

ВВЕДЕНИЕ В БИОТЕХНОЛОГИЮ

«Научные основы биотехнологии»

Основные вопросы

- Научные основы биотехнологии. Элементы биотехнологии.
- Техника и методы для культивирования микроорганизмов.
- Типы ферментационных процессов.
- Биологические агенты (клетки, микробные монокультуры и ассоциации, ферменты, культуры клеток и тканей, гибридомы, трансгенные организмы).
- Субстраты.
- Аппаратура для реализации биотехнологических процессов и получения конечного продукта.
- Совокупность методов для контроля и управления биотехнологическими процессами. Моделирование и оптимизация процессов получения целевых продуктов.
- Критерии оценки эффективности биотехнологических процессов

Комплексность биотехнологии

- Промышленная микробиология;
- медицинская биотехнология;
- технологическая биоэнергетика,
- сельскохозяйственная биотехнология;
- биогидрометаллургия;
- инженерная энзимология;
- клеточная и генетическая инженерия;
- экологическая биотехнология.

Элементы, слагающие биотехнологию

- Биологические агенты (клетки, микробные монокультуры и ассоциации, ферменты, культуры клеток и тканей, гибридомы, трансгенные организмы).
- Аппаратура для реализации биотехнологических процессов и получения конечного продукта.
- Совокупность методов для контроля и управления биотехнологическими процессами. Моделирование и оптимизация процессов получения целевых продуктов.
- Продукт.

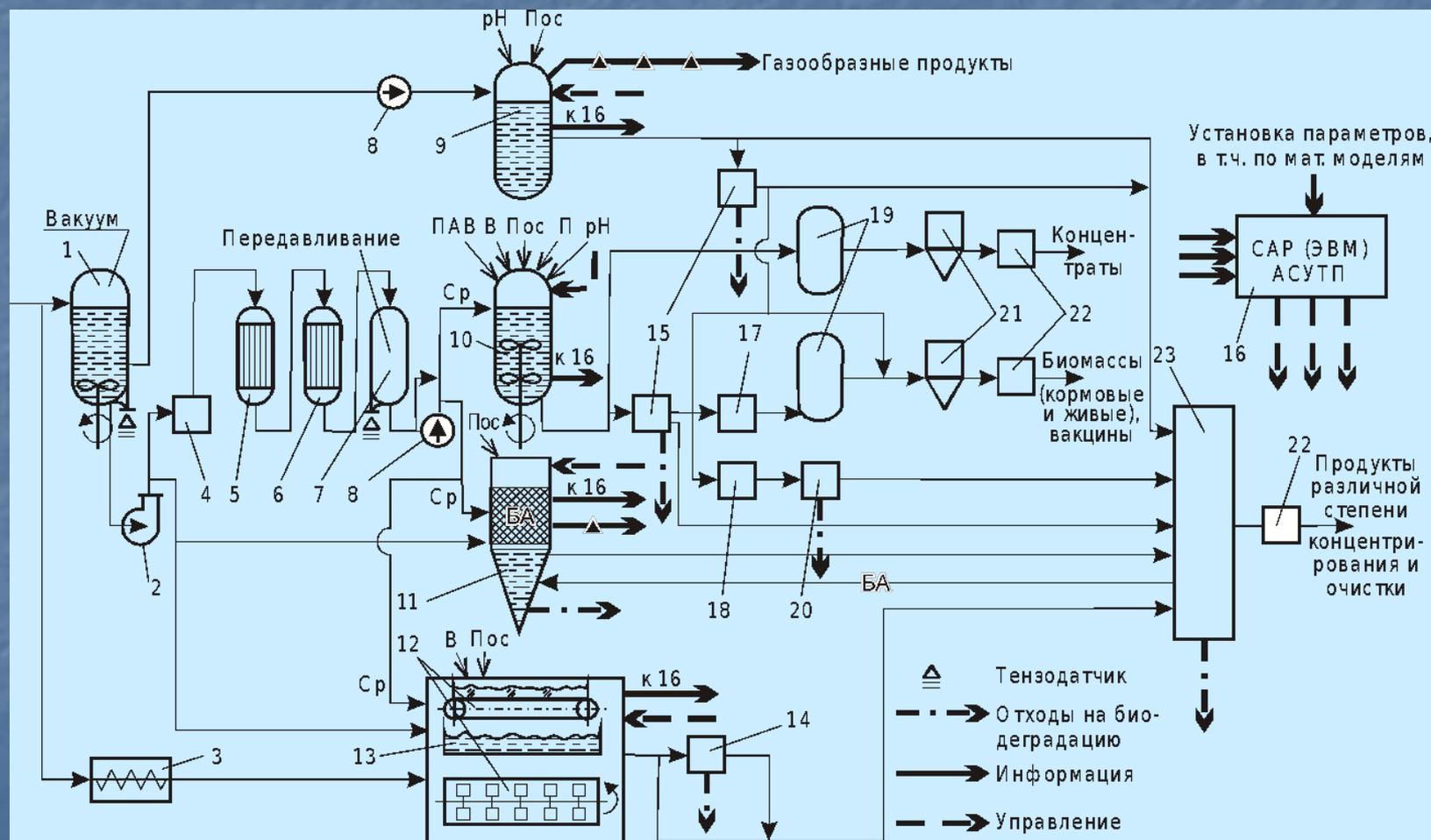
Области науки, новейшие результаты которых важны для развития биотехнологии

Генетическая инженерия	Технология рекомбинантных ДНК
Биокатализ	Ферменты (выделение, иммобилизация). Целые микробные клетки (иммобилизация, стабилизация)
Иммунология	Моноклональные антитела
Технология ферментации	Производство продуктов. Переработка отходов

Междисциплинарная природа биотехнологии



Принципиальная схема реализации биотехнологических процессов (У. Э. Виестур и др., 1987)



Блоки технологической схемы

- 1 – реактор для приготовления сред;
- 2 – вихревой насос;
- 3 – аппарат для приготовления твердых сред;
- 4 – паровая колонка для подогрева сред до температуры стерилизации;
- 5 – выдерживатель сред при температуре стерилизации;
- 6 – теплообменник для охлаждения сред;
- 7 – мерник-сборник питательной среды;
- 8 – дозатор;
- 9 – анаэробный ферментер;
- 10 – глубинный аэробный ферментер;
- 11 – биокаталитический реактор;
- 12 – ферментер для поверхностной твердофазной ферментации;
- 13 – то же для поверхностной жидкостной ферментации;
- 14 – экстрактор;

Блоки технологической схемы (продолжение)

- 15 – сепаратор для отделения биомассы;
- 16 – система локальной автоматики;
- 17 – плазмолизатор биомассы;
- 18 – дезинтегратор биомассы;
- 19 – выпарная установка;
- 20 – фракционирование дезинтегратов;
- 21 – сушилка и другие аппараты для обезвоживания;
- 22 – аппаратура для расфасовки продукта;
- 23 – ионообменные колонны, аппараты для химических и мембранных методов выделения, центрифуги, фильтры, кристаллизаторы и др. устройства;
- рН – раствор для коррекции рН, П – компоненты и среды для подпитки, Пос – посевной материал, В – сжатый воздух, ПАВ – пеногаситель, Ср – стерильная питательная среда, БА – биологический агент.

Типы ферментационных процессов

Микроорганизмы, используемые в промышленности для получения целевых продуктов

Организм	Тип	Продукт
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Дрожжи	Пекарские дрожжи, вино, эль, саке
<i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Propionibacterium shermanii</i>	Бактерии Бактерии	Йогурт Швейцарский сыр
<i>Gluconobacterium suboxidans</i>	Бактерии	Уксус
<i>Penicillium roquefortii</i>	Плесень	Сыры типа рокфора
<i>Aspergillus oryzae</i>	Плесень	Саке
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Дрожжи	Этанол
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Бактерии	Ацетон
<i>Xanthomonas campestris</i>	Бактерии	Полисахариды
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Бактерии	L-Лизин
<i>Candida utilis</i>	Дрожжи	Микробный белок
<i>Propionibacterium</i>	Бактерии	Витамин B ₁₂
<i>Aspergillus oryzae</i>	Плесень	Амилаза
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Дрожжи	Лактаза
<i>Saccharomycopsis lipolytica</i>	Дрожжи	Липаза
<i>Bacillus</i>	Бактерии	Протеазы

Микроорганизмы, используемые в промышленности для получения целевых продуктов (продолжение)

Организм	Тип	Продукт
<i>Endothia parasitica</i>	Плесень	Сычужный фермент
<i>Leocanostoc mesenteroides</i>	Бактерии	Декстран
<i>Xanthomonas campestris</i>	Бактерии	Ксантан
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Плесень	Пенициллины
<i>Chehalosporium acremonium</i>	Плесень	Цефалоспорины
<i>Rhizopus nigricans</i>	Плесень	Трансформация стероидов
Гибридомы	–	Иммуноглобулины и моноклональные антитела
Клеточные линии млекопитающих	–	Интерферон
<i>E. coli</i> (рекомбинантные штаммы)	Бактерии	Инсулин, гормон роста, интерферон
<i>Blakeslea trispora</i>	Плесень	β -Каратин
<i>Phaffia rhodozyma</i>	Дрожжи	Астаксантин
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Бактерии	Биоинсектициды
<i>Bacillus popilliae</i>	Бактерии	Биоинсектициды

Субстраты

Важнейшие группы субстратов, биологических агентов и образуемых в биотехнологических процессах продуктов (Виестур и др., 1987)

Субстраты	Биологические агенты	Продукты
Меласса, сок сахарного тростника, гидролизаты растительных полимеров	Микроорганизмы, растительные и животные клетки,	Биоудобрения и биоинсектициды, микробные биомассы, диагностикумы, вакцины
Сахара, спирты, органические кислоты Парафины нефти Полупродукты, предшественники биотрансформации Природный газ, водород Отходы с/х и лесной промышленности Отходы промышленности, в том числе переработки фруктов и овощей Бытовые отходы, сточные воды Молочная сыворотка Картофель, зерно Зеленая биомасса растений	Вирусы Компоненты клеток: мембраны, протопласты, митохондрии, ферменты Внеклеточные продукты: ферменты, коферменты Иммобилизованные клетки микроорганизмов, растений и животных, их компоненты и внеклеточные продукты	Биогаз Чистые продукты, медикаменты, диагностикумы Гормоны и др. продукты биотрансформации Органические кислоты Полисахариды Белок одноклеточных Пищевые продукты Экстракты, гидролизаты Спирты, органические растворители Антибиотики Аминокислоты Ферменты, витамины Металлы, неметаллы Моноклональные антитела

Совокупность методов для контроля и управления биотехнологическими процессами. Моделирование и оптимизация процессов получения целевых продуктов

Величины и расчетные параметры, применяемые для управления биотехнологическими процессами

Измеряемые параметры	Расчеты на базе измерений
<p>Концентрация основных субстратов и продуктов в культуральной среде (сахара, спирты, органические кислоты и пр.)</p>	<p>Продуктивность ($\text{кг/м}^3 \text{ ч}$) Удельная скорость роста, μ (ч^{-1}) Удельная скорость потребления субстрата, q_s ($\text{кг/кг}\cdot\text{ч}$)</p>
<p>Концентрации важнейших внутриклеточных компонентов (ферменты метаболизма углерода, ключевые метаболиты, АТФ, НАДФ и др.)</p> <p>Концентрация биомасс</p> <p>Состав микрофлоры в культуре.</p> <p>Концентрация растворенных O_2 и CO_2 в культуральной среде</p> <p>Уровень и состояние пены</p> <p>Концентрация целевого продукта</p>	<p>Удельная скорость образования продукта, q_p ($\text{кг/кг}\cdot\text{ч}$)</p> <p>Экономический коэффициент, Y_p, Y_x (кг/кг)</p> <p>Объемный коэффициент массопередачи по кислороду, $K_{v\text{O}_2}$ (ч^{-1})</p> <p>Энергетический выход биосинтеза, η</p> <p>Теплопродукция</p> <p>Суммарный удельный расход сырья</p>

- Промышленная микробиология

«Промышленная микробиология: процессы производства полезных веществ»

- Промышленный биосинтез белковых веществ. Особенности возникновения отрасли, современное состояние и перспективы развития.
- Субстраты 1-го поколения для получения белково-витаминных концентратов. Субстраты II-го поколения: углеводороды. Особенности микробного роста на углеводородах и ферментации. Выход продукта и его состав. Субстраты III-го поколения: особенности получения белка одноклеточных на спиртах и природном газе.
- Микробиологическое получение целевых продуктов. Аминокислоты.

Промышленные биосинтез белковых веществ. Особенности возникновения отрасли, современное состояние и перспективы развития

Химический состав микробных биомасс и традиционных белковых продуктов (Waterworth, 1982)

Состав, %	Водоросли	Нитчатые грибы	Дрожжи	Бактерии	Соя	Рыбная мука
Белок	47–63	31–50	47–56	72–83	45	64
Жиры	7–20	2–8	2–6	1–3	1	9
Зола	7	2	6	8	6	18
Лизин	2.4	1.5	4.2	4.1	2.8	4.0
Метионин- Цистеин	1.7	0.8	1.7	2.3	1.3	2.8
Нуклеи- новые кислоты	3–8	9	6–12	8–16	Нет	Нет

Субстраты I-го поколения для получения белково-витаминных концентратов.
Субстраты II-го поколения: углеводороды. Особенности микробного роста на углеводородах и ферментации. Выход продукта и его состав.
Субстраты III-го поколения: особенности получения белка одноклеточных на спиртах и природном газе

Сопоставление продуктивности высших растений и Spirulina (А. Сассон, 1987)

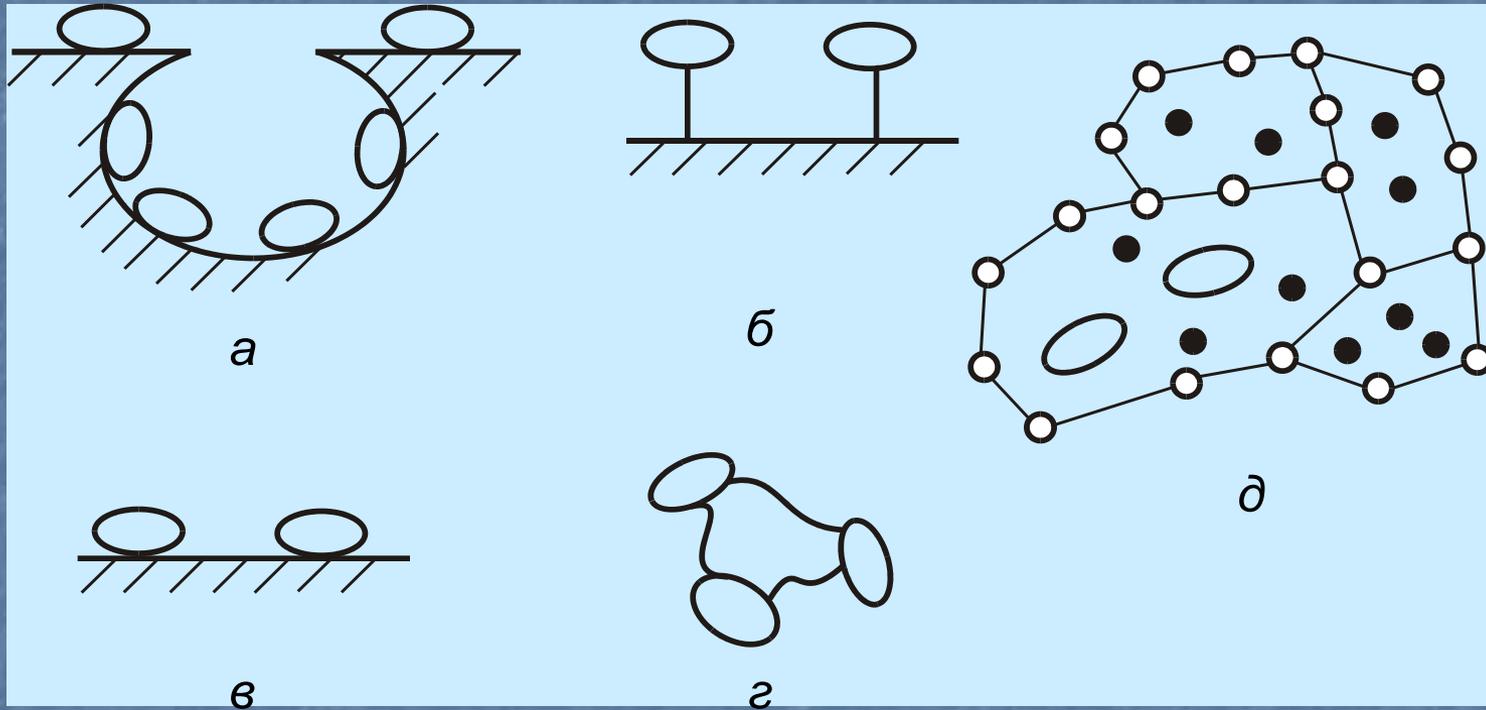
Продуцент	Выход, т/га/год	
	Вес (АСБ)	Неочищенный белок
Пшеница	4	0.5
Кукуруза	7	1.0
Соевые бобы	6	2.4
Spirulina	50	35.0

Инженерная энзимология

«Инженерная энзимология»

- Ферментные препараты, особенности получения, применения. Продуценты и среды. Типы ферментационных процессов /твердофазное поверхностное и глубинное/. Аппаратура. Технологический цикл и стадийность процесса производства ферментов. Методы выделения и очистки. Применение.
- Имобилизованные ферменты. Методы иммобилизации ферментов.
- Особенности процессов на основе иммобилизованных ферментов. Типы реакционных аппаратов. Процессы получения целевых продуктов на основе иммобилизованных ферментов. Биологические микроустройства. Типы ферментных электродов. Биолюминесцентный микроанализ.

Основные методы иммобилизации ферментов



а – абсорбция на крупнопористом носителе; б – ковалентное связывание;
в – адсорбция; г – поперечная сшивка; д – включение в гель

Особенности процессов на основе иммобилизованных ферментов.
 Типы реакционных аппаратов. Процессы получения целевых продуктов на основе
 иммобилизованных ферментов. Биологические микроустройства.
 Типы ферментных электродов. Биолюминесцентный микроанализ

Иммобилизованные ферменты, используемые в промышленности

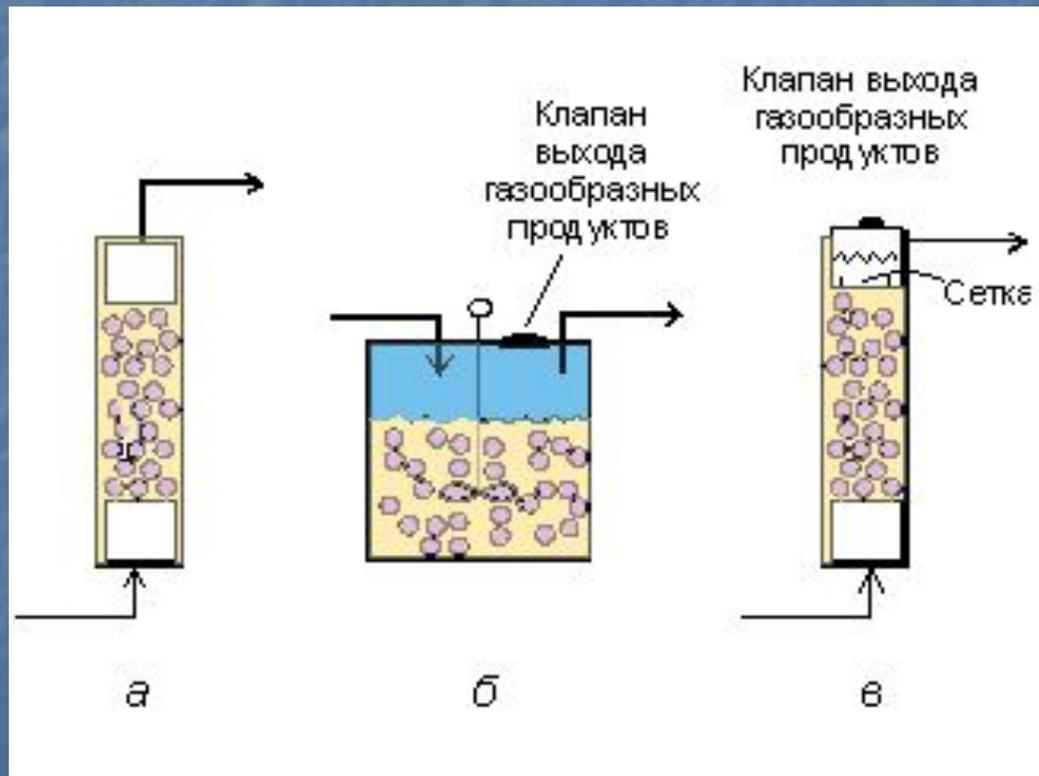
Иммобилизованный фермент	Объемы выпуска, т/г	Получаемый продукт	Страна
Аминоацилаза	Менее 5	L-аминокислоты	Япония
Аминоглюкозидаза	1	Глюкоза	Англия
Глюкозоизомераза	1500–1750	Глюкозо-фруктозные сиропы	Дания, Нидерланды, Япония
Гидантоиназа	Менее 1	D-фенилглицин-	Япония
Лактаза	5	Лактозные гидролизаты	Япония
Нитрилаза	0.1	Акриламид	Япония
Пенициллин G-ацилаза	3–4	6 АПК	Япония, Нидерланды
Пенициллин V-ацилаза	1	6 АПК	Англия, Австрия

Особенности процессов на основе иммобилизованных ферментов.

Типы реакционных аппаратов. Процессы получения целевых продуктов на основе иммобилизованных ферментов. Биологические микроустройства.

Типы ферментных электродов. БиOLUMИнесцентный микроанализ

Конструкция биореакторов на основе иммобилизованных ферментов (Дж. Вудворд, 1988)



Особенности процессов на основе иммобилизованных ферментов.

Типы реакционных аппаратов. Процессы получения целевых продуктов на основе иммобилизованных ферментов. Биологические микроустройства.

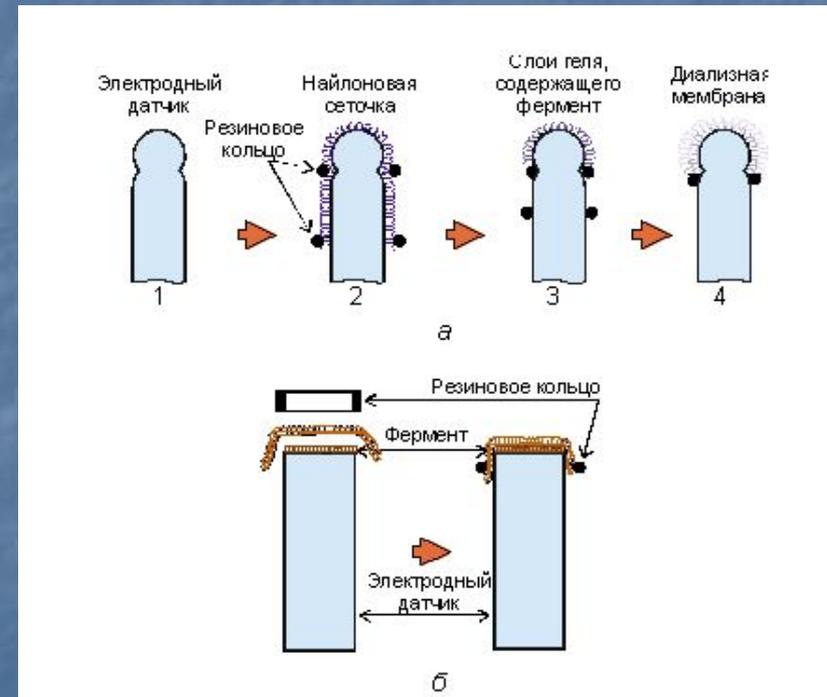
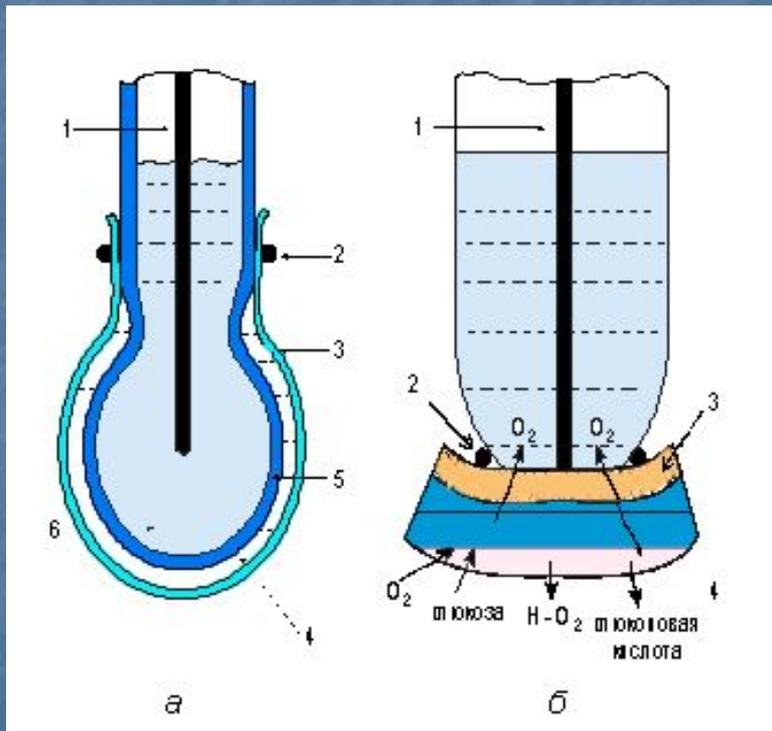
Типы ферментных электродов. Биоломинесцентный микроанализ

Типичные ферментные электроды и их параметры (Дж. Вудворд, 1988)

Определяемое вещество	Фермент	Датчик	Стабильность	Время реакции	Чувствительность, М/л
Мочевина	Уреаза	Катионный Газовый (NH ₃)	3 недели 1 мес.	30–60 с 2–4 мин	10 ⁻² –5 · 10 ⁻⁵ до 5 · 10 ⁻⁴
Глюкоза	Глюкозооксидаза	pH-электрод Газовый (O ₂)	1 неделя 3 недели	5–10 мин 2–5 мин	10 ⁻¹ –10 ⁻³ 2 · 10 ⁻⁴
L-аминокислоты	Оксидаза L-аминокислот	Pt(H ₂ O ₂)	4–6 мес.	12 с	10 ⁻³ –10 ⁻⁵
Спирты	Алкогольоксидаза	Pt(H ₂ O ₂)	1 неделя	12 с	0.5–100 мг/ %
Пенициллин	Пенициллиназа	pH-электрод	2 недели	0.5–2 мин	10 ⁻² –10 ⁻⁴
Мочевая кислота	Уратоксидаза	Pt(H ₂ O ₂)	4 мес.	30 с	10 ⁻² –10 ⁻⁴
Нитрат	Нитратредуктаза	NH ⁴⁺	2–3 мин	–	10 ⁻² –10 ⁻⁴
Нитрит	Нитритредуктаза	Газовый (NH ₃)	3–4 мес.	2–3 мин	5 · 10 ⁻² –5 · 10 ⁻⁴
Сульфат	Акрилсульфатаза	Pt	1 мес.	1 мин	10 ⁻¹ –10 ⁻⁴

Особенности процессов на основе иммобилизованных ферментов.
Типы реакционных аппаратов. Процессы получения целевых продуктов на основе иммобилизованных ферментов. Биологические микроустройства.
Типы ферментных электродов. Биолуминесцентный микроанализ

Изготовление ферментных электродов. Ферментный электрод для определения глюкозы

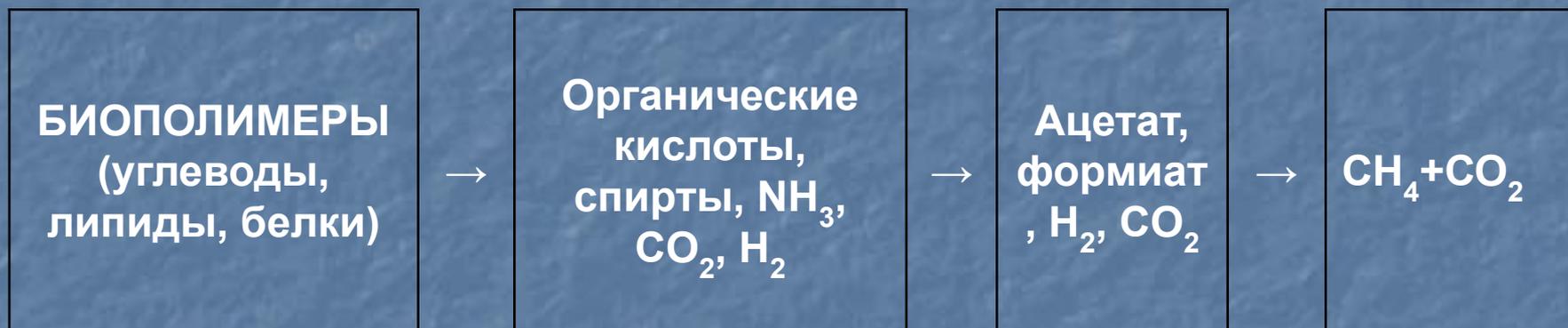


Технологическая биоэнергетика
и биологические процессы
переработки минерального сырья

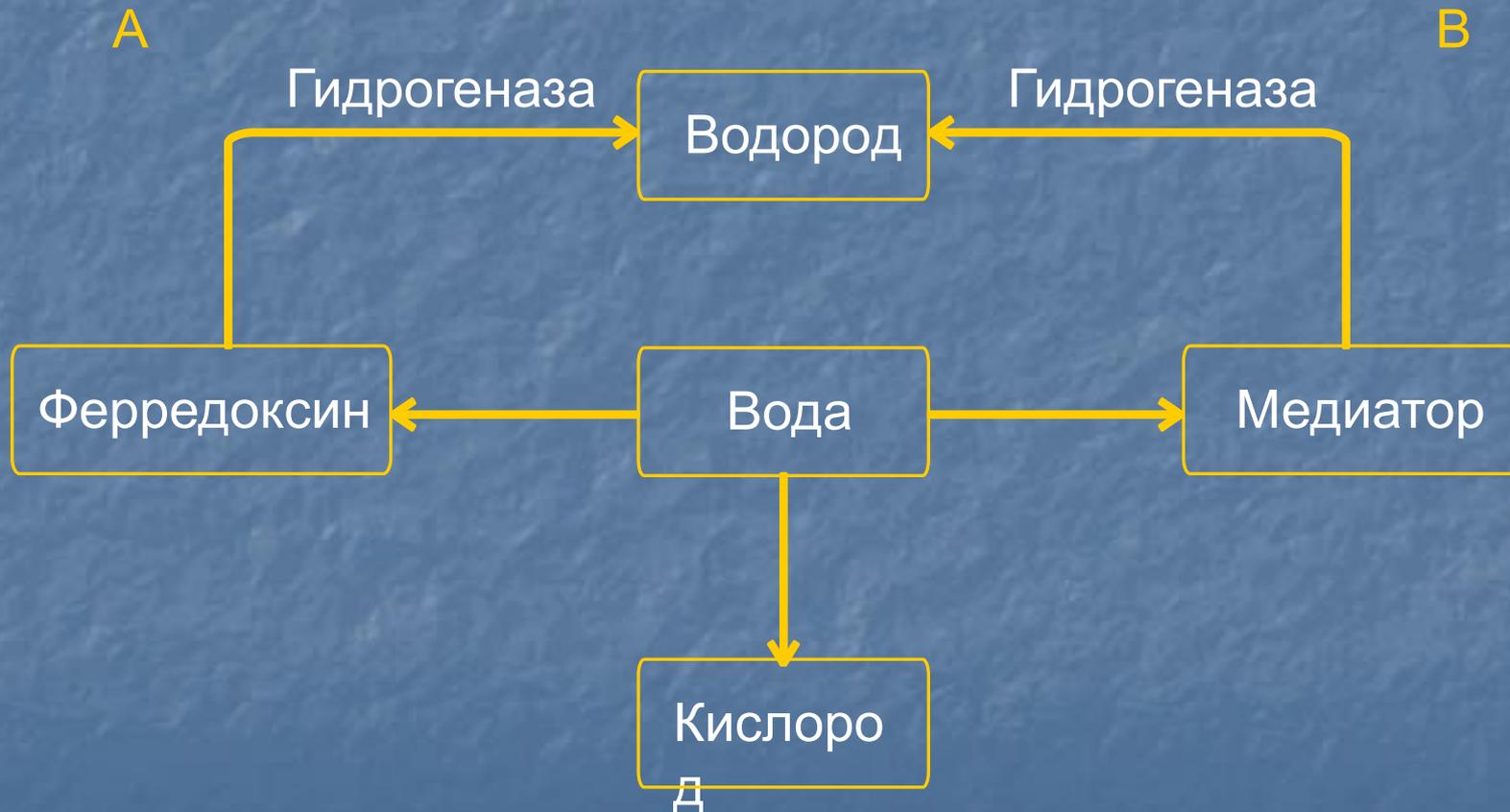
«Технологическая биоэнергетика и биологические процессы переработки минерального сырья»

- Биотехнология в решении энергетических проблем. Получение биогаза, спирта из промышленных и сельскохозяйственных отходов.
- Микробное выщелачивание и биогидрометаллургия металлов. Химизм процесса микробного взаимодействия с минералами и горными породами.
- Методы извлечения металлов (подземное, кучное, чановое). Использование микроорганизмов в процессах добычи полезных ископаемых.

Процессы деструкции органических субстратов

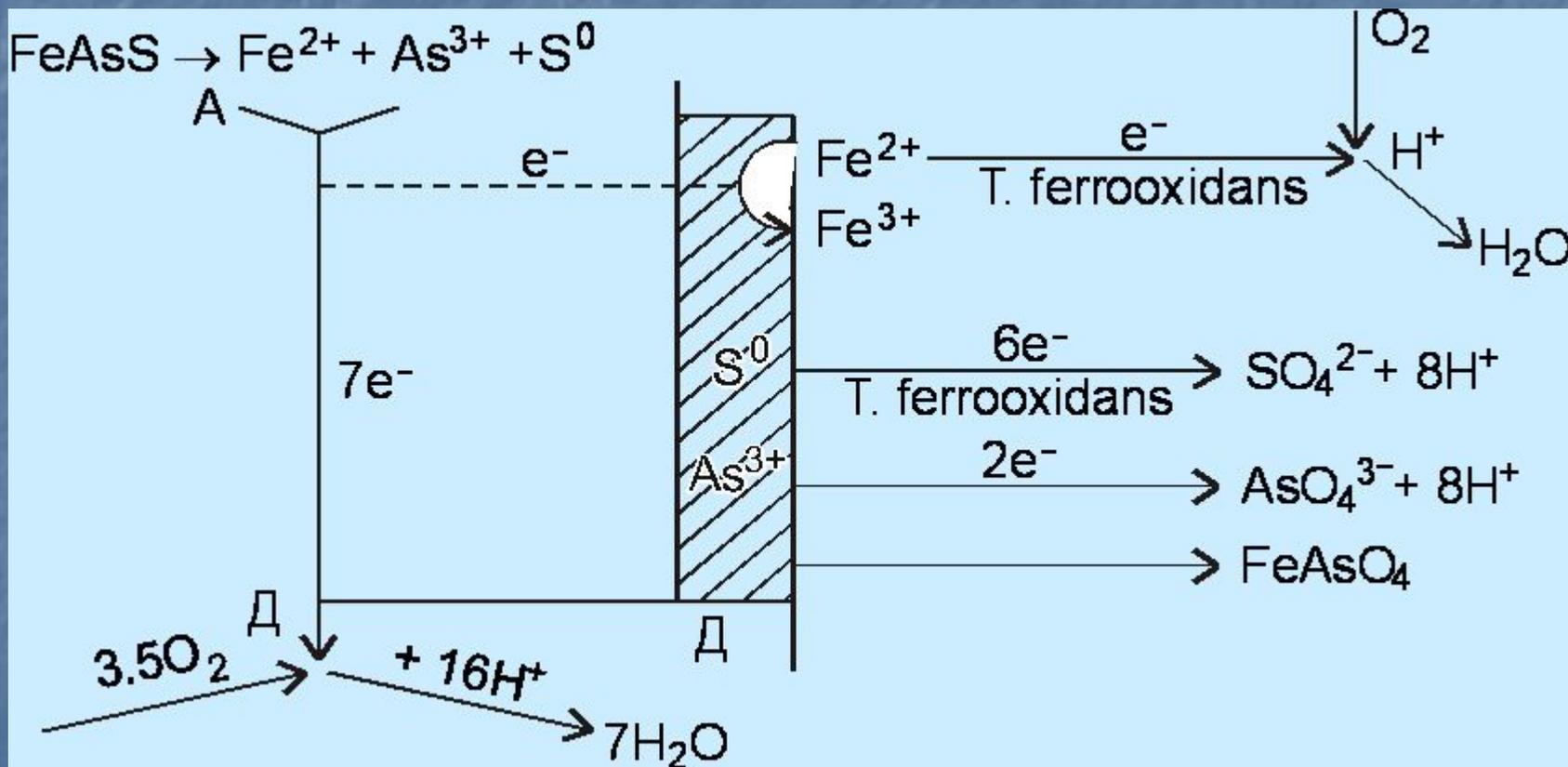


Биологическое получение водорода



Микробное выщелачивание и биогехнология металлов. Химизм процесса микробного взаимодействия с минералами и горными породами

Модель бактериально-химического окисления арсенопирита *Thiobacillus ferrooxidans*



А – анод; К – катод; Д – диффузионный слой

Схема бактериального выщелачивания меди из куч или отвалов руды

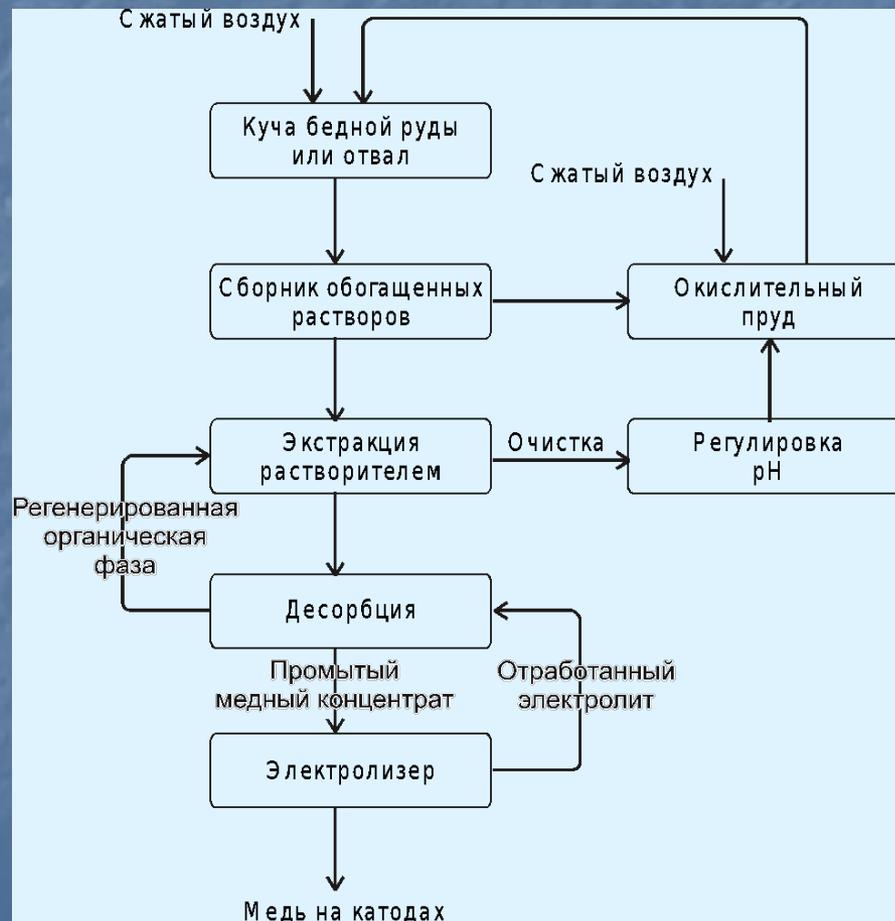
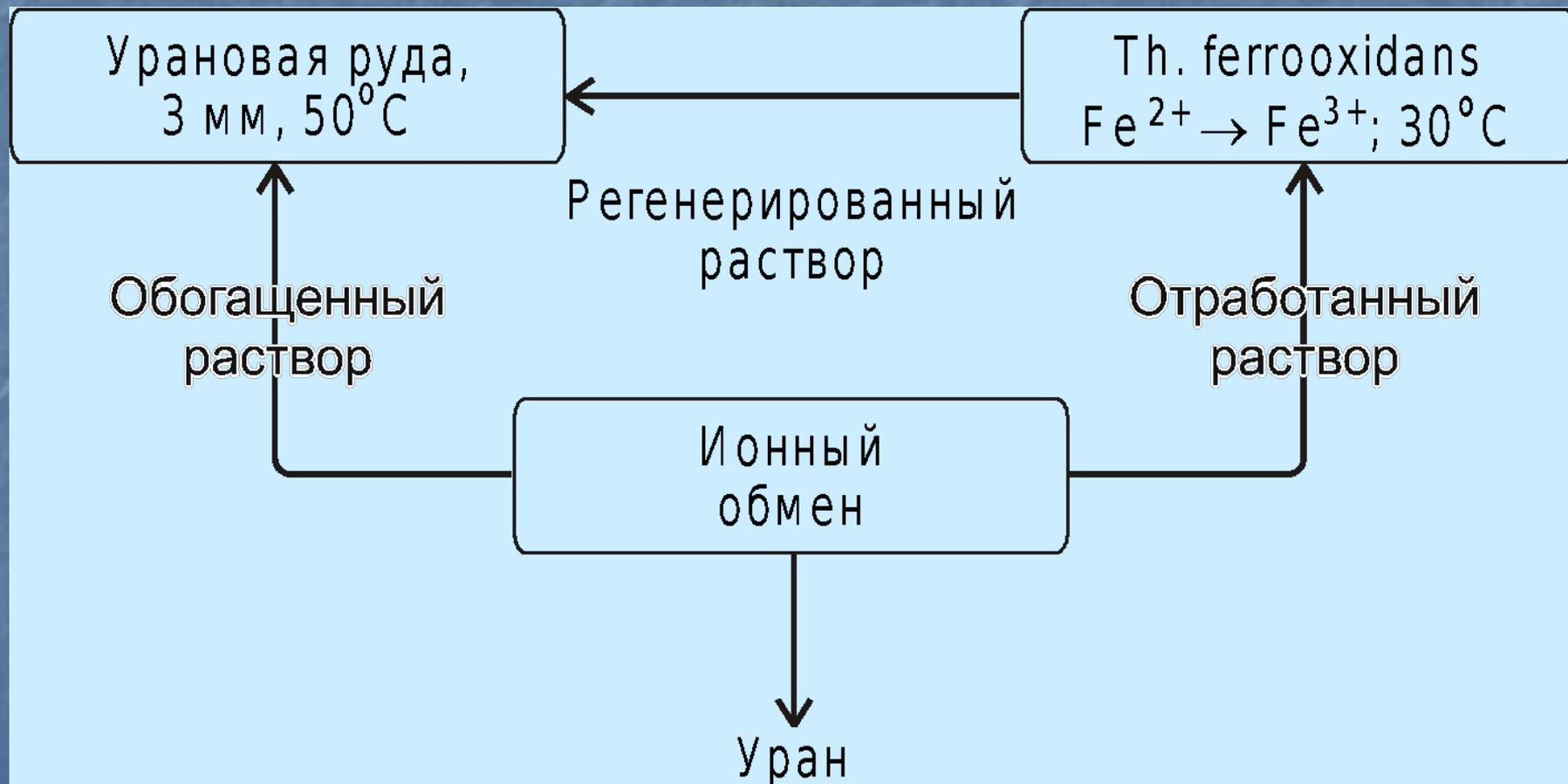


Схема выщелачивания урановой руды



Методы извлечения металлов (подземное, кучное, чановое).
Использование микроорганизмов в процессах добычи полезных ископаемых

Биосорбция металлов из растворов (К. Браейерли и др., 1988)



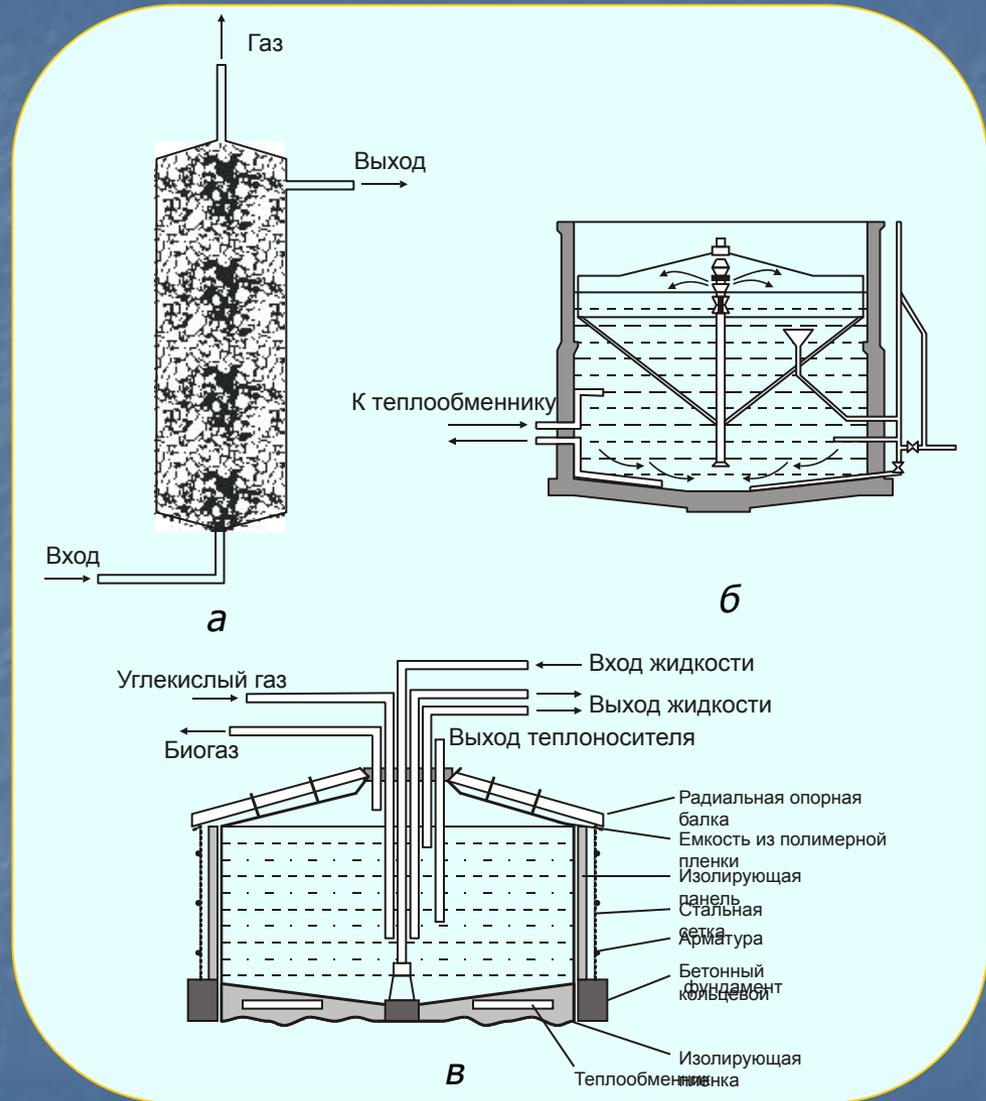
Биотехнология и проблемы защиты окружающей среды

«Биотехнология и проблемы защиты окружающей среды»

- Принципы биологических методов аэробной и анаэробной переработок отходов. Анаэробные методы переработки отходов сельскохозяйственных производств.
- Биотехнологические методы переработки городских стоков. Промышленные биофильтры и аэротенки.
- Применение биотехнологических методов для очистки газовоздушных выбросов и деградации ксенобиотиков

Принципы биологических методов аэробной и анаэробной переработки отходов

Типы установок для очистки сточных вод пищевой промышленности:
а – анаэробный биофильтр;
б – установка с винтовым насосом для перемешивания;
в – высокоскоростной реактор Коулзерда
(Дж. Бест и др., 1988)



Промышленные биофильтры и аэротенки



Биопленка, формирующаяся на поверхности фильтрующего слоя биофильтра, представляет собой сложную экологическую систему (К. Форстер, Д. Вейз, 1990)

Промышленные биофильтры и аэротенки

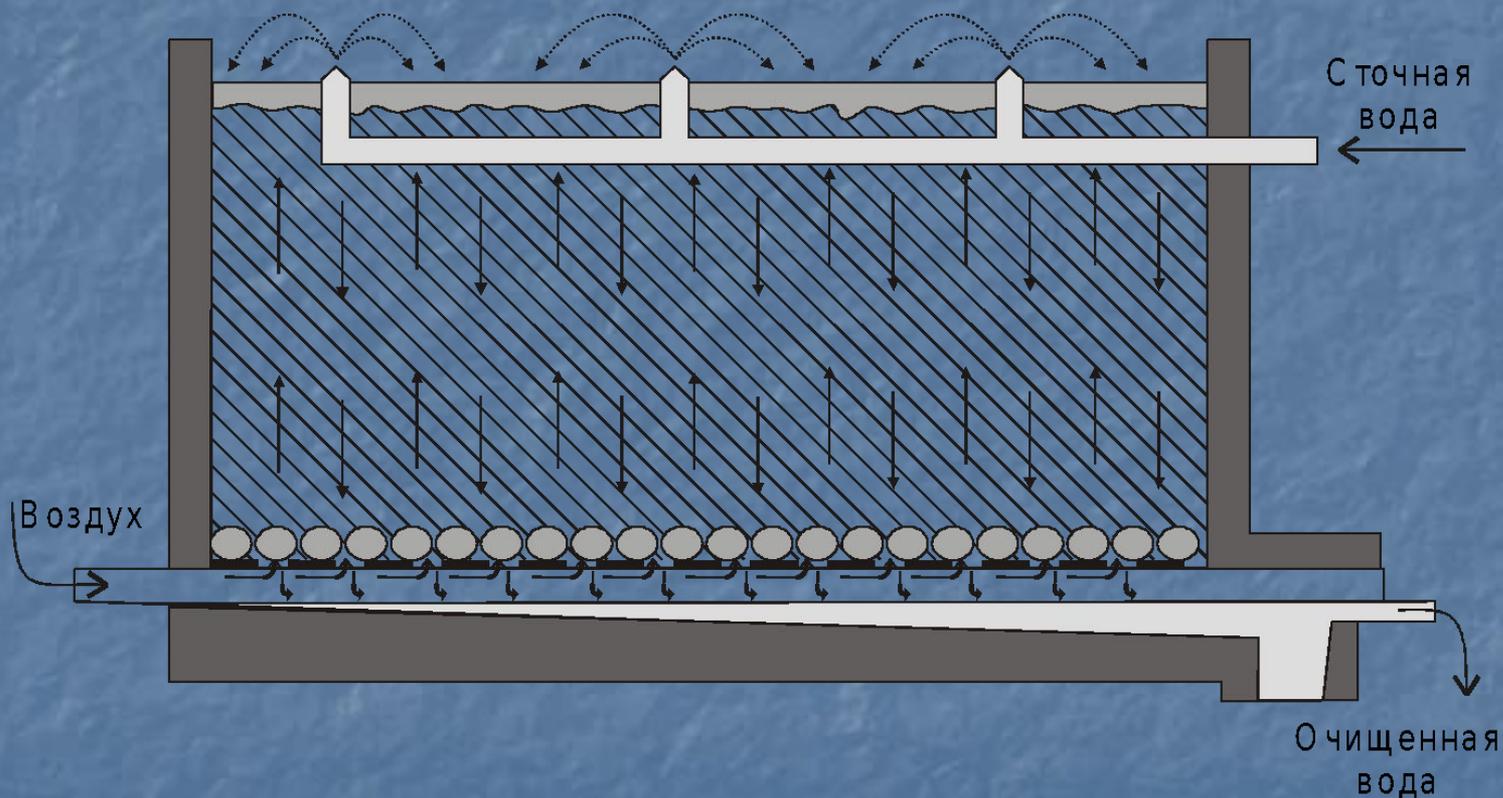


Схема биофильтра (М. С. Мосичев, 1982)

Применение биотехнологических методов
для очистки газоздушных выбросов и деградации ксенобиотиков

Классификация установок биологической очистки воздуха (И. Б. Уткин, 1989)

Тип установки	Рабочее тело	Водный режим	Основная стадия удаления примесей из воздуха	Источник минеральных солей
Биофильтр	Фильтрующий слой – иммобилизованные на природных носителях микробные клетки	Циркуляция воды отсутствует	1. Десорбция материалом фильтрующего слоя. 2. Деструкция микробными клетками	Материал фильтрующего слоя
Биоскруббер	Вода, активный ил	Циркуляция воды	1. Абсорбция в абсорбере водой. 2. Деструкция в аэротенке активным илом	Минеральные соли вносят в воду
Биореактор с омываемым слоем	Иммобилизованные на искусственных носителях микробные клетки	Циркуляция воды	1. Диффузия через водную пленку к микроорганизмам. 2. Деструкция в биологическом слое	Минеральные соли вносят в воду

Клеточная и генетическая инженерия

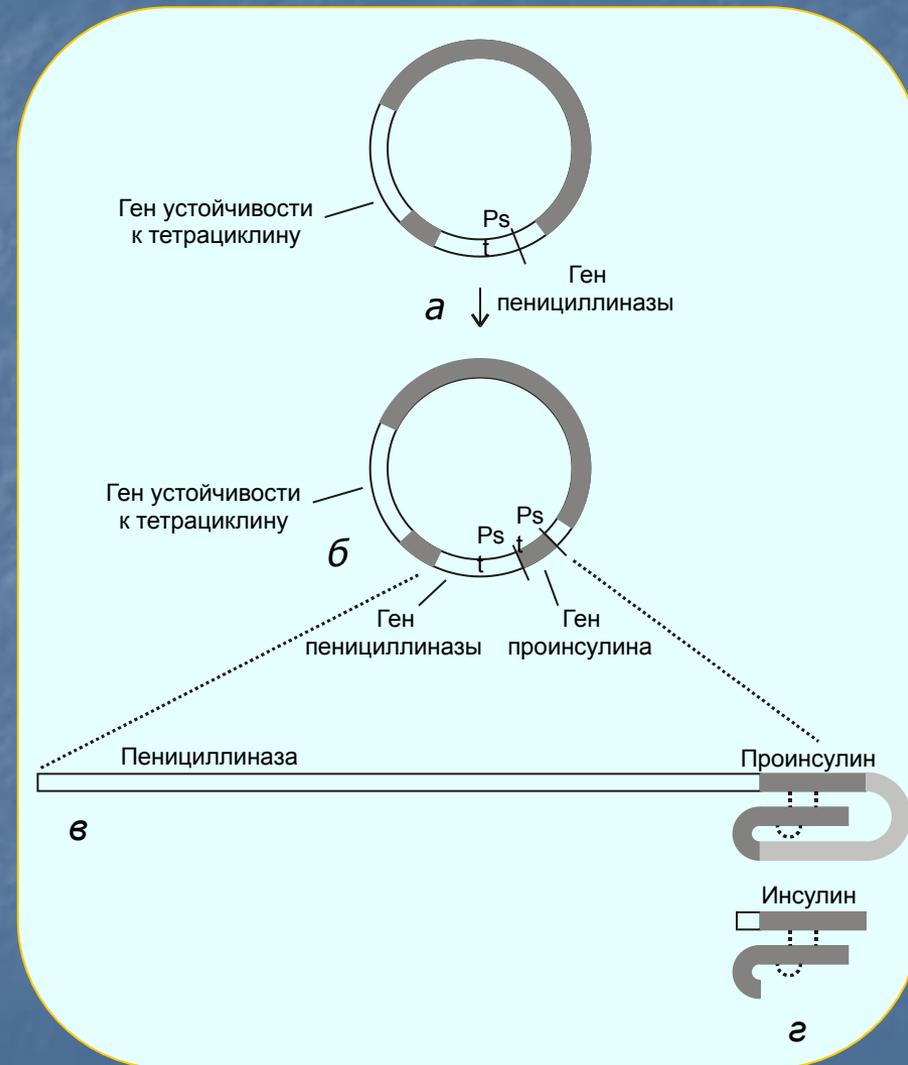
«Клеточная и генетическая инженерия»

- Генетическая инженерия: принципы, возможности. Области применения биологических агентов, полученных методами генетической инженерии.
- Технологии генетического конструирования организмов *in vitro*. Источники ДНК для клонирования генов / рестрикция, ферментный и химико-ферментный синтез генов/. Методы введения ДНК. Экспрессия генов в рекомбинантных ДНК. Генная инженерия промышленно-важных продуцентов инсулина, соматотропина, интерферонов.
- Клеточная инженерия. Получение биологических агентов методами клеточной инженерии *in vivo*. Мутагенез. Методы получения и выделения мутантов. Гибридизация эукариотических клеток. Плазмиды и конъюгация у бактерий. Фаги и трансдукция. Техника слияния протопластов. Гибридомы. Получение и применение моноклональных антител.

Генная инженерия промышленно-важных продуцентов инсулина, соматотропина, интерферонов

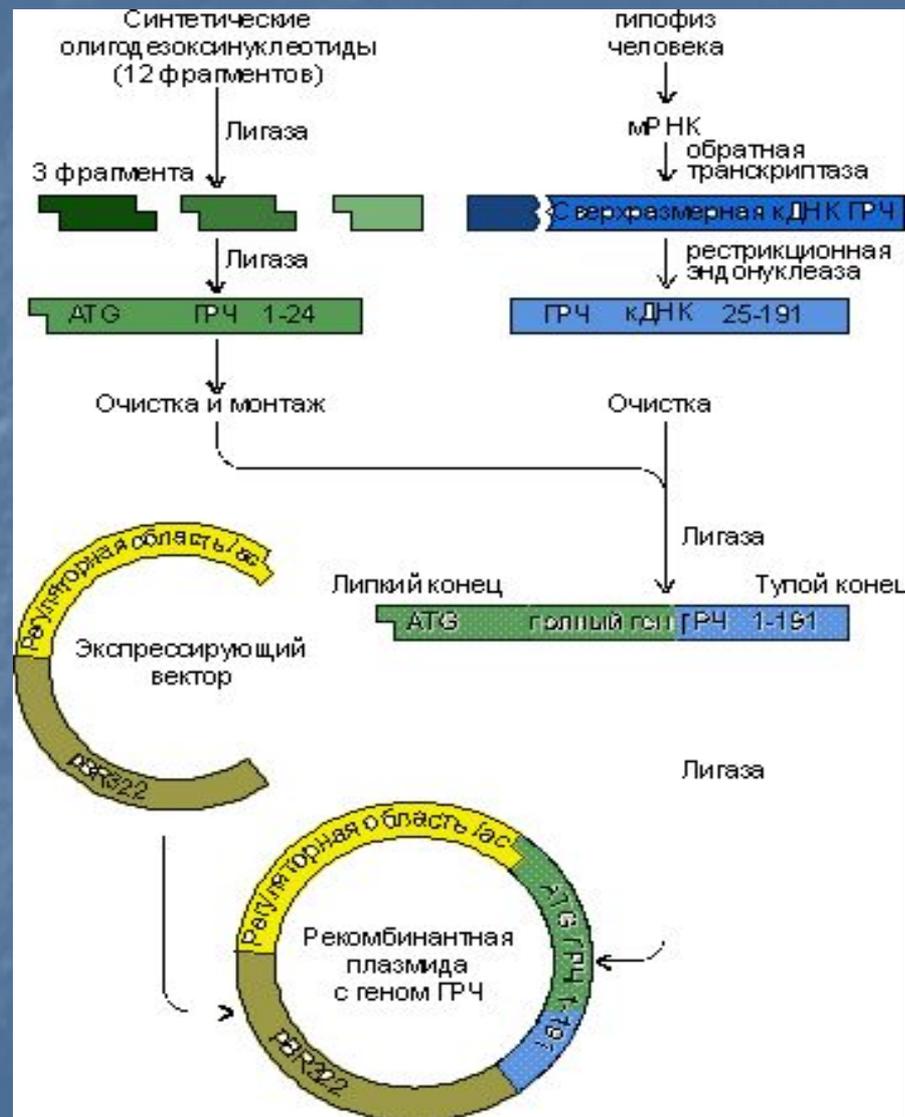
Биосинтез инсулина крысы в сконструированных клетках *E. Coli* (Gilbert e.a., 1980)

- а* – карта плазмиды pBR322 с двумя генами – пенициллиназы и устойчивости к тетрациклину;
- б* – карта, полученная при определении последовательности кДНК рекомбинантной плазмиды в продуцирующем инсулин клоне *E. coli*;
- в* – гибридный белок;
- г* – биологически активный инсулин после удаления пенициллиназы и сегмента проинсулина



Генная инженерия промышленно важных продуцентов инсулина, соматотропина, интерферонов

Схема
конструирования
гена соматотропина
комбинацией
химического синтеза
и выделенной мРНК
(P. Newmark, 1979)



Возможность получения ряда веществ в культуре животных клеток

Продукт	Клетки или их источник
Гормон роста	Опухоль гипофиза
Коллаген	Фибробласты
Кортикостероиды	Опухоль надпочечника
Гистамин	Опухоль из тучных клеток
Меланин	Меланома радужной оболочки сетчатки
Мукополисахариды	Фибробласты
Фактор роста нервной ткани	Нейробластома

Возможные области и способы применения антител (И. Хиггинс, 1988)

Область медицины	Способ применения
Анализ	Структурные зонды для идентификации поверхностных особенностей клеток
Диагностика	Наборы реактивов для диагностики беременности; выявление эстрогенных рецепторов для диагностики рака молочной железы
Иммунодиагностика	Точное определение количества специфических антигенов
Иммуноочистка	Очистка антигенов (например интерферона)
Терапия	Направленный перенос токсинов в раковые клетки, инактивация ядов, пассивная иммунизация, лечение аутоиммунных болезней

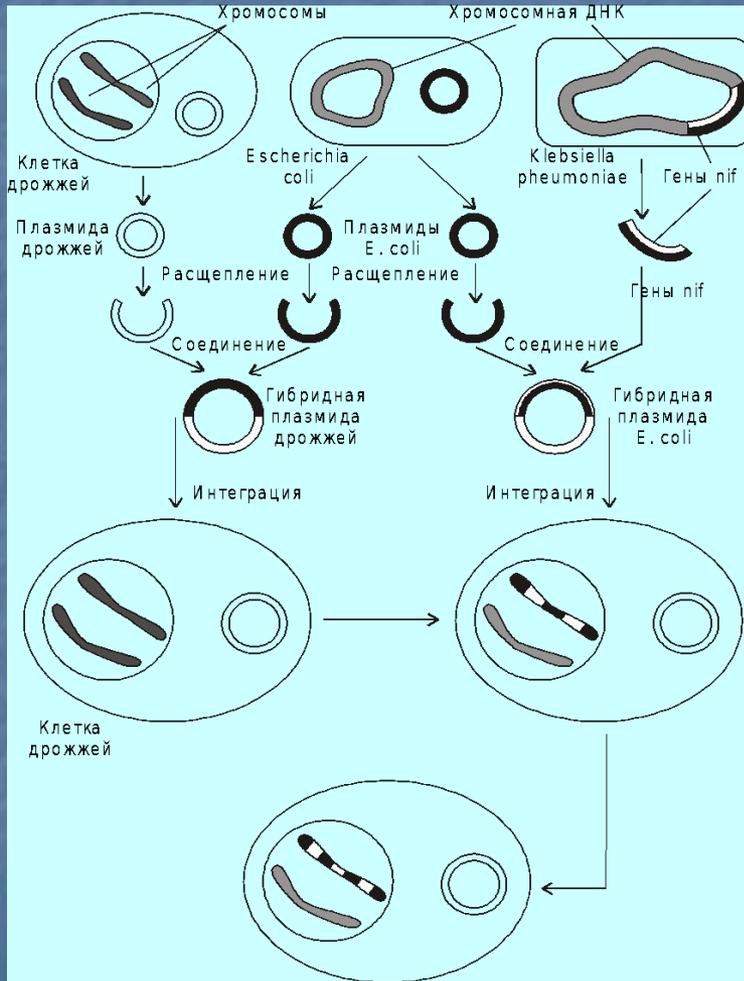
Сельскохозяйственная биотехнология

«Сельскохозяйственная биотехнология»

- Технология получения биологических удобрений. Продуценты, среды, ферментационная техника. Особенности применения. Нитрагин. Азотобактерин.
- Биологические методы и препараты для борьбы с вредителями и болезнями сельскохозяйственных растений и животных. Технология получения биологических препаратов /бактериальных, грибных, вирусных/.
- Биотехнология растений. Размножение и модификация растений *in vitro*.

Технология получения биологических удобрений

Гены азотфиксации были встроены в геном дрожжей (У. Брилл, 1991).



На первом этапе получают гибридные плазмиды слиянием плазмидиз *E.coli* и дрожжевой клетки.

На втором – выделяют *nif*-гены из *Klebsiella pneumoniae* и встраивают их во вторую плазмиды из *E.coli*, которую внедряют в хромосому дрожжей

Биологические методы и препараты для борьбы с вредителями
и болезнями сельскохозяйственных растений и животных

Наиболее распространенные инсектопатогенные бактерии
и инфицируемые ими насекомые (*G. A. Hardy, 1986*)

Бактерии	Насекомые
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Саранчи
<i>Pseudomonas septica</i>	Жук-навозник, жук-древесинник
<i>Vibrio leonardia</i>	Огневка пчелиная большая, мотылек кукурузный
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Бабочка-голубянка, бабочка-толстоголовка
<i>Proteus vulgaris</i>	Саранчи
<i>Salmonella enteritidis</i>	Огневка пчелиная большая
<i>Diplococcus spp.</i>	Майский хрущ, шелкопряд тутовый, шелкопряд непарный, шелкопряд дубовый походный
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Различные бабочки, моли
<i>B. popilliae</i>	Жук-навозник
<i>B. sphaericus</i>	Комары
<i>B. moritai</i>	Мухи

Биологические методы и препараты для борьбы с вредителями и болезнями сельскохозяйственных растений и животных

Бактериальные препараты

- **Энтобактерин** – на основе *Bac. thuringiensis* var. *Dalleriae*; эффективен против чешуекрылых насекомых.
- **Дендробациллин** – препарат для защиты леса от сибирского шелкопряда на основе *Bac. thuringiensis* var. *dendrolimus*.
- **Инсектин** – предназначен для борьбы с сибирским шелкопрядом. Получен на основе *Bac. thuringiensis* var. *insectus*.
- **БИП** – на основе *Bac. thuringiensis* var. *darmstadiensis*; эффективен против вредителей плодовых (молей, пядениц, листоверток, шелкопрядов) и овощных культур (беянок, молей).
- **Бактулоцид** – бактерия, на основе которой выпускается данный препарат, выделена из водоема и отнесена к группе Bt H14.

Грибные препараты

- **Metarhizium anisopliae** – наиболее известный энтомопатогенный гриб, описанный более 100 лет назад как зеленый мускаринный гриб.
- **Verticilium lecanii** является единственным грибным энтомопатогеном, на основе которого на западе успешно выпускают препараты в промышленных масштабах.
- **Hirsutella thompsonii** использовали некоторое время в США для производства препарата «Микар» с целью контроля численности цитрусовых клещей.
- **Боверин** является отечественным грибным препаратом, который изготавливают на основе конидиоспор *Beauveria bassiana* Vuill.