**1.** Биотехнология – это наука, которая изучает методы получения полезных для человека веществ и продуктов в управляемых условиях, используя микроорганизмы, клетки животных и растений или изолированные из клеток биологические структуры.

Промышленная микробиология - наука о важнейших микробиологических процессах и их практическом применении для получения промышленным способом ценных продуктов жизнедеятельности микроорганизмов, их биомассы как белкового продукта, о получении отдельных полезных веществ или препаратов, используемых в различных отраслях народного хозяйства.

Пищевая биотехнология является одним из важнейших разделов биотехнологии. В течение тысячелетий люди успешно получали сыр, уксус, спиртные напитки и другие продукты, не зная о том, что в основе лежит метод микробиологической ферментации. Кроме того, пищевая биотехнология используется для получения веществ и соединений, используемых в пищевой промышленности: это лимонная, молочная и другие органические кислоты; ферментные препараты различного действия – протеолитические, амилолитические, целлюлолитические; аминокислоты и другие пищевые и биологически активные добавки.

Использование микроорганизмов или ферментных препаратов, биотехнологических процессов при производстве пищевых продуктов оказывает существенное влияние на потребительские свойства и показатели качества продовольственных товаров. Знание о биотехнологических процессах позволит товароведу-эксперту определить причины порчи продовольственных товаров и возникновения дефектов, приводящих к существенным количественным потерям товаров. Например, неправильное применение заквасок может привести к ухудшению качества и возникновению дефектов кисломолочной продукции. С другой стороны, использование новых штаммов микроорганизмов может придать продукту – пиву, вину и другим пищевым продуктам, – новые оригинальные оттенки вкуса и аромата. Применение ферментных препаратов и других соединений, полученных биотехнологическим способом, будет способствовать оптимизации и интенсификации технологических процессов производства пищевых продуктов, улучшению их свойств и продлению сроков хранения.

**3.** В некоторых отраслях биотехнология способна заменить традиционную технологию (например, при длительном хранении продуктов, в производстве пищевых приправ, полимеров, сырья для текстильной промышленности, метанола, этанола, биогаза и водорода, а также при извлечении некоторых металлов из бедных руд). В некоторых отраслях промышленности биотехнология играет ведущую роль.

Здесь, прежде всего, имеются в виду следующие области применения: производство продуктов питания (широкомасштабное выращивание микроорганизмов для получения белков, аминокислот и органических кислот, витаминов, ферментов); повышение продуктивности сельскохозяйственных культур (клонирование и отбор разновидностей растений на основе тканевых культур in vitro, использование биоинсектицидов); фармацевтическая промышленность (производство вакцин, биосинтез антибиотиков, гормонов и других соединений); уменьшение загрязнения окружающей среды (очистка сточных вод, переработка отходов и побочных продуктов сельского хозяйства и промышленности) и многое другое.

**2.** В начале XIX в. русский академик К.С. Киргоф впервые получил жидкий ферментный препарат амилазы из проросшего ячменя и описал ферментный процесс.

В 1857 г. Луи Пастер установил, что микробы играют ключевую роль в процессах брожения, и показал, что в образовании отдельных продуктов участвуют разные виды микроорганизмов. Его исследования послужили основой развития в конце XIX и начале XX вв. бродильного производства органических растворителей (ацетона, бутанола и других), в том числе этилового спирта.

1875 г. Разработан метод получения чистых культур микроорганизмов, гарантирующий содержание в посевном материале клеток только определенного вида (Р. Кох).

В 1893 г. установлена способность плесневых грибов синтезировать лимонную кислоту (К. Вемер).

1925 г. Установлена возможность искусственного мутагенеза микроорганизмов (грибов) под влиянием рентгеновского облучения (Г.А. Надсон, Г.С. Филиппович).

В 30-е годы в СССР было организовано производство микробиологическим способом технических препаратов ферментов и витаминов (рибофлавина, эргостерина).

**Следующий важный этап** – организация промышленного производства антибиотиков, основанного на открытии химиотерапевтической активности пенициллина в 1940 г. (Флемминг, Флори и Чейни).

В военные годы (1941-1945 гг.) возросла потребность в дрожжах как источнике белковых веществ. Изучалась способность дрожжей накапливать белоксодержащую биомассу на непищевом сырье (древесные опилки, гороховая, овсяная шелуха). В блокадном Ленинграде, Москве были созданы установки, на которых производили пищевые дрожжи. В военной Германии биомассу дрожжей добавляли в колбасу и супы.

Еще в 60-х годах ряд нефтяных и химических компаний начали исследования и разработки по созданию биотехнологических процессов получения белка одноклеточных организмов, предназначенного для добавления в пищу животным и людям. Одной из причин этого был недостаток белковой пищи в мире. Наиболее конкурентоспособными оказались процессы на основе метанола и крахмала. На основе углеводородного сырья (жидких и газообразных углеводородов) в 70-х годах в СССР впервые было создано многотоннажное производство кормовых дрожжей.

В конце 60-х годов начали применяться иммобилизованные формы микробных ферментов, которые нашли широкое применение в пищевой промышленности.

В 1972 г. разработана технология клонирования ДНК (П. Берг).

В 1975 г. с возникновением генной инженерии появилась возможность направленно создавать для промышленности микроорганизмы с заданными свойствами.

В 1981 г. проведена микрохирургическая трансплантация эмбрионов животных с целью быстрого размножения высокопродуктивных экземпляров (Вилландсон).

**4.** Не все микроорганизмы могут быть использованы в промышленных условиях, а лишь те микроорганизмы-продуценты, обладающие способностью под воздействием внешних факторов (состава среды, условий культивирования, температуры, рН среды и т.д.) образовывать в больших количествах преимущественно то соединение, которое является главным (целевым) продуктом данного производства.

К микроорганизмам-продуцентам предъявляется ряд обязательных требований. Микроорганизмы должны:

- расти на дешевых и доступных питательных средах;

- максимально усваивать питательные вещества среды;

- обладать высокой скоростью роста биомассы и давать высокий выход целевого продукта;

- проявлять синтетическую активность, направленную в сторону получения желаемого продукта; образование побочных продуктов должно быть незначительным;

- быть генетически однородными, стабильными в отношении продуктивности, требований к питательному субстрату и условиям культивирования;

- быть устойчивыми к фагам и другой посторонней микрофлоре;

- быть безвредными для людей (не обладать патогенными свойствами) и для окружающей среды;

- обладать хорошей способностью выделения.

**Сверхсинтез** – способность микроорганизма синтезировать определенный продукт в количествах, превосходящих физиологические потребности, часто встречается в природе.

В промышленности применяют три вида штаммов: природные штаммы, нередко улучшенные естественным или искусственным отбором; штаммы, измененные в результате индуцированных мутаций; штаммы культуры, полученные методами генной или клеточной инженерии.

**Селекция** – это направленный отбор мутантов, то есть микроорганизмов, наследственные признаки которых претерпели изменения в нужном для человека направлении.

Для ускорения селекции используют индуцированный **мутагенез**, применяя мутагенные факторы физической, химической и биологической природы. К универсальным физическим мутагенам относятся УФО, рентгеновские лучи и др.; химические факторы, биологическими мутагенами являются фаги (вирусы микроорганизмов).

Однако мутации образуются случайным образом, поэтому более широко используется генная инженерия – генетическая рекомбинация. Рекомбинация - это обмен генами между двумя хромосомами.

**6.** Питательная среда обеспечивает жизнедеятельность, рост, развитие биообъекта, эффективный синтез целевого продукта. Питательные среды могут иметь неопределенный состав, то есть включать биогенные (растительные, животные, микробные) добавки - мясной экстракт, кукурузную муку, морские водоросли и т.д.

В состав практически любой питательной среды входят такие компоненты, как вода, соединения углерода (глюк, сахароза; спирт глицер; крахмал, целлюл), азота (аминокисл, мочевина), фосфора (вносят соли фосф к-ты) и других минеральных веществ, витамины (кукур экстракт, мол сыворотка).

Сырье, используемое для получения целевого продукта, должно быть недефицитным, недорогим (свеклов меласса – лим к-та, этанол; мелассная барда – дрожжи, мол сыворотка – белковые препараты).

**5**. лаг-фаза - I фаза. В этот период культура привыкает к новым условиям обитания. Активируются ферментные системы, если необходимо, синтезируются новые ферментные системы, клетка готовится к синтезу нуклеиновых кислот и других соединений. Продолжительность этой фазы зависит от физиологических особенностей микроорганизмов, состава питательной среды и условий культивирования.

II фаза называется фазой ускоренного роста, она характеризуется началом деления клеток, увеличением общей массы популяции и постоянным увеличением скорости роста культуры.

Затем следует логарифмическая, или экспоненциальная фаза роста - III фаза. В этот период отмечается максимальная скорость роста культуры, интервалы между появлением предыдущего и последующего поколения постоянны.

Наступает IV фаза – фаза замедления или уменьшения скорости роста. Вследствие интенсивного роста и размножения культуры запас необходимых питательных веществ в среде уменьшается. Кроме того, в среде накапливаются продукты метаболизма, которые в определенной концентрации могут мешать нормальному протеканию биохимических процессов обмена веществ.

V фаза называется стационарной (фазой линейного роста). Масса и количество всех живых клеток достигает максимума. Количество вновь образовавшихся клеток на этом этапе равно количеству клеток, отмерших и автолизованных (разрушенных клеточными ферментами).

Когда равновесие нарушается и количество отмерших клеток превышает прирост наступает VI фаза – фаза ускорения отмирания.

Завершается цикл роста и развития популяции в замкнутом объеме VII фазой, характеризующейся отмиранием и автолизом микроорганизмов, которая называется фазой отмирания. На этой стадии биомасса клеток значительно уменьшается, так как запасные вещества клетки исчерпываются.

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

где d x / d t – скорость роста; μ - коэффициент пропорциональности, обычно называемый удельной скоростью роста; х – концентрация биомассы.

**9.** Процессы биотехнологических производств разнообразны, но все они имеют пять общих основных стадий, которые могут различаться в зависимости от целевого продукта и способа его получения. Основные стадии следующие: приготовление питательной среды; получение посевного материала; культивирование микроорганизмов; выделение целевого продукта; очистка целевого продукта.

Задача специалиста, оптимизирующего состав среды для конкретного вида микроорганизма, - выбрать такие источники углерода, азота, фосфора и других веществ, которые наиболее оправданы в экономическом и экологическом отношениях.

Поддержание чистой культуры штамма-продуцента - ключевая задача любого биотехнологического производства.

Стадия выделения продукта существенно зависит от того, накапливается продукт в клетках или он выделяется в культуральную жидкость, или же продуктом является сама клеточная масса.

**7, 14.** Ферментация (культивирование) - это вся совокупность последовательных операций от внесения в заранее приготовленную и термостатированную питательную среду посевного материала (инокулята) до завершения процессов роста и биосинтеза вследствие исчерпывания питательных веществ среды.

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

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

При **периодическом способе** культивирования стерильная питательная среда засевается исходной культурой продуцента, и далее в этой же емкости микроорганизмы при определенных условиях проходят через все стадии роста и развития популяции. Когда процесс культивирования заканчивается, емкость для выращивания освобождают, и цикл возобновляется, начиная от засева питательной среды исходной культурой продуцента.

При **непрерывном способе** культивирования микроорганизмы постоянно получают приток свежей стерильной питательной среды, а из аппарата непрерывно отбирается биомасса вместе с образуемыми метаболитами.

Культивирование микроорганизмов, образующих пленку из биомассы, осуществляется в ферментере типа колонки с наполнителем. В качестве наполнителя может использоваться макроноситель (кокс, прутья, стружка, стеклянные шарики и т.д.) и микроноситель (амберлитовые смолы, частички сефадекса и т.д.). Клетки, культивируемые таким образом, называют иммобилизованными. +: длительность эксплуатации при непрер. ферментации, устойчивость клеток, простота выделения целевого прод, меньше энергозатраты.

**10.** Посевным материалом (инокулятом) называют чистую культуру микроорганизма, которую получают путем ее последовательного пересева из пробирки в колбу, а затем в аппараты увеличивающегося объема до количества, необходимого для промышленного производства. Приготовление посевного материала состоит из следующих стадий:

1. Получение культуры микроорганизма в микробиологической лаборатории завода. 2. Выращивание микроорганизмов в малом посевном аппарате. 3. Выращивание микроорганизмов в большом посевном аппарате. 4. Накопление культуры микроорганизмов в малом ферментере. Передачу чистых культур из одного аппарата в другой осуществляют в конце логарифмической фазы роста.

В биотехнологии широко применяются плесневые грибы, дрожжи, актиномицеты (грамположительные бактерии, не образующие спор), бактерии и водоросли в виде чистых и смешанных культур. В традиционных процессах ферментации предпочтение обычно отдается смешанным культурам, а в большинстве современных ферментационных процессов – монокультурам.

**8. Особенности культивирования животных клеток.** Животные клетки используются для культивирования вирусов, при производстве вакцин, для получения интерферона и т.д.

Суспензию отдельных клеток получают обработкой размельченной ткани эмбриона пищеварительным ферментом трипсином. В обычной методике культивирования пользуются цилиндрическими бутылями, которые медленно вращаются вокруг своей длинной оси. Деление клеток млекопитающих происходит примерно раз в сутки (для сравнения – клетки дрожжей делятся каждые 1,5-2 ч, а бактериальные клетки – каждые 20-60 мин). Клетки млекопитающих нуждаются в многочисленных питательных веществах, поэтому добавляют смесь аминокислот, пуринов и пиримидинов для синтеза белков и нуклеиновых кислот, глюкозу в качестве источника углерода и энергии, витамины и минеральные соли для поддержания необходимого осмотического давления и значения рН, близкого к 7,2. Среда также должна содержать небольшие концентрации антибиотиков для подавления роста бактерий и 5-20 % сыворотки (из крови человека или из плода крупного рогатого скота). Для оптимального роста температуру культуры необходимо поддерживать около 37 ºС, так как ниже 36 ºС клетки либо делятся крайне медленно, либо не делятся вовсе; при температуре выше 38 ºС погибают. Большинство культур клеток млекопитающих, в том числе и клеток человека, удается сохранять неопределенно долгое время замороженными в специальной среде при - 180 ºС.

**Особенности культивирования растительных клеток.** Получение массы растительных клеток обходится намного дороже, чем равное количество бактериальных или дрожжевых клеток. Поэтому избегают разрушения клеток с целью извлечения из них полезных для человека соединений. В связи с этим, растительные клетки иммобилизуют внутри пористых полимеров. Доказано, что в таком состоянии клетки удается поддержать жизнеспособными в течение нескольких сотен дней. Проблемой остается извлечение метаболитов в том случае, когда они синтезируются внутри клеток, а не выделяются в среду.

Использование растительных клеток является перспективным направлением биотехнологии, так как клетки, растущие в культуре, способны синтезировать вещества, которые не обнаруживаются в целом растении.

**11. +вопрос 6.**

Каждый конкретный вид микроорганизмов, используемых в биотехнологии, строго избирателен к питательным веществам. Потребность микроорганизма в тех или иных соединениях определяется физиологическими особенностями данного вида микроба, но во всех случаях среда должна быть водным раствором этих веществ и обеспечивать в определенном количестве их приток в клетку. Первоначальную ориентировку в выборе оптимального состава питательной среды, исходя из состава клеточного вещества микроба, сделать можно.

Важнейшим условием приготовления питательных сред является соблюдение правил асептики. Для обеззараживания питательных сред применяют, как известно, химическое воздействие (дезинфекцию), воздействие температуры и других физических факторов (ультразвука, ультрафиолетовых лучей, ультрафильтрации).

В биотехнологии широко применяют термические методы обеззараживания питательных сред (автоклавирование, стерилизацию, кипячение и др.).