в состав ЦПМ и ее производных, клеточной стенки грамотрицательных бактерий, а также служат запасными веществами, входят в состав эндотоксина грамотрицательных бактерий, в составе ЛПС формируют антигены. В бактериальных жирах преобладают длинноцепочечные (C14-C18) насыщенные жирные кислоты и ненасыщенные жирные кислоты, содержащие одну двойную связь. Сложные липиды представлены фосфатидилинозитом, фосфатидилглицерином и фосфатидилэтаноламином. У некоторых бактерий в клетке находятся воски, эфиры миколовой кислоты. Микоплазмы - единственные представители царства Procaruotae, имеющие в составе ЦПМ стеролы. Остальные бактерии в составе ЦПМ и ее производных не имеют стеролов.

В бактериальной клетке присутствуют все типы РНК: иРНК, транспортная РНК (тРНК), рРНК, менее известная антисенсРНК (асРНК). Молекулы асРНК пока не обнаружены в клетках эукариот. Информация об асРНК записана в хромосоме, в так называемых антисенс-генах. АсРНК принимает активное участие в регуляции различных клеточных процессов, в том числе репликации ДНК бактерий, вирусов, плазмид и транспозонов. асРНК представляет собой короткую молекулу, комплементарную определенному участку иРНК, и, соединяясь с ней, блокирует процесс синтеза белка. При этом в клетке подобные комплексы могут накапливаться, и при диссоциации асРНК и иРНК одновременно начинается синтез белка на большом числе однотипных. Искусственные молекулы асРНК пытаются использовать для борьбы с бактериями за счет угнетения ими синтеза в клетке определенных жизненно важных белков.

Пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды – это те строительные блоки, из которых синтезируются нуклеиновые кислоты. Кроме того, пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды входят в состав

многих коферментов и служат для активации и переноса аминокислот, моносахаров, органических кислот.

Бактерии, обладающие окислительным метаболизмом, энергию получают путем дыхания. **Дыхание** – процесс получения энергии в реакциях окисления-восстановления, сопряженных с реакциями окислительного фосфорилирования, при котором донорами электронов могут быть органические (у органотрофов) и неорганические (у литотрофов) соединения, а акцептором - только неорганические соединения. Схема обмена веществ у бактерии представлена на рисунке 23.

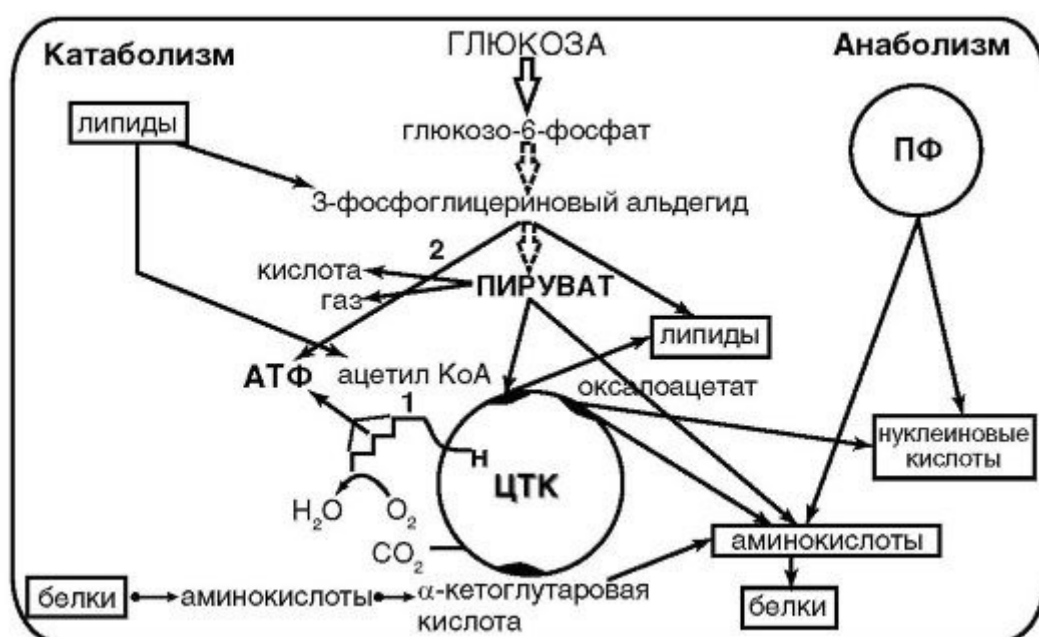


Рисунок 23 – Схема обмена веществ у бактерий

У бактерий, обладающих окислительным метаболизмом, акцептором электронов (или водорода [H<sup>+</sup>]) является молекулярный кислород. В этом случае пируват полностью окисляется в цикле трикарбоновых кислот до CO<sub>2</sub>. Цикл трикарбоновых кислот выполняет функции поставщика как предшественников для биосинтетических процессов, так и атомов водорода, который в форме восстановленного НАД переносится на молекулярный кислород через серию переносчиков, обладающих сложной структурно оформленной мультиферментной системой - дыхательной цепью. Дыхательная цепь у бактерий локализована в ЦПМ и во внутриклеточных мем-

бренных структурах. Типичная цепь выглядит следующим образом: ЦТК → НАД(Н<sub>2</sub>) → флавопротеид → хинон → цитохромы: b c a → O<sub>2</sub>.

Конечным этапом переноса электронов (протонов) по дыхательной цепи является восстановление цитохромов a + a<sub>3</sub> (цитохромоксидазы). Цитохромоксидаза является конечной оксидазой, передающей электроны на кислород. Образующиеся при окислении ФАД или хинонов протоны связываются ионами O<sub>2</sub>- с образованием воды.

В то время как у эукариотов ферменты дыхательной цепи имеют относительно постоянный состав, у бактерий встречаются вариации в составе дыхательной цепи. У некоторых бактерий цитохромы отсутствуют и при контакте с кислородом происходит непосредственный перенос водорода на кислород с помощью флавопротеидов, конечным продуктом при этом оказывается перекись водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Помимо углеводов, прокариоты способны использовать другие органические соединения, в частности белки, в качестве источника энергии, окисляя их полностью до CO<sub>2</sub> и H<sub>2</sub>O.

**Анаэробное дыхание.** Некоторые бактерии обладают способностью использовать в анаэробных условиях нитрат как конечный акцептор водорода. Восстановление нитрата может происходить двумя путями: аммонификацией, при которой нитрат превращается в аммиак, и денитрофикацией, при которой происходит восстановление нитрата до молекулярного азота или закиси азота. Этот процесс связан с деятельностью фермента нитратредуктазы.

**Сульфатное дыхание.** Использовать сульфат как конечный акцептор водорода при анаэробном дыхании способна лишь небольшая группа бактерий, включающая только два рода: *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum*. Эти бактерии являются строгими анаэробами, они обитают в сероводородном иле и не имеют значения в медицинской микробиологии. Они способны использовать в качестве донора электронов молекулярный водород, поэтому их относят к хемолитотрофам. Этим бактериям принадлежит ведущая роль в образовании сероводорода в природе.

**Ферментация белков.** Если для бактерий с бродильным метаболизмом источником энергии служат белки, то такие бактерии называются пептолитическими. Пептолитические бактерии гидролизуют белки и сбраживают аминокислоты. Многие аминокислоты сбраживаются совместно с другими, при этом одна выполняет функцию донора, а другая - функцию акцептора водорода. Аминокислота-донор дезаминируется в кетокислоту, которая в результате окислительного декарбоксилирования превращается в жирную кислоту.

Рост бактериальных клеток связан с синтезом и накоплением всех компонентов, входящих в ее состав, и увеличением размера, характерного для данного вида. В условиях, обеспечивающих рост микробов, происходит и процесс их деления. Для большинства бактерий характерно поперечное бинарное деление, приводящее к образованию двух дочерних клеток. У грамположительных бактерий при этом происходит синтез перегородки между делящимися клетками. Перегородка начинает формироваться на периферии и «движется» к центру клетки. Для грамотрицательных бактерий характерно первоначальное формирование перетяжки, отделяющей клетки. После ее образования окончательное разделение дочерних клеток сопровождается синтезом перегородки между ними. Размножение бактерий бинарным делением приводит к росту числа бактериальных клеток в геометрической прогрессии. При внесении бактерий в питательную среду они растут и размножаются до тех пор, пока содержание какого-нибудь из необходимых компонентов среды не достигает минимума, после чего рост и размножение прекращаются. Если на протяжении всего этого времени не прибавлять питательные вещества и не удалять конечные продукты обмена, то получаем *статическую бактериальную культуру*. Статическая (периодическая) культура бактерий ведет себя как многоклеточный организм с генетическим ограничением роста. Если построить график, по оси абсцисс которого отложить время, а по оси ординат - число клеток, то получим кривую, описывающую зависимость числа образующихся клеток от времени размножения, которая называется кривой роста (рис. 24).

На кривой роста бактерий в жидкой питательной среде можно различить несколько фаз, сменяющих друг друга в определенной последовательности.

Начальная – **лаг-фаза** (от англ. *lag* - отставать), охватывает промежуток времени между инокуляцией (посевом бактерий) и началом размножения. Ее продолжительность в среднем 2-5 ч и зависит от состава питательной среды и возраста засеваемой культуры. Во время лаг-фазы происходит адаптация бактериальных клеток к новым условиям культивирования, идет синтез индуцибельных ферментов.

**Экспоненциальная** (логарифмическая) фаза характеризуется постоянной максимальной скоростью деления клеток. Эта скорость зависит от вида бактерий и питательной среды. Время удвоения клеток называется временем генерации, которое варьирует от вида бактериальной культуры: у бактерий рода *Pseudomonas* оно равняется 14 мин, а у *Mycobacterium* - 24 ч. Величина клеток и содержание белка в них во время экспоненциальной фазы остаются постоянными. Бактериальная культура в этой фазе состоит из стандартных клеток.

**Стационарная** фаза наступает тогда, когда число клеток перестает увеличиваться. Так как скорость роста зависит от концентрации питательных веществ, то при уменьшении содержания последних в питательной среде уменьшается и скорость роста. Снижение скорости роста происходит также из-за большой плотности бактериальных клеток, снижения парциального давления кислорода, накопления токсичных продуктов обмена. Продолжительность стационарной фазы составляет несколько часов и зависит от вида бактерий и особенностей их культивирования.

Фаза **отмирания** наступает вследствие накопления кислых продуктов обмена или в результате автолиза под влиянием собственных ферментов. Продолжительность этой фазы колеблется от десятка часов до нескольких недель.



Рисунок 24 – Кривая бактериального роста

Продолжительность жизни бактерий мало изучена. Известно, что мезофилы на питательной среде при комнатной температуре в условиях, когда размножение бактерий минимально, могут сохранять свою жизнеспособность в течение 1-2 лет. Очевидно, что биологическая смерть бактерий в большей степени связана с ограничением числа возможных делений. Считается, что большинство бактерий могут делиться около 50 раз, после чего клетка погибает. Механизмы гибели остаются не до конца изученными, но показано существование у бактерий генов, изменение активности которых специфически направлено на самоуничтожение клеток. Постоянное нахождение бактериальной популяции в логарифмической фазе роста наблюдается в непрерывной культуре, что достигается постепенным дозированием поступления питательных веществ, контролем плотности бактериальной суспензии и удалением метаболитов. Непрерывные бактериальные культуры используются в биотехнологических процессах. Накопление бактериальной массы (числа бактерий) при культивировании зависит от многих факторов (качество питательных сред, посевная доза, температура выращивания, pH, наличие активирующих рост добавок и др.).

На жидких питательных средах рост и размножение бактерий проявляются в виде диффузного помутнения, образования придонного осадка или поверхностной пленки. Особенностью размноже-

ния бактерий роста *Leptospira* на жидких средах является отсутствие видимых проявлений роста.

На плотных питательных средах бактерии образуют скопление клеток - колонии, которые принято считать потомком одной клетки. Колонии различаются формой, размерами, поверхностью, прозрачностью, консистенцией и окраской. Колонии с гладкой блестящей поверхностью принято называть колониями в S-форме (от англ. *smooth* - гладкий). Колонии с матовой шероховатой поверхностью называют R-формами (от англ. *rough* - шероховатый).

Окраска колоний определяется способностью бактерий синтезировать пигменты. Пигменты различаются по цвету, химическому составу и растворимости. Пигменты предохраняют бактериальную клетку от УФ-лучей, обезвреживают токсичные кислородные радикалы, обладают антибиотическими свойствами, принимают участие в реакциях, сопутствующих фотосинтезу в фототрофных бактериях.

Заполните таблицу 1.

*Таблица 1 – Характеристика этапов развития культуры микроорганизмов*

<i>Фаза развития</i>	<i>Описание</i>	<i>Темпы роста</i>	<i>Метаболиты</i>

### ***Контрольные вопросы***

1. В чем проявляется эффект Пастера?
2. Как взаимосвязаны различные типы брожения?
3. Укажите отличия первичного и вторичного метаболизма.
4. Укажите факторы, которые играют основную роль при накоплении микробной биомассы.

## **Лабораторная работа №5**

### **Методы культивирования микроорганизмов**

**Цель занятия:** познакомиться с процессами выращивания микробной массы. Изучить принципы поверхностного и глубинного культивирования микроорганизмов.

**Порядок выполнения лабораторной работы:**

1. Законспектируйте основные понятия.
2. Начертите схему (рис. 25).
3. Сделайте обозначения.
4. Ответьте на контрольные вопросы.

При **поверхностном** методе культивирования продуцентов ферментов культура растет на поверхности твердой увлажненной питательной среды. Микробная масса полностью обволакивает и прочно скрепляет твердые частицы, клетки получают питание за счет содержащихся в этих средах веществ и используют для дыхания кислород воздуха, поэтому для их нормального обеспечения кислородом приходится применять рыхлые по своей структуре среды с небольшой высотой слоя. Недостатком метода является необходимость больших площадей для выращивания. Главное преимущество поверхностного метода – более высокая конечная концентрация фермента на единицу массы среды. Поверхностные культуры можно быстро и легко высушить, их легко перевести в товарную форму и транспортировать. Меньше потребность электроэнергии по сравнению с глубинным методом.

**Глубинный** метод культивирования заключается в выращивании микроорганизмов в жидкой питательной среде. Он технически более совершенен, чем поверхностный, так как легко поддается механизации и автоматизации (рис. 25). Весь процесс должен проводиться в строго асептических условиях, что с одной стороны, является преимуществом метода, а с другой – составляет наибольшую техническую трудность, т.к. нарушение асептики часто приводит к прекращению образования фермента.



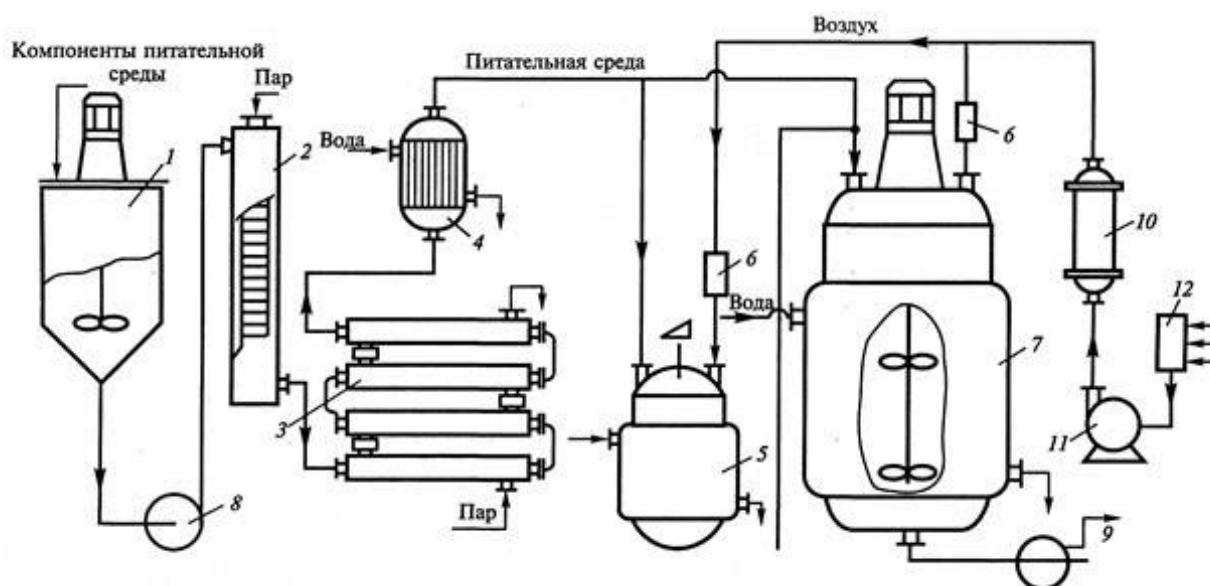


Рисунок 5 – Принципиальная технологическая схема глубинного культивирования микроорганизмов. Обозначения: 1 – смеситель питательной среды; 2 – колонка для непрерывной стерилизации потока питательной среды; 3 – теплообменник - выдерживатель; 4 – теплообменник для охлаждения потока питательной среды; 5 – инокуляторы (или посевные аппараты); 6 – индивидуальный фильтр для очистки воздуха; 7 – ферментер; 8,9 – насосы; масляный фильтр для предварительной очистки воздуха; 11 – компрессор; 12 – головной фильтр для очистки воздуха

Широко применяют **периодическое культивирование с подпиткой**: помимо внесения питательного субстрата в реактор до введения в него биообъекта, в процессе культивирования в аппарат добавляют питательные вещества через определенные промежутки времени порциями или непрерывно «по каплям». Иногда дополнительно вносят биообъект. Существует также **отъемно-доливочное культивирование**, когда часть объема из биореактора время от времени изымается при добавлении эквивалентного объема среды. Это приводит к регулярному омолаживанию культуры и к задержке ее перехода к фазе отмирания. Такой режим культивирования в зна-

чительной мере уподобляется непрерывному процессу, поэтому называется также **полунепрерывным культивированием**.

**Концентрация фермента** в среде при глубинном культивировании обычно значительно ниже, чем в водных экстрактах поверхностной культуры. Фильтраты культуральных жидкостей содержат не более 3% сухих веществ. Это вызывает необходимость предварительного концентрирования фильтратов перед тем, как выделять ферменты любым методом.

**Система называется закрытой**, если ни одна составная часть этой системы после начала процесса в биореакторе не вводится и не выводится. В периодическом процессе в ферментер сначала подают все питательные вещества, водную фазу и посевной материал. Процесс идет в соответствии с кривой роста микроорганизмов с заключительным замиранием реакции, обусловленным недостатком субстрата, накоплением токсических метаболитов, неблагоприятным изменением физико-химических условий окружающей среды (рН, температура, парциальное давление кислорода, вязкость), гибелью и лизисом микроорганизмов. Во время культивирования все параметры непрерывно изменяются.

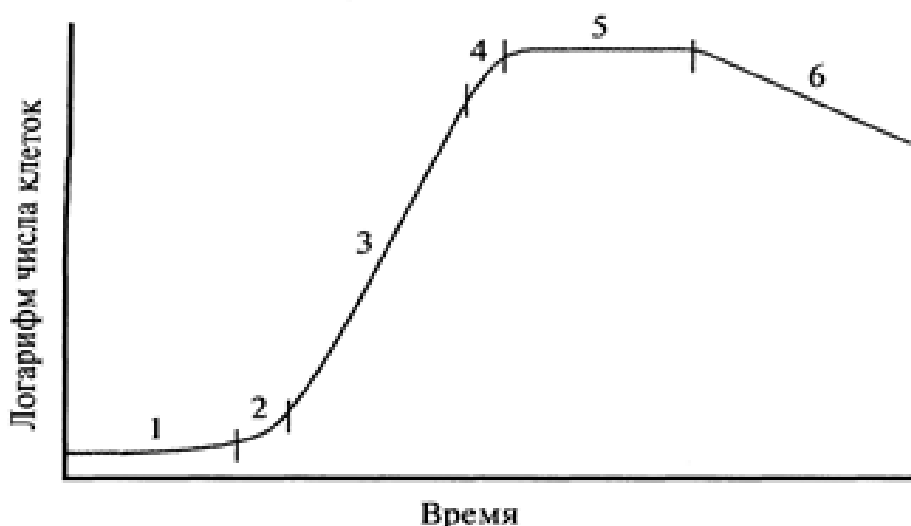
Развитие управляемых периодических процессов привело к созданию **объемно-доливочной системы**: в процессе культивирования главные компоненты среды добавляют дробно, чем исключают субстратное ингибирование. Никакие жидкие компоненты из среды не отводят.

**Открытые системы работают** в непрерывном потоке. В процессе реакции часть отработанной питательной среды из биореактора удаляют и добавляют новую, что обеспечивает непрерывность процесса. В единицу времени субстрата вводят не больше, чем может переработать культура. Проводят непрерывное культивирование по крайней мере с одной лимитирующей рост концентрацией вещества. Регулирование осуществляют поддержанием концентрации биомассы или продукта на постоянном уровне путем изменения концентрации субстрата (**турбидостат**) или применения строго лимитированной концентрации питательных веществ с соответствующим изменением концентрации клеток или продукта (**хеMOSTAT**).

Все процессы культивирования можно разделить на две большие группы - периодические и непрерывные.

При **периодическом способе** производства простерилизованный ферментер заполняется питательной средой, часто уже содержащей нужные микроорганизмы. Биохимические процессы в этом ферментере продолжаются от нескольких часов до нескольких дней. При этом типе культивирования клеточная культура может пройти все фазы своего развития (рис. 26):

1) **Lag-фазу**, или фазу задержанного роста, при которой клетки растут медленно и адаптируются к новой среде обитания в объеме ферментера;



*Рисунок 26 – Кривая роста бактериальной культуры при периодической ферментации: 1 – лаг-фаза, 2 – фаза ускорения, 3 – экспоненциальная фаза, 4 – фаза замедления, 5 – стационарная фаза, 6 – фаза отмирания*

2) фазу ускорения – когда адаптация закончилась и клетки начинают интенсивно делиться

3) **Log-фазу**, характеризующаяся интенсивным делением клеток и сбалансированностью роста всей популяции;

4) фазу замедленного роста, связанную с исчерпанием питательных субстратов и накоплением токсических продуктов метаболизма;

5) **Const-фазу** или стационарную фазу, при которой прирост новых клеток количественно равняется числу погибающих;

6) **фазу отмирания**, характеризующуюся прогрессирующей гибелью клеток.

Синтез первичных метаболитов наиболее интенсивно идет с середины Log-фазы до середины стационарной. Ближе к концу стационарной фазы может начаться синтез вторичных метаболитов.

Периодически ферментер опорожняют, моют, стерилизуют, целевой продукт отправляют на очистку, и начинают новый цикл.

Системы, функционирующие в таких условиях, характеризуются как **batch-системы** (замкнутые системы). Большинство современных биотехнологических систем функционируют как batch-процессы, при которых однажды оптимизированные условия обеспечивают максимальное накопление целевого (требуемого) продукта.

При **непрерывном способе** подача равных объемов сырья (питательных веществ) и отвод культуральной жидкости, содержащей клетки продуцента и целевой продукт осуществляется одновременно. Такие ферментационные системы характеризуются как открытые. Через некоторое время после начала процесса в таком ферментере устанавливается динамическое равновесие между процессами размножения клеток с одной стороны и процессами отмирания и вымывания живых клеток их аппарата с другой. В результате концентрация клеток устанавливается на определенном уровне, задаваемом технологическим режимом (скоростью потока, количеством питательных веществ, температурой). Принцип непрерывного проточного культивирования похож на непрерывные процессы в химической технологии и подобно им может реализовываться по двум основным схемам:

**1. процесс идеального (полного) вытеснения;**

**2. процесс идеального (полного) смешения;**

Реактор для выращивания микроорганизмов в процессе полного вытеснения в общем виде представляет собой трубу, расположенную вертикально или горизонтально. При этом в один конец медленно втекает среда и посевной материал (микроорганизмы), а из другого конца вытекает культуральная жидкость. При этом из-за

примерно одинаковой скорости движения и отсутствия завихрений перемешивания слоев жидкости в реакторе не происходит (ламинарный режим). Уменьшение концентрации питательных веществ и накопление продуктов биосинтеза, а так - же клеточной биомассы происходит в таком реакторе не только во времени, но и в пространстве (от начала реактора к концу). В таком режиме обычно проводят анаэробное культивирование. Процесс полного вытеснения применяется в крупнотоннажных производствах в тех случаях, когда желательно избежать потери времени на опорожнение, стерилизацию и заполнение емкости (производство пива).

Если целевой продукт является эндометаболитом, т.е. находится внутри клетки, то для получения более плотной клеточной культуры проводят **периодическое культивирование в режиме диализа**. При этом питательный субстрат постоянно поступает в реактор через специальную мембрану и через нее же отводится часть культуральной жидкости без клеток. Диализ ведет к снижению концентрации продуктов жизнедеятельности клеток, неблагоприятно влияющих на их жизнеспособность. Этот метод не нужно путать с непрерывным проточным культивированием.

В зависимости от того, на каком принципе основано поддержание постоянства концентрации клеток различают **турбидостатический и хеMOSTатический** режимы непрерывного культивирования.

При **турбидостатическом режиме** культивирования постоянство концентрации клеток обеспечивается управляемым изменением скорости потока жидкости через аппарат за счет подачи больших или меньших объемов питательной среды. Наиболее распространенным методом определения концентрации клеток в культуральной жидкости является измерение светорассеивания (мутности) выходящего из ферментера потока с помощью прибора-нефелометра, измеряющего мутность жидкости по величине светорассеяния. Сам прибор посредством электрической схемы связан с насосом для подачи питательной среды или вентилем (краном), регулирующим эту подачу. Повышение концентрации клеток в культуральной жидкости, приводит к увеличению светорассеяния, что автоматически вызывает увеличение объема подаваемой в аппарат свежей питательной

среды, и что, в свою очередь, приводит к вымыванию избыточных клеток. Наоборот, при уменьшении светорассеяния (снижении концентрации клеток) скорость протока жидкости через аппарат уменьшается и соответственно уменьшается процесс их вымывания из ферментера.

Недостатком турбидостатического режима является то, что в этом режиме невозможно достигнуть полного усвоения питательных веществ и при выделении целевого продукта они могут безвозвратно теряться или загрязнять его, усложняя процесс очистки. При длительном культивировании в турбидостате возникает довольно серьезная проблема, связанная с прилипанием клеток к фотоэлементу и искажения его показаний. Однако имеются и определенные преимущества. Так, например, если засевадается смешанная культура, то в турбидостате автоматически отбирается более быстро растущий вид, что может использоваться для предохранения его от заражения посторонней микрофлорой (если, конечно, она растет медленнее) и селекции определенных форм.

При **хемостатическом режиме** поддержание постоянства концентрации культуры продуцента осуществляется за счет регулирования не выходящего, а входящего потока. Сущность регулирования состоит в том, что концентрацию основного питательного вещества (или одного из основных), поступающего в реактор устанавливают на определенном уровне, который ограничивает (лимитирует) степень размножения микроорганизмов, поддерживая тем самым культуру микроорганизма в определенной нужной концентрации. Такой метод регулирования называется **хемостатическим**, а реактор - **хемостатом**.

Хемостаты применяются в процессах, характеризующихся малой скоростью протока жидкости и низкой концентрацией питательных веществ, что облегчает саморегулировку системы. Недостатком хемостатического метода регулирования является то, что в этом случае обычно не удается получить продукты в достаточно высокой концентрации и добиться полной утилизации питательных веществ.

Эффективным способом решения этой проблемы является использование так называемых **иммобилизованных биокатализаторов** (клеток или ферментов). Процесс **иммобилизации** заключается

в (закреплении) молекул фермента или целых живых клеток на (или в) специальных носителях или насадках значительно большего (на много порядков) размера. При этом биокатализатор из фактически гомогенного становится гетерогенным. После окончания процесса такой катализатор легко отделить фильтрованием от культуральной жидкости, очистить, а иногда даже регенерировать. Такие катализаторы обычно имеют большой срок действия, по сравнению с иммобилизованными, удобны в обращении, но имеют гораздо более высокую стоимость и требуют использования специально сконструированных для их использования ферментеров, что препятствует их широкому использованию.

**Контрольные вопросы:**

1. Какие способы культивирования микроорганизмов - объектов биотехнологии вам известны?
2. В чем заключаются принципиальные отличия культивирования в открытых и закрытых системах?
3. Укажите преимущества и недостатки турбидостатического и хемотростического режима культивирования.
4. Что такое иммобилизованные биокатализаторы?
5. Принцип и назначение процесса иммобилизации ферментов.

## **Лабораторная работа №6**

### **Устройство светового микроскопа. Люминесцентная микроскопия. Устройство электронного микроскопа**

**Цель занятия:** ознакомиться с принципом работы и устройством светового микроскопа. Получить представление об основных видах микроскопии и ее значении в практике биотехнологии.

#### **Порядок выполнения лабораторной работы**

1. Законспектировать основные понятия.
2. Познакомиться с устройством светового микроскопа.
3. Зарисовать прибор, сделав обозначения.
4. Ознакомиться с различными видами микроскопов и основными правилами микроскопирования.
5. Зарисовать схему устройства электронного микроскопа.
6. Заполнить таблицу 2.
7. Ответить на контрольные вопросы.

**Микроскоп.** Изучение морфологии и строения клеток микроорганизмов, величины которых измеряются микрометрами ( $1\text{ мкм} = 0,001\text{ мм}$ ), нанометрами ( $1\text{ нм} = 0,001\text{ мкм}$ ), ангстремами ( $1\text{ \AA} = 0,1\text{ нм}$ ), возможно только с помощью микроскопов.

Наиболее распространены и удобны для микробиологических исследований прозрачных объектов в проходящем свете микроскопы МБИ-1, МБР-1, БИОЛАМ 70Р (рабочий), С (студенческий), Д (дорожный).

Микроскоп имеет механическую и оптическую части (рис. 27).

Механическая часть микроскопа включает штатив с предметным столиком, тубус, макро- и микрометрические винты. Верхняя часть штатива – тубусодержатель – может перемещаться на 50 мм с помощью механизма, приводимого в действие вращением макрометрического и микрометрического винтов, предназначенных для грубой и тонкой фокусировки препарата. При вращении этих винтов по часовой стрелке тубусодержатель микроскопа опускается, при вращении против часовой стрелки – поднимается. В верхней части тубусодержателя находится револьвер, в отверстия которого ввинчиваются объективы и тубус.



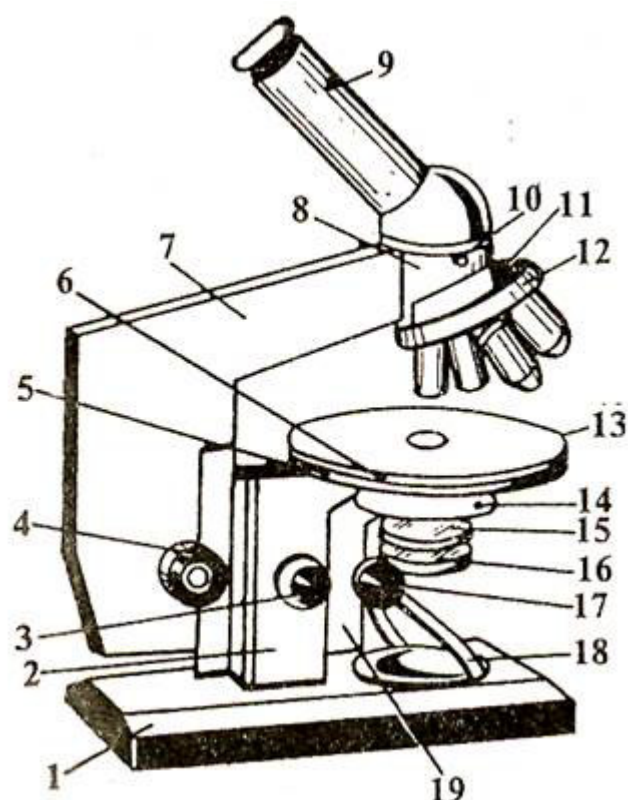


Рисунок 27 – Схема микроскопа «Биолам». Обозначения: 1 – основание микроскопа; 2 – коробка с механизмом микрометрического фокусирования; 3 – микрометрический винт; 4 – макрометрический винт; 5 и 6 – винты для перемещения столика; 7 – тубусодержатель; 8 – головка микроскопа; 9 – насадка монокулярная (тубус с окуляром); 10 – винт для крепления насадки; 11 – винт, фиксирующий револьвер относительно тубуса; 12 – револьвер с объективами; 13 – предметный столик; 14 – винт для крепления конденсора; 15 – конденсор; 16 – дополнительная линза; 17 – рукоятка кронштейна; 18 – зеркало; 19 – кронштейн.

Оптическая часть микроскопа состоит из осветительного аппарата, объектива и окуляра.

Осветительный аппарат состоит из зеркала и конденсора. Зеркало отражает падающий на него свет и направляет его в конденсор. Одна сторона зеркала плоская, и ее используют при любом источни-

ке света и при любом увеличении. Другую, вогнутую, сторону зеркала употребляют при малых увеличениях без конденсора. Конденсор, состоящий из нескольких линз, собирает отраженный от зеркала свет в пучок, направляемый непосредственно на плоскость препарата. Под конденсором имеется ирисовая диафрагма и откидная оправа для светофильтра. Ирисовая диафрагма служит для задержания лишних лучей света и позволяет при необходимости уменьшить апертуру конденсора (апертура – это “охват” линзы, она характеризуется количеством лучей, попадающих в линзу).

Объектив представляет собой наиболее важную часть микроскопа. Он состоит из системы линз, заключенных в металлическую оправу, которые дают действительное увеличенное обратное изображение. В микроскопах МБР-1, БИОЛАМ используются объективы, дающие увеличение в 8, 40 и 90 раз. Увеличение объектива зависит от фокусного расстояния фронтальной линзы и, следовательно, от ее кривизны. Чем больше кривизна фронтальной линзы, тем короче фокусное расстояние и тем больше увеличение объектива. Поэтому, чем большее увеличение дает объектив, тем ниже его следует опускать над плоскостью препарата. При 8х объективе расстояние между фронтальной линзой объектива и исследуемым объектом равно 8,53 мм, при 40х - 0,4 мм, при 90х - 0,1 мм. Изображение, получаемое при помощи линз, обладает рядом недостатков - аберраций. Наиболее существенные - сферическая (каждая точка объекта имеет вид кружочка, а не точки, изображение не резкое, размытое) и хроматическая (получаемое изображение приобретает окраску, которую не имеет объект) аберрации. Объективы, у которых аберрации скоррегированы не полностью, называются ахроматами. Они содержат до шести линз и дают изображение наиболее резкое в центре. Более совершенные объективы – апохроматы – могут состоять из 10-12 линз, хроматическая погрешность в них в 10 раз меньше, чем у ахроматов. Планохроматы полностью устраняют искривление поля зрения, их применяют при микрофотографировании.

Окуляр служит для рассмотрения изображения объекта, увеличенного с помощью объектива, и содержит две линзы: глазную (верхнюю) и собирающую (нижнюю). Окуляры могут давать увеличение в 5, 7, 10, 12, 15 и 20 раз, что указано на их оправе.

Увеличение, которое дает микроскоп, определяется произведением увеличения объектива на увеличение окуляра.

Бинокляры имеют дополнительное увеличение насадки (она предназначена для наблюдения объекта одновременно двумя глазами). Однако общее увеличение еще не характеризует всех возможностей микроскопа. Увеличенное изображение может оказаться как четким, так и нечетким. Отчетливость получаемого изображения определяется разрешающей способностью микроскопа - минимальным расстоянием между двумя точками, когда они еще не сливаются в одну. Чем больше разрешающая способность микроскопа, тем меньшей величины объект можно увидеть. Повысить ее можно двумя путями: либо освещая объект короткими лучами света, например УФ, либо увеличивая показатель преломления среды ( $n$ ), граничащей с линзой, с тем, чтобы приблизить его к показателю преломления стекла, на котором находится объект ( $n$  стекла = 1,5).

В целом микроскопический объект может рассматриваться в трех типах системы: сухой - между линзой объектива и объектом находится воздух ( $n = 1$ ); водной - между линзой объектива и объектом находится капля воды ( $n = 1,3$ ) - водная иммерсия; масляной - линза объектива погружается в каплю иммерсионного масла - кедрового, касторового, вазелинового ( $n = 1,52$ ) - масляная иммерсия.

При микроскопии в дневное время можно пользоваться естественным светом, однако, чаще прибегают к источникам искусственного света, которые обеспечивают интенсивное регулируемое освещение (осветители типа ОИ - 19, ОИ - 35). При установке света конденсор должен быть поднят до упора, ирисовая диафрагма открыта; настройка освещения производится с объективом малого увеличения (8х). Объектив опускают на расстояние около 0,8 см от предметного стекла и, вращая зеркало, добиваются равномерного и яркого освещения.

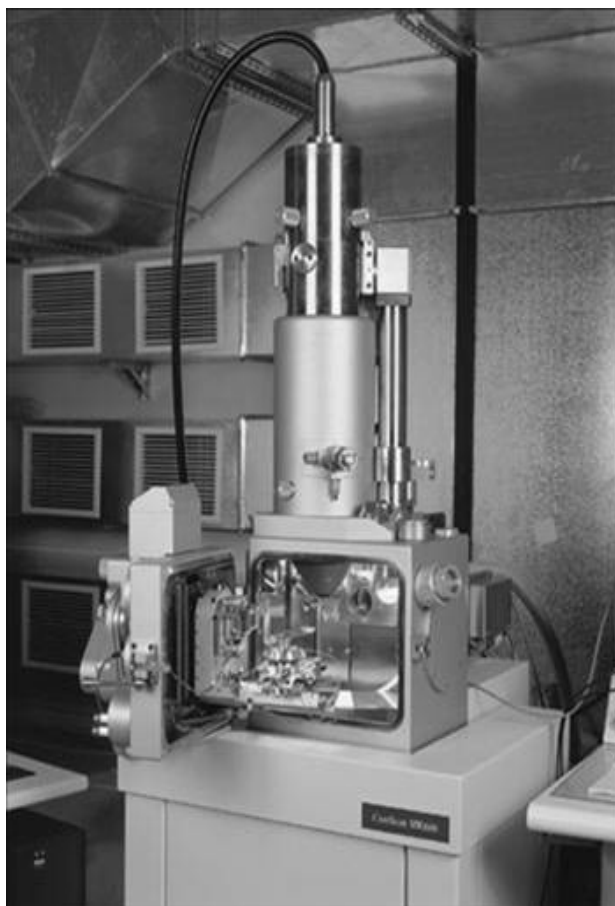
Яркость освещения следует регулировать только изменением накала лампы осветителя или применением светофильтров. Положение зеркала, конденсора и диафрагмы осветителя больше не изменять. Диафрагмой конденсора можно пользоваться только для изменения контрастности изображения.

На предметный столик помещают препарат, закрепляют его боковыми зажимами и изучают сначала с объективом 8х. Для детального изучения препарата пользуются объективом 40х, осуществляя фокусировку только микровинтом. После просмотра препарата переводят револьвер на увеличение 8х и только после этого снимают препарат с предметного столика. Микроскоп в нерабочем состоянии должен находиться на увеличении 8х.

Высокая разрешающая способность современных **электронных микроскопов** (15-10-5А и даже 3 и 1,5 А) позволяет наблюдать и изучать объекты, невидимые в световом микроскопе: вирусы, фаги, микоплазмы, тонкое строение клеток прокариот и эукариот, их макро- и микроструктурные элементы, другие субмикроскопические органеллы.

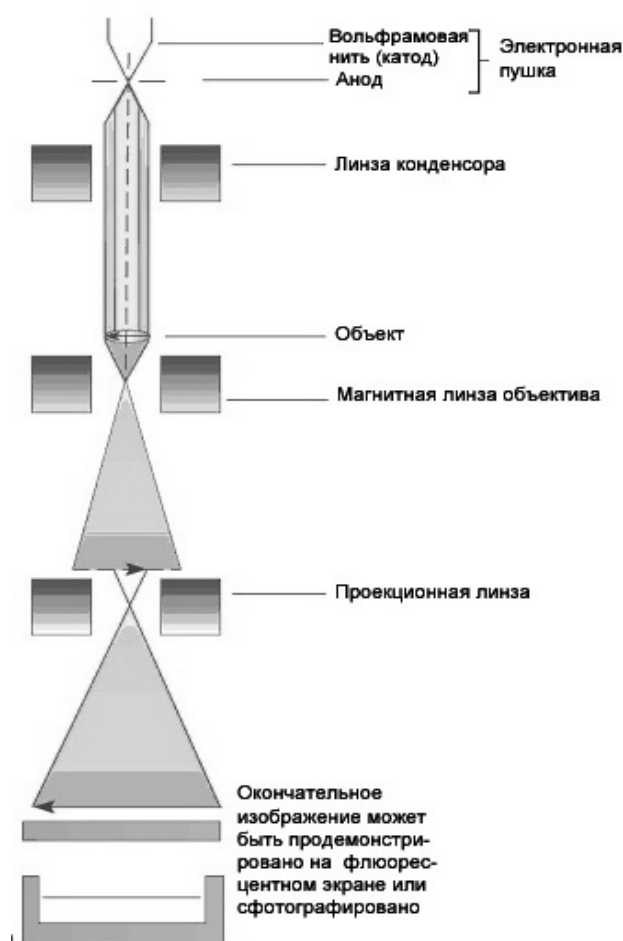
Электронный микроскоп состоит из нескольких сложных узлов: колонные, в которой находятся осветительная система (электронная пушка и конденсорная линза), камера объекта (предметный столик, объективная, промежуточная и проекционная линзы), экран, фотокамера; вакуумной системы; установки для электропитания, размещенной в металлическом шкафу за колонной; вспомогательных устройств (рис. 28).

Принцип ЭМ. В качестве источника электронных лучей применяют электронную пушку, основой которой служит вольфрамовая нить, нагретая электрическим током (рис. 29). Электронные лучи обладают малой длиной волны. Прохождение электронных лучей в вакууме через электромагнитные поля, создаваемые электромагнитными линзами, концентрирует и направляет электронный поток. Это обеспечивает резкое повышение разрешающей способности электронного микроскопа до 0,2 нм и увеличение до  $10^9$ .



*Рисунок 28 – Электронный микроскоп*

Препараты для электронной микроскопии должны быть прозрачными и прочными. Их готовят на специальных тончайших пленках – подложках из коллодия. Толщина пленок около 1 мкм. Для их получения пользуются 0,5-2%-ным раствором коллодия в амилацетате. Пленки осторожно укладывают на опорную металлическую сетку с очень мелкими ячейками (4-10 ячеек на 1 мм). Приготавливают препарат, тщательно промывают его дистиллированной водой от посторонних примесей (остатков среды, солей), сушат, напыляют металлом (хромом) или контрастируют фосфорновольфрамовой кислотой, уранилацетатом и др. Для изучения структуры клеток, выявления локализации вирусов после обработки готовят тонкие срезы на специальных ультрамикротоме. Следовательно, в электронных микроскопах микроорганизмы исследуют не в живом состоянии, а в виде фиксированных препаратов.



*Рисунок 29 – Схема электронного микроскопа*

В **трансмиссионных** микроскопах электроны проходят через образец, затем собираются и фокусируются электромагнитными линзами. Электроны невидимы для глаза, поэтому они направляются на флуоресцентный экран, который воспроизводит видимое плоскостное изображение, или на фотоплёнку, чтобы получить постоянный снимок (электронную микрофотографию). Проходя через объект, части которого имеют различную толщину, электроны больше или меньше задерживаются, а объект приобретает контрастность. Создаёт изображение только та часть электронов, которая проходит через объект и попадает на экран микроскопа. Участки клеток, слабо рассеивающие электроны, выглядят на экране светлыми, а участки, сильно рассеивающие электроны, тёмными.

В **сканирующих** электронных микроскопах пучок электронов фокусируется в тонком зонде и им сканируют образец, а отражен-

ные от поверхности образца электроны собираются и формируют на экране объемное изображение. При сканирующей электронной микроскопии изучают поверхность различных объектов, напыляя на них в вакуумной камере электронно-плотные вещества, и исследуют реплики, повторяющие контуры образца.

Заполните таблицу 2.

*Таблица 2 – Сравнение электронного и светового микроскопов*

Параметр	Электронный микроскоп	Световой микроскоп
Источник излучения		
Длина волны		
Максимальное полезное увеличение		
Максимальное разрешение		
Линзы		
Объект		
Красители		

### ***Контрольные вопросы***

1. Назовите и охарактеризуйте наиболее распространенные микроскопы.
2. Назовите основные части светового микроскопа.
3. Устройство электронного микроскопа.
4. Особенности приготовления препаратов для электронной микроскопии.

## **Лабораторная работа № 7**

### **Устройство автоклава. Правила упаковки посуды для стерилизации. Стерилизация питательных сред**

**Цель занятия:** ознакомиться с принципом работы и устройством автоклава. Получить представление о стерилизации текучим паром и принципах подготовки материалов для стерилизации безопасности при работе с прибором под давлением.

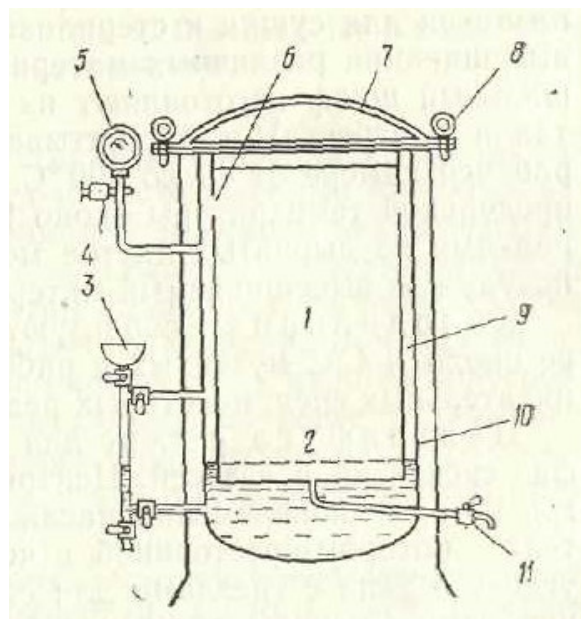
#### **Порядок выполнения лабораторной работы:**

1. Изучить конструкцию и принцип работы автоклава.
2. Изучить требования к стеклянной посуде лаборатории.
3. Приготовить ватные пробки.
4. Законспектировать правила подготовки посуды и материалов к стерилизации в автоклаве (табл. 3).
5. Ответить на контрольные вопросы.

**Автоклавы** служат для стерилизации посуды, питательных сред и других материалов насыщенным паром под давлением выше атмосферного. Автоклавы бывают разных конструкций (вертикальные, горизонтальные), но принципиальная схема их устройства одинакова (рис. 30, 31).

Принцип действия автоклава основан на возрастании температуры кипения воды при повышении давления (при давлении в 1 атм  $t^{\circ}$  кипения воды 99,1С, а при давлении в 2 атм. – 119,6С). Автоклавы бывают стационарные и переносные, горизонтальные и вертикальные. Воду в автоклаве нагревают для образования пара при помощи электрической энергии. Основные части автоклава: кожух, водопаровая камера, стерилизационная камера, крышка с резиновой прокладкой. Водопаровая камера из специальной высококачественной; стали предназначена для получения пара. Предназначенный для стерилизации материал помещают в стерилизационную камеру. Массивная крышка с резиновой прокладкой наглухо закрывает водопаровую камеру. Крышку к корпусу прикрепляют болтами и сверху зажимают барашковыми гайками.

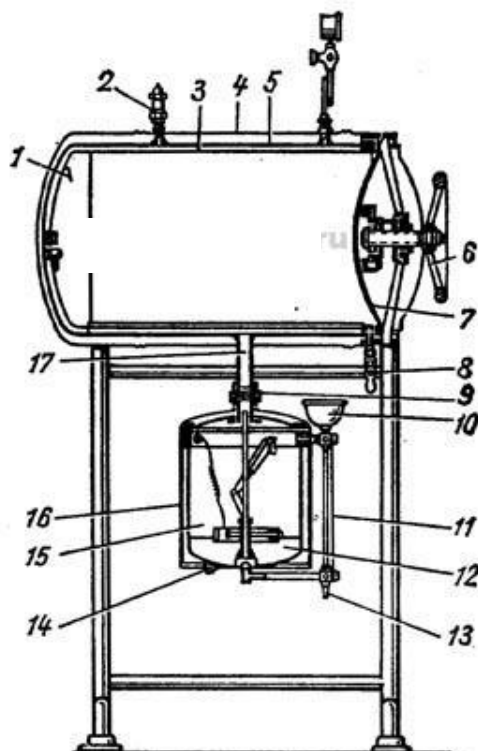




*Рисунок 30 – Схема устройства вертикального автоклава: 1- камера стерилизации, 2 – подставка для размещения стерилизуемых материалов, 3 – воронка для заполнения автоклава водой; 4- клапан предохранительный, 5 – манометр, 6 – отверстие для поступления пара в камеру стерилизации, 7 – крышка, 8- зажимы винтовые, 9 – камера водопаровая, 10 – котел, 11- кран для спуска воды*

Наружный кожух предохраняет автоклав от механических повреждений. В современных электрических автоклавах система подачи нагретого пара отделена от стерилизационной камеры. Пар подается в стерилизационную камеру через патрубок от котелка, снабженного электронагревательным элементом с регулятором степени нагрева. К автоклаву придается арматура: манометр с сифонной трубкой и трехходовым краном, водомерная стеклянная трубка для измерения уровня воды в водопаровой камере автоклава, предохранительный клапан для предупреждения чрезмерного повышения давления в автоклаве, воздушный и спускной краны для удаления воздуха в начале стерилизации и для удаления конденсата из стерилизационной камеры. Персонал, обслуживающий автоклав, должен быть подготовлен на специальных курсах. Квалификационная комиссия в присутствии инспектора

котлонадзора выдает удостоверения на право эксплуатации автоклава. При неумелой работе с автоклавом может произойти взрыв.



*Рисунок 31 – Горизонтальный автоклав АЭ-31:1: 1 – отражатель; 2 – предохранительный клапан; 3 – стерилизационная камера; 4 и 16 – кожухи; 5 – паровая камера; 6 – штурвал; 7 – крышка; 8 – спускной кран; 9 – накидная гайка; 10 – воронка; 11 – водомерная стеклянная трубка; 12 – электронагреватель; 13 – кран водомерной трубки; 14 – болт заземления; 15 – котелок; 17 – патрубок*

Пользоваться автоклавом запрещается, если: а) истек срок осмотра автоклава инженером-теплотехником; б) обнаружен хотя бы один неисправный зажимный болт; в) повреждено хотя бы одно ушко крышки автоклава; г) испорчен манометр, предохранительный клапан или стекло водомерной трубки; д) не произведена в установленный срок очистка автоклава от накипи и грязи; е) замечена течь котла. Перед тем как приступить к эксплуатации автоклава, необходимо проверить его комплектность и изучить прилагаемую к автоклаву инструкцию.

Надо учитывать, что показание манометра соответствует определенной температуре пара в автоклаве: 0,50 МПа - 112 °С, 0,1 МПа - 120, 0,15 МПа - 127, 0,2 МПа - 134 °С.

Материал в автоклаве чаще всего стерилизуют при 0,1 МПа в течение 20-30 мин. По окончании стерилизации отключают источник нагрева (стрелка манометра постепенно доходит до нуля). После этого открывают пароотводный кран, выпускают остаток пара. Затем осторожно отвинчивают крышку и открывают ее. После полного остывания вынимают простерилизованный материал.

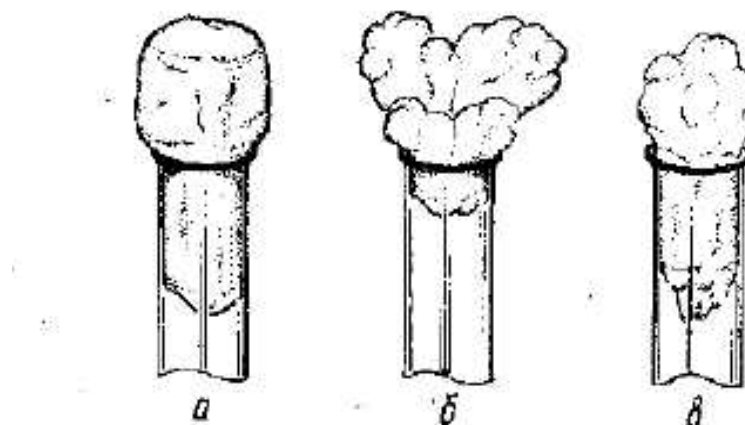
В автоклаве можно стерилизовать посуду, инструменты, питательные среды (кроме желатина и сред с углеводами) и т. п. При работе необходимо соблюдать правила техники безопасности. К работе допускают лиц, имеющих удостоверение на право пользования автоклавом. Исправность автоклава проверяет инспекция котлонадзора.

Аппарат Коха – это металлический цилиндр, обшитый снаружи материалом (линолеум, асбест), плохо проводящим тепло. На дно наливают воду, а стерилизуемый материал помещают сверху на подставку. Аппарат закрывают конической крышкой, в которой имеются отверстия для термометра и выхода пара. Внизу расположен кран для спуска воды. Стерилизацию проводят текущим паром при 100°С в течение 30-60 мин. При таком режиме погибают вегетативные клетки спорообразующих и неспорообразующих форм микробов. Дробная стерилизация (трехкратная) по 30-60 мин в течение трех дней с интервалом 18-20 ч позволяет создать условия для прорастания спор в вегетативные клетки и освободиться от них. В промежутки времени между стерилизацией споры прорастают и при последующем прогревании погибают. В аппарате Коха стерилизуют те материалы, которые не выдерживают температуру выше 100°С (желатин, молоко, углеводные среды и др.).

Для лабораторных биотехнологических исследований необходима различная стеклянная посуда. Чашки Петри (диаметр 10 см, высота 1,5 см) применяют для выделения чистых культур, количественного учета микроорганизмов, анализа микрофлоры на плотных питательных средах и других исследований; колбы Виноградского, плоские бутылки-матрацы, качалочные колбы для выращивания

аэробных микроорганизмов, пробирки и колбы с поплавками — для изучения процессов брожения. Кроме специальной микробиологической посуды широко используют обычную химическую посуду: колбы плоскодонные конические Эрленмейера, круглодонные, мерные (на 25, 50, 100, 200 мл); пипетки градуированные (на 1, 2, 5, 10 мл), пипетки Мора (на 1, 2, 5, 10, 20, 25, 50, 100 мл), пастеровские пипетки с вытянутым капилляром, пробирки биологические (без ранта) 18x2,0; 18x1,5; 15x1,5 см; бюретки, капельницы, воронки, мензурки, цилиндры, бюксы, склянки.

Колбы и пробирки, используемые для приготовления и стерилизации питательных сред и выращивания культур микроорганизмов, закрывают ватными пробками (рис. 32). Пробки изготовляют вручную или при помощи специальной машины.



*Рисунок 32 — Выполнение ватных пробок: а — правильно; б, в — неправильно*

Правильно подготовленная к стерилизации лабораторная посуда, инструментарий, питательные среды предупреждает их загрязнение микрофлорой воздуха при хранении и использовании. Подготовленные лабораторные материалы до стерилизации следует хранить в чистых коробках или ящиках столов, выложенных фильтровальной бумагой. Сверху подготовленные материалы также следует прикрыть бумагой.

Способы подготовки посуды и материалов к стерилизации в автоклаве приведены в табл. 3.



Наименование изделий	Способы подготовки
	более штук и обертывают поверх пробок бумагой.
Емкость для забора материала	Закрывают двойной пергаментной бумагой и обвязывают вокруг горлышка ниткой или закрепляют резиновым кольцом.
Питательные среды	Закрывают силиконовыми или ватно-марлевыми, которые должны входить в горлышко сосуда на $\frac{2}{3}$ своей длины. Поверх пробки (кроме пробирок) надевают бумажный колпачок, который обвязывают вокруг горлышка ниткой или закрепляют резиновым кольцом.
Спецодежда	Укладывают в стерилизационные коробки или упаковывают в двойные мягкие упаковки из бязи.

### Контрольные вопросы:

1. Объясните принцип работы автоклава.
2. Чем отличается принцип автоклавирования от стерилизации в аппарате Коха?
3. Укажите правила подготовки посуды к стерилизации.

## **Лабораторная работа № 8**

### **Термостат, его устройство и назначение. Назначение и устройство сухожарового шкафа**

**Цель занятия:** ознакомиться с принципом работы и устройством термостата и сушильного шкафа. Получить представление о требованиях безопасности при работе с электрическими приборами.

#### **Порядок выполнения лабораторной работы:**

1. Изучить конструкцию и принцип работы электрического термостата.
2. Изучить конструкцию и принцип работы сухожарового и сушильного шкафов.
4. Заполнить таблицу 4.
5. Ответить на контрольные вопросы.

При проведении лабораторных исследований зачастую возникает необходимость в обеспечении и высокоточном поддержании заданной температуры рассматриваемого объекта. Для этих целей в помещении монтируют особое регулирующее устройство, **термостат лабораторный**.

Термостаты предназначены для выращивания микроорганизмов на питательных средах при постоянной заданной температуре. В лабораториях устанавливают несколько термостатов с разной температурой, благоприятной для развития отдельных групп микроорганизмов: мезофиллов – 28-30 °С, термофилов – 43-55, патогенных видов – 37 °С. Термостаты бывают различной формы, размеров и конструкций: от небольшого шкафчика до термостата с несколькими отделениями или отдельной термостатной комнаты.

**Термостат** (рис. 33) представляет собой металлический шкаф с двойными стенками, между которыми находится слой воды или воздуха. Наружная часть термостата покрыта материалом, плохо проводящим тепло (асбест, линолеум).

Внутри термостата расположены полки для размещения посевного материала выращиваемых микроорганизмов. Постоянную температуру в термостате поддерживают с помощью терморегулятора,

который вмонтирован в верхнюю крышку термостата. Устройство терморегулятора основано на принципе линейного расширения веществ. Терморегуляторы представляют собой сплав каких-либо двух металлов с различным коэффициентом теплового расширения (латунь, цинк) или металлическую "подушку", наполненную спиртом, смесью спирта и эфира, ртутью или другими веществами, изменяющими свой объем при определенной температуре. При нагревании термостата выше установленной нормы металлы расширяются, контакты размыкаются и дальнейший приток тепла автоматически задерживается. После снижения температуры включается электрический ток и приток тепла возобновляется.



*Рисунок 33 – Термостат воздушный*

Температура воздуха в данной конкретной части помещения, где стоит термостат, должна быть максимально ограждена от влияния таких посторонних факторов, как тепло от ламп накаливания или радиатора отопления и не подвергаться прямому воздействию солнечных лучей. Встроенные в прибор датчики очень чутко реагируют на любое изменение температуры, включая либо отключая подачу энергии на кондиционер или печь для достижения заранее установленных значений.

Требования, предъявляемые современной биотехнологией, обусловили появление на рынке термостатов, обладающих самыми разнообразными характеристиками и особенностями функциониро-



вания. На данный момент все аппараты данного типа поддаются классификации по нескольким основным параметрам:

- по диапазону рабочих температур (высоких, средних и низких);
- по теплоносителю (жидкостные, воздушные и твердотельные);
- по точности поддержания работы;
- по области применения (промышленные, лабораторные и пр.).

С учётом совокупности характеристик, среди которых стоимость занимает не последнее место, наибольшей популярностью пользуется **термостат воздушный лабораторный**. Производители предлагают множество моделей, основанных на общем принципе действия, но основное деление происходит по двум веткам: термошкафы и хладотермостаты. Независимо от целей термостатирования, и те и другие способны обеспечить поддержание температуры в установленном рабочем диапазоне, независимо от колебаний факторов среды. Внешне воздушные термостаты напоминают сушильные шкафы. Существующие образцы, как правило, оснащены электрическим или газовым обогревом, термометрами и терморегуляторами. Они достаточно широко применяются как при постоянных температурах разделения, так и для программированных анализов. Их способность к поддержанию стабильных условий внутри рабочего объёма активно используется при проведении разного рода микробиологических, санитарно-бактериологических, вирусологических и биохимических исследований. Преимущество вышеописанных агрегатов над всеми остальными подобного класса состоит в меньшей инерционности и лёгкости в эксплуатации и обслуживании.

Лабораторные **жидкостные термостаты** тоже имеют ряд неоспоримых преимуществ, основное из которых, пожалуй, - очень хорошая тепловая стабильность. Именно от требуемого диапазона и будет зависеть выбор рабочего тела (жидкости) для устройства. Лучшей признана дистиллированная вода, с той оговоркой, что диапазон поддерживаемых ею температур весьма ограничен (от 5 °С до 95 °С). Второе место уверенно занимают силиконовые масла (от -80 °С до 350 °С), хотя их повседневное использование признано экономически не выгодным в силу определённых причин (изменение по-

казателей вязкости, вредные испарения, полимеризация, отвердевание и т.п.). И, наконец, последним по счёту, идёт простой этиловый спирт, весьма эффективно применяемый в криотермостатах (- 60 °С до 0 °С).

**Сухожаровой шкаф** или воздушный стерилизатор – наиболее простой и эффективный метод стерилизации медицинских принадлежностей, позволяющий сохранить их целостность и физические свойства.

Принцип работы устройства основан на циркуляции горячего воздуха внутри камеры из нержавеющей стали или другого термостойкого материала. Стерилизующим агентом в данном случае является сухое тепло, обладающее превосходными проникающими свойствами практически для любых материалов.

Процесс стерилизации в сухожаровом шкафу практически не требует участия человека. Для стерилизации требуется задать время и температуру, или (в некоторых моделях) выбрать нужную программу. Все остальное выполняется в автоматическом режиме.

Благодаря специальной системе вентиляции воздух в камере прогревается быстро и равномерно, что способствует сохранности стерилизуемых предметов.

Управляющая система на основе микроконтроллеров поддерживает стабильную температуру на протяжении всего процесса стерилизации, не допуская колебаний температуры или перегрева.

Помимо микропроцессорной системы контроля температуры, медицинские сухожаровые шкафы снабжаются резервной схемой на основе термостата, работающей независимо от основной системы.

Простота конструкции медицинского воздушного стерилизатора обеспечивает идеальную дезинфекцию, а также быструю и эффективную очистку камеры. Некоторые модели имеют возможность подключения к персональному компьютеру для документирования процесса стерилизации или корректировки параметров. Стерилизовать предметы можно как в упаковке, так и без нее в решетчатых емкостях. Эффективность стерилизации напрямую зависит от свободного доступа воздуха к обрабатываемым предметам, поэтому необходимо соблюдать правильную загрузку камеры.

В отличие от пара, используемого для стерилизации автоклавами, горячий сухой воздух в сухожаре исключает коррозию металлических инструментов и эрозию стеклянных поверхностей. По цене воздушные сухожаровые шкафы значительно дешевле автоклавов. Также ниже затраты на их использование.

К недостаткам воздушных стерилизаторов по сравнению с автоклавами можно отнести более высокие температуры, используемые в сухожарах. Этот факт сокращает номенклатуру стерилизуемых изделий. Исключаются: резина, текстиль, полимеры и другие принадлежности, не выдерживающие высоких температур. Ограничивается и перечень упаковочных материалов. Исключается бумага, пергамент, непропитанная бязь и некоторые другие. Перед стерилизацией следует обязательно убедиться, что предметы являются термостойкими.

Независимо от формы, круглой или прямоугольной, все сухожаровые шкафы состоят из нескольких основных узлов (рис. 34). Корпус шкафа оборудуется надежной теплоизоляцией и электроконтактными термометрами для автоматического контроля температуры внутри камеры. Нагревание стерилизационной камеры обычно осуществляется электронагревательным элементом. Внутри камера оборудована загрузочными сетками для удобного и рационального размещения стерилизуемых предметов. Имеется крышка с блокировкой от произвольного открывания. Подставка имеет вмонтированное реле времени, шкалу отсчета и сигнальные лампы для удобного контроля за процессом стерилизации.

Кроме невысокой стоимости **воздушные стерилизаторы** привлекают простотой в обслуживании и эксплуатации. Их можно устанавливать в помещениях без дополнительной установки вентиляционных устройств.

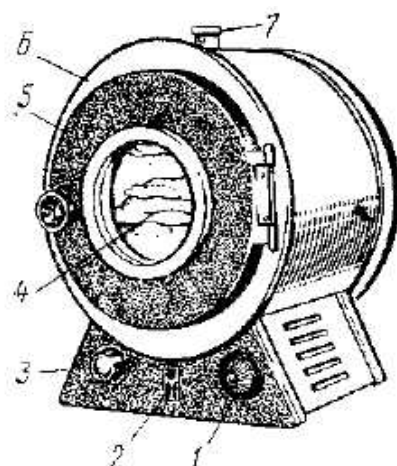


*Рисунок 34 – Сухожаровой шкаф*

Загруженный аппарат нагревается до желаемой температуры с учетом прогрева самого устройства и загруженного в камеру материала. Чаще всего температура сухого воздуха доводится до уровня 180 градусов, а сама процедура обеззараживания длится 60 минут. Допустимым считается колебания температуры в 11 – 14 градусов. Чем больше объем камеры, тем большими могут быть отклонения температурного режима. Временные отклонения не должны превышать 5 минут. Современные модификации сухожаровых шкафов обеспечивают два режима: 1 час при температуре 180 градусов; 2 часа при температуре 160 градусов.

Обработка медицинского и ветеринарного инструментария в упаковке позволяет использовать его в течение 3 суток. Инструменты без упаковки используются сразу же после стерилизации. В качестве упаковочного материала в сухожарах используют влагонепроницаемую бумагу. Пакеты для игл или шприцев склеивают поливиниловым спиртом или крахмальным клеем.

Сушильный шкаф (рис. 35) с терморегулятором предназначен для сушки и стерилизации лабораторной посуды, для высушивания различных материалов до постоянной массы. Сушильный шкаф изготавливают из термостойких материалов (металла и асбеста) и рассчитывают на диапазон температур в рабочей камере от 40 до 200 °С. Длительность разогревания до предельной температуры около 1,5 ч. Внутри шкаф оборудован полками из дырчатых листов металла, на которых размещают посуду или высушиваемый материал.



*Рисунок 35 – Сушильный шкаф: 1 – рукоятка терморегулятора со шкалой, 2 – выключатель, 3 – сигнальная лампа, 4 – подставка, 5- дверца, 6 – корпус, 7 – отверстие для термометра и вентиляционный колпачок*

Изучите имеющиеся в лаборатории биотехнологии термостаты, сушильные и сухожаровые шкафы. Заполните таблицу 4.

*Таблица 4 – Особенности конструкции, модели и назначение приборов лаборатории биотехнологии*

Прибор	Модель	Устройство	Назначение

### ***Контрольные вопросы***

1. Объясните назначение термостата.
2. В чем преимущества воздушных и водяных термостатов.
3. Принципы обслуживания термостата.
4. Назначение и устройство сухожарового шкафа. Отличия стерилизации воздухом от стерилизации паром.

## **Лабораторная работа № 9**

### **Получение трансгенных животных**

**Цель занятия:** ознакомиться с технологиями создания трансгенных животных.

**Порядок выполнения лабораторной работы:**

1. Законспектируйте информацию о трансгенных животных.
2. Составьте схему-классификацию технологий создания трансгенных животных.
3. Ответьте на контрольные вопросы.

**Трансгенез** – это процесс переноса и интеграции чужеродной генетической информации в геном живого.

**Трансгенные животные** – это животные, которые получены в результате переноса в их геном чужеродных генов от других видов животных или человека.

Генетическая инженерия животных — наиболее сложное из всех биотехнологических направлений. Это связано с отсутствием у всех позвоночных животных бесполого размножения, а у млекопитающих — еще и с невозможностью развития потомства вне материнского организма. Однако биотехнология XXI в. сумела преодолеть эти трудности.

В настоящее время разработаны методы введения дополнительной генетической информации в клетки практически любых организмов. Но получить трансгенное млекопитающее удастся только с использованием сложных методологических подходов. Наиболее успешным является *метод микроинъекций в мужской пронуклеус*.

Для осуществления микроинъекций используют клетки, полученные сразу после слияния яйцеклетки и сперматозоида. У млекопитающих после слияния половых клеток в течение нескольких часов ядра сперматозоида и яйцеклетки (мужской и женский пронуклеусы соответственно) остаются не слившимися. В мужской пронуклеус с помощью специального прибора вводят молекулы ДНК, содержащие нужные гены. Через некоторое время происходит слияние пронуклеусов, и зигота начинает делиться. Та-

кие зиготы вводятся в матку специально подготовленной самки (суррогатной матери). Через положенный для вынашивания плода срок рождается трансгенный детеныш. Таким способом можно получить трансгенное животное практически любого вида млекопитающих.

Трансгенных животных получают для научных и практических целей. В частности, на лабораторных трансгенных мышах созданы модели целого ряда наследственных заболеваний человека. На таких животных отрабатываются возможные пути предотвращения этих заболеваний и оказания медицинской помощи болеющим.

Некоторые белки человека не удастся нарабатывать с использованием бактерий, грибов или культур клеток животных. В этом случае методом микроинъекций можно получить животное, в молоке которого будет содержаться белок медицинского назначения (рис. 36). Примером может служить один из факторов свертывания крови человека, который необходимо периодически вводить больным гемофилией. По расчетам ученых, стадо трансгенных животных (например, овец) с численностью около сотни особей будет способно обеспечить необходимым белком всех гемофиликов мира. Таких животных называют *животными-биореакторами*.

Для решения проблемы создания таких стад разработан и испытывается метод клонирования животных (не путать с уже известным вам клонированием генов). Так как получение каждого трансгенного животного с нужными свойствами представляет собой сложную задачу, предполагается получать точные генетические копии (клоны) однажды полученных особей. Это можно сделать согласно следующей схеме (рис. 37).

С помощью специального прибора из яйцеклетки извлекают ее ядро. Затем в нее вводят ядро соматической клетки того животного, которое надо клонировать. Создают условия, при которых такая бывшая яйцеклетка (а теперь псевдозигота), начнет делиться.



*Рисунок 36 – Схема получения животного, в молоке которого будет содержаться белок медицинского назначения*



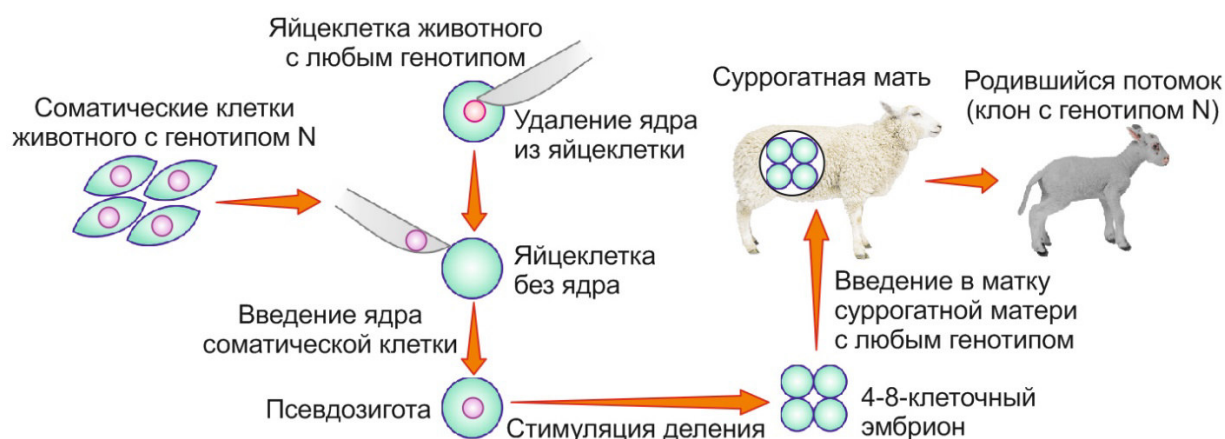


Рисунок 37 – Схема получения клонов с генотипом N

Как известно, деление зиготы (дробление) — это начало развития эмбриона. Такие эмбрионы переносят в матку суррогатной матери. При удачной трансплантации в стенку матки эмбрион будет развиваться, как обычный плод. В результате родится детеныш — точная генетическая копия того организма, из клетки которого было взято ядро.

Клонировать можно (и нужно!) не только трансгенных животных. В современном животноводстве давно и успешно применяется искусственное осеменение. Для получения высокопродуктивных животных определенной породы используется сперма самцов-производителей. Во множестве хозяйств такой спермой искусственно оплодотворяют половозрелых самок.

Производителями называют тех животных, в генотипе которых обязательно (и желательно в гомозиготном состоянии) присутствуют гены, которые определяют основные породные признаки. Потомки, получаемые от таких производителей, наследуют только половину их высокоценного генотипа. Клонирование же такого производителя может дать точную копию, сохраняющую весь генотип.\* В рамках генетической инженерии животных ведутся работы не только по млекопитающим. Разрабатываются более эффективные методы получения трансгенных птиц и рыб.

---

\*Животных-производителей определенной породы получают путем многолетней селекции, поэтому их ценность огромна. Например, в 2019 г. на аукционе в штате Северная Дакота (США) одного из племенных быков продали за 1,51 млн долларов.\*

В селекционной работе с сельскохозяйственной птицей основными направлениями являются получение пород с улучшенным составом мяса и яиц, а также пород, устойчивых к инфекционным заболеваниям. Проводятся эксперименты по созданию птицебиореакторов, в яйцах которых белок птичий альбумин был бы частично заменен на белок медицинского или ветеринарного назначения.

Для выведения пород рыб также используются методы генетической инженерии. Один из проектов данного направления уже реализован. В геном атлантического лосося был введен ген гормона роста одного из видов тихоокеанского лосося. Результатом этого стало создание лосося, растущего в 2 раза быстрее, чем рыбы исходной породы (рис. 38). Еще одним достижением генетической инженерии рыб стало создание пород светящихся в темноте аквариумных рыбок. Для этого были использованы гены медуз и кораллов, которые кодируют светящиеся белки разных цветов (рис. 39).



*Рисунок 38 – Особи лосося одного возраста исходной и трансгенной пород*



*Рисунок 39 – Трансгенные аквариумные рыбки*

Гены, которые используются для переноса, выделяют из определенного генома или синтезируют искусственно. В мировой практике уже получены трансгенные животные, продуцирующие с молоком целый ряд лекарственных веществ:

- факторы свёртываемости крови против гемофилии;
- человеческий белок С для предотвращения образования тромбов;
- моноклональные антитела для лечения различных форм рака.

Получение трансгенных животных включает следующие стадии:

1. Создание генной конструкции (выбор, получение и клонирование чужеродного гена).
2. Внедрение ее в геном организма путем микроинъекции гена в мужской пронуклеус, трансплантация зиготы реципиенту.
3. Селекция модифицированных организмов.

Трансгенные мыши получены методом микроинъекции яйцеклетки самок-доноров. В мужской пронуклеус вводят трансген. Имплантируют самке – суррогатной матери, которая рождает трансгенное потомство – основателей трансгенных линий.

Создание трансгенных коров:

1. Сбор ооцитов коров, забитых на скотобойне.
2. Созревание ооцитов *in vitro*.

3. Оплодотворение бычьей спермой in vitro.
4. Центрифугирование оплодотворенных яйцеклеток для центрирования желтка.
5. Микроинъекция ДНК в мужской пронуклеус.
6. Развитие эмбрионов in vitro.
7. Нехирургическая имплантация одного эмбриона реципиентной самке во время течки.
8. Скрининг ДНК потомков на наличие трансгена.

Трансгенные животные важны для различных биомедицинских исследований. Существует множество трансгенных животных, моделирующих различные заболевания человека (рак, атеросклероз, ожирение и др.). В практических целях трансгенные животные используются различными зарубежными фирмами как коммерческие биореакторы, обеспечивающие производство разнообразных медицинских препаратов (антибиотиков, факторов свертываемости крови и др.).

### ***Контрольные вопросы***

1. Что изучает клеточная инженерия?
2. Кем был получен первый межвидовой гибрид растительных клеток?
3. Какие преимущества имеет клеточная инженерия перед классическими методами селекции?
4. В чем отличие поликлональных и моноклональных антител?
5. Кто впервые получил моноклональные антитела? Назовите основные этапы получения моноклональных антител.
6. Какими свойствами обладают разные виды стволовых клеток?
7. Какие проблемы возникают при получении и применении стволовых клеток?

## **Лабораторная работа № 10**

### **Трансплантация эмбрионов КРС**

**Цель занятия:** изучить механизм трансплантации эмбрионов сельскохозяйственных животных.

**Порядок выполнения лабораторной работы:**

1. Законспектируйте информацию о трансплантации эмбрионов животных.
2. Составьте схему этапов трансплантации эмбрионов.
3. Подготовьте сообщение на заданную тему.
4. Ответьте на контрольные вопросы.

**Трансплантация эмбрионов** – прогрессивный метод улучшения породных и продуктивных качеств животных, позволяющий получить потомство с улучшенными генетическими свойствами, существенно увеличив поголовье высокоценного скота. Оплодотворенные яйцеклетки (зиготы, эмбрионы) получают от генетически ценной коровы, на седьмой день после её осеменения, до прикрепления эмбриона к стенке матки. Эмбрион пересаживают в матку коровы-реципиента, которая служит в качестве «суррогатной матери» и не имеет ценных породных свойств. В случае, если пересадка окажется результативной и эмбрион приживётся, то по истечении нескольких месяцев беременности на свет появляется новорожденное животное, значительно превосходящее реципиента по своему генетическому потенциалу.

*Требования к животным донорам и реципиентам.*

В качестве доноров эмбрионов используют телок или коров, обладающих высокоценным генетическим и породным потенциалом, в возрасте от 14 месяцев. Коров можно использовать для трансплантации после отела (но не ранее, чем через 2 месяца) и окончания послеродового периода, когда матка полностью восстановилась и возобновились половые циклы. В качестве доноров используют самых ценных и качественных племенных животных. Качество донора определяется по таким критериям, как племенная ценность, количество и качество молочной продукции, экстерьер, общее развитие, полноценный половой цикл и т. д. Рекомендуют проводить отбор

животных для трансплантации эмбрионов с учетом дополнительных критериев, отражающих гормональный статус и метаболическую активность потенциальных доноров. При этом практическое значение имеет способность донора к множественной овуляции, к получению от него жизнеспособных эмбрионов.

Считают, что для получения от донора не менее 10 овуляций и 6 жизнеспособных эмбрионов необходимо, чтобы в нулевой день полового цикла в крови коров содержание эстрадиола было на уровне 15,4 пг/мл, тестостерона – 0,18 нг/мл, ЛГ – 1,46 МЕ/л. Уровень прогестерона на 10-й день полового цикла – от 2,0 до 5,0 нг/мл (в среднем 3,55) и ЛГ – 1,54 МЕ/л. Вызывание суперовуляции может быть эффективным при содержании в крови холестерина не менее 3,55 ммоль/л,  $\beta$ -каротина – 8,88 мкмоль/л, витамина А – 4,36 мкмоль/л и активности аланинаминотрансферазы – не менее 0,24 мкмоль/л.

В качестве реципиента можно использовать животных любых пород, с учетом особенностей, отражающихся на размере и массе новорожденного. Коровам можно проводить трансплантацию эмбрионов после родов и окончания послеродового периода, на фоне восстановившихся половых циклов. Реципиентом может стать малоценное животное, не предназначенное для воспроизводства ремонтного молодняка. Для объективной оценки функциональной активности яичников животных-реципиентов и снижения эмбриональной смертности при трансплантации, проводят оценку качества желтых тел в яичнике. Учитывают также уровень гормонально-метаболического гомеостаза реципиентов, особенно- на 6–7 день естественного или индуцированного полового цикла. Пересадку эмбрионов рекомендуется проводить реципиентам с уровнем прогестерона в крови от 2,0 до 4,9 нг/мл, независимо от результатов оценки желтого тела. Соотношение прогестерона к эстрадиолу должно быть 1:10. В случае использования телок в качестве реципиентов с уровнем прогестерона свыше 5 нг/мл, приживляемость снижается на 10–17 %, ниже 2,0 нг/мл – на 25–30 %. Содержание холестерина должно быть в пределах от 2,60–3,90 мкмоль/л,  $\beta$ -каротина – 12,2–17,3 мкмоль/л.



### *Суперовуляция и пересадка эмбриона.*

Цель гормональной стимуляции коров – получить из яичника вместо одной яйцеклетки максимальное количество половых клеток за одну овуляцию. Под влиянием фолликулостимулирующего гормона созревают множество яйцеклеток одновременно (суперовуляция). Созревшие яйцеклетки почти одновременно выбрасываются в яйцепровод, где происходит оплодотворение. Через неделю можно вымывать из матки коровы большое количество эмбрионов. Условием удачной трансплантации эмбрионов является соблюдение синхронности проявления половой охоты у доноров и реципиентов. Пересадка эмбриона реципиенту возможна лишь спустя одну неделю от начала половой охоты. Таким образом, происходит приживание эмбриона у реципиента и желтое тело функционирует. Эмбрион можно пересаживать в течение 6–8 дней после начала половой охоты реципиента, а при использовании замороженных эмбрионов срок от половой охоты до пересадки должен составлять одну неделю. Эффективная трансплантация эмбрионов возможна при соблюдении двух факторов: правильный выбор оптимального времени для пересадки и синхронность полового цикла коровы-донора и коровы-реципиента. При этом необходимо внимательно отслеживать и учитывать признаки охоты.

### *Суперовуляция и синхронизация половых циклов.*

Заблаговременно ветеринарным врачом планируется проведение программы по пересадке эмбрионов и предоставляются индивидуальные инструкции по каждой корове. За один день до начала гормональной обработки оценивают состояние матки и яичников животных. Если в яичниках коровы функционирует желтое тело, то можно начинать процесс трансплантации эмбрионов. Фолликулостимулирующий гормон (ФСГ) вводят в течение 4-х дней, два раза в сутки, утром и вечером, в понижающихся дозах с интервалом в 12 часов. Реципиентов обрабатывают простагландином на второй день после начала стимулирования суперовуляций у доноров. Донорам инъецируют простагландины на третий день вечером. Это делается потому, что половая охота быстрее проявляется у доноров с суперовуляцией, чем у реципиентов.

### *Осеменение.*

На 6-й день от начала стимуляции суперовуляции реципиенты и доноры начинают входить в состояние охоты. Коров-доноров осеменяют искусственно два раза, с интервалом 9–15 часов, т. к. не все яйцеклетки созревают одновременно. При необходимости (при длительной охоте) осеменение повторяют 3-й раз. Наблюдение за признаками охоты осуществляют в течение нескольких дней. Проявление охоты у доноров и реципиентов происходит одновременно. Все признаки охоты тщательно фиксируют. Рефлекс неподвижности – самый важный признак готовности коров-реципиентов. Оптимальная синхронность половой охоты достигается в том случае, если разница по времени не больше 24-х часов. После осуществления осеменения доноров и наступления половой охоты у реципиентов делают перерыв на одну неделю. В этот период эмбрионы развиваются в матке донора.

### *Вымывание эмбрионов.*

Эмбрионы извлекают из матки коровы-донора специальными катетерами через неделю после искусственного осеменения. Вымывание повторяют несколько раз. Одновременно производится массаж рога матки, с целью отделения всех эмбрионов от стенок матки. Жидкость с эмбрионами сливают в эмбриональный фильтр. После того, как один рог матки промыт, катетер переводится в другой рог матки и весь процесс повторяется. На следующем этапе производится поиск извлечённых эмбрионов в поле зрения микроскопа. Далее производится классификация и разделение эмбрионов по категориям: I, II, III и IV. Для процесса трансплантации можно использовать свежеполученные эмбрионы категорий I, II и III. Для замораживания подходят только эмбрионы I категории. Эмбрионы IV категории не используют. После оценки эмбрионов производят ректальное исследование реципиентов, оценивают развитие желтых тел. Часть эмбрионов замораживают в криозащитной среде в сосудах, заполненных жидким азотом.

При оценке эмбрионов соблюдают следующую последовательность:



1. После процедуры промывания рогов матки коровы-донора мерные бутылки с полученной жидкостью передают через окно-шлюз в стерильный бокс.

2. Осаждение эмбрионов производится в течение 20 минут в термостате при 37 С.

3. Верхнюю часть жидкости из каждой емкости удаляют с помощью сифона, оставляя 50-100 мл.

4. Отстой переносят в 2-3 пластмассовые чашки Петри, дно которых для удобства подсчета эмбрионов расчерчено на квадраты  $0,8 \times 0,8$  см.

5. Под микроскопом при 15-20-ти кратном увеличении находят эмбрионы и шприцем, емкостью на 1 см<sup>3</sup> (через присоединенную к нему укороченную пайету), переносят на малое часовое стекло в 1мл солевого раствора Дюльбекко для кратковременного хранения и морфологической оценки при увеличении в 100 раз.

Выявляют неоплодотворенные яйцеклетки, без признаков развития и с дегенеративными изменениями оболочки или цитоплазмы. Дегенерированные яйцеклетки имеют сморщенную, неправильной формы цитоплазму. Нередко наблюдается разрушение цитоплазмы, растягивание, разрыв или расслоение прозрачной оболочки. Непригодными к трансплантации являются эмбрионы, резко отстающие от нормального развития, с выраженным асинхронным дроблением бластомеров, с явлениями их дегенерации. Зародыши со значительными разрывами, расслоениями прозрачной оболочки для трансплантации непригодны.

Условно пригодными к пересадке можно считать эмбрионы с небольшими морфологическими изменениями: с невыраженной неравномерностью дробления бластомеров; небольшим их сжатием; с включениями в перивителлиновом пространстве; с нарушениями прозрачной оболочки.

Бластоцисты с небольшим сжатием бластополости и незначительными деформациями прозрачной оболочки условно пригодны для трансплантации.

После криоконсервации оценка эмбрионов затруднена, так как процесс глубокого замораживания и оттаивания накладывает специфический отпечаток на морфологические структуры эмбрионов.

### *Пересадка эмбрионов.*

Пересадку эмбрионов проводят с использованием специального катетера, введённого глубоко в рог матки. Трансплантация производится спустя одну неделю после начала половой охоты, при закрытой шейке матки, с соблюдением правил асептики. Пересадку коровам часто проводят на фоне эпидуральной анестезии, телкам вводят седативные препараты. Для пересадки можно использовать замороженные или свежеполученные эмбрионы. Трансплантация свежеполученных эмбрионов производится в день их вымывания из рогов матки коровы-донора, после оценки качества. В разных странах мира процент стельности реципиентов при использовании замороженных эмбрионов составляет от 45 до 65 %.

Приживаемость эмбрионов – одна из ведущих проблем, с которой сталкиваются специалисты при проведении трансплантации эмбрионов коровам-реципиентам. Нередко отмечается отторжение и гибель эмбриона в организме реципиента. Причины этого явления до конца не изучены, поэтому эффективность применения метода трансплантации в некоторых хозяйствах остается под вопросом. Затраты на лабораторное оборудование, инструменты, медикаменты и т. п., весьма значительны. Однако на последнем этапе работы всегда есть риск отторжения эмбриона. В связи с этим, по мнению многих авторов, особое внимание следует уделять подбору коров-реципиентов. Ведь именно от репродуктивного здоровья реципиентов зависит успех пересадки, приживаемость эмбрионов, здоровье будущего новорожденного теленка. Пересадка эмбриона самке с неизвестным характером и уровнем обменных процессов, без определения содержанием в крови половых гормонов и их соотношения проводится фактически вслепую, что экономически невыгодно. Для успешного выбора подходящего для трансплантации животного необходимо проводить подробную оценку состояния метаболизма его организма. В частности, необходимо определять содержание в крови эстрадиола, тестостерона, прогестерона, лютеинизирующего гормона, холестерина,  $\beta$ -каротина, витамина А, активность аланин-аминотрансферазы и т. п. Известно, что показатели гормонального и метаболического гомеостаза позволяют с высокой степенью объективности оценить интенсивность обменных процессов, протекаю-

щих в организме самки-реципиента, позволяя распознать на ранних этапах эмбрионального развития целый ряд акушерских болезней и патологию развивающегося плода. Животным с риском развития перинатальной патологии сопутствуют нарушения гормонопродуцирующей функции фетоплацентарной системы, особенно на заключительном этапе беременности. Поэтому вполне возможно использование их для прогнозирования развития акушерской патологии на ранних этапах развития беременности и ее профилактики.

Трансплантация эмбрионов является современным эффективным методом, улучшающим породные и продуктивные качества поголовья крупного рогатого скота. Основная цель трансплантации — получить от высокоценного донора наибольшее количество телят, обладающих генетическим потенциалом матери. Главной задачей современных специалистов, работающих по проблеме трансплантации, является увеличение процента приживаемости эмбрионов, создание новых, простых в исполнении и недорогих схем пересадки, увеличение сроков хранения свежеполученных эмбрионов, усовершенствование криоконсервации и т. д. Для оценки состояния гормонально-метаболического гомеостаза организма коров — реципиентов многие ученые рекомендуют проводить определение в крови уровня эстрадиола, тестостерона, прогестерона, лютеинизирующего гормона, холестерина,  $\beta$ -каротина, витамина А, активности аланин — аминотрансферазы и т. п. Учитывая регулируемую роль, которую выполняют в период внутриутробного развития плода стероидные гормоны и другие биологически активные вещества, исследования крови необходимо проводить с прогностической и диагностической целью в отношении характера течения беременности, родов, послеродового периода и состояния новорожденных телят.

Велико практическое значение соблюдения правил длительной низкотемпературной консервации и правил транспортировки. Применение метода глубокого замораживания эмбрионов в жидком азоте при температуре  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  имеет большое практическое значение. Он позволяет: длительное время сохранять ценный генетический материал; проводить пересадку их реципиентам в любое удобное время в спонтанную охоту; исключить необходимость постоянного содержания в стаде животных — реципиентов; значительно упро-

стить экспорт и импорт эмбрионов; становится возможным сохранить генофонд редчайших и исчезающих пород животных.

*Темы для сообщений:*

1. Биотехнология в воспроизводстве и селекции крупного рогатого скота.
2. Способы извлечения оплодотворённых яйцеклеток из суперовулированных коров – доноров.
3. Хранение и пересадка эмбрионов.
4. Перспективы внедрения трансплантации эмбрионов.
5. Методы диагностики и профилактики микробной контаминации при трансплантации эмбрионов.
6. Группы крови и трансплантация эмбрионов.
7. Криоконсервирование эмбрионов.
8. Эффективность использования метода трансплантации эмбрионов в молочном скотоводстве.
9. Трансплантация эмбрионов в коневодстве.

***Контрольные вопросы***

1. Понятие о трансплантации эмбрионов. Влияние трансплантации эмбрионов на генетический прогресс в популяции.
2. Технология трансплантации эмбрионов.
3. Методы извлечения эмбрионов, их эффективность. Среды для извлечения эмбрионов.
4. Оценка качества эмбрионов.
5. Методы криоконсервации эмбрионов.
6. Экстракорпоральное оплодотворение.
7. Капацитация сперматозоидов.

## Лабораторная работа №11

### Методы определения рН производственных растворов и жидкостей

**Цель работы:** определение рН растворов кислот, оснований и солей различными методами (растворы индикаторов, универсальная индикаторная бумага).

**Порядок выполнения работы:**

1. Изучите теоретическую часть, законспектируйте основные понятия.
2. Определите рН предложенных растворов различными методами.
3. Ответьте на контрольные вопросы.

Существуют различные методы определения рН растворов. Одним из методов является колориметрический метод, основанный на применении реагентов, которые изменяют окраску в зависимости от концентрации ионов водорода. Такие реагенты называют кислотно-основными индикаторами. Они представляют собой слабые органические кислоты или основания, недиссоциированные молекулы и ионы которых имеют разную окраску при различных значениях рН. Интервал рН, в котором индикатор меняет свою окраску, называют интервалом рН перехода окраски индикатора.

Равновесие диссоциации индикатора может смещаться под действием кислот или оснований влево, или вправо соответственно. Так, в растворе лакмуса в интервале значений рН от 0 до 5,0 (до интервала перехода) в растворе будет превалировать протонированная форма индикатора, и раствор окрасится в красный цвет. При  $\text{pH} > 8,0$  (за интервалом перехода) в растворе в большем количестве присутствуют депротонированные частицы индикатора и раствор имеет синюю окраску. В интервале перехода и протонированная, и депротонированная формы индикатора присутствуют в соизмеримых количествах, поэтому раствор имеет промежуточную окраску, то есть фиолетовую. Сопоставляя действие исследуемого раствора на различные индикаторы нетрудно определить рН исследуемого раствора (табл. 7).

*Таблица 7 – Интервалы перехода окраски некоторых кислотно-основных индикаторов*

Индикатор	Интервал рН перехода окраски	Окраска до интервала перехода	Окраска в интервале перехода	Окраска за интервалом перехода
метиловый оранжевый	3,1 – 4,4	красный	оранжевый	оранжево-желтый
метиловый красный	4,4 – 6,2	красный	оранжевый	желтый
лакмус	5,0 – 8,0	красный	фиолетовый	синий
фенолфталеин	8,0 – 9,8	бесцветный	бледно-розовый	малиновый

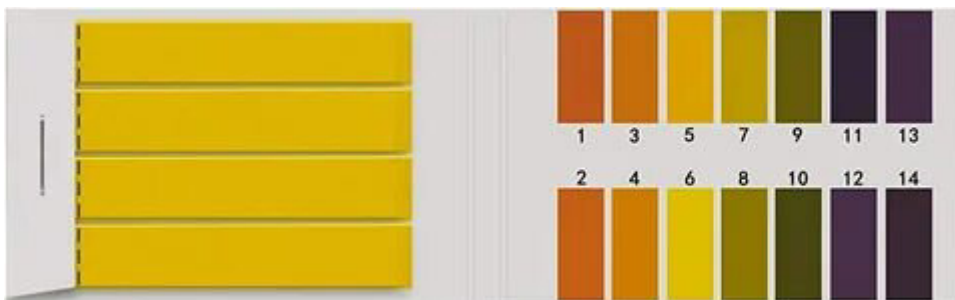
Для проведения эксперимента получите у преподавателя исследуемый раствор. Возьмите 4 пробирки. Поместите в каждую пробирку одинаковое количество (2-3 см<sup>3</sup>) раствора и добавьте по капле растворы имеющихся индикаторов. Отметьте цвет раствора в каждой пробирке. Результаты исследований оформите в виде таблицы (табл. 8). На основании полученных данных определите значение рН выданного раствора.

*Таблица 8 – Результаты исследования рН растворов*

Индикатор	Окраска исследуемого раствора	Порядок величины рН раствора	рН исследуемого раствора
Метиловый оранжевый Метиловый красный Лакмус Фенолфталеин			

рН исследуемого раствора можно определить не только с помощью индикатора, но и с помощью индикаторной бумаги, напри-

мер, лакмусовой. Лакмусовая бумага представляет собой полоску фильтровальной бумаги, пропитанной раствором лакмуса, который предварительно подкрашивают добавлением очень малого количества кислоты (“красная лакмусовая бумага”) или щелочи (“синяя лакмусовая бумага”). Универсальная лакмусовая бумага изменяет свой цвет в кислой и щелочной средах. В кислых растворах химреагент окрашивается в красный цвет, в щелочных – в синий.



*Рисунок 40 – Набор универсальной лакмусовой бумаги*

Для проведения опыта стеклянной палочкой нанесите на полоску универсальной индикаторной бумаги 1-2 капли исследуемого раствора. Сразу же сравните окраску бумаги с цветной шкалой. Сделайте вывод о значении рН исследуемого раствора. Укажите реакцию его среды и вычислите концентрацию ионов водорода.

#### **Контрольные вопросы:**

1. Роль реакции среды в жизнедеятельности культур продуцентов.
2. Перечислите основные методы определения рН растворов.
3. Какие способы регулирования и коррекции рН среды Вам известны?
4. Что такое буферные растворы и какое применение они находят в биотехнологическом производстве?

## **Лабораторная работа № 12**

### **Установки для поверхностного и глубинного культивирования микроорганизмов**

**Цель занятия:** ознакомиться с технологиями получения грибного белка и функциональных продуктов на основе грибов.

**Порядок выполнения лабораторной работы:**

1. Законспектируйте основные понятия.
2. Заполните таблицу 9.
3. Ответьте на контрольные вопросы.

**Биореактор, ферментер или ферментатор** – это закрытая или открытая емкость, в которой при определенных условиях (давление, температура, концентрация сухих веществ, рН среды и т.д.) протекает на клеточном или молекулярном уровне контролируемая реакция, осуществляемая с помощью микроорганизмов.

**Биореакторы (ферментаторы)** составляют основу биотехнологического производства. Масса аппаратов, используемых, например, в микробной биотехнологии, различна, и требования здесь определяются большей частью экономическими соображениями. При масштабировании добиваются соответствия важнейших характеристик процесса, а не сохранения принципа конструкции.

Техническую вооруженность биотехнологических процессов целесообразно условно ограничить аппаратным оформлением производств, базирующихся на культивировании: 1) бактерий и грибов, 2) клеток и тканей растений, 3) клеток и тканей животных организмов и человека. Такое подразделение обусловлено тем, что бактерии и грибы в большинстве своем выращивают в однотипных биореакторах, имеющих почти однотипную обвязку, в которую входят: ферментатор, многокорпусный вентиль стерильный (для подачи питательной среды, посевного материала, подпитки и пр.), системы регулирования рН,  $1V^\circ$ , подачи иеногасителя, система контроля расхода воздуха, пробоотборник, электродвигатель.

Растительные клетки, имеющие клеточную стенку (также как бактерии и грибы) растут, размножаются и развиваются значительно дольше, чем большинство бактерий и грибов, а это вносит опре-



деленные коррективы в аппаратное оформление соответствующих биотехнологических процессов.

Культуры клеток животных и человека, не имеющие клеточных стенок, являются более ранимыми и требовательными к условиям своего существования, чем клетки других эукариот и прокариот. Поэтому оборудование для них можно отнести к разряду "тихоходного", обеспечивающего нежное обращение с биообъектами.

В отдельных случаях допустимы исключения, например, когда возможно культивирование в глубинных условиях некоторых растительных клеток (суспензионная культура женьшеня), используя ферментационное оборудование, рассчитанное на выращивание, например, бактерий или грибов.

К. Шюгерль в 1982 г. предложил подразделить биореакторы на 3 основные группы согласно способу потребления энергии для перемешивания и диспергирования и стерильного воздуха (газа):

- в биореакторах I типа энергия расходуется на механическое движение внутренних устройств;
- в биореакторах II типа энергия расходуется на работу внешнего насоса, обеспечивающего рециркуляцию жидкости и/или газа;
- в биореакторах III типа энергия расходуется на сжатие и подачу газа в культуральную жидкость.

Развитие промышленности антибиотиков продвинуло далеко вперед проблему создания специальной аппаратуры для культивирования микробов тАФ продуцентов БАВ (аминокислот, антибиотиков, полисахаридов, витаминов, ферментов и других соединений). Были предложены различного типа биореакторы для выращивания микроорганизмов, однако все конструкции ферментаторов (ферментеров) оставались в основном сходными по большинству параметров и, усредненно, их можно подразделить на 2 типа: без подводки стерильного воздуха (для анаэробов) и с подводкой его (для аэробов). Аэрируемые биореакторы могут быть с мешалками и без них.

В последние годы апробированы мембранные биореакторы, биореакторы с полыми волокнами и некоторые другие.

При расчете и конструировании биореакторов необходимо учитывать время протекания различных биологических процессов у представителей различных групп организмов.

Размеры ферментаторов определяются соотношением внешнего диаметра к высоте, который варьирует обычно в пределах от 1:2 до 1:6. Почти универсальными и чаще используемыми являются ферментаторы для анаэробных и аэробных процессов. Эти ферментаторы в свою очередь классифицируют по способу ввода в аппарат энергии для перемешивания газовой фазой (ФГ), жидкой фазой (ФЖ), газовой и жидкой фазами (ФЖГ) (табл. 9, рис. 40).

*Таблица 9 – Основные типы ферментаторов*

Ферментаторы	Характеристика конструкции аппарата	Тип аппарата
ФГ с подводом энергии газовой фазой	Простота конструктивного оформления и высокая надежность в связи с отсутствием движущихся узлов и деталей	Барботажный, барботажно-эрлифтный, колоночный (колонный), форсуночный
ФЖ с подводом энергии жидкой фазой	Обычно энергия передается жидкой фазе мешалкой или насосом	Эжекционный с циркуляционным контуром, с мешалкой
ФЖГ (комбинированные)	Основным конструктивным элементом является перемешивающее устройство, обеспечивающее высокую интенсивность растворения кислорода и высокую степень диспергирования газа. В то же время энергия газовой фазой выводится обычным способом	Барботажный с механическим перемешиванием

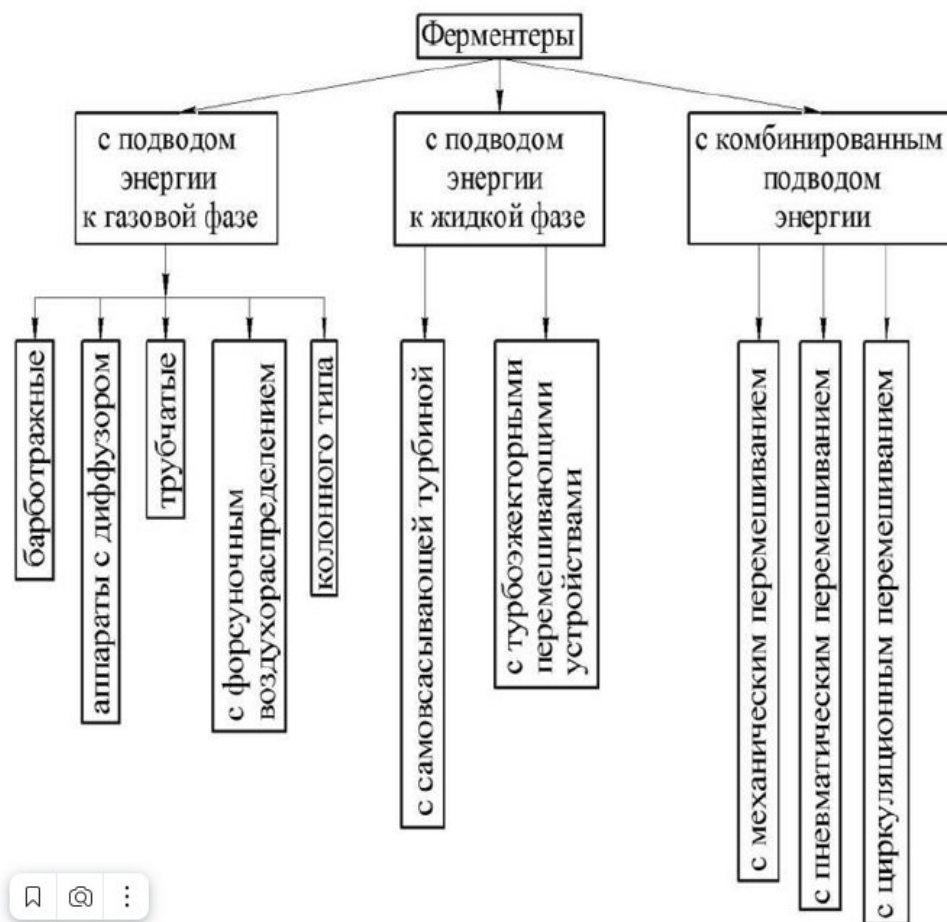


Рисунок 40 – Классификация ферментеров

С использованием указанных классификаций удастся разработать единые методы инженерных расчетов основных конструктивных элементов и режимов работы ферментаторов.

Ферментаторы указанных трех групп имеют большое количество общих элементов. Различие же состоит в конструкциях аэрирующих и перемешивающих устройств. Примером конструктивного оформления ферментатора группы ФГ может быть аппарат с эрлифтом вместимостью 63 м<sup>3</sup>. В аппарате отсутствует механическое перемешивание, поэтому проще поддерживать асептические условия. Воздух для аэрации среды подается по трубе, расположенной вертикально в ферментаторе. Аэратор, конструкция которого обеспечивает вихревое движение выходящего воздуха, расположен в нижней части диффузора и насыщает питательную среду воздухом.

Газожидкостная смесь поднимается по диффузору и перемешивается через его верхние края. В этой же зоне часть воздуха уходит из аппарата, и более плотная среда опускается вниз в кольцевом пространстве между корпусом ферментатора и диффузором. Так происходит многократная циркуляция среды в ферментаторе. Для отвода биологического тепла внутри ферментатора установлен змеевик, а также аппарат снабжен секционной рубашкой. Эффективность работы ферментатора определяется прежде всего необходимой интенсивностью перемешивания. Применение высокопродуктивных штаммов биообъектов, концентрированных питательных сред, высокий удельный расход мощности на перемешивание ТАФ все эти факторы сказываются на существенном возрастании тепловыделений, и для отвода тепла в ферментаторе устанавливают наружные и внутренние теплообменные устройства.

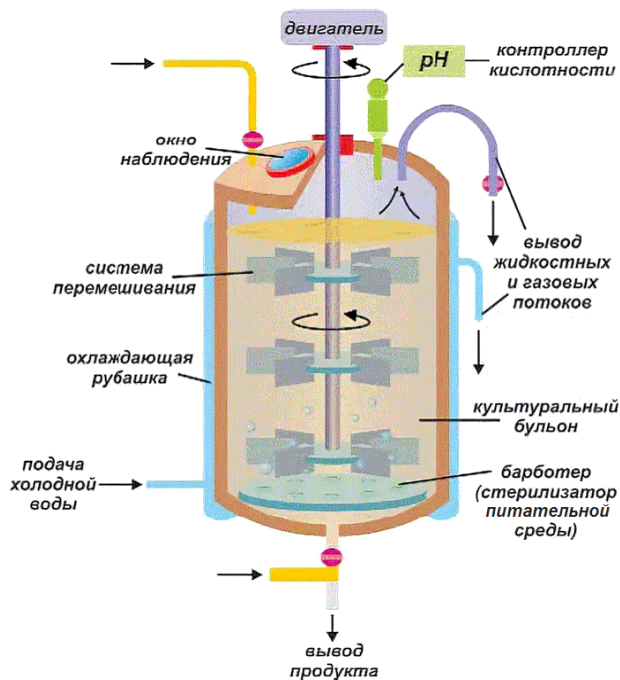


Рисунок 41 – Схема устройства ферментера

### **Контрольные вопросы**

1. Укажите основные типы ферментаторов.
2. Какие приемы аэрации среды вам известны?
3. Как достигается стерильность в полости ферментера?

## **Лабораторная работа № 13**

### **Контроль сырья для микробиологических процессов. Работа с диагностическими сыворотками и бактериофагами**

**Цель занятия:** ознакомиться с принципами контроля качества сырья, качества питательных сред, получить навыки фаготипирования.

#### **Порядок выполнения лабораторной работы:**

1. Законспектируйте основные понятия.
2. Заполните таблицу 10.
3. Получите навыки постановки реакции фаготипирования.
4. Ответьте на контрольные вопросы.

Одним из важных этапов микробного биосинтеза является приготовление питательных сред. Отделение приготовления питательной среды на современном биотехнологическом производстве - это цех, оборудованный емкостями для хранения твердых и жидких веществ, средствами их транспортировки и аппаратами с перемешивающими устройствами для приготовления растворов, суспензий или эмульсий.

Условно реактивы для приготовления питательных сред подразделяются по чистоте на несколько групп.

В порядке увеличения чистоты их можно распределить в следующий ряд:

1. "технический" с коричневой полосой на этикетке;
2. "чистый" или "ч" с зеленой полосой;
3. "чистый для анализа" или "чда" с синей полосой;
4. "химически чистый" или "хч" с красной полосой;
5. "особо чистый" или "осч" с желтой полосой.

Для импортных реактивов существуют похожие градации.

Для приготовления производственной питательной среды предварительно растворяют сахара и соли, тщательно суспендируют такие нерастворимые компоненты, как соевая мука и мел. Крахмалосодержащее сырье предварительно клейстеризуют. Для ускорения эти процессы проводят в небольших аппаратах с мешалками (реакторах), а затем растворы смешивают в смесителе-реакторе

с плоским дном, снабженным барботажным устройством для ввода пара. Концентрат среды, составляющий около одной трети крайне важного объёма, для окончательного растворения и суспендирования нагревают острым паром до 70-80 °С. При этой температуре не происходит разложения термолабильных компонентов среды. Приготовление более концентрированных сред дает возможность использования смесителей меньшей вместимости.

Питательная среда перед подачей в ферментер должна быть обеззаражена. На этом этапе подготовки субстрата крайне важно решить две задачи: полностью уничтожить всю контаминантную микрофлору, которая содержится в крайне важном для культивирования объёме жидкости, и сохранить биологическую полноценность питательной среды.

Для приготовления питательных сред и растворов, используемых при микробиологическом анализе, допускается применение химических веществ по степени чистоты не ниже ЧДА (чистая для анализа).

Основным фактором, определяющим качество и дальнейшую пригодность питательной среды, является правильность ее приготовления. Приготовление сред должно осуществляться со строгим соблюдением рецептуры приготовления и условий стерилизации, определенных изготовителем.

Контроль питательных сред на этапе приготовления включает:

- оценку внешнего вида готовой среды;
- измерение рН питательной среды до и после автоклавирования;
- определение стерильности (отсутствия контаминации) готовой среды;
- постановку качественного контроля биологических свойств среды.

Оценку внешнего вида готовой питательной среды проводят визуально. Цвет, прозрачность и консистенция приготовленной среды должны быть типичны для данной питательной среды и соответствовать нормативной документации изготовителя.

На некоторые наиболее часто встречающиеся ошибки при приготовлении сред указывают:

- потемнение среды вследствие перегрева или недостаточного перемешивания;
- неполное растворение (комки) порошкообразной среды;
- образование осадка.

Значение водородного показателя определяют с помощью рН-метров для агаризованных и жидких питательных сред. Определение проводят согласно инструкции по использованию приборов.

Отклонение рН среды за пределы диапазона, указанного в паспорте, приводит к ухудшению ее биологических свойств, вплоть до полной непригодности. Отклонения водородного показателя или другие проблемы с рН могут быть вызваны:

- перегревом, в том числе при стерилизации;
- недостаточным перемешиванием (менее 15 минут);
- использованием щелочного стекла;
- загрязнением емкостей, в которых готовилась среда;
- дистиллированной водой низкого качества.

Определение стерильности (для стерилизуемых сред) и отсутствия контаминации (для нестерилизуемых сред) проводят путем выдержки в течение 48 - 72 часов при температуре 35 – 37 °С.

Огромное значение имеет питательная среда при культивировании клеток эукариот *in vitro*. Она должна содержать сбалансированный состав макро- и микроэлементов, углеводов, витаминов, регуляторов роста, аминокислот. Для успешного размножения *in vitro* в большинстве случаев прописи сред приходится подбирать индивидуально для каждого вида и даже сорта или культивара различных растений.

Ткани, выращиваемые в жидких питательных средах, обычно культивируют в роллерах с круговым перемешиванием среды или в шейкерах вибрирующего типа, иногда используют стационарную среду, помещая ткань на мостики из фильтровальной бумаги.

**Химический состав среды**, ее физические свойства должны соответствовать задачам, поставленным на данном этапе исследования. Основные задачи, которые решает исследователь при размножении растений в асептических условиях, можно сформулировать так: ввести в культуру, размножить (этап мультипликации), укоренить, высадить *ex situ* с последующей постасептической адап-

тацией. В соответствии с задачами процесс клонального размножения принято условно разделять на соответствующие этапы.

1. На первом этапе часто в состав сред вводят **антиоксиданты**, предупреждающие активацию гидролитических ферментов и гибель высаженных эксплантов.

2. На втором этапе состав среды преимущественно такой же, однако во многих случаях ее обогащают веществами, которые вызывают и многократно усиливают формообразовательные процессы, применяя увеличенные концентрации цитокининов.

3. На третьем этапе подбирается состав среды, способствующий укоренению регенерантов; она или вообще не содержит фитогормонов, или содержит лишь небольшие количества ауксинов.

Успех клонального размножения во многом зависит от наличия и концентрации в среде тех или иных элементов минерального питания, органических соединений. Необходимо четко представлять, из какой климатической зоны происходит растение, знать его биологию и особенности размножения. Сегодня широко известен целый ряд готовых базовых питательных сред для всех этапов микроразмножения растений, однако предпочтительнее индивидуальное покомпонентное приготовление каждого типа питательной среды. Во-первых, это намного дешевле, во-вторых, позволяет своевременно и оперативно реагировать на изменения в поведении культуры *in vitro*.

Растворы **регуляторов роста и витаминов** обычно готовят из расчета 1 мг вещества на 1 мл раствора. Цитокинины (6-бензиламинопурин (БАП), зеатин, кинетин) сначала растворяют в не большом количестве 1 н щелочи, ауксины (ИУК, 1-нафтилуксусная кислота (НУК), 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д)) – в 1 капле этанола и затем доводят до нужного объема бидистиллированной водой. Растворы витаминов и фитогормонов также хранят в холодильнике, однако для лучшей сохранности их можно разливать в емкости (эпендорфы) по 3-5 мл (для разового использования) и хранить в морозильной камере. Кинетин плохо растворим. С этой целью можно использовать различные растворители: 1 М раствор HCl (несколько капель), 50%-й раствор этанола, диметилсульфат или 2%-й раствор NaOH. Гиббереллины растворя-



ют в теплой дистиллированной воде. При этом следует помнить, что эти соединения термонестабильны. Гумат натрия, гидролизат казеина, дрожжевой автолизат готовят в день их использования. Агар лучше расплавить непосредственно перед употреблением в половинном объеме бидистиллированной воды, а затем добавлять к среде. Все манипуляции по приготовлению растворов удобно проводить с помощью магнитной мешалки. Дистиллированная вода должна быть теплой (37-40°C). Наиболее часто используются среды с показателем рН от 4,3 до 6,0, т. е. в кислом диапазоне. Иногда, при длительном культивировании некоторых видов, со временем может произойти закисление культуральной среды, что негативно влияет на темпы роста. В этом случае необходимо проверить кислотность отработанной среды, и если сдвиг действительно произошел, то нужно чаще проводить пассажи.

*Таблица 10 – Значение компонентов среды*

Компоненты среды	Примеры веществ				Назначение
	Для культур прокариот	Для грибных культур	Для культуры клеток растений	Для культуры клеток животных	
Питательные вещества					
Антиоксиданты					
Регуляторы роста					

**Диагностические сыворотки** получают как от мелких животных (кроликов, морских свинок), иммунизированных убитыми микроорганизмами, антигенами, анатоксинами, так и от крупных (коз, лошадей, баранов), если необходимо большое количество сыворотки. Диагностические сыворотки применяют в различных им-

мунологических реакциях для установления вида, подвида или серотипа (серовара) возбудителя инфекционной болезни, определения различных антигенов в биол. жидкостях. В зависимости от характера иммунологической реакции различают агглютинирующие, преципитирующие, флюоресцирующие, гемолитические, меченные изотопами, ферментами, и другие диагностические сыворотки. Среди диагностических сывороток различают антимикробные, к которым относятся антибактериальные и противовирусные, а также антитоксические.

**Антибактериальные сыворотки** обычно используют как агглютинирующие. По степени специфичности их разделяют на **неадсорбированные** (нативные) и **адсорбированные** (поливалентные, содержащие антитела к нескольким антигенам или нескольким детерминантным группам антигена, и монорецепторные).

**Противовирусные диагностические сыворотки** используют в различных реакциях иммунитета, например, реакции торможения гемагглютинации, реакции связывания комплемента, реакции иммунофлюоресценции и др. К противовирусным сывороткам в зависимости от вида вируса предъявляются особые требования. Противовирусные сыворотки очищают от термолабильных ингибиторов прогреванием при  $t^{\circ} 56^{\circ}$  в течение 30 мин., а от термостабильных ингибиторов ферментированием, воздействием углекислотой и другие в зависимости от природы вируса. Кроме этого, определяют наличие неспецифических агглютининов.

Из **антитоксических диагностических сывороток** наиболее часто используют сыворотки для обнаружения ботулинических токсинов в реакции нейтрализации *in vivo* и идентификации токсина возбудителя дифтерии в реакции преципитации. Преципитирующие сыворотки используют в реакциях преципитации для определения растворимых антигенов микробного, растительного или животного происхождения, определения аутоантител, С-реактивного белка, для диагностики инф. болезней, выявления видовой принадлежности белка крови, обнаружения определенных веществ в продуктах при подозрении на фальсификацию.

**Флюоресцирующие (люминесцирующие) сыворотки** представляют собой глобулиновую фракцию иммунной сыворотки кро-

ви животных, меченную флюоресцирующими красителями – **флюорохромами**. Их применяют для обнаружения микробов методом прямой иммунофлюоресценции в патологическом материале и при экспериментальных исследованиях. С аналогичной целью используют также меченные флюорохромами антиглобулиновые и антикомплементарные сыворотки при непрямой иммунофлюоресценции.

В иммунологии широко применяют диагностические сыворотки для определения группы крови, проведения тканевого типирования, для характеристики иммунологического статуса организма. Группы крови по системе АВ0 определяют с помощью стандартных гемагглютинирующих сывороток, приготовленных из крови человека. Они специфичны, т. к. содержат определенные аллоантитела – альфа-, бета- или альфа + бета-антитела. Сыворотка крови группы АВ (IV) этих антител не содержит.

Для определения резус-принадлежности крови используют стандартную сыворотку анти-  $Bh^0(D)$ , а также сыворотку для пробы Кумбса, приготовленную из крови животных (кроликов, коз, баранов), иммунизированных белком сыворотки крови человека. Для дополнительного исследования крови донора применяют сыворотки анти-  $rh'(C)$  и анти- $rh''(E)$ , сыворотки, содержащие два антитела – анти- $Bb^0 (C -f- D)$  или анти- $Rho (D -f- E)$  или три антитела – анти- $Rh^+ (C + D + E)$ .

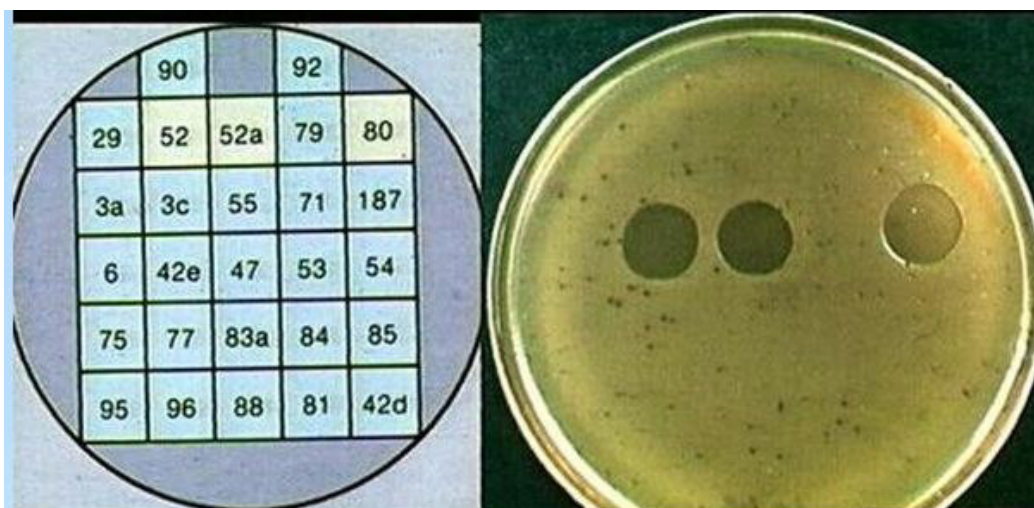
В диагностических целях применяют также широкий спектр **бактериофагов**. По спектру действия выделяют поливалентные (лизирующие родственные бактерии, в том числе близких видов), моновалентные (лизирующие бактерии одного вида) и типоспецифические (лизирующие отдельные штаммы бактерий одного вида) фаги. Стандартные наборы фагов применяют для фаготипирования возбудителей холеры, брюшного тифа, дифтерии, сальмонеллёзов, стафилококковых инфекций и др. Фаготипирование проводят с целью выявления чувствительности патогенных бактерий к препаратам на основе этих фагов.

**Постановка реакции фаготипирования** по модифицированному методу Креджи и Иенсена.

В основу фаготипирования положен принцип совместного выращивания типлируемой культуры с типовым бактериофагом. Наступление лизиса является индикаторным признаком, определяющим типовую принадлежность бактерий.

Для фаготипирования бактерий рекомендуется применять 1,5% мясо-пептонный агар с 5% глицерина.

Суточную агаровую культуру исследуемого штамма отсевают на бульон и помещают в термостат при 37 °С. С появлением заметного роста культуру набирают в пастеровскую пипетку с тонко вытянутым капилляром и наносят небольшими каплями на поверхность хорошо подсушенной питательной среды. Расположение капель на поверхности агара можно наметить заранее. Количество капель должно соответствовать числу типовых фагов плюс 1 капля для контроля роста культуры. Каплям культуры дают возможность впитаться, для чего требуется 3-10 мин. Затем на поверхность каждой капли наносят эксцентрично по 1 капле типового фага с таким расчетом, чтобы часть культуры оставалась свободной от воздействия бактериофага. Сектор, оставшийся свободным от воздействия бактериофага, является контролем роста культуры (рис. 42). При постановке опыта для каждого типа бактериофага берут отдельную пипетку. Типовой бактериофаг применяют в критическом титре, т. е. в наибольшем разведении, при котором исследуемый бактериофаг вызывает на плотной питательной среде явный лизис культуры гомологического фаготипа и не лизирует культуры других гетерологических типов. После того как бактериофаг впитается в питательную среду, чашки с посевом помещают в термостат при 37 °С. Через 6—8 ч производят учет результатов фаготипирования. Непрерывное 6-часовое инкубирование чашек в термостате можно заменить 2-часовой инкубацией, после которой чашки переносят в холодильник, а на следующий день их снова на 3—4 ч помещают в термостат и затем учитывают результаты.



*Рисунок 42 – Схема реакции фаготипирования*

Наличие хорошо выраженного лизиса исследуемой культуры с одним из типовых фагов указывает на принадлежность культуры к данному фаготипу. Появление выраженных признаков лизиса одновременно в нескольких каплях указывает на то, что степень разведения типовых фагов, взятых в опыт, недостаточна. В этих случаях опыт следует повторить с большими разведениями бактериофагов.

Учет фаготипирования производят как в проходящем, так и в падающем свете. Интенсивность лизиса отмечают с помощью четырехкрестной системы.

### ***Контрольные вопросы***

1. Органолептический контроль сырья для приготовления питательных сред.
2. Методы контроля качества питательной среды.
3. Классификация химических реактивов и сырья по степени чистоты.
4. Сфера применения и виды диагностических сывороток.
5. Сфера применения и виды бактериофагов.

## Словарь терминов (гlossарий)

**Автоселекция** – процесс постепенного вытеснения менее приспособленных форм микроорганизмов более приспособленными.

**Анатоксин** – это бактериальный экзотоксин, потерявший токсичность в результате длительного воздействия формалина, но сохранивший антигенные свойства.

**Библиотека генома** – набор клонированных фрагментов ДНК, содержащий весь геном.

**Аэротенк** – смеситель-резервуар для очистки сточных вод.

**Барда** – отход производства спирта.

**Биобезопасность** – состояние защищенности человека, общества, цивилизации и окружающей среды от вредного, опасного для жизни и здоровья человека воздействия токсических и аллергенных биологических веществ и соединений, содержащихся в природных или генно-инженерно-модифицированных биологических объектах и полученных из них продуктах.

**Биогенез** – образование органических соединений живыми организмами.

**Биомасса** – общая масса особей одного вида, группы видов или сообщества в целом на единицу поверхности или объема местообитания.

**Биологический агент** (штамм - продуцент целевого продукта) – активное начало и основа любого биотехнологического производства, физиолого-биохимические характеристики и свойства которого определяют в конечном итоге эффективность всего биотехнологического процесса.

**Биореактор** – закрытая или открытая емкость, в которой при определенных условиях протекает на клеточном уровне контролируемая реакция, осуществляемая с помощью микроорганизмов.

**Вакцины** – это препараты, приготовленные из убитых или ослабленных болезнетворных микроорганизмов или их токсинов.

**Вектор** – самореплицирующаяся (автономная) молекула ДНК, используемая в генной инженерии для переноса генов и других последовательностей от организма-донора в организм-реципиент, а также для клонирования нуклеотидных последовательностей.

**Вектор** – молекула ДНК, способная переносить в клетку чужеродную ДНК любого происхождения и обеспечить там ее размножение.

**Генная инженерия** – совокупность приемов, методов и технологий, в том числе технологий получения рекомбинантных рибонуклеиновых и дезокси-рибонуклеиновых кислот, по выделению генов из организма, осуществлению манипуляций с ними и введению их в другие организмы.

**Генетический код (ГК)** – система записи наследственной информации в виде последовательности нуклеотидов в молекулах нуклеиновых кислот. Единицей ГК служит кодон, или триплет (тринуклеотид). ГК определяет порядок включения аминокислот в синтезирующуюся полипептидную цепь.

**Генетический риск** – возможность проявления непредсказуемых, опасных для здоровья и жизни человека и для окружающей среды наследственных изменений генома и качества организма.

**Генно-инженерная деятельность** – деятельность ученых, специалистов, научных организаций и государственных органов, направленная на получение, испытание, транспортировку и использование генетически модифицированных организмов (ГМО) и полученных из них продуктов.

**Генотерапия** – лечение наследственных болезней с помощью введенных в геном реципиента чужеродных генов или вживление полноценных генетических соматических клеток в ткани биологического объекта.

**Геном** – совокупность генов, содержащихся в гаплоидном (одинарном) наборе хромосом и в нехромосомных генах, расположенных в органеллах протоплазмы данного организма. Диплоидные организмы содержат два генома — отцовский и материнский.

**ДНК-лигаза** – фермент «сшивающий» участки молекулы ДНК.

**Иммобилизация** – перевод ферментов в нерастворимое состояние.

**Иммуногенность** – свойство антигена вызывать иммунный ответ.

**Интерфероны** – группа белковых веществ, вырабатываемых зараженными вирусами.

**Клонирование** – размножение в бактериальной клетке рекомбинантной молекулы ДНК.

**Кодон** – триплет нуклеотидов, кодирующий определенную аминокислоту или комплиментарный терминирующей сигнал.

**Компетенция** – способность клетки, ткани, органа, организма воспринимать индуцирующее воздействие и специфически реагировать на него изменением развития.

**Космиды** – плазмидные вектора, в которые встроен участок генома фага  $\lambda$ , обеспечивающий возможность упаковки этой молекулы ДНК в фаговую частицу. Фаговые частицы обеспечивают хорошее проникновение гибридной ДНК в клетку (путем инъекции), после чего происходит замыкание ДНК в кольцо по липким концам и репликация ее по плазмидному типу.

**Криоконсервация** – глубокое замораживание клеток.

**Культуральная жидкость** – сложная смесь, состоящая из клеток штамма-продуцента, раствора непотребленных питательных компонентов и накопившихся в среде продуктов биосинтеза.

**Лаг-фаза** – медленный рост культуры в период адаптации.

**Лигаза** – фермент, «сшивающий» связи между геном и плазмидой с образованием ковалентных фосфо-эфирных связей.

**Лигирование** – образование фосфодиэфирной связи между двумя основаниями одной цепи ДНК, разделенными разрывом. Этот термин употребляют также в случае соединения тупых концов и при образовании связи в РНК.

**Липкий конец** – свободный одноцепочечный конец двухцепочечной ДНК, комплементарной одноцепочечному концу, принадлежащему этой же или другой молекуле ДНК.

**Лиофильное высушивание** – обезвоживание после замораживания.

**Лузга** – отход при производстве масла из семян подсолнечника.

**Маркер (ДНК)** – фрагмент ДНК известного размера, используемый для калибровки фрагментов в электрофоретическом геле.

**Маркерный ген** – ген, идентифицированный по месту расположения и имеющий четкое фенотипическое проявление.

**Мезга** – отход производства крахмала, соков и т.д.



**Меласса** – отход производства сахара.

**Модификация продукта** – перестройка полученных соединений животного, растительного или микробного происхождения с целью придания им специфических свойств.

**Папаин** – фермент, получаемый из продуктов папайи.

**Плазмида** – добавочные кольца молекулы ДНК бактерий.

**Плазмида** – основа плазмидного вектора — кольцевая двухцепочечная ДНК, обладающая способностью к автономной репликации, а также к встраиванию в нее и передачи в геном реципиента чужеродных генов и других последовательностей ДНК.

**Промотор** – участок гена, ответственный за начало его транскрипции.

**Пролиферация** – новообразование клеток и тканей путем размножения.

**Рекомбинантные биообъекты** – биообъекты, в которые путем генно-инженерных манипуляций введена чужеродная ДНК, ответственная за синтез чужеродного или гетерологичного продукта.

**Рекомбинантный ген** – ген, состоящий из компонентов различных генов.

**Рекомбинантная ДНК** – ДНК, состоящая из участков различных исходных молекул ДНК.

**Рекомбинация** – перераспределение генетического материала родителей, приводящее к наследственной комбинативной изменчивости.

**Рестриктаза** – фермент, разрезающий молекулу ДНК.

**Рестриктаза** – это эндонуклеаза, узнающая какую-то последовательность внутри цепи ДНК (сайт рестрикции, см. выше) и проводящая гидролиз (разрыв) этой цепи.

**Реципиент** – клетка, в которую переносят чужеродный ген.

**Сайт рестрикции** – небольшой участок ДНК для узнавания ферментом – рестриктазой.

**Скрининг** – проверка полученных клонов.

**Соматическая гибридизация** – процесс вовлечения в генетическую рекомбинацию хромосомы и гены ядра и органелл вне сексуального цикла, например, путем слияния изолированных прото-

пластов. Приводит к появлению гибридных клеточных линий и соматических гибридов растений.

**Трансляция** – синтез белка в рибосомах при участии информационной, транспортной РНК и других факторов.

**Тотипотентность** – полноценность, информативность.

**Транскрипция** – образование РНК-копии на матрице ДНК с помощью фермента РНК-полимеразы.

**Трансформация** – процесс внедрения плазмиды-вектора внутрь клетки с внесением чужеродной ДНК.

**Ультрафильтрация** – отделение веществ с помощью мембранных фильтров.

**Фагмиды** – векторы содержащие элементы вирусной нуклеиновой кислоты и плазмиды, что дает им возможность в определенных условиях образовывать зрелые фаговые частицы или существовать в бактериальных клетках в виде плазмид.

**Фазмиды** – гибриды между фагом и плазмидой. После встройки чужеродной ДНК могут в одних условиях развиваться как фаги, в других – как плазмиды.

**Ферменты** – катализаторы белковой природы.

**Шелуха** – твердая оболочка семян.

**Экспрессия гена** — проявление (самовыражение) функционирования генетической информации, записанной в гене, в форме рибонуклеиновой кислоты, белка и фенотипического признака.

**Электропорация** – метод переноса генов в клетки с помощью электрического разряда, вызывающего образование дополнительных пор в клеточной мембране.

**Экзотоксины** – это белковые вещества, выделяемые клетками бактерий во внешнюю среду.

## Рекомендуемая литература

1. Ермаков, В. В. Вирусология и биотехнология : методические указания / В. В. Ермаков. — Самара : СамГАУ, 2024. — 54 с. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/392582>
2. Галиуллин, А. К. Ветеринарная биотехнология / А. К. Галиуллин, Р. Я. Гильмутдинов, В. И. Плешакова. — Санкт-Петербург : Лань, 2023. — 240 с. — ISBN 978-5-507-45765-6. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/319316>
3. Вирусология и биотехнология / Р. В. Белоусова, Е. И. Ярыгина, И. В. Третьякова [и др.]. — 5-е изд., стер. — Санкт-Петербург : Лань, 2023. — 220 с. — ISBN 978-5-507-47230-7. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/351851>
4. Якупов, Т. Р. Биотехнология в животноводстве : учебно-методическое пособие / Т. Р. Якупов, Ф. Ф. Зиннатов. — Казань : КГАВМ им. Баумана, 2023. — 50 с. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/330539>
5. Биотехнология и фармакология нейропептидов : учебное пособие / М. А. Самотруева, А. Л. Ясенявская, В. Х. Мурталиева, А. А. Старикова. — Астрахань : АГМУ, 2023. — 125 с. — ISBN 978-5-4424-0761-7. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/385286>
6. Бабайлова, Г. П. Технология производства продукции животноводства с основами биотехнологии: учебное пособие для вузов / Г. П. Бабайлова, Е. С. Симбирских, Ю. С. Овсянников. — Санкт-Петербург : Лань, 2022. — 240 с. — ISBN 978-5-8114-8738-7. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/200267>

7. Строганова, И. Я. Биотехнология в ветеринарной медицине : учебное пособие / И. Я. Строганова. — Красноярск : КрасГАУ, 2020 — Часть 1 : Общая биотехнология — 2020. — 191 с. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/187431>
8. Самотруева, М. А. Биотехнология и фармакология моноклональных антител : учебное пособие / М. А. Самотруева, А. А. Цибизова. — Астрахань : АГМУ, 2023. — 106 с. — ISBN 978-5-4424-0760-0. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/385283>
9. Коростелева, Л. А. Биотехнологии при производстве и переработке продукции животноводства : методические указания и рекомендации / Л. А. Коростелева. — Самара : СамГАУ, 2023. — 37 с. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/337985> (дата обращения: 18.03.2024). — Режим доступа: для авториз. пользователей.

*Учебное издание*

Дмитрий Юрьевич Ильин  
Галина Викторовна Ильина  
Светлана Анатольевна Сашенкова

## **БИОТЕХНОЛОГИЯ**

Практикум

Компьютерная верстка Г.В. Ильиной  
Корректор Л.Н. Каменская

Дата подписания к использованию 25.03.2024  
№ \_ в реестре электронных ресурсов ПГАУ  
Объем издания 5,06 Мб.

Федеральное государственное бюджетное образовательное  
учреждение высшего образования «Пензенский государствен-  
ный аграрный университет» 440014, Пенза, ул. Ботаническая,  
30 [www.pgau.ru](http://www.pgau.ru)