

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Самарский государственный университет
РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
Учреждение Российской академии наук
Самарский научный центр РАН

Ю.П. Фролов

**БИОТЕХНОЛОГИЯ
И БИОЛОГИЧЕСКАЯ НАНОТЕХНОЛОГИЯ**

Краткий курс

Учебное пособие

Самара
2010

ББК 30.16
УДК 631.147
Ф 91

Фролов Ю.П. Биотехнология и биологическая нанотехнология.
Краткий курс: Учебное пособие. Самара: СамНЦ РАН, 2010. 192 с.
ISBN 978-5-93424-504-8

В книге кратко изложены основы биотехнологии, представленные всеми разделами этой науки (сырьевая и энергетическая база биотехнологии, инженерная энзимология, промышленная микробиология, экологическая биотехнология, биологическая нанотехнология, процессы и аппараты биотехнологических производств). Предназначена в качестве учебного пособия по университетскому курсу «Введение в биотехнологию», может быть полезной аспирантам и студентам вузов биотехнологического профиля, обучающимся по многоуровневой системе.

Пособие может быть использовано студентами педагогических, сельскохозяйственных и медицинских вузов.

БК 30.16
УДК 631.147

Печатается по решению редакционно-издательского и методического Совета биологического факультета Самарского государственного университета и Издательского Совета СамНЦ РАН

Рецензенты:

заведующий кафедрой «Анатомии, физиологии и гигиены человека», доктор биологических наук, профессор Попов Ю.М. (Поволжская государственная социально-гуманитарная академия)
старший научный сотрудник, кандидат биологических наук
Медведева Т.Н. (Институт экспериментальной медицины и биотехнологии СамГМУ)

Печатается в авторской редакции
Компьютерный набор – Новичкова Е.А., Аглашова Е.Ю.
Компьютерная верстка – Новичкова Е.А.

Подписано в печать 02.11.10. Формат 60x84/16. Бумага офсетная.
Печать офсетная. Усл.-печ. л. 12,06; уч.-изд л. 11,22.
Гарнитура «Times New Roman». Тираж 500 экз. Заказ № 16328.

Отпечатано в типографии ООО «СамЛюксПринт».
г. Самара, ул. Ташкентская, 151 А. Тел. (846) 927-07-09.

ISBN 978-5-93424-504-8

© Фролов Ю.П., 2010
© Изд-во Совета СамНЦ РАН

*Светлой памяти моих
школьных учителей
посвящаю*

Предисловие

В 1985 г., четверть века назад, на биофаках госуниверситетов нашей страны появилась новая учебная дисциплина "Введение в биотехнологию". За относительно небольшой срок традиционная биотехнология пополнилась целым рядом направлений, практических достижений, граничащих с фантастикой. Получили широкое развитие работы по созданию генетически модифицированных растений (ГМ-растений), ряд из них был разрешен к коммерческому использованию. Было клонировано первое домашнее животное – овца Долли, а за ней еще несколько представителей других видов млекопитающих. Началась и успешно завершилась Международная программа "Геном человека". Был прочтен геном некоторых растений и животных. Успешно внедрили метод экстракорпорального оплодотворения (ЭКО), и стали реальностью так называемые суррогатные матери. В спешном порядке ведутся работы на людях со стволовыми клетками. С помощью ГМ-растений получены "съедобные" вакцины. На государственном уровне вышли работы по использованию достижений нанотехнологии, в частности нанобиотехнологии, являющейся, по-сути, молекулярной ветвью бионики, рождение которой было официально закреплено полвека назад (1960 г.). Внедрение технических средств нанотехнологии в существующий арсенал методов генетической и клеточной инженерии в будущем позволит творить настоящие чудеса. Это связано с тем, что человек успешно осваивает технологии вмешательства в "святое святых" живого – молекулярный уровень, представляющий собой фундамент иерархической пирамиды уровней организма. Данное обстоятельство накладывает высокую ответственность за последствия внедрения новинок биотехнологии в жизнь.

Одно из самых древних эмпирических достижений биотехнологии – получение путем брожения этилового спирта, несмотря на очевидную полезность его использования в ряде областей жизни, создало до настоящего времени практически неразрешимую проблему алкоголизации населения.

Еще более серьезно стоит вопрос о применении биологического оружия, "боевых" вирусов. Уже сейчас достижения нанотехнологии внедряются в военное дело с целью более "эффективного" уничтожения себе подобных. Большие споры в обществе вызывает вопрос об опасности для здоровья людей использования продуктов, полученных на основе ГМ-растений. Проблемы есть, и будут возникать новые, не менее серьезные. Успехи в области биотехнологии могут привести к новой "хиросиме", если попадут в руки безответственных политиков. Ученый, добившийся высоких успехов в области технологии, несет такую же ответственность за последствия применения своих достижений, как и тот, кто будет реально применять их в жизни.

В 1985 году при освоении курса "Введение в биотехнологию" большую помощь оказала книга "Биотехнология" (отв. ред. А.А. Баев, 1984) и вскоре вышедшая серия из 8 книг "Биотехнология" (1987). Биотехнология – наука многоплановая, поэтому названные книги, как и большинство ныне вышедших учебных пособий, являются плодами творчества авторских коллективов. Чтобы успевать за достижениями биотехнологии, учебные пособия должны постоянно обновляться. Среди таких пособий следует отметить как наиболее полную, к тому же снабженную лабораторным практикумом, книгу коллектива авторов под редакцией Н.В. Загоскиной и Л.В. Назаренко "Биотехнология: теория и практика" (М.: Оникс, 2009), а также книгу "Биотехнология" (под ред. Е.С. Воронина, СПб.: ГИОРД, 2008). Однако тираж этих книг недостаточен, чтобы обеспечить потребности вузов, поэтому возникает необходимость издания последними своих учебных пособий. Настоящая книга предназначена для студентов биофака госуниверситета и представляет собой краткий (сжатый) курс биотехнологии, дополненный разделами по биологической нанотехнологии и слабо освещаемым в других пособиях материалом по процессам и аппаратам биотехнологических производств. Она рассчитана на преподавание дисциплины "Введение в биотехнологию" по многоуровневой системе.

Автор выражает глубокую признательность инженерам кафедры биохимии Е.А. Новичковой и Е.Ю. Аглашовой, оказавшим помощь в техническом оформлении книги.

Введение

Задачи биотехнологии. До своего вытеснения из животного царства (около 3-5 млн. лет назад) человек был рядовым представителем организмов, населяющих нашу планету, подчинялся законам, общим для всех ее обитателей, находился под жестким давлением естественного отбора.

Даже беглого взгляда на образ жизни современного человека достаточно, чтобы выделить ведущие движущие силы, определившие развитие человечества от сообщества своих примитивных предков до цивилизации высокоинтеллектуальных представителей наших дней. Такими движущими силами и одновременно свойствами, присущими человеку, были труд и язык как средство общения, которые способствовали прогрессивному развитию мыслительных способностей. Зачатки трудовой и коммуникативной деятельности, а также целесообразного поведения имеются и в мире животных, есть у них и элементы познавательной деятельности, без которой невозможна адекватная реакция на изменяющиеся условия внешней среды. Однако прогрессивное развитие эти свойства получили только у человека.

Становление человека как особого вида, определяющего в настоящее время судьбу биосферы, происходило в сложных условиях длительного ледникового периода, сменившего около 100 тыс. лет тому назад теплый субтропический климат. Благоприятные доледниковые условия существования с обилием пищи не способствовали развитию человеческого начала наших древних предков. В суровый ледниковый и сложный послеледниковый периоды активность человека была полностью направлена на выживание, удовлетворение любыми путями своих биологических (животных) потребностей. Здесь в полной мере реализовались присущие человеку свойства, которые определили дальнейшую траекторию его развития.

В отношении взаимодействия человека с живой природой выделяют два периода: собирательство и переход от него к производящему хозяйству. Оба вида деятельности базируются на использовании биологических ресурсов, первоисточником которых являются растения. Однако, если собирательство, которое в определенной мере сохранилось до настоящего времени, связано с потреблением продуктов дикой природы, то производящее хозяйство, давшее начало современному сельскому хозяйству, которое подразделяется на растениеводство и животноводство (включает также рыбоводство, пчеловод-

ство и шелководство), стало активно изменять биологическую природу своих объектов, создавать не встречающиеся в природе сорта растений и породы животных. Сами по себе сельскохозяйственные растения и животные не являются объектами биотехнологии, они представляют собой лишь организмы, которые в практических целях подвергаются биотехнологическим воздействиям. Не является объектом биотехнологии и человек, здоровьем которого занимается медицина. Он тоже представляет собой организм, причем наиболее важный, на который направлены методы биотехнологии и биологической нанотехнологии (БНТ). В названных случаях суть биотехнологических операций заключается в искусственном воздействии на нижние уровни организации (клеточный, молекулярный).

Следует отметить, что биотехнология в определенной мере способна решить непосредственно с участием лишь своих объектов ряд задач, которые выполняет традиционное хозяйство. В частности, культивирование одноклеточных фотосинтезирующих организмов (например, хлореллы), дрожжей на отходах растениеводства пополняет кормовую базу животных, а выращивание дрожжей на этаноле позволяет получать белковый продукт пищевого назначения.

Благодаря разумной деятельности человек со времени освобождения от жесткого давления естественного отбора создал себе условия для относительно безопасной жизни. Он совершил множество научно-технических революций, сменявшихся сравнительно спокойными периодами внедрения их результатов в жизнь (что по своей сути напоминает картину протекания биологической эволюции). Благодаря этому человек коренным образом изменил окружающую среду, создал для себя своеобразный "технококон", внутри которого постоянно живет и работает. У него появились специфические потребности, отсутствующие у животных. Некоторые из них являются жизненно необходимыми, другие облегчают жизнь, удовлетворяют интеллектуальные потребности. Есть потребности, не приносящие пользы, порою вредные для здоровья. Кроме того, фактически любое достижение, исходно направленное на пользу человека, находит также губительное для него применение. Практически во всех названных случаях достижения биотехнологии и нанотехнологии находят прямое или косвенное использование, о чем пойдет речь в соответствующих разделах книги. В целом же можно отметить, что достижения биотехнологии широко применяются в сельском хозяйстве, медицине, очистке окружающей среды от загрязнений, биоэнергетике,

биогеометаллургии, пищевой, легкой и химической промышленности, освоении космического пространства, научных исследованиях, военном деле и т.д. Нередко использование какого-либо биотехнологического метода позволяет одновременно решить несколько задач из числа названных. Так, биотехнологическая утилизация древесных отходов позволяет получить этанол и очистить от них окружающую среду. Утилизация навоза в метантенках дает биогаз, компост, улучшает санитарное состояние на животноводческих фермах, предотвращает загрязнение окружающей среды.

Впечатляющие перспективы открываются перед человечеством на путях использования будущих достижений нанотехнологии.

Таким образом, в процессе освоения ресурсов живой и неживой природы человек постоянно использовал различные биотехнологии, позволяющие наиболее полно удовлетворять его потребности. Более того, биотехнологическим воздействиям человек стал подвергать и себя с целью улучшения здоровья, получения потомства, восстановления утраченных органов. При этом глубина биотехнологических воздействий на организмы и важность решаемых задач непрерывно возрастают.

Предмет биотехнологии. Термин "биотехнология" вошел в употребление с 70-х годов прошлого века и в связи с постоянным расширением круга задач, решаемых этой наукой, не имеет однозначного определения. Термин получен путем сочетания трех греческих слов: *bios* – жизнь; *techné* – искусство, мастерство, умение; *logos* – слово, учение. Технология, в широком смысле слова, – наука об оптимальных способах получения полезного результата. Дополнительное слово, конкретизирующее термин "технология", может обозначать материал, из которого получают продукт (например, технология *нефти и газа*), получаемый продукт (например, технология *лаков и красок*) и, наконец, сам процесс получения продукта (например, технология *электросварки*). Применительно к *биотехнологии* подходит третий вариант: *bios* означает активное начало, осуществляющее технологический процесс. Таким образом, дословно, биотехнология – это наука об использовании человеком биологических систем для решения практических задач. Поскольку ученые условились не включать в эту науку традиционное сельское хозяйство, имеющее дело со сложными организмами, и естественные биосистемы, а также учитывая искусственный характер биотехнологических процессов, можно составить представление о биотехнологии как науке об использова-

нии в качестве активного начала преимущественно одноклеточные, субклеточные и биомакромолекулярные системы для получения в искусственно созданных условиях полезного результата.

Термин "биотехнология" часто для краткости используется и при обозначении биотехнологического *процесса*.

Биотехнология является *прикладной* наукой, направленной на получение практического результата. Кроме того, она относится к числу *инженерных* дисциплин, сочетающих биологические знания с техническими (инженер – специалист с высшим техническим образованием). По этой причине на биотехнологических производствах работают специалисты с биологическим и техническим образованием, а чтобы понимать друг друга, они должны быть знакомы с основами биотехнологии.

Разделы и объекты биотехнологии. С учетом особенностей объектов биотехнологии и связанного с ними характера решаемых задач ее условно делят на следующие разделы:

1. Промышленная (техническая) микробиология. Ее объектами являются мельчайшие организмы, как правило, различимые только под микроскопом. Среди них – представители разных царств органического мира, относящиеся к прокариотам (бактерии, включая цианобактерии; архебактерии) и эукариоты (микроскопические грибы, микроскопические формы водорослей и простейшие). Сюда же относятся и вирусы.

2. Клеточная (и тканевая) инженерия. объектами которой являются клетки многоклеточных организмов – животных (включая человека) и растений.

3. Инженерная энзимология, ее объектами являются ферменты.

4. Генетическая инженерия. Объектами генетической инженерии являются молекулы ДНК, превращаемые с помощью специальных технологий в рекомбинантные ДНК.

Во всех названиях этих разделов биологические термины (микробиология, клеточная, энзимология, генетическая) сочетаются с техническими (промышленная, техническая, инженерия, инженерная), что лишний раз подчеркивает инженерно-биологическую направленность биотехнологии.

Теоретическая база биотехнологии. Биотехнология (в современном понимании) по сравнению с классическими биологическими науками, является очень молодой. Бурное развитие и большие успехи, достигнутые биотехнологией, объясняются тем, что она возникла

на стыке хорошо разработанных ранее наук. К их числу, прежде всего, относятся:

1. Микробиология и вирусология.
2. Энзимология.
3. Генетика.
4. Молекулярная биология.
5. Химическая технология.

Сырьевая база биотехнологии. Для получения продукции на биотехнологических предприятиях, как и на любом производстве, требуется сырье. Сырьем называют исходный материал, используемый в производстве продукции. Используемое на биологических предприятиях сырье отличается большим разнообразием. Выбор того или иного вида сырья в значительной степени определяет технологию производства, себестоимость и качество получаемого продукта. Прежде чем запустить сырье в биотехнологический процесс, его часто подвергают предварительной обработке (измельчение, обогащение, гидролиз, разделение на фракции и т.д.), качественному и количественному анализу. Сырье, прошедшее такую обработку, называется технологическим.

Наибольшее количество сырья потребляет промышленная микробиология. Оно идет на приготовление питательных сред для выращивания микроорганизмов. Оптимальный состав среды для конкретной ферментации устанавливается опытным путем, но все среды должны удовлетворять некоторым общим требованиям.

Во-первых, они должны поставлять энергию, необходимую для жизнедеятельности организмов. Для гетеротрофов источником энергии являются органические вещества, для хемолитотрофов – способные к окислению неорганические соединения. Источником энергии для фототрофных организмов служит свет.

Во-вторых, среда должна быть источником углерода. Гетеротрофные организмы удовлетворяют потребность в углероде за счет источника энергии, автотрофные организмы (хемолитотрофы и фототрофы) используют диоксид углерода.

В-третьих, питательная среда должна содержать азот в форме аммиака, аммонийных солей или органических соединений (аминокислоты, пурины, пиримидины).

В-четвертых, в среде должны присутствовать в достаточном количестве элементы минерального питания (фосфор, магний, кальций, калий, сера, натрий, микроэлементы: железо, медь, цинк и др.).

Сырье должно удовлетворять потребности микроорганизмов и клеток в пластическом материале, идущем на построение внутриклеточных структур и биосинтез химических соединений на экспорт, а также во многих случаях и в энергии.

В качестве сырья используются природные материалы и отходы производства. Сырье подразделяют по происхождению на минеральное, растительное и животное, по химическому составу – неорганическое и органическое, по агрегатному состоянию – твердое, жидкое и газообразное.

Минеральное сырье, в свою очередь, делят на рудное (металлическое), нерудное (неметаллическое) и горючее (органическое). Рудное сырье представлено преимущественно оксидами и сульфидами металлов. Нерудное сырье разнообразно по составу и применяется либо в естественном состоянии (песок, глина, слюда, асбест и др.), либо поступает на химическую переработку (фосфориты – $\text{Ca}(\text{PO}_4)_2$; апатиты – $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 + \text{CaF}_2$ или CaCl_2 ; и т.д.). Для биотехнологии может представлять интерес сероводород, образующийся в глубинах Черного моря при разложении органических веществ в условиях недостатка кислорода. Горючие природные ископаемые: торф, бурые и каменные угли, сланцы, нефть, природный газ используют в качестве источника сырья или энергии.

В качестве сырья в биотехнологии используются также воздух (кислород – 21%, азот – 78%, углекислый газ – 0,03% и др.) и вода (в частности, при фотосинтезе).

Растительное и животное сырье по своему назначению подразделяют на пищевое (масла, жиры, молоко, овощи и др.) и техническое (древесина, хлопок, кожа, шерсть и др.).

Кроме того, сырье подразделяют на возобновимое (растительное, животное) и невозобновимое (минеральное).

Основными направлениями в решении сырьевой проблемы являются: использование более дешевого сырья; применение отходов как вторичных материальных ресурсов; применение концентрированного сырья; комплексное использование сырья; замена пищевого сырья непищевым.

Энергетическая обеспеченность. Биотехнологические процессы протекают как с выделением, так и с поглощением тепла. В первом случае (экзэргонические процессы) необходимо рационально использовать выделяющуюся энергию, во втором – правильно выбрать источник энергии и организовать подвод тепла в зону реакции.

Раздел науки, занимающийся изучением оптимального сочетания технологии и ее энергетики называют энерготехнологией. В настоящее время большое внимание уделяется энергосберегающим технологиям. Показателем эффективности использования энергии является ее расход на единицу получаемой продукции (кВт·ч/кг, кДж/кг).

Часть энергии микроорганизмы получают с пищей, окисляя которую в аэробных или анаэробных условиях, они синтезируют молекулы АТФ, расходуемые на процессы биосинтеза. Фототрофные организмы получают большую часть энергии в форме света, естественного или искусственного. Для получения последнего расходуется электроэнергия. Водородные бактерии используют энергию окисления водорода, который в промышленности получают методом конверсии, потребляющим тепло, или путем электролиза воды, связанным с расходом электроэнергии.

Кроме подвода энергии, необходимой для осуществления биохимических реакций, существуют и другие статьи ее расхода. Чтобы процесс шел с высокой скоростью, культуральную среду необходимо подогреть до определенной температуры и поддерживать ее на этом уровне. Кроме того, энергия расходуется на перемешивание культуральной среды, перекачивание теплоносителя, растворов субстрата и продукта. Острый пар используется на стерилизацию оборудования и сырья. Энергия требуется и для таких технологических процессов, непосредственно не связанных с биохимическими реакциями, как упаривание, сушка, фильтрация, ректификация, центрифугирование, вакуумирование, охлаждение, электрофорез и т.д.

История биотехнологии. Историю развития биотехнологии условно можно разделить на три, сокращающихся по продолжительности, этапа. Первый этап (предыстория) длился несколько тысяч лет, второй (промышленная микробиология) – более сотни лет, третий (собственно биотехнология) – десятки лет. В последние годы большой интерес привлекает к себе нанотехнология. Один из ее разделов – биологическая нанотехнология (БНТ), одновременно является, по сути, и разделом биотехнологии.

Первый этап начался несколько тысяч лет назад с использования процессов, активным началом которых были микроорганизмы и ферменты. Еще древним народам были известны виноделие, приготовление уксуса, пивоварение, выпечка хлеба из кислого теста. Пещерный человек обнаружил, что пролежавшее несколько дней мясо было бо-

лее приятно на вкус, чем съеденное сразу после охоты. Он умел также приготавливать из фруктов и зерна опьяняющие напитки. Дозревание мяса и изготовление алкогольных напитков были первыми использованными человеком биотехнологическими процессами (ферментативным и микробиологическим). В этот ранний период люди рассматривали брожение как таинственное явление. Но, даже не зная об истинных участниках этих процессов, они квасили и солили овощи, силосовали корма, мацерировали лен и коноплю, изготавливали сыры, разнообразные молочнокислые продукты, алкогольные напитки, с помощью фекалий сельскохозяйственных животных удаляли шерстный покров со шкур при изготовлении кожаных изделий и т.д.

Второй этап начался благодаря классическим исследованиям Л. Пастёра, который в 1857 г. установил, что спиртовое брожение осуществляется живыми клетками дрожжей. Под существующие микробиологические производства была подведена теоретическая база. Другие наблюдения Л. Пастёра привели его к предположению о возможности лечения инфекционных болезней человека введением в организм микробов, подавляющих жизнедеятельность возбудителя заболевания. В начале XX века немецкие ученые Эммерих и Лоу выделили из бактерий антибиотик пиоцианазу, способный разрушать некоторые болезнетворные микроорганизмы, и успешно применили его для лечения больных. За 50 лет до них русские врачи А.Г. Полотебнов и В.А. Манассин установили лечебное действие плесневого гриба (кожуры ашельсинов) в отношении дерматозов. В 1928 г. английский микробиолог А. Флеминг получил экстракт из плесени, который назвал пенициллином. Позднее были выделены другие антибиотики: стрептомицин, хлорамфеникол, тетрациклин, эритромицин, вистатин и др. В настоящее время антибиотики производятся в промышленных масштабах.

К началу XX века относится появление метода обработки на иловых площадках сточных вод с разложением их органической части микроорганизмами грунта. Впоследствии для биологической очистки сточных вод стали строить более эффективно действующие сооружения, а сам метод завоевал всеобщее признание и стал основным в промышленности службы быта, обеспечивающей санитарное благосостояние населенных пунктов.

Первая половина XX века ознаменовалась разработкой многих промышленных процессов ферментации: производство различных спиртов, уксусной, молочной, лимонной и глюконовой кислот, апето-

на, глицерина. Для этого периода характерна ориентация на проведение анаэробных ферментаций в глубинных культурах (микроорганизмы произвольно суспензируются в культуральной среде) и аэробных ферментаций в поверхностных культурах (микроорганизмы находятся в контакте с воздухом на поверхности питательной среды). Успехи в получении больших количеств стерильного воздуха экономичным путем привели к преимущественному проведению аэробных ферментаций глубинными методами в аппаратах емкостного типа. Такие процессы были реализованы, в частности, при производстве пекарских дрожжей, органических кислот, пенициллина.

В первые послевоенные годы размах работ по промышленным ферментациям существенно сузился. Это обуславливалось бурным ростом нефтехимической промышленности и появившейся в связи с этим возможностью получать многие соединения методами химического синтеза. Последние в этот период с экономической точки зрения оказались наиболее привлекательными при получении различных органических кислот и растворителей. Однако в связи с расширением возможностей промышленной микробиологии такое положение оказалось временным. Химическая промышленность, как правило, работает на невозобновимом сырье, нередко сильно загрязняет окружающую среду. Биотехнология, напротив, чаще всего работает на возобновимом сырье, может сама очищать окружающую среду от загрязнений, вырабатывать энергию, получать сложные вещества и решать много таких задач, которые не под силу химии.

Третий этап начался во второй половине XX века, и характеризуется он появлением принципиально новых направлений в биологии, обусловленных успехами биологических наук, в частности молекулярной биологии.

В нашей стране микробиологическая промышленность в 1966 г. была выделена в отдельную отрасль, главным образом в связи с созданием крупного производства кормовых дрожжей на базе парафинов нефти. Было образовано главное управление микробиологической промышленности при Совете министров (СМ) СССР — Главмикробиопром. На предприятиях Главмикробиопрома было сосредоточено все микробиологическое производство, за исключением производства антибиотиков и некоторых специальных медицинских препаратов. Со второй половины 70-х годов в связи с нарастающим истощением невозобновимых природных ресурсов, загрязнением окружающей среды, ростом народонаселения, с одной стороны, и рево-

люционными открытиями в биологии – с другой, все большее внимание ученых, хозяйственных руководителей и правительств привлекает биотехнология, которая потенциально способна внести крупный вклад в решение перечисленных выше глобальных проблем. Важный вклад в становление биотехнологии и ее последующее развитие в нашей стране внесли постановления ЦК КПСС и СМ СССР "О мерах по ускорению развития молекулярной генетики и использованию их достижений в народном хозяйстве" (1974 г.) и "О дальнейшем развитии физико-химической биологии и биотехнологии" (1981 г.). Позднее на самых высоких уровнях дополнительно решался ряд организационных вопросов, связанных с ускорением работ в области биотехнологии. В частности, было введено преподавание в университетах учебной дисциплины "Введение в биотехнологию". В декабре 1985 г. вместо Главмикробиопрома было создано Министерство микробиологической и медицинской промышленности СССР во главе с Валерием Алексеевичем Быковым (в прошлом выпускником и преподавателем Куйбышевского политехнического института).

В настоящее время во всем мире большое внимание уделяется развитию нанотехнологий, на выполнение теоретических и экспериментальных исследований выделяются большие средства, получены первые результаты от внедрения в практику ряда нанотехнологических разработок. Та часть нанотехнологии, которая связана с биологическими системами, обычно называется биологической нанотехнологией (иногда, нанобиотехнологией) и является разделом биотехнологии (подобно молекулярной биологии, которую часто считают разделом биохимии).

Глава 1. ИНЖЕНЕРНАЯ ЭНЗИМОЛОГИЯ

1.1. Краткие сведения о ферментах

Ферменты (энзимы) представляют собой молекулярные системы, относящиеся к самому нижнему уровню биологической организации. Биологическими системами они являются по своему происхождению, преимущественно внутриклеточной или внутриорганизменной локализации и выполняемым функциям. Они обладают высокой автономностью – способностью функционировать за пределами организма. На этом свойстве основано их применение в биотехнологии (инженерная энзимология). Все ферменты являются белковыми молекулами, имеющими большую массу (от 15 тысяч до нескольких миллионов дальтон) и сложное строение, выражающееся в наличии нескольких иерархических уровней конформации (первичная, вторичная, третичная, четвертичная структуры).

Молекула фермента представляет собой кибернетическую систему, выходом которой (управляемым параметром) является каталитическая активность. Несмотря на свою относительно простую организацию (по сравнению с клеткой и многоклеточным организмом), молекула фермента обладает определенной структурной и функциональной специализацией. Прежде всего, она имеет область, в которой происходит связывание и превращение субстрата. В свою очередь, в этой области, называемой активным центром, выделяют каталитическую зону и зону связывания. Каталитическую зону образуют те группировки активного центра, которые контактируют с подвергающимися превращению фрагментами молекул субстрата, то есть принимают непосредственное участие в синтезе или расщеплении связи субстрата. Зону связывания образуют группировки, контактирующие с непревращаемыми фрагментами субстрата и укрепляющими его в активном центре. Однако имеется немало ферментов, которые кроме активного центра имеют аллостерический центр, выполняющий функцию управляющей (регуляторной) части. Такого рода ферменты, называются аллостерическими; они обычно имеют четвертичную структуру и состоят из определенного числа субъединиц. Активный и аллостерический центры в пределах молекулы фермента пространственно разделены. Молекула вещества, оказывающего управляющее воздействие (эффектор), соединяется с аллостерическим центром, в результате чего происходит изменение состояния активного центра,

которое, в свою очередь, вызывает повышение или понижение скорости ферментативной реакции.

Ферменты чрезвычайно чувствительны к внешним воздействиям. На их активность влияют ингибиторы, активаторы, порою высокие концентрации субстрата (субстратное торможение), продукта (ретроингибирование), концентрация ионов водорода (рН среды), температура.

Первичная структура фермента детерминирована на молекуле ДНК. Совокупность ферментов (совместно со структурой клетки) определяют направление метаболизма в биосистемах. Биохимические реакции лежат в основе всех процессов жизнедеятельности организмов, имеют свою специфику и классифицируются в соответствии со своей системой, которая распространяется и на ферменты. Согласно классификации, разработанной Международной комиссией по ферментам и принятой в 1961 г., все ферменты разделяют на шесть классов:

1. Оксидоредуктазы (катализируют окислительно восстановительные реакции).
2. Трансферазы (катализируют реакции переноса группировок с одного соединения на другое).
3. Гидролазы (катализируют расщепление внутримолекулярных связей органических веществ при участии молекул воды).
4. Лиазы (катализируют реакции негидролитического расщепления с образованием двойных связей или реакции присоединения по двойным связям).
5. Изомеразы (катализируют реакции изомеризации молекул).
6. Лигазы (катализируют реакции синтеза с использованием энергии макроэргических соединений).

Приведенная характеристика классов свидетельствует о том, что в реакции с молекулой фермента могут принимать участие одна, две и даже три молекулы субстратов. В связи с этим такие реакции называют соответственно одно-, двух- и трехсубстратными. Кроме того, в зависимости от механизма связывания молекул субстратов с ферментом, двух- и трехсубстратные реакции подразделяют на несколько типов. Так, для двухсубстратных реакций известны неупорядоченный механизм (варианты: независимое и взаимозависимое присоединение молекул субстратов), упорядоченный механизм связывания субстратов и так называемый механизм "пинг-понга".

Ферменты, подобно катализаторам небиологической природы, ускоряют в равной степени как прямую, так и обратную реакции, то

есть обладают обратимостью действия. Однако в большинстве случаев условия протекания реакций обеспечивают подавляющее преобладание одной из них. Такие реакции называются односторонними. В некоторых случаях скорости прямой и обратной реакций имеют соизмеримые значения. Такие реакции называют двухсторонними.

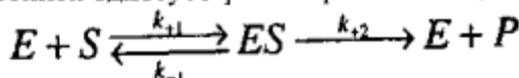
1.2. Основные закономерности ферментативной кинетики

Для протекания любой реакции необходимо, чтобы реагирующие молекулы пришли в контакт друг с другом. Однако не каждое столкновение молекул сопровождается их взаимодействием. Реакция протекает только в том случае, если молекулы обладают достаточным запасом кинетической энергии. Наименьшее значение ее называется энергией активации. Совокупность молекул любого вещества представляет собой статистический набор корпускул с различной энергией. Все молекулы этой совокупности, обладающие энергией, равной и превышающей энергию активации, имеют потенциальную возможность вступить в химическую реакцию. С увеличением температуры доля таких молекул растет, а с ней повышается и скорость реакции. Однако большинство биологических макромолекул при увеличении температуры сверх определенного предела подвергаются тепловой денатурации.

Кроме повышения температуры существует второй путь ускорения химической реакции – понижение энергии активации. Применительно к биологическим катализаторам (ферментам) это достигается в большой мере за счет многостадийности реакции. В каталитическом действии ферментов можно выделить, как минимум, три стадии: 1) присоединение молекулы субстрата S к молекуле фермента E с образованием фермент-субстратного комплекса (ФСК) ES ; 2) превращение субстрата; 3) отделение конечного продукта (или продуктов) реакции P от фермента. Каждой из этих стадий соответствует свое значение энергии активации, значительно меньшее той энергии активации, которая требуется в случае протекания реакции неферментативным путем. Благодаря разделению одного большого энергетического порога на пути к образованию продукта на несколько малых порогов, доля активных молекул (при столкновении имеющих энергию, равную или большую энергии активации отдельных стадий реакции) существенно возрастает, а с ней многократно увеличивается скорость превращения субстрата в продукт.

Помимо влияния на скорость ферментативной реакции факторов, влияющих непосредственно на молекулу фермента (интенсивное

воздействие), его значение можно увеличить с помощью экстенсивных факторов – повышения концентрации фермента и субстрата. Для простейшей односторонней односубстратной реакции вида



зависимость скорости реакции v_{+2} от концентрации фермента и субстрата выражается уравнением Михаэлиса-Ментен

$$v_{+2} = \frac{k_{+2}[E_0][S]}{K_m + [S]}, \quad (1.1)$$

где $[E_0]$ – исходная концентрация фермента; $[S]$ – концентрация субстрата; K_m – константа Михаэлиса, равная выражению $(k_{-1} + k_{+2})/k_{+1}$.

Если в этом уравнении кинетики простейшей ферментативной реакции концентрацию субстрата принять постоянной, то легко установить, что скорость реакции линейно зависит от концентрации фермента. Если же принять постоянное значение $[E_0] = [E] + [ES]$ (где $[E]$ – концентрация не связанных с субстратом, свободных молекул фермента), то окажется, что скорость реакции с увеличением концентрации субстрата растет по криволинейному закону (параболическая зависимость), достигая максимального значения $V = k_{+2}[E_0]$ при концентрации $[S] \gg K_m$ (рис. 1.1).

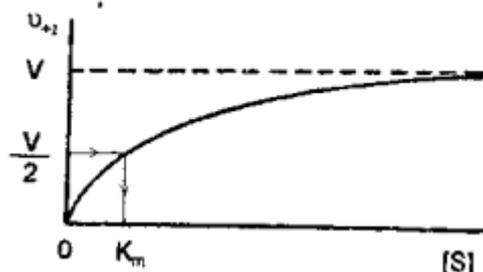


Рис. 1.1. Зависимость скорости односубстратной односторонней реакции v_{+2} от концентрации $[S]$ ($[E_0] = \text{const}$)

Нетрудно показать, что константа Михаэлиса численно равна концентрации субстрата, при которой скорость реакции равна половине максимальной ($v_{+2} = 0,5V$).

Если уравнение Михаэлиса-Ментен

$$v_{+2} = \frac{V[S]}{K_m + [S]} \quad (1.2)$$

записать в обратном виде

$$\frac{1}{v_{+2}} = \frac{K_m}{V} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V}, \quad (1.3)$$

то полученное уравнение Лайнуивера-Берка (1.3) графически будет выражено в виде прямой линии, отражающей зависимость $1/v_{+2}$ от $1/[S]$.

На этом графике (рис. 1.2) обратные значения максимальной скорости реакции и константы Михаэлиса ($1/V$ и $1/K_m$) находятся в точках пересечения прямой с осями координат ($1/v_{+2}$ и $1/[S]$).

Все остальные ферментативные реакции в координатах Лайнуивера-Берка выражаются в виде прямых линий, кроме случая субстратного торможения.

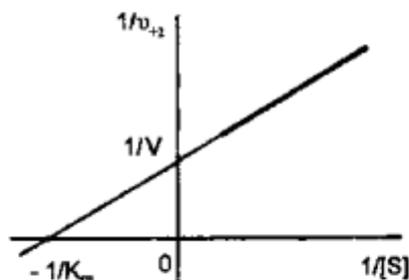


Рис. 1.2. Зависимость $1/v_{+2}$ от $1/[S]$ для односторонней односубстратной реакции

Скорость ферментативной реакции может быть снижена или полностью остановлена при действии ингибиторов – веществ, специфически (избирательно) действующих на молекулы ферментов. Ингибирование бывает необратимым и обратимым, при котором одновременно с образованием фермент-ингибиторного комплекса идет его диссоциация. Кроме того, ингибирование бывает конкурентным, смешанным и бесконкурентным, а по силе воздействия – с полным или частичным эффектом торможения.

Необратимое ингибирование (с полным или частичным эффектом торможения) имеет место, когда ингибитор прочно связывается с активным центром фермента.

Конкурентное ингибирование проявляется на стадии образования ФСК, когда субстрат и ингибитор конкурируют за возможность присоединения к зоне связывания активного центра. Неконкурентное ингибирование проявляется на стадии превращения субстрата в продукт, при этом ингибитор подавляет активность каталитической зоны активного центра. При смешанном торможении ингибитор одновременно замедляет скорость образования ФСК и каталитического превращения субстрата. Ингибитор может присоединяться непосред-

венно к ФСК, вызывая остановку реакции или ее замедление (бесконкурентное ингибирование).

Конкурентное ингибирование позволяет достичь максимального значения скорости реакции V путем увеличения концентрации субстрата (рис. 1.3).

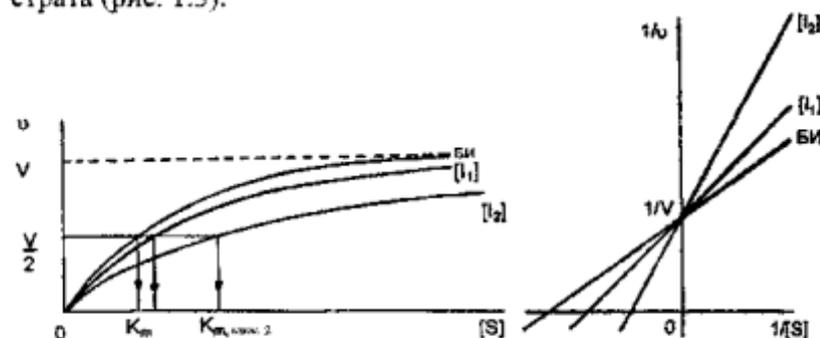


Рис. 1.3. Влияние различных концентраций конкурентного ингибитора I на скорость односубстратной односторонней ферментативной реакции ($[I_2] > [I_1]$; БИ – без ингибитора; $K_{m, \text{каж. 2}}$ – “кажущееся” значение K_m при $[I] = [I_2]$)

Неконкурентное ингибирование не позволяет достичь максимальной скорости реакции V путем повышения концентрации субстрата (рис. 1.4).

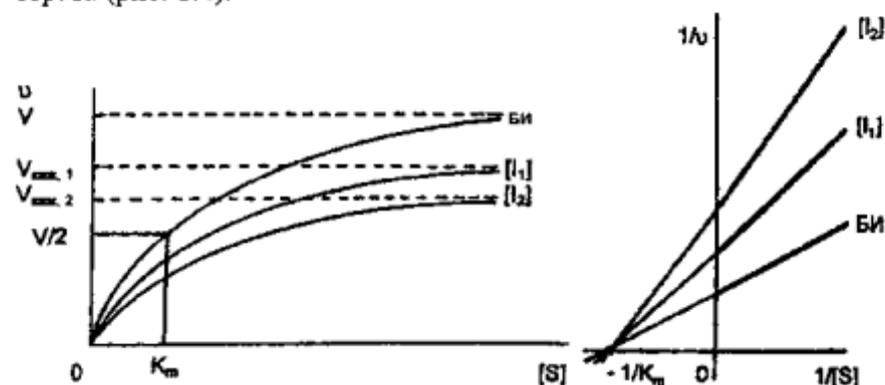


Рис. 1.4. Влияние различных концентраций неконкурентного ингибитора I на скорость односубстратной односторонней ферментативной реакции для случая полного торможения ($[I_2] > [I_1]$; БИ – без ингибитора)

Снижать скорость ферментативной реакции могут и сами молекулы субстрата, выступая в роли ингибиторов, обратимо образующих

комплекс ES_2 . Ингибирование проявляется на стадии образования ФСК. Схематично механизм субстратного торможения представлен на рис. 1.5, а зависимость скорости реакции от концентрации субстрата – на рис. 1.6.

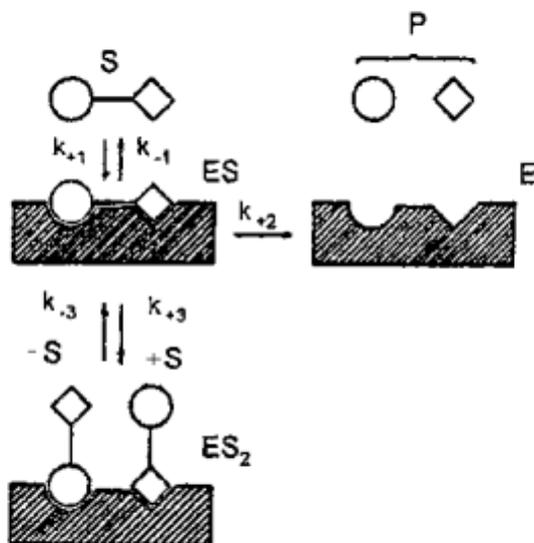


Рис. 1.5. Концептуальная модель субстратного торможения ферментативной активности

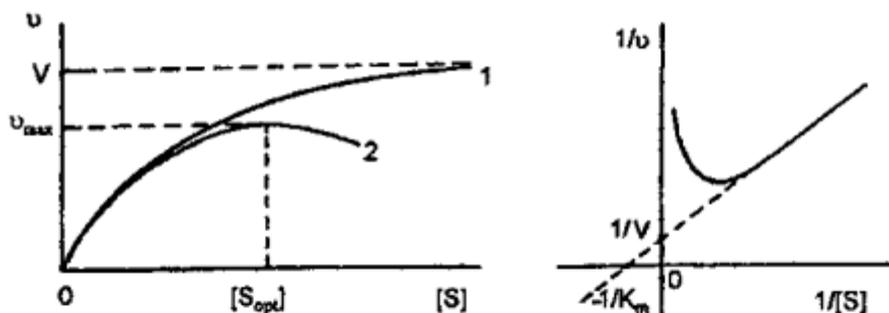


Рис. 1.6. Зависимость скорости односторонней реакции от концентрации субстрата в случае субстратного торможения (2) и при его отсутствии (1); $V = k_{+2}[E_0]$

Ингибирование продуктом реакции (ретроингибирование) осуществляется по механизму отрицательной обратной связи, при котором один из конечных продуктов метаболической цепочки связывается с аллостерическим центром фермента, стоящим в ее начале (та-

кое влияние, например, оказывает фосфоенолпируват – продукт одной из завершающих реакций гликолиза, на фермент подготовительной стадии этого процесса – фосфофруктокиназу).

Температура увеличивает скорость как прямой, так и обратной реакции, однако это увеличение не беспредельно, так как одновременно повышается и скорость денатурации молекул фермента. Поэтому каждый фермент имеет температурный оптимум (t_{opt}), когда скорость реакции максимальна (рис. 1.7а). То же можно сказать и о кислотности (рН) среды, которая влияет на конформацию фермента. Для него тоже имеется оптимальное значение pH_{opt} , при котором скорость реакции максимальна (рис. 1.7б).

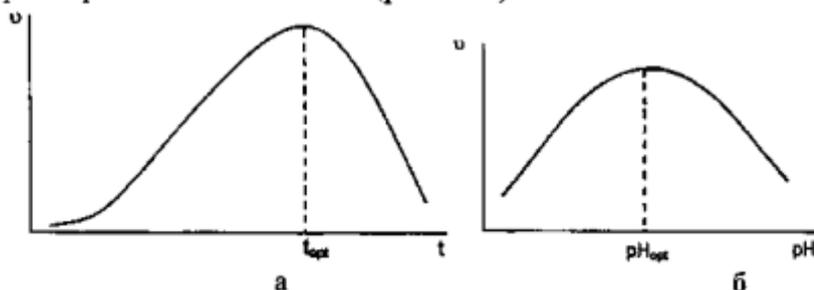


Рис. 1.7. Влияние температуры и рН среды на скорость ферментативной реакции

На скорость ферментативной реакции влияют магнитные и электрические поля, электромагнитное излучение.

1.3. Источники ферментов

В зависимости от области применения ферментов к ним предъявляются различные требования по степени чистоты, составу, источнику получения. Например, для медицинских целей, как правило, пригодны лишь индивидуальные ферменты высокой степени чистоты, в то время как для сельскохозяйственного производства достаточно иметь многокомпонентные комплексные ферментные препараты, причем низкоочищенные более эффективны.

Источниками ферментов могут быть ткани различных животных, растения и микроорганизмы.

Ферментами богаты поджелудочная железа и слизистая оболочка желудка, поэтому выгодно использовать эти отходы мясной промышленности для выделения ферментов. Из водного экстракта поджелудочной железы, в частности, получают комплексный ферментный препарат, содержащий многие гидролитические ферменты (амилазу, липазу, про-

теиназу, рибонуклеазу и др.). Разработаны методы получения этих ферментов в высокоочищенном кристаллическом виде.

Препараты некоторых гидролитических ферментов получают из высших растений: папаин – из млечного сока дынного дерева папайи; бромелин – из стеблей ананаса; фицин – из сока деревьев или листьев рода фикус (чаще из листьев инжирного дерева).

Наиболее доступным и почти неограниченным источником получения ферментов в промышленном масштабе являются микроорганизмы, из которых можно выделить практически любые из известных ферментов. Некоторые ферментные препараты, например, целлюлозолитические ферменты (целлюлазы, гемицеллюлазы), глюкозоизомеразы и др. могут быть получены только с помощью микроорганизмов.

В настоящее время описано более 2000 реакций различного типа, осуществляемых микроорганизмами (окисление, восстановление, метилирование, ацетилирование и др.), которые имеют разную локализацию. Ферменты, синтезируемые микроорганизмами, могут быть внутриклеточными (эндоферменты) и внеклеточными (экзоферменты). Внеклеточные ферменты обеспечивают клетку питательными веществами, расщепляя высокомолекулярные субстраты в окружающей ее среде. К внеклеточным ферментам относятся в основном гидролазы. Функциональная особенность этих ферментов обуславливает высокую продуктивность их биосинтеза, устойчивость к химическим и физическим факторам среды. Путем мутагенеза, селекции, генетической инженерии, подбора оптимальных условий культивирования, использования индукторов удается многократно повысить продуктивность исходных штаммов.

Ферменты микроорганизмов разделяют на конститутивные (постоянно синтезируются независимо от условий существования или наличия субстратов) и индуцируемые (адаптивные), скорость синтеза которых изменяется в зависимости от условий существования. К их числу относится большинство гидролитических ферментов (экзоферменты). Спектр адаптивных ферментов зависит от химической природы субстрата, на изменение которого направлена их активность. Механизм этой зависимости объясняется теорией индуцированного синтеза ферментов. При культивировании продуцентов таких ферментов, в особенности на синтетических средах в глубинных условиях, применяют специфические индукторы.

По отношению к температуре микроорганизмы подразделяют на три группы: психрофилы (оптимум в интервале 0-15°), мезофилы (25-

37°) и термофилы (55-75°). Большинство используемых в биотехнологии микроорганизмов относится к мезофилам.

Микробные ферменты перед ферментными препаратами растительного и животного происхождения имеют следующие преимущества:

- 1) широкий спектр образуемых ферментов, который позволяет использовать одни и те же микроорганизмы для получения нескольких ферментов;
- 2) доступность сред, включающих отходы различных производств, используемых для выращивания микроорганизмов;
- 3) высокая скорость выработки экзоферментов и накопления биомассы, содержащей эндоферменты;
- 4) возможность существенно интенсифицировать образование ряда ферментов путем подбора питательной среды и получения высокопродуктивных штаммов;
- 5) накопление большинства ферментов в культуральной среде, что значительно упрощает их выделение.

1.4. Ферментные препараты

Отечественная промышленность освоила выпуск большого ассортимента технических ферментных препаратов, которые кроме основного фермента содержит комплекс других ферментов и различные балластные примеси. В промышленных препаратах, как правило, требуемый препарат составляет 1-5 % от общего белка.

Основной объем промышленного производства микробных ферментов составляют внеклеточные белки, причем наиболее значительную долю составляют бактериальные протеазы. Внутриклеточные ферменты представляются наиболее перспективными для решения многих проблем. Однако возникают сложности с их выделением, поэтому их производство ограничено. Только глюкозоизомераза составляет исключение из-за большого объема производимого глюкозо-фруктозного сиропа.

Препараты ферментов получают с помощью глубинного или поверхностного культивирования микроорганизмов. В названии препарата это отражено соответственно буквами «Гх» и «Пх», а степень очистки — числом, например: Г10х, П20х. Ниже представлен список основных отечественных ферментных препаратов, освоенных производством.

Амилолитические препараты:

Амилоризин Пх, П20х, Г10х

Амилосубтилин Г3х, Г15х

Амиломезентерин Г5х, Г15х

Глюкаваморин Пх

Глюкозидомикопсин Г3х

Пектолитические ферментные препараты:

Пектаваморин Пх, Г3х, Г10х, Г20х

Пектофостидин Г3х

Целлюлолитические ферментные препараты:

Целловиридин Пх, П10х

Протеолитические ферментные препараты:

Проторизин П20х

Прототеризин П10х, Г10х

Протосубтилин Г3х, Г10х, Г20х

Протомезентерин Г10х

Смешанные ферментные препараты:

Амилоризин П10х – амилаза + протеаза

Пектаваморин П10х; пектофостидин П10х, Г10х – пектолитические ферменты + протеаза

Ренниномезентерин Г10х, Г20х – молокосвертывающий фермент + протеаза

Этот список ферментных препаратов промышленного назначения может быть продолжен.

Кроме перечисленных ферментных препаратов освоено производство ферментов для проведения медицинских анализов и научных исследований. Несмотря на то, что валовой объем производства этих ферментов относительно невелик, их выпуском занимается большое количество фармацевтических и биохимических фирм, а сами ферменты обычно высокоочищенные и имеют большую стоимость.

1.5. Выделение и очистка ферментов

Выделение и очистка ферментов обычно представляет собой сложный многостадийный процесс, ход которого определяется физико-химическими свойствами фермента и свойствами его источника. Все процедуры должны проводиться таким образом, чтобы в минимальной степени инактивировать фермент. С этой целью во многих случаях выделение ферментов проводят при пониженных температу-

рах в присутствии различных стабилизирующих агентов (субстратов, кофакторов, комплексообразователей, восстанавливающих веществ). Необходимо предварительно исследовать зависимость активности и стабильности фермента от pH среды, ионной силы и природы буфера, температуры, способа дезинтеграции, присутствия растворителей. Ферменты, которые инактивируются кислородом, следует выделять в бескислородных условиях (в среде азота).

При выделении экзоферментов используется культуральная среда, которую потом отделяют от клеток. Затем из нее извлекают нужные ферменты.

При выделении внутриклеточных и клеточносвязанных ферментов необходимо предварительно разрушить клеточные оболочки. Процедура их разрушения для клеток животных и растений более щадящая, а для микроорганизмов – более грубая, способная привести к существенному снижению активности ферментов.

Дезинтеграция клеток. Методы дезинтеграции условно подразделяются на механические, физические, химические, энзиматические и биологические.

Механическая дезинтеграция осуществляется с помощью гоменизаторов, а также с использованием баллистического (разрушение оболочки абразивной поверхностью бусинок при встряхивании), декомпрессионного (взвесь клеток подвергается насыщению инертным газом при высоком давлении и последующему резкому снижению его до атмосферного) и экструзионного (продавливание клеток через малые отверстия) методов.

Физические методы включают процедуры замораживание-оттаивание (повреждение оболочки кристалликами льда), осмотическое разрушение (разрыв оболочки при помещении клеток в гипотонический раствор), ультразвуковую дезинтеграцию (облучение суспензии микроорганизмов ультразвуком), повреждение клеточной оболочки с помощью ионизирующей радиации и др.

Химические методы осуществляются путем действия на клеточную оболочку растворов кислот, щелочей, солей, органических растворителей, поверхностно-активных веществ (ПАВ).

Энзиматические методы основаны на действии литических ферментов (лизоцим, сок виноградной улитки, дрожжелитические ферменты) на оболочку клетки.

Биологические методы основаны на ингибировании биосинтеза клеточной оболочки, действии фагов, антибиотиков.

Клетки растительных и животных тканей обычно разрушаются механическими методами с помощью гомогенизаторов. При выделении эндоферментов микроорганизмов применяются физические и механические (баллистический, ультразвуковой) методы дезинтеграции, при которых клетки подвергаются сильным и сверхсильным воздействиям. Это обусловлено чрезвычайно высокой прочностью клеточной оболочки.

Для крупномасштабной дезинтеграции микроорганизмов наиболее перспективно использование иммобилизованных литических ферментов, а также получение мутантных штаммов с легко разрушающимися клеточными оболочками.

Разделение ферментов, содержащихся в полученных после дезинтеграции клеток смесях веществ, применяют методы, основанные на различиях в их растворимости, хроматографию, гельфильтрацию, центрифугирование, электрофорез.

Фракционирование последовательным осаждением широко применяется при разделении белков. Оно наиболее эффективно при значении pH раствора, равном изоэлектрической точке выделяемого белка. Действие осадителей, в первую очередь, основано на гидратации (разрушении гидратной оболочки) белковой молекулы. Для этой цели используют высокие концентрации нейтральных солей (сульфат аммония) или органические растворители (этанол, ацетон и др.). Высокой избирательностью обладает обратимое биоспецифическое осаждение, а также разделение белковых макромолекул путем распределения их между двумя несмешивающимися между собой водорастворимыми полимерами (например, декстраном и полиэтиленгликолем).

Из хроматографических методов наиболее широко используется ионообменная и аффинная хроматографии. Последняя основана на способности ферментов обратимо связываться со специфическими лигандами, иммобилизованными с помощью коротких мостиков (спейсеров) на гранулах наполнителя колонки. В качестве лиганда обычно используется субстратоподобный ингибитор выделяемого фермента.

Гельфильтрация, являющаяся одной из разновидностей хроматографии, основана на эффекте "молекулярных сит", когда смесь белков пропускается через колонку, заполненную набухшими гранулами сефадекса, сефарозы или другого полимера с соответствующим размером пор.

Зонально-скоростное центрифугирование осуществляет разделение белковых молекул в градиенте плотности сахарозы или другого стабилизирующего седиментационные зоны макромолекул вещества.

При электрофорезе разделение ферментов основано на различии их подвижности в электрическом поле, которая определяется величиной их заряда, массой и конформацией. Эффективно разделение в градиенте рН (изоэлектрическое фокусирование), когда движение фермента в колонке прекращается в зоне со значением рН, равным изоэлектрической точке данного белка.

Концентрирование и очистка. Для производственных целей, прежде всего в сельском хозяйстве, используют неочищенные или частично очищенные ферментные препараты. Неочищенные препараты получают путем высушивания в мягком режиме культуры микроорганизмов вместе с остатками питательной среды, а также упаривания экстракта из культуры микроорганизма, выращенного поверхностным способом, или фильтрата культуральной жидкости для варианта глубинного культивирования. Кроме того, применяют метод ацетоновых порошков, при котором производят осаждение и быстрое обезвоживание при низкой температуре тканей или вытяжек из них, содержащих ферменты. Частично очищенные ферментные препараты в промышленности получают методами экстракции, концентрирования и осаждения. Для удаления низкомолекулярных примесей на разных стадиях очистки ферментов используют гельфильтрацию или диализ (фильтрацию через полупроницаемые мембраны, пропускающие только малые молекулы), осуществляемую порою под давлением (ультрафильтрация). Последняя позволяет осуществлять концентрирование разбавленных белковых растворов. Кроме того, для концентрирования используют лиофильную сушку (испарение в замороженном состоянии, минуя жидкую фазу), выпаривание в вакууме (резко снижает температуру кипения жидкости) и осаждение сульфатом аммония с последующим перерастворением в небольшом объеме.

Для получения высокоочищенных ферментов используют хроматографические и электрофоретические методы, которые более трудоемки и ведут к резкому увеличению стоимости продукта.

1.6. Имобилизованные ферменты

Под иммобилизацией ферментов понимается полное или частичное ограничение свободы их движения. В клетке ферменты иммобилизованы на мембранах и в компартментах (лизосомах, митохондри-

риях, ядре, хлоропластах). Использование иммобилизации в биотехнологии дает ряд существенных преимуществ перед применением ферментов, непосредственно растворенных в реакционном объеме:

1. Иммобилизация повышает на несколько порядков стабильность ферментов, увеличивая тем самым срок их службы.
2. Иммобилизация позволяет многократно использовать ферментативный препарат.
3. Иммобилизованный фермент легко отделяется от реакционной смеси, что позволяет получать продукт, не загрязненный ферментом.
4. Иммобилизация фермента позволяет получать продукт в режиме непрерывной ферментации с регулируемой скоростью потока реакционной смеси.
5. Путем подбора соответствующих носителей и методов иммобилизации можно в определенной мере изменять свойства фермента: специфичность, зависимость активности от температуры, pH среды, а также его стабильность (о чем говорилось выше).

Долговечность работы иммобилизованного (иммобилизованного) фермента обеспечивается за счет стабилизации его нативной конформации и защиты от действия гидролитических ферментов.

Поскольку биотехнологический процесс протекает в водной среде, то при иммобилизации должно быть обеспечено условие свободной диффузии субстрата к ферменту и отток молекул образовавшегося продукта от него. Эффективность работы иммобилизованного фермента помимо его активности зависит от правильного выбора носителя (обеспечивающего иммобилизацию) и способа связывания его с носителем.

Методы иммобилизации ферментов подразделяются на физические и химические. Физические методы, в свою очередь, осуществляются путем адсорбции, включения в гель, инкапсулирования и включения в липосомы (рис. 1.8).

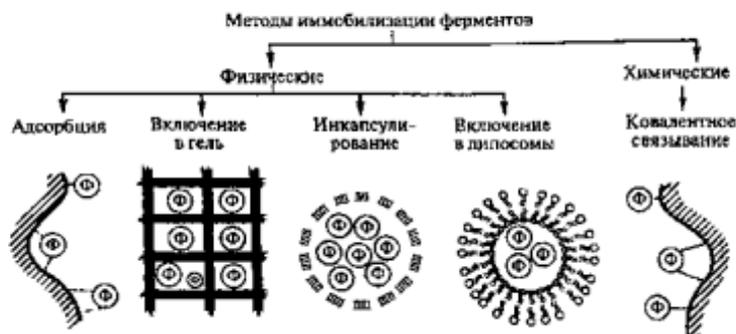


Рис. 1.8. Методы иммобилизации ферментов: Ф – фермент [3 осн.]¹

При адсорбционной иммобилизации молекула фермента удерживается на поверхности носителя с помощью адсорбционного взаимодействия. В качестве носителя, который должен обладать свойством нерастворимости в водной среде, используются активированный уголь, кремнезем, пористое стекло, различные глины, а также полисахариды, синтетические полимеры и др. Прочность связи фермента с носителем небольшая, что при изменении условий протекания реакции может привести к потере молекул фермента за счет десорбции. Усилить прочность этой связи позволяет предварительная модификация его поверхности путем обработки ионами металлов, полимерами, монослоем липидов, белками и др. Процесс иммобилизации осуществляется путем контакта водного раствора фермента с носителем.

Иммобилизация ферментов путем включения в гель нашла широкое распространение благодаря простоте реализации и своей универсальности, поскольку позволяет получать не только иммобилизованные индивидуальные ферменты, но и мультиферментные комплексы и интактные клетки. Наиболее часто используют гели полиакриламида, поливинилового спирта, поливинилпирролидона и др. Иммобилизация осуществляется путем смешивания фермента с водным раствором мономера (например, акриламида), после чего инициируется процесс полимеризации, завершающийся образованием геля (в приведенном примере – полиакриламидного геля – ПААГ).

Используется и комбинация двух названных методов, когда частички сорбента с находящимися на их поверхности молекулами фермента иммобилизуют в ячейках геля (например, ПААГ). Метод двойной

¹ Взято из списка основной литературы

иммобилизации обеспечивает стабилизацию конформации фермента за счет сил адсорбции (предохраняет его от денатурации в неблагоприятных условиях) и препятствует проникновению в ячейки геля крупных молекул — пептидгидролаз, выделяемых микроорганизмами или попадающих в реакционную смесь с субстратом. Молекулы субстрата имеют свободный доступ к молекулам иммобилизованного фермента.

Инкапсулирование фермента заключается во включении водного раствора фермента или полиферментных систем в микрокапсулы, ограниченные полупроницаемой мембраной, которая пропускает внутрь низкомолекулярные субстраты и кофакторы, но задерживает молекулы фермента. Разработаны несколько способов инкапсулирования, они более сложны, чем для двух рассмотренных выше методов. Обычно микрокапсулы имеют диаметр порядка десятков или сотен микрометров, толщина мембраны составляет сотые-десятые доли микрометра. Оболочка микрокапсулы (мембрана) образована полупроницаемым полимером (полиамид, полимочевина, полистирол, коллодий и др.).

Широкое распространение в производстве получил метод включения фермента в волокна, который аналогичен микрокапсулированию. Один из способов включения ферментов в волокно состоит в растворении полимера, образующего волокно (триацетатцеллюлоза, нитроцеллюлоза, этилцеллюлоза и др.), в органическом растворителе, эмульгировании полученного раствора с раствором или суспензией фермента и продавливании эмульсии через тонкие отверстия прядильного устройства в коагулирующую жидкость (например, толуол). Полученные волокна представляют собой пористые полимерные гели, содержащие однородную дисперсию небольших капель водного раствора фермента диаметром приблизительно 1 мкм. Количество фермента, включенного в волокна, может составлять сотни миллиграмм на один грамм волокна.

Включение фермента в липосомы является специфической разновидностью инкапсулирования, при котором его молекулы заключают в везикулы, ограниченные системой концентрических бислоенных замкнутых липидных мембран. Липосомы могут быть моноламеллярными (ограничены одной бислоенной мембраной) и полиламеллярными (ограничены несколькими бислоями концентрических сфер). Техника получения липосом достаточно проста. Липиды растворяют в органическом растворителе, который затем испаряется, оставив на стенках сосуда тонкую пленку липида. В сосуд наливают раствор фермента и осуществляют механическое диспергирование липидной пленки, обрывки которой образуют микрокапсулы (липо-

сомы) с заключенным в их объеме раствором фермента. При действии ультразвука полиламеллярные липосомы распадаются на моноламеллярные. Ферменты, заключенные в липосоме, используют преимущественно в медицинских и научных целях.

Химический способ иммобилизации наиболее распространен в промышленности и заключается в ковалентном связывании фермента носителем. Он обеспечивает прочную и необратимую связь фермента с носителем, в качестве которого используются полисахариды, синтетические полимеры, неорганические кремнеземные соединения (силикагели, силохромы, пористые стекла). Поверхность носителя нередко активируют, а фермент присоединяют к ней с помощью небольшой молекулы (вставки, спейсера), которая устраняет стерические затруднения в его функционировании (рис. 1.9). В то же время ковалентная связь фермента с носителем часто сопровождается стабилизацией конформации энзима, что увеличивает его срок работы.

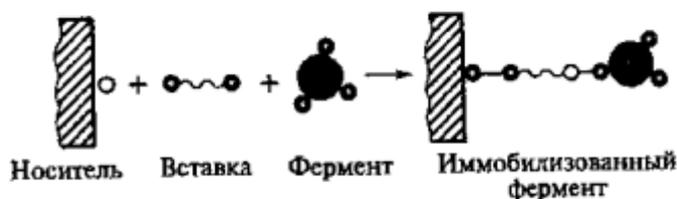


Рис. 1.9. Схема иммобилизации фермента химическим методом [1]

1.7. Инактивация, стабилизация и реактивация ферментов

Инактивация. Фермент, в соответствии со своей ролью в каталитической реакции, в отличие от субстрата, не расходуется, поэтому срок службы этой "молекулярной машины" в принципе не ограничен. Однако существует ряд факторов, не связанных непосредственно с протеканием ферментативной реакции, которые ведут к нарастающему во времени снижению активности фермента и вызывают необходимость вводить в реакционную смесь дополнительное его количество. Снижение активности фермента замедляет технологический процесс, а дополнительное расходование фермента повышает стоимость получаемого продукта.

Возможны два пути, способные ослабить негативное последствие инактивации фермента: повышение его стабильности и реактивация потерявших активность молекул.

Среди причин инактивации можно выделить: агрегацию молекул фермента; тиолдисульфидный обмен между молекулами и внутри

их; изменения в первичной структуре, например, химическая модификация функциональных групп; разрыв S-S-связей; диссоциация на субъединицы ферментов с четвертичной структурой; конформационные изменения в макромолекуле. Сами процессы, вызывающие инактивацию, можно разделить на две большие группы: физические и физико-химические (конформационные внутримолекулярные превращения под действием температуры, pH, высоких концентраций солей, органических растворителей или ПАВ и т.д.) и химические (автолиз, автокаталитическая модификация функциональных групп фермента, например, автоокисление, и др.). Если в системе имеются протеолитические ферменты, попавшие, например, с субстратом, происходит расщепление полипептидной цепочки. При выделении ферментов из тканей инактивация ферментов происходит в результате автолиза.

Высокореакционноспособными инактивирующими корпускулами являются супероксидный и гидроксидный радикалы (последние образуют перекись водорода). В качестве защиты от них ферментов можно использовать супероксиддисмутазу (СОД) и каталазу (активная защита), а также низкомолекулярные перехватчики радикалов, например, тиолы (пассивная защита).

Стабилизация. Для оценки стабильности фермента на практике обычно используются два показателя: полупериод жизни фермента (время, за которое активность фермента снизится в два раза) и доля остаточной активности его (в процентах) после инкубации в течение фиксированного времени в конкретных условиях.

Существует большое число способов стабилизации ферментов, под которой понимают направленное изменение структуры фермента или окружающей его микросреды, приводящее к увеличению активационного барьера процесса инактивации. Стабилизация фермента, наряду с увеличением срока его работы может повышать и термостабильность.

Стабилизация ферментов может быть повышена как при нековалентных взаимодействиях, так и при образовании ковалентных связей.

В первом случае стабильность повышается при комплексообразовании апофермента с коферментом, фермента с субстратами и ингибиторами, благодаря чему, в частности, возрастает устойчивость белковой части молекулы к денатурационным воздействиям вследствие изменения структуры и энергетики глобулы. Образование специфических комплексов некоторых ферментов с такими органическими

соединениями как этиленгликоль, глицерин, сахароза, диметилсульфоксид и др. ведет к повышению стабильности за счет уменьшения структурированности воды в микроокружении фермента. Стабилизирующий эффект образования комплексов фермента с полимерами и белками (поливиниловые полимеры, полисахариды, альбумин и др.) объясняется изменением свойств среды, защитным действием полимера, и, главное, изменением структуры фермента. Включение фермента в нерастворимые полимерные гели вызывает ограничение конформационной подвижности фрагментов макромолекулы в тесных ячейках высококонцентрированного геля, не позволяет по чисто стерическим причинам развернуться молекуле фермента. При этом в сотни и тысячи раз увеличивается термостабильность некоторых ферментов. Кроме того, полимерный гель защищает их от атаки микроорганизмов. Адсорбция ферментов на органических и неорганических носителях существенно повышает стабильность (и термостабильность) преимущественно за счет стабилизации нативной конформации фермента, многоточечной его фиксации.

Во втором случае, при образовании ковалентных связей фермента с растворимым или нерастворимым носителем, изменение его стабильности обусловлено химической модификацией функциональных групп фермента, полифункциональными многоточечными взаимодействиями его с носителем, изменением микроокружения фермента. Термостабильность ферментов зависит от их аминокислотного состава. Замена одной аминокислоты на другую в результате мутации может существенно повлиять на термостабильность фермента. Химическая модификация функциональных групп аминокислотных остатков, влияющих на стабильность фермента, позволяет повысить его устойчивость к действию повышенной температуры, триптическому гидролизу. Химическая модификация с помощью бифункциональных агентов, например глutarовым альдегидом, ведет к образованию внутримолекулярных сшивок, которые делают структуру фермента жесткой, менее способной к разворачиванию, при этом его термостабильность и устойчивость к протеолизу может повыситься. Конъюгация ферментов с белками, полисахаридами и другими водорастворимыми полимерами способна повысить стабильность ферментов. В конъюгатах создаются стерические затруднения для бимолекулярного взаимодействия ферментов, повышается жесткость структуры фермента за счет многоточечного связывания его с носителем, при этом увеличивается устойчивость фермента к автолизу. Стабилизиру-

ет фермент и многоточечное ковалентное взаимодействие его с нерастворимыми белковыми и полимерными гелями, а также ковалентная иммобилизация на органических (модифицированная сефароза, аминоэтилцеллюлоза и др.) и неорганических, например силикатных, носителях.

Реактивация. В химических производствах происходит так называемое отравление катализаторов, поэтому их периодически подвергают регенерации. Такая же задача стоит и перед биотехнологией, только реализация ее оказывается гораздо более сложной, поскольку характер повреждения молекул ферментов бывает самым разным (ведь они "молекулярные машины"). Несмотря на все меры, принятые для защиты ферментов от повреждающих агентов, повышения их стабильности, с течением времени происходит их инактивация. Реактивация биокатализаторов позволит использовать их многократно.

Реактивация агрегированных белков заключается в нарушении межмолекулярных нековалентных контактов, которое ведет к разрушению агрегатов. Для этой цели, в частности, используют высококонцентрированный (8 М-ный) раствор мочевины. Затем удаляют этот денатурат и получают нативный фермент. При реактивации фермента с четвертичной структурой появляются дополнительные сложности, поскольку после диссоциации агрегата до отдельных субъединиц необходимо создать условия для сборки олигомерного белка из этих субъединиц. Встречаются случаи инактивации фермента с четвертичной структурой вследствие диссоциации его на субъединицы под действием кислоты, щелочи, детергентов, мочевины и т.д. В некоторых случаях снятие денатурирующего воздействия сопровождается полной или частичной ассоциацией субъединиц и ренатурацией фермента.

Если фермент потерял активность в результате химической модификации функциональных групп, то его реактивация в ряде случаев возможна с помощью обратной химической реакции. В частности ферменты, инактивированные модификацией сульфгидрильных групп, реактивируют добавлением избытка низкомолекулярного тиола или другого восстановителя. Если в ферменте под действием тиола разрывается одна или несколько дисульфидных связей и образуются смешанные с этим тиолом дисульфиды, то такие ферменты можно реактивировать, добавляя в небольшом избытке по отношению к ферменту ионы ртути, меди, серебра или ртуторганические соедине-

ния, которые расщепляют смешанные дисульфидные связи за счет конкуренции с инактивирующим тиолом.

При необратимой денатурации ферментов необходимо в инактивированном ферменте разрушить все нековалентные связи и перевести его в развернутое состояние (статистического клубка). Для этого часто используют концентрированные растворы мочевины или гуанидинхлорида. Затем нужно удалить денатурат и создать условия для реактивации фермента. Было показано, что пептидные цепи ряда ферментов (трипсин, α -химотрипсин) способны к самопроизвольному сворачиванию в нативную конформацию.

Один из наиболее сложных случаев реактивации, когда в молекуле фермента произошел гидролиз пептидной связи, начали разрабатывать в последнее время с использованием протеолитических ферментов.

Особый случай реактивации представляет регенерация небелковой части ферментов — кофакторов. Для этой цели используются ферментные и неферментные (химические, электрохимические) методы регенерации.

1.8. Области применения инженерной энзимологии

Ферменты обладают высокой эффективностью при катализе разнообразных реакций, представляющих практический интерес. В настоящее время в природе обнаружено свыше трех тысяч разных ферментов, каждый из которых в силу своей селективности катализирует, как правило, одну конкретную реакцию. Это обстоятельство позволяет выделять из природных объектов биокатализатор, способный осуществлять практически любую реакцию, востребованную в той или иной области человеческой деятельности. Поэтому неудивительно, что инженерная энзимология непрерывно расширяет область своего применения и связанное с этим разнообразие ферментов, используемых чаще всего в иммобилизованной форме.

В легкой промышленности перед отбеливанием и окрашиванием текстильных изделий используется расщипловка растительных волокон (освобождение от крахмала), осуществляемая с использованием α -амилазы; для выделки кожи применяют протеазы микробного происхождения и трипсин (обезволашивание шкур, отмочка и мягчение кож). При мацерации льна перспективно использование комплексных ферментных препаратов, получаемых при культивировании специально

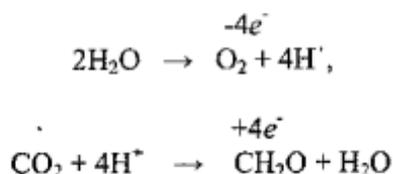
отобранных бактерий. В быту для улучшения качества стирки в стиральные порошки добавляют щелочные протеазы, липазы.

В сельском хозяйстве для улучшения перевариваемости кормов к ним добавляют протосубтилин, целлюлазы, последние используются и при силосовании. Ферменты применяются и при химическом синтезе незаменимых аминокислот для разделения их рацемических смесей. Незаменимые аминокислоты нужны для обеспечения белкового баланса кормов. Широко используются ферменты и в пищевой промышленности. Реннин применяют при получении сыра, глюкозоизомеразу – при производстве глюкозо-фруктозных сиропов, глюкоамилазу – при получении глюкозы. С помощью α -амилазы осуществляют гидролиз крахмала. Бромелин используют при производстве питательных смесей на основе гидролизатов белков, а также, подобно пепсину и протеазам микробного происхождения – для мягчения (тендеризации) мяса. Протеолитические ферменты используют также для ускорения созревания рыбы (сельди) при посоле. Липазы модифицируют вкус молочных продуктов, лактаза (β -галактозидаза) превращает обычное молоко в безлактозное, обладающее диетическими свойствами. Применяют лактазу и в хлебопечении, опять же для расщепления молекулы лактозы, которая не сбраживается хлебопекарными дрожжами. Добавление протеолитических ферментов к муке вызывает модификацию пшеничных белков, благодаря чему тесто становится более мягким. С помощью микробных протеиназ получают принципиально новые продукты питания – пластеины. Для этого вначале одним из гидролитических ферментов производят гидролиз белков, после чего в гидролизат может быть добавлена дефицитная аминокислота (например, метионин для соевого белка) или, наоборот, удалена одна из них (например, фенилаланин, который вредно употреблять детям, больным фенилкетонурией). Затем, используя способность некоторых протеолитических ферментов (пепсин, трипсин, химотрипсин) осуществлять безматричный синтез, получают белковоподобные питательные вещества – пластеины (работы А.Я. Данилевского, В.В. Завьялова и др.). Белковые гидролизаты вводят в овощные и фруктовые соки, пюре, супы.

Для осветления вин, фруктовых соков и пива используют пектиназу, протеазы микробного происхождения, пепсин. Для удаления кислорода из консервных банок и бутылок с различными напитками, например с пивом, применяют препараты глюкозооксидазы. Применяются они также для удаления глюкозы из пищевых продуктов, ко-

торые должны храниться в высушенном состоянии. В биоэнергетике перспективно использование ферментов и фотосинтетического аппарата растений и бактерий при создании искусственных систем для фоторазложения воды на водород и кислород (биофотоллиз воды). Это позволит получить экологически чистый энергоноситель – водород (водородная энергетика). В биотопливных элементах происходит прямое превращение химической энергии субстрата в электрическую. Примером может быть энзиматическое окисление метанола в муравьиную кислоту на электроде (аноде).

Важной представляется проблема биоспецифического электро-синтеза. Синтез некоторых соединений (углеводов, аминокислот, стероидов), протекающих с затратой энергии, в ряде случаев может быть реализован с использованием иммобилизованных ферментов и электрической энергии. Проведение *in vivo* ферментативных электросинтетических процессов



в принципе позволяет поставить задачу построения систем электропитания живых организмов.

Широкое применение ферменты находят в медицине. Прежде всего, ферментные препараты применяются в заместительной терапии заболеваний пищеварительной системы. Принимаемый перорально панкреатин содержит липазу, α -амилазу, трипсин, химотрипсин; фестал – липазу, амилазу, протсазу поджелудочной железы, гемоцеллюлазу (и компоненты желчи); ораза – комплекс протеолитических и амилолитических ферментов; солизим – ферментный липолитический препарат и т.д. Однако применяют и антиферментные препараты (пантрипин, контрикал и др.), которые угнетают активность протеолитических ферментов. β -Галактозидаза восстанавливает способность к усвоению молочных продуктов у людей, страдающих недостаточностью этого фермента в желудочно-кишечном тракте. Для растворения тромбов в кровеносных сосудах применяют плазмин, стрептокиназу, урокиназу. Ферменты, разрушающие некоторые неза-

менимые аминокислоты (например, аспарагиназу), используют в онкологии. Такие протеолитические ферменты как трипсин, химотрипсин, коллагеназа, субтилизин, иммобилизованные на волокнистых материалах, применяют для эффективного лечения ран, ожогов, абсцессов (гнойных нарывов).

При введении ферментного препарата в кровь возникают сложности, связанные с его антигенностью, быстрой инактивацией и быстрым выведением из организма. Стабильность фермента в этом случае повышают путем введения в его молекулу обратимых сшивок, химической модификации ферментов, их межмолекулярного связывания, связывания с другими молекулами (водорастворимыми полимерами), а также заключения ферментов в микрокапсулы, липосомы, "тени" эритроцитов. Инкапсулированные ферменты захватываются клеткой путем эндоцитоза и таким образом проникают внутрь ее. Однако при использовании некоторых из этих способов стабилизации фермента необходимо решать проблему деградации и последующего выведения из организма небелковой части (мембраны, растворимые полимеры) и самих модифицированных молекул ферментов.

В тех случаях, когда фермент действует на субстрат, присутствующий в биологической жидкости, можно избежать введения его в организм, используя систему экстракорпоральной перфузии. При этом иммобилизованный фермент помещают в закрытую систему, через которую циркулирует биологическая жидкость, возвращающаяся обратно в организм освобожденной от вредного вещества. В частности, колонки, заполненные микрокапсулами с ферментом, используют для диализа в аппарате "искусственная почка".

В медицинской диагностике ферменты используются для проведения биохимических анализов. Биосенсоры на основе иммобилизованных ферментов позволяют быстро выполнять точные анализы, применяются они и в проточных анализаторах. Микробиосенсор на основе глюкозооксидазы и рутениевого красителя, иммобилизованных в ПААГ, выполненный с использованием субмикронных оптических волокон, может быть введен в клетку для измерения в ней концентрации глюкозы.

Иммобилизованные ферменты в производстве

Биотехнологической промышленностью освоен ряд технологических процессов, позволяющих производить в больших количествах продукцию.

Получение глюкозо-фруктозных сиропов. Этот крупномасштабный процесс осуществляет изомеризацию глюкозы, превращая ее во фруктозу, которая в 2,5 раза слаще глюкозы и в 1,7 раза слаще сахарозы. На рынок глюкозо-фруктозная смесь поступает обычно в виде сиропов. Применяется при производстве тонизирующих напитков, мороженого, кондитерских изделий, консервированных фруктов и др. Реактор выполнен в виде колонны высотой около 5 м. Фермент адсорбируют обычно на гранулах пористых неорганических носителей или ионообменных смол. Часто вместо иммобилизованного фермента используют иммобилизованные клетки микроорганизмов. Один килограмм иммобилизованного фермента за 100 суток работы катализирует образование до 4000 кг фруктозы (в пересчете на сухое вещество). Время полуинактивации фермента равно 50 суткам, через 100 суток непрерывной работы, когда его активность снизится до 25 % от исходного уровня, осуществляют перезагрузку реактора ферментом. Схема процесса изомеризации глюкозы представлен на рис. 1.10.

Процесс протекает при температуре 60°, рН 8,2. Глюкозу обычно получают путем гидролиза крахмала. Содержание фруктозы в сиропе на выходе из реактора 42 – 45 %. Стоимость одного килограмма продукта при использовании иммобилизованного фермента почти в 5 раз ниже, чем при использовании периодического процесса с растворимым ферментом.

Разделение рацемических смесей аминокислот. Полученную химическим путем рацемическую смесь ацил-DL-аминокислоты в производственных условиях подвергают воздействию фермента амилоацилазы, которая осуществляет отщепление ацильного радикала лишь у L-аминокислоты, оставляя неизменной ацил-D-аминокислоту. L-аминокислоту отделяют, а раствор ацил-D-аминокислоты нагревают, после чего вновь образуется рацемическая смесь. Технологический процесс, как и в ранее рассмотренном случае, протекает в непрерывном режиме. Фермент иммобилизуют адсорбцией на сфадексе или заключают в полые волокна триацетата целлюлозы, он устойчив, регенерацию катализатора осуществляют в колонне простым добавлением в нее раствора фермента, который адсорбируется на носителе. В таком режиме без перезагрузки катализатора реактор работал более 8 лет.

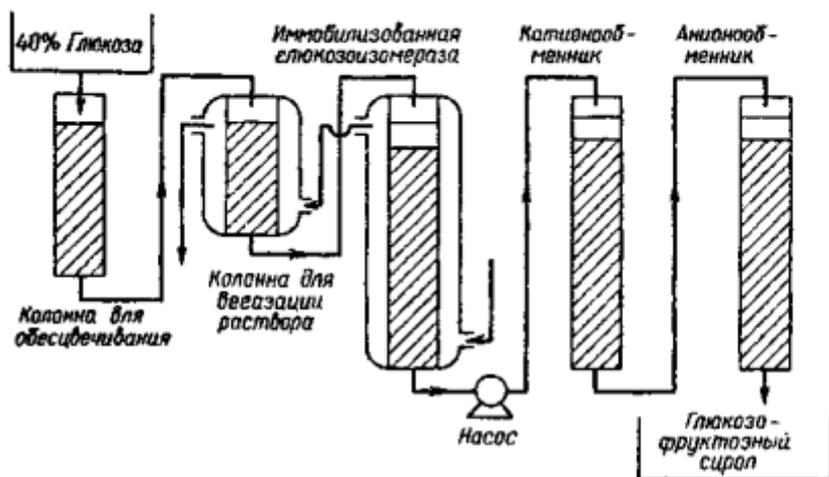


Рис. 1.10. Схема установки для получения глюкозо-фруктозного сиропа на фенолформальдегидной смоле [3]

Аминоацилаза слабочувствительна к стронцию боковой цепи аминокислоты, поэтому может быть использована для разделения рацематов широкого круга аминокислот.

Гидролиз лактозы. Дисахарид лактоза (молочный сахар) в достаточно больших количествах содержится в молоке. Он характеризуется малой сладостью и низкой растворимостью, к тому же определенная часть населения не может употреблять молоко из-за наличия в ней лактозы, но усваивает без аллергических реакций безлактозное молоко. Кроме того, гидролиз лактозы, содержащейся в молочной сыворотке (около 5 % в жидкой и около 75 % в высушенной) позволяет получить сахаристые вещества из нетрадиционного сырья и ограничивает сброс сыворотки в водосмы.

Лактазу (β -галактозидазу), выделенную из дрожжей или грибов, иммобилизуют в волокна триацетата целлюлозы. Фермент стабилен: за 50 суток работы он теряет лишь 20 % активности. Молоко многократно проходит через реакционную колонну вплоть до достижения заданной степени конверсии. Лактоза превращается в смесь моносахаров глюкозы и галактозы.

Получение глюкозы из крахмала. Гидролиз крахмала осуществляется с участием последовательно работающих ферментов: α -амилазы и глюкоамилазы. Первый из них гидролизует крахмал до

олигосахаридов, второй отщепляет у них с конца глюкозу. Процесс реализован на уровне пилотных установок.

Получение глюкозы из целлюлозы. Ферментный гидролиз происходит под действием целлюлазного комплекса, состоящего как минимум из четырех ферментов, которые прочно адсорбируются на целлюлозе (автоиммобилизация). Эта связь сохраняется в ходе постепенной деградации субстрата. Продуктами этой реакции могут быть глюкоза или ее смесь с целлобиозой. Получаемые сахара могут сбраживаться дрожжами непосредственно в этой реакционной системе с образованием этанола. Процесс реализован, как и в случае с ферментативным гидролизом крахмала, на уровне пилотных установок. На Земле ежегодно образуется около 100 миллиардов тонн целлюлозы, поэтому в случае реализации этой технологии недостатка в сырье для нее не будет.

В заключение следует отметить, что ферменты представляют собой "молекулярные" машины, то есть наноразмерные системы, со своим специфическим механизмом каталитического действия. В будущем успехи нанотехнологии позволят конструировать и производить не встречающиеся в природе катализаторы биологического типа, способные ускорять требуемые человеку реакции.

2.1. Теоретические основы клеточной инженерии и главные направления ее развития

Сельское хозяйство и традиционные биотехнологии в течение многих веков используют для получения необходимых человеку продуктов способные к самостоятельному существованию организмы животных, растений, микробов. Новый этап биотехнологии связан не только с интенсификацией и улучшением ее традиционных областей, но и появлением принципиально новой технологии – клеточной инженерии. Объектами этой новой биотехнологии стали культивируемые ткани и клетки высших многоклеточных организмов – растений и животных.

Идея о возможности культивирования клеток вне организма была высказана еще в конце XIX века в отношении клеток растений. Однако впервые удалось ввести в культуры клетки животных, что было осуществлено в начале XX века. Культивировать растительные клетки на искусственных питательных средах исследователям долго не удавалось. Первые успехи в этой области относятся к тридцатым годам, а бурное развитие нового направления работ с клетками растений и животных происходит в 60-70-е годы.

Важным свойством культур клеток растений является тотипотентность, позволяющая из одной соматической клетки выращивать полноценное растение, а также возможность получать путем слияния двух соматических клеток (парасексуальная гибридизация) гибридной клетки, из которой в силу ее тотипотентности в ряде случаев удастся получить гибридное растение.

Важным достижением клеточной инженерии явилось получение специализированных соматических клеток с неограниченными способностями к делению ("бессмертные" популяции). Этого удалось добиться путем инфицирования соматических клеток вирусом саркомы Рауса или с помощью соматической гибридизации их с опухолевыми клетками.

Культуры клеток в кинетическом отношении ведут себя подобно одноклеточным организмам (микробам), что делает возможным применение в клеточной инженерии аппаратуры, подобной той, которую традиционно использовали в промышленной биотехнологии.

В настоящее время работы в области клеточной инженерии ведутся по следующим направлениям:

1. Получение ценных биологически активных веществ промышленным способом путем культивирования тканей растений;

2. Применение тканевых и клеточных культур для быстрого клонального микроразмножения и оздоровления растений;
3. Использование методов клеточной и генетической инженерии для изменения генома клетки и получение на ее основе нового растения;
4. Получение моноклональных антител.

Кроме названных направлений существуют и другие, связанные также с клетками животных, некоторые из них находятся на стадии лабораторных разработок.

2.2. Производство полезных соединений с помощью культуры растительных клеток

Жизненный цикл клетки. Сформировавшееся многоклеточное растение состоит из совокупностей клеток (тканей) различной специализации. Генетически все клетки одинаковы, а их специализация осуществляется на эпигенетическом уровне путем репрессии определенных наборов генов. Все делящиеся клетки проходят клеточный цикл, состоящий из ряда стадий (фаз) (рис. 2.1).

Дифференцировка клетки происходит через фазу покоя чаще всего после деления. При определенных условиях дифференцированные клетки могут дедифференцироваться, то есть терять структуры, необходимые для выполнения ими своих специфических функций, и возвращаться к состоянию делящейся клетки. С процессами дедифференцировки приходится иметь дело при культивировании клеток.

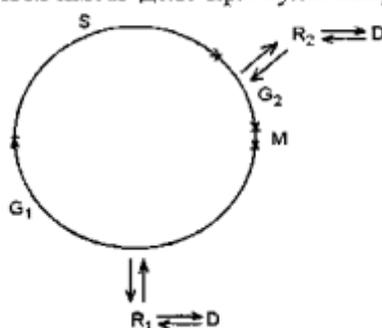


Рис. 2.1. Схема клеточного цикла: G_1 – пресинтетическая фаза; S – фаза синтеза ДНК; G_2 – постсинтетическая фаза; M – митоз; R_1 и R_2 – фазы покоя; D – дифференцированная клетка

Каллус. Основным типом культивируемой растительной клетки является каллусная клетка, в результате деления которой возникает клон — каллусная ткань, или каллус. Он представляет собой один из типов клеточной дифференцировки, у высших растений образуется обычно при травмах и функционирует непродолжительное время. Каллус защищает пораженное место и накапливает питательные вещества для регенерации.

При получении культивируемых каллусных клеток фрагменты тканей разных органов высших растений (экспланты) помещают на искусственную питательную среду *in vitro* в пробирки, колбы, чашки Петри. Процесс получения первичного каллуса и дальнейшего его культивирования требует строгих стерильных условий. Работу с культурами проводят в обычных микробиологических боксах, предварительно облучаемых ультрафиолетом, или в ламинар-боксах, где асептика достигается постоянной подачей стерильного воздуха в рабочий объем.

Культура каллусных тканей выращивается поверхностным способом на полутвердой агаризованной среде (концентрация агара 0,6-1,0%), среде с применением других желирующих полимеров, либо на мостиках из фильтровальной бумаги, либо на дисках из пенополиуретана, погруженных в жидкую питательную среду. Основными компонентами питательных сред для культуры клеток и тканей растений являются минеральные соли (макро- и микроэлементы), источник энергии и углерода (обычно сахароза или глюкоза), витамины, регуляторы роста (фитогормоны ауксин, цитокинин). Иногда в состав питательных сред включают комплексные органические добавки (гидролизат казеина или смесь аминокислот, дрожжевой экстракт, экстракты из разных органов растений).

Каллусная ткань, выращиваемая поверхностным способом, представляет собой аморфную массу тонкостенных паренхимных клеток, не имеющую строго определенной анатомической структуры. Цвет массы может быть белым, желтоватым, зеленым, красным, пигментированным антоцианами полностью или зонально. Различное тканевое происхождение первичных каллусных клеток является одной из причин гетерогенности культуры каллусной ткани.

В зависимости от происхождения и условий выращивания каллусные ткани бывают: 1) рыхлыми, сильно оводненными, легко распадающимися на отдельные клетки; 2) средней плотности, с хорошо выраженными меристематическими очагами; 3) плотными, с зонами

редуцированного камбия и сосудов (в основном трахеиподобных элементов).

В цикле выращивания каллусные клетки после ряда делений проходят обычный для клеток растения онтогенез. Они приступают к росту растяжением, затем дифференцируются как зрелые каллусные клетки и, наконец, деградируют.

Химический состав каллусной ткани и ткани органа, из которого она получена, как правило, различается. Каллусные ткани, выращиваемые поверхностным способом, часто применяют для сохранения в растущем состоянии коллекций разных штаммов, линий, мутантов, из них получают суспензии клеток, культивируемых в жидкой питательной среде, для регенерации растений (соматический эмбриогенез).

Суспензионные культуры. Культуры клеток растений, выращиваемые в жидкой питательной среде, обычно называют суспензионными. Отдельные клетки, небольшие группы или достаточно крупные агрегаты (более 50 клеток) выращивают во взвешенном состоянии в жидкой среде. Применяют разные аппараты и способы поддержания их в таком состоянии. Начальный момент получения суспензионной клеточной культуры является событием случайным (случайным). Это означает, что только клетки, по ряду причин способные к перестройке метаболизма и размножению с высокой скоростью в данных конкретных условиях суспензионного культивирования, образуют "хорошие" линии. Важными характеристиками таких линий являются высокая степень дезагрегации (5-10 клеток в группе), морфологическая выравненность клеток (небольшие размеры, сферическая или слегка овальная форма, плотная цитоплазма), отсутствие трахеиподобных элементов.

Клеточную суспензию получают, помещая каллусную ткань в колбу с жидкой питательной средой. Эта суспензия перемешивается в колбах на качалке или в специальных сосудах с помощью роллеров (вращающих устройств). Для инициации суспензионной культуры необходимо 2-3 грамма свежей массы каллусной ткани на 60-100 мл жидкой питательной среды.

Суспензионную среду можно получить и из фрагментов органа растения (дисков запасающей паренхимы мясистых корней моркови, клубней картофеля и др.). Однако этот путь более трудоемок и требует большего времени. Клетки экспланта должны при этом образовать первичный каллус, после чего поверхностные каллусные клетки, по-

павшие в жидкую среду и размножившиеся в ней, дадут начало линии, способной расти в суспензии.

Рыхлые, обводненные культуры каллусных тканей более пригодны для перевода в суспензию, чем структурированные, плотные каллусы.

Первоначально перед культивированием суспензию фильтруют через 1-2 слоя марли, нейлоновые или металлические сита, чтобы избавиться от крупных, плотных кусков каллусной ткани, остатков экспланта и очень крупных агрегатов клеток. Фильтрация рекомендуется проводить несколько раз перед переводом клеток в свежую питательную среду, пока не будет получена суспензия с желательными клеточными характеристиками. При этом следует помнить, что агрегированность суспензии зависит не только от характеристик начальной линии, но и от условий культивирования.

Выращивание клеточных суспензий в жидкой питательной среде имеет ряд преимуществ перед выращиванием каллусовых тканей поверхностным способом. Здесь легче влиять на метаболизм и рост клеточной популяции экзогенными факторами. Критериями роста в цикле выращивания служит увеличение числа клеток, их сырой или сухой массы. Ростовая кривая имеет сходную с микробной популяцией S-образную форму.

Различают, как и при выращивании микроорганизмов, первичный и вторичный метаболизм. Первичный метаболизм — это рост биомассы, вторичный — это синтез сравнительно низкомолекулярных веществ: алкалоидов, терпеноидов, гликозидов, полифенолов, полисахаридов, эфирных масел, натуральных красителей (пигментов), антиканцерогенных пептидов (ингибиторов протеаз, фитовирусов), фитогормонов и др.

Деление клеток, приводящее к увеличению клеточной массы (первичный метаболизм) и синтез вторичных метаболитов разобщены во времени. Синтез последних в подавляющем большинстве случаев возрастает в фазе замедленного роста и достигает максимума в стационарной фазе. Правильное сочетание компонентов среды, двухэтапное культивирование клеток в средах для "роста" и для "продукции" может увеличить количество продукта в клеточной культуре, полученной из растения, способного к данным синтезам.

Трудности культивирования. Как и в опытах с микроорганизмами, для экстракции полезных соединений из растительной биомассы клетки необходимо разрушить. Однако получение массы расти-

тельных клеток обходится намного дороже, чем такого же количества бактерий и дрожжей. Поэтому ученые стараются избежать разрушения клеток. Наиболее практичным решением, как для осуществления полного биосинтеза полезных соединений, так и для биопревращений доступных веществ представляется иммобилизация растительных клеток внутри пористых полимеров. Удастся поддерживать жизнеспособными такие клетки в течение нескольких сотен дней. Остается найти простой способ извлечения синтезированных метаболитов, поскольку они обычно не выделяются в среду, а накапливаются в клеточных вакуолях. По мнению многих специалистов, ныне это является основной проблемой, осложняющей использование растительных клеток для производства полезных соединений.

Другая трудность состоит в получении достаточных количеств гомогенного растительного материала и стабильных штаммов. Культивируемые клетки, как правило, сохраняют способность к синтезу вторичных веществ, свойственных тому виду растения, из которого они получены, хотя отмечены случаи, когда их спектр отличается от спектра веществ в исходном растении. Обычно количество интересующих человека веществ в клеточной массе ниже, чем в органах целого растения, запасующих их. Однако преимущества использования технологий промышленного выращивания клеток — продуцентов ценных веществ (независимость получения продукта от климата, сезона года, погоды, почвенных условий, возможность оптимизировать режим выращивания и применять управление с помощью ЭВМ) компенсируют более низкую концентрацию этих веществ в культуре и, в то же время, заставляют исследователей создавать и внедрять более продуктивные штаммы, чем те, которые были непосредственно получены от растения.

Первоначальным важным условием для этого является использование для получения клеточных культур вида и индивида растения с высокой биосинтетической способностью. Однако этого бывает недостаточно, и обычным путем повышения продуктивности клеточного штамма в настоящее время является применение мутагенеза и селекции на клеточном уровне наиболее продуктивных линий.

Промышленное культивирование клеток. Способы выращивания, разработанные в микробиологии, применяются для глубинного культивирования растительных клеток. Используются закрытые и открытые системы в периодическом и проточном режимах. В закрытой системе при периодическом режиме выращивания клеточная масса

(инокулюм) помещается в определенный объем среды. До конца выращивания система остается закрытой по всем параметрам, кроме газов. В закрытой непрерывной культуре из системы периодически удаляется старая питательная среда, а взамен подается свежая среда. Клетки при этом остаются в системе в течение всего цикла выращивания. В открытые проточные культуры периодически (или непрерывно) поступает свежая питательная среда, однако отбирается не только старая среда, но и часть урожая клеточной массы. Регуляция этого процесса может осуществляться по принципу турбидостата или хемостата (см. гл. 6), однако при глубинном выращивании растительных клеток принцип турбидостата практически не применяется. Одной из причин этого обстоятельства является разрушение части клеток при отводе их к оптическому датчику (турбидиметру).

Выращивание суспензии клеток растений в установках непрерывного культивирования по принципу хемостата применяется как для изучения метаболизма клеток, стабильно поддерживающихся в разных фазах клеточного цикла, так и при промышленном выращивании клеточной массы с целью получения экономически важных продуктов. Однако пока наиболее изученным и распространенным режимом глубинного культивирования клеточных суспензий является закрытая периодическая культура.

Практические результаты. Современными методами мутагенеза и селекции отечественными учеными получены клеточные линии раувольфии змеиной — продуцента индольных алкалоидов, содержащего в 10 раз больше ценного для медицины антиаритмического алкалоида аймалина, и диоскорей дельтовидной, продуцирующие вполне сопоставимые с корневищем целого растения количества диосгенина, используемого в качестве сырья для синтеза гормональных препаратов. Так же получен штамм клеток руты душистой, содержащей в 20 раз больше алкалоида рутакидона, чем растение. В промышленном масштабе получают клеточную массу корня женьшеня, корневища радиолы розовой, воробейника (продуцент шиконина), табака (продуцент убихинона, или кофермента Q).

Клетки табака культивировали в аппарате объемом 20 000 л при непрерывном режиме работы в течение 3 месяцев (Япония). Продуктивность культуры составила 5,6 г/л в сутки сухой массы клеток (более 100 кг в сутки с аппарата).

Для создания рентабельных промышленных клеточных технологий важны не только мутанты, обладающие высокой биосинтети-

ческой способностью, но и линии, растущие на простых питательных средах, устойчивые к осмотическому и механическому стрессу. Такие линии для ряда растений созданы.

Получение мутантных клеточных линий методами классической микробиологической генетики дополняется созданием продуктивных штаммов путем гибридизации соматических клеток, а также путем переноса индивидуальных генов, определяющих вторичный метаболизм (метод генетической инженерии).

Промышленное выращивание клеточных масс перспективно не только для получения веществ, идентичных продуктам самих растений, но и для поиска новых активных веществ, возможно с принципиально иным типом действия, чем уже известные продукты растений. Большой интерес представляет возможность использования активного ферментативного аппарата растительной клетки для биотрансформации химических соединений. Например, суспензия клеток наперстянки душистой осуществляет трансформацию сердечного гликозида дигитоксина в более активную и удобную для медицины форму – дигоксин, или биотрансформация суспензией клеток мяты перечной пулегона и ментона в конечный продукт – ментол.

В последние десятилетия проводятся большие работы по культивированию каллусных культур многоклеточных морских водорослей. Последние широко используются как продукт питания, в корм скоту, в качестве удобрения, для получения йода, ценных веществ (агар-агара и других желатирующих продуктов, шестиатомного спирта маннита, кровезаменителей и т.д.). Общая добыча морских водорослей в мире достигла 3 млн. тонн в год, из них более 2/3 выращивается в хозяйстве марикультуры, причем приблизительно половина приходится на Китай.

В МГУ в 80-х годах было исследовано 23 вида красных, бурых и зеленых макрофитных водорослей из бассейнов Черного, Белого, Балтийского и Японского морей с целью определения возможности получения каллусных и в перспективе суспензионных культур. Аналогичные работы ведутся и в других странах.

2.3. Клональное микроразмножение и оздоровление растений

2.3.1. Клональное микроразмножение

Сущность и достоинства метода. Термином клональное микроразмножение называют бесполое размножение растений в культуре тканей и клеток, при котором возникшие формы растений генетически идентичны исходному экземпляру. В основе микроразмножения лежит использование уникальной способности растительной клетки реализовать присущую ей тотипотентность под влиянием экспериментальных воздействий и дать начало целому растительному организму.

Этот метод позволяет за короткий срок получить большое количество однородного посадочного материала растений. Коэффициент микроразмножения достигает 10^5 - 10^7 растений в год, что в несколько тысяч раз больше, чем при использовании традиционных методов вегетативного размножения. Так, из одного растения земляники, хризантемы, розы при размножении их посредством культуры тканей можно получить в год свыше миллиона растений.

Клональное микроразмножение значительно ускоряет селекционный процесс, в 4-5 раз сокращая сроки получения товарной продукции. Чрезвычайно важно, что при размножении растений в культуре тканей происходит их освобождение от патогенных микроорганизмов и во многих случаях от вирусов. Оздоровление посадочного материала значительно улучшает качество продукции, увеличивает урожайность. Несомненное значение имеет однородность растений, получаемых в культуре тканей.

При микроразмножении экономятся площади теплиц, занятых под маточные растения. Тысячи размноженных растений легко размещаются на небольших площадях климатических камер. В культуре тканей можно поддерживать рост растений круглый год, что важно для растений, имеющих в цикле своего развития периоды покоя. При выращивании растений с длительной ювенильной фазой можно добиться ускоренного перехода от нее к репродуктивной фазе развития. И, наконец, методом культуры тканей удастся размножить растения, которые совсем не размножаются вегетативно.

Методы клонального микроразмножения. Все работы по клональному микроразмножению растений выполняют в стерильных условиях.

Различают несколько методов клонального микроразмножения.

1. Индукция развития *пазушных меристем*, при которой наиболее полно обеспечивается генетическая идентичность размножаемых

растений и родительских форм. Суть этого метода состоит в том, что верхушку побега размножаемого растения помещают на питательную среду, содержащую фитогормон кинетин. Через несколько недель формируется вегетативный побег, несущий у основания листья. В основании побега развивается каллус и дифференцируются корни. В пазухах листьев закладываются почки. Как правило, внесение в среду кинетина вызывает пробуждение и быстрое развитие боковых почек, которые образуют пазушные побеги второго и третьего порядков. При изоляции и переносе этих побегов на среду, содержащую те же концентрации кинетина, наблюдается повторение процесса активации пазушных почек. Так размножают малину, вишни, сливы, яблони, виноград, розы и др. При этом из одной стерильно полученной верхушки побега, по закону геометрической прогрессии, можно получить несколько тысяч растений в год.

2. Пролиферация каллуса и последующая регенерация из него растения. Принципиально отличается от рассмотренного выше способа тем, что здесь появляется возможность мутации генома. В основе этого метода микроразмножения лежит использование способности клеток экспланта, изолированного из растения и помещенного на питательную среду, дедифференцироваться.

Каллусные клетки активно делятся, размножаются и при определенных условиях могут перейти к организованному росту и формированию побегов. Основным условием, определяющим переход от пролиферации каллуса к органогенезу, является соотношение гормонов в питательной среде. При высоком соотношении экзогенных гормонов цитокинин/ауксин происходит образование побегов, при низком – индуцируется корнеобразование, а при среднем происходит пролиферация каллуса. Эта закономерность, впервые установленная Скугом и Миллером, легла в основу регуляции микроразмножения растений через культуру каллусных клеток (хотя из этого правила есть отдельные исключения).

Каллусные клетки можно неопределенно долго выращивать в условиях *in vitro*, периодически пересаживая их на свежую питательную среду, но при этом возникают явления, нежелательные при микроразмножении: изменение плоидности культивируемых клеток; структурные перестройки хромосом и накопление генных мутаций; потеря морфогенетического потенциала культивируемыми клетками. Длительное культивирование их усугубляет эти изменения, поэтому период неорганизованного роста при микроразмножении должен

быть сведен к минимуму. Снижение морфогенетического потенциала культивируемых клеток зависит от видовой принадлежности растения. Так, если каллус большинства злаковых растений теряет способность к морфогенезу в течение первых нескольких месяцев, то каллус табака сохраняет способность к формированию органов в течение четырех лет.

3. Образование придаточных побегов *непосредственно из экспланта*. Этот метод микроразмножения основан на способности изолированных частей растений при благоприятных условиях восстанавливать недостающие органы и ткани и таким образом регенерировать целое растение. Процесс является следствием нарушения корреляций между органами целого растения и представляет собой пример компенсационных корреляций, при которых восстанавливается нарушенное равновесие в организме. Это наиболее распространенный тип регенерации у высших растений, положенный в основу традиционных методов вегетативного размножения в культуре клеток и тканей. Почти любые органы и ткани растения можно использовать в качестве экспланта, если их удастся получить свободными от инфекции.

В зависимости от того, из каких участков растения берется эксплант, при использовании данного метода имеют место два принципиально различных явления: возникновение почек из существующих меристем или редифференциация специализированных клеток, образование меристематических очагов и дифференциация стеблевых почек.

Этим методом размножают на питательных средах в пробирках такие растения как бегония, каланхоэ, фиалки, петуния, цикорий, цикламены и др.

4. *Соматический эмбриогенез*. Этот тип клонального микроразмножения характеризуется тем, что зародышеподобные структуры (соматические зародыши -- эмбриониды) развиваются асексуально вне зародышевого мешка из соматических клеток культивируемых тканей путем, напоминающим нормальный зиготический эмбриогенез. Соматические клетки культивируемых тканей экспланта и каллуса при определенных условиях стимуляции превращаются в зиготоподобные клетки, дающие начало зародышеобразным структурам.

Первое описание соматического эмбриогенеза относится к культуре каллусных клеток моркови, в которых наблюдались глобулярные, сердцевидные, торпедовидные стадии развития соматического зародыша. Несколько позднее был описан соматический эмбриогенез

в суспензионной культуре клеток моркови. В настоящее время соматический эмбриогенез используется как один из методов клонального микроразмножения растений. Он лежит в основе микроразмножения большинства растений из семейств орхидных и цитрусовых. Индукция соматического эмбриогенеза осуществляется с помощью различных регуляторов роста, прежде всего фитогормонов.

2.3.2. Оздоровление растений

Практически все культурные растения поражаются вирусами. В настоящее время описано более 600 фитопатогенных вирусов, причем их список постоянно пополняется. Они не опасны для человека, но наносят большой ущерб сельскому хозяйству. Особенно сильно заражены вирусами те сельскохозяйственные культуры, которые размножаются вегетативным путем (клубнями, черенками, луковичками). Посевы картофеля повсеместно поражены фитовирусами: все клубни, потребляемые нами, весь товарный и почти весь семенной картофель содержит вирусы. Известно около 20 разных вирусов, поражающих растения картофеля. Ежегодный ущерб, наносимый только вирусами картофеля, достигает 25-50 % урожая. Помимо прямого снижения урожая, вирусные инфекции нередко значительно ухудшают его качество.

В основе безвирусного растениеводства лежит оздоровление сортов культурных растений методами культуры тканей с целью получения исходного безвирусного материала, ускоренное размножение посадочного материала черенкованием в тепличных условиях.

В 1949 г. было установлено, что апикальная меристема (небольшой участок не более 0,1 мм, расположенный на кончике стебля и состоящий из недифференцированных клеток, который постоянно растет и образует органы растения) практически не содержит вирусов. В 1952 г. Морелю и Мартену (Франция) удалось получить безвирусные георгины из зараженных растений. Сорт картофеля бель-де-фонтанэ, который практически исчез в результате заражения вирусом, был возрожден из здоровой меристемы, выделенной из зараженного растения и культивируемой *in vitro*.

Эти наблюдения и эксперименты и легли в основу оздоровления растений. В настоящее время предложены и освоены изящные методы культивирования ткани и выращивания растений из верхушечной меристемы, позволяющие получать здоровые растения – регенераты из исходных зараженных растений.

Одновременно ведутся работы по диагностике вирусов, разработке новых методов борьбы с фитовирусами, включая методы генетической инженерии (введение в геном растения генов, контролирующей устойчивость растения к вирусам).

2.4. Протопласты растительных клеток как объект биологического конструирования

2.4.1. Протопласты

Протопласт растительной клетки представляет собой по-существу растительную клетку, лишённую клеточной стенки. Снаружи он ограничен мембраной (плазмалеммой), содержит внутриклеточные органоиды, характеризуется структурной целостностью и способностью осуществлять активный метаболизм.

В растительной клетке протопласт выявляется как морфологически обособленное образование при плазмолизе. Плазмолиз – это отделение пристеночного слоя цитоплазмы от твердой оболочки растительной клетки. Его можно наблюдать под микроскопом, если поместить кусочек растительной ткани в раствор более концентрированный, чем вакуолярный сок. В этом случае будет происходить отток воды из клетки, так как клеточная стенка легко проницаема для воды. Однако она достаточно жестка и мало меняет форму при оттоке воды из клетки. Протопласт же, теряя воду, сокращается в объеме и отделяется от клеточных стенок. При этом он остается жизнеспособным. В нативной ткани цитоплазма всех клеток связана протоплазматическими тяжами (плазмодесмами), которые проходят через поры в клеточных стенках. Плазмолиз разрушает эту связь.

Получение протопластов. Существуют механический и энзиматический методы получения протопластов из растительных клеток.

Механический метод был предложен в 1892 г. Суть его состоит в том, что ткань выдерживают в концентрированном (0,1 М) растворе сахарозы, вследствие чего происходит плазмолиз. Затем ткань разрезают бритвой, и протопласты из разрезанных клеток выходят в раствор. Этот метод имеет ряд ограничений и в настоящее время заменен энзиматическим.

В энзиматическом методе для удаления клеточной стенки используются ферментативные препараты трех типов – целлюлазы, гемицеллюлазы и пектиназы. Их действие направлено на разрушение основных компонентов клеточной стенки – целлюлозы, гемицеллюлозы и пектиновых веществ. Целлюлозные молекулы, собранные в

микрофибриллы, формируют рыхлый, но прочный структурный остов, который погружен в аморфный матрикс из гемицеллюлоз, пектиновых веществ и белков. В клетках разных типов ткани соотношение этих компонентов разное, поэтому и соотношение в активности ферментов комплекса при гидролизе клеточной стенки в каждом конкретном случае должно быть свое.

Очень важным фактором для успешного выделения жизнеспособных, нативных протопластов является подбор осмотического стабилизатора (сахара, иногда ионные осмотики – растворы CaCl_2 , Na_2HPO_4 , KCl , концентрация 0,3-0,8 моль/л), защищающего лишенный клеточной стенки протопласт от осмотического разрушения. Другие условия: pH 5,4-6,2; изоляция протопластов от света или работа при слабом свете; температура – специфичная для конкретной ткани.

После энзиматической обработки ткани из нее с помощью фильтрации и последующего осадительного или флотационного центрифугирования выделяют протопласты.

Для получения протопластов кроме тканей растений широко используют клеточные суспензии и каллусные культуры.

Протопласты культивируют в жидких каплях, в чашках Петри с агаризованной питательной средой или в специальных сосудах.

Сразу после удаления раствора ферментов у протопластов начинается образование клеточной стенки. Этот процесс стимулирует добавление в питательную среду сахаров, ксилозы, рибозы. Для индукции деления протопластов в среду добавляют фитогормоны. Возможность регенерации растений из протопластов (с помощью эмбриоидов или через развитие каллуса с дальнейшей индукцией морфогенеза) свидетельствует об их тотипотентности.

2.4.2. Биологическое конструирование

Соматическая гибридизация. Изолированные протопласты за то время, пока они не образуют клеточной стенки, могут спонтанно сливаться между собой. Чтобы повысить частоту слияний, используют различные агенты химической или физической природы. Из химических агентов для адгезии (слипания) и слияния протопластов часто используют поливиниловый спирт (ПВС) или полиэтиленгликоль (ПЭГ). Недостаток этой техники состоит в том, что одновременно получить большое количество слившихся клеток очень трудно. Разработан физический метод, при котором в качестве индуктора

слияния протопластов используют импульсы электрического тока. Этот метод применяют для слияния разных протопластов, животных клеток и липосом.

Разработка способов индукции слияния протопластов вместе с развитием техники культивирования клеток *in vitro*, дающей возможность получения изолированных протопластов, их культивирования и образования каллуса, а в дальнейшем целого растения, сформировало новый, очень интересный и перспективный метод гибридизации растений – парасексуальную (неполовую), или соматическую гибридизацию.

Сущность этого способа гибридизации заключается в том, что в качестве родительских используют не половые клетки (гаметы), а клетки тела (сомы) растений, из которых изолируют протопласты. В отличие от полового скрещивания, где имеет место одностороннее исключение протоплазмы (мужские гаметы), при соматической гибридизации в образовавшемся гибриде оба партнера имеют более или менее равный цитоплазматический статус. В большинстве исследований слияние протопластов высших растений приводит к образованию гибрида, либо цибрида. Цибридное растение содержит цитоплазму обоих партнеров, а ядро – одного. Это происходит в том случае, если после слияния протопластов не происходит слияние ядер и одно из них дегенерирует.

Гибридизация с помощью слияния соматических клеток (протопластов) растений является приемом, сходным с разработанной значительно раньше гибридизацией соматических клеток животных. Имеется, однако, одно принципиальное различие: метод гибридизации соматических клеток животных позволяет получать гибридную клетку (гибридому), а гибридизация протопластов в последующем дает возможность получить гибридное растение.

До последнего времени генетики, и селекционеры обладали единственным инструментом конструирования новых растений – способом природного полового скрещивания. Оно представляет собой строго регламентированную систему гибридизации, где в качестве родительских форм можно использовать лишь определенные организмы в определенных сочетаниях.

Парасексуальная гибридизация позволяет:

1. Скрещивать филогенетически отдаленные виды организмов, которые невозможно скрестить обычным половым путем (например, получены соматические гибридные клетки между протопластами рас-

тений и животными клетками или между протопластами высших растений и водорослей).

2. Получать асимметричные гибриды, несущие весь генный набор одного из родителей и несколько хромосом другого.

3. Создать систему гибридизации, включающую одновременное слияние трех и более родительских клтков.

4. Получать растения, гетерозиготные по внеядерным генам, и т.д.

С момента первого сообщения о гибридизации растений табаков путем слияния соматических клеток (1972 г.) появилось большое количество работ по внутривидовой, межвидовой, межтрибной и межсемейной гибридизации. Методики гибридизации отработаны применительно к семействам пасленовых (табак, картофель, томат), крестоцветных, зонтичных (морковь) и др. Для практической селекции сельскохозяйственных растений гибридизация между очень далекими видами представляет потенциальный интерес главным образом как средство переноса небольшого количества генного материала от одного вида другому (асимметричные гибриды).

Большой интерес представляет принципиально новый подход для генетической трансформации растений – направленные изменения на уровне соматических клеток. Один из них можно определить как селекцию на клеточном уровне, когда популяция соматических клеток или протопластов растений рассматривается как суспензия индивидуальных организмов, способных дать целое растение. Воздействие мутагенами на соматические клетки и последующая селекция их позволили получить клеточные линии, устойчивые к заболеваниям, засолению почв, гербицидам и т.д. Эти клеточные линии дают растения с указанными свойствами, а также представляют материал для соматической гибридизации.

Ассоциации клеток. Перспективным направлением, которое развивается в последнее время, является создание новых клеток и клеточных систем путем введения микроорганизмов в клетку или в популяции культивируемых клеток растений. Экспериментально создаваемые клеточные системы называют ассоциациями. При этом исследования направлены на получение ассоциаций внутриклеточного (эндосимбиотического) и межклеточного (экзосимбиотического) типа. В первом случае проводят индуцированное введение микроорганизмов (путем эндоцитоза или в составе липосом) в изолированные протопласты высших растений. Во-вторых – совместно культивируют клетки или ткани растений с микроорганизмами.

Наряду с научным интересом эти работы преследуют и практические цели:

1. Серьезным ограничением практического использования культур растительных клеток является энергетическое обеспечение процессов биосинтеза. Растительные клетки в культурах гетеротрофны и обладают ограниченной способностью к фотосинтезу. Одним из решений данной проблемы могло бы быть введение в эти культуры микроорганизмов, синтезирующих субстраты для роста растительных клеток или предшественники биосинтеза. Особенно перспективно введение в культуры гетеротрофно растущих клеток фототрофных микроорганизмов.

2. Другая возможность использования в биотехнологии ассоциаций клеток высших растений с микроорганизмами состоит в получении растений, способных к фиксации молекулярного (атмосферного) азота.

Работы в этом направлении ведутся, получены первые результаты, которые вселяют надежды.

2.5. Культивирование клеток человека и животных

Культивирование клеток. Культивированием тканей животных начали заниматься в конце XIX века. К настоящему времени разработаны и отработаны в деталях все процедуры культивирования клеток и тканей. Имются линии различных клеток человека и животных.

Клетки животных не имеют клеточной оболочки, однако в составе ткани они, как правило, связаны межклеточным веществом. Оно в разных тканях может быть различным по своему составу – от мукополисахаридов до фиброзных белков, и в добавление к углеводным и белковым элементам содержит неорганические соли (например, костная ткань). Поэтому различные ткани требуют разных методов дезинтеграции. Эмбриональные и зрелые ткани, а также опухоли со слабо развитым межклеточным веществом часто удается дезагрегировать с помощью одной из трех методик или их сочетания:

способа механического разделения;

энзиматического переваривания;

обработки веществами, связывающими двухвалентные ионы.

Способ механического разделения отдельно применяется редко.

Среди многих энзимов, применяемых для дезинтеграции тканей, наиболее часто используют трипсин, а также коллагеназу, эластазу, папаин и др.

Некоторые ткани, особенно для сохранения своей целостности, нуждаются в двухвалентных катионах, особенно в ионах кальция и магния. Если эти ионы удалить с помощью связывающих их веществ, ткани легко подвергаются разделению. К таким веществам относятся этилендиаминтетраацетат (ЭДТА), всрсен, трилон В и др.

Все работы по культивированию клеток животных ведут в строго стерильных условиях. Клетки культивируют на предметных, покровных, часовых стеклах, в пробирках и специальных флаконах (рис. 2.2).

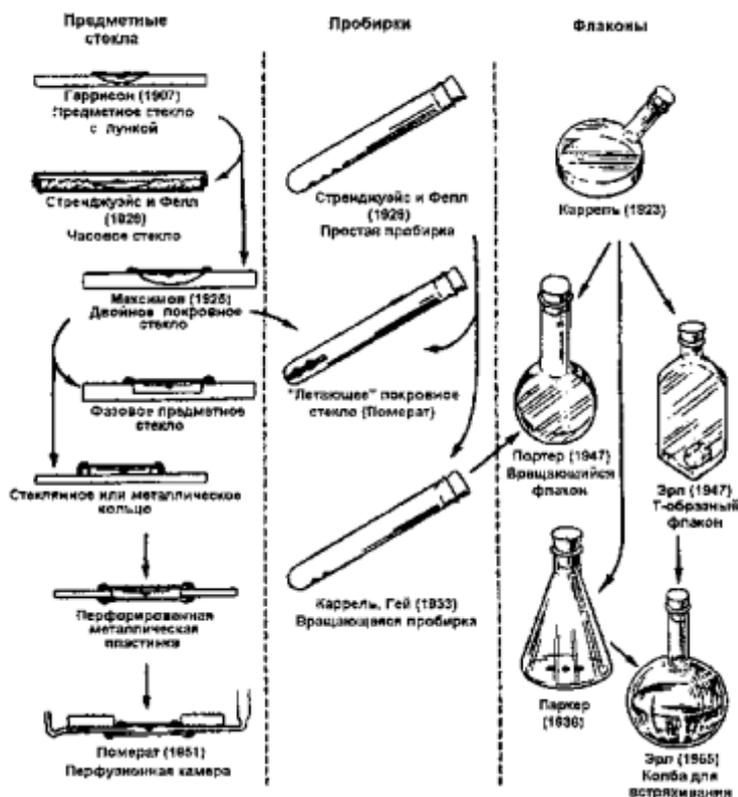


Рис. 2.2. Сосуды для культивирования клеток и тканей [3]

При кратковременном культивировании маленьких кусочков ткани их помещают в сгусток лимфы (или сыворотки), нанесенный в виде кап-

ли на покровное стекло и помещенный в лунку предметного стекла ("вишняя" капля). Для длительного культивирования тканей без пересева используют двойное покровное стекло. Культивирование органов осуществляют в часовых стеклах, на которых рост происходит в сгустке лимфы, а само стекло помещают в чашку Петри с мокрой ватой для поддержания влажности. Для получения качественного изображения при микроскопировании вместо вогнутых стекол используют камеры с плоскопараллельными стенками. Перфузионные камеры позволяют длительное время наблюдать за клетками и осуществлять киносъемку. Если нет необходимости в хороших оптических условиях, культивирование осуществляют в неподвижных или вращающихся пробирках. Для выращивания больших количеств клеток используют флаконы и колбы. Т-образный флакон Эрла с очень гладкими внутренними стенками обладает хорошими оптическими свойствами. Помимо названных сосудов применяют и другие конструкции.

Каждый тип клеток для своего культивирования требует питательную среду определенного состава. Бывают ростовые и поддерживающие (предназначенные, главным образом, для сохранения клеточных культур в хорошем состоянии в течение нескольких недель) среды. Их состав сложен, в них входят соли, аминокислоты, витамины, предшественники нуклеиновых кислот, источники углеводов, липидов и другие вещества, а также естественные компоненты (сыворотка крови, бычий эмбриональный экстракт, амниотическая жидкость, экстракт куриного эмбриона и т.д.). Среди сред для культивирования следует назвать среды Игла, Хэма F-10, 199, Вэймаута и др.

Все клетки теплокровных должны выращиваться в термостатах при температурах, близких к нормальной температуре тела животных.

Можно считать, что основы использования клеток человека и животных в биотехнологии были заложены в 1949 г., когда удалось вырастить вирус полиомиелита в культивируемых клетках кожи и мышц человеческого зародыша. В дальнейшем оказалось возможным выращивать вирусы не только в клетках первичных культур, но и в клетках перевиваемых линий, то есть в клетках, поддерживаемых в культуре в течение неопределенно долгого времени. Примерами таких линий являются клетки *HeLa* (карцинома шейки матки человека), ВНК-21 (почка эмбриона хомяка), *Vero* (почка зеленой мартышки).

Благодаря применению метода клеточных культур вирусы стали выделять в достаточно чистом виде, что, в свою очередь, способствовало быстрому прогрессу в области диагностики вирусных заболева-

ний и получения вакцин. Что касается применения клеточных культур для получения ценных веществ, то в этом направлении делаются только первые шаги.

Достаточно продолжительное время люди пользуются физиологически активными веществами, выделенными из органов и тканей животных, для лечения заболеваний и регуляции функций организма (инсулин, интерферон, гормон роста, половые гормоны и др.). Потребность в таких препаратах велика, но производство их дорого, технологически несовершенно и связано с уничтожением большого количества животных. Кроме того, далеко не всегда препараты, полученные от животных, достаточно эффективны для человека.

Представлялось перспективным, поэтому для промышленного производства физиологически активных соединений использовать культуры клеток соответствующих органов человека и животных. На первый взгляд, решить эту задачу несложно, однако при реализации ее пришлось встретиться с рядом серьезных трудностей. Прежде всего, дифференцированные клетки, вырабатывающие конкретное физиологически активное вещество, при помещении их в культуральную среду плохо размножаются (или совсем не размножаются). Кроме того, если часть клеток в процессе адаптации начинает делиться, то оказывается, что они теряют способность вырабатывать требуемое физиологически активное вещество. Существуют и другие трудности (подбор и дороговизна питательных сред, особенности культивирования и др.). Несмотря на это, в данной области достигнуты некоторые успехи, в частности, получен интерферон (гликопротеид, обладающий универсальным противовирусным действием) при культивировании фибробластов, получены культуры β -клеток поджелудочной железы, продуцирующие инсулин.

Получение моноклональных антител. Новые перспективы в области культивирования клеток человека и животных появились после того, как Дж. Барский в 1960 г. обнаружил способность соматических клеток сливаться *in vitro*, то есть давать соматические гибриды (гибридомы), аналогично слиянию протопластов растений, открытому позднее (в 1972 г.). Большой вклад в дальнейшее развитие соматической гибридизации клеток животных внесли Б. Эфрусси, Г. Харрис и др. Примером практического использования гибридом является получение моноклональных антител.

Иммунная система вырабатывает специфические антитела на огромное множество антигенов. В основе такой способности лежит

наличие большого разнообразия клонов лимфоцитов, каждый из которых вырабатывает антитела одного типа с узкой специфичностью, реагирующие с определенной химической группировкой молекулы антигена – антигенной детерминантой (АД).

В ответную реакцию на действие одного антигена вовлекается в работу большое количество лимфоцитов, каждый из которых вырабатывает специфические антитела, реагирующие со своими АД на молекуле антигена.

Моноклональные антитела – это высокоспецифичные антитела, продуцируемые потомками одной-единственной клетки (клоном). Общее число различных клонов лимфоцитов у мышей, например, по оценкам некоторых исследователей, равно 10^7 - 10^{10} .

В 1975 г. Д. Кёлер и Ц. Милстейн предложили принципиально новый метод получения моноклональных антител, за что в 1984 г. им была присуждена Нобелевская премия. Они получили гибридомы путем слияния клеток селезенки от иммунизированного определенным антигеном животного с миеломными (раковыми) клетками. Для повышения частоты слияний клеток используют полиэтиленгликоль (ПЭГ), вирус Сендай или другие агенты.

Полученная гибридома приобрела способность синтезировать определенное антитело и неограниченно делиться. Последнее свойство она получила от миелоидной клетки.

Следующим этапом после процедуры слияния клеток является операция выделения гибридом путем культивирования клеток на селективной среде, на которой выживают только гибридомы.

Затем из гибридом отбирают те, которые вырабатывают специфические антитела (в ответ на введенный в организм животного антиген). После этого производят массовое размножение клеток в условиях *in vitro* или в организме животных, которым вводят в брюшную полость гибридомные клетки.

Наконец, из культуральной среды или асцитной жидкости (отобранной из брюшной полости) выделяют моноклональные антитела.

Моноклональные антитела применяют для целей диагностики, лечения, выделения веществ в чистом виде. Перспективно возможное применение их для лечения опухолей с помощью иммунотоксиков. Последние представляют собой комплексы моноклональных антител, специфичных для опухолевых клеток, и субъединиц белковых ядов, например, рицина – белка, выделяемого из семян клещевины. Этот белок состоит из двух субъединиц (А и В), соединенных между собой

дисульфидной связью. Субъединица А, попав в цитоплазму, необратимо ингибирует белковый синтез клетки, тем самым убивает ее. Выделенную из рицина субъединицу А ковалентно соединяли с молекулой моноклонального антитела, специфичной к антигену опухолевой клетки. После введения в организм этот комплекс избирательно связывается с поверхностью опухолевой клетки и, в конечном счете, оказывается "втянутым" внутрь ее. Субъединица А в цитоплазме высвобождается и убивает клетку. Моноклональное антитело в этом случае осуществляет доставку токсина только к опухолевым клеткам.

Клонирование животных. Если вегетативное размножение растений ни у кого не вызывает удивления, то клонирование животного организма, то есть развитие его из генома соматической клетки (хотя и "упакованного" в энуклеированную яйцеклетку) стало настоящей сенсацией второй половины XX века, точнее его конца, когда в 1997 году появился ягненок Долли и начались разговоры о возможном клонировании человека.

Первые опыты по пересадке ядра соматической клетки в яйцеклетку с удаленным собственным ядром проводили на лягушке Р. Бриггс, Т. Кинг, затем Дж. Гердон с Р. Ласки. Из такой реконструированной яйцеклетки в начале удалось получить головастика, позднее - взрослого животного (лягушку). В Советском Союзе удалось клонировать методически более сложный объект - мышь (Машку). Лишь после этого появилось сенсационное сообщение о клонировании Я. Уилмутом ягненка Долли из реконструированной яйцеклетки с ядром клетки молочной железы овцы породы финн дорсет. Клетки молочной железы получали от 6-летней овцы, находящейся на последнем триместре беременности. Реконструированные яйцеклетки вначале культивировали в перевязанном яйцеводе промежуточного реципиента (овцы), а затем переместили в матку окончательного реципиента - овцы шотландская черномордая. Обращает на себя внимание крайне низкий выход удачных исходов с клонированием млекопитающих. В последующем практически по сходной методике были клонированы и другие животные (корова, свинья, кошка, макака и т.д., включая эмбрион человека). Высказываются надежды на возможное в будущем клонирование мамонта, помещая ядро соматической клетки извлеченного из слоя вечной мерзлоты мамонтенка в энуклеированную яйцеклетку современного животного.

Обращает на себя внимание, что во всех этих случаях геном соматической клетки помещали в яйцеклетку, что говорит о решающей

ее роли (вероятно, со кортикального слоя) в индушировании и организации начальных этапов эмбриогенеза (на эпигеномном уровне). Сами соматические клетки, включая стволовые клетки (о которых речь пойдет ниже), не в состоянии сформировать организм многоклеточного животного, в отличие от соматических клеток растения.

Стволовые клетки. Еще в древности использовались суспензии органов животных для увеличения жизнеспособности человека. Об этом поведал в 1875 г. немецкий египтолог Георг Эберс, опубликовавший самый обширный из всех известных древнеегипетских медицинских трактатов. Новый всплеск исследований в области тканевой терапии связан с работами гистолога, профессора Санкт-Петербургской Военно-медицинской академии Александра Александровича Максимова. Он полагал, что в течение всей жизни позвоночного животного в его организме существуют клетки, которые способны делиться и порождать специализированные клетки, подобно стволу дерева, дающему начало своим многочисленным ветвям. В 1908 г. А.А. Максимов ввел в научный обиход и сам термин "стволовая клетка". Позднее было установлено, что существуют клетки, обладающие свойством тотипотентности, то есть способностью образовывать целый организм. Их назвали эмбриональными стволовыми клетками (ЭСК). Такими свойствами обладают бластомеры нескольких начальных делений зиготы, с чем связано рождение однояйцовых близнецов. Кроме ЭСК существуют плюрипотентные СК, которые способны дифференцироваться в зависимости от своего окружения в различные типы тканей. Существуют фетальные СК (ФСК), которые получают из абортивного материала на 9-12 неделях беременности, а также СК клетки пуповинной крови.

У взрослого человека СК в малых количествах имеются в разных органах, наибольшее содержание их выявлено в костном мозге. В нем содержатся два вида стволовых клеток. Одни из них дают все многообразие клеток крови (гемопоэтические стволовые клетки), другие – стромальные СК, способны дифференцироваться во множество типов специализированных клеток (гепатоциты, нейроны, мышечные, костные клетки и т.д.). В организме человека СК выполняют роль резервного пула, восполняющего погибшие клетки органов. С возрастом содержание СК непрерывно снижается.

Многочисленные исследования, которые ведутся во всем мире в области клеточной терапии, направлены на то, чтобы с помощью СК

восстанавливать поврежденные органы человека, вплоть до выращивания их сызнова (например, зубов).

Пуповинную кровь отбирают при рождении ребенка, затем с помощью центрифугирования из нее выделяют СК, погружают в криопротектор (раствор, предохраняющий их от разрушения при замораживании), помещают в специальные мешки, герметично их запаивают и помещают в криобокс, где плавно охлаждают до -80°C , затем погружают в жидкий азот (-196°C). Считается, что клетки могут храниться в этих условиях без потери активности до 15 лет. В случае необходимости СК размораживают и применяют для лечения человека, у которого они были взяты. Забор костного мозга у человека производят путем пункции тазовой кости или грудины под наркозом.

Глава 3. ПРОМЫШЛЕННАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

Промышленная, или техническая микробиология является традиционной, самой крупномасштабной и весьма востребованной отраслью биотехнологии, несмотря на появление направлений, использующих иные объекты. Диапазон задач, решаемых с помощью микроорганизмов, разнообразие которых велико, огромен. Новую жизнь промышленной микробиологии дают достижения генетической инженерии, поставляющие для нее новые, не встречающиеся в природе штаммы микроорганизмов.

3.1. Краткие сведения о микроорганизмах

Большинство микроорганизмов представлено одноклеточными формами. Они характеризуются высокой скоростью роста и размножения, которое часто происходит путем простого деления клетки. Интенсивность метаболизма у микроорганизмов тоже высока, что отчасти объясняется большим значением отношения поверхности клетки к ее объему. Они достаточно однообразны по форме и чрезвычайно разнообразны по физиологическим и биохимическим свойствам.

Некоторые микроорганизмы растут в условиях, непригодных для жизни других организмов. Так, они способны расти при температуре свыше 100° ($70-105^{\circ}$), повышенном уровне радиации (миллионы рентген в сутки), в сильнокислой ($\text{pH} < 1,0$) или щелочной ($\text{pH} > 9,0$ и выше) среде, при высокой концентрации хлорида натрия (25-30%), в отсутствии кислорода, могут переносить очень низкую температуру, высушивание и другие экстремальные условия.

Ряд бактерий и водоросли растут на минеральных средах, используя для биосинтеза в качестве единственного источника углерода углекислый газ, то есть являются автотрофами. Подобно высшим растениям, они могут использовать энергию света (фотоавтотрофы) или получать ее при окислении неорганических соединений (хемоли-тотрофы). Однако, многие микробы для получения энергии и биосинтеза соединений клетки нуждаются в органических веществах (гетеротрофы). Некоторым из этих микроорганизмов (например, молочнокислым бактериям, простейшим) для развития нужны факторы роста (готовые витамины, аминокислоты, другие органические вещества, которые они сами синтезировать не могут). Такие микробы называют ауксотрофами. Многие микробы способны разлагать сложные органические соединения (белки, углеводы, в том числе целлюлозу, ли-

пиды, нуклеиновые кислоты, углеводороды), некоторые используют вещества, токсичные для человека и животных (метанол, аммиак, окись углерода, сероводород, нитриты и др.) и осуществляют разложение несприродных соединений (ксенобиотиков).

Прокариоты. Не имеют ограниченного мембраной ядра, генетическая система представлена примитивной кольцевой хромосомой. Они лишены хлоропластов, митохондрий, аппарата Гольджи, лизосом, а рибосомы отличаются от рибосом эукариот. Митоз у прокариот отсутствует.

Эукариоты. Содержат оформленное ядро, митохондрии, лизосомы, аппарат Гольджи, центриоли, рибосомы. Ядерная ДНК заключена в хромосомах, обычно не кольцевых, соединена с гистонами. Делятся путем митоза.

Прокариотические и эукариотические микроорганизмы – достаточно сложные объекты биотехнологии. Они осуществляют цепи биохимических реакций, автоматически регулируют их в соответствии с условиями среды. Достоинством микроорганизмов, отличающим их от ферментов, является способность к самовоспроизведению.

В биотехнологическом производстве в качестве продукта используют как компоненты их тела (или всю биомассу), так и конечные (или промежуточные) продукты, появляющиеся при их участии в окружающей среде.

3.2. Кинетика транспорта субстратов в клетку

Скорость образования продукта микроорганизмами определяется скоростью самой медленной ферментативной реакции, входящей в систему взаимосвязанных реакций ("узкое место", "горлышко бутылки"). Так обстоит дело в случае работы микроорганизмов в кинетической области, когда лимитирующим процессом является ферментативная реакция.

Однако, прежде чем начнется ферментативное превращение субстрата в продукт, молекулы субстрата должны проникнуть внутрь клетки. Поэтому возникает вопрос: не работает ли микроорганизм в, так называемой, диффузионной области, где лимитирующим фактором является скорость поступления субстрата в клетку?

Основным барьером между клеткой и внешней средой является клеточная мембрана. Наряду со множеством разнообразных функций она обеспечивает относительное постоянство внутреннего состава клетки путем регулирования обмена веществ между клеткой и окру-

жающей средой. Механизмы и скорость перемещения растворенных веществ через биологические мембраны зависят от размеров молекул, степени их гидрофобности, а также особенностей структуры. Молекулы транспортируемых веществ или ионы металлов могут переноситься через мембрану по трем вариантам: 1) независимо от наличия и переноса других соединений (унипорт), 2) одновременно и однонаправленно с другими соединениями (симпорт) и 3) одновременно и противоположно направленно с другими соединениями (антипорт) (рис. 3.1).

Поступление веществ в клетку может осуществляться при помощи двух принципиально различных механизмов: неспецифической диффузии (простой, или пассивной) и специфического транспорта (облегченная диффузия и активный транспорт) (рис. 3.2).

Пассивная диффузия. В ходе пассивной диффузии осуществляется перемещение веществ вдоль градиента концентрации в сторону более низкого значения ее, без затраты энергии. Диффундирующие молекулы не модифицируются и не соединяются с другими видами молекул. С выравниванием концентрации по обе стороны мембраны скорость диффузии падает. Через липидный бислой проходят незаряженные молекулы (вода, CO_2 , мочевины, этанол и др.), а также гидрофобные низкомолекулярные органические вещества.

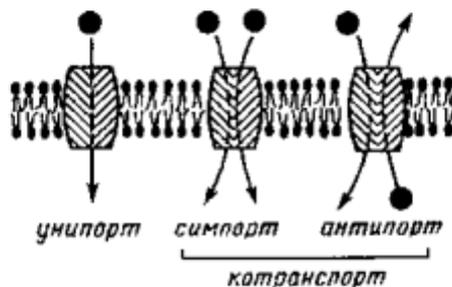


Рис. 3.1. Классификация способов переноса через мембрану [12 гл.5]

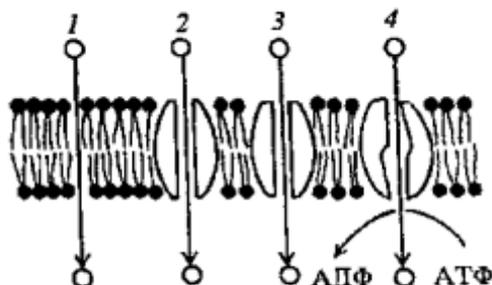


Рис. 3.2. Виды пассивного и активного транспорта веществ через мембрану: 1 – простая диффузия; 2 – облегченная диффузия; 3 – каналообразующий белок; 4 – активный транспорт [6 гл.2]

Процесс диффузии описывается законом Фика:

$$v_d = -D \frac{d[S]}{dr},$$

где v_d – скорость транспорта в расчете на единицу поверхности, участвующей в переносе субстрата S ; D – коэффициент диффузии для субстрата S ; $d[S]/dr$ – градиент концентрации субстрата.

Для опосредованных мембранных транспортных процессов (облегченной диффузии и активного транспорта) характерны кинетика насыщения и специфичность к транспортируемому веществу.

Облегченная диффузия. Осуществляется с участием специальных белковых молекул-переносчиков (пермеаз, или транслоказ), которые, соединяясь с транспортируемыми молекулами, как бы "протаскивают" их через мембрану. Пермеазы отличаются высокой специфичностью по отношению к транспортируемому веществу и по свойствам напоминают ферменты. Перенос веществ не требует энергии, так как происходит в направлении меньшей концентрации вещества. По такому механизму, в частности, переносится глюкоза. Скорость облегченной диффузии

$$v_{od} = V \frac{[S]}{K_m + [S]},$$

где V – максимальная скорость поступления вещества в клетку; $[S]$ – концентрация субстрата около внешней стороны мембраны; K_m – константа Михаэлиса (численно равна концентрации $[S]$, при которой $v_{od} = 0,5V$).

При $[S] \gg K_m$ скорость диффузии приближается к предельному (максимальному) значению (рис. 3.3).

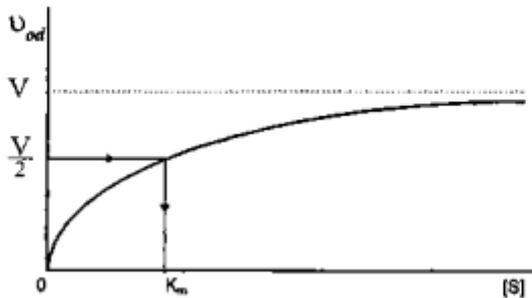


Рис. 3.3. Влияние концентрации субстрата S на скорость облегченной диффузии

Облегченная диффузия происходит с большей скоростью, чем пассивная диффузия.

Активный транспорт. В отличие от пассивной и облегченной диффузии активный транспорт происходит в направлении более высокой концентрации переносимого вещества, поэтому осуществляется с затратой энергии. Системы активного транспорта могут создавать в клетке концентрации вещества, во много раз превышающие его концентрацию во внешней среде. Кинетика поступления вещества в клетку, как и в случае с облегченной диффузией, описывается уравнением Михаэлиса-Ментен.

Механизмы активного транспорта функционируют за счет энергии АТФ (перенос сахаров, аминокислот) и во многих случаях за счет разности электрохимического потенциала ионов водорода, создающейся на цитоплазматической мембране ($\Delta\mu_H^+$). Градиент электрохимического потенциала ионов водорода генерируется у бактерий мембраносвязанными протонными насосами, которые выбрасывают эти ионы на наружную поверхность мембраны, вследствие чего внутренний объем клетки защелачивается и приобретает более отрицательный электрический потенциал. Поскольку активный транспорт связан с затратой энергии, то на него оказывают влияние ингибиторы энергетического метаболизма, а также разобщители окисления и фосфорилирования – протониферы, которые уменьшают трансмембранный потенциал.

Важную роль в физиологии бактерий играют неорганические ионы. Бактерии имеют специфические транспортные системы для

каждого отдельного иона или группы близкородственных ионов, которые могут конкурировать между собой (например, SO_4^{2-} , CrO_4^{2-} , SeO_4^{2-} , MoO_4^{2-}).

Таким образом, за исключением пассивной диффузии, все остальные механизмы транспорта веществ оказываются кинетически неотличимы от процессов, относящихся к кинетической зоне, непосредственно связанных с клеточным метаболизмом.

Если лимитирующим процессом является диффузия, то ее скорость при глубинном культивировании микроорганизмов можно повысить путем перемешивания среды и повышения концентрации слабо диффундирующего субстрата.

Процессы диффузии обычно приходится учитывать при культивировании на поверхности твердых сред, а также при глубинном культивировании, если микроорганизмы находятся в виде флоккул (скоплений клеток) или биологических пленок, а также при использовании в качестве субстратов плохо растворимых в воде газов. Это же относится в ряде случаев и к иммобилизованным микроорганизмам.

3.3. Феноменология роста периодической культуры

Как и в случае с выращиванием культуры клеток многоклеточных организмов под периодической культурой понимается замкнутая по всем ее компонентам (за исключением газов) система, в которую первоначально загружается питательная среда и инокулят (микроорганизмы), а через определенное время одномоментно производится остановка процесса и сьем полученного продукта. Это старый способ проведения микробиологического процесса, не потерявший своих позиций до настоящего времени. Процесс выращивания микроорганизмов в периодической культуре представляется довольно простым, типичным практически для всех микроорганизмов. Он характеризуется прохождением ряда стадий, приводящих к получению из ничтожного количества посевного материала (инокулята) значительного количества биомассы и продуктов метаболизма.

Поведение системы в течение всего времени культивирования графически описывается с помощью кривой роста, которая представляет собой отражение своего рода истории роста культуры. Она обычно изображается в полулогарифмических осях: время — логарифм биомассы, которые позволяют более четко выделять фазы роста (рис. 3.4).

В общем случае после посева микроорганизмов в среду, не лимитированную по содержанию компонентов питания, периодическая

культура начинает свое существование с лаг-фазы, в течение которой рост биомассы отсутствует. Такая картина наблюдается в том случае, когда в качестве инокулята используются ослабленные голоданием или отравленные микроорганизмы. Чтобы начать делиться, они должны пройти период адаптации к условиям нормальной питательной среды, восстановить утраченные в неблагоприятный период внутриклеточные структуры. Лишь после этого начинается в ускоряющемся темпе деление клеток (фаза ускорения роста). Лаг-фазу и фазу ускорения роста в совокупности называют лаг-периодом, который отсутствует, если инокулят берется из культуры, находившейся в фазе экспоненциального роста.

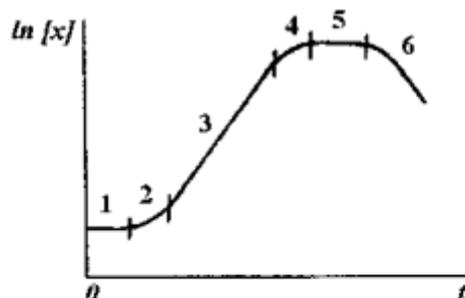


Рис. 3.4. Кривая роста периодической культуры:

1 — лаг-фаза; 2 — фаза ускорения роста; 3 — экспоненциальная фаза; 4 — фаза замедления роста; 5 — стационарная фаза; 6 — фаза отмирания; $[x]$ — концентрация биомассы

В этой фазе микроорганизмы наиболее жизнеспособны, время между соседними делениями минимально, так как отсутствуют лимитирование по продуктам питания и отравление выделяющимися в среду продуктами метаболизма (свежая среда). В полулогарифмических осях экспоненциальной фазе соответствует отрезок прямой линии. Рост идет с максимально возможной скоростью, генетически заложенной в клетках. Однако со временем питательная среда истощается и в ней накапливаются продукты обмена веществ. Все это уменьшает темпы деления клеток и переводит культуру в фазу замедления роста, которая сменяется стационарной фазой, когда рост биомассы прекращается. Культура в стационарной фазе может содержать самые разнокачественные клетки: живые, но голодающие, живые, но ингибированные продуктами метаболизма, отмирающие по причине голодания и самоотравления. Вследствие этого в стационарной фазе

устанавливается равенство скоростей роста и отмирания клеток популяции. После стационарной фазы, а иногда сразу после прекращения роста, наступает фаза отмирания. Растущие клетки теряют свою стабильность, когда по каким-либо причинам рост останавливается. Прекращение роста немедленно вызывает деструктивные процессы в клетках. Фаза отмирания характеризуется автолизом (самоперевариванием) клеток и уменьшением биомассы. Автолиз (аутолиз) в фазе отмирания представляет собой экстремальное проявление нестабильности клеток после прекращения их роста.

3.4. Кинетика роста периодической культуры

Важной особенностью микробных популяций является их многочисленность, которая позволяет, подобно химической кинетике, обращаться с концентрацией микроорганизма (плотностью его популяции) как с непрерывно изменяющейся величиной $[x]$. Ошибка, которая возникает вследствие игнорирования дискретности микробных популяций

$$m \sim 1/\sqrt{[x]}.$$

При значениях $[x]$, с которыми приходится иметь дело на практике, величина m очень мала, и ей можно пренебречь. Это позволяет при математическом описании кинетики численности микробных популяций использовать дифференциальные уравнения.

Уравнение Мальтуса, применительно к микробной популяции, имеет следующий вид:

$$\frac{d[x]}{dt} = r[x],$$

где r — коэффициент естественного прироста.

Значение r равно разности между удельной скоростью роста μ и удельной скоростью отмирания ε популяции ($r = \mu - \varepsilon$).

После решения (интегрирования) уравнения Мальтуса получается два уравнения: в осях $[x]-t$

$$[x] = [x_0] e^{rt}$$

и в полулогарифмических осях $\ln[x]-t$

$$\ln[x] = \ln[x_0] + rt,$$

где $[x_0]$ — начальная концентрация микроорганизмов (при $t=0$).

Анализ последнего уравнения позволяет объяснить с учетом значений μ и ε ход кривой роста численности популяции (и ее био-

массы). В лаг-фазе μ и ε равны нулю, поэтому некоторое время значение $\ln[x]$ остается постоянным (равным $\ln[x_0]$). Затем μ постепенно возрастает до значения μ_{\max} при отсутствии смертности ($\varepsilon=0$). Этому случаю соответствует фаза ускорения роста. В экспоненциальной фазе $\mu=\mu_{\max}$, а смертность по-прежнему отсутствует (не лимитированная по субстратам питательная среда, незначительное содержание в ней вредных продуктов обмена). Однако, по мере истощения питательной среды удельная скорость роста начинает все быстрее снижаться ($\mu<\mu_{\max}$) и появляется смертность ($\varepsilon>0$), но $\mu>\varepsilon$. Этой ситуации соответствует фаза замедления роста. В стационарной фазе значения удельной скорости роста и удельной скорости отмирания сравниваются ($\mu=\varepsilon$), коэффициент естественного прироста r становится равным нулю и рост концентрации микробной популяции прекращается ($\ln[x]$ становится постоянным). В фазе отмирания значение ε начинает преобладать над μ ($\varepsilon>\mu$, $r<0$), и концентрация микробной популяции снижается.

При производстве биомассы режим культивирования стремятся по возможности вести с максимальной скоростью, когда

$$\frac{d[x]}{dt} = \mu_{\max} \cdot [x], \text{ а после интегрирования } \ln[x] = \ln[x_0] + \mu_{\max} t,$$

что соответствует экспоненциальной фазе на кривой роста (в отсутствии лаг-периода).

Если предположить, что размножение микробных клеток происходит простым делением, то за каждое поколение количество клеток будет удваиваться, и через n последовательных поколений выразится формулой

$$[x] = [x_0] \cdot 2^n, \text{ или } [x] = [x_0] \cdot 2^{t/g},$$

где g — продолжительность жизни одного поколения (время удвоения численности популяции).

После логарифмирования этого уравнения получим

$$\ln[x] = \ln[x_0] + \frac{\ln 2}{g} \cdot t.$$

Из равенства двух уравнений для нахождения значения $\ln [x]$, получим

$$\mu_{\max} = \frac{\ln 2}{g} = \frac{0,693}{g}.$$

Эта формула связывает удельную скорость роста концентрации микробной популяции и время генерации g . Определив, например,

под микроскопом среднее значение величины g , можно вычислить значение удельной скорости роста.

Величина μ представляет одну из наиболее важных характеристик как самого организма, так и условий среды. В выражении

$$\mu = \frac{d[x]/dt}{[x]}$$

числитель $d[x]/dt$ является абсолютным приростом концентрации. После деления его на концентрацию $[x]$ получаем относительную, или удельную скорость роста μ с размерностью T^{-1} (мин^{-1} , час^{-1} , или $1/\text{мин}$, $1/\text{час}$). Таким образом, для нахождения значения μ можно использовать величины g , весовой прирост биомассы или прирост величины рассеивающей способности суспензии клеток, найденный с помощью ФЭКа.

Значение μ зависит от концентрации лимитирующего (обычно основного, при избытке остальных компонентов) субстрата питательной среды S . Согласно уравнения Моно

$$\mu = \frac{\mu_{\max} [S]}{K_S + [S]},$$

где K_S – субстратная константа, численно равная концентрации субстрата, при которой $\mu = 0,5\mu_{\max}$.

Это уравнение напоминает уравнение Михаэлиса-Ментен для скорости ферментативной реакции, поскольку прирост биомассы обеспечивается работой ферментов. Ему, опять же, соответствует график кривой с насыщением, для которого $\mu = \mu_{\max}$ при $[S] \approx 10K_S$ (рис. 3.5).

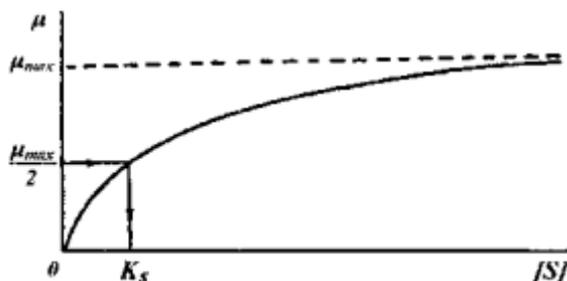


Рис. 3.5. Зависимость удельной скорости роста от концентрации субстрата

Величина K_S так же, как и μ_{\max} , является важным, генетически детерминированным показателем микроорганизма.

Другим существенным фактором, влияющим на скорость роста популяции микроорганизмов, может быть концентрация продуктов метаболизма в окружающей среде. Согласно исследованиям академика Н.Д. Иерусалимского с сотр., зависимость удельной скорости роста от концентрации продукта-ингибитора может быть выражена уравнением неконкурентного торможения энзиматических реакций

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot K_p}{K_p + [P]},$$

где $[P]$ – концентрация продукта-ингибитора; K_p – константа ингибирования, численно равная концентрации $[P]$, при которой $\mu = 0,5 \mu_{\max}$.

Графически уравнение Иерусалимского выражается кривой (рис. 3.6).

Совместное действие на μ концентраций $[S]$ и $[P]$ выражается уравнением Моно-Иерусалимского

$$\mu = \mu_{\max} \frac{[S]}{K_m + [S]} \cdot \frac{K_p}{K_p + [P]}.$$

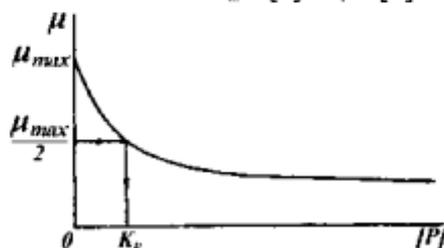


Рис. 3.6. Зависимость удельной скорости роста от концентрации продукта-ингибитора

3.5. Кинетика роста проточной культуры

Метод проточного культивирования пришел в биотехнологию из химической технологии. Принцип проточного культивирования состоит в том, что в емкость, где размножаются микроорганизмы, непрерывно подается свежая питательная среда и одновременно отбирается из нее такой же объем культуры. По этому принципу работают два различных процесса культивирования: процесс полного вытеснения и процесс полного (идеального) смешения.

В первом случае емкость для выращивания микроорганизмов по форме представляет собой трубу – тубулярный ферментатор, в который с линейной скоростью u (м/час) втекает среда (с концентрацией

$[S_0]$) и посевной материал (с концентрацией $[x_0]$). Перемешивание не производится (процесс анаэробный). По ходу движения жидкости происходит снижение концентрации субстрата на выходе из аппарата (с рабочей длиной l_p) до значения $[S_K]$ и повышение концентрации биомассы до значения $[x_K]$ (рис. 3.7).

В производственных условиях тубулярный ферментатор после запуска сам себя обеспечивает инокулятом путем частичного возврата биомассы с выхода (рис. 3.8). Доля потока U (объемная скорость, $\text{м}^3/\text{час}$), которая возвращается на вход ферментатора, равна α . Путем отстаивания или центрифугирования производят концентрирование биомассы, подаваемой на вход ферментатора, поэтому в первом приближении можно считать, что ее объем не влияет на скорость потока U и концентрацию субстрата $[S_0]$ на входе ($\alpha \ll 1$).

Примером практического применения тубулярного ферментатора является производство пива в башенных (вертикальных) проточных емкостях. Аналогичная картина наблюдается в батарее последовательно соединенных 10-12 проточных ферментаторов, используемой при производстве этилового спирта.

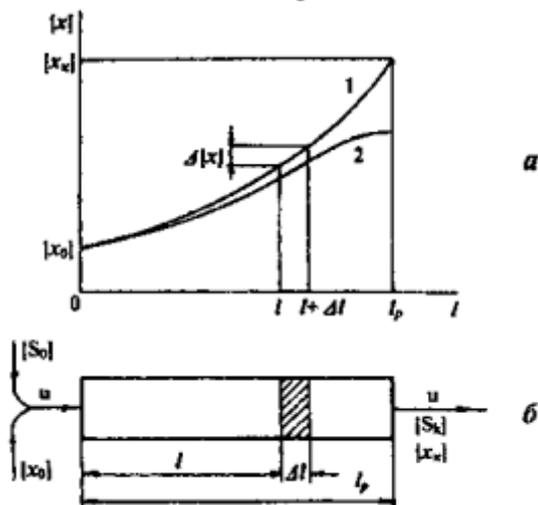


Рис. 3.7. Изменение концентрации биомассы (а) по длине тубулярного ферментатора (б) при нелимитированном (1) и лимитированном (2) концентрацией субстрата росте



Рис. 3.8. *Схема работы тубулярного ферментатора с частичным возвратом биомассы. C – сепаратор (центрифуга или отстойник)*

В процессе полного смешения рост культуры происходит в ферментаторе при интенсивном перемешивании. Перемешивание достигается продуванием воздуха (барботажем) или работой мешалки, либо обоими этими способами одновременно. Во всей массе культуры условия должны быть совершенно одинаковыми. Этот метод культивирования называется также гомогенно-проточным. В ферментаторе создаются условия, соответствующие любой точке кривой роста в фазе замедления роста (от конца экспоненциальной фазы до начала стационарной). В установившемся режиме скорость разбавления $D=U/V$ (U – объемная скорость подачи питательной среды; V – рабочий объем ферментатора) равна удельной скорости роста численности популяции. Система обладает способностью автоматически подстраиваться к изменившимся условиям культивирования ($[S_0]$, D) изменением скорости роста (μ) и концентрации биомассы ($[x]$).

При таком способе культивирования нельзя получить устойчивое состояние системы только при максимальной скорости роста (μ_{\max}). Незначительное повышение скорости протока (D) или воздействие, замедляющее рост, приводит к тому, что скорость роста оказывается меньше скорости протока, и культура быстро вымывается из ферментатора.

Воспроизведение в проточном ферментаторе определенной точки кривой роста широко используется в биотехнологии. Хорошо отработанный периодический процесс выращивания микроорганизмов экономически выгоден, так как культура непрерывно находится в состоянии максимальной активности, и не тратится время на загрузку и выгрузку аппарата, прохождение лаг-периода.

В ферментаторе полного смешения управление скоростью роста обычно осуществляют путем лимитирования одним субстратом при нелимитирующих концентрациях других компонентов питательной среды. Поскольку рост микроорганизмов регулируют химические факторы среды, такое непрерывное культивирование называют хемостатным. Этот метод в биотехнологии используется при наращивании биомассы.

Хемостатный метод культивирования был изобретен и его теория обоснована в 1950 г. одновременно и независимо Моно во Франции и Новиком и Сцилардом в Америке.

В соответствии с этой теорией рост культуры характеризуется хемостатной кривой, отражающей зависимость плотности популяции микроорганизмов в состоянии равновесия $[\bar{x}]$ от концентрации поступающего в аппарат субстрата $[S_0]$ и скорости разбавления D .

Рассмотрим баланс биомассы при хемостатном культивировании (рис. 3.9).

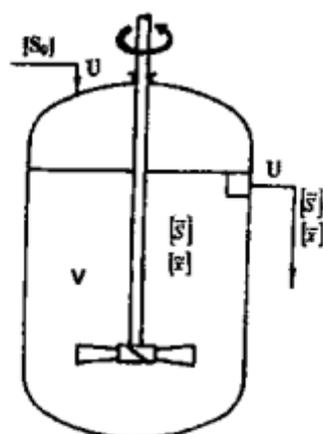


Рис. 3.9. Схема работы хемостата

Увеличение концентрации микроорганизмов (прирост биомассы) за единицу времени в единице рабочего объема аппарата (хемостата)

$$\left(\frac{d[x]}{dt} \right)_{\text{прирост}} = \mu[x].$$

Убыль биомассы за это же время

$$\left(\frac{d[x]}{dt}\right)_{\text{убыва}} = D[x].$$

Изменение концентрации биомассы за единицу времени

$$\frac{d[x]}{dt} = \mu[x] - D[x] = [x] \cdot (\mu - D).$$

В состоянии установившегося равновесия $d[x]/dt = 0$, $\mu = D$.

Величина μ зависит от концентрации субстрата (уравнение Моно). В состоянии равновесия

$$D = \mu_{\max} \frac{[\tilde{S}]}{K_s + [\tilde{S}]},$$

где $[\tilde{S}]$ (S с тильдой) – равновесная концентрация субстрата. Из этого уравнения она равна

$$[\tilde{S}] = \frac{DK_s}{\mu_{\max} - D}.$$

Равновесная концентрация биомассы

$$[\tilde{x}] = Y_{x/s} \left([S_0] - [\tilde{S}] \right),$$

где $Y_{x/s}$ – экономический коэффициент, равный количеству биомассы x , получающейся из единицы массы субстрата S .

Подставляя в это уравнение полученное выше равновесное значение концентрации $[\tilde{S}]$, получим уравнение хемостатной кривой

$$[\tilde{x}] = Y_{x/s} \left([S_0] - \frac{DK_s}{\mu_{\max} - D} \right),$$

связывающее между собой значения $[\tilde{x}]$, $[S_0]$ и D . Два последних параметра оператор может изменять, влияя тем самым на $[\tilde{x}]$.

Графическим отражением уравнения хемостатной кривой является сама хемостатная кривая (рис. 3.10).

На этих графиках критическое значение $D_{кр}$ соответствует значению скорости разбавления, при которой происходит вымывание культуры из ферментатора.

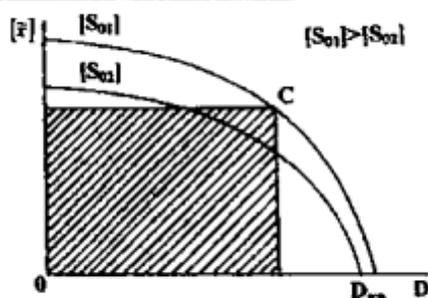


Рис. 3.10. Хемостатные кривые

Удельная производительность ферментатора по биомассе в расчете на единицу рабочего объема в единицу времени

$$R_{y_d} = D[\bar{x}].$$

На хемостатной кривой для конкретного режима культивирования (т. С на рис. 3.8) значению R_{y_d} соответствует площадь заштрихованного прямоугольника. Легко показать, что зависимость R_{y_d} от D отражается кривой с максимумом (рис. 3.11).

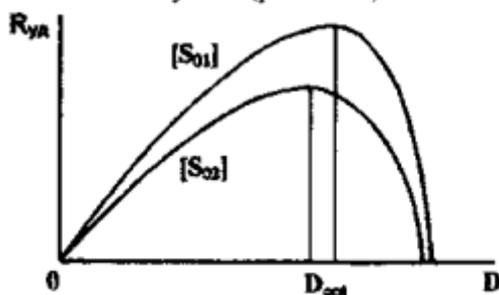


Рис. 3.11. Влияние скорости разбавления на удельную производительность хемостата

Чтобы найти значение D_{opt} , при котором R_{y_d} принимает максимальное значение, необходимо пойти производную dR_{y_d} / dD и приравнять ее к нулю, откуда

$$D_{opt} = \mu_{max} \left(1 - \sqrt{\frac{K_s}{[S_0] + K_s}} \right).$$

Подставив значение D_{opt} в уравнение для R_{y_d} , получим значение $R_{y_d,max}$

$$R_{y_d,max} = D_{opt}[\bar{x}].$$

Этому оптимальному режиму культивирования соответствует степень превращения субстрата

$$x_s = \frac{[S_0] - [\tilde{S}_{opt}]}{[S_0]},$$

которая показывает, какая доля субстрата, поступающего в хемостат, превращается в продукт (биомассу) при $[\tilde{S}_{opt}]$ (когда $D = D_{opt}$).

3.6. Области применения промышленной микробиологии

Промышленная микробиология решает чрезвычайно широкий круг проблем, которые, в зависимости от целевого продукта, обычно подразделяют на следующие типы:

1. Целевым продуктом является микробная масса в целом (дрожжи, микроводоросли и др.).
2. Целевым продуктом являются биохимические продукты сложного строения, выделяемые микроорганизмами в процессе культивирования в среду или получаемые из биомассы (антибиотики, витамины, органические кислоты, ферменты, спирты и др.).
3. Целью процесса является осуществление сложных химических превращений с использованием ферментативной активности микроорганизмов.
4. Целью процесса является очистка некоторой среды от нежелательных компонентов (очистка сточных вод, депарафинизация нефти и др.).
5. Целью процесса является получение ценных металлов (микробиологическое выщелачивание металлов из руд).

До середины XX века в промышленной микробиологии преобладали производства, в основе которых лежали процессы брожения, использующие сырье преимущественно углеводной природы. Из производств, использующих аэробные процессы, следует назвать получение антибиотиков, органических кислот и биомассы, получаемой опять же из углеводного сырья.

3.6.1. Традиционные микробиологические производства

В качестве сырья использовали углеводы растительного происхождения. Для питания микроорганизмов требуются моно- и дисахариды. В этом отношении пригодно после несложных процедур подготовки сырье, содержащее сахар: сахарный тростник, сахарная свекла,

меласса (сироп, получающийся после извлечения кристаллического сахара из концентрированного сока сахарного тростника или свеклы), фруктовые соки.

Второй тип углеводного сырья – крахмал, содержащийся в семенах хлебных злаков (кукурузы, ячменя, овса, ржи, пшеницы, сорго и др.), солоде, картофеле, батате, земляной груше, маниоке и т.д. Перед использованием для культивирования микроорганизмов сырье подвергается осахариванию, в результате чего получают сбраживаемые сахара. Осахаривание осуществляется путем кислотного или ферментативного гидролиза. В качестве ферментативных препаратов применяют солод, получаемый из семян хлебных злаков, или ферменты плесневых грибов и бактерий. Солод – продукт, получаемый при проращивании семян злаков. Амилазы синтезируются в алейроновом слое зерновки и гидролизуют крахмал эндосперма. Такое осахаривание – инженерно-энзиматический процесс.

Третий тип углеводного сырья – древесные (обрезки, щепки, стружки, опилки) и сельскохозяйственные (кукурузные початки, стебли сахарного тростника после извлечения сахара, льняная костра, шелуха хлопковых семян, овсяная мякина) отходы. Их осахаривают путем сернокислотного гидролиза, после чего раствор нейтрализуют щелочью. Получают сульфитные щелока. Осахаренное (технологическое) сырье становится пригодным для непосредственного использования в микробиологическом производстве. Ниже коллективно будут приведены примеры традиционных микробиологических производств.

Получение этанола. Получают путем спиртового брожения с участием дрожжей углеводного сырья. В последнее время интенсивно изучается проблема получения этанола с помощью бактериальных культур *Zyotomonas mobilis*, которые имеют в несколько раз большую скорость потребления углеводов и образования спирта, а также высокий выход его (до 95% от теоретического).

Использование спирта общеизвестно: горючее (в чистом виде или в смеси с бензином) для двигателей внутреннего сгорания; в медицине и быту; сырье для химических производств; растворитель; для получения пищевого и кормового белка; в качестве спиртового напитка и др.

Пивоварение. Это производство напитков из солода путем сбраживания дрожжами экстрактов из проросших (осоложенных) семян хлебных злаков. Продукт – пиво, а также квас, получаемый пу-

тем сочетания спиртового и молочнокислого брожения. Сырье – злаки.

Виноделие. Продукт виноделия – вино – получают путем нормального спиртового брожения сока из зрелого и неиспорченного винограда и выдерживания в подвале. Крепость – 8-9%.

Спиртовые напитки. К ним относятся: ром (получают из сахарного тростника); виски и водка (из зерен хлебных злаков); брэнди (из сброженного фруктового сусла или затора), сюда относят коньяк (коньячный брэнди из винограда); джин (дистилляция в присутствии можжевельных ягод); настойки и ликеры (получают путем настаивания очищенного спирта, брэнди на плодах, цветах или целых растениях, а также смешиванием спирта с отжатым из них соком). Все это крепкие алкогольные напитки.

Дрожжи и дрожжевые продукты. Получают пекарские, пивные, пищевые и кормовые дрожжи. Пищевые дрожжи богаты белками и витаминами группы В. Кормовые дрожжи – ценный продукт для кормления крупного рогатого скота (КРС), свиней и других сельскохозяйственных животных. В качестве сырья используют мелассу, сульфитный шелок, кукурузу, молочную сыворотку, гидролизованную барду (отход спиртового производства), отходы после сбраживания древесного сахара.

Продукт данного производства – биомасса, микробиологический процесс – аэробный.

Глицериновое брожение. Получают глицерин путем сбраживания при участии дрожжей мелассы, гидролизатов муки из пшеницы и других злаков.

Ацетобутиловое брожение. Продуктами брожения являются ацетон и бутанол. Сырье – гидролизаты крахмала, дисахариды, меласса, гидролизаты отходов растениеводства.

Ацетоэтиловое брожение. Продукты – ацетон и этиловый спирт. Сырье – кукуруза, картофель, меласса, гидролизаты отходов растениеводства.

Бутилоизопропиловое брожение. Продукты – бутиловый и изопропиловый спирты. Сырье – гидролизаты древесины.

Уксус. Получают в результате спиртового (анаэробного) и следующего за ним уксуснокислого (аэробного) брожения субстратов, содержащих сахар и крахмал. Состав уксуса в известной степени зависит от характера сырья, способов приготовления, выдерживания и хранения. Кроме уксусной кислоты может содержать небольшие ко-

личества спирта, глицерина, эфиров и др. Сырье – вино, яблочный сок, мед.

Кисломолочные продукты. К ним относятся ацидофилин, кефир, кумыс, ягурт, пахтање и др. Получают путем молочнокислого брожения из молока сельскохозяйственных животных.

Получение сыра. Сыр – продукт, приготовленный из творога, который получится в результате свертывания казеина (белка) цельного или обезжиренного молока или молока после добавления к нему сливок. Свертывание молока происходит под воздействием сычужного или какого-либо другого аналогичного фермента, или же вследствие молочнокислого брожения, а иногда под совместным влиянием фермента и молочной кислоты. Важную роль в созревании сыра играют пропионовокислые бактерии, определяющие также его вкус, которые попадают в сыр с сычужным ферментом, представляющим собой водный экстракт из телячьих желудков. Сырье – молоко овечье, козье, коровье, кобылье.

Пропионовокислое брожение. Продукты брожения – пропионовая и уксусная кислоты. Сырье – углеводы (лактоза и др.).

Получение 2,3-бутиленгликоля. Получают путем брожения из гидролизатов древесины, пшеничной муки, кукурузного крахмала и др. Продукт является исходным сырьем для получения синтетического каучука, антифризом ("незамерзающей" жидкостью) и органическим растворителем.

Получение амилазы. Амилаза – экзофермент, образуемый бактериями. Сырье – крахмал, пшеничные отруби, барда.

Получение рибофлавина. Рибофлавин (витамин В₂) образуется бактериями. Сырье – ячмень, кукуруза, просо, овес, рожь, сорго и др.

Лимоннокислое брожение. Лимонная кислота образуется плесневыми грибами *Aspergillus niger* в аэробных условиях, используется при консервировании фруктов, приготовлении напитков, сырье – меласса.

Глюконовокислос брожение. Глюконовую кислоту образуют многие аспергиллы и пенициллы. Используется в медицине и ветеринарии в виде глюконата кальция. Получают путем сбраживания растворов глюкозы.

Фумаровокислос брожение. Продукт – фумаровая кислота, применяется при производстве пластмасс. Образуется плесневыми грибами, процесс аэробный. Сырье – углеводное (глюкоза, фруктоза, сахароза, крахмал и др.).

Галловая кислота. Галловая (триоксibenзойная) кислота образуется путем брожения с участием плесневых грибов. Применяется при лечении кожных болезней (как дубящее вещество), как краска, чернила. Сырьё – экстракты танина (фенольные соединения растений).

Итаконовая кислота. Образуется аспергиллами. Применяется при производстве пластмасс, поверхностно-активных веществ (ПАВ), синтетических препаратов. Сырьё – углеводное (глюкоза, кукурузный экстракт и др.).

Образование маннита. Многоатомный спирт маннит образуется плесневыми грибами путем сбраживания глюкозы и других гексоз. Используется для получения ПАВ, синтетических смол, олифы.

Образование жира. Жиры образуются плесневыми грибами, сырьё – техническая глюкоза (полученная при гидролизе древесины). Жиры – простые, состоят преимущественно из глицеридов стеариновой, пальмитиновой, олеиновой и линолевой кислот.

Антибиотики. Это вещества, образуемые живыми организмом и способные угнетать или убивать микроорганизмы. Большинство антибиотиков из числа изученных в настоящее время образуются грибами (пенициллами, актиномицетами, аспергиллами) и бактериями. Для получения антибиотиков используется разное сырьё, от чего в определенной степени зависит их стоимость. Так, для получения пенициллина требуется только углеводное сырьё (кукурузный экстракт, лактоза, глюкоза, мсласса), а для получения стрептомицина в дополнение к углеводному сырью нужен белковый компонент – пептон, мясной экстракт.

Приведенный неполный перечень традиционных микробиологических производств свидетельствует о многообразии получаемых продуктов и широком диапазоне областей их применения. Большинство продуктов этих производств относится к продуктам вторичного метаболизма.

Во второй половине XX века появились новые микробиологические производства, часто связанные с использованием нетрадиционного сырья. К таким новым направлениям, в частности, относится производство белка.

3.6.2. Получение белка из неуглеводного сырья

Белки являются важнейшим компонентом продуктов питания человека и кормов сельскохозяйственных животных. Однако соя и

другие растения с высоким содержанием белка плохо поддаются культивированию на многих территориях нашей страны. Одним из нетрадиционных источников получения кормового белка стало использование парафинов нефти. Из них в производственных установках на целом ряде биотехнологических производств получали белково-витаминные концентраты (БВК) с участием дрожжей рода кандида. По ряду причин от производства БВК из парафинов нефти пришлось отказаться и флагман этой технологии – Киришский комбинат (Ленинградская область) в настоящее время перепрофилирован на производство спирта из пшеницы.

Биомасса из метана. В качестве сырья для культивирования микроорганизмов и получения биомассы может быть использован метан – основная составляющая часть природного газа, которым богата наша страна. Процесс биосинтеза на природном газе связан с определенными трудностями: низкой растворимостью газа в питательной среде, медленным ростом метаноокисляющих микроорганизмов (представителей более 20 родов) и сложностями аппаратурного оснащения процесса. Эти микроорганизмы обладают повышенной потребностью в кислороде, азоте, фосфоре и микроэлементах; в процессе окисления метана выделяется больше тепла и углекислоты, чем при окислении углеводов. При оптимальных для биосинтеза соотношениях метана и воздуха (находящихся для лучшего растворения газов под давлением) образуется взрывоопасная смесь, что приобретает особое значение в случае организации крупнотоннажного производства. Разработкой этой технологии занимаются.

Биомассы из окисленных производных углеводов. Перспективным сырьем для производства белка помимо метана являются окисленные производные углеводов – спирты и органические кислоты. Эти соединения хорошо растворимы в воде и не взрывоопасны.

Метанол. Бактерии на метаноле образуют биомассу с концентрацией 78,3 г/л и продуктивностью 11 г/л·час, дрожжи – соответственно 140 г/л и 15 г/л·час, однако у бактерий содержание белка в биомассе 70-80%, а у дрожжей лишь 45-60%. Используется непрерывный процесс культивирования биомассы микроорганизмов для использования в качестве добавки к кормам сельскохозяйственных животных.

Этанол. В отличие от метанола нетоксичен. Выход белка 0,7-0,8 г на 1 г этанола. Некоторые зарубежные фирмы США, Японии,

Германии, Испании и других стран разработали способы получения пищевого белка на этаноле, пригодные для промышленного производства с целью введения получаемого продукта в хлебопекарные и мясные изделия.

Установлено, что этанол применим в качестве сырья и для микробного биосинтеза незаменимых аминокислот, в частности лизина.

Уксусная кислота. Применение в качестве сырья для получения биомассы в промышленных масштабах в настоящее время нерентабельно.

3.6.3. Получение белка с помощью водородных бактерий

Особенностью водородных бактерий является то, что они развиваются за счет окисления водорода кислородом воздуха, освобождая при этом большое количество энергии, которая используется для поглощения углерода из углекислоты воздуха. Обмен веществ у водородных бактерий очень лабилен. Они могут окислять и органические вещества, усваивать азот в форме солей, а также фиксировать атмосферный азот. Внимание к водородным бактериям вызвано рядом причин. Во-первых, их способность к автотрофному росту обеспечивает независимость производства биомассы от источников органического сырья. Они растут за счет энергии окисления водорода, ассимилируя неорганические компоненты (углекислоту и минеральные соли). Во-вторых, применение водородных бактерий позволяет осуществлять эффективное использование электроэнергии путем электролиза воды с целью получения водорода, а из него – биомассы. На 1 кг биомассы расходуется 40-45 киловаттчасов энергии. Сложность технологии культивирования водородных бактерий связана с плохой растворимостью водорода в воде и взрывоопасностью газовой смеси (70-80% H_2 , 20-30% O_2 и 3-5% CO_2), находящейся под давлением. Возможность использования биомассы водородных бактерий в качестве добавки к кормам сельскохозяйственных животных связана со специальной предварительной обработкой ее. Работы в этом направлении ведутся.

3.6.4. Другие экспериментальные методы получения белка

Выращивание хлореллы. Микроводоросли – один из важных объектов современной биотехнологии. Интенсивное их культивирование в промышленных биоустановках позволяет получать биомассу с высоким содержанием полноценных белков и ряда витаминов; при

соответствующем подборе состава питательных сред микроводоросли можно использовать в качестве продуцентов незаменимых аминокислот. Определенный интерес представляет использование микроводорослей, в том числе хлореллы, в автотрофном звене замкнутых биотехнических систем жизнеобеспечения человека. Микроводоросли обладают высокой устойчивостью (в частности, к действию радиации), широкими адаптационными возможностями и технологичностью при их использовании.

Для культивирования хлореллы используются установки четырех типов:

1. Закрытая циркулирующая система. Культиватор одной из конструкций состоит из стеклянных труб диаметром 40 мм, между которыми находятся газоразрядные лампы. Циркуляцию клеточной суспензии осуществляют центробежные насосы.

2. Закрытая глубинная система. Культиватор представляет собой относительно глубокую емкость, в которой культура освещается снаружи или лампами, погруженными в суспензию. Перемешивание осуществляют с помощью мешалок или барботажа.

3. Установка открытой глубинной системы. Представляет собой аквариум с глубиной слоя суспензии 25-50 см, который освещается сверху.

4. Установка открытой неглубинной системы. Глубина суспензии в ней 5-25 см.

Культивирование микроводорослей можно организовать в любой климатической зоне, но наиболее подходящими при открытом способе выращивания являются субтропические, пустынные и полупустынные районы нашей страны, где максимальные урожаи хлореллы достигают 35-50 г/м² и более сухого вещества в сутки.

Получение биомассы из сока растений. В качестве источника углерода в производстве микробного белка применяются безбелковая фракция сока зеленых растений, так называемый коричневый сок, получаемый после отделения растительного белка от зеленого сока. Коричневый сок в зависимости от вида зеленых растений содержит от 0,8 до 5,5% органических кислот, ряда источников органического азота, витаминов и других соединений. Он является хорошим сырьем для получения микробных биомасс (дрожжевой, бактериальной). Выход биомассы в термически обработанном соке составляет 8-25 г/л, а содержание протеина в сухом остатке биомассы в пределах 45-59%.

Получение аминокислот. Свободные аминокислоты находят широкое применение в качестве кормовых и пищевых добавок, сырья для фармацевтической и парфюмерной промышленности, улучшения вкусовых качеств продуктов питания. Аргинин в сочетании с аспаратом и глутаматом помогает при заболеваниях печени, цистеин защищает SH-ферменты в печени (и других тканях) от окисления и оказывает детоксицирующее действие, триптофан является антидепрессантом, его используют при лечении алкоголизма и бессоницы и т.д. Ежегодно в мире производится около 800 тысяч тонн аминокислот различными способами, включая химический синтез (с последующим разделением рацемата – см. гл. 1), энзиматический синтез, гидролиз природных материалов. Наряду с ними используется и микробиологический синтез с участием микроорганизмов, которые подразделяют на 4 класса: дикие штаммы, ауксотрофные мутанты, регуляторные мутанты и ауксотрофные регуляторные мутанты. При работе с дикими (природными) штаммами для получения сверхсинтеза нужной аминокислоты ищут пути, позволяющие обойти генетический контроль клетки (например, за счет изменения некоторых факторов среды), в норме обеспечивающий сбалансированное содержание всех аминокислот. При использовании мутантов получают штаммы с искусственно измененным механизмом, осуществляющим генетический контроль. Из методов генетической инженерии для получения аминокислот наиболее употребительна амплификация генов, регулирующих их синтез.

В промышленности для получения аминокислот чаще всего используют штаммы коринебактерий, брeвибактерий, а в последнее время сконструированные генно-инженерным путем штаммы *E. coli*. После завершения ферментации культуральную жидкость высушивают. Если необходима высокоочищенная аминокислота, то ее экстрагируют из культуральной жидкости с помощью ионообменных смол с последующей кристаллизацией.

Практически наиболее важным является получение незаменимых аминокислот. Для человека их 8 (валин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, треонин, триптофан, фенилаланин), для сельскохозяйственных животных к ним добавляются гистидин и аргинин, а для молодняка птицы – еще пролин. Значимость этих аминокислот состоит в том, что недостаток всего одной из них вызывает несбалансированность корма и часть остальных аминокислот не сможет принять участие в биосинтезе белка, который является важнейшим компонен-

том продукции животноводства. Поэтому в объеме производимых аминокислот важнейшее место занимают незаменимые аминокислоты (метионин, лизин, треонин). Наибольшая доля приходится на глутаминовую кислоту, которая используется в качестве приправы. Она способствует усилению вкуса и консервированию пищи.

3.6.5. Получение вакцин

Вакцинация при ряде инфекционных заболеваний является одним из наиболее эффективных профилактических мероприятий. Проблема имеет немаловажное значение, так как инфекционные болезни занимают существенную долю среди других видов болезней. Ситуация усугубляется возрастающей урбанизацией и развитием транспортных коммуникаций. Среди возбудителей инфекционных заболеваний человека особенно многочисленную группу составляют бактерии. Известно более 1000 инфекционных заболеваний, вызываемых бактериями и риккетсиями. Во многих странах до сих пор широко распространены такие заболевания, как туберкулез, коклюш, дизентерия, столбняк. Постоянную угрозу для жителей планеты представляет холера. Некоторые заболевания (сыпной тиф, анаэробная раневая инфекция и др.) принимают массовый характер во время народных бедствий.

Второе место по количеству возбудителей инфекционных заболеваний занимают вирусы. В настоящее время насчитывается более 500 видов вирусов, размножающихся в организме человека.

Меры борьбы с инфекционными заболеваниями очень разнообразны, однако ведущее положение занимают профилактические мероприятия. Кроме неспецифических общесанитарных мероприятий широко применяется специфическая иммунизация, создающая в организме активный иммунитет (вакцинопрофилактика) или помогающая противостоять заболеванию пассивным путем (введение сывороток и гамма-глобулинов).

Вопросы иммунизации важны также и для ветеринарии. В условиях растущей интенсификации животноводства, перевода его на промышленную основу, повысились риски возникновения инфекционных заболеваний, носящих массовый характер. В этих условиях резко возрастает роль плановой специфической иммунопрофилактики.

Кроме того, с повестки дня полностью не снят вопрос об абсолютной неприменимости бактериологического оружия, а также о биотерроризме в отношении сельскохозяйственных животных.

В связи с этим возникает потребность в достаточном количестве необходимых вакцин, которые условно подразделяют на четыре группы:

1. Вакцины из живых ослабленных, апатогенных вариантов возбудителей инфекций, кратко называемых "живыми вакцинами".

2. Вакцины, представляющие собой взвеси убитых патогенных бактерий, риккетсий, вирусов, называемые "убитыми корпускулярными вакцинами".

3. Вакцины, состоящие из растворимых, извлеченных из бактерий антигенов, называемые "химическими вакцинами".

4. Анатоксины – обезвреженные токсины бактерий, сохранившие антигенные свойства.

Получение всех этих вакцин связано с культивированием соответствующих болезнетворных микроорганизмов. Принципиальной особенностью получения вакцин против вирусных болезней является необходимость культивировать вирусы в клетках живого организма или в тканевых культурах.

3.6.6. Получение бактериальных удобрений и средств защиты растений

В растениеводстве необходимость в культивировании микроорганизмов связана с использованием в сельском хозяйстве бактериальных удобрений и средств защиты растений.

Азотфиксация. Использовать азот, содержащийся в атмосфере (N_2), могут только прокариоты, частью самостоятельно, частью в симбиозе с высшими растениями. Процесс восстановления молекулярного азота до аммиака происходит с участием нитрогеназного ферментативного комплекса бактерий. В конце XIX века было установлена связь между фиксацией азота и клубеньками бобовых растений. Клубеньковые бактерии относятся к роду *Rhizobium*. Заражение растения этими свободноживущими палочковидными бактериями происходит через молодые корневые волоски. Бактерии стимулируют разрастание тканей растения с образованием клубеньков, содержащих крупные бактериальные клетки – бактероиды, которые и осуществляют фиксацию азота. При симбиозе растение обеспечивает бактерий питательными веществами (главным образом сахарами), а око-

ло 95% фиксированного азота переходит в виде ионов аммония в цитоплазму растения-хозяина. Помимо корневых клубеньков встречаются клубеньки и на стеблях. Благодаря симбиозу клубеньковых бактерий с растениями семейства бобовых почва получает 100-300 кг азота на 1 га в год. Корневые клубеньки бывают и у небобовых растений. Эндосимбионтами в этом случае, как правило, бывают актиномицеты, принадлежащие к роду *Frankia*. Наиболее эффективно связывание азота этими бактериями происходит при симбиозе с ольхой, облепихой, хотя хозяевами симбионтов могут быть и травянистые растения (куропаточья трава). Корневые клубеньки древесных растений могут достигать размера теннисного мяча. Накопление азота до 150-300 кг на 1 га в год.

Встречаются симбиозы растений и с азотфиксирующими цианобактериями. В частности, водный папоротник *Azolla*, растущий на поверхности затопленных рисовых полей, в симбиозе с цианобактерией рода *Anabaena* в состоянии полностью удовлетворить потребности риса в азоте.

Фиксацию атмосферного азота могут осуществлять и свободноживущие бактерии, относящиеся в основном к родам *Clostridium* и *Azotobacter*. Живут они преимущественно на поверхности корней. На рисовых полях они связывают 30-50 кг азота на 1 га в год. Бактерии рода *Azotobacter* входят в состав бактериального удобрения – азотобактерина, которое получают путем культивирования микроорганизмов в ферментаторах. После завершения ферментации биомассу отделяют центрифугированием и высушивают. Вносят азотобактерин в почву с семенами или обрабатывают им клубни и корни рассады сельскохозяйственных культур, не относящихся к семейству бобовых.

Для бобовых растений используют бактериальное удобрение – нитрагин. Готовят его из активной, специфической для каждого вида растений этого семейства, расы клубеньковых бактерий, размножаемых на стерилизованном и богатом органическим веществом субстрате. Для лучшего образования клубеньков семена культурных бобовых растений заражают клубеньковыми бактериями.

К бактериальным удобрениям также относится фосфобактерии – порошок, содержащий в большом количестве споры микроорганизмов, которые обладают повышенной способностью переводить фосфорорганические соединения в удобоусвояемую для растений форму. Вносят в почву вместе с семенами или посадочным материалом.

Защита растений. Изменение стратегии защиты растений в сторону ограниченного применения химических средств защиты вызвано необходимостью охраны окружающей среды. Микробиологические препараты, в том числе вирусные, можно рассматривать как надежные средства для построения интегрированных систем защиты растений. Их можно использовать в сочетании со многими другими препаратами, в том числе с бактериальными удобрениями и препаратами эпифитных бактерий – стимуляторов роста растений.

Микроорганизмы, вызывающие губительные заболевания вредных насекомых и грызунов, выделены из крови или различных органов больных или погибших особей этих видов.

В качестве средств борьбы с вредителями используют препараты бактерий, микроскопических грибов и вирусов, способных возбуждать массовые заболевания и даже эпизоотии в популяциях вредителей.

В нашей стране было создано крупнотоннажное производство энтомопатогенных бактериальных препаратов (бактериальных инсектицидов).

При производстве бактериальных средств защиты растений применяется поверхностное и глубинное культивирование. Используют непрерывно-циклическое (первая стадия – наращивание биомассы, вторая – формирование спор, с применением батареи ферментаторов по стадиям) и непрерывно-периодическое (посевным материалом для следующей ферментации служат споры, оставшиеся после сливания культуральной жидкости от предыдущей ферментации) культивирование.

Для получения вирусных препаратов энтомопатогенные вирусы размножают в массе живых насекомых. Достигнуты определенные успехи при культивировании вирусов насекомых в клеточных культурах.

Кроме того, для защиты растений используют антибиотики в борьбе с фитопатогенными организмами (вирусами, бактериями, грибами, простейшими) и с насекомыми-вредителями. В то же время некоторые антибиотики оказывают стимулирующее влияние на рост растений. Большой практический интерес представляет использование антибиотиков при выращивании растений в закрытом грунте. В растениеводстве в качестве средств борьбы применяют как медицинские антибиотики (стрептомицин, тетрациклин, хлорамфеникол и др.), так и антибиотики немедицинского назначения (бластицидин, касугамицин, циклогексимид и др.).

3.6.7. Получение биохимических реактивов, медикаментов и витаминов

Управление микробным синтезом чаще всего осуществляется по принципу максимальной конверсии сырья в целевой продукт при возможно высоких нагрузках ферментационного оборудования. Однако специфика производства биохимических реактивов заключается в том, что целевой продукт нередко производится в небольших количествах и имеет высокую стоимость. При использовании высокопродуктивных микроорганизмов (в том числе рекомбинантных продуцентов и так называемых «суперпродуцентов») необходимо провести лишь несколько ферментаций в год для обеспечения потребности в целевом продукте.

Для получения биохимических реактивов используются практически все группы микроорганизмов. Биохимические реактивы, получаемые путем микробного синтеза, представляют собой все основные группы биологически активных веществ: нуклеиновые кислоты и их компоненты, полисомы, рибосомы, факторы белоксинтезирующей системы, ферменты, аминокислоты, полисахариды и др.

Препараты биологически активных веществ в зависимости от области их применения по своему качеству должны в какой-то мере приближаться к состоянию чистого вещества, то есть должны быть получены, например, в кристаллическом виде, электрофоретически гомогенными. Все сказанное о биохимических реактивах в общих чертах имеет место при получении медикаментов, кроме основных антибиотиков и некоторых других препаратов сравнительно крупномасштабного производства.

С помощью микробиологических процессов получают некоторые витамины (B_{12} , B_2 , эргостерин, из которого получают витамин D_2).

Производство антибиотиков до недавнего времени являлось очень масштабным микробиологическим процессом. Если в 1945 г. в мире было получено всего 500 кг пенициллина, то в настоящее время всевозможных антибиотиков производится на миллиард долларов. Помимо антибиотиков медицинского назначения получают кормовые антибиотики (кормогризин, биовит и др.).

Учитывая сравнительно небольшие ферментационные объемы, для получения биохимических реактивов в большинстве случаев применяют наиболее универсальные ферментаторы периодического действия с мешалкой.

3.6.8. Трансформация органических соединений

Данная область представляет собой комплексную дисциплину, лежащую на стыке микробиологии, энзимологии и органической химии. Основными методическими подходами к трансформации органических соединений являются:

1. Микробиологическая трансформация, то есть использование ферментативной активности жизнеспособных клеток микроорганизмов;
2. Использование ферментных препаратов и очищенных ферментов.

Микробиологическая трансформация может осуществляться и весьма крупными фрагментами метаболической системы клетки, но во всех случаях ее результатом является некоторое изменение молекулярной структуры трансформируемого субстрата, а не синтез молекулы *de novo*.

Методы микробиологической трансформации позволяют осуществлять синтез метаболитов в течение одной технологической стадии превращения, а для проведения синтеза химическим путем требуется несколько стадий. Для микробиологических реакций не нужна дорогостоящая аппаратура, так как микроорганизмы и их ферменты функционируют в малоагрессивных средах, при обычных температурах и давлениях. Недостатком этих методов является относительно низкая производительность по сравнению с химическими реакциями, но это можно устранить путем использования современных успехов ферментативной химии (иммобилизация клеток и ферментов, непрерывное культивирование и др.).

В настоящее время известны ферментативные реакции превращения практически всех основных классов органических соединений. Для осуществления этих химических превращений используются микроорганизмы всех систематических групп: грибы, актиномицеты, многие семейства бактерий и микроводорослей. В практике методы микробиологической трансформации преимущественно используются для превращения следующих групп органических соединений: стероидов, углеводов, антибиотических веществ, углеводородов, органических кислот, гетероциклических соединений и нуклеотидов.

В качестве примера приведем:

1. Получение аспарагиновой кислоты путем аминирования (присоединения аминогруппы) fumarата с участием свободных, иммобилизованных, а также разрушенных клеток *E.coli*.

2. Получение АТФ путем фосфорилирования (присоединения остатка фосфорной кислоты) аденозина с использованием в качестве биокатализатора нативных или обработанных толуолом пивных и хлебопекарных дрожжей, экстрактов микроводорослей или смеси дрожжей и микроводорослей. Побочными продуктами фосфорилирования являются молекулы АДФ и АТФ. Процесс используется в промышленных условиях.

3.6.9. Микробное выщелачивание руд (биогеометаллургия)

Выщелачивание, или растворение сульфидных минералов под действием автотрофных бактерий на протяжении многих лет наблюдалось в связи с работами в горнодобывающей промышленности. Бактерии, обнаруженные в характерных горных породах, легко росли, используя процесс окисления сульфидных минералов для выработки энергии и атмосферную двуокись углерода как источник структурного углерода (хемолитотрофные микроорганизмы). Связанные с такими процессами микроорганизмы относятся к факультативным, но наличие в среде обитания атмосферного кислорода ведет к более высоким скоростям роста и выщелачивания.

К выщелачиванию с помощью микроорганизмов способны следующие минералы: арсенопирит (FeAsS), халкоцит (Cu_2S), халкопирит (CuFeS_2), совелит (CuS), галенит (PbS), меллирит (NiS), молибденит (MoS_2), шпалерит (ZnS), тетрагидрит ($\text{Cu}_2\text{Sb}_2\text{S}_7$).

До недавнего времени микробное выщелачивание применялось преимущественно для вторичного выделения минералов из низкоконцентрированных металлических руд, содержащихся в отвалах и отходах горнодобывающей промышленности. Однако в последние годы привлекла внимание возможность использования микробного выщелачивания в случае "богатых" руд как альтернатива широко применяемым процессам пирометаллургического извлечения металлов. Подготовительные операции в обоих указанных случаях примерно одинаковы, а сам процесс микробного выщелачивания может осуществляться при таком инженерном оформлении, какое характерно для достаточно хорошо отработанных процессов обработки сточных вод, то есть в проточной системе, работающей без соблюдения асептических условий.

3.6.10. Биоэнергетика

Технологическая биоэнергетика – одно из направлений биотехнологии, связанное с эффективным использованием энергии, запасаемой при фотосинтезе.

Растительные ресурсы в мире огромны, их биомасса оценивается в 100 миллиардов тонн по сухому веществу в год. Лишь незначительная часть их расходуется человечеством, но эта часть дает более 10% потребляемой в мире энергии. Биомасса – не только возобновляемый и почти даровой источник энергии, но и альтернатива тающим запасам полезных ископаемых.

Этанол – экологически чистое топливо, дающее при сгорании углекислый газ и воду. Он используется в двигателях внутреннего сгорания в чистом виде или как 10-20%-ная надбавка к бензину (газохол). На значительных посевных площадях начали выращивать растения, предназначенные для микробиологической переработки на спирт (биоэтанол). Кроме зерновых культур перспективным растением для получения биотоплива является рапс. В условиях дефицита посевных площадей возникает дилемма: продовольствие или энергия.

Метан и другие углеводороды. Получение метана – важный путь утилизации сельскохозяйственных отходов. В СССР за один год образовывалось около 1 миллиарда тонн отходов животноводства (навоза), что соответствует геологическим масштабам и превышает добычу известных энергоносителей. Его утилизация в биореакторе с участием метаногенной ассоциации бактерий позволяет получать биогаз – смесь приблизительно равных количеств метана и углекислого газа. В мире используется огромное количество малых установок вместимостью от 10-15 л (Китай, Индия и др.) до промышленных установок большой мощности. В результате этого процесса происходит обеззараживание отходов и получение ценного органического удобрения (компоста).

Кроме метаногенных анаэробов существует другая группа микроорганизмов – продуцентов углеводородов. Некоторые микроводоросли (например, *Botryococcus braunii*) способны накапливать до 75% к сухой массе углеводороды. В США действует ферма по выращиванию таких микроводорослей с площадью водоемов 52 000 га, дающая около 4800 м³ жидких углеводородов в сутки.

Водород. Получение водорода остается на уровне поисковых разработок. Это абсолютно чистое топливо, дающее при сгорании лишь воду. Используют иммобилизованные микроорганизмы, спо-

способные выделять водород, а также искусственные системы из хлоропластов и отдельных ферментов, способные при участии света генерировать водород или одновременно H_2 и O_2 (биофототоллиз воды). Одновременно работают над повышением эффективности фотосинтеза. Теоретически рассчитанная эффективность фотосинтеза близка к 15% (доля световой энергии, превращаемой в химическую энергию органических веществ). Фактически наиболее продуктивные растения запасают не более 1,5-2,0%. Радикальным способом решения этой проблемы было бы создание искусственных фотосистем.

В заключение главы следует назвать сложный микробиологический процесс – силосование кормов. Работа по силосованию производится в следующем порядке: скашивание растительной массы, ее измельчение, загрузка в силосные сооружения, уплотнение и укрытие. Изоляция силосной массы от доступа воздуха прекращает развитие в ней аэробных бактерий и плесневых грибов, а образовавшаяся в результате жизнедеятельности молочнокислых бактерий молочная кислота, подкисляя корм, подавляет анаэробные гнилостные, маслянокислые и др. процессы. Источником питания молочнокислых бактерий служит сахар, содержание которого в корме определяет силосуемость последнего. Легко силосуемыми растениями являются кукуруза, подсолнечник, однолетние и многолетние злаковые травы, их смеси с бобовыми травами, кормовая капуста, корнеплоды и их ботва, бахчевые и др. Силосуют зеленые растения в период, когда они содержат наибольшее количество питательных веществ и не загрубели. Закладку и хранение силоса осуществляют в силосных сооружениях, которые бывают в виде траншей, башен и ям. В Советском Союзе ежегодно заготавливали свыше 200 млн. тонн силоса.

Серьезной проблемой, связанной с жизнедеятельностью микроорганизмов, является защита материалов, в первую очередь синтетических, от биоповреждений.

Микроорганизмы будут необходимым звеном систем жизнеобеспечения космических кораблей при длительных пилотируемых полетах к другим планетам и обитаемым станциям на этих планетах.

В природе, не отягощенной бурной человеческой деятельностью, между основными звеньями биологического круговорота (продуценты, консументы, редуценты) складывается относительное равновесие, которое исключает резкое изменение условий существования организмов на нашей планете (кроме периодов глобальных катастроф). Прогрессивный рост численности населения и, главное, все возрастающая активность его, направленная на природную среду, негативным образом изменяют все три ее стихии: воду, воздух и сушу. Разумно-неразумная деятельность человека, замешанная на примитивном гедонизме, бездумном потреблении ведет биосферу к неминуемой гибели, что проявляется в череде природных катаклизмов – предвестников глобальной катастрофы. Чтобы гармонизировать взаимоотношения человека и окружающей среды, нужны усилия, соответствующие мероприятия, среди которых экологической биотехнологии (экобиотехнологии) отводится существенная роль. Важное место в природоохранительной деятельности занимает борьба с загрязнениями. Конечно, главное направление в защите окружающей среды от загрязнений – использование технологий, исключающих попадание их за пределы производства, однако реальная деятельность людей далека от идеальных схем и благих пожеланий людей. Непрерывно растет номенклатура и количество загрязняющих веществ, отравляющих окружающую среду. Поэтому естественно возникает вопрос об ее очистке от этих веществ, об их утилизации.

4.1. Загрязнение и очистка вод

Воды в природе много, она покрывает две третьих поверхности Земли. Общее количество природной воды на Земле составляет 1386 млн. км³, свыше 97,5% приходится на соленые воды. Однако пресной воды всего 35 млн. км³. Кроме того, подавляющая часть пресной воды является труднодоступной (в основном находится в полярных ледниках и водоносных слоях под землей). Годовой объем потребления пресной воды в мире достигает приблизительно 4 триллионов кубометров (4 тыс. км³).

Помимо человеческой деятельности существуют и другие, абиотические и биотические источники ее загрязнения. В частности, воду загрязняют многие обитающие в ней организмы. Однако, существуют мощные естественные системы очистки воды: путем фильтрации че-

рез грунты; испарения и последующей конденсации, опресняющих ее, и, конечно, биологическая очистка воды.

Однако не следует забывать, что человека интересует преимущественно пресная вода, которой на планете не так уж много. Кроме того, природные очистительные системы в полной мере не справляются с возросшими темпами загрязнения воды, и ее приходится перед использованием дополнительно доочищать и обеззараживать. В настоящее время значительная часть населения планеты испытывает недостаток в качественной питьевой воде. Резервные источники питьевой воды интенсивно тают и, в конечном счете, смешиваются с морской водой, а реки с вырубленными вокруг них лесами мелеют и загрязняются неочищенными стоками. В целом же человечество стоит перед угрозой водного голода, если не сумеет уберечь воду от загрязнения. Можно, конечно, удовлетворять потребность в питьевой воде за счет опреснения морской воды, но это дорого, даже при использовании современных энергосберегающих технологий, например, фильтрации через полупроницаемых мембраны.

При пользовании водой практически не происходит ее накопления где-то или исчезновения. В открытой системе потребляется чистая вода, а возвращается в окружающую среду в том же количестве, но загрязненная. Основная, реально выполняемая задача состоит в том, чтобы перед сбросом отработанной воды в естественный водоем очистить ее, освободить от загрязняющих примесей. Последние весьма разнообразны по составу, а объем воды, подлежащей очистке, колоссален. В среднем горожанин в год на свои бытовые нужды расходует и затем сбрасывает в канализацию ориентировочно 30-40 м³ чистой воды. Кроме того, большое количество ее поступает в канализационную систему с промышленных и сельскохозяйственных предприятий. Не следует забывать и ливневую канализацию. Особой формой загрязнения водоемов в последние десятилетия стали разливы нефти.

Каждый вид загрязнений имеет свои эффективные способы борьбы с ним. Так, сточные воды промышленных предприятий в каждом конкретном случае обычно имеют свой преобладающий состав химических веществ-загрязнителей. Поэтому для очистки таких вод рационально применить предварительную локальную очистку, после чего такую воду можно сбрасывать в водоем или объединять со стоками хозяйственно-бытовых вод. Наиболее желательно использовать

в технологических процессах очищенную воду повторно (замкнутая система водоснабжения).

Помимо биологической (биохимической) очистки сточных вод от загрязнений, прежде всего производственного происхождения, применяются и другие способы.

4.1.1. Механические и физико-химические методы очистки

Промышленные, бытовые и атмосферные (поступающие из ливневой канализации) стоки содержат взвешанные твердые и жидкие примеси, которые образуют с водой дисперсную систему. Для удаления взвешенных частиц из сточных вод используют гидромеханические процессы (периодические и непрерывные): процеживание, отстаивание (гравитационное и центробежное), фильтрование.

Для удаления из сточных вод тонкодисперсных взвешенных частиц (твердых и жидких), растворимых газов, минеральных и органических веществ применяют богатый набор физико-химических методов очистки: коагуляцию, флотацию, адсорбцию, ионный обмен, экстракцию, ректификацию, выпаривание, дистилляцию, обратный осмос и ультрафильтрацию, кристаллизацию, десорбцию и др.

Коагуляция – процесс укрупнения дисперсных частиц в результате их взаимодействия и объединения в агрегаты. Для ускорения коагуляции при очистке вод применяют добавки специальных веществ – коагулянтов (соли алюминия, железа или их смеси). В воде коагулянты образуют хлопья гидроксидов металлов, которые улавливают коллоидные и взвешенные частицы и вместе с ними оседают под действием силы тяжести.

Флокуляция – процесс агрегации взвешенных частиц при добавлении в сточную воду высокомолекулярных соединений (флокулянтов). Флокуляция ускоряет оседание частиц при коагуляции и снижает расход коагулянтов.

Флотацию применяют для удаления из сточных вод нерастворимых диспергированных примесей, который самопроизвольно плохо отстаиваются. Этот процесс широко применяется при очистке сточных вод нефтеперерабатывающих, целлюлозно-бумажных, пищевых и других производств, а также для выделения активного ила после биохимической очистки. Суть флотации состоит в том, что поднимающиеся со дна флотатора (аппаратора для флотации) пузырьки воздуха слипаются с частицами примеси и поднимают их (флотируют) на по-

верхность воды, с которой пена с частицами удаляется с помощью специальных скребков.

Адсорбция применяется для глубокой очистки сточных вод от растворенных органических веществ после биохимической очистки, а также в локальных установках.

Ионообменная очистка применяется для извлечения из сточных вод металлов (цинка, меди, хрома, никеля, свинца и др.).

Экстракция жидкостная применяется для очистки сточных вод, содержащих фенолы, масла, органические кислоты, ионы металлов и др. Химическая природа экстрагента зависит от экстрагируемого вещества.

Обратный осмос и ультрафильтрация – фильтрование растворов через полупроницаемые мембраны, широко используются при обессоливании воды на ТЭЦ и некоторых других производствах.

Из *электрохимических методов* применяют процессы анодного окисления и катодного восстановления, электрокоагуляцию, электрофлотацию и электродиализ. Анодно окисление и катодное окисление применяют для очистки сточных вод от растворенных примесей (цианидов, азокрасителей, аминов, спиртов и др.). Для электрокоагуляции положительным моментом является отсутствие потребности в реагентах. При электрофлотации происходит выделение пузырьков кислорода на аноде, а водорода – на катоде. Поднимаясь в сточной воде, эти пузырьки флотируют взвешенные частицы. Электродиализ основан на разделении ионизированных веществ под действием электродвижущей силы (ЭДС), создаваемой по обе стороны полупроницаемой мембраны.

4.1.2. Химические методы очистки

К химическим методам очистки сточных вод относят нейтрализацию, окисление и восстановление. Сточные воды, содержащие минеральные кислоты и щелочи, перед сбросом их в водоемы или перед использованием в технологических процессах, нейтрализуют. Для окисления при очистке сточных вод используют следующие окислители: хлор, диоксид хлора, хлорат кальция, перманганат калия, перекись водорода, кислород воздуха, озон и др. Очистка восстановлением широко используется для удаления из сточных вод соединений ртути, хрома, мышьяка. Для удаления ионов тяжелых металлов (ртути, хрома, мышьяка, кадмия, цинка, свинца, меди, никеля и др.) из сточных вод используют реагентные методы очистки, сущность ко-

торых заключается в переводе растворимых в воде веществ в нерастворимые при добавлении различных реагентов с последующим отделением их от воды в виде осадков.

4.1.3. Термические методы очистки

На химических предприятиях образуются сточные воды, содержащие различные минеральные соли и органические вещества. Такие воды могут быть обезврежены термическими методами. К ним относятся концентрирование сточных вод испарением и вымораживанием. В первом случае после выпаривания чистой воды остается в остатке концентрированный раствор солей или их сухой осадок. Во втором варианте чистая вода выделяется в виде кристаллов льда, а примеси остаются в рассоле. К термическим методам также относятся кристаллизация, сушка и термоокислительное обезвреживание примесей. В последнем случае все органические вещества, загрязняющие сточные воды, полностью окисляются кислородом воздуха при высоких температурах до нетоксичных соединений.

4.1.4. Биохимические методы очистки сточных вод

Очистка в природных условиях. Люди издавна знали способность почв утилизировать различные отходы биологического происхождения и использовали ее в своей повседневной жизни. Внося в почву навоз и жидкие отходы, они улучшали санитарно-гигиенические условия своей среды обитания и одновременно повышали плодородие почвы.

В период становления капитализма быстро возрастала численность городского населения, и поддержание санитарного состояния городов стало серьезной проблемой. Для ее решения за городом выделяли специально подготовленные участки земли, на которые выливали сточные воды. Их первоначально подвозили гужевым транспортом в бочках, а затем стали подавать по специальным водоводам.

Очистка сточных вод на таких участках земли, которые называются полями орошения, осуществляется под действием почвенной микрофлоры, солнца, воздуха и жизнедеятельности растений. В почвах полей орошения утилизация загрязнений, которые первоначально имели преимущественно биологическое происхождение, происходит с участием многочисленных бактерий, микроскопических грибов, водорослей, простейших и беспозвоночных животных обычно в аэробных условиях. В зависимости от химического состава преобладаю-

ших компонентов загрязняющих веществ в почве формируется определенное сообщество этих организмов, обеспечивающее наиболее эффективный процесс биодegradации отходов. Поскольку почва становится более плодородной, на ней выращивают сельскохозяйственные культуры.

Если на таких полях сельскохозяйственные культуры по той или иной причине не выращивают, их называют полями фильтрации.

Кроме того, для биологической очистки и доочистки сточных вод в комплексе с другими очистными сооружениями используют биологические пруды. Они представляют собой каскад из 3-5 слабопроточных прудов, через которые протекает осветленная или биологически очищенная сточная вода, прежде чем попасть в основной водоем. Систему слабопроточных прудов используют также как конечное звено перед сбросом в водоем сточных вод, загрязненных радионуклидами. Особенностью биологических прудов является наличие фототрофных организмов, прежде всего водорослей, которые потребляют углекислый газ, фосфаты и аммонийный азот, выделяемые при биохимическом разложении органических веществ, и снабжают бактерии кислородом. Пруды с естественной аэрацией имеют глубину 0,5-1,0 м, хорошо прогреваются солнечным светом. Используются также пруды с искусственной аэрацией, в которые принудительно подается воздух. В зимнее время пруды не работают.

Аэробные процессы очистки. Наиболее эффективными процессами биохимической очистки сточных вод являются те, которые протекают в специальных искусственных сооружениях — аэротенках и биофильтрах при хорошей аэрации. Очистка сточных вод осуществляется активным илом, находящимся во взвешенном состоянии (аэротенки) или микроорганизмами (биофильтры).

Аэротенки. Аэротенками называют железобетонные резервуары, в которых осуществляется непрерывная биохимическая очистка сточных вод, предварительно прошедших через решетки, сита (задерживают крупные загрязнения), песколовки и первичный отстойник для выделения мелких взвешенных частиц. В аэротенке сточная вода вместе с имеющимся в ней активным илом (флокулирующая смесь из агрегатов бактерий и простейших) интенсивно аэрируется воздухом, который подается под давлением от компрессоров. Биологическая очистка осуществляется в два этапа: на первом микроорганизмы активного ила адсорбируют загрязняющие вещества, на втором — окисляют их. Число микроорганизмов в 1 г активного ила дос-

тигаст многих миллиардов, среди них свыше половины составляют псевдомонады. Затем, в порядке убывания, идут представители родов *Bacillus*, *Enterobacterium* и *Sarcina*, сахаромицеты, некоторые нитчатые бактерии и др. Очищенная вода со взвесью флокул активного ила поступает во вторичный отстойник, где происходит осаждение активного ила. Отстоенная вода используется по назначению (или сбрасывается в реку), часть осевшего активного ила возвращается в аэротенк, другая часть – на утилизацию или складирование (рис. 4.1).

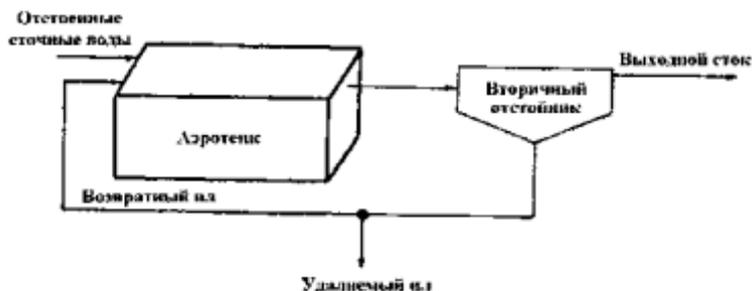


Рис. 4.1. Схема станции аэрации

Существует большое количество конструкций аэротенков и способов аэрации. В последнее время стали применять реакторы шахтного типа, которые занимают меньшие площади и используют для повышения скорости окислительных процессов технический кислород или обогащенный им воздух. Аппараты, использующие кислород, называют окситенками.

Биофильтры. Биофильтры представляют собой аппараты, заполненные кусковой насадкой (щебень, гравий, шлак, керамзит, керамические и пластмассовые тела различной конфигурации и т.д.), на поверхности которой в процессе эксплуатации образуется биопленка, выполняющая роль, аналогичную взвеси активного ила. В биофильтр по принципу противотока подаются сверху загрязненные стоки, а снизу – воздух. Микроорганизмы биопленки окисляют органические вещества сточной воды, используя их как источник питания и энергии, при этом толщина биопленки увеличивается. Отработанная (омертвевшая) биопленка смывается сточной водой и удаляется из биофильтра.

Такие биофильтры менее производительны, чем аэротенки, более чувствительны к содержанию частиц в воде, поступающей из

первичного отстойника (они забивают поры насадки биофильтра), но вместе с тем более дешвы и просты в эксплуатации.

Широко распространены биофильтры с вращающимися дисками. Они представляют собой резервуар, в котором имеется горизонтальный вал с насаженными на него пластмассовыми дисками диаметром до 3 м. Диски с растущей на них биопленкой погружены почти на половину диаметра в очищаемую воду и вращаются со скоростью 0,5-10 об./мин. Сточная вода аэрируется.

Степень очистки стоков в биофильтрах зависит от скорости прохождения их через аппарат. Биофильтры с капельной фильтрацией имеют низкую производительность, но обеспечивают полную очистку. Биопленка, образующаяся в капельных биофильтрах, устроена в экологическом отношении сложнее, чем активный ил. В ней формируется трофическая пирамида от бактерий, располагающихся на нижнем уровне, до личинок насекомых – на верхнем уровне.

Анаэробные процессы очистки. Аэробные процессы получили большее распространение в силу своей надежности, стабильности и хорошей изученности. Однако анаэробные процессы имеют ряд несомненных преимуществ. Прежде всего, они дают практически на порядок при равных условиях меньшее количество активного ила, дальнейшая переработка которого связана с существенными затратами. Кроме того, при анаэробной очистке образуется горючий газ – метан, а потребность энергии на перемешивание ниже, чем на аэрацию при аэробной очистке. Главный недостаток анаэробных систем – меньшая скорость реакции по сравнению с аэробными процессами.

Системы, использующие анаэробные процессы, были известны в Европе более 100 лет назад. Они используются для сбраживания осадков, образующихся при биохимической очистке производственных сточных вод, а также в качестве первой ступени очистки очень концентрированных промышленных сточных вод с биохимическим потреблением кислорода (БПК) приблизительно 4-5 г/л. Для очистки сточных вод используют метановое брожение. Процессы ферментации протекают при участии смешанной культуры, которая включает три группы бактерий: гидролитические (ацидогенные – обеспечивают гидролиз субстрата преимущественно до низкомолекулярных органических кислот), гетероацетогенные (продуцируют уксусную кислоту и водород) и метаногенные (продуцируют метан). Последняя группа может быть подразделена на потребителей водорода (литотрофы) и уксусной кислоты (ацетотрофы) (рис. 4.2).

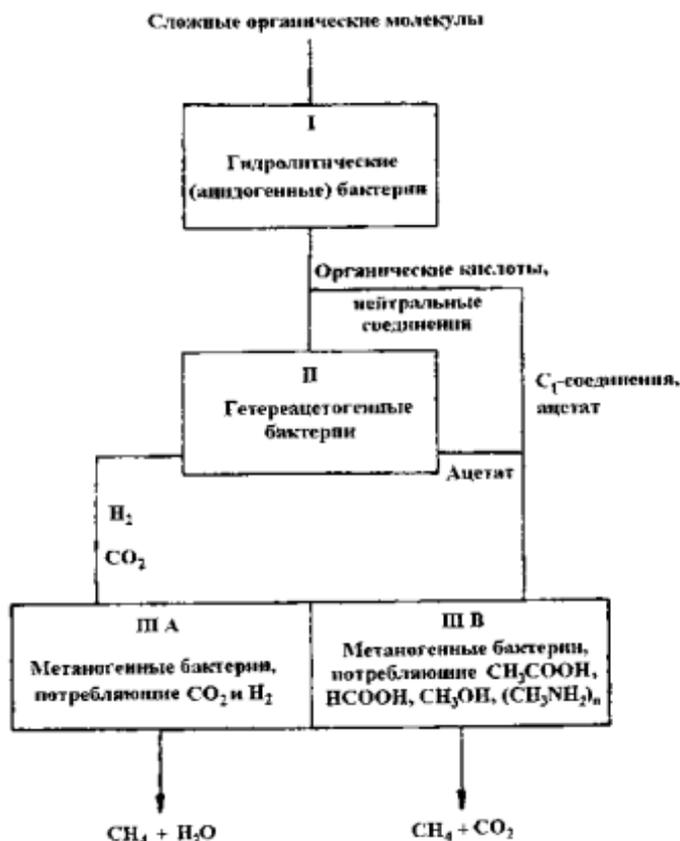


Рис. 4.2. Пути биodeградации субстрата при анаэробном сбраживании

Сбраживание ведут при мезофильных (30-35°) и термофильных (50-55°), а также криофильных (менее 20°) условиях. При криофильных условиях работают септиктенки, которые представляют собой реактор без мешалки и какого-либо перемешивания для повышения микробной активности. При мезофильных и термофильных условиях работают герметически закрытые резервуары с подогревом и перемешиванием – метантенки (рис. 4.3).

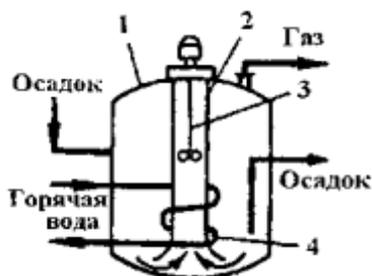


Рис. 4.3. Метантенк: 1 – корпус, 2 – труба, 3 – мешалка, 4 – змеевик

В целом же типичная схема сбраживателя с мешалкой представлена на рис. 4.4.

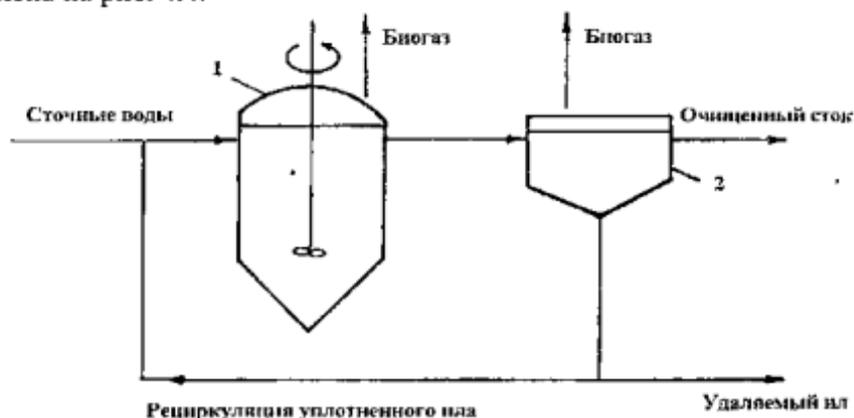


Рис. 4.4. Типичная схема сбраживателя с мешалкой:
1 – сбраживатель, 2 – отстойник

Сбраживанию до метана и диоксида углерода подвергаются такие сложные соединения как полисахариды, липиды и белки. Полного сбраживания органических веществ в метантенках достичь нельзя. В среднем степень распада составляет около 40%. Высокая температура и интенсивное перемешивание увеличивают степень распада загрязнителей.

4.1.5. Очистка от разливов нефти и нефтепродуктов

Большую опасность для окружающей среды представляет загрязнение нефтью, особенно при попадании ее в воду. Масштабные загрязнения такого рода обычно происходят в морях и океанах при авариях на нефтеналивных судах с высокой тоннажностью. Еще более возросла эта опасность в связи с подводным бурением на больших глубинах, примером чему – глобальная катастрофа 2010 года в Мексиканском заливе. Не исключена такая ситуация при бурении скважин в будущем в акватории Северного Ледовитого океана, где устранение последствий очень проблематично. Ежегодные выбросы нефти в моря и океаны составляют миллионы тонн.

При попадании в водоемы нефть и нефтепродукты образуют плавающую на поверхности воды пленку, частично растворяются, создают устойчивую эмульсию, оседают на дно водоема. Нефтяное пятно не пропускает солнечные лучи, замедляет обновление кислорода в воде. В результате перестает размножаться планктон – основной продукт питания морских обитателей.

При концентрации нефтепродуктов в водоеме 0,05-0,10 мг/л погибают икра и молодь рыб, при концентрации 0,1-1,0 мг/л погибает планктон, а концентрация 10-15 мг/л смертельна для взрослых особей рыб. Нефть – своего рода наркотик для морских обитателей. Было замечено, что некоторые рыбы, "хлебнув" однажды нефти, уже не стремятся покинуть отравленную зону.

В окружающей среде нефтепродукты постепенно окисляются аэробными бактериями до безвредных веществ. В водоемах процесс самоочищения протекает при наличии достаточного количества кислорода и только в теплое время года, причем продолжается длительное время. При температуре воды ниже 5-10° бактериальное разложение нефтепродуктов практически приостанавливается. Нефтяное загрязнение – грозный фактор, влияющий на жизнь всего Мирового океана. Особенно опасно загрязнение высокоширотных вод, где из-за низкой температуры нефтепродукты практически не разлагаются и как бы "консервируются" льдами, поэтому нефтяное загрязнение может нанести серьезный ущерб окружающей среде Арктики и Антарктики. Не следует забывать, что лед является резервным источником пресной воды.

Для устранения последствий попадания нефти и нефтепродуктов в моря и океаны (а также реки) используются различные механи-

ческие и химические методы. Большую помощь в этом деле может принести использование микроорганизмов — "пожирателей" нефти.

Нефть и нефтепродукты не способны сбраживаться в анаэробных условиях. Однако такие устойчивые углеводороды, как парафин, нефть подвергаются окислению под действием микробов, но только в аэробных условиях. Было установлено, что использовать нефть могут бактерии, широко распространенные в любой полевой, лесной, луговой почве. Более того, такая способность присуща и многим микроскопическим грибам. Алканы с длинной цепью используются очень многими бактериями, при этом по мере удлинения цепи парафинов растет число видов, способных использовать эти соединения, а также интенсивность их использования. В середине XX века было установлено, что большинство видов дрожжей рода *Candida* окисляет углеводороды. Многие псевдомонады окисляют углеводороды настолько полно, что накопления промежуточных продуктов не происходит. В первичном воздействии на углеводородную цепь участвует молекулярный кислород, без которого парафины не окисляются. Окисление катализирует монооксигеназа:

Парафин + O₂ + НАДН₂ → Алифатический спирт + НАД + H₂O.
Дальнейшее окисление парафина протекает по пути, который известен как β-окисление жирных кислот с длинной цепью.

Для борьбы с нефтяными загрязнениями выделены высокоэффективные штаммы микроорганизмов. В частности, в загрязненный нефтью район Мексиканского залива с такими штаммами микроорганизмов отправилась группа научных сотрудников одного из НИИ г. Томска.

В заключение главы в отношении очистки сточных вод, прежде всего осуществляемых в аэробных условиях, следует отметить некоторые моменты. Очистные сооружения выполняют барьерную функцию между источниками загрязнений воды и водосмом, в который поступает очищенная вода. В свое время сформировалась "доктрина катаболической безотказности микробов", согласно которой любое органическое соединение, имеющееся в природе, используется (и обезвреживается) какими-либо микроорганизмами. Если речь идет о бытовых стоках, то очистка происходит в соответствии с этой доктриной, однако, чтобы эффективность работы очистного сооружения была высокой, необходимо еще до пуска его в эксплуатацию осуществить направленную адаптацию микрофлоры активного ила к предстоящей очистке стоков с конкретным составом загрязнителей. Су-

ществуют практические рекомендации по формированию в аэротенках высокоадаптированного активного ила, микрофлора которого способна к преимущественному окислению специфических органических компонентов очищаемых сточных вод с передачей и закреплением этих свойств в цепи наследственности.

Однако в сточные воды (да и в твердые отходы) все чаще поступают вещества небиологического происхождения, с которыми ранее не контактировали микроорганизмы. Поэтому ведутся интенсивные исследования по использованию специальных штаммов микроорганизмов, созданных с помощью современных генетических методов, которые способны эффективно утилизировать ксенобиотики.

Микроорганизмы не только очищают сточные воды, они, совместно с другими организмами, используются в качестве биоиндикаторов, позволяющих судить о степени чистоты (или загрязненности) водоемов. Последние обладают способностью к самоочищению в ответ на попадание в них загрязняющих веществ. Самоочищение представляет собой сложный комплекс взаимосвязанных химических, физико-химических и биохимических процессов. Гидробиологический анализ оценки степени загрязнения водоемов основан на способности некоторых видов гидробионтов обитать в среде с той или иной загрязненностью. Это их свойство называется сапробностью данного организма. Разработана система сапробности, которая позволяет судить о степени загрязненности водоема или его участка.

4.2. Утилизация твердых отходов

В быту каждый человек в среднем за год образует сотни килограмм твердых отходов, которые необходимо обезвредить и вновь ввести в существующий природный круговорот. С учетом вклада предприятий, работающих на удовлетворение потребности людей, годовое количество твердых отходов в расчете на одного человека измеряется тоннами. С металлическими отходами вопрос решается просто – они идут на переплавку, отходы биологической природы способны утилизировать микроорганизмы. Принципиальные сложности возникают с синтетическими материалами, для деградации которых часто нет микроорганизмов.

К широко распространенным твердым отходам биологического происхождения относится целлюлоза и ее производные, обычно встречающиеся в виде древесины. Часть этих отходов используется для изготовления строительных материалов (древесностружечных и древесноволокнистых плит – ДСП и ДВП). Другая часть таких отхо-

дов используется в качестве топлива, а также после термохимического гидролиза для микробиологического получения технического спирта, при сгорании которого образуются лишь CO_2 и H_2O .

Огромное число твердых отходов, являющихся преимущественно продуктами жизнедеятельности человека, складывают на городских свалках, причем значительная часть их нередко рассыпается при транспортировке. На свалках отходы частично подвергаются медленной естественной деградации, частично сжигаются. На них постепенно наслаиваются новые отходы, при этом в нижних слоях возникают условия для анаэробной биодеградации с выделением биогаза. Это наблюдение навело на мысль об организации данного процесса в условиях свалок. Для этого экскаватором или бульдозером роют траншею, дно и стены ее застилают водонепроницаемой пленкой, помещают внутрь перфорированные (с отверстиями) пластмассовые трубы и засыпают ее твердыми отходами, уплотняя их сверху. После заполнения траншеи отходами их накрывают пленкой, засыпают землей и по трубам водой увлажняют отходы. Через определенное время вследствие начавшегося брожения по трубам станет выходить биогаз (смесь CH_4 и CO_2), и это будет продолжаться до тех пор, пока не исчерпаются загруженные в траншею отходы. Биогаз является носителем энергии. После заполнения одной траншеи сразу же начинают заполнять следующую, благодаря чему биогаз может поступать потребителю непрерывно.

К твердым отходам в сельском хозяйстве относится неиспользуемая в качестве продуктов питания и кормов часть урожая, а также навоз. При анаэробном сбраживании их тоже получают биогаз. Для ускорения процесса биодеградации используют специальные установки.

Другим способом биодеградации отходов сельского хозяйства, прежде всего соломы и несъедобных частей растений, а также сырого активного ила, сухих листьев и веток является компостирование, которое издавна использовалось людьми для получения компоста.

Компостирование – это экзотермический процесс биологического окисления, в котором органический субстрат подвергается аэробной биодеградацией смешанной популяцией микроорганизмов в условиях повышенной температуры и влажности. При компостировании субстрат претерпевает физические и химические превращения, завершающиеся образованием стабильного гумифицированного (со-

держщего гумус) продукта – ценного органического удобрения, одновременно улучшающего структуру почвы.

Компостирование включает в себя одновременно процессы синтеза и деструкции. Простые низкомолекулярные органические соединения (растворимые сахара и органические кислоты) легко проникают через клеточную стенку микроорганизмов и являются источниками энергии при синтезе биополимеров. С другой стороны, высокомолекулярные соединения отходов, прежде чем попасть в клетку через ее стенку, должны быть гидролизваны с помощью экзоферментов микроорганизмов.

Существуют различные системы компостирования. В простых системах компостирования подготовленный (измельченный, очищенный от металлических и пластмассовых отходов) материал складывается на поверхность бетонированной площадки в виде длинных куч, называемых компостными рядами, имеющими треугольную форму в поперечном сечении. При естественной аэрации высота рядов не должна превышать 1,5 м, а ширина – 2,5 м. В процессе компостирования, которое длится 2-3 месяца, для улучшения аэрации материала осуществляют его переворачивание. Для того, чтобы сократить срок компостирования и исключить переворачивание материала, осуществляют принудительную аэрацию его через специальные воздухопроводные каналы. При крупномасштабной биодеградации отходов их предварительно (на 2-3 дня) помещают во вращающийся барабан длиной 40 м и диаметром 4 м, установленный с небольшим уклоном к горизонту. Скорость вращения барабана 1-2 об./мин, при этом происходит механическое истирание отходов. Затем материал обычно помещают на несколько недель в компостные ряды.

Особую группу условно твердых отходов составляет активный ил, получающийся при биологической очистке воды. Влажность активного ила составляет 99,2-99,5 %, причем взвешенные частицы имеют малый размер и гидратную оболочку, которая препятствует их уплотнению. Для уплотнения взвеси частиц используют гравитационный, флотационный, центробежный и вибрационный методы. Масштабное уплотнение и обезвоживание активного ила осуществляют на иловых площадках. Механическое обезвоживание осадков осуществляют на вакуум-фильтрах, фильтр-прессах (периодического действия), центрифугах и виброфильтрах. При необходимости активный ил подвергают сушке в сушилках различного типа. Сухой ил содержит 37-52 % белков, 20-35 % аминокислот, а также витамины группы В. Если он не содержит тяжелые металлы (по плотности пре-

вышающие железо – Pb, Cu, Zn, Ni, Cd, Co, Sb, Sn, Bi, Hg) или неразрушенные вредные химические вещества, то может быть использован для кормления животных, рыб и птиц. Разработаны технологические схемы получения белково-витаминного кормового продукта (белвитамила), производства смеси кормовых дрожжей с илом и получения технологического витамина В₁₂ для комбикормовой промышленности. Загрязненный ил может быть захоронен в почве, в море (ограниченно, по лицензии, в Великобритании), а также подвергнут сжиганию.

4.3. Утилизация ксенобиотиков

Наиболее распространенными твердыми отходами небиологической природы являются различного рода пластмассы. Чтобы решать вопрос о рациональном методе утилизации таких отходов бытового назначения необходимо организовать четкую систему их сбора. Если же такие отходы являются побочным продуктом массового производства основного изделия, то экономика и экология требуют разработать технологии использования этих отходов для получения нового готового продукта. Сжигание таких отходов часто экономически невыгодно, так как требует высоких температур горения, исключаящих выделение в атмосферу вредных недоокисленных химических соединений.

Несмотря на искусственное происхождение таких материалов в ряде случаев существуют микроорганизмы (ксенобионты), способные осуществлять их биodeградацию. Так, ресурсы вышедшей из употребления полиэтиленовой пленки ежегодно оцениваются в нашей стране десятками тысяч тонн. Разработаны технологии переработки таких отходов в трубы для сельского хозяйства, а также для вторичного получения полиэтиленовой пленки. Кроме такой неструктивной утилизации возможна и биodeградация полиэтилена, полипропилена, поливинилхлорида под действием бактерий, плесени и грибов, а пластмассы, находящиеся в земле, способны разрушаться почвенными микроорганизмами, подвергнувшимися мутациям под действием облучения. Для ликвидации отходов из таких материалов достаточно их заражения соответствующей культурой микроорганизмов. Для интенсификации этого процесса можно использовать введение в композиции на основе пластмасс небольших добавок растительных крахмалов и соединений двухвалентного железа, служащих центрами начала биораспада отходов. Это желательно практиковать в отношении упаковочных материалов.

4.4. Биологическая защита атмосферы от вредных выбросов

Основными источниками загрязнения атмосферного воздуха являются промышленные предприятия, тепловые электростанции и животноводческие комплексы. Загрязнения в атмосферу могут поступать непрерывно или периодически, залпами или мгновенно. При залповых выбросах за короткое время в воздух выделяется большое количество вредных веществ. При мгновенных выбросах, например во время проведения взрывных работ, загрязнения выбрасываются в доли секунды, иногда на значительную высоту. По агрегатному состоянию загрязнения могут быть твердыми, жидкими, газообразными и смешанными. Загрязняющие частицы (твердые и жидкие) имеют разный размер, от сотых долей микрометра до десятков микрометров и более. Выбросы в атмосферу также могут быть организованными и неорганизованными, нагретыми и холодными. При организованном выбросе загрязнения поступают в атмосферу через специально сооруженные газоходы, воздухопроводы, трубы, а при неорганизованном выбросе – в виде ненаправленных потоков в результате нарушения герметичности оборудования и по другим причинам.

Химический состав загрязнений и степень их опасности для здоровья человека и состояния живых организмов окружающей среды разнообразны. Однако во многих случаях, прежде всего для крупнотоннажных производств, химический состав загрязнений известен.

Наиболее эффективным направлением снижения выбросов является создание безотходных технологий, в частности внедрение замкнутых газовых потоков. Однако до настоящего времени основным средством предотвращения вредных выбросов остается разработка и внедрение эффективных систем очистки газов. Под очисткой газов понимают отделение от газа загрязняющих веществ или превращение их в безвредное состояние.

Для улавливания частиц от 5 до 1000 мкм применяют пылесодержательные камеры и циклоны, в основе работы которых лежит действие гравитационных, инерционных и центробежных сил. Частицы размером от 0,05 до 100 мкм улавливают с помощью скрубберов, тканевых и волокнистых фильтров, а от 0,01 до 10 мкм – с помощью электрофильтров. Для обезвреживания воздуха от газообразных и парообразных вредных веществ применяют абсорбционные (включая хемосорбцию), адсорбционные, каталитические, термические и другие методы.

Для физической абсорбции на практике часто применяют воду, при хемосорбции – обычно водные растворы солей, щелочей, органических веществ. В адсорбционных методах вредные примеси поглощаются пористыми адсорбентами. Каталитические методы основаны на химических превращениях токсичных компонентов в нетоксичные на поверхности твердых катализаторов, как это, в частности, происходит в автомобильных каталитических нейтрализаторах выхлопных газов. Термические методы основаны на сжигании горючих примесей в топках печей и факельных горелках.

Однако многие вещества органической и неорганической природы могут быть утилизированы микроорганизмами, использующими их как источник питания. Такой процесс происходит в среде, содержащей воду, в аэробных условиях. Эти методы стали применять практически лишь со второй половины XX века, и они еще не получили достойного распространения.

Для биологической (биохимической) очистки воздуха применяют три типа аппаратов: биофильтры, биоскрубберы и биореакторы с омываемым слоем.

Основной частью биофильтра для очистки воздуха является фильтрующий слой, избирательно сорбирующий токсические вещества из воздуха. После этого растворенные токсические вещества диффундируют к микробным клеткам, поглощаются ими и подвергаются деструкции. Наполнителем фильтрующего слоя обычно служат дешевые природные материалы – компост, торф и др. Они содержат в своем составе минеральные соли и вещества, необходимые для развития микроорганизмов, поэтому внесение дополнительных минеральных добавок не требуется. Со временем концентрация микроорганизмов в фильтрующем слое становится избыточной и его заменяют новым. Как и в случае с биологической очисткой водных стоков на начальном этапе работы биофильтра происходит адаптация микроорганизмов к природе утилизируемых загрязняющих веществ.

При использовании биоскруббера при очистке воздуха реализуются два процесса. Первоначально загрязненный газ поступает снизу в аппарат колонного типа (скруббер), в котором сверху (по принципу противотока) подается орошающая вода. Путем абсорбции она избирательно поглощает из воздуха загрязняющие вещества и очищает его. Затем загрязненная вода поступает в аэротенк, где ее очищают микроорганизмы, питающиеся загрязняющими веществами.

В биореакторах с омываемым слоем очистку загрязненного газа осуществляют микроорганизмы, иммобилизованные в гранулы. Загрязняющее вещество растворяется в жидкости, омывающей гранулы, диффундирует в микробные клетки, где подвергается биодеградации. Периодически (раз в несколько месяцев) реактор очищают и наполняют свежими гранулами. Эти аппараты являются наиболее перспективными для очистки воздуха.

Мир микробов настолько функционально разнообразен, что для большинства загрязняющих веществ можно найти виды, способные их деградировать, а если их все-таки нет, то с помощью методов генетической инженерии можно будет создать нужный штамм.

5.1. Общие понятия бионанотехнологии

Традиционные области физики часто имеют дело с телами размером от миллиметра и более. Частицы, размер которых выражается в микрометрах (микронах), условно относят к микрообъектам. Тела, имеющие размер, хотя бы в одном направлении, от 1 до 100 нанометров (10-1000 ангстрем) называют нанообъектами. Ниже этого диапазона располагается атомный масштаб (соизмеримый с размером атомов), имеющий порядок десятых долей нанометра. Было установлено, что нанообъекты обладают физическими свойствами, сильно отличающимися от свойств, присущих телам, состоящим из этих нанообъектов. В частности, отдельно взятый атом или наночастица металла обладают иными свойствами, чем кусок этого металла. Другой пример – эмиссионный спектральный анализ. Линейчатый спектр, несущий информацию об энергетических уровнях электронов химического элемента, можно получить лишь при условии превращения анализируемой пробы в парообразное состояние, когда свет излучают отдельные атомы. В твердом и жидком состоянии совокупности этих же атомов линейчатый спектр не дают. Еще пример: отдельные молекулы ферментов и вирусы обладают функциоанльной активностью, а в кристаллической форме они неактивны. Эта особенность приводит к так называемым размерным эффектам – новому поведению частиц, зависящему от их размера. В технике такая зависимость позволяет конструировать материалы с новыми свойствами из одних и тех же исходных материалов. Она лежит в основе нанотехнологий, с помощью которых получают изделия с уникальными техническими характеристиками.

Возникновение жизни на Земле напрямую связано с образованием и функционированием типичных нанообъектов, представленных молекулами полинуклеотидов и полипептидов, а также мембранными структурами, отграничивавшими протобионты от окружающей среды. Одноклеточные, а тем более многоклеточные организмы представляют собой колоссальные ансамбли согласованно работающих молекулярных "машин" и построенных из них наноструктур (митохондрий, рибосом и т.д.), выполняющих самые разнообразные функции. Да и сама биологическая эволюция представляла собой непрерывный процесс совершенствования и соревнования наноструктур, входящих в состав организмов. Изучением биомакромолекул и обра-

зусмых ими субклеточных структур занимается молекулярная биология. Знания, полученные этой наукой, используются биологической нанотехнологией (бионанотехнологией – БНТ, или нанобиотехнологией) для создания искусственных наносистем с целью удовлетворения разнообразных практических потребностей людей.

5.2. Лабораторная техника для работы с биологическими нанообъектами

5.2.1. Микроскопия

Оптические микроскопы. Важнейшей характеристикой микроскопа является разрешающая способность (разрешение), под которой понимают наименьшее расстояние между двумя точками объекта, при котором они еще воспринимаются раздельно (не сливаются друг с другом). Обычные оптические микроскопы, предел разрешения которых (d) определяется уравнением Аббе-Фурье

$$d = \lambda / n \sin(\alpha),$$

(λ – длина волны в вакууме; n – коэффициент преломления среды в пространстве между образцом и объективом; α – половинный угол апертуры) не позволяют наблюдать нанообъекты.

Однако были созданы сканирующие ближнепольные оптические микроскопы (СБОМ), которые преодолели этот предел разрешения классической оптики, понизив его значение приблизительно на порядок. В таких микроскопах поверхность образца сканируется (построчно обследуется) оптическим зондом, который испускает свет, поступающий от лазера. Источник света, падающего на объект, располагается над поверхностью последнего на расстоянии нескольких мкм. Диаметр светового пятна, сканирующего исследуемую поверхность, очень мал (до 10 нм), что значительно ниже предела разрешения d . Увеличенное изображение объекта наблюдают на экране монитора компьютера. У СБОМ теоретически отсутствует предел разрешения. Возможности таких микроскопов ограничены техническими причинами. СБОМ находят применение в клеточной биологии, микробиологии и протеомике. (Протеомика – наука, основным предметом изучения которой являются белки и их взаимодействия в живых организмах.) В частности, с их помощью были визуализированы изображения доменов основного комплекса фотосистемы II, связанного с липидными монослоями.

Электронные микроскопы. Электронная микроскопия, как и световая, позволяет получить увеличенное изображение микроскопи-

ческого объекта. В отличие от световой микроскопии она обладает на порядки более высокой разрешающей способностью. Разрешение микроскопа ограничивается явлением дифракции и теоретически составляет примерно половину длины волны луча, применяемого для освещения. Длина волны (λ) электрона, ускоренного в постоянном электрическом поле с разностью потенциалов U (в Вольтах)

$$\lambda = \sqrt{150/U} \text{ [Å]}.$$

Для стандартного электронного микроскопа (ЭМ) с ускоряющим напряжением $U = 100\,000$ Вольт, $\lambda \approx 0,04$ ангстрема, а разрешение $d \approx 0,02$ Å. По целому ряду технических причин достигнутое разрешение на два-три порядка ниже: для кристаллических (периодических) материалов оно ориентировочно составляет 2, а для большинства биологических объектов – 10-20 ангстрем.

Электронный микроскоп (рис. 5.1) состоит из колонны, стенда, вакуумной системы и пульта управления. Колонна заключает в себе всю электронно-оптическую систему, упрощенная схема которой представлена на рис. 5.2.

Наблюдение в электронной микроскопии ведется в режиме просвечивания объекта (просвечивающий ЭМ), а также в специальном варианте микроскопирования, при котором осуществляется сканирование объекта электронным зондом (растровые ЭМ, работающие в режиме отражения или просвечивания). Растровые ЭМ сканируют образец с помощью очень тонкого луча диаметром всего в несколько ангстрем. Их разрешающая способность ограничивается в основном диаметром электронного луча и радиационным повреждением объекта, увеличенное изображение которого наблюдают на экране кинескопа. (Растр – светящаяся строка на экране кинескопа.)

При работе ЭМ в режиме просвечивания объект заключают в пластмассовый блок, с помощью ультрамикротомы получают ультратонкие срезы (толщиной несколько сот ангстрем) и контрастируют их путем обработки соединениями тяжелых металлов, атомы которых эффективно рассеивают электроны и делают изображение контрастным. При микроскопировании корпускул (отдельных биомакромолекул, вирусов, органоидов) их помещают на тонкую пленку-подложку (например, слюду), в вакууме под определенным углом на них напыляют металл, а затем под прямым углом – углерод. Полученную углеродную реплику вместе со слоем напыленного металла снимают с подложки, помещают на металлическую сетку, которую вводят в ЭМ.

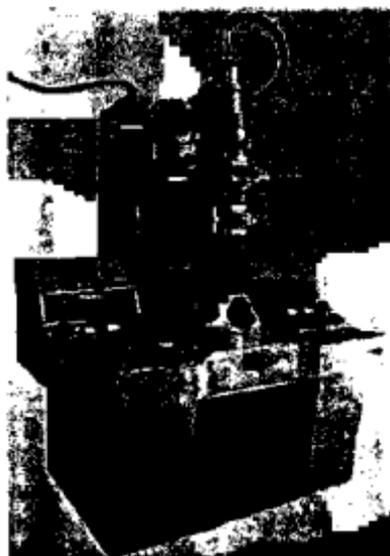


Рис. 5.1. *Общий вид отечественного электронного микроскопа ЭМВ-100Б*

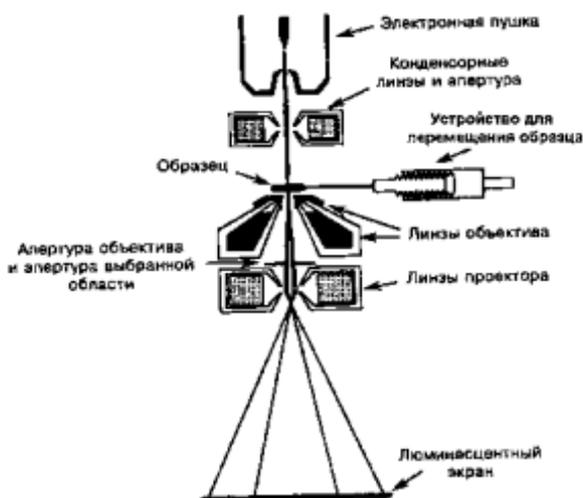


Рис. 5.2. *Упрощенная электронно-оптическая схема просвечивающего электронного микроскопа [3]*

Атомно-силовой микроскоп (АСТ). Он был изобретен в середине 80-х годов прошлого столетия и является одним из представителей сканирующих зондовых микроскопов, к которым относится,

помимо СБОМа, также сканирующий туннельный микроскоп (СТМ, см. ниже).

АСМ используется для получения изображения металлических поверхностей в атомном масштабе, а также для получения трехмерных профилей поверхности биологических образцов в нанометровом масштабе. Он исключительно полезен при определении размера и конформации единичных макромолекул и их агрегатов, адсорбированных на твердых поверхностях. АСМ сканирует образцы с помощью тончайшего зонда (острой иглы), закрепленного на свободном конце миниатюрного кантилевера (кронштейна). Зонды обычно изготавливают из кремния или нитрида кремния. Длина кантилевера – 100-500 мкм, ширина – 10-40 мкм, толщина – 0,1-5 мкм; длина зонда – около 10 мкм, радиус закругления острия – 1-50 нм. Кантилевер измеряет слабые силы взаимодействия, возникающие между острием и поверхностью образца, значение которых зависит от расстояния между ними. Эти силы вызывают соответствующий изгиб кантилевера. Величина изгиба регистрируется с помощью оптической системы, включающей диодный лазер и детектор. Перемещение образца осуществляется с помощью пьезоэлектрического сканера (рис. 5.3). (Пьезоэлектричество – возникновение электрических зарядов при деформации кристалла (прямой эффект) и деформация кристалла под действием электрического поля (обратный эффект).)

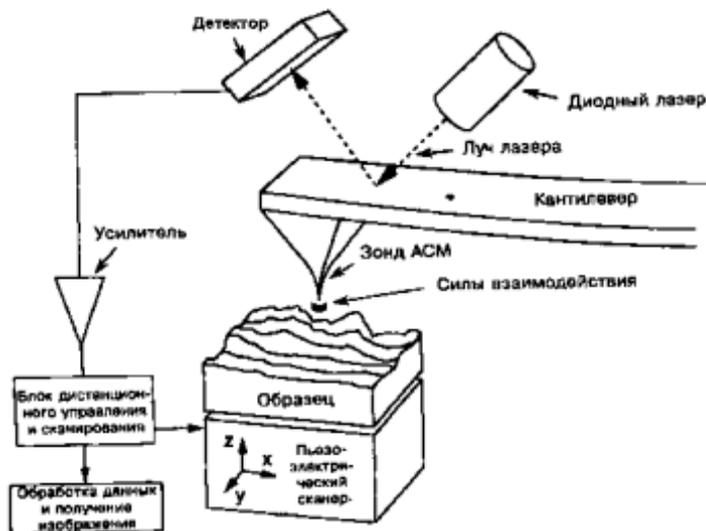


Рис. 5.3. Принципиальная схема АСМ [3]

Увеличенное изображение объекта наблюдают на мониторе компьютера. АСМ позволяет манипулировать отдельными молекулами: механическим касанием молекулу белка можно адсорбировать на острие зонда, приподнять и перенести в другое место (рис. 5.4).

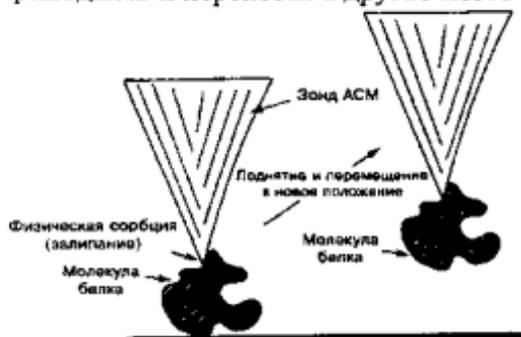


Рис. 5.4. Манипуляция молекулой белка с помощью АСМ [3]

Сканирующий туннельный микроскоп (СТМ). В 1986 г. Г. Биннинг и Г. Ройпер получили Нобелевскую премию за изобретение СТМ, который может определять морфологию поверхностей с разрешающей способностью до отдельных атомов. Для работы СТМ требуются электропроводящие образцы и зонды. С помощью СТМ были получены изображения биомакромолекул (белков, ДНК), адсорбированных на проводящем субстрате (золоте).

Принцип работы СТМ основан на квантовом явлении прохождения электрона сквозь потенциальный барьер, который образован разрывом электрической цепи – небольшим промежутком (туннельным зазором) между зондирующим микроострием и поверхностью образца. Это явление называется туннельным эффектом, при котором полная энергия частицы меньше высоты потенциального барьера, и она (частица) проходит как бы по туннелю под барьером.

СТМ работает следующим образом (рис. 5.5): тонко заостренное токопроводящее острие приближают к поверхности образца на расстояние 1 нм с помощью манипулирования предметным столиком (на рис. 5.5 не показан) и пьезоэлектрического сканера. На таком близком расстоянии электроны туннелируют сквозь зазор между острием и образцом. Туннельный ток зависит от приложенной разности потенциалов между острием и образцом, от расстояния между ними, формы острия и химического состава образца и острия.

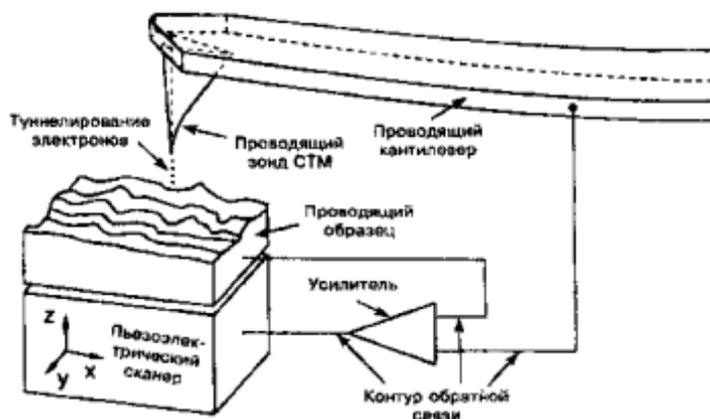


Рис. 5.5. Принцип действия СТМ [3]

Контур обратной связи обеспечивает постоянную величину туннельного зазора или постоянного тока. Мерой морфологии поверхности и ее химического состава являются туннельный ток и напряжение контура обратной связи. Изображение наблюдают на мониторе компьютера.

Оптический пинцет. Оптический (лазерный) пинцет представляет собой устройство, в котором сфокусированный луч лазера используется для передвижения микроскопических объектов размером от 10 нм до 10 мкм или удержания их в определенном месте. Этот эффект имеет место, если диэлектрическая постоянная и показатель преломления материала частицы выше, чем соответствующие значения у окружающей ее среды.

В случае, когда размер частицы меньше длины волны ($d < \lambda$), наличие сил, удерживающих частицу в фокусе, обусловлено появлением на поверхности последних электрических зарядов противоположного знака, которые наведены электромагнитным полем лазерного луча. В фокусе эти силы уравновешены. Перемещение фокуса луча нарушает это равновесие, появляется сила, которая возвращает частицу в новое положение фокуса.

Если размер частицы больше длины волны ($d > \lambda$), то становятся справедливыми законы геометрической оптики. Частица отклоняет луч света, при этом получает импульс силы от потока фотонов, действующий в противоположном отклонению направлении. В фокусе луча импульсы сил, действующих на частицу с разных сторон, урав-

новешсны, а при перемещении фокуса появляется неуравновешенная сила, возвращающая частицу вслед за фокусом.

Таким образом, с помощью лазерного пинцета можно осуществлять сборку конструкций из наноразмерных частиц.

5.2.2. Рентгеноструктурный анализ

Рентгеноструктурный анализ является эффективным методом установления конформации (пространственного строения) биомолекул и их комплексов. Он основан на расшифровке дифракционной картины, получаемой при воздействии рентгеновских лучей на кристаллические вещества. Образование этой картины происходит в соответствии с условием Вульфа-Брэггов (Ю.В. Вульф – русский физик-кристаллограф, У.Г и У.Л. Брэгги – английские физики), отвечающим получению дифракционного максимума:

$$2d \sin \theta = n\lambda,$$

где d – расстояние между отражающими плоскостями (в которых располагаются узлы кристаллической решетки); λ – длина волны рентгеновского луча; θ – угол, под которым луч падает на отражающую плоскость; n – целое число (1, 2, 3, ...).

Длина волны зависит от энергии лучей E в килоэлектронвольтах (кэВ):

$$\lambda = 1,240/E \text{ [нм]}.$$

Одиночные кристаллы белков размером 0,1-1,0 мм получают методом подвешенных (висячих) капель. Для этого небольшую каплю (1-20 мкл) раствора белка (или вируса) помещают на покровное стекло (каплей вниз) и дают растворителю возможность постепенно испариться.

Рентгенограмму получают, используя одиночный кристалл или порошок из мелких кристаллов, запаянных в стеклянный капилляр (метод Дебая-Шерера).

Современная установка для получения дифракционной картины (рис. 5.6) состоит из источника рентгеновских лучей, столика, на котором крепится исследуемый образец, шагового электромотора, вращающего этот столик, и экранного детектора. Для снижения скорости радиационного разрушения образца осуществляется его охлаждение азотом через сопло криогенной системы.

Экранный детектор входит в состав прибора с зарядовой связью (ПЗС), который является основой современной цифровой фото- и видеотехники. ПЗС накапливает электронный заряд при попадании на

него светового потока. Уровень заряда зависит от интенсивности и продолжительности освещения. Для минимизации темнового тока ПЗС работает при температуре -40°C , что позволяет детектировать единичные фотоны. Рентгеновские лучи, которые идут от образца, падают на экран, покрытый слоем сцинтиллятора, превращаясь в фотоны света. Экран детектора сообщается с матрицей ПЗС (емкость 4096×4096 пикселей) через соответствующее число оптических волокон сечением 20×20 мкм. Емкость единичного пикселя достигает нескольких сотен тысяч электронов, обеспечивая высокий динамический диапазон. Полученный по оптическим волокнам сигнал поступит на аналогово-цифровой преобразователь (АЦП), а затем на компьютер для обработки с помощью специальных программ и визуализации получаемой картины.

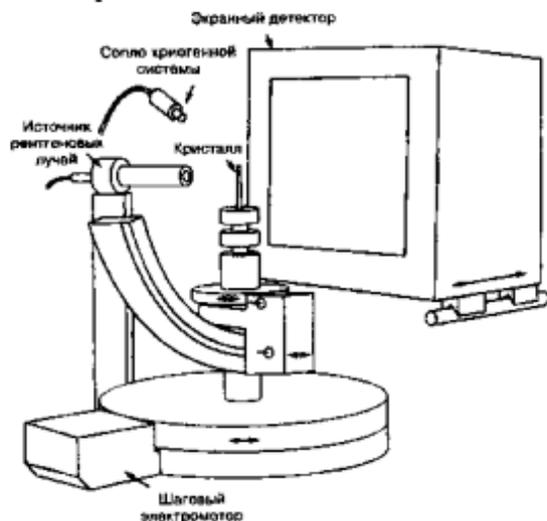


Рис. 5.6. Рентгеновская установка для получения дифракционной картины с экранным детектором [3]

Сама по себе рентгенограмма говорит только об амплитудах, но ничего не говорит о фазах, соответствующих этим амплитудам, делая невозможным установление структуры молекулы. В 1953 г. М.Перуц применил к белкам метод, разработанный кристаллографами для расшифровки фаз в случае известных структур. Метод состоит в том, что к исследуемой молекуле присоединяют в определенных местах два атома металла (М. Перуц присоединял атомы ртути к атомам се-

ры остатков цистеина в гемоглобине). Затем сравнивают рентгенограммы нативных молекул и модифицированных путем присоединения атомов металла. При расшифровке рентгенограмм используется математический аппарат, включающий преобразование Фурье, для которого требуется фазовая информация.

Рентгеноструктурный анализ сыграл большую роль в установлении в 1953 году вторичной структуры ДНК (двойной спирали) Дж. Уотсоном, Ф. Криком и М. Уилкинсом. В 1957 году английский биохимик Дж. Кендрью расшифровал одиночную цепь миоглобина, поразительно напоминающую каждую из четырех цепей гемоглобина, трехмерная структура которых была установлена с помощью рентгеноструктурного анализа в 1959 году М. Перутцем с сотрудниками. В 1962 году Д. Филипс с помощью этого метода получил изображение структуры фермента лизоцима. С помощью рентгеноструктурного анализа расшифрована трехмерная нативная структура нескольких тысяч белков. Обычно рентгенограммы белков снимают с использованием характеристического излучения меди с длиной волны $1,537 \text{ \AA}$.

В настоящее время структуру короткоживущих конформеров (молекул, различающихся только структурой, конформационных изомеров) со временем жизни, исчисляемым микро- и наносекундами, удастся установить с помощью времяразрешающей кристаллографии. Она позволяет получать и интерпретировать карты электронной плотности во времени. При понижении температуры скорость конформационных переходов замедляется на несколько порядков (криокристаллография). Так, например, изучали конформационный переход гемсодержащего белка, соединенного с молекулой СО, в белок, лишенный этой молекулы. Для этого с помощью лазерного флэш-фотолиза "выжигали" молекулу СО при -196°C и регистрировали переход конформации через стадию короткоживущего интермедиата [3].

5.2.3. Прочие методы

Помимо ранее рассмотренных методов в исследованиях по нанотехнологии используются и другие инструментальные методы.

Так, для определения массы наночастиц используется магнитостатический масс-спектрометр, в котором перед попаданием в масс-анализатор они подвергаются ионизации путем бомбардировки потоком электронов. Поделив массу частицы на ее плотность (если она известна), находят размер частицы (объем).

Для получения кристаллографической информации о приповерхностных слоях материала используется методика дифракции низкоэнергетических электронов, пучок которых ведет себя как волна, отражающаяся от кристаллографических плоскостей аналогично рентгеновскому лучу. Длина волны электронного пучка

$$\lambda = 1,226 / \sqrt{E} \text{ [нм]},$$

где E – энергия электрона в эВ.

Так как электроны малых энергий (10-100 эВ) проникают в образец лишь очень неглубоко, дифракционная картина отражает положение атомов в поверхностном слое [1].

Для решения различных вопросов в области нанотехнологии используются такие физические методы как инфракрасная, фотоэмиссионная и рентгеновская спектроскопия, магнитный резонанс (ЭПР, ЯМР), различные виды электрофореза, хроматография и др.

Кроме того, неocenимый вклад в методическое обеспечение экспериментов и трактовку полученных результатов вносит математическое моделирование. Например, кинетические исследования работы важнейших объектов БНТ – ферментов – невозможны без использования математических уравнений ферментативной кинетики, отражающих большое количество конкретных вариантов протекания реакций. Анализ этих моделей требует использования математического аппарата, а расчет уравнений – применения ЭВМ, которые в настоящее время встроены также в большинство лабораторных приборов.

5.3. Генетические нанотехнологии

5.3.1. Общие сведения о носителях генетической информации

Исходным носителем генетической информации, которая определяет строение клеток и проявление ими биологических функций, является дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК). Она же является тем узким "мостиком", который обеспечивает преемственность поколений. Генетическая система сформировалась естественным путем в процессе биологической эволюции. Первоначально носителями генетической информации были молекулы рибонуклеиновой кислоты (РНК), которые одновременно выполняли и функцию реализации этой информации путем ускорения определенных химических реакций (катализ). У современных организмов носителем наиболее полной, "стратегической" (передающейся последующим поколениям) информации стали молекулы ДНК, а различные виды РНК – преиму-

щественно посредниками на пути биосинтеза основного "рабочего" звена биосистем – белков.

У прокариот ДНК представлена кольцевой "бактериальной хромосомой", располагающейся непосредственно в цитоплазме (нуклеоид). Кроме того, у многих бактерий имеется внехромосомная ДНК в форме небольших, замкнутых в кольцо ее молекул, получивших название плазмид. ДНК эукариот в основной массе входит в состав хромосомного набора, находящегося в ядре, и частично (менее 1%) содержится в митохондриях и пластидах (цитоплазматическая ДНК).

По одному из своих размеров, поперечному, ДНК относится к нанообъектам. К ним же относятся и мономеры, из которых она построена (нуклеотиды).

Из функций, которые осуществляются с участием молекулы ДНК, следует назвать репликацию (самоудвоение ДНК), транскрипцию (биосинтез молекул РНК на соответствующих участках ДНК) и репарацию ДНК (ликвидацию ее повреждений).

На молекулах ДНК закодирована информация о первичной структуре белков, рибонуклеиновых кислот, имеются участки, выполняющие регуляторные функции, однако назначение большей части нуклеотидных последовательностей не вполне ясно (это относится к ДНК эукариот). Существенной особенностью строения ДНК эукариот является мозаичный характер кодирования информации о структуре белков. Участки ДНК, кодирующие аминокислотную последовательность белковой молекулы (экзоны), разделяются участками, которые такой информации не несут. Поэтому после транскрипции предшественницы матричной РНК – пре-мРНК происходит процессинг (созревание) последней, в ходе которого вырезаются участки, транскрибированные с интронов (их доля может достигать 90% от пре-мРНК), а кодирующие участки сшиваются в единую нить, образуя зрелую мРНК. Вырезанные участки пре-РНК подвергаются ферментативному расщеплению и в цитоплазму не поступают. Вырезание "лишних" участков имеет место и у транскриптов транспортных и рибосомных РНК (тРНК и рРНК) при их биосинтезе.

5.3.2. Естественные процессы изменения генетической информации

Биологическая эволюция непременно связана с изменением наследственной информации организмов. В естественных условиях оно, прежде всего, обусловлено спонтанным возникновением точковых

мутаций и хромосомных перестроек: выпадением участков хромосом (делеции), удвоением (дупликация) или умножением (амплификации) числа отдельных генов или их групп, вставками участков хромосом в новые места (транспозиции), обменом участками между хромосомами (транслокации). Отмеченные мутации носят ненаправленный характер, тем не менее, они дают материал для последующего отбора. В результате могут появляться микроорганизмы с полезными или улучшенными свойствами. Скорость появления мутаций увеличивают, используя искусственные мутагены (радиацию, УФ-облучение, химические вещества).

В природе существуют и другие пути получения микроорганизмов с измененным геномом, основанные на обмене генетической информацией. Прежде всего, генетический обмен между клетками осуществляется с помощью внехромосомных генетических элементов – плазмид, которые встречаются обычно в кольцевой (реже в линейной) двухцепочечной формах. Перенос генетической информации от клетки-донора к клетке-реципиенту может осуществляться путем конъюгации при непосредственном контакте клеток между собой. Аналогичная передача ДНК от клетки к клетке осуществляется посредством трансдукции с участием бактериофага. Гены могут также передаваться из клетки в клетку без непосредственного контакта их и без каких-либо переносчиков. Трансформирующая (донорная) ДНК, высвобожденная в результате спонтанного лизиса части клеток популяции, адсорбируется и поглощается некоторыми (компетентными) клетками и включается в их геном. Кроме того, генетическую информацию могут переносить транспозоны – дискретные сегменты ДНК, способные к самостоятельному перемещению в пределах одного генома или из одного генома в другой.

При исследовании взаимодействий, связанных с операциями на нуклеиновых кислотах (ДНК, РНК), которые имеют место в мире микроорганизмов, был выявлен целый ряд биологических нанотехнологий, которые в адаптированном виде используются в генетической инженерии. Так, нашли широкое применение ферменты рестриктазы, с помощью которых в естественных условиях бактерии выводят из строя ДНК бактериофагов; лигазы, сшивающие фрагменты молекул ДНК; ДНК и РНК-полимеразы; прямая и обратная транскриптазы; плазмиды и т.д.

5.3.3. Генетическая инженерия

Академик А.А. Баев под генетической инженерией понимает конструирование *in vitro* функционально активных генетических структур – рекомбинантных ДНК. Это конструирование носит целенаправленный характер, а введение рекомбинантной ДНК в геном реципиента создает новый организм или модифицирует существующий. Область применения генноинженерных технологий в настоящее время существенно расширилась по сравнению с тем временем, когда А.А. Баев давал определение генетической инженерии (1984 год), поэтому не все, что сейчас к ней относят, в буквальном смысле подходит под это определение.

Бактерии обладают высокой скоростью метаболизма и целым рядом эксплуатационных характеристик, отличающих их от культивируемых клеток эукариот. Поскольку генетический код у прокариот и эукариот един, а механизм биосинтеза белка сходен, то возникла идея внедрить ген эукариотического организма, ответственного за синтез конкретного белка, в геном бактерии и "заставить" ее вырабатывать этот белок. К числу последних относятся инсулин, соматотропин, интерфероны и др. В целом технология создания организмов, несущих рекомбинантную ДНК, достаточно стандартна, различия касаются лишь конкретных случаев.

Прежде всего, необходимо получить ген, который предназначен для переноса. Этот ген (трансген) можно выделить из генома организма-донора, взять из геномной библиотеки, синтезировать химическим или ферментативным путем. Обычно трансген выделяют из клеток эукариот, для которых характерно, как отмечалось выше, мозаичное строение, в отличие от структуры генов прокариот, куда он (трансген) переносится.

Прокариотический организм процессинг осуществить не может, и, следовательно, не сможет синтезировать белок, закодированный в трансгене эукариота. Это несоответствие устраняют следующим образом: выделяют из клетки-донора прошедшую процессинг, зрелую мРНК, с которой затем с помощью обратной транскриптазы (ревертазы) получают копию ДНК (кДНК). Ее можно переносить в клетку реципиента.

Следующий этап связан с механизмом переноса этой генетической информации в клетку, который осуществляют одним из двух путей: с помощью вектора или прямым введением.

Вектор – молекула ДНК (или РНК), которая переносит включенный в нее чужеродный ген в клетку, где он реплицируется. К числу векторов относят плазмиды, вирусы, транспозоны и др. Широкое распространение получило использование в качестве векторов плазмид. Плазида (как и другие векторы) должна обладать способностью к автономной репликации, иметь область, куда можно встраивать трансген, маркерные гены (позволяющие отличить трансформированные клетки от обычных) и соответствующий промотор, а также небольшой размер. Фермент рестриктаза в определенном месте разрывает ДНК плазмиды и в место разрыва с помощью другого фермента – лигазы – встраивается трансген.

Чтобы происходила транскрипция трансгена с плазмиды, необходимо наличие прокариотического промотора, стоящего перед ним. Для этой цели широко используются коммерческие бактериальные промоторы. Таким образом, вектор представляет собой генетическую конструкцию, которая помимо ДНК собственно плазмиды и трансгена содержит промотор и работающий маркерный ген, например, придающий клеткам устойчивость к антибиотикам или способность вырабатывать белки, светящиеся в УФ-лучах (репортерный ген). С помощью плазмид можно клонировать фрагменты ДНК размером не более 10 000 пар нуклеотидов (10 т.п.н.).

Конъюгативная плазида, содержащая трансген (химерная, или гибридная плазида) попадает путем конъюгации в бактерию и начинает реплицироваться в каждом новом поколении. Благодаря наличию маркеров отбирают клетки, содержащие трансген, затем осуществляют их клонирование с целью получения большого количества копий, которые путем транскрипции синтезируют белок, закодированный во введенном гене. Обычно эти процессы осуществляют в бактериальных клетках.

Прямой перенос генов в клетку осуществляют путем трансформации, трансдукции, трансфекции (введение ДНК, адсорбированной на кристаллах фосфата кальция, в клетку путем фагоцитоза), микроинъекции ДНК с помощью микроиглы и микроманипулятора (в клетку или ядро), путем упаковки ДНК в липосомы, которые сливаются с мембраной клетки, а также с помощью биологической баллистики. Последний метод заключается в том, что молекулы рекомбинантной ДНК напыляют на мельчайшие частицы золота (или вольфрама), которыми с помощью специальной генной пушки обстреливают клетку (и ее ядро). Прямой перенос генов производят в клетки эукариот (эм-

бриональные клетки животных, клетки культуры тканей, проростки и др.). Из полученных трансформированных клеток эукариот можно вырастить трансгенное растение или осуществлять культивирование этих клеток.

5.3.4. Области применения генетической инженерии

Традиционные методы создания организмов с полезными для человека свойствами основаны на селекции возникших естественным путем мутантов (скорость мутирования позднее стали искусственно увеличивать с помощью мутагенов), а также объединении в одном гибридном организме ряда полезных свойств, присущих по отдельности разным организмам. Однако скрещивание, дающее гибриды, способные приносить потомство, возможно лишь между представителями одного вида. Методы генетической инженерии позволили преодолеть этот установленный Природой барьер и создавать генетические химеры, объединяя в одном организме фрагменты геномов представителей не просто разных видов, но и царств.

Во многих лабораториях мира проводятся всевозможные работы в области генетической инженерии. Одни из них направлены на решение фундаментальных проблем биологии, другие преследуют чисто практические цели, третьи стремятся показать безграничные возможности генетической инженерии по удовлетворению стимулируемых рекламой непрерывно растущих, часто надуманных потребностей людей, например, получение розы синего цвета или хлопка с окрашенным "на корню" волокном. Многие примеры из этой категории проблем носят характер декларации о намерениях, призванных лишь вызвать интерес к генетической инженерии.

Области, где генно-инженерные исследования действительно могут принести реальную пользу – медицина и сельское хозяйство. Однако, поскольку эти области относятся к числу жизненно важных, напрямую связанных с организмом человека, внедрение достижений генетической инженерии должно быть чрезвычайно осмотрительным, учитывающим весь комплекс возможных последствий.

В медицине рекомбинантные ДНК (порою полученные путем химического синтеза и не встречающиеся в природе) используются при лечении и диагностике болезней.

Из веществ, используемых в лечебных целях, можно назвать полученные с помощью генно-инженерных методов инсулин (гормон поджелудочной железы, регулирует углеводный обмен и поддержи-

вает нормальный уровень сахара в крови), соматотропин (гормон роста, секретируется передней долей гипофиза), интерфероны (факторы устойчивости к инфекционным заболеваниям), соматостатин (гормон гипоталамуса, подавляет выделение инсулина и соматотропина), β -эндорфин (опиоидный пептид, оказывает модулирующее влияние на передачу нервных импульсов в ряде отделов ЦНС), антитела, вакцины (включая съедобные), факторы свертывания крови и др. Серьезные перспективы имеют работы в области генетической терапии (генотерапии) – лечении наследственных заболеваний человека. Не менее важной проблемой является использование трансгенных животных как источника органов для пересадки человеку. Удобным донором по ряду причин является свинья, у которой "нокаутированы" (выключены) гены гистонесовместимости, а вместо них введены гены гистосовместимости. Работы в этой области ведутся.

Полимеразная цепная реакция. Генно-инженерные технологии применяются и при создании методов диагностики заболеваний. Широко применяется метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), а в последнее время – биологические микрочипы (биочипы).

Для того, чтобы выявить возбудителя инфекционного заболевания, его часто требуется получить в достаточном для анализа количестве. Для этого его выращивают на питательной среде.

Так, отдельную микробную клетку, упавшую из воздуха на питательную среду в чашке Петри, практически невозможно обнаружить даже с помощью микроскопа, а колония, которая из нее вырастет, становится видимой невооруженным глазом. Вирусы выращивают в живых клетках организмов, например, в курином эмбрионе или культуре клеток. В методе ПЦР выращивают достаточное для анализа количество не опасных возбудителей болезни, а специфических безопасных фрагментов их ДНК. Для этого после расшифровки нуклеотидной последовательности ДНК возбудителя заболевания синтезируют небольшие последовательности, ограничивающие специфический участок ДНК. В специальном приборе – термоциклере (амплификаторе) в среду, содержащую ничтожное количество ДНК возбудителя заболевания вводят эти ограничивающие участки (праймеры), набор из четырех типов нуклеотидов и термостабильную ДНК-полимеразу. После этого последовательно, в несколько этапов осуществляют амплификацию – получение огромного количества (достаточного для анализа) копий специфического участка ДНК (вместе с ограничивающими его праймерами).

Биочипы являются одним из наиболее быстро развивающихся экспериментальных направлений современной биологии. Один из конструктивных вариантов биочипа представляет собой небольшую пластинку (матрицу) размером с почтовую марку, изготовленную из стекла или пластика. На нее нанесены с помощью специального робота микрокапли геля, в которых иммобилизованы молекулы, способные специфически взаимодействовать с молекулами пробы. Плотность расположения таких капель (микрозондов) на пластинке ("платформе") – 10-30 на 1 квадратный миллиметр.

На рис. 5.7 показан принцип действия зонда олигонуклеотидного биочипа. В гелевой микрокапле иммобилизованы фрагменты одноцепочечной ДНК, состоящие из последовательности нуклеотидов АГТЦ. Обычно молекулы анализируемой пробы метят флуоресцентным красителем, который начинает светиться только при полном соединении этой молекулы с тестом (молекулами, иммобилизованными в микрокапле геля). Если в пробе, содержащей одноцепочечную ДНК или олигонуклеотиды, имеется участок ТЦАГ, комплементарный АГТЦ, образуется дуплекс и возникает свечение (рис. 5.7).

Таким способом можно осуществлять секвенирование фрагментов ДНК, которое после соответствующего анализа позволяет установить полную нуклеотидную последовательность ДНК. Для этой цели, в частности, был изготовлен гексамерный олигонуклеотидный микрочип, содержащий 4096 разных микрозондов ($4^6 = 4096$; 4 – число нуклеотидов – А, Г, Ц, Т; 6 – число нуклеотидов в зонде), расположенных в строго определенном порядке. Для количественного анализа (регистрации светящихся зондов) был изготовлен чип-детектор, состоящий из флуоресцентного широкопольного высокотемпературного микрочипа, соединенного с видеокамерой и компьютером, и разработано программное обеспечение. Чип-детектор работает в автоматическом режиме.

Этот метод по характерному набору олигонуклеотидных зондов позволяет обнаруживать в пробе отдельные гены, выявлять в них мутации. Он позволяет работать и с молекулами РНК.

Кроме нуклеиновокислотных биочипов разработаны и белковые биочипы (содержащие ферменты, антитела, антигены и т.д.), которые облегчат исследования в области протеомики (наука о белках).

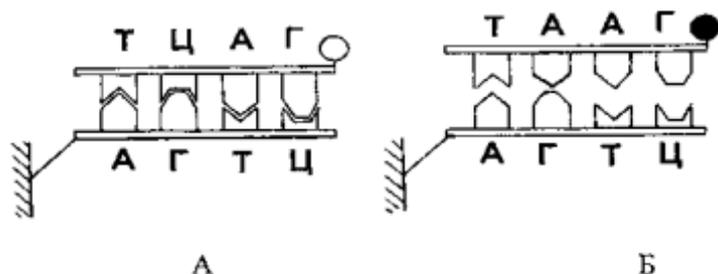


Рис. 5.7. *Схема связывания фрагментов ДНК на биочипе.*

Олигонуклеотид фиксирован на одном из элементов биочипа и избирательно связывает из многих флуоресцентно меченых фрагментов ДНК только полностью комплементарный, который начинает светиться (А). Присутствие некомплемментарной пары (А-Г) предотвращает взаимодействие и оставляет элемент биочипа темным (Б)

Широкое применение биочипы находят в медицине для диагностики инфекционных и наследственных заболеваний, выявления рака. Так, один-единственный биочип может выявить все известные на сегодняшний день формы возбудителя туберкулеза, а также определить, каким именно антибиотиком нужно лечить конкретную форму. И определяется это не за несколько недель, как традиционным способом, а в течение нескольких суток.

Если гены присутствуют в геноме в количестве одной или нескольких копий, требуется их предварительная амплификация, как это делается в ПЦР-анализе. Разработан метод, при котором амплификация происходит исключительно в гелевых элементах биочипа.

Идея создания биочипа пришла в голову практически одновременно трем ученым – в Британии, Югославии и СССР. Югославские и английские ученые идею до реального продукта не довели, удалось это лишь нашим ученым во главе с директором института молекулярной биологии, академиком Андреем Дарьевичем Мирзабековым, которые создали и довели до практического использования “русский биочип”, как его называют за рубежом.

В растениеводстве усилия генобиотехнологов направлены, прежде всего, на улучшение эксплуатационных характеристик культурных растений. Тем из них, которые выращивают в неблагоприятных условиях, с помощью генно-инженерных методов вводят гены

растений, обладающих устойчивостью к действию этих неблагоприятных факторов среды. Так получают растения, устойчивые к засухе, жаре, повышенному засолению почвы, морозам, а также к вредным насекомым. Чтобы создать такие сорта растений, необходимо предварительно четко установить механизм соответствующей устойчивости и выявить ген или гены, от которых она зависит в растении-доноре, а затем совершить стандартные процедуры переноса их в растение-реципиент. В этом и состоит принципиальное отличие целенаправленной работы генетических конструкторов от случайного появления полезных мутаций в естественных условиях.

Приходится создавать сорта растений, устойчивых и к антропогенным факторам, в частности к гербицидам, которые в сельском хозяйстве применяют для борьбы с сорняками.

Ведутся генно-инженерные работы по регулированию сроков созревания овощей и фруктов, увеличению времени их хранения, повышению эффективности фотосинтеза, биологической азотфиксации, изменению пищевой ценности растений, в частности, улучшению аминокислотного состава белков зерновых культур. Большое облегчение в работе с растениями связано с их тотипотентностью, когда из трансгенной соматической клетки можно вырастить целое растение.

При работе с клетками животных чужеродную ДНК вводят в культивируемые соматические клетки или в половые клетки. В первом случае геномодифицированные клетки используют для получения, например, ДНК-вакцины (некоторых вирусных антигенов). В случае получения трансгенных животных генетическая конструкция часто вводят в эмбриональные стволовые клетки (ЭСК). Когда число бластомеров эмбриона не превышает восьми, они являются недифференцированными и обладают свойством тотипотентности, то есть каждый из них может дать начало новому организму, выращенному в утробе суррогатной матери. Можно вводить чужеродную ДНК и в сперматозоиды, а затем производить ими оплодотворение.

Трансгенные животные применяют, прежде всего, для моделирования различных генетических болезней и поиска путей их лечения (генотерапия). Кроме того, трансгенные животные могут быть использованы в качестве своеобразных биореакторов, например секретирующих в молоко гормоны, ферменты, моноклональные антитела, сывороточный альбумин (используется при операциях) и др.

Генетическая инженерия позволяет получать фантастические результаты, которые могут пойти как на пользу людям, так и причи-

нить им вред. Применение последних может вступить в конфликт с существующими нормами морали. Это обстоятельство необходимо обязательно учитывать при решении вопроса о внедрении в жизнь той или иной генно-инженерной разработки.

5.4. Морфогенетические наноструктуры

Информационные биомакромолекулы. Исходная биологическая информация, приобретенная организмами в процессе эволюции, хранится в молекулах ДНК и через них же передается потомству. Кодирована она с помощью триплетного кода, образованного мономерными элементами – нуклеотидами. Белковые (полипептидные) молекулы в период возникновения жизни, по-видимому, тоже обладали матричными свойствами, и, согласно мнению ряда ученых, на них происходила сборка полинуклеотидов. Поэтому не исключено, что и в настоящее время отдельные группы белков являются промежуточными носителями морфогенетической информации, полученной от молекул ДНК. Однако информация не имеет биологического смысла, если отсутствует (или не работает) механизм ее реализации. Функцию передачи и реализации генетической информации в биосистемах выполняют наноразмерные элементы – биомакромолекулы.

Цитоскелет. Наноразмерные элементы образуют опорно-двигательную систему (цитоскелет) эукариотических клеток, который в первой половине XX века некоторые ученые принимали за аналог нервной системы простейших. Цитоскелетные структуры представлены нитевидными, неветвящимися белковыми комплексами (филаментами). Существует три системы филаментов, которые различаются по ультраструктуре, химическому составу и функциональному назначению. Самые тонкие из них с диаметром около 6 нм состоят в основном из белка актина и называются микрофиламентами. Самые толстые фибриллы с диаметром 25 нм, состоящие из белка тубулина, называются микротрубочками. Третья группа представлена промежуточными филаментами с диаметром около 10 нм, которые образованы разными, но родственными белками. Эти элементы встречаются во всех без исключения эукариотических клетках. Все три группы филаментов нестабильны, способны к полимеризации и деполимеризации, что может приводить к некоторой подвижности, в частности проявляющейся в изменении формы клетки. Все филаменты обладают специфическими свойствами, однако особый интерес в последнее время исследователи проявляют к микротрубочкам. Тубулины, из ко-

торых они состоят, при полимеризации образуют полые трубки, давшие им соответствующее название. Молекула тубулина состоит из двух разных субъединиц: α -тубулина и β -тубулина, соединенных между собой, то есть представляет гетеродимер, обладающий полярностью. При полимеризации, идущей с затратой энергии ГТФ, образуются протофибриллы, также обладающие полярностью. Тринадцать протофибрилл, соединяясь боковыми поверхностями, образуют микротрубочку, полярные свойства которой проявляются в том, что на одном конце (плюс-конце) происходит присоединение гетеродимеров тубулина (с участием ГТФ), а на другом (минус-конце) – их диссоциация. В составе микротрубочек обнаружены ассоциированные с тубулинами MAP-белки (microtubule-associated proteins), которые стабилизируют микротрубочки и ускоряют полимеризацию тубулина. Полагают, что микротрубочки выполняют скелетную и двигательную функции.

Наблюдения за поведением фибробластов и эпителиальных клеток (эпителиоцитов) в условиях *in vitro*, длительное время проводившиеся профессором МГУ Ю.М. Васильевым, дали ему основание в одной из своих работ назвать цитоскелст разумным, организующим целесообразные реакции клетки в ответ на различные ситуации. Он отметил наличие у клеток кратковременной и долговременной памяти, которую связал с работой микротрубочек. С другой стороны, ученый из Томского научного центра СО РАН Е.Е. Слядников теоретически доказал, что микротрубочки в силу полярности молекул тубулинов обладают способностью запоминать, хранить и перерабатывать огромное количество информации. Молекулы тубулина могут находиться в двух (может быть, в трех) конформационных состояниях в зависимости от того, куда переместится свободный электрон из центра гетеродимера, то есть они являются двоичными элементами микротрубочковой информационной системы. Микротрубочки обладают способностью к распознаванию образов и представляют собой квантовые процессоры, сформированные из тубулиновых базовых элементов. Это, по-видимому, и является причиной целесообразного ("разумного") поведения клеток, о котором говорил Ю.М. Васильев.

У микротрубочек имеется еще одна функция – они являются своего рода транспортными коммуникациями с односторонним движением, по которым транспортные белки (динеины и кинезины) могут перемещать различные внутриклеточные структуры (митохондрии, лизосомы, хромосомы, секреторные вакуоли и др.). Микротру-

центра к периферии (рис. 5.8).

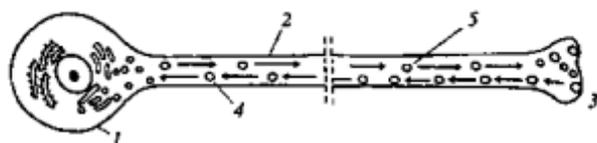


Рис. 5.8. Схема движения частиц в аксоне: 1 – тело нейрона; 2 – аксон; 3 – нервное окончание; 4 – ретроградный транспорт; 5 – антероградный транспорт [6 гл. 2]

Локомоторные белки, подобно шаговым электродвигателям, которые применяются в исполнительных устройствах компьютеров, осуществляют прерывистое движение своих "грузов", осуществляемое с затратой энергии АТФ. Кинезины перемещаются в направлении плюс-конца, к периферии (антероградный транспорт), динеины осуществляют ретроградный транспорт, направленный к центру клетки (рис. 5.9).

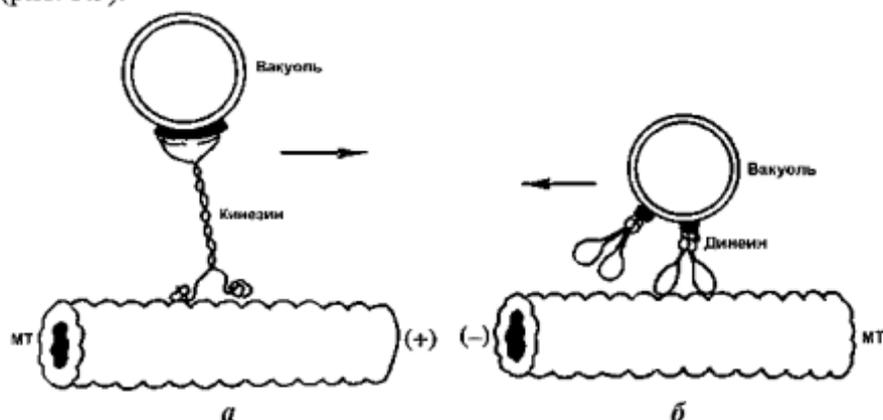


Рис. 5.9. Внутриклеточное перемещение вакуоли с помощью кинезина (а) и динеина (б); МТ – микротрубочка [6 гл. 2]

Моторные белки обычно обладают специфичностью по отношению к транспортируемым частицам. Таким образом, в клетке имеется напоминающая железнодорожное сообщение транспортная система, осуществляющая четкую, с точностью до шага локомоторного белка, доставку корпускул в нужное место. Эта транспортная система контролируется микротрубочковыми квантовыми процессорами, кото-

рыс, с одной стороны, обеспечивают требуемую форму клетки, с другой – соответствующее расположение в ней органелл, то есть осуществляют морфогенез клетки (цитоморфогенез).

Естественно, возникает вопрос об участии генетической информации, которая содержится в молекулах ДНК, в этих процессах. Известно, что компоненты ЦОМТ – центриоли, в интерфазных клетках связаны с помощью промежуточных филаментов с ядерной мембраной и ядром. Не исключено, что морфогенетическая информация каким-то неизвестным сейчас способом перекодируется и через промежуточные филаменты передается в ЦОМТ, а от него – микротрубочкам, которые реализуют ее.

Коллаген. У *Metazoa*, как отмечал известный онтофизиолог В.Н. Никитин с сотр., важную роль в морфогенезе играет соединительная ткань, прежде всего вырабатываемые ее клетками коллаген и углеводно-белковые комплексы. Многие факты указывают на то, что молекулы коллагена, помимо традиционно признаваемой опорной функции, принимают активное участие в формировании органов. Молекула коллагена состоит из трех спирально закрученных цепей и, в отличие от глобулярного тубулина, имеет фибриллярное строение. Первичная структура молекулы коллагена, за исключением коротких концевых участков, представлена чередующимися трипептидами, которые начинаются остатком глицина. Остальная часть каждого триплета состоит из всевозможных сочетаний двух аминокислотных остатков, что наводит на мысль о не только опорной (механической) функции коллагена, но и информационной, где кодонами являются триплеты (реально – дуплеты) аминокислотных остатков. Первичная структура длинных цепей (приблизительно 1000 аминокислотных остатков каждая) кодирует морфогенетическую информацию, исходно заданную основным носителем генетической информации – молекулами ДНК.

Не исключено, что коллагеновые молекулы, используя свою триплетную информацию, формируют трехмерный каркас, к различным кодовым участкам которого, напоминающим «штрих-код», перемещаются соответствующие специализированные клетки. Важную роль в морфогенезе, по-видимому, играют углеводно-белковые компоненты основного вещества соединительной ткани (гликопротеиды), которые за счет белок-белкового взаимодействия связываются с соответствующими кодирующими участками коллагена. Углеводная часть гликопротеидов, в частности, относящихся к группе лектинов,

обладает высокоспецифическими рецепторными свойствами и выполняет функции узнавания при взаимодействии со специализированными клетками, из которых строятся органы. Между собой клетки связываются с помощью тканеспецифических факторов агрегации (гликопротеинов, протеогликанов) в присутствии ионов кальция и магния. Строение информационного коллагенового каркаса находится под постоянным контролем морфогенетической информации ДНК и в ходе онтогенеза изменяется.

Следует отметить, что морфогенез *Metazoa*, как и других, более низких уровней организации биосистем, происходит с широким участием механизмов самоорганизации, включающих взаимное узнавание и адгезию (слипание) структур, из которых формируются трехмерные системы.

Таким образом, биологические информационные системы (БИС), по-видимому, могут иметь разную химическую природу и состоять из молекул нуклеиновых кислот, белков, углеводов, выполняющих как функцию хранения информации, так и ее реализации (например, информационная РНК хранит информацию, а рибосомная РНК – ее реализует, являясь компонентом рибосомы).

Приверженцы гипотезы квантово-статистической природы человеческого создания считают, что в нейронах мозга подходящими субъектами для "квантово-статистических вычислений" являются информационные белковые нанополимеры – микротрубочки цитоскелета (С. Хамерофф, Р. Пенроуз и др.). В этом случае работа нервной системы со своими механизмами кодирования информации также базируется на макромолекулярных элементах.

Знание кодов БИС и механизмов реализации информации в будущем позволит решить сложные медицинские проблемы. Появится реальная возможность конструировать искусственные информационные системы под конкретные цели, как, например, это делается при химическом синтезе генов-носителей информации о структуре несуществовавших ранее белков. Более того, молекулярные носители биологической информации со временем можно будет использовать в качестве базовых элементов при создании нанокomпьютеров.

5.5. Биосенсоры

Слаженное протекание внутриклеточных процессов связано не только с четким следованием исполнительных структур клетки управляющим воздействиям, но и работе обратной связи, несущей центру информацию о реальном результате управления и корректирующей его. Так, при избыточном накоплении на конечном участке цепи последовательно работающих ферментов метаболита, он связывается с аллостерическом центром стоящего в начале цепи фермента, изменяет его конформацию, что ведет к снижению активности (или полному выключению) данного фермента. Это наиболее примитивная сенсорная (чувствующая) система, в которой белковая система (аллостерический фермент) меняет свою структуру и поведение в ответ на изменение конкретного фактора окружающей среды.

Чрезвычайно важным для формирования целесообразного поведения одноклеточного организма или *Metazoa* является получение информации о состоянии внешней среды. Задача решается с помощью встроенных в цитоплазматическую мембрану рецепторных белковых молекул R (рис.5.10). Когда рецепторная, в данном случае седомежная молекула R, активируется изменением какого-то фактора S внешней среды, она претерпевает конформационные изменения. Последние детектируются (обнаруживаются) гетеротримерными G-белками, связанными с мембраной, которые, в свою очередь, активируют эффекторные молекулы E в мембране (ферменты, ионные каналы и др.). Часто это ведет к выделению в цитозоль вторичного мессенджера M.

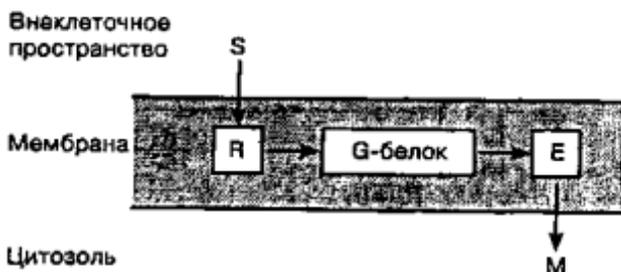


Рис. 5.10. Работа мембранной сигнальной системы [8]

Например, эффектор – аденилатциклаза катализирует формирование вторичного мессенджера – цАМФ, который активирует цАМФ-зависимую протеинкиназу, осуществляющую фосфорилирование

различных белков: ферментативных, мембранных, рибосомных, хроматиновых. В результате могут возникнуть самые разнообразные изменения в метаболизме клетки. В частности фосфорилирование белков хроматина оказывает влияние на транскрибирование генов, контролируя тем самым скорость синтеза ферментов и других белков.

Существует великое множество рецепторных систем наноразмерного уровня, воспринимающих самые различные сигналы.

У *Metazoa* информационный процесс начинается с восприятия сигнала рецептирующими системами. Сам процесс восприятия сигнала, обработка его и посылка к исполнительной системе связаны с кодированием (шифрованием) информации. Это происходит уже на уровне отдельной нервной клетки, которая функционирует одновременно как кодирующая и декодирующая (расшифровывающая) система.

Помимо познавательного интереса в отношении исследования строения и работы сенсорных систем актуальным является бионический аспект – использование этих наноразмерных, высокочувствительных датчиков для регистрации различных физических и химических агентов.

5.6. Транспортные системы мембран

В большинстве случаев транспорт веществ через мембрану в клетке осуществляется с участием белковых молекул.

При пассивном транспорте некоторые мембранные белки образуют молекулярные комплексы – каналы. Через них за счет простой диффузии растворенные молекулы поступают в клетку или выходят из нее. Некоторые из этих каналов открыты постоянно, другие могут закрываться или открываться в ответ на связывание с сигнальными молекулами или изменение концентрации ионов внутри клетки. Так, в частности, работает холинорецептор, управляющий трансмембранным каналом. Он функционирует без участия G-белка, по принципу самостоятельного канала. Пять его гликопротеиновых субъединиц (2 α -, 1 β -, 1 γ - и 1 δ -субъединицы) образуют канал диаметром 2 нм, проницаемый для ионов натрия, калия, кальция и некоторых органических катионов (рис. 5.11). Рецептор (и, соответственно, канал) может находиться в трех состояниях: покоя (канал закрыт), активированном (канал открыт) и десенсibilизированном (канал закрыт). Активация канала осуществляется связыванием рецептора с ацетилхолином (агонистом) и протекает в течение миллисекунд. Переход из одного состояния в другое, по-видимому, сопровождается существенными конформационными изменениями субъединиц.

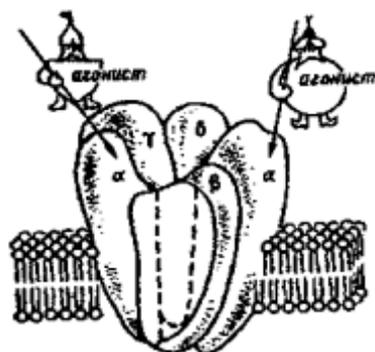


Рис. 5.11. Структура холинорецептора [12]

Перенос веществ по механизму облегченной диффузии также протекает с участием белков-переносчиков (пермеаз). Предложены модели вращающегося переносчика и трансляции (рис. 5.12).

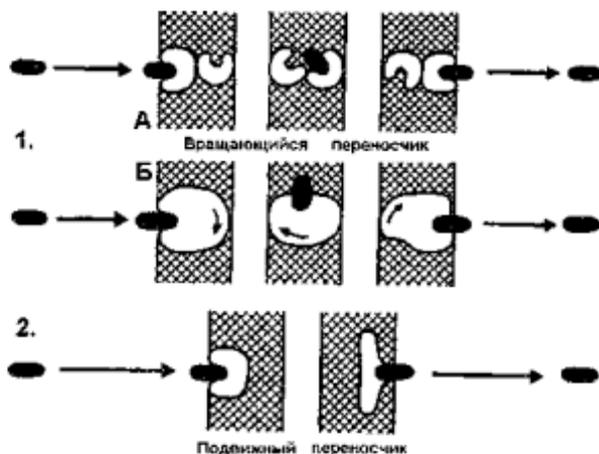


Рис. 5.12. Модели работы пермеаз по механизму вращающегося переносчика (1А и 1Б) и трансляции (2) [13]

Общей чертой этих моделей является последовательность стадий узнавания субстрата, его связывания с белком-переносчиком, переноса через мембрану и освобождения от переносчика.

Активный трансмембранный транспорт осуществляется с затратой энергии, так как происходит перенос ионов из области с низкой

концентрацией их в область с высокой концентрацией. Ионный транспорт осуществляется транспортными АТФ-азами, которые часто называют ионными насосами. Так, (K^+/Na^+) -насос представлен двухсубъединичной белковой молекулой, находящейся в плазматической мембране (рис. 5.13).

При работе он за один цикл откачивает из клетки три иона натрия и закачивает в нее два иона калия. При этом затрачивается одна молекула АТФ, идущая на фосфорилирование АТФ-азы, в результате чего ион натрия переносится через мембрану из клетки, а ион калия получает возможность связаться с белковой молекулой и затем переносится в клетку (антипорт). Сходным образом с помощью мембранных насосов происходит регуляция в клетке концентрации ионов магния и кальция.

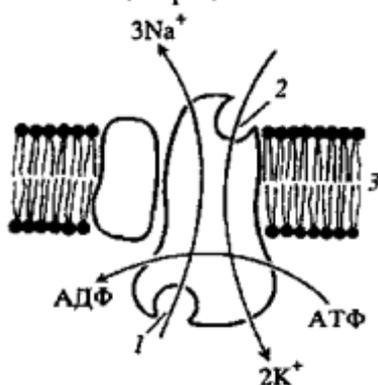


Рис. 5.13. Схема работы (K^+/Na^+) -насоса: 1 – участок связывания Na^+ ; 2 – участок связывания K^+ ; 3 – мембрана [2 гл. 6]

Еще более сложное строение имеет обратимая протон-транслоцирующая АТФ-аза (H^+ -АТФ-аза). Она представляет собой мембраносвязанные комплексы, состоит из двух частей: каталитической (F_1), которая диссоциируется с мембраны, может функционировать только как АТФ-аза, и мембранной (F_0), обладающей протон-транслоцирующей активностью (рис. 5.14).

F_1 адсорбируется на поверхности мембраны, взаимодействуя с гидрофобной частью F_0 , полностью погруженной в мембрану. Считают, что F_0 представляет собой тот канал, по которому протоны поступают к активному центру АТФ-азы. F_0 состоит из трех видов субъединиц (а, б, в). Формула F_1 (в порядке уменьшения их молекулярной массы) – $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$,

$F_0 - a_1b_2c_{6-10}$. Только полный комплекс F_1-F_0 способен осуществлять преобразование энергии, то есть реакции, связанные с переносом энергии через мембрану. В митохондриях за счет энергии переноса протонов через мембрану происходит синтез АТФ с участием АТФ-азы из АДФ и неорганического фосфата. В этом случае фермент выступает в роли АТФ-синтетазы. Расщепление АТФ с участием этого же фермента осуществляет перекачивание протонов через мембрану в обратном направлении (во внутреннее пространство). В этом проявляется обратимость функционирования H^+ -АТФ-азы.

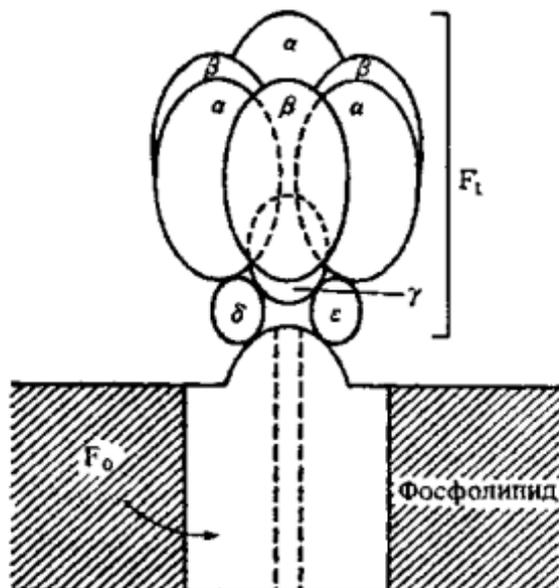


Рис. 5.14. Структура H^+ -АТФ-азы: $\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon$ – субъединицы F_1 ; α, β образуют насос, γ, δ, ϵ – образуют ворота; F_0 – канал [14]

5.7. Механохимические системы

К работающим молекулярным "машинам" относятся также ферменты и белковые макромолекулы, обеспечивающие разнообразные механические функции. В основе их работы лежат конформационные изменения макромолекул. Молекулярные механизмы сокращения мышц и регуляция их работы описаны в общеизвестных литературных источниках [16]. Большой интерес представляет строение и работа локомоторного аппарата бактерий. Ее движущее устройство напо-

минает колесо, которое признается гениальным творением человеческого разума. Каждая клетка *E.coli* имеет 4 жгутика, вращательные движения которых позволяют клетке перемещаться. В основании жгутика, расположенном на клеточной стенке и мембране, имеется "колесо" – кольцо из 16 молекул белков в мембране, противостоящее сходному кольцу в клеточной стенке (рис. 5.15).

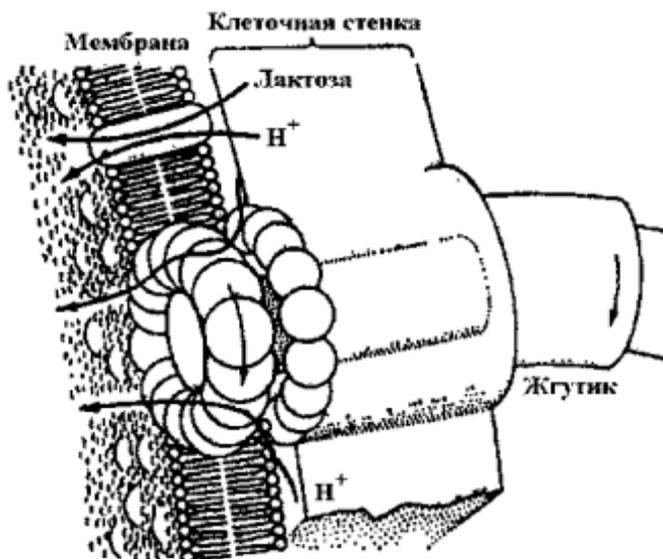


Рис. 5.15. Схема движущего устройства *E.coli* [17]

Вращение жгутика в результате вращения кольца, подобного шарикоподшипнику, происходит за счет энергии, выделяющейся при переносе протонов внутрь клетки [17].

В заключение следует отметить, что успехи БНТ в будущем смогут коренным образом изменить медицину. Прогнозируется создание нанороботов-врачей, которые будут перемещаться с током крови и даже попадать внутрь клеток, чтобы предотвращать их повреждение и устранять появившиеся дефекты, а, в конечном счете, обеспечить физическое бессмертие человека. В частности, если предложенная автором модель морфогенеза с участием коллагенового информационного каркаса подтвердится в эксперименте, наномедицина сможет эффективно корректировать строение органов и форму тела человека, а также предотвращать и лечить онкологические болезни.

Глава 6. ПРОЦЕССЫ И АППАРАТЫ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДСТВ

6.1. Классификация биотехнологических процессов

Центральным процессом любого биотехнологического производства являются биохимические реакции, то есть химические реакции, протекающие с участием отдельных ферментов или их комплексов, работающих в составе живой клетки. В связи с этим, вся аппаратура биотехнологических производств, от биохимического реактора, до устройств, обеспечивающих вспомогательные операции, имеет много общего с аппаратами химической и нефтехимической технологии. Более того, многие аппараты химической технологии без каких-либо переделок используются в биотехнологических производствах. То же самое можно сказать и о процессах, протекающих в биотехнологических аппаратах. Поэтому классификация процессов и аппаратов, принятая в химической технологии, почти без изменения может быть перенесена на биотехнологию.

Конечно, биотехнологические процессы имеют свои особенности, что сказывается на конструкции отдельных аппаратов, прежде всего биохимических реакторов. Биотехнологические процессы, в большинстве своем, требуют стерильных условий, протекают при более мягких температурных режимах, сравнительно невысоких давлениях, в малоагрессивных средах.

В основе классификации биотехнологических процессов лежат кинетические закономерности, в соответствии с которыми эти процессы подразделяются на пять групп:

- биохимические,
- гидромеханические,
- тепловые,
- массообменные,
- механические.

В соответствии с этой классификацией на пять групп подразделяются и аппараты, в которых реализуются биотехнологические процессы.

6.2. Биотехнологические реакторы

6.2.1. Устройство и работа биореакторов

Под биохимическим реактором (биореактором) понимают такой аппарат, в котором проводится биохимическая реакция с целью получения определенного продукта на основе использования микроорга-

низмов, клеток многоклеточных организмов или ферментов (растворенных и иммобилизованных). В отношении названия этих аппаратов нет единой терминологии, их называют также ферментаторами, культиваторами. Классификация их осуществляется по разным параметрам.

Поскольку о самих процессах, протекающих в биореакторах, и их кинетике было сказано ранее, кратко остановимся на устройстве и работе этих аппаратов.

В зависимости от осуществляемых в ферментаторах процессов, они подразделяются на:

- аэробные и анаэробные;
- периодические и непрерывные;
- стерильные и нестерильные;
- глубинные и поверхностные;
- аппараты с гомогенной и гетерогенной реакционной средой, и др.

Поскольку в биореакторе, помимо биохимических реакций, имеют место процессы массо- и теплообмена, как правило в них осуществляется перемешивание реакционной среды. По типу перемешивания биореакторы разделяют на аппараты с механическим и пневматическим перемешиванием.

По конструктивному исполнению биореакторы подразделяются на аппараты:

- 1) периодического действия;
- 2) емкостного типа непрерывного действия, с мешалками;
- 3) трубчатые;
- 4) с псевдооживлением.

Биореактор периодического действия представляет собой емкость, которая одновременно заполняется исходными веществами (например, раствором субстрата и микроорганизмами) и освобождается после практически полного превращения субстрата в продукт. С помощью теплоносителя (обычно воды), подаваемого в кожух биореактора, а также работы мешалки, в реакционном объеме поддерживается задаваемая температура. Если процесс аэробный, то в аппарат подается воздух (рис. 6.1а).

Перемешивание и снабжение кислородом может осуществляться с помощью барботажно-эрлифтного (газлифтного) механизма (рис. 6.1б). В центре аппарата располагается тяговая труба (1), в которую снизу подается барботированный (в виде пузырьков) воздух (2). Под-

нимаясь вверх, пузырьки увлекают за собой жидкость, которая, достигнув верха трубы, в дегазированной виде опускается к нижней кромке ее и вновь увлекается воздушными пузырьками вверх. Отработанный воздух сверху аппарата уходит наружу.

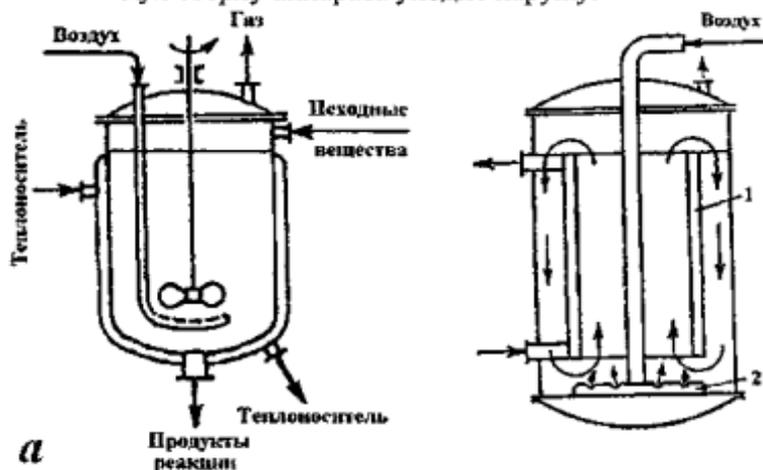


Рис. 6.1. Биореактор периодического действия с механической мешалкой и барботажом (а); барботажно-эрлифтный биореактор (б) [2]

Биореактор емкостного типа непрерывного действия с мешалкой в принципе напоминает ранее рассмотренный. Отличие состоит в том, что в него непрерывно подаются исходные вещества и в таком же количестве отбирается продукт реакции, при этом рабочий объем (заполненный реакционной смесью) остается неизменным (рис. 3.9 в гл. 3). Для выращивания дрожжевой биомассы часто используют биореакторы с барботажно-эрлифтным перемешиванием. На этих производствах нередко применяют не отдельные аппараты, а батареи последовательно соединенных биореакторов. Если питательная среда (S_0) подается только в первый биореактор, то батарея работает по однопоточной схеме (рис. 6.2а). Если же питательная среда подается в каждый аппарат, имеет место многопоточная система (рис. 6.2б).

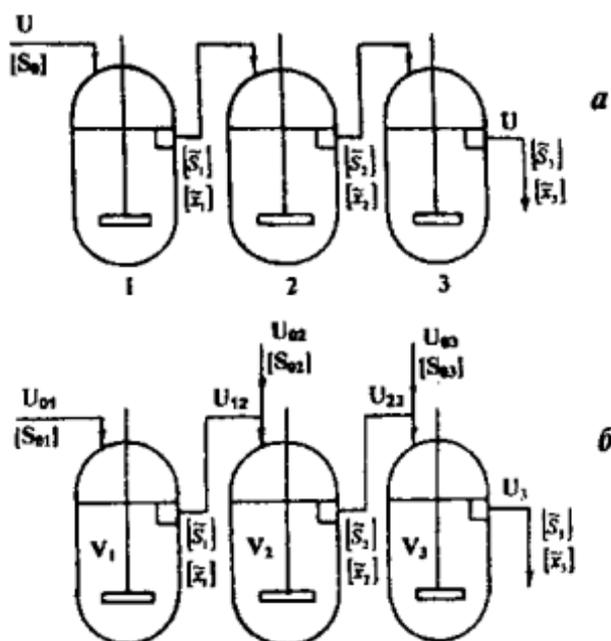


Рис. 6.2. Схема работы батареи биореакторов, включенных по однопроточной (а) и многопроточной (б) системе

Кинетика превращения субстрата в биомассу у однопроточной системы сходна с кинетикой тубулярного биореактора. При многопроточной системе резко снижается риск "вымывания" биомассы и повышается скорость ее образования.

Трубчатый биореактор является альтернативой рассмотренной батарее реакторов емкостного типа. Основным его элементом служит труба (колонна), разделенная на равные секции горизонтальными перфорированными (с отверстиями) перегородками (рис.6.3).

Биореактор предназначен для ведения биохимических процессов в аэробных условиях при подводе среды и воздуха совместным потоком к основанию колонны. Соотношение между жидкостью и газом отрегулировано так, что на каждой перегородке удерживается слой жидкости, а пространство над ним заполнено воздухом. Все объемы жидкости должны полностью перемешиваться, чтобы она передвигалась только от основания колонны к ее верху. В подобных условиях каждая секция биореактора работает как реактор непрерывного действия емкостного типа.

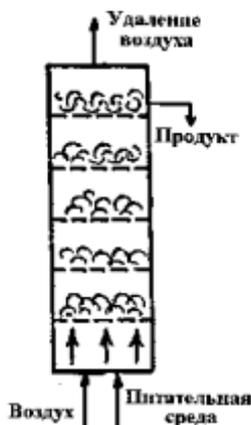


Рис. 6.3. Трубчатый биореактор (схема)

Микробная масса в биореакторе может находиться в виде свободно суспензированных в жидкой среде частиц или быть прикрепленной к соответствующим твердым поверхностям. Свободно суспензированные микроорганизмы часто образуют агрегаты (флокулы), размер которых на несколько порядков больше, чем размер одиночных организмов. Флокуляция, вероятно, генетически обусловлена (в частности, дрожжи подразделяются на флокулирующие и нефлокулирующие), хотя степень ее выраженности может быть усилена с помощью флокулирующих агентов, например хлоридов алюминия или кальция.

Механизм адгезии микроорганизмов к различным поверхностям полностью не выяснен, тем не менее практикой установлено, что они способны прикрепиться к некоторым "инертным" поверхностям, развиваясь в пленки, окутывающие эти поверхности. Толщина пленок, по-видимому, определяется главным образом теми же факторами, которые влияют на образование микробных флокул.

Биореакторы с псевдооживлением характеризуются тем, что жидкая питательная среда, поступающая с низа колонны, поддерживает флокулы микроорганизмов во взвешенном состоянии. Поскольку размер флокул в процессе роста увеличивается, то происходит их сепарация (разделение) по размеру. Снизу располагаются более крупные флокулы, сверху – мелкие. Эти биореакторы являются аппаратами башенного типа и широко применяются в технологии непрерывного получения пива (рис. 6.4). Отношение высоты колонны к ее диаметру приблизительно 10:1.



Рис. 6.4. Башенные биореакторы, применяющиеся в непрерывных процессах пивоварения

В гетерогенных многофазных системах наличие газовой фазы часто вызывает интенсивное образование пены, которая уменьшает рабочий объем реактора и скорость биохимических процессов, вызывает унос части ферментационной среды, замачивание фильтра на линии отходящего из реактора воздуха. Пенообразование усиливается присутствием в реакционной среде белковых веществ (в основном, продуктов метаболизма бактерий), обладающих свойствами поверхностно-активных соединений. Известны механические способы борьбы с пенообразованием, однако в силу их низкой эффективности в основном с ним борются путем добавления в реакционную среду пеногасителей (природные и минеральные жиры, высшие спирты, жирные кислоты и силиконы).

6.2.2. Управление ростом микробных популяций на протоке

Автоматизированный контроль и управление процессом, протекающим в биореакторе, имеет много общего с контролем и регулированием химико-технологических параметров на химическом производстве. Осуществляется измерение и регистрация параметров, влияющих на скорость биохимических процессов в реакторе. К числу контролируемых параметров относятся температура, pH среды, концентрация растворенного кислорода и др. (рис. 6.5).

На основании замеров осуществляется оптимальное управление работой реактора с использованием ЭВМ.

При работе биореактора в непрерывном режиме (на протоке) скорость роста биомассы можно регулировать с помощью разных ме-

тодов. Если культивирование микроорганизмов осуществляется со скоростями, близкими к максимальной удельной скорости роста (μ_{\max}) или равными ей, которым на кривой роста соответствует экспоненциальная фаза, целесообразно использовать турбидостат. В фазе замедленного роста используют хемостат, в котором при культивировании поддерживается на постоянном уровне концентрация лимитирующего фактора, обычно одного из субстратов (рис.6.6).

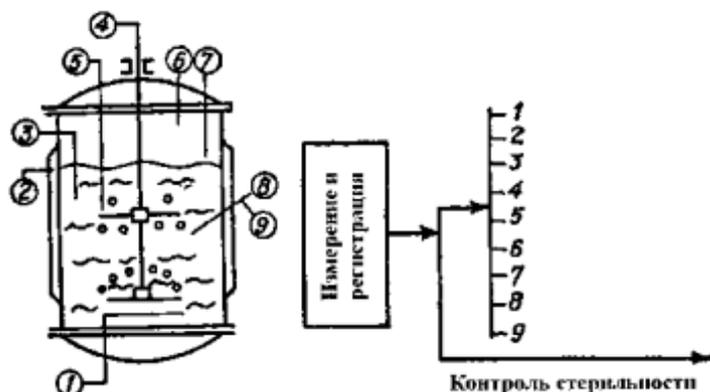


Рис. 6.5. Основные технологические параметры, контролируемые в биореакторе: 1 – интенсивность аэрации; 2 – температура; 3 – концентрация растворенного кислорода; 4 – интенсивность перемешивания; 5 – расход субстрата и продукта; 6 – состав газа; 7 – индикация пены; 8 – рН среды; 9 – реологические (вязкостные) свойства среды [2]

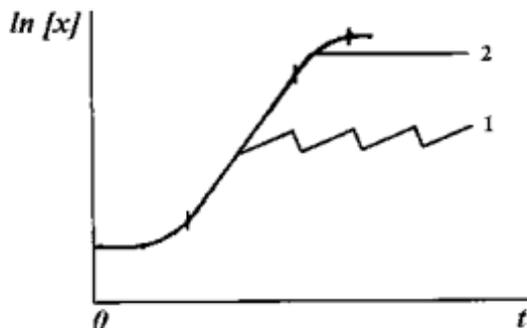


Рис. 6.6. Графики регуляции концентрации биомассы $[x]$ в хемостате (2) и турбидостате (1)

В турбидостате автоматически поддерживается на заданном уровне концентрация биомассы путем периодического включения насоса, подающего в реактор питательную среду (рис. 6.7).

Контроль за концентрацией биомассы (микроорганизмов) в реакторе ведется с помощью турбидиметра, измеряющего мутность суспензии, подаваемой в кювету микронасосом из реактора. Электрический сигнал с фотоприемника поступает в электронный блок, регулирующий работу насоса, подающего среду в реактор. Когда величина сигнала с фотоприемника превысит значение, заданное оператором на электронном блоке, автоматически включается насос, в реактор начинает подаваться свежая среда, которая смешивается с суспензией микробов и понижает ее концентрацию. Одновременно через переливное устройство такой же объем суспензии вытекает из реактора в виде продукта. В реакторе концентрация суспензии за счет разбавления питательной средой снизится, что отметит фотодатчик, а регулятор работы насоса отключит его до того момента, когда концентрация микроорганизмов за счет их размножения опять превысит заданное значение. Система работает в импульсном режиме, что отражено на рисунке 6.6.



Рис. 6.7. Блок-схема турбидостата [2 осн.]

При работе в зоне замедленного роста значение удельной скорости роста $\mu < \mu_{\max}$. Производительность хемостата зависит (через μ) от концентрации субстрата, поступающего в реактор, и скорости подачи в него питательной среды. Оба эти параметра (концентрация и скорость) регулируются оператором, величина μ автоматически устанавливается самими микроорганизмами и поддерживается на постоянно

уровне, пока оператор не изменит значение хотя бы одного из них. Турбидостат, представленный на рис. 6.7, легко превратить в хемостат, отключив всю автоматику и включив насос в режим непрерывной работы.

При работе в зоне нелимитированного субстратом роста ($[S_0] \gg K_s$) регулирование скорости роста биомассы можно осуществлять путем поддержания на заданном уровне значения pH среды (pH-стат) или концентрации кислорода (оксистат) в реакторе. Раствор кислоты или щелочи (pH-стат) или кислорода (оксистат) подается в реактор импульсами (как в турбидостате) под контролем соответствующего датчика.

Возможно одновременное регулирование по концентрациям лимитирующего субстрата (например, глюкозы) и кислорода.

6.3. Гидромеханические процессы и аппараты

На биотехнологических производствах при некоторых процессах происходит образование неоднородных смесей, которые в дальнейшем подлежат разделению. Разделение может преследовать различные цели, а именно, очистку газовой или жидкой фазы от взвешенных в ней загрязняющих частиц или выделение ценных продуктов, взвешенных в газовой или жидкой фазе. Однако встречаются задачи противоположного характера: из веществ, находящихся в различных агрегатных состояниях, необходимо получить смесь.

Решение этих задач основано на использовании гидрокинетических закономерностей.

6.3.1. Разделение смесей

Обычно приходится иметь дело со следующими неоднородными смесями:

- пыль – система, состоящая из газа и распределенных в нем твердых частиц (размером 5-50 мкм);
- дым – система, состоящая из газа и распределенных в нем твердых частиц размером 0,3-5 мкм, образуется при горении;
- туман – система, состоящая из газа и распределенных в нем капель жидкости размером 0,3-3 мкм, образуется в результате конденсации; пыль, дым, туман носят общее название аэрозоли;
- суспензия – система, состоящая из жидкости и взвешенных в ней твердых частиц (грубая – больше 100 мкм, тонкая – 100-0,1 мкм, коллоидная – меньше 0,1 мкм);

эмульсия – система, состоящая из жидкости и распределенных в ней капель другой жидкости, не растворяющейся в первой; размер капель колеблется в широких пределах;

пена – система, состоящая из жидкости и распределенных в ней пузырьков газа.

К числу процессов разделения относятся осаждение и фильтрование.

Осаждение – разделение жидких или газовых неоднородных систем путем выделения из жидкой или газовой фазы твердых или жидких взвешенных частиц. Выделение осуществляется под действием силы тяжести, центробежной силы, а также под действием силы электрического поля. Соответственно различают отстаивание, циклонный процесс и осадительное центрифугирование, электроочистку.

Гравитационное осаждение – осуществляется в отстойниках.

Для разделения суспензий используются полунепрерывно действующие (рис. 6.8а) и непрерывно действующие (рис. 6.8б) отстойники. В последнем случае осадок суспензии удаляют с помощью гребка, не останавливая отстойник.

Отстойники для эмульсий также бывают периодически действующими (подобно делительной воронке) и непрерывно действующими (рис. 6.9).

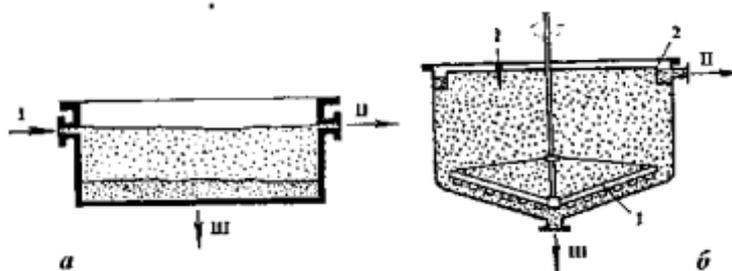


Рис. 6.8. Полунепрерывно действующий (а) и непрерывно действующий (б) отстойники: I – гребок; 2 – кольцевой желоб; I – суспензия; II – осветленная жидкость; III – осадок [1]

Разделение жидкостей по поверхности а-а в непрерывно действующем отстойнике соблюдается при условии $h_1 \cdot \rho_1 = h_2 \cdot \rho_2$.

Осаждение под действием центробежной силы осуществляется двумя способами:

- созданием вращательного движения жидкости или газа (циклонный процесс);

- разделение суспензии и эмульсии в роторе центрифуги (осадительное центрифугирование).

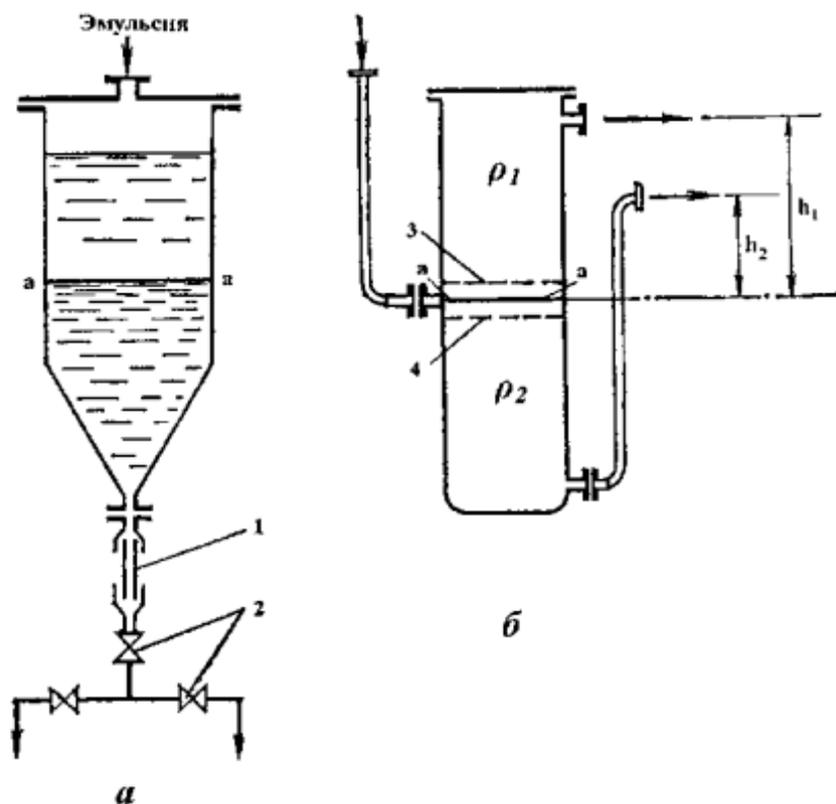


Рис. 6.9. Периодически (а) и непрерывно (б) действующие отстойники для эмульсий: 1 – смотровое стекло; 2 – краны; 3-4 – перфорированные перегородки; а-а – поверхность раздела жидкостей; ρ_1, ρ_2 – плотности разделяемых жидкостей [1]

Для очистки газа от пыли применяют батарейные циклоны (рис.6.10). С помощью винтовых лопастей запыленный воздух закручивается, пыль под действием центробежных сил отбрасывается к периферии и сыпается в низ циклона.

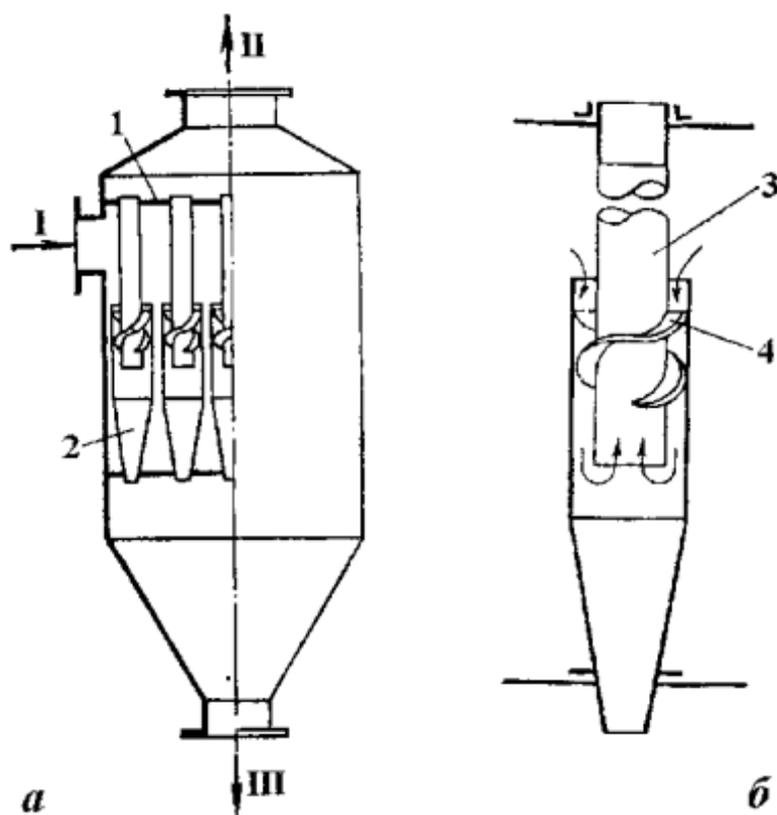


Рис. 6.10. Батарейный циклон (а) и элемент батарейного циклона (б): 1 – перегородка; 2 – элемент циклона; 3 – выводная трубка; 4 – винтовые лопасти; I – запыленный газ; II – очищенный газ; III – пыль [1]

Схема очистки суспензии с помощью отстойной центрифуги (рис.6.11) работает следующим образом: во вращающийся ротор (барaban) подается суспензия, твердые частицы под действием центробежной силы отбрасываются к стенке барабана и накапливаются. В периодически действующей центрифуге для выгрузки суспензии ее останавливают, в непрерывно действующей суспензию выгружают без остановки центрифуги.

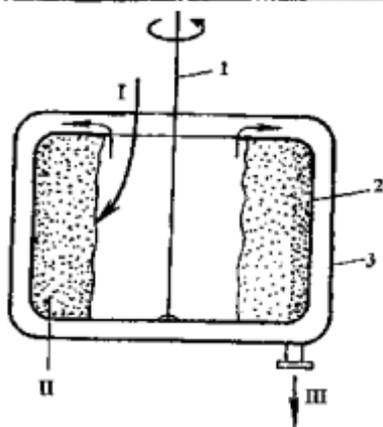


Рис. 6.11. *Схема отстойной центрифуги периодического действия: 1 – вал; 2 – барабан; 3 – кожух; I – суспензия; II – осадок; III – осветленная жидкость [1]*

Отстойные центрифуги для разделения эмульсий часто называют сепараторами. Они работают в непрерывном режиме. Пример такой центрифуги – сепаратор тарельчатого типа для сепарации молока.

Осаждение под действием электрического поля применяется для удаления из газа взвешенных твердых или жидких частиц. Для этого газовый поток пропускают между электродами, к которым приложено высокое напряжение (4–6 кВ/см). Происходит ионизация молекул газа, которые адсорбируются на частицах и заряжают их. Заряженные частицы притягиваются к электроду (аноду) и скапливаются на нем.

Фильтрация – разделение суспензий или пылей с помощью пористой перегородки, способной задерживать взвешенные частицы (фильтра). В зависимости от движущей силы, осуществляющей этот процесс, различают фильтрацию под давлением и центробежную фильтрацию (центрифугирование). Существует большое количество конструкций фильтров, некоторые из них работают под вакуумом. Барабанный вакуум-фильтр (рис. 6.12) осуществляет разделение суспензий (например, отделение дрожжевых клеток от остатков питательной среды).

Внутри вращающегося барабана, обтянутого фильтрующей тканью, создается разрежение. Барабан погружен в корыто, в которое подается суспензия. Для предотвращения выпадения осадка в корыте используется качающаяся мешалка. Частицы оседают на наружной

поверхности барабана, с которой затем снимаются с помощью специального ножа. При необходимости предварительно производится промывка осадка (рис. 6.12). Фильтрат проходит через фильтрующую ткань в барабан и по камерам и трубам удаляется из него.

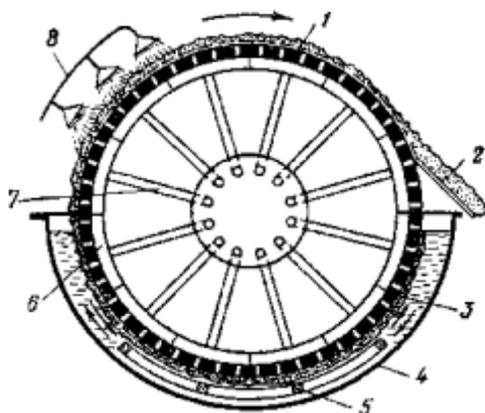


Рис. 6.12. *Схема барабанного вакуум-фильтра:*
 1 – перфорированный барабан; 2 – нож;
 3 – фильтрующая ткань; 4 – корыто;
 5 – качающаяся мешалка; 6 – камеры; 7 – трубы;
 8 – устройство для разбрызгивания промывной
 жидкости [1]

Под вакуумом работают и фильтры, очищающие газы от пыли (пример – бытовой пылесос).

Фильтрующие центрифуги, как и фильтры, работающие под давлением, бывают периодического (с остановкой для выгрузки осадка), так и непрерывного действия. Фильтрация осуществляется во вращающемся барабане, частицы оседают на сите барабана, а фильтрат попадает в кожух центрифуги и непрерывно удаляется из него. По такому принципу работают бытовые соковыжималки (дополнительно снабженные устройством для предварительного размельчения фруктов и овощей).

6.3.2. Перемешивание в жидкой среде

Перемешивание в жидкой среде применяется для получения эмульсий и суспензий, а также для интенсификации тепловых, диффузионных и химических (биохимических) процессов. Оно осущест-

вляется тремя основными способами: механическим, пневматическим и циркуляционным.

Механическое перемешивание осуществляется с помощью мешалок различного типа. Мешалка, чаще всего, представляет собой комбинацию лопастей, насаженных на вращающийся вал. В зависимости от геометрии лопастей различают лопастные, пропеллерные, турбинные и специальные мешалки (рис. 6.13).

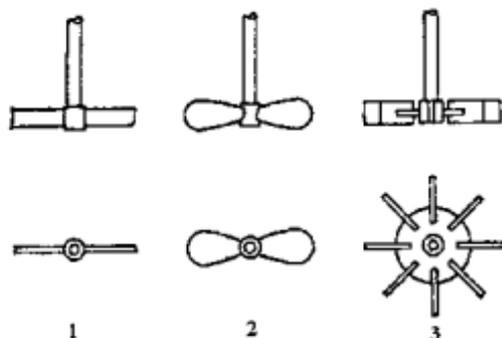


Рис. 6.13. Основные типы мешалок: 1 – лопастная; 2 – пропеллерная; 3 – турбинная [1]

Пневматическое перемешивание осуществляется путем пропускания газа через слой перемешиваемой жидкости. Газ (обычно воздух) распределяется барботером, представляющим собой ряд горизонтально расположенных у дна аппарата перфорированных труб. Такой способ перемешивания еще называют барботажем.

Циркуляционное перемешивание производится многократным прокачиванием жидкости через систему аппарат – циркуляционный насос.

6.4. Тепловые процессы и теплообменные аппараты

Технологические процессы, скорость протекания которых определяется скоростью подвода или отвода тепла, называются тепловыми, а аппараты, предназначенные для проведения этих процессов, – теплообменными.

К тепловым процессам относятся нагревание, охлаждение, конденсация, испарение.

Нагревание – повышение температуры перерабатываемых веществ путем подвода к ним тепла.

Охлаждение – понижение температуры перерабатываемых веществ за счет отвода от них тепла.

Конденсация – сжижение паров какого-либо вещества путем отвода от него тепла.

Испарение – перевод в парообразное состояние какой-либо жидкости путем подвода к ней тепла. Частным случаем испарения является выпаривание – концентрирование при кипении растворов твердых нелетучих веществ путем удаления жидкого летучего растворителя в виде пара.

6.4.1. Нагревание

Нагревание часто производят водяным паром, топочными газами, промежуточными носителями, электрическим током.

Для нагревания водяным паром характерно большое количество тепла, выделяющегося при конденсации единицы массы пара. Существует два способа нагревания водяным паром.

Нагревание "острым" паром – когда водяной пар вводится непосредственно в нагреваемую жидкость. Для нагревания и одновременного перемешивания жидкости пар вводят через барботер (трубу с рядом мелких отверстий).

Нагревание "глухим" паром – когда жидкость нагревается паром через разделяющую их стенку в аппаратах с рубашками, змеевиками и т.д. Этим методом пользуются, если нагреваемая жидкость может взаимодействовать с водой.

Нагревание топочными газами – самый старый способ обогрева. Топочные газы образуются в печах при сжигании твердого, жидкого или газообразного топлива. Они нагревают жидкость, находящуюся в реакционных аппаратах или циркулирующую по трубчатому змеевику.

Нагревание промежуточными теплоносителями применяется чаще всего в тех случаях, когда для сохранения качества продуктов или обеспечения безопасности работы недопустим даже кратковременный перегрев. В этих случаях для обогрева применяют промежуточные теплоносители, которые сначала нагревают топочными газами (или другим способом), а затем подают в рубашки или змеевики реакционных или теплообменных аппаратов. В качестве промежуточных теплоносителей используют воду, минеральные масла, расплавленные смеси солей и др.

По способу превращения электрической энергии в тепловую различают электрические печи сопротивления, индукционные и дуговые.

Электрические печи сопротивления делятся на печи прямого действия, когда нагреваемое тело включается непосредственно в электрическую цепь, и косвенного действия, когда тепло выделяется при прохождении тока по специальным нагревательным элементам.

Нагревание в индукционных печах осуществляется индукционными токами. Обогреваемый аппарат является сердечником соленоида, охватывающим его. По соленоиду пропускают переменный электрический ток. В стенках аппарата возникают вторичные токи, которые нагревают аппарат и через него находящиеся в аппарате вещества.

Диэлектрическое нагревание токами высокой частоты применяется для нагревания диэлектриков. Нагреваемое тело помещают между обкладками конденсатора. Под действием переменного напряжения молекулы диэлектрика колеблются, при этом за счет внутреннего трения между ними выделяется тепло. Количество выделившегося тепла пропорционально квадрату напряженности и частоте тока. Нагревание обычно ведут токами высокой частоты (0,5-100 МГц), получаемыми в специальных генераторах. Этот механизм используется и в бытовых микроволновых печах ("микроволновках").

Дуговые печи в биотехнологии не применяются.

6.4.2. Охлаждение

Для охлаждения до температур, близких к температурам окружающей среды, используют воздух и воду. В отдельных случаях применяют охлаждение льдом, позволяющее получить температуры, близкие к 0 °С. Обычно охлаждение производят с использованием холодильных машин.

Для получения умеренного холода применяют холодильные машины, подразделяемые на парокомпрессионные, газокompрессионные, абсорбционные, пароводяные эжекторные, водоиспарительные.

Широкое применение получили парокомпрессионные машины. Хладагент, в частности фреон (хладон-12 – CCl_2F_2) засасывается компрессором, сжимается и конденсируется (в конденсаторе), при этом окружающей среде отдается тепло Q (рис. 6.14).

Затем сконденсированный фреон дросселируется в дросселирующем вентиле и в капельном виде поступает в испаритель, где испаряется и отнимает тепло от охлаждаемого материала (охлаждение

до $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$). Такие машины, в частности, применяются в современных бытовых холодильниках, испаритель у них называется обычно морозилкой.

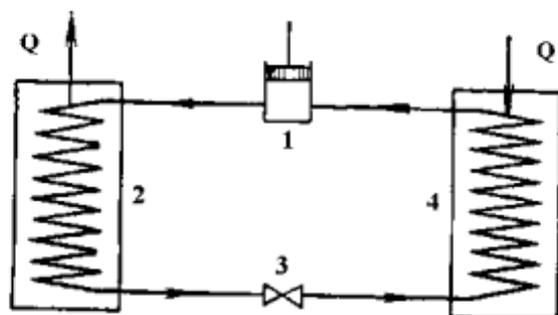


Рис. 6.14. *Схема парокомпрессионной холодильной машины:*

1 – компрессор; 2 – конденсатор; 3 – дросселирующий вентиль; 4 – испаритель

Глубокое охлаждение используется главным образом для разделения газовых смесей их сжижением и последующей ректификацией. Обычно применяемое каскадное (ступенчатое) охлаждение основано на использовании соединенных последовательно нескольких парокомпрессионных холодильных машин с различными теплоносителями, с понижающимися по ходу охлаждения температурами кипения.

6.4.3. Конденсация

Различают два вида конденсации: поверхностную (или просто конденсацию), при которой конденсирующиеся пары и охлаждающий агент разделены стенкой, на которой происходит конденсация, и конденсацию смешением, при которой конденсирующиеся пары непосредственно соприкасаются с охлаждающим агентом. В первом случае (рис. 6.15) конденсирующиеся пары идут сверху вниз по трубам, а охлаждающая жидкость идет снизу вверх между труб (принцип противотока).

Если конденсации подвергаются пары жидкостей, не растворимых в воде, то конденсацию этих паров можно проводить путем непосредственного смешения их с водой.

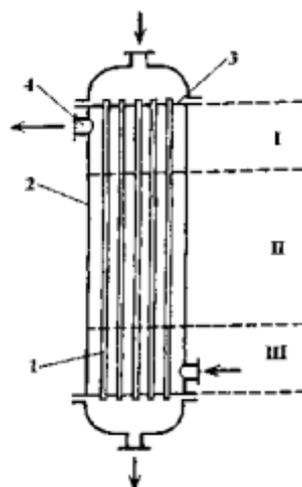


Рис. 6.15. Поверхностная конденсация: 1 – трубы; 2 – кожух; 3 – решетка; 4 – патрубок; I – зона охлаждения перегретого пара; II – зона конденсации; III – зона охлаждения

6.4.4. Выпаривание

Выпаривание (как частный случай испарения) осуществляется в выпарных аппаратах. Сущность его заключается в переводе растворителя в парообразное состояние и отводе полученного пара от оставшегося концентрированного раствора. Выпаривание обычно проводится как при кипении под давлением, так и под вакуумом. Преимущественное распространение получили трубчатые выпарные аппараты, теплообменное устройство которых (греющая камера, или кипятыльник) выполнено в виде трубчатого теплообменника. С одной стороны стенок труб находится выпариваемый раствор, с другой – теплоноситель, подводящий тепло (обычно водяной пар).

6.4.5. Теплообменные аппараты

Теплообменные аппараты (теплообменники) предназначены для проведения тепловых процессов. Широкое распространение получили теплообменники, в которых теплоносители разделены стенкой, и тепло передается от одного теплоносителя к другому через эту разделяющую их стенку. Наиболее часто применяются кожухотрубные теплообменники. Они состоят из цилиндрического кожуха, к которому

с двух сторон приварены трубные решетки. В трубных решетках плотно закреплен пучок труб. Для ввода и вывода теплоносителей к кожуху и днищам приварены патрубки. Один поток теплоносителя направляется по трубам, другой – по межтрубному пространству (см. рис. 6.15).

Кроме того, применяются теплообменники типа "труба в трубе" (рис. 6.16).

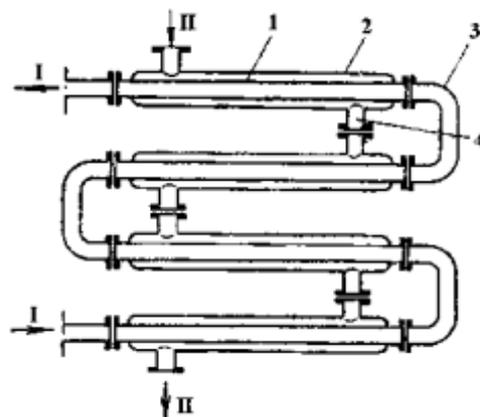


Рис. 6.16. Двухтрубный теплообменник типа "труба в трубе":
 1 – внутренняя труба; 2 – наружная труба;
 – соединительное колено; 4 – соединительный
 патрубок; I, II – теплоносители [1]

Теплообменник представляет собой батарею из последовательно соединенных теплообменных элементов. Каждый элемент состоит из внутренней трубы и охватывающей ее наружной трубы. Теплообмен осуществляется через стенку внутренней трубы. Теплоносители движутся навстречу друг другу (принцип противотока).

Кроме того, применяются специальные теплообменные аппараты: с рубашкой и со змеевиками (рис. 6.17).

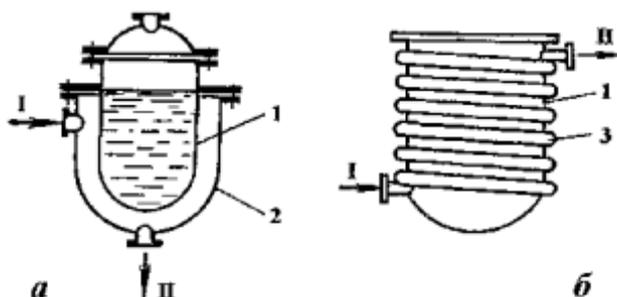


Рис. 6.17. Теплообменные аппараты с рубашкой (а) и змеевиком (б): 1 – корпус реактора; 2 – рубашка; 3 – змеевик; I, II – теплоноситель

6.5. Массообменные процессы и аппараты

Технологические процессы, скорость протекания которых определяется скоростью переноса вещества (массы) из одной фазы в другую, называют массообменными, а аппараты, предназначенные для проведения этих процессов, – массообменными аппаратами. В результате массообменных процессов происходит разделение смесей на составляющие компоненты.

В основе массообмена лежат следующие процессы: абсорбция, ректификация, экстракция, кристаллизация, адсорбция, сушка, ионный обмен, мембранное разделение.

6.5.1. Абсорбция и ректификация

Абсорбция – поглощение газов или паров из газовых или паровых смесей жидкими поглотителями, которые называются абсорбентами. Здесь имеет место переход из газовой фазы в жидкую. Процесс абсорбции является избирательным и обратимым. После избирательной абсорбции одного или нескольких компонентов из газовой или паровой смеси проводят десорбцию – выделение этих компонентов из жидкости. Таким образом осуществляется разделение смеси. Регенерированный абсорбент готов к новому акту абсорбции (круговой процесс).

Ректификация – разделение жидких однородных смесей на составляющие вещества или группы составляющих веществ в результате противоточного взаимодействия паровой и жидкой смесей. Здесь

имеет место переход из жидкой фазы в газовую (и наоборот). Ректификация основана на различных температурах кипения компонентов смеси. Аппараты, в которых осуществляется процесс ректификации, называются ректификационными колоннами.

Аппараты, в которых осуществляется абсорбция (абсорберы) и ректификация, выполнены в виде колонн с разнообразным внутренним устройством.

Ректификационные установки бывают периодически (с перезагрузкой смеси) и постоянно (без перезагрузки) действующими.

В периодически действующей ректификационной установке (рис. 6.18) исходная смесь загружается в куб, где нагревается до температуры кипения и испаряется. Пары проходят через ректификационную колонну, взаимодействуя в противотоке с жидкостью, возвращаемой из дефлегматора. В дефлегматоре богатые легколетучим компонентом пары конденсируются, и конденсат поступает в делитель потока (разделительный стакан). Часть жидкости из делителя потока направляется на орошение ректификационной колонны, а другая часть (дистиллят) проходит через холодильник и направляется в соответствующий сборник.

По мере испарения смеси содержание летучего компонента в дистилляте непрерывно уменьшается, будучи максимальным, в начале и минимальным в конце перегонки. Это позволяет в случае необходимости получать несколько фракций дистиллятов различного состава, отводя их в разные сборники. Способ перегонки с разделением смеси на несколько фракций, в различной степени обогащенных летучим компонентом, называют фракционной перегонкой. Существует большое число методов ректификации. Этим методом можно разделять смеси летучих веществ, получаемых, например, при брожении (пропионовокислос, апстоэтиловое, ацетобутиловос и др.).

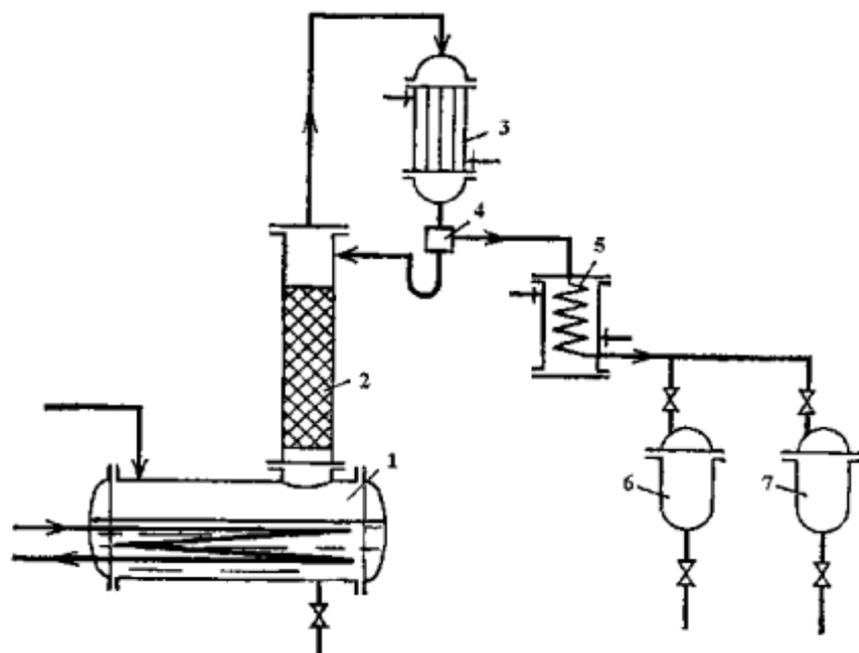


Рис. 6.18. Принципиальная схема ректификационной установки периодического действия: 1 – куб; 2 – ректификационная колонна; 3 – дефлегматор; 4 – разделительный стакан; 5 – холодильник; 6, 7 – сборники фракций [1].

6.5.2. Экстракция

Экстракция – извлечение одного или нескольких растворенных веществ из одной жидкости другой жидкостью (экстрагентом), практически не смешивающейся (или частично смешивающейся) с первой. Имеет место переход из одной жидкой фазы в другую. Экстракция осуществляется в экстракторах.

Экстракция широко используется для извлечения ценных продуктов из разбавленных растворов, а также получения концентрированных растворов.

Используются следующие основные типы экстракторов: смешительно-отстойные, колонные и центробежные.

В смешительно-отстойных экстракторах в одном аппарате производится смешение смеси с экстрагентом, а в другом разделении с помощью отстойника.

В колонных экстракторах получают большую поверхность фазового контакта путем диспергирования капель одной жидкой фазы в другую. В колоннах имеются разделительные камеры, где происходит отделение одной жидкой фазы от другой.

Центробежные экстракторы применяют в тех случаях, когда экстрагируемое вещество нестойко и необходимо максимально сократить время экстракции. Разделение фаз осуществляется с помощью центробежной силы. Эти экстракторы применяют и в тех случаях, когда плотности растворителей мало между собой различаются.

В большинстве случаев экстракцию применяют в сочетании с ректификацией, при которой выделяется экстрагент, вновь вступающий в процесс экстракции.

6.5.3. Кристаллизация

Кристаллизация – выделение вещества из жидкой фазы в виде твердой фазы (кристаллов). Процесс применяют преимущественно в тех производствах, где требуется получение веществ повышенной чистоты. Продукт, получаемый в результате кристаллизации, представляет собой сыпучую массу кристаллов различного размера. Внешняя геометрическая форма кристаллов специфична для каждого вещества.

Процесс кристаллизации состоит из двух последовательных стадий: образования зародышей кристаллов и роста кристаллов. Образование зародышей кристаллов происходит в пересыщенных растворах, когда пересыщение достигает определенной величины. Разность между концентрацией раствора, при которой начинают образовываться зародыши, и концентрацией насыщенного раствора называют максимальным пересыщением. На кинетику процесса кристаллизации влияет большое число факторов, основными из которых являются: пересыщение, температура, интенсивность перемешивания. С увеличением пересыщения увеличивается скорость роста кристаллов. С повышением температуры увеличивается скорость образования зародышей и скорость роста кристаллов. Перемешивание, ультразвуковые колебания и другие механические воздействия резко увеличивают скорость образования кристаллических зародышей.

Аппараты, в которых осуществляется кристаллизация, называются кристаллизаторами.

Для проведения процесса кристаллизации солей, растворимость которых значительно уменьшается с понижением температуры, при-

меняют *изогидрические кристаллизаторы*. Пересыщение в них достигается путем охлаждения раствора ниже температуры насыщения при неизменном его объеме, что приводит к возникновению кристаллизации. Горячий насыщенный раствор заливают в аппарат при непрерывно работающей мешалке (рис.6.19).

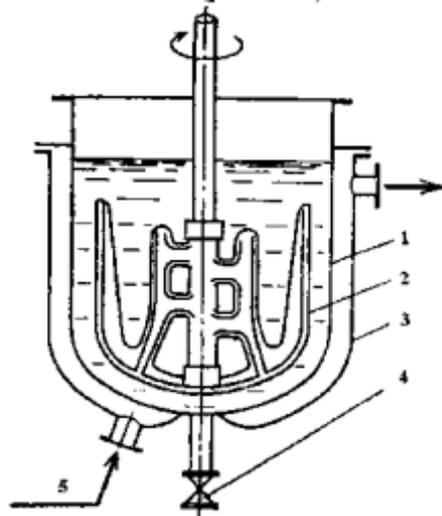


Рис. 6.19. *Изогидрический кристаллизатор периодического действия: 1 – корпус; 2 – мешалка; 3 – охлаждающая рубашка; 4 – разгрузочное устройство; 5 – штуцер для подачи охлаждающей воды [1]*

После заполнения кристаллизатора в рубашку подается охлаждающая вода. Образовавшаяся суспензия кристаллов сливается через разгрузочное устройство и направляется на фильтр или центрифугу для отделения кристаллов от маточного раствора.

Вакуумные кристаллизаторы представляют собой аппараты, в которых раствор охлаждается вследствие адиабатического испарения под вакуумом части растворителя, так как на его испарение расходуется физическое тепло раствора.

Выпарные кристаллизаторы применяются для кристаллизации солей, растворимость которых мало изменяется с температурой. При этом процесс осуществляется путем удаления части растворителя с помощью выпаривания раствора.

Кроме того, также применяется кристаллизация *высаливанием*. При этом варианте кристаллизации пересыщение в растворе может создаваться путем добавления в систему какого-либо вещества, снижающего растворимость выделяемого вещества в растворителе. Добавляемое вещество называется высаливателем.

Для очистки вещества от нелетучих примесей применяют *сублимацию* с последующей *десублимацией*. Сублимация – перенос вещества из твердой фазы в паровую, минуя жидкую. Благодаря этому возможно выделение сублимацией из смеси твердых веществ нужного компонента, а затем, в других условиях путем десублимации из паровой фазы получить его в чистом виде (кристаллы). Полученный в процессе десублимации продукт называется сублимат.

6.5.4. Адсорбция

Адсорбция – поглощение газов, паров или растворенных в жидкостях веществ поверхностью твердого поглотителя – адсорбента. В этом процессе вещество переходит из газовой или жидкой фазы в твердую.

Особенностью адсорбции кроме избирательности является еще и обратимость – выделение при определенных условиях адсорбированных компонентов. Этот процесс называется десорбцией.

В качестве адсорбентов используются твердые материалы, обладающие в большинстве случаев очень высокой пористостью и, следовательно, большой удельной поверхностью ($\text{м}^2/\text{г}$). Наиболее распространенными адсорбентами являются силикагель (гель кремниевой кислоты), активированные угли (древесные, костяные, каменные), активированные серной кислотой глины и др. Поверхность 1 г активированного угля составляет 200-1000 м^2 , силикагеля – 500 м^2 и более. Распространены специальные адсорбенты – синтетические цеолиты (получившие название молекулярных сит) с тонкими порами, сечение которых соизмеримо с размерами молекул. Адсорбенты изготавливают зернистыми (2-8 мм) и пылевидными (50-200 мкм). Количество поглощенного адсорбентом вещества зависит от природы адсорбента и поглощаемого вещества. Кроме того, оно прямо пропорционально давлению и концентрации поглощаемого вещества и обратно пропорционально температуре. Для десорбции зависимость противоположная.

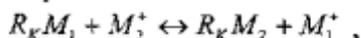
Аппараты, предназначенные для проведения процессов адсорбции, называют адсорберами. В случае применения зернистого адсор-

бента используют схемы с неподвижным и движущимся адсорбентом. В первом случае процесс проводят периодически. В начале через колонну с адсорбентом пропускают парогазовую смесь и насыщают его поглощенным веществом. Затем пропускают через колонну вытесняющее вещество или нагревают адсорбент, осуществляя таким образом десорбцию (регенерацию адсорбента). Во втором случае адсорбент циркулирует в замкнутой системе: насыщение его газом происходит в одной зоне аппарата (адсорбционной), а регенерация – в другой (десорбционной).

6.5.5. Ионообменные процессы

Ионообменные процессы используются для извлечения вещества из раствора. Они основаны на способности некоторых твердых материалов (ионитов) обратимо обменивать свои ионы на ионы извлекаемого вещества. Процесс применяется в тех производствах, где требуется извлечь вещества из растворов, в которых они находятся в малых концентрациях. В этом процессе извлекаемые вещества переходят из жидкой фазы в твердую.

Обмен ионов в ионитах происходит в эквивалентных количествах и обратимо. Обмен катионов:



где R_K – катионит (ионит, присоединяющий катионы); M_1^+ – обмениваемый катион; M_2^+ – удаляемый из раствора катион.

Соответственно происходит и обмен анионов (А) на анионите (R_A):



В качестве ионитов наиболее часто используют ионообменные смолы. Создание ионообменной смолы сводится к синтезу нерастворимого в воде и других растворителях твердого органического полимера, образующего трехмерный высокомолекулярный каркас с активными группами путем "сшивания" линейного полимера в пространственную сетку с помощью различных "мостикообразующих" веществ. Таким образом, ионообменные смолы состоят из матрицы (пространственно сшитых углеводородных цепей) и закрепленных на ней активных ионогенных групп. Последние вводятся различно: либо присоединением к имеющемуся каркасу исходных мономеров, либо в самом процессе образования высокомолекулярного соединения.

Сухая ионообменная смола еще не является ионитом, им она становится после набухания. В воде происходит диссоциация ионо-

генных групп с образованием подвижных противоионов и неподвижных, связанных с матрицей ионов. При взаимодействии ионообменных смол с растворами электролитов противоионы замещаются эквивалентным количеством ионов, находящихся в растворе.

Для регенерации катионита, насыщенного извлеченными из электролита катионами, используют растворы кислот (например, 5%-ную HCl):



а регенерацию анионита осуществляют раствором щелочи (например, 5% NaOH):



После регенерации ионитов необходима тщательная отмывка их водой от следов регенерирующих растворов.

Для получения деминерализованной воды обычную воду пропускают через колонки с катионитом и анионитом.

Схемы ионообменных процессов принципиально не отличаются от схем процессов физической адсорбции. Весь цикл ионообменного процесса включает следующие стадии:

- 1) сорбцию ионов из раствора,
- 2) отмывку ионита от исходного раствора,
- 3) регенерацию ионита,
- 4) отмывку ионита от регенерирующего раствора.

Как и адсорбционная аппаратура, ионообменная аппаратура также делится на действующую периодически и непрерывно. Ионообменные аппараты, как правило, выполнены в форме колонн.

6.5.6. Сушка

Сушка – удаление влаги из твердых влажных материалов путем ее испарения. Процесс имеет большое значение во многих производствах, где влажные природные вещества должны быть предварительно обезвожены или должен быть обезвожен готовый продукт, получающийся в последней стадии производства. При сушке имеет место переход влаги из твердого влажного материала в паровую или газовую фазу.

Наиболее распространенным способом удаления влаги из твердых влажных материалов является тепловая сушка. Она в производстве осуществляется, главным образом, двумя способами:

1. Нагреванием влажных материалов теплоносителем через твердую непроницаемую перегородку (контактная сушка).

2. Нагреванием влажных материалов путем непосредственного контакта с газовым теплоносителем, обычно воздухом (газовая, или воздушная сушка).

Иногда тепло подводится к высушиваемому материалу токами высокой частоты (диэлектрическая сушка) или инфракрасными лучам (радиационная сушка).

Аппараты, предназначенные для проведения сушки, называют сушилками.

Для контактной сушки обычно применяют сушильные шкафы, сушилки с мешалками и вальцовые сушилки. Для ускорения процесса сушки в этих аппаратах часто создают вакуум.

Сушильный шкаф является простейшим аппаратом и обычно состоит из теплоизолированного корпуса, внутри которого располагаются греющие плиты. На них в противнях ставят высушиваемый материал. Образующиеся при сушке пары удаляются через патрубок в корпусе.

Сушилки с мешалками более сложны. Они имеют внутри устройство для перемешивания высушиваемого материала.

Вальцовые сушилки используются для высушивания в вакууме суспензий и густых паст (рис.6.20). Внутри сушилки медленно вращается полый барабан, который частично погружен в высушиваемую суспензию или пасту, помещенную в корыто. Барабан изнутри обогревается паром. Суспензия смачивает поверхность барабана и сушится в тонком слое. Образовавшийся за один оборот барабана тонкий слой сухого материала снимается ножом и ссыпается в тележку, установленную в герметичном коробе. Высушиваемая суспензия непрерывно поступает в корыто по трубе. Пары воды и воздух через патрубок отсасываются вакуум-насосом, перед которым установлены ловушки для пыли и конденсатор для ожижения отсасываемого водяного пара.

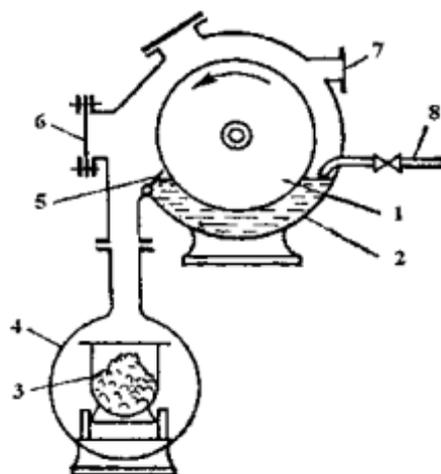


Рис. 6.20. Вальцовая сушилка: 1 – барабан (валец); 2 – корыто; 3 – тележка; 4 – короб; 5 – нож; 6 – смотровое окно; 7 – патрубок для присоединения к вакуум-наосу; 8 – питающая труба [1]

Сушилки для сушки горячим паром бывают разных конструкций: камерные, туннельные, ленточные, барабанные, распылительные и др. Распылительная сушилка применяется для высушивания материалов, обладающих большой начальной влажностью и текучестью, приближающейся к текучести жидкости. Высушиваемый материал разбрызгивается распылителем в сушильную камеру, где благодаря большой удельной поверхности капель в токе горячего воздуха происходит быстрое (за сотые доли секунды) испарение влаги. Высушенный материал осаждается в нижней части камеры, а также извлекается из удаляемого воздуха циклоном или фильтром.

Если материал, из которого нужно удалить влагу, не выдерживает нагревания, применяют лиофильную сушку. В этом случае материал замораживают и помещают в камеру, где создается вакуум. Удаление влаги происходит путем сублимации (возгонки), то есть пары удаляются непосредственно с замороженной поверхности.

6.5.7. Мембранное разделение

Мембранное разделение жидких или газовых смесей основано на способности некоторых тонких пленок (полупроницаемых мем-

бран) пропускать одни вещества и задерживать другие (селективность). В этом случае вещества из одной жидкой или газовой фазы переходят через полупроницаемую мембрану в другую фазу.

Мембранное разделение применяют для очистки и концентрирования растворов, разделения близкокипящих компонентов, отделения высокомолекулярных веществ от низкомолекулярных растворителей, глубокой очистки вод и т.д.

К основным мембранным методам относятся:

- обратный осмос и ультрафильтрация,
- испарение через мембрану,
- диализ,
- электродиализ,
- диффузионное разделение газа.

Обратный осмос состоит в фильтровании растворов под давлением через проницаемые мембраны, пропускающие растворитель и полностью (или частично) задерживающие молекулы или ионы растворенных веществ. Если в сосуде, содержащем раствор и чистый растворитель, разделенные полупроницаемой мембраной, со стороны раствора приложить давление, превышающее осмотическое давление растворителя, то произойдет перенос растворителя из раствора в сторону чистого растворителя (обратный осмос – противоположный движению молекул растворителя до приложения давления).

Ультрафильтрация – это частный случай обратного осмоса, когда молекулярная масса растворенных компонентов во много раз (500 и более) превышает молекулярную массу растворителя. С помощью ультрафильтрации отделяют высокомолекулярные соединения от низкомолекулярных за счет селективного пропускания последних мембраной. Давление при ультрафильтрации ниже, чем при обратном осмосе, а аппараты одинаковые (различаются по размеру пор в мембране).

Испарение через мембрану – процесс разделения жидких смесей посредством полупроницаемых мембран, когда разделяемая жидкая смесь вводится с одной стороны мембраны, а проникающий через нее компонент в виде паров отводится с другой стороны мембраны в вакуум либо в поток инертного газа (рис. 6.21).

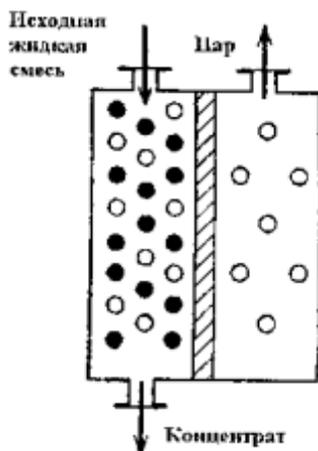


Рис. 6.21. *Схема разделения жидкой смеси испарением через полупроницаемую мембрану [1]*

Диализ – процесс самопроизвольного разделения молекул (или ионов) высокомолекулярных и низкомолекулярных веществ при помощи полупроницаемых мембран, которые пропускают малые молекулы (или ионы) и задерживают макромолекулы и коллоидные частицы.

Электродиализ – диализ в постоянном электрическом поле, в десятки раз ускоряющем процесс разделения ионов.

Диффузионное разделение газов через полупроницаемые мембраны основано на различии коэффициентов диффузии компонентов газовой смеси в непористых полимерных мембранах (гелях) под действием градиентов концентрации. Процесс разделения подчиняется законам молекулярной диффузии.

Для изготовления полупроницаемых мембран применяют различные материалы: полимерные пленки (полиэтиленовые, полипропиленовые, целлофановые, фторопластовые и др.); металлическую фольгу (из сплавов платины, палладия, серебра, молибдена и др.), в которой формируют поры; пористые стекла (натрийборсиликатные и др.); ионообменные мембраны. Наибольшее распространение получили полимерные мембраны.

В промышленности используют преимущественно аппараты с плоскокамерными, трубчатыми и спиральными фильтрующими элементами, а также с мембранами в виде полых волокон. Последние

применяются для процессов обратного осмоса и ультрафильтрации и представляют собой полые волокна малого диаметра (45-200 мкм) и толщиной стенки 10-15 мкм. Они способны выдерживать большое давление. Такие аппараты компактны и высокопроизводительны (рис. 6.22).

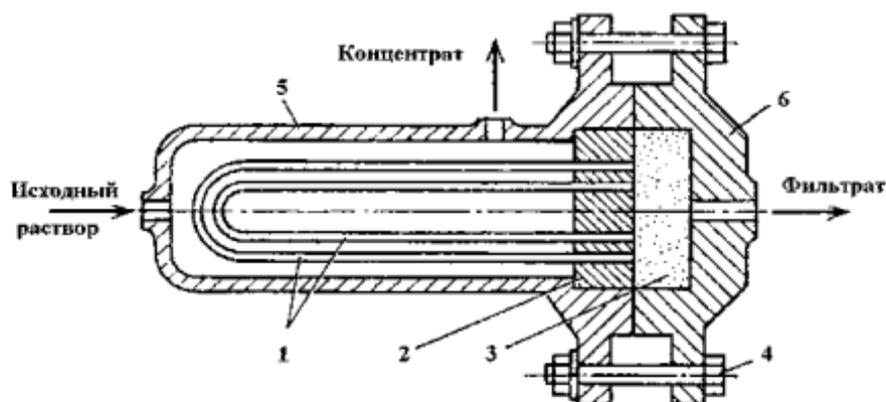


Рис. 6.22. Конструктивная схема аппарата из U-образных полых волокон: 1 – полупроницаемые мембраны в виде полых волокон; 2 – шайба; 3 – пористая подложка; 4 – болты; 5 – корпус аппарата; 6 – крышка аппарата [1]

Например, один аппарат диаметром 240 мм и длиной 1220 см с U-образными фильтрующими элементами в виде полых волокон позволяет обессолить и получить 50 м³ пресной воды в сутки, расходуя почти в 50 раз меньше электроэнергии, чем при традиционной перегонке в дистилляторе.

6.6. Механические процессы и аппараты

К механическим процессам, применяемым в химических и биотехнологических производствах, относятся измельчение и классификация.

6.6.1. Измельчение

Измельчение – процесс деления твердого тела на части, при котором путем приложения внешних сил преодолеваются силы молекулярного притяжения в измельчаемом твердом теле и образуются новые поверхности. Увеличение суммарной поверхности размельченно-

го материала способствует быстрому протеканию химических реакций, повышает скорость его растворения, способствует образованию суспензий и т.д.

Измельчение характеризуется степенью измельчения $i = d_n/d_k$, где d_n и d_k – средний размер куска соответственно до измельчения и после измельчения. Степень измельчения колеблется от 3-6 для машин крупного измельчения до 100 и более для машин мелкого и тонкого измельчения. Получение высоких степеней измельчения достигают путем последовательного применения машин с возрастающей степенью измельчения.

Крупное и среднее измельчение ($d_k = 250-25$ и $25-5$ мм соответственно) проводят, как правило, сухим способом, мелкое и тонкое ($d_k = 5-1$, $1-0,0075$ мм соответственно) – как сухим, так и мокрым (обычно в воде), а коллоидное (d_k до $0,1$ мкм) – обычно мокрым методом.

Измельчение материалов осуществляется методами раздавливания, раскалывания и истирания.

Измельчающие машины разделяют на дробилки и измельчители (мельницы). Дробилки осуществляют крупное и среднее измельчение, мельницы – мелкое, тонкое и коллоидное измельчение.

Дробление осуществляется в щековых, конусных, молотковых, валковых дробилках, бегунках, шаровых и стержневых барабанных измельчителях.

Струйные измельчители (мельницы) обеспечивают измельчение материала средней твердости до размера частиц 2-5 мкм. Материал измельчается при соударении частиц между собой, а также при ударах и истирании о стенки камеры. Измельчаемые частицы вводят в струю газа или пара, имеющую скорость несколько сотен метров в секунду.

Вибрационные измельчители применяют для весьма тонкого измельчения. Они представляют собой барабан, заполненный шарами (между которыми находятся частицы размельчаемого материала). Вибратор, установленный внутри барабана, совершает 1500-3000 колебаний в минуту при амплитуде 2-4 мм.

Коллоидное измельчение обеспечивает очень тонкое измельчение (до десятых долей мкм). Измельчение осуществляется обычно мокрым способом в зазоре между конической поверхностью корпуса и поверхностью ротора, равном долям миллиметра. Окружная скорость ротора 30-120 м/с. В этот зазор подается суспензия, твердые частицы которой измельчаются истиранием.

6.6.2. Классификация

Путем классификации измельченный материал разделяют на фракции (классы), ограниченные определенными диапазонами размеров кусков (частиц).

В промышленности используют три вида классификации:

1. Грохочение, или механическая классификация – просеивание сыпучих материалов через сита, решета, решетки с определенным размером отверстий, через которые проходят более мелкие частицы.
2. Гидравлическая классификация – разделение на фракции смеси твердых частиц по значению скорости осаждения их в жидкости (обычно воде).
3. Воздушная классификация (сепарация) – разделение на фракции смеси твердых частиц по значению скорости осаждения их в воздухе.

Для осуществления этих процессов применяют большое количество различающихся по конструкции классифицирующих устройств.

ЛИТЕРАТУРА

Основная

(по всему курсу)

1. Загоскина Н.В., Назаренко Л.В., Калашникова Е.А., Живухина Е.А. Биотехнология: теория и практика: Учеб. пособие для вузов / Под ред. Н.В. Загоскиной, Л.В. Назаренко. – М.: Оникс, 2009. – 496с.
2. Тихонов И.В. и др. Биотехнология: Учебник / Под ред. Е.С. Воронина. – СПб.: ГИОРД, 2008. – 704 с.
3. Егорова Т.А., Клунова С.М., Живухина Е.А. Основы биотехнологии: Учеб. пособие для высш. нед. учеб. заведений. – М.: Изд. центр "Академия", 2003. – 208с.

Дополнительная

1. Биотехнология / Отв. ред. А.А. Баев. – М.: Наука, 1984. – 310с.
2. Бич Г., Бест Д., Брайерли К. и др. Биотехнология. Принципы и применение. – М.: Мир, 1988. – 480с.
3. Сассон А. Биотехнология: свершения и надежды. – М.: Мир, 1987. – 412с.
4. Бейли Дж., Оллис Д. Основы биохимической инженерии. В 2-х частях. – М.: Мир, 1989. – Ч.1 – 692с., Ч.2 – 590с.
5. Артамонов В.И. Биотехнология – агропромышленному комплексу. – М.: Наука, 1989. – 160с.
6. Сазыкин Ю.О. и др. Биотехнология / Под ред. А.В. Катлинского. – М.: ИЦ "Академия", 2007. – 256 с.
7. Неверова О.А. и др. Пищевая биотехнология продуктов и сырья растительного происхождения: Учебник. – Новосибирск: Сиб. унив., 2007. – 415 с.

Глава 1. Инженерная энзимология

1. Березин И.В. и др. Имобилизованные ферменты // Биотехнология. Кн.7. – М.: Высшая школа, 1987. – 160с.
2. Березин И.В. и др. Инженерная энзимология // Биотехнология. Кн.8. – М.: Высшая школа, 1987. – 144с.
3. Введение в прикладную энзимологию / Под ред. И.В. Березина и К. Мартинека. – М.: Изд-во МГУ, 1982. – 384с.
4. Крстович В.Л. Введение в энзимологию. М.: Наука, 1986. – 332с.
5. Лобанюк А.Г. и др. биотехнология микробных ферментов. – Минск.: Наука и техника, 1989. – 205с.

6. Фролов Ю.П. Управление биологическими системами. Молекулярный уровень. – Самара: Изд-во "Самарский университет", 1999. – 108с.

Глава 2. Клеточная инженерия

1. Бутенко Р.Г. и др. Клеточная инженерия // Биотехнология. Кн.3. – М.: Высшая школа, 1987. – 128с.
2. Катаева Н.В., Бутенко Р.Г. Клональное микроразмножение растений. – М.: Наука, 1983. – 98с.
3. Пол Дж. Культура клеток и тканей. – М.: Медгиз, 1963. – 348с.
4. Новые методы культуры животных тканей. – М.: Мир, 1976. – 256с.
5. Методы культивирования клеток / Отв. ред. Г.П. Пинаев. – Л.: Наука, 1988. – 314с.
6. Ченцов Ю.С. Введение в клеточную биологию. – М.: ИКЦ "Академкнига", 2004. – 494 с.
7. Дяттерев Н.Д. Клонирование: правда и вымысел. СПб.: ИК "Невский проспект", 2002. – 128с.
8. Борисов К. Стволовые клетки. СПб.: Наука и техника, 2006. – 288с.
9. Фролов Ю.П., Серых М.М. Управление биологическими системами. Клеточный уровень / Под ред. Ю.П. Фролова. – Самара: Изд-во "Самарский университет", 2000. – 116с.
10. Фролов Ю.П., Серых М.М., Инюшкин А.Н., Чепурнов С.А. Управление биологическими системами. Организменный уровень / Под ред. Ю.П. Фролова. – Самара: Изд-во "Самарский университет", 2001. – 318 с.

Глава 3. Промышленная микробиология

1. Воробьева Л.И. Техническая микробиология. – М.: Изд-во МГУ, 1987. – 168с.
2. Варфоломеев С.Д., Калюжный С.В. Биотехнология: Кинетические основы микробиологических процессов. – М.: Высшая школа, 1990. – 296с.
3. Елинов Н.П. Химическая микробиология. – М.: Высшая школа, 1989. – 448с.
4. Перт С.Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. – М.: Мир, 1978. – 332с.

5. Печуркин Н.С. и др. Популяционные аспекты биотехнологии. – Новосибирск: Наука, 1990. – 173с.
6. Производство белка на водороде / Отв. ред. И.И. Гительзон. – Новосибирск, 1981. – 150с.
7. Белянин В.Н. и др. Энергетика фотосинтезирующей культуры микроводорослей. – Новосибирск: Наука, 1980. – 136с.
8. Фролов Ю.П., Розенберг Г.С. Управление биологическими системами. Надорганизменный уровень / Под ред. Ю.П. Фролова. – Самара: Изд-во "Самарский университет", 2002. – 190с.

Глава 4. Экологическая биотехнология

1. Кузнецов А.Е. и др. Прикладная экобиотехнология. В 2-х томах. – М.: Бином. Лаборатория знаний. 2010. – Т.1 – 629с., Т.2 – 485с.
2. Экологическая биотехнология / Под. ред. К.Ф. Форстера и Д.А.Дж. Вейза. – Л.: Химия, 1990. – 384с.
3. Родионов А.И. и др. Техника защиты окружающей среды. – М.: Химия, 1989. – 512с.
4. Ковалева Н.Г., Ковалев В.Г. Биохимическая очистка сточных вод предприятий химической промышленности. – М.: Химия, 1987. – 158с.
5. Дроздов В.Д., Ксенофонтов Б.С. Очистка производственных сточных вод и утилизация осадков. – М.: Химия, 1988. – 112с.
6. Путилов А.В. и др. Охрана окружающей среды. – М.: Химия, 1991. – 224с.
7. Чурбанова И.Н. Микробиология. – М.: Высшая школа, 1987. – 240с.
8. Пономарев В.Г. и др. Очистка сточных вод нефтеперерабатывающих заводов. – М.: Химия, 1985. – 256с.

Глава 5. Биологическая нанотехнология

1. Пуд Ч., Оуэнс Ф. Нанотехнологии. – М.: Техносфера, 2005. – 336с.
2. Ратнер М., Ратнер Д. Нанотехнология: простое объяснение очередной гениальной идеи. – М.: ИД "Вильямс", 2004. – 240с.
3. Нолтинг Б. Новейшие методы исследования биосистем. – М.: Техносфера, 2005. – 256с.
4. Богданов К.Ю. Что могут нанотехнологии? – М.: Просвещение, 2009. – 96с.
5. Дебабов В.Г., Лившиц В.А. Современные методы создания промышленных штаммов микроорганизмов // Биотехнология. Кн. 2. – М.: Высшая школа, 1988. – 208с.

6. Дяттерев Н.Д. Генная инженерия: спасение или гибель человечества? – СПб: ИК "Невский проспект", 2002. – 126с.
7. Васильев Ю.М. Клетка как архитектурное чудо // Соросовский образовательный журнал. 1996, №2, с. 36 – 43; №4, с. 4 – 10; 1999, №6, с. 18 – 23; 2000, №6, с. 2 – 7; 2001, №11, с. 2 – 6.
8. Смит К.Ю.М. Биология сенсорных систем. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2005. – 583с.
9. Уильямс Л., Адамс У. Нанотехнологии. – М.: ЭКСМО, 2009. – 368с.
10. Уолкер Ш. Биотехнология. – М.: ЭКСМО, 2008. – 336с.
11. Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., Уотсон Дж. Молекулярная биология. В 5-и томах. – М.: Мир, 1986-1987.
12. Бодырев А.А. и др. Введение в биомембранологию / Под ред. А.А. Болдырева. – М.: Изд-во МГУ, 1990. – 208 с.
13. Мусил Я. и др. Современная биохимия в схемах. – М.: Мир, 1984. – 216 с.
14. Кагава Я. Биомембраны. – М.: Высшая школа, 1985. – 304 с.
15. Рамбиди Н.Г. Структура полимеров – от молекул до наносамблей: Учебное пособие. – Долгопрудный: ИД "Интеллект", 2009. – 264 с.
16. Фролов Ю.П., Серых М.М. и др. Биохимия и молекулярная биология: Учебное пособие для вузов / Под ред. Ю.П. Фролова. – Самара: Изд-во "Самарский университет", 2004. – 501 с.
17. Волькенштейн М.В. Биофизика. – М.: Наука, 1981. – 575 с.
18. Фролов Ю.П. Современные методы биохимии. – Самара: Изд-во "Самарский университет", 2003. – 412 с.

Глава 6. Процессы и аппараты биотехнологических производств

1. Плановский А.Н., Николаев П.И. Процессы и аппараты химической и нефтехимической технологии. – М.: Химия, 1987. – 496с.
2. Смирнов Н.Н. Биохимические реакторы. – Л.: Химия, 1987. – 72с.
3. Винаров А.Ю. и др. Ферментационные аппараты для процессов микробиологического синтеза. – М.: Дели принт, 2005. – 278с.
4. Фролов В.Ф. Лекции по курсу "Процессы и аппараты химической технологии". – СПб.: Химиздат, 2008. – 608 с.
5. Фролов Ю.П. Математические методы в биологии. ЭВМ и программирование: Теоретические основы и практикум. – Самара: Изд-во "Самарский университет", 1997. – 265 с.

Предисловие	3
Введение.....	5
Глава 1. Инженерная энзимология	15
1.1. Краткие сведения о ферментах.....	15
1.2. Основные закономерности ферментативной кинетики.....	17
1.3. Источники ферментов.....	22
1.4. Ферментные препараты.....	24
1.5. Выделение и очистка ферментов.....	25
1.6. Имобилизованные ферменты	28
1.7. Инактивация, стабилизация и реактивация ферментов	32
1.8. Области применения инженерной энзимологии	36
Глава 2. Клеточная инженерия	43
2.1. Теоретические основы клеточной инженерии и главные направления ее развития.....	43
2.2. Производство полезных соединений с помощью культуры растительных клеток.....	44
2.3. Клональное микроразмножение и оздоровление растений ..	51
2.4. Протопласты растительных клеток как объект биологического конструирования	55
2.5. Культивирование клеток человека и животных	59
Глава 3. Промышленная микробиология.....	67
3.1. Краткие сведения о микроорганизмах.....	67
3.2. Кинетика транспорта субстратов в клетку	68
3.3. Феноменология роста периодической культуры	72
3.4. Кинетика роста периодической культуры.....	74
3.5. Кинетика роста проточной культуры.....	77
3.6. Области применения промышленной микробиологии	83
Глава 4. Экологическая биотехнология	101
4.1. Загрязнение и очистка вод.....	101
4.2. Утилизация твердых отходов.....	113
4.3. Утилизация ксенобиотиков	116
4.4. Биологическая защита атмосферы от вредных выбросов....	117

Глава 5. Биологическая нанотехнология.....	120
5.1. Общие понятия бионанотехнологии.....	120
5.2. Лабораторная техника для работы с биологическими нанообъектами.....	121
5.3. Генетические нанотехнологии.....	130
5.4. Морфогенетические наноструктуры.....	140
5.5. Биосенсоры.....	145
5.6. Транспортные системы мембран.....	146
5.7. Механохимические системы.....	149
Глава 6. Процессы и аппараты биотехнологических производств..	151
6.1. Классификация биотехнологических процессов.....	151
6.2. Биотехнологические реакторы.....	151
6.3. Гидромеханические процессы и аппараты.....	159
6.4. Тепловые процессы и теплообменные аппараты.....	165
6.5. Массообменные процессы и аппараты.....	171
6.6. Механические процессы и аппараты.....	183
Литература.....	186

**ОСНОВНЫЕ УЧЕБНЫЕ ПОСОБИЯ И МОНОГРАФИИ ПРОФЕССОРА
САМАРСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УНИВЕРСИТЕТА**

Ю.П. ФРОЛОВА

1. **Фролов Ю.П.** Математические методы в биологии. – Куйбышев: Куйб. гос. ун-т, 1978. – 80 с.
2. **Фролов Ю.П., Дриваль В.И.** Физико-химические методы анализа в биологической химии. – Куйбышев: Куйб. гос. ун-т, 1981. – 68 с.
3. **Фролов Ю.П.** Математические методы в биологии. ЭВМ и программирование. Куйбышев: Куйб. гос. ун-т, 1987. – 148 с.
4. **Фролов Ю.П.** Введение в математическое моделирование биологических процессов. Часть 1. Молекулы и клетки. – Самара: Изд-во "Самарский университет", 1992. – 428 с.
5. **Фролов Ю.П.** Введение в математическое моделирование биологических процессов. Часть 2. Организмы и популяции. – Самара: Изд-во "Самарский университет", 1994. – 318 с.
6. **Фролов Ю.П.** Математические методы в биологии. ЭВМ и программирование: Теоретические основы и практикум. – Самара: Изд-во "Самарский университет", 1997. – 265 с.
7. **Фролов Ю.П.** Управление биологическими системами. Молекулярный уровень. – Самара: Изд-во "Самарский университет", 1999. – 108 с.
8. **Фролов Ю.П., Серых М.М.** Управление биологическими системами. Клеточный уровень / Под ред. Ю.П. Фролова. – Самара: Изд-во "Самарский университет", 2000. – 116 с.
9. **Фролов Ю.П.** Неконтактное действие бензоидных соединений на биологические системы. – Самара: Изд-во "Самарский университет", 2000. – 84 с.
10. **Фролов Ю.П., Серых М.М., Ипюшкин А.Н., Чепурнов С.А.** Управление биологическими системами. Организменный уровень / Под ред. Ю.П. Фролова. – Самара: Изд-во "Самарский университет", 2001. – 318 с.
11. **Фролов Ю.П., Розенберг Г.С.** Управление биологическими системами. Надорганизменный уровень / Под ред. Ю.П. Фролова. – Самара: Изд-во "Самарский университет", 2002. – 192 с.
12. **Фролов Ю.П.** Современные методы биохимии. – Самара: Изд-во "Самарский университет", 2003. – 412 с.
13. **Фролов Ю.П., Серых М.М., Макурина О.Н., Кленова Н.А., Подковкин В.Г.** Биохимия и молекулярная биология / Под ред. Ю.П. Фролова. – Самара: Изд-во "Самарский университет", 2004. – 501 с.
14. **Серых М.М., Фролов Ю.П.** Эволюционная биохимия / Под ред. Ю.П. Фролова. – Самара: Изд-во "Самарский университет", 2007. – 206 с.
15. **Фролов Ю.П.** Биотехнология и биологическая нанотехнология. – Самара, 2010. – 218 с.
16. **Фролов Ю.П., Васильева Т.И., Теньгаев Е.И.** Современные методы биохимии: лабораторный практикум / Под ред. проф. Ю.П. Фролова. – Самара: Изд-во «Самарский университет», 2011. – 192 с. (в печати)