

**федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова
Министерства здравоохранения Российской Федерации
(Сеченовский Университет)**

Институт фармации им. А.П. Нелюбина
Кафедра биотехнологии

Методические материалы по дисциплине:

Основы биотехнологии и нанотехнологии

основная профессиональная образовательная программа высшего
профессионального образования - программа специалитета

06.05.01 Биоинженерия и биоинформатика

ВВЕДЕНИЕ

Целью освоения дисциплины «Основы биотехнологии и нанотехнологии» является изучение способов получения полезных для человека продуктов в управляемых биотехнологических процессах с использованием монокультур и ассоциаций микроорганизмов, культур клеток растений, животных и ферментов.

К задачам изучения дисциплины следует отнести приобретение студентом знаний и практических навыков работы с продуцентами биотехнологий, освоение методов культивирования продуцентов и управления биотехнологическими процессами, необходимого будущему специалисту в будущей профессиональной деятельности.

В результате изучения дисциплины студент должен:

Знать:

- основные направления биотехнологии, ее роль в развитии общества, цели и задачи биотехнолога в практической и теоретической деятельности;
- основные методы биотехнологических исследований;
- основные элементы и стадии биотехнологических процессов;
- классификацию процессов биосинтеза, обобщенную технологическую схему процесса микробного синтеза;
- классификацию продуктов и субстратов, используемых в биотехнологических процессах;
- современные методы моделирования, масштабирования и оптимизации процессов, входящих в технологическую схему
- основы нанобиотехнологии и основные её направления на современном этапе.

Уметь:

- анализировать и моделировать типовой биотехнологический процесс;
- определять основные стадии роста продуцентов в различных биотехнологических системах;
- оптимизировать основные технологические стадии процесса культивирования;
- анализировать результаты исследований и определять параметры и средства для управления и контроля стадий биотехнологического процесса;
- правильно оформить результаты исследований, уметь оценить тип процесса биотехнологии.

Владеть:

- методами культивирования продуцентов;
- методами математического моделирования биотехнологических систем;
- методами управления роста и биосинтезом биологически активных веществ в биотехнологической системе.

Курс лекций «Основы биотехнологии и нанотехнологии» разработан для самостоятельного изучения некоторых разделов дисциплины с дальнейшим рассмотрением и обсуждением тем на практических занятиях для студентов.

Лекция № 1

Тема: Краткий исторический очерк развития биотехнологии. Новейший этап развития биотехнологии

План

1. История возникновения биотехнологии
2. Формирование эмпирических технологий.
3. Формирование микробиологических производств: первая взаимосвязь науки и микробиологических производств.
4. Развитие производств первичных и вторичных метаболитов, микробных биомасс. Революционное преобразование микробиологических производств.
5. Новейший период развития биотехнологии.

Начало и дальнейшее формирование биотехнологии трактуется неоднозначно: по мнению одних (Овчинников, Баев, Скрыбин), считается правомерным отнести к сфере биотехнологии древние процессы брожения, включая получение спирта, силосование; по мнению других (Айба, Хемфри, Миллис), условной датой появления биотехнологии можно считать присуждение компании «Мерк Кемикал Компани» за достижения в области биохимической технологии в 1947 г. премии Мак-Гро - Хилла, но есть мнение, что начало биотехнологии следует отнести к 70-м годам XX столетия к моменту зарождения генетической инженерии. Однако, правомерно отнести возникновение современной биотехнологии, начавшей свое формирование на базе существующих отраслей микробиологической промышленности, к началу 50-х годов XX века, а весь предшествующий данному периоду этап называть предысторией формирования биотехнологии, ведущей корни из древнейших цивилизаций. Предысторию формирования биотехнологии можно подразделить на ряд этапов:

- появление эмпирической технологии в 6-м тысячелетии до н.э.,
- зарождение естественных наук в XV-XVII веках;
- формирование микробиологических производств и начало взаимодействия науки и микробиологических производств в конце XIX -10-х годах XX века, вызвавшее революционное преобразование микробиологических производств;
- создание научно-технических предпосылок для возникновения современной биотехнологии (10-е - конец 40-х годов XX века).

Человек с древнейших времен начал использовать в своей хозяйственной деятельности биологические организмы, в частности микроорганизмы, не зная об их существовании. Первым микробиологическим процессом, использованным на практике, было брожение - процесс обмена веществ, при

котором в органическом субстрате происходят изменения под воздействием микробных ферментов. Возбудителями бродильных процессов являются грибы, бактерии, дрожжи. Данные организмы легко культивируются, быстро размножаются в сравнительно простых условиях и синтезируют ферменты, вызывающие разложение органических веществ. С древнейших времен брожение применяли при хлебопечении, пивоварении и виноделии. Так, при раскопках Вавилона обнаружены дощечки, насчитывающие 6000 лет, с описанием процесса приготовления пива, а в пирамидах Египта, построенных в этот же период, - караваи хлеба. Есть сведения об очистных сооружениях, которые функционировали в древнем Риме. С 3-4-го тысячелетий известны человеку процессы пектинового брожения, лежащие в основе мочки прядильных растений, льна, конопли и др. С древнейших времен человечество сталкивалось и с отрицательными последствиями деятельности микроорганизмов (порча продуктов, инфекционные болезни людей и домашнего скота). Следствием этого на первых этапах были неосознанные, эмпирические попытки разработки методов и средств борьбы с этими явлениями. Так стали возникать методы консервирования продуктов. Во второй половине XV века начатое развитие современного естествознания. На становление и развитие биологии существенное влияние оказали успехи химии, которая из описательной в этот период превращается в аналитическую. Произошли сдвиги в изучении сущности процессов брожения; появился термин «ферментация», а процесс брожения стали связывать с наличием в среде дрожжей или ферментов. В XVI-XVII веках сначала во Франции, а затем повсеместно для разрыхления теста стали использовать пивные дрожжи; позднее с изменением и совершенствованием технологии пивоварения для этих целей стали применять дрожжи спиртовых производств. В Европе стали добывать медь в процессах бактериального выщелачивания.

Во второй половине XVIII века была доказана способность одного вещества разлагать другое. Это послужило началом экспериментального изучения уникальной способности ферментов к катализу специфических химических реакций. Таким образом, развитие описательной микробиологии и изучение химических превращений стали важной предпосылкой для становления микробиологии и биохимии.

В XIX веке с развитием химических наук были заложены основы органической химии. В этот период были открыты многие органические кислоты, глицерин, холестерин, глюкоза, первые аминокислоты, осуществлен синтез мочевины. Для зарождения энзимологии большое значение имело изучение процесса гидролиза полисахаридов. Огромное влияние на создание научных основ микробиологических производств имели работы Луи Пастера, который по просьбе правительства Франции исследовал причины нарушения технологических процессов в ряде производств. Работая в области прикладной микробиологии, Пастер сделал ряд крупнейших фундаментальных открытий, которые заложили основы современной

технической микробиологии. Пастер неоспоримо доказал, что болезни, порча продуктов, брожение и гниение вызываются микроорганизмами, и создал теорию об экзогенности попадания этих организмов в среду. Этим была доказана несостоятельность бытующей в то время теории самозарождения микроорганизмов. Работы Пастера заложили научные основы виноделия, пивоварения, производства спирта и уксуса, борьбы с инфекционными болезнями. Современник Пастера Гексли, оценивая работы Пастера, говорил, что «и своими открытиями возместил Франции большую часть контрибуции, уплаченной Германии». Крупным достижением данного периода было разработка метода чистых культур, а также усовершенствование сред для выделения и выращивания микроорганизмов. Чистые культуры стали применять в сложившихся микробиологических производствах. Большое значение имели работы по изучению микробного антагонизма и применению его в медицине. Мечниковым было создано учение об антагонизме микробов и научно обоснованы рекомендации для практических применений этого учения. В этот период активно изучалась азотфиксация. Немецкие исследователи Гельригель и Вильфарт установили биологическую природу процесса фиксации азота бобовыми растениями, а Бейеринк выделил чистую культуру клубеньковых бактерий и доказал их присутствие в ризосфере растений. Блестящими работами Виноградского, Омелянского, Надсона, Исаченко были заложены основы геологической микробиологии; начато изучение роли микроорганизмов в превращениях серы, железа, кальция, грязеобразовании. Стали закладываться научные основы биологической обработки стоков. Очистные сооружения, известные со времен Древней Индии и Римской империи и пришедшие в упадок в средние века, с бурным развитием промышленности на рубеже XIX-XX веков вновь стали предметом пристальных исследований. В этот период начала складываться энзимология. Для изучения и применения ферментов потребовалась разработка и подбор специальных «мягких» методов выделения и очистки. Началось практическое применение ферментных препаратов для подслащивания ряда веществ, появились препараты для дубления кож и применения в аналитике. В 70-80-е годы XIX столетия были заложены основы культивирования растительных клеток и животных тканей. После работ Шванна и Вирхова, назвавших клетку элементарным организмом, возник интерес к изучению живых клеток, и начались эксперименты по сохранению жизнеспособности клеток и кусочков тканей в специфических условиях и средах. В 1865 г. Мендель доложил Обществу испытателей природы свои наблюдения о закономерностях передачи наследственных признаков. В начале XX века были введены термины «мутации», «ген», возникла гипотеза Сэттона-Бовери о том, что хромосомы являются материальными носителями наследственных признаков. Русский цитолог Навашин раскрыл особенности структуры хромосом и заложил основы хромосомной теории наследственности. В данный период внедрение научных знаний дало

возможность приступить к разработке научно-обоснованных биотехнологий многих производственных процессов.

Последний период эры предистории современных биотехнологий (10-е - 40-е годы XX века) условно можно подразделить на два этапа. На первом этапе, в начале его, в основном, происходило усовершенствование технологии существующих производств, а затем, благодаря успехам микробиологии, биохимии и других наук того периода, в результате принципиальных усовершенствований аппаратуры и технологий возникла основа для организации новых производств. В этот период стали выпускать новые экологически чистые биоудобрения и биологические препараты для борьбы с вредителями и болезнями сельскохозяйственных растений, возникли производства ряда целевых продуктов (органических растворителей, спиртов), начались промышленные испытания биотехнологических процессов переработки и использования растительных отходов. Второй этап данного периода тесно связан с биотехнологическими методами получения ряда сложных веществ - антибиотиков, ферментов, витаминов.

Революционным моментом данного периода была промышленная реализация технологии производства антибиотиков. Отправной точкой при этом послужило открытие Флемингом, Флори и Чейном химиотерапевтического действия пенициллина. Практически одновременно в СССР Ермольева, изучая действие лизоцима, показала, что он является фактором естественного иммунитета, а Гаузе и Бражникова получили новый активный препарат - антибиотик грамицидин. После второй мировой войны в ходе интенсивного развития промышленных биотехнологий были организованы производства аминокислот, белка одноклеточных, превращение стероидов, освоено культивирование клеток животных и растений. Интактные клетки микроорганизмов широко стали использовать для получения лекарственных веществ стероидной природы, были организованы крупные производства вакцин. Эра новейших биотехнологических процессов, возникшая в течение последних 25-30 лет, связана с использованием иммобилизованных ферментов и клеточных органелл, а также основана на методах рекомбинантных ДНК. Бурно развивающиеся в настоящее время генетическая и клеточная инженерия способствуют тому, что биотехнологии постепенно завоевывают все новые и новые области производства и решительно внедряются во многие сферы деятельности человека. В 50-е годы после успешного использования для получения вакцины вируса полиомиелита, выращиваемого в культуре клеток млекопитающих, линии культур клеток человека стали незаменимыми для выделения и культивирования ряда других вирусов, производства антител, интерферона, противоопухолевых химиопрепаратов. В конце 60-х годов иммобилизованные ферменты и клетки стали успешно применяться не только для производства полусинтетических препаратов, но и для проведения несложных биохимических анализов.

Возникновение генетической инженерии условно относят к 1972 году, когда в США Бергом была создана первая рекомбинантная молекула ДНК. С середины 70-х годов данной проблемой интенсивно занимаются тысячи научных коллективов и промышленных компаний во всех странах мира. Сочетание слов «генетика» и «инженерия» свидетельствуют о том, что наступило время, когда стало возможным конструирование рекомбинантных ДНК и целенаправленно создавать искусственные генетические программы. Это дало возможность организовать получение многих важных препаратов, а также начать работу по получению новых суперштаммов-деградаторов промышленных токсикантов. Внедрение новейших методов биотехнологии в настоящее время производит переворот в различных областях биотехнологии, включая биотехнологические процессы. Эти методы позволяют интенсифицировать экологически чистые биотехнологии воспроизводства пищи и кормовых препаратов, решать методами задачи обеспечения человечества материальными и энергетическими ресурсами и также природоохранные проблемы.

Лекция № 2

Тема: Культивирование микроорганизмов в замкнутой и открытой биотехнологической системах.

ПЛАН

1. Понятие о культурах и культивировании микроорганизмов-продуцентов.
2. Питательные среды для культивирования различных физиологических групп микроорганизмов.
3. Рост микроорганизмов в замкнутой системе. Кривая роста.
4. Непрерывные культуры.

При изучении отдельных клеток микроорганизмов можно получить лишь ограниченную информацию. Поэтому обычно микробиологи и биотехнологи изучают популяции, состоящие из миллионов и миллиардов особей. Такие популяции, или культуры, получают, выращивая микроорганизмы при определенных условиях. Культуру, содержащую микроорганизмы только одного вида, называют *чистой* или *аксенической*, а культуру, в которой содержится более одного вида микроорганизмов - *смешанной*. Если же в культуре растут только два вида микроорганизмов, причем их специально поддерживают в ассоциации друг с другом, то такая культура называется *двухкомпонентной*. Выделяют также *накопительные* культуры, в которых преобладают представители одной группы или даже одного вида микроорганизмов.

Различают культуру *первичную* - только что изолированную из природной популяции; *субкультуру* - полученную в результате клонирования первичной культуры; *пассированную* - культуру, прошедшую много пассажей на средах; *аэробную* и *анаэробную* - культуры, выросшие соответственно в аэробных и анаэробных условиях; *контаминированную* -

культуру, которая загрязнена посторонними, обычно воздушными, микроорганизмами; культуры с указанием *времени инкубации* (например, четырехчасовая, суточная и т.д.); *слайд-культуру* - культура, которая выращена на предметном стекле, покрытом тонким слоем питательной среды.

Идентифицированную чистую культуру какого-либо вида, подвида, варианта и выделенную из того или иного источника (организма, внешней среды и т.д.), называют *штаммом*. Один штамм от другого может отличаться одним или несколькими малосущественными признаками, в том числе источником выделения. Обозначают штаммы, как правило, произвольно: по месту выделения, порядковому номеру регистрации, отличительному признаку и т.д. Штаммы, имеющие выдающиеся свойства и полезные для народнохозяйственных и научных целей, сохраняют в государственных коллекциях культур, на них выдают авторские свидетельства.

Совокупность особей, происходящих из одной клетки, называют *клоном*. Культуры, полученные клонированием, генетически идентичны и фенотипически относительно однородны. Клоны выделяют из одной изолированной клетки путем ее культивирования или из одной изолированной колонии. Последний способ наиболее прост, но наименее надежен. Для повышения надежности клонирование следует вести на неселективных средах и повторять многократно.

Получение чистой культуры не сводится только к тому, чтобы выделить данный вид из смешанной природной популяции микробов. Необходимо поддерживать выделенную чистую культуру в искусственных условиях, которые исключали бы загрязнение культуры другими видами. Обычно чистые культуры поддерживают на питательных средах в пробирках, колбах или чашках Петри. Культуральный сосуд сначала должен быть простерилизован (т.е. в нем должно быть уничтожено все живое), а затем, после того как в него будут внесены исследуемые микроорганизмы, защищен от загрязнения извне. Основным источником загрязнения - воздух, в котором всегда содержатся микроорганизмы. Крышка, накрывающая чашку Петри, специально предназначена для того, чтобы предотвращать попадание внутрь микробов из воздуха. Пробирки и колбы с той же целью закрывают ватными пробками, металлическими колпачками или пластмассовыми завинчивающимися крышками.

Наружная поверхность культурального сосуда, конечно, тоже может быть источником загрязнения, когда колбу или пробирку открывают, чтобы внести в нее материал или взять пробу. Поэтому сразу же после открытия сосуда и еще раз непосредственно перед его закрытием горлышко обжигают в пламени.

Обычно *инокулят* (микробный материал, используемый для засева или инокуляции среды в культуральном сосуде) вносят на металлической проволочке, называемой *петлей*, которую перед самым использованием быстро стерилизуют в пламени. Жидкие культуры переносят с помощью пипетки. Пипетки предварительно стерилизуют, заворачивая в бумагу или

помещая в стеклянный или металлический пенал. Бумага или пенал предотвращают загрязнение как внутренней, так и внешней поверхности пипеток вплоть до их использования. Чтобы еще больше снизить вероятность случайного загрязнения, можно пересевать культуры в настольном боксе или в небольшой закрытой комнате, куда поступает специально обработанный воздух с пониженным содержанием микроорганизмов.

Для культивирования микроорганизмов предложены буквально тысячи различных сред, и часто при описании этих сред не указывается четко, зачем в них введены те или иные компоненты. Между тем состав среды для культивирования может и должен основываться на научных *принципах питания*. Из химического состава клеток, который в общих чертах одинаков у всех живых организмов, видно, какие вещества должны быть в первую очередь необходимы для их роста (таблица 1). На долю шести элементов, приведенных в таблице, приходится около 95 % сухой биомассы клеток микроорганизмов, а остаток составляют различные другие элементы.

Таблица 1 - Приблизительный элементарный состав микробной клетки*

Элемент	Содержание, % от сухого вещества	Элемент	Содержание, % от сухого вещества
Углерод	50	Натрий	1
Кислород	20	Кальций	0,5
Азот	14	Магний	0,5
Водород	8	Хлор	0,5
Фосфор	3	Железо	0,2
Сера	1	Все остальные элементы	0,3
Калий	1		

* Данные для бактерии *Escherichia coli*, приводимые С. Лурия (Мир микробов, т. 1, 1979)

Результаты изучения физиологии питания показали, что почти всем группам микроорганизмов необходимы калий, магний, кальций, железо, марганец, кобальт, медь, молибден и цинк. Они необходимы микроорганизмам, так как выполняют различные функции в их метаболизме.

Все необходимые металлы микроорганизмы могут получать в форме катионов неорганических солей. Калий, натрий, кальций и железо требуются в относительно больших количествах, и поэтому их соли всегда должны включаться в состав питательных сред. Один из неметаллов, фосфор, также можно добавлять в среду в неорганической форме - в виде фосфатов. Нужные количества марганца, кобальта, меди, молибдена и цинка вносят в следовых количествах, поэтому их часто называют микроэлементами (таблица 2).

Следует отметить, что у некоторых групп микроорганизмов имеются дополнительные, специфические потребности в минеральных веществах. Например, клеточные стенки диатомовых и некоторых водорослей сильно насыщены кремнием, и эти микроорганизмы нуждаются в больших количествах кремния, который добавляют в виде силикатов. Высоки потребности в ионах железа у железобактерий. Хотя у большинства микроорганизмов не удается выявить точную потребность в натрии: некоторым гетеротрофным, а также фототрофным бактериям, обитающим в морях, он необходим в относительно больших количествах. В этих случаях его нельзя заменить другими одновалентными катионами.

Потребности микроорганизмов в углероде, азоте, сере и кислороде невозможно охарактеризовать просто, поскольку различные группы микроорганизмов должны получать эти элементы в определенной химической форме (таблица 2).

Таблица 2 - Главнейшие физиологические функции в клетках микроорганизмов важнейших элементов

Элемент	Физиологическая роль
Водород	Входит в состав воды и органических веществ клетки
Кислород	Входит в состав воды и органических веществ клетки; в виде O ₂ служит акцептором электронов при дыхании аэробных микроорганизмов
Углерод	Входит в состав органических веществ клетки
Азот	Входит в состав органических веществ клетки
Сера	Входит в состав белков, коферментов клетки
Фосфор	Входит в состав нуклеиновых кислот, фосфолипидов, коферментов клетки
Калий	Неорганический катион, участвующий в поступлении веществ в клетку, кофактор некоторых ферментов
Магний	Важный катион клетки; неорганический кофактор для многих ферментов, участвует в связывании ферментов с субстратами; входит в состав хлорофиллов
Кальций	Важный катион клетки; кофактор протеиназ
Железо	Входит в состав цитохромов и некоторых белков, не содержащих гем; кофактор для некоторых ферментов
Кобальт	Входит в состав витамина B ₁₂ и его производных, служащих коферментами
Марганец	Неорганический кофактор для некоторых ферментов; иногда может заменять магний
Медь, цинк, молибден	Неорганические компоненты некоторых ферментов

Потребность в углероде. Фотосинтезирующие микроорганизмы и те прокариоты, которые получают энергию в результате окисления

неорганических соединений - автотрофы, используют обычно в качестве единственного или главного источника углерода CO_2 - вещество, содержащее углерод в наиболее окисленной форме. Превращение CO_2 в органические компоненты клетки - восстановительный процесс, требующий затраты энергии. Соответственно у этих физиологических групп микроорганизмов значительная часть энергии, получаемой от света или при окислении неорганических соединений, должна затрачиваться на восстановление CO_2 до уровня органических веществ.

Все другие организмы - гетеротрофы - получают углерод в основном из органических питательных веществ. Большинство органических субстратов окислено до того же уровня, что и органические компоненты клетки. Поэтому, для того чтобы они могли служить источником углерода для построения компонентов клетки, обычно не требуется их предварительного восстановления. Однако органические субстраты требуются не только для целей биосинтеза: они должны также удовлетворять энергетические потребности клетки. Значительная часть углерода, содержащегося в органическом субстрате, направляется по тем путям метаболизма, которые доставляют энергию, и в конце концов выводятся из клетки в виде CO_2 и органических соединений (типичных конечных продуктов брожения). Таким образом, органические питательные вещества обычно играют двойную роль: они служат одновременно и источником углерода, и источником энергии.

Многие микроорганизмы могут полностью удовлетворять свои потребности в углероде каким-либо одним органическим соединением. Другие же не способны расти в присутствии лишь одного органического вещества и нуждаются в добавочных органических компонентах питательных сред. Эти добавочные вещества нужны исключительно для целей биосинтеза и используются в качестве предшественника определенных органических компонентов клетки, которые микроорганизм не может полностью синтезировать сам. Они называются *ростовыми факторами*.

Микроорганизмы крайне разнообразны в отношении, как типа, так и числа тех органических соединений, которые они могут использовать в качестве основных источников углерода и энергии. Разнообразие это так велико, что любое природное соединение может использоваться каким-нибудь микроорганизмом. Поэтому кратко описать химическую природу органических источников углерода для микроорганизмов невозможно. Исключительное разнообразие потребностей в углероде - один из интереснейших аспектов физиологии микроорганизмов.

При этом одни микроорганизмы крайне «многоядны», тогда как другие отличаются высокой специализацией. Например, некоторые бактерии рода *Pseudomonas* способны использовать в качестве источника углерода и энергии в питательной среде более 90 различных органических соединений, а бактерии, окисляющие метан, могут использовать только два субстрата - метан и метанол. Некоторые бактерии способны расщеплять целлюлозу и использовать только субстраты, её содержащие.

Большинство организмов, которые зависят от органических источников углерода (а возможно, и все они), нуждаются также в очень небольших количествах CO_2 , так как это соединение необходимо для некоторых биосинтетических реакций. Но так как обычно организмы, использующие органический субстрат, образуют в больших количествах углекислоту, потребность в ней для целей биосинтеза может быть удовлетворена за счет этого источника. Тем не менее полное удаление CO_2 из среды часто задерживает, а иногда и полностью подавляет рост микроорганизмов на органических средах. Для того чтобы на таких средах удовлетворительно росли некоторые бактерии и грибы, нужно поддерживать относительно высокие концентрации CO_2 в атмосфере.

Потребность в азоте и сере. Азот и сера входят в состав органических веществ клетки, главным образом, в восстановленной форме, т.е. соответственно в виде аминогрупп и сульфгидрильных групп. Большинство фотосинтезирующих микроорганизмов поглощает эти два элемента в окисленном состоянии - в форме неорганических солей (нитратов и сульфатов). Поэтому они сначала восстанавливаются, а затем уже используются в биосинтезах. Многие нефотосинтезирующие бактерии и грибы удовлетворяют свои потребности в азоте и сере также в виде нитратов и сульфатов. Однако некоторые микроорганизмы не способны восстанавливать азот (или серу) соответствующих анионов, поэтому эти элементы необходимы им в восстановленной форме. Потребность в восстановленном азоте распространена довольно широко; для чего азот необходимо добавлять в питательные среды в виде солей аммония. Потребность в восстановленной сере встречается реже; источником такой серы могут служить сульфиды или какие-нибудь органические соединения, содержащие сульфгидрильные группы (например, цистеин).

Потребность в азоте и сере у микроорганизмов может быть удовлетворена за счет органических веществ, содержащих азот и серу в восстановленной форме (аминокислот или более сложных продуктов распада белка - пептонов). Такие соединения нередко могут служить одновременно также источником энергии и углерода; в этом случае они сразу же удовлетворяют потребности клетки в углероде, азоте, сере и в энергии.

Некоторые бактерии могут использовать молекулярный азот атмосферы (N_2) - самый неограниченный источник азота в природе. Этот процесс называется *азотфиксацией*, и первая его стадия состоит в восстановлении N_2 до аммиака.

Факторы роста микроорганизмов. Любое органическое соединение, которое необходимо организму в качестве предшественника или составной части органического материала клетки, но которое сам он не может синтезировать из более простых источников углерода, должно быть обеспечено в питании. Такого рода органические вещества называют *факторами роста*. По своей химической структуре и по своей роли в метаболизме эти вещества делятся на три класса:

- 1) аминокислоты, которые нужны для построения белков;

- 2) пурины и пиримидины, которые необходимы для построения нуклеиновых кислот;
- 3) витамины, к которым относятся самые различные органические соединения. Витамины входят в состав простетических групп или активных центров некоторых ферментов.

Так как ростовые факторы удовлетворяют лишь специфические потребности, связанные с процессами биосинтеза, они нужны лишь в небольших количествах по сравнению с главным источником углерода. В состав белков микроорганизмов входит примерно 20 различных аминокислот, так что потребность в любой отдельной аминокислоте, которую сама клетка не может синтезировать, не слишком велика. Это относится и к потребностям в каком-либо пурине или пиримидине, поскольку в состав нуклеиновых кислот входят пять различных азотистых оснований такого типа. Витамины нужны в еще меньших количествах, так как различные коферменты, для которых они служат предшественниками, выполняют каталитические функции и поэтому их количество в клетке измеряется миллионными долями сухого вещества клетки.

Биосинтез аминокислот, пуринов и пиримидинов, а также витаминов, входящих в состав ферментов, включает сложные цепи реакций. Если организм неспособен осуществлять хотя бы одну из этих реакций, то он должен получать ее конечный продукт извне в виде фактора роста. Однако организму не всегда необходим этот фактор в готовом виде. Если блокирован один из ранних этапов в цепи биосинтеза, то специфическую потребность клетки можно удовлетворить теми органическими предшественниками, которые образуются в этой цепи после блокированного участка. Анализ потребности микроорганизмов в факторе роста обычно указывает, что они нуждаются в разных химических формах данного фактора. Например, некоторые микроорганизмы нуждаются в витамине B_1 , причем в качестве фактора роста нужна вся молекула; однако есть и такие, которым можно давать две половинки этого вещества, и они сами способны соединять их. Тогда эти микроорганизмы различают по *минимальной* потребности в факторе роста. Организмы, нуждающиеся в факторах роста, называют *ауксотрофными* и противопоставляют *прототрофным* организмам, которым такие факторы роста не нужны.

Отношение микроорганизмов к кислороду. Кислород входит в состав воды и многих органических соединений клетки. Будучи компонентом воды, всегда в больших количествах поступает в клетку. Однако многие организмы нуждаются и в молекулярном кислороде O_2 . К ним относятся те виды, которые удовлетворяют свою потребность в энергии за счет аэробного дыхания, при котором кислород играет роль терминального окислителя. Такие организмы называют *облигатными аэробами*.

Для микроорганизмов, растущих на агаре или в тонких слоях жидкости в присутствии воздуха, кислорода обычно вполне достаточно. В жидких средах при большом объеме жидкости аэробные микроорганизмы могут расти только на поверхности, образуя пленку, так как в более глубоких слоях

по мере удаления от поверхности условия приближаются к анаэробным. Для нормального роста аэробных микроорганизмов в глубоких слоях жидкости требуется аэрация. Микроорганизмы способны использовать только растворенный кислород. В то время как минеральные соли и органические вещества можно добавлять к среде в концентрациях, обеспечивающих рост клеток на протяжении нескольких часов или даже суток, с молекулярным кислородом этого сделать нельзя, так как растворимость его очень мала. Литр воды, находящейся при температуре 20 °С в равновесии с атмосферным воздухом, содержит всего лишь 6,2 мл или 0,28 ммоль O₂. Такого количества достаточно для окисления не более 0,046 ммоль или 8,3 мг глюкозы (т.е. примерно одной тысячной общего количества глюкозы, содержащейся в обычных питательных средах). Поэтому в среде невозможно создать значительный запас O₂, и его приходится добавлять непрерывно. В целом, микроорганизмы приспособились к очень низким концентрациям растворенного кислорода; однако недопустимо без ущерба для дыхания клеток доводить эти концентрации до уровня ниже критического.

Скорость перехода молекулярного кислорода в раствор возрастает с увеличением поверхности раздела между газовой и жидкой фазами и повышением парциального давления O₂ в газовой фазе. Для аэрации жидких культур пользуются либо обычным воздухом, либо смесью O₂, N₂ и CO₂. Для увеличения поверхности раздела прибегают к различным способам, таким как: 1) культивирование в тонком слое; 2) перемещение жидкости путем встряхивания (прямого или кругового); 3) вращение лежащих сосудов вдоль продольной оси; 4) пропускание воздуха через жидкость под давлением с помощью газораспределителя (стеклянные фильтры, колбы Клейвера); 5) перколяция; 6) механическое перемешивание.

Для глубинной культуры аэробных микроорганизмов принудительную аэрацию с помощью газораспределителей (стеклянных фильтров, доз) часто комбинируют с механическим перемешиванием. Следует учитывать, что даже в хорошо аэрируемых ферментерах или естественных водоемах кислород не всегда распределен равномерно. Если образуются скопления бактерий, то возникают локальные ниши с пониженным парциальным давлением кислорода. Затравками для возникновения таких полуанаэробных микростанций служат содержащиеся в природных водоемах взвешенные частицы. В эксперименте такие условия можно воспроизводить, добавляя к бактериальным взвесям мелкодисперсные частицы (глину, целлюлозу, хитин). В этих случаях микроорганизмы растут как «флора обрастания» - очень плотно друг к другу на поверхности частиц, и так же страдают от недостатка кислорода.

На другом физиологическом полюсе находятся микроорганизмы, которые получают энергию в результате реакций, не включающих использование молекулярного кислорода. Более того, для многих групп с такой физиологией молекулярный кислород токсичен - он убивает эти микроорганизмы или подавляет их рост. Такие микроорганизмы называют *облигатными (строгими) анаэробами*.

При выращивании строго анаэробных микроорганизмов необходимо исключить доступ кислорода. Техника культивирования анаэробных культур предусматривает: применение прокипяченных питательных сред и закрытых сосудов без пузырьков воздуха; создание бескислородной атмосферы в вакуумных эксикаторах или горшках Витта; применение адсорбентов кислорода (щелочного пирогаллола, дитионита, хлорида одновалентной меди) и других вспомогательных средств. Нередко удается ослабить или полностью нейтрализовать вредное для микроорганизмов действие кислорода, добавляя к среде восстановители (аскорбиновую кислоту, тиогликолат, цистеин или даже сульфид, если микроорганизмы его переносят).

Даже крайне чувствительные к кислороду микроорганизмы можно пересеивать на воздухе, если путем непрерывной продувки азота через культуральные сосуды исключить возможность соприкосновения питательной среды с воздухом (техника Хангейта). Можно также использовать перевивочные боксы, наполненные азотом, аргоном или водородом без примеси кислорода. В качестве цветного индикатора анаэробных условий в среду добавляют краситель резазурин (в присутствии кислорода он синий, а в анаэробных условиях бесцветен) или ставят в анаэробные инкубационные склянки сосудики с щелочным раствором глюкозы и метиленового синего (в анаэробных условиях он бесцветен).

Среди микроорганизмов существуют также *факультативные анаэробы*, способные расти и в присутствии, и в отсутствии молекулярного кислорода. По своему метаболизму факультативные анаэробы делятся на две подгруппы. Некоторые из них, например молочнокислые бактерии, получают энергию исключительно в результате брожения, но нечувствительны к присутствию кислорода, их называют *микроаэротолерантными* формами. У других (например, у многих дрожжей и энтеробактерий) метаболизм может переключаться с дыхания на брожение. Когда имеется молекулярный кислород, они используют его для терминального окисления, но в отсутствие кислорода могут получать энергию также с помощью брожения или анаэробного нитратного дыхания.

Некоторые из облигатных аэробов лучше растут при парциальных давлениях кислорода, значительно меньших, чем в воздухе (0,2 атм). Такие микроорганизмы называются *микроаэрофильными*. Возможно, что у них имеются ферменты, которые инактивируются в среде с сильными окислительными свойствами и потому могут действовать только при низких парциальных давлениях кислорода. Таковы многие бактерии, получающие энергию в результате окисления молекулярного водорода; известно, что гидрогеназа - фермент, участвующий в окислении водорода, - легко инактивируется кислородом. К ним также относят многие аэробные азотфиксирующие бактерии.

Первоначальное разделение микроорганизмов по способу питания было сделано на две группы: автотрофов (не нуждающихся в органических веществах) и гетеротрофов (нуждающихся в органических веществах).

Многообразие использования различных источников углерода микроорганизмами показало, что деление на эти две группы недостаточно. Было сделано много попыток создать более сложные системы классификации. Наиболее приемлема и полезна оказалась классификация, основанная на двух параметрах - природе источника энергии и природе основного источника углеродного питания. По источнику энергии все организмы делятся на два типа: на фотосинтезирующие организмы, способные использовать энергию света и называемые *фототрофами*, и на микроорганизмы, которые нуждаются в химических источниках энергии и которые называют *хемотрофами*. Организмы, способные использовать в качестве основного источника углерода CO_2 , называют *автотрофами*, а те, которые способны использовать органические соединения углерода, - *гетеротрофами*. На основе этих критериев можно разделить все организмы по типу питания на шесть главных групп:

1. *Фотоавтотрофы* - используют свет как источник энергии и CO_2 в качестве основного источника углерода. Эта группа включает большинство фотосинтезирующих микроорганизмов, высшие растения, водоросли.

2. *Фотогетеротрофы* - используют свет в качестве источника энергии и

как основной источник углерода какое-нибудь органическое вещество. Сюда относят некоторые пурпурные и зеленые бактерии.

3. *Хемоорганогетеротрофы* - используют органические химические соединения как основной источник энергии и основной источник углерода.

4. *Хемолитоорганотрофы* - используют химические неорганические соединения как источник энергии (чаще H_2 , восстановленное железо и марганец) и органические соединения как источник углерода.

5. *Хемоорганоавтотрофы* - используют в качестве источника энергии органические соединения (часто низкомолекулярные) и в качестве источника углеродного питания используют CO_2 .

6. *Хемолитоавтотрофы* - используют в качестве источника энергии восстановленные химические соединения (NH_3 , NO_2 , H_2S , S , S_2O_3) и CO_2 как источник углеродного питания.

Следует подчеркнуть, что ввиду значительной гибкости многих микроорганизмов в отношении питания классификация их по этому признаку оказывается в известной степени произвольной. Например, многие фотоавтотрофные прокариоты могут так же расти в темноте как хемоорганогетеротрофы. Такие организмы относят обычно к категории с более простыми потребностями: например, фототрофность имеет в этом смысле преимущество перед хемотрофностью, а автотрофность - перед гетеротрофностью. Чтобы указать, что микроорганизм может (или не может) переключаться на иной тип питания, часто употребляют термины *облигатный* или *факультативный*. Например, *облигатному фотоавтотрофу* обязательно нужен свет для получения энергии и CO_2 в качестве основного источника углерода, тогда как *факультативный фотоавтотроф* использует органические источники углерода.

Для указания потребности в факторах роста иногда используют два дополнительных термина - *прототрофность* и *ауксотрофность*. Прототрофы могут удовлетворять все свои потребности в углероде за счет основного источника. Ауксотрофы же нуждаются еще в одном или нескольких органических веществах (факторах роста). Как прототрофы, так и ауксотрофы могут встречаться среди организмов различных указанных шести групп. Например, для многих фотоавтотрофных водорослей и бактерий характерна ауксотрофность, которая выражается в том, что им абсолютно необходим какой-либо витамин или же несколько витаминов.

В большинстве своем микроорганизмы - одноклеточные организмы, они имеют высокое отношение поверхности к объему и поэтому высокие интенсивности обмена с окружающей средой. С этим связаны:

- высокие скорости размножения микроорганизмов,
- большой прирост биомассы,
- высокая скорость роста микробных популяций
- высокая скорость микроэволюционных процессов в микробных сообществах.

Процессы культивирования микроорганизмов разделяют на *периодические* и *непрерывные*. При периодическом режиме в культиватор одновременно закладывают все необходимое для роста микроорганизмов (субстраты) и некоторую “затравку” биомассы, после чего популяция микроорганизмов растет и развивается по своим законам. В некоторый момент времени производится изъятие биомассы. Затем процесс повторяется. Таким образом, снятие урожая производится периодически, и каждый раз популяция проходит через все стадии роста.

В замкнутой системе культивирования микроорганизмов численность популяции можно разделить на фазы (рисунок 1):

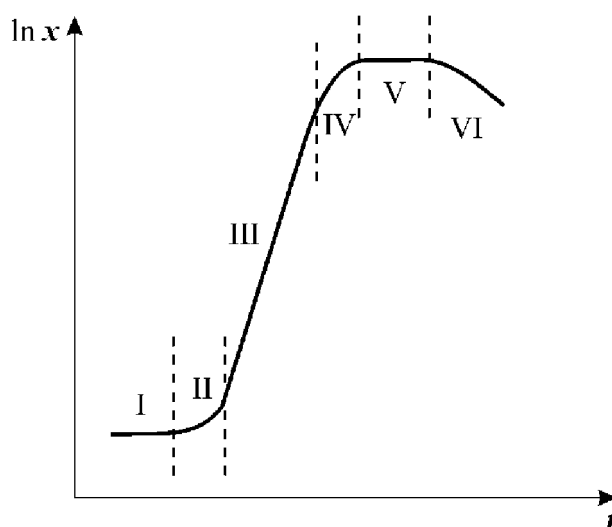


Рис. 1. Кривая роста микроорганизмов при периодическом культивировании. I - лаг-фаза; II - фаза ускорения роста; III - фаза экспоненциального роста; IV - фаза замедления роста; V - фаза стационарная; VI - фаза отмирания культуры

Непрерывные культуры микроорганизмов - это культуры, в которые все время добавляется питательная среда, а часть содержимого, в том числе живые организмы - биомасса - постоянно удаляется. Эти условия имитируют естественные проточные системы. Однако в отличие от естественных систем, условия среды и развития микроорганизмов в установках непрерывного культивирования в лабораториях и на промышленных предприятиях находятся под контролем и могут быть стабилизированы. Это позволяет проводить эксперименты с культурами микроорганизмов по изучению популяционных законов развития видов и их сообществ, наблюдать процессы микроэволюции.

Все это делает микробные популяции чрезвычайно привлекательными как в практическом отношении для биотехнологии, так и в качестве научного объекта для изучения популяционных и эволюционных процессов.

Лекция № 3

Тема: Особенности получения культур клеток и тканей растений.

Условия и питательные среды для культивирования. Цели создания и культивирования культур клеток растений

План

1. Понятие «клеточная инженерия»
2. Культивирование клеток растений.
3. Культивирование тканей растений - каллусогенез растений.
4. Изолированные протопласты. Методы получения протопластов.

Основой клеточной инженерии является слияние неполовых клеток (соматических) с образованием единого целого. В результате слияния клеток происходит образование гибридов у дрожжей, грибов, водорослей.

Другое направление клеточной инженерии - манипуляции с безъядерными клетками, свободными ядрами и другими фрагментами, сводящиеся к комбинированию разнородных частей клетки. Эти эксперименты, а также микроинъекции в клетку хромосом, красителей и т. п. проводят для выяснения взаимных влияний ядра и цитоплазмы, факторов, регулирующих активность генов, и т. п.

Путём соединения клеток разных зародышей на ранних стадиях их развития выращивают мозаичных животных, или химер, состоящих из двух различающихся генотипами видов клеток. С помощью таких экспериментов изучают процессы *дифференцировки* клеток и тканей в ходе развития организма. Ведущиеся уже не одно десятилетие опыты по пересадке ядер

соматических клеток в лишённые ядра (энуклеированные) яйцеклетки животных с последующим выращиванием зародыша во взрослый организм с кон. 20 в. получили широкую известность как *клонирование* животных. Преимущество клеточной инженерии в том, что она позволяет экспериментировать с клетками, а не с целыми организмами. Последнее гораздо сложнее, а иногда и невозможно, особенно в случае млекопитающих животных и человека или при получении отдалённых гибридов. Методы клеточной инженерии в медицине, сельском хозяйстве или биотехнологии часто применяют в сочетании с *генной инженерией*.

Р.В. Тузова, Н.А. Ковалев «Молекулярно-генетические механизмы эволюции органического мира. Генетическая и клеточная инженерия», 2010, Электронный ресурс: ISBN: 978-985-08-1186-8.

Каллусогенез растений.

Метод клеточных культур дает возможность получить неограниченное количество идентичных клеток, которые могут служить модельными системами для изучения метаболизма растений. Растительные клетки могут быть получены как на твердых средах, так и глубинным способом. При глубинном культивировании клеток растений используются основные методы культивирования микроорганизмов.

Для получения культивированных клеток растений процедуру начинают с взятия в асептических условиях кусочка ткани от молодого здорового растения (листья, ствол). Ткань помещают в среду, содержащую питательные вещества и факторы роста с обеспечением света, влажности, температуры. Рост происходит в виде каллуса (он может в дальнейшем культивироваться на твердой среде или может использоваться для получения суспензии клеток).

Каллус состоит из дезорганизованной массы клеток, способных к неограниченному росту и образованию метаболитов, характерных для растений. Ткань гетерогенна по биохимическим признакам клеток. Суспензионная культура более гомогенна, растет быстрее и обладает высокими адаптационными способностями, чем клетки каллуса.

Для получения суспензионной культуры небольшое количество каллусной ткани переносят в жидкую среду и культивируют в течение 2-3 недель. Пересев суспензионной культуры осуществляют через 10-28 дней. В цикле выращивания биомасса увеличивается в 10-15 раз, а количество клеток в 3-4 раза. В культуре клеток найдены ценные биологически активные вещества, не обнаруженные в растениях, и целевой продукт в ряде случаев накапливается в значительно больших количествах, чем в интактных растениях.

Особенностью клеточных культур является их способность к тотипотентности, то есть в определенной среде и при определенных условиях

из отдельной клетки возможно регенерировать целое растение. Подобное свойство отсутствует у животных, то есть в любой клетке растения заложена полная информация, которая необходима для дифференцировки клеток при делении.

Дифференцировка - возникновение различий между однородными клетками и тканями, изменение в ходе развития, приводящие к образованию специализированных клеток, органов, тканей. Свойство тотипотентности используется при микроразмножении растений, которые обладают следующими преимуществами:

1. возможность быстрого введения новых объектов;
2. получение систем, не содержащих возбудителей болезни;
3. круглогодичный рост;
4. возможность размножения плохо растущих растений;
5. возможность обмена генетическим материалом;
6. сохранение новых генотипов.

Новые формы растений могут создаваться с использованием клеточной инженерии: гибридные высшие растения получают с помощью парасексуальной гибридизации путем слияния протопластов (протопласт-клетка, имеющая только клеточную мембрану, отсутствует клеточная стенка, которая ограничивает цитоплазму с различными органоидами).

Изолированные клетки и ткани культивируют на многокомпонентных питательных средах содержащих: макро- и микроэлементы, углеводы, витамины, фитогормоны. Углеводы (сахароза, глюкоза - 2-3 %) используют в качестве питательного компонента, так как большинство каллусных тканей лишено хлорофилла и не способно к автотрофному питанию. Из гормонов ауксины - способствуют дифференцировке клеток экспланта и цитокинины - индуцирующие клеточное деление. При культивировании на твердых средах используют агар.

Среда по Мурасиге и Скугу - универсальная. Она пригодна для образования каллуса, поддерживает неограниченный каллусный рост и способствует индукции морфогенеза. Изменение концентрации ауксина и цитокинина приводит либо к образованию корней, либо стеблевых культур. Физические факторы - свет, температура, аэрация и влажность.

Свет. Большинство каллусных тканей растет в условиях слабого освещения или в темноте. Однако свет может выступать как фактор, обеспечивающий морфогенез и активирующий процессы вторичного синтеза. Оптимально 1000 люкс. Температура - оптимальна 26°C.

Аэрация. При культивировании в малых объемах нормальная аэрация достигается при постоянном перемешивании суспензии.

Влажность - 60-70 % в помещении.

Каллусная ткань образуется в результате повреждений на целых растениях, а также в стерильной культуре на эксплантах - фрагментах ткани или органа. Возникновение каллуса связано с неограниченным делением (пролиферацией) дифференцированных клеток. В процессе дифференцировки клетки теряют способность делиться.

Дифференцировка - это возврат клеток в меристематическое состояние, при котором они сохраняют способность к делению. Обязательное условие образования каллуса присутствие ауксина и цитокинина. Ауксины подготавливают клетку к делению, цитокинины - инициируют деление клеток.

Действие этих гормонов проявляется при последовательном или одновременном внесении их в среду. Через несколько часов после перенесения экспланта в условия *in vitro* начинается новый синтез белка, который связан с механическим повреждением и действием гормонов. Когда гормоны израсходуются, синтез белка прекращается. Если клетки будут культивироваться на питательной среде с ауксинами и цитокининами, то начнется каллусогенез. При культивировании на питательной среде образуется каллусная ткань, которая может различаться по плотности (рыхлой, средней плотности или плотная). Рыхлая каллусная ткань имеет сильно оводненные клетки, легко распадается на небольшие группы клеток и может использоваться для получения суспензионной культуры. Ткань средней плотности характеризуется хорошо выраженными меристематическими очагами (рисунок 3). В ней легко инициируются процессы органогенеза. У плотных тканей различают зоны редуцированного камбия и трахеидоподобных элементов.

Растения всегда служили источником пищи, лекарств, жизни. Способность интактных растений синтезировать различные биологически активные вещества позволило предположить, что тем же свойством будут обладать клетки и ткани. Культуры клеток могут синтезировать все классы соединений вторичного обмена, даже превышающих их синтез в растении.

У большинства культур вторичные метаболиты синтезируются в период стационарной фазы, у некоторых весь период роста.

Изолированные протопласты, их получение и культивирование.

Протопласты (от греч. *protos* - первый и *plastos* - вылепленный) - ограниченные мембраной цитоплазматические образования, несущие внутриклеточные органоиды и характеризующиеся структурной целостностью и способностью осуществлять активный метаболизм, выполнять биосинтезы и трансформацию энергии. В растительной клетке протопласт выявляется как морфологически обособленное образование при плазмолизе. Изолированный протопласт растения - это содержимое растительной клетки, окруженное плазмалеммой. Клеточная стенка отсутствует.

Развитие исследований в области изоляции растительных протопластов привело к разработке и модификации методов их выделения. Наиболее простым является механический метод, за счет разности концентрации солей или насыщенных растворов внутри и снаружи клеточной стенки. Тем не менее, он имеет ряд ограничений: 1 - этим методом можно выделить только небольшое число протопластов; 2 - используются только те ткани, в которых имеет место экстенсивный плазмолиз; 3 - получить протопласты из меристематической или зрелой ткани трудно; 4 - медлительный и трудоемкий.

Принципиально отличный метод получения изолированных протопластов - энзиматический, в этом случае для удаления клеточной стенки используются ферменты. В сравнении с механическим методом ферментативное выделение протопластов имеет отдельные преимущества: 1 - одновременно можно выделить большое количество протопластов; 2 - протопласты не подвергаются сильному осмотическому сжатию; 3 - клетки более интактны и не повреждены; 4 - метод сравнительно быстрый.

Для удаления клеточной стенки используют ферментные препараты трех типов - целлюлазы, гемицеллюлазы и пектиназы. Действие этих ферментов направлено на разрушение основных компонентов клеточной стенки. У растений это целлюлоза, гемицеллюлоза и пектиновые вещества. В клетках разных типов ткани, в зависимости от функциональных особенностей, возраста, наличия вторичных утолщений эти соотношения могут варьировать. Поэтому комбинацию ферментных препаратов и их соотношение специфичны для каждого типа клеток.

Процедура выделения протопластов состоит из трех этапов:

1. обработка ферментом
2. выделение протопластов из обособленных клеточных стенок
3. отделение интактных протопластов от клеточных осколков

При получении рекомбинантных клеток эффективным является метод слияния протопластов, который применим для микробных и растительных клеток, он включает:

1. разрушение клеточной стенки ферментами.
2. слияние протопластов.
3. рекомбинация хромосом.
4. регенерация клеточной стенки.

После слияния протопластов образуются гибридные клетки, в которых возможна рекомбинация генов (возобновление и перераспределение инженерного материала родителей).

Культивирование из изолированных клеток тканей на искусственных питательных средах в стерильных условиях (*in vitro*) называется методом культуры изолированных тканей.

Лекция № 4

Тема: Клеточная инженерия животных

План

1. Цели получения культур клеток и тканей животных.
2. Гибридомы: определение и цели получения.
3. Получение моноклональных антител.
4. Цели получения трансгенных животных.

Виды клеток животных, которые культивируют.

- негибридные клетки, например, стволовые;
- опухолевые клетки для оценки лекарственных препаратов, например, клетки опухолей костного мозга, миеломы. Они продуцируют большое количество аномальных иммуноглобулинов;
- гибридные клетки.

Получение моноклональных антител

При введении в организм животных и человека чужеродных макромолекулярных веществ - белков или полисахаридов (антигенов) в крови появляются защитные белки - антитела, для которых характерна необыкновенная, уникальная специфичность. Каждое антитело узнает только свой антиген, точнее, одну его детерминантную группу. В одном белке, состоящем из нескольких сот аминокислот обычно 10-15, разных детерминант, поэтому к одному белку образуется целое семейство различных по своей специфичности антител.

Антитела давно и широко используются для нейтрализации бактериальных токсинов, змеиных ядов, вирусов, попавших в кровь, и для идентификации индивидуальных белков, находящихся в клетке. Однако иногда требуются не многокомпонентные смеси антител, возникающие в крови в ответ на введение антигена, а отдельные, элементарные составляющие этой смеси, направленные лишь к одной детерминанте антигена и имеющие одни и те же характеристики - моноклональные антитела. Моноклональные антитела (monoclonal antibodies) - гомогенные антитела, продуцируемые гибридными клетками, в которых сочетаются способность синтеза специфических иммуноглобулинов одного изотипа с неограниченной пролиферацией. Методику получения таких гибридных клеток иначе называют гибридомами.

В результате иммунного ответа на определенный антиген образуется высокогетерогенный продукт, иными словами, антисыворотка содержит смесь антител. Последние продуцируются разными линиями В-лимфоцитов и направлены к разным детерминантам антигена. Если бы в определенную линию лимфоцитов можно было бы выделить и растить *in vitro*, полученный клон продуцировал бы моноклональные антитела. К сожалению, антителобразующие клетки не могут расти в культуре. В то же время существуют злокачественные опухоли костного мозга, миеломы, клетки которых продуцируют большое количество аномальных иммуноглобулинов. Эти клетки обладают способностью к неограниченному росту (т.е. образуют

клоны), и продуцируемые ими иммуноглобулины идентичны по структуре. По сути дела, это моноклональные антитела, однако антиген, к которому они направлены, неизвестен. И. Келер и Дж. Миелстен в 1974 г. сумели выделить гибридные клоны клеток, путем смешивания клеток миеломы мыши с клетками селезенки иммунных мышей. Эти клетки, будучи получены путем слияния, названные гибридомами, наследовали способность к неограниченному росту в культуре и в то же время к продукции антител определенной специфичности (моноклональных антител).

Начиная с 1979 г. несколько американских лабораторий создали моноклональные антитела, реагирующие со специфическими антигенами рака легких, молочной железы, толстой кишки, поджелудочной железы. Такие антитела позволяют диагностировать рак на ранних стадиях. Методом ранней диагностики улавливается рак поджелудочной железы, моноклональные антитела улавливают специфический антиген в сыворотке больных.

Этапы получения гибридом:

- иммунизация животных;
- отбор индуцирующих специфические антитела клонов;
- клонирование и реклонирование;
- массовая наработка гибридных клеток;
- получение культуральной жидкости или асцида, содержащий антитела;
- Выделение антител;

Обычно вся процедура от момента начала иммунизации до выделения антител занимает 3 -4 месяца (рис.2).

Организация работ и оборудование. Для работы по получению гибридом желательно выделить отдельное помещение, в котором имеется ламинарный бокс, инкубатор, низкоскоростная центрифуга и микроскопы. Помимо, обычно имеется морозильник и сосуд Дьюара с жидким азотом для хранения клеток. Основными средами, употребляемыми для получения гибридом, являются среда RPMI 1640 и среда Игла в модификации Дульбекко.

При иммунизации животных иммунный ответ вырабатывается на все детерминаты всех компонентов вводимого материала. Это значительно осложняет отбор клонов, продуцирующих антитела к интересующей детерминате, так как их доля может быть крайне незначительной. Поэтому по возможности для иммунизации применяют очищенные антигены, по крайней мере на последних этапах иммунизации. Одним из достоинств гибридомной техники и является как раз то обстоятельство, что специфические антитела против данного антигена можно получить, взяв для иммунизации неочищенный препарат антигена, и употребив впоследствии эти антитела для очистки антигена.

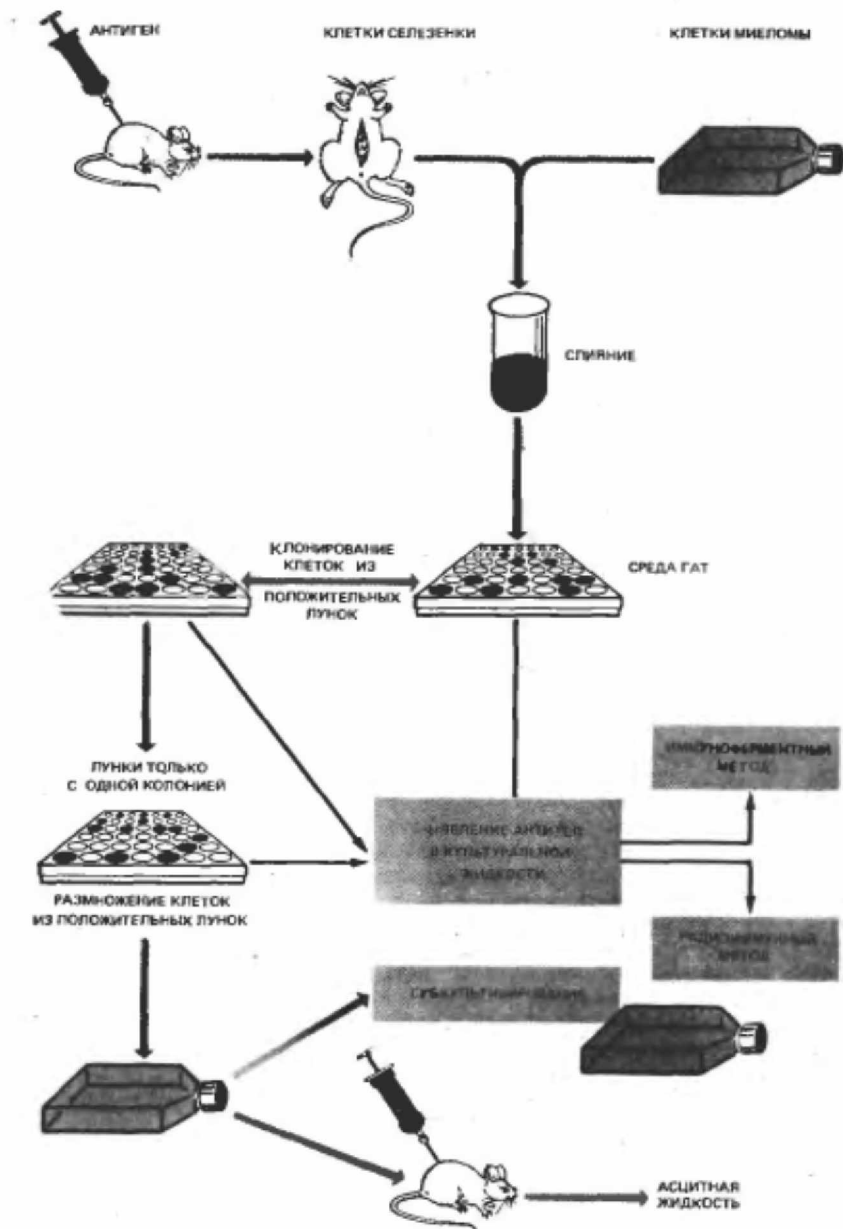


Рис. 43. Основные этапы получения гибридом, синтезирующих моноклональные антитела

Рис. 2 - Технология получения гибридом

Предпосылками для возникновения метода получения гибридом, синтезирующих моноклональные антитела, были разработки двух методологических подходов:

1. получение миелом, адаптация их к условиям культивирования вне организма;
2. метод соматической гибридизации клеток.

Другой предпосылкой возникновения метода получения гибридом явилась техника гибридизации соматических клеток, разработка которых широко проводилась после открытия феномена спонтанной гибридизации.

Обычно для иммунизации используют крыс и мышей. Это связано с тем, что подходящие миеломные клетки мышей и крыс широко распространены и,

Назначение процесса иммунизации состоит в том, чтобы увеличить долю клеток, продуцирующих антитела заданной специфичности, и перевести эти клетки в функциональное состояние, при котором они способны сливаться и образовывать антителобразующие гибридные клетки. Экспериментально установлено, что для гибридизации необходимо выделять селезеночные клетки животных через 3 - 4 суток после последнего введения антигена, то есть тогда, когда в лимфоидных органах много активно пролиферирующих клеток.

Конкретная схема иммунизации сильно зависит от природы антигена и его иммуногенности. Антигены клеточной поверхности являются сильными иммуногенами, тогда как большинство растворимых белков - слабые иммуногены. В последнем случае необходимо применять разлячные адьюванты, усиливающие иммунный ответ (ПАФ). По ходу иммунизации определяют титр антител к антигену. В опыт набирают животных с высоким титром антител.

Слияние клеток осуществляют в ПЭГ, добавляя 30 - 35 % полиэтиленгликоля к осадку клеток. Клетки центрифугируют 2 мин, затем их оставляют при комнатной температуре еще на 5-7 мин. После этого их обмывают и культивируют.

Клонирование осуществляется для выделения стабильных клонов гибридомных клеток. Для недавно образованных гибридом высокая нестабильность, связанная с утратой хромосом. К основным методам клонирования клеток относят метод лимитирующих разведений, клонирование в полужидком агаре и клонирование с помощью прибора - проточного цитофлуориметра.

После отбора гибридом, синтезирующих интересующие исследователя антитела, можно приступить к их массовому наращиванию с целью получения большого количества антител. Ускорению роста клеток способствует добавление питающего слоя. Гибридомы поддерживают в логарифмической фазе роста. Клетки культивируют как в стационарной культуре, так и в роллерной, а также различного типа ферментерах.

Очистку готовых антител можно получить высаливанием белков сульфатом аммония с последующим диализом. Если антитела необходимо выделить в чистом виде, то предварительно определяют их класс и подкласс, так как способы очистки различаются для антител разных классов. Выделение чистых антител лучше всего проводить на иммуносорбентах. Если не удастся

выделить антитела прямым способом, то получают иммуноглобулиновую фракцию с помощью методов аффинной и ионообменной хроматографии.

Интерес к применению моноклональных антител проявляет ряд европейских и североамериканских фирм. В Калифорнии существуют компании, выпускающие диагностические приборы для обнаружения гепатита, другие фирмы осуществляют выпуск лекарственных средств, третьи - препаратов для диагностики раковых заболеваний; все на основе моноклональных антител. Во Франции в Национальном институте здравоохранения и медицинских исследований (INSERM) освоена гибридная техника, производящая иммунологические реактивы.

Одним из условий дальнейших успехов на пути получения клеток и клеточных систем с новыми свойствами является углубление знаний, касающихся фундаментальных основ биологии механизмов регуляции процесса клеточной дифференциации, физиологии протопластов как объекта биологической трансформации клеток, взаимоотношение клеточных органелл. Следовательно, прогресс в развитии клеточной инженерии будет в значительной степени определяться успехами в области клеточной биологии и физиологии.

Квадромы - клеточные линии, получаемые в результате слияния двух гибридом, продуцирующих антитела разной специфичности. Они секретируют бифункциональные иммуноглобулины, имеющие в одной молекуле два разных по специфичности центра связывания антигена и обладающие таким образом сродством к двум различным антигенам.

Применение гибридом и квадром для терапии и диагностики *in situ*:

- с помощью гибридной технологии получили молекулы мышинных иммуноглобулинов, которые вызывают у человека иммунный ответ.

Найдены пути снижения иммуногенности мышинных моноклональных антител путем удаления отдельных фрагментов или замены их на аналогичные участки иммуноглобулинов человека.

В результате генно-инженерных манипуляций с иммуноглобулиновыми генами были получены химерные антитела и замещенные антитела.

Трансгенные животные. Цели создания:

1. Поиск возможной замены у данного вида не только генов, сколько целых кусков хромосом, используя уже имеющиеся библиотеки ДНК.
2. В онкологии замена онкогенов, т.е. генов, мутантная экспрессия которых приводит к возникновению рака.
3. Инсерция генов ростовых гормонов. Особи, имеющие дополнительный ген ростового гормона, значительно быстрее растут.
4. Перенос генов в клетки животных, из которых будут формироваться донорские органы для человека.

Трансгенные сельскохозяйственные животные - это живые биотехнологические фабрики 21 века, которые будут наиболее экологически чистыми производителями белковых препаратов.

Лекция № 5

Тема: Математическое моделирование биотехнологических систем

План

1. Основные направления моделирования процессов.
2. Блочный принцип математического моделирования биотехнологических систем.
3. Математическое описание кинетики роста микроорганизмов, кинетики потребления субстрата, кинетики биосинтеза продуктов метаболизма.
4. Основные направления моделирования процессов биосинтеза.
Классификация математических моделей и входящих в них параметров.
5. Требования, предъявляемые к математическим моделям.

Биотехнология микробного синтеза - это частная наука, предмет которой - многообразие биосинтетических процессов, осуществляемых с помощью микроорганизмов, а методы, как и в любой другой науке - общие, особенные и частные. Остановимся на моделировании - особенном методе исследования каких-либо объектов (конкретных и абстрактных) на моделях.

Наиболее общее определение модели принадлежит выдающемуся ученому и педагогу Н. А. Умову (1971): все наше мирозерцание от своего наиболее обыденного до наиболее возвышенного содержания представляет собой собрание моделей, образующих более или менее удачный отклик существующего, соответствующих или не соответствующих тем вещам, которые имелись в виду при их построении.

Н. И. Кондаков в Логическом словаре-справочнике дает следующее определение модели: модель - искусственно созданный объект в виде схемы, чертежа, логико-математических знаковых формул, физической конструкции и т. п., который будучи аналогичен исследуемому объекту..., отображает и воспроизводит в более простом, уменьшенном виде структуру, свойства, взаимосвязи и отношения между элементами исследуемого объекта, непосредственное изучение которого связано с какими-либо трудностями, большими затратами средств и энергии или просто недоступно, и тем самым облегчает процесс получения информации об интересующем нас предмете.

Все существующие модели обычно подразделяют на три типа: физические, вещественно-математические и логико-математические.

Физические модели имеют природу, сходную с природой изучаемого объекта, и отличаются от него лишь размерами, скоростью течения исследуемых явлений и иногда материалом.

Вещественно-математические модели имеют отличную от прототипов физическую природу, но допускают одинаковое с оригиналом математическое описание.

Логико-математические модели конструируются из знаков. Это абстрактные модели, которые строятся как исчисления. Исчисления - такая система изучения тех или иных областей объективного мира, в которой предметам какой-либо определенной области ставятся в соответствие

материальные знаки (цифры, буквы и т. п.), с которыми затем чисто формально по принятым в системе точным логическим правилам производятся операции, необходимые для достижения поставленной цели. Физические модели широко используются в физико-химической биологии. Это главным образом физические модели макромолекул - ДНК, РНК, белка, с помощью которых макетируются способы связей между элементами, образующими макромолекулы. К физическим моделям относятся также модель рибосомы, предложенная А. С. Спириным (1971). В биотехнологии микробиологического синтеза процесс культивирования микроорганизмов - это физическая модель промышленного производства.

Вещественно-математические модели применяются в биотехнологии микробного синтеза с начала XX столетия. Это системы дифференциальных уравнений различной степени сложности, разработкой которых занимались Мак-Кендрик, Пай, Моно, Н. Д. Иерусалимский и многие другие исследователи. В настоящее время общее число таких моделей оценивается более 100.

Логико-математические модели также находят применение в биотехнологии микробного синтеза; так, например, В. В. Бирюков (1985) с успехом использовал *булевы* модели для прогнозирования ферментативных процессов. Нельзя не подчеркнуть, что за логико-математическими моделями большое будущее, так как они могут и должны составить основу формализованного языка биотехнологических процессов (в том числе микробиологического синтеза). Формализованный язык в отличие от обычного языка, выполняющего познавательную функцию и функцию общения и представляющего систему звуков и букв, является системой таких знаков (символов), операции с которыми совершаются по правилам, определяющимся только формой выражений, составленных из символов. Если в обычном языке встречается многозначность, что ведет к неясности и неточности, то при создании формализованного языка стремятся к полной однозначности и предельной точности символов. Преимущество языка формул заключается также в том, что изложение мысли отличается компактностью и ясностью.

Для описания биотехнологических процессов на различных уровнях организации используются разнообразные языки (как естественный, так и искусственный). Биотехнология занимается изучением живых систем различной степени сложности. Причем, для описания разнообразных явлений наряду с естественным языком используются биохимический, морфологический, физико-химический, генетический, энергетический и физиологический языки. Эти языки применяются на различных уровнях организации живой материи: клеточном, тканевом, популяционном, биоценоотическом.

Масштабирование в биологии требует специальных решений, при этом до настоящего времени нет единого подхода к решению данной задачи. Для оптимизации и управления биотехнологическими процессами, помимо экспериментального, необходимо также привлечение математического моделирования. Эти два подхода, дополняя друг друга, позволяют более эффективно решать поставленные задачи, являясь для него источником

информации. Математические модели - удобное средство обобщения экспериментальных данных. Наличие математических моделей позволяет более обоснованно подходить к планированию экспериментов и обрабатывать данные, существенно сокращать объем экспериментальных работ. Для моделирования и расчета биотехнологических процессов в силу их сложности применяют системный подход. Математическая модель сложной биосистемы должна включать описание различных по своей природе объектов и явлений. Поэтому, анализируя биологическую системы в целом, применяют метод декомпозиции или блочный метод, расчлняя исходную систему на ряд подсистем: строятся модели массообмена, кинетики роста биообъекта и биохимических процессов.

К настоящему времени разработано много моделей массообмена, кинетики потребления субстрата и образования различных продуктов. Наиболее сложная задача - моделирование собственно биологических объектов, так как они значительно сложнее химических, физических и технических. Объекты биотехнологии способны к саморегулированию, их сложность усугубляется неоднородностью. Процессы, протекающие в биореакторе, зависят не только от сложных внутриклеточных факторов, но и от условий внешней среды; в свою очередь, внешние процессы в биологии связаны с внутренними, поэтому их разделить нельзя. Кроме этого, на данном этапе уровня развития математической биологии отсутствует теория, адекватная сущности биологических процессов. Пока не создан математический аппарат, способный описать природу биологических превращений во всем многообразии, то есть необходимо развитие и совершенствование самого математического аппарата.

Математическое описание биологических объектов дополнительно осложняется их недостаточной изученностью. Поэтому на данном этапе возможно достаточно упрощенное и приближенное математическое описание биологических объектов, это направление нуждается в существенном совершенствовании.

Необходимо отметить, что программы для ЭВМ в случае автоматизации биотехнологических исследований формулируются также на искусственном формализованном языке. Он предназначен для записи информации, хранящейся в запоминающем устройстве вычислительных машин, для описания программ (алгоритмов), указывающих очередность арифметических и логических операций и последовательность выполнения команд по вводу данных из запоминающего устройства, по переработке и преобразованию поступающей в ЭВМ информации.

В процессе исследования биотехнологических процессов микробиологического синтеза происходит непрерывная трансформация моделей изучаемого объекта, их усложнение и изменение характера согласно следующей триаде: эксперимент - теория - практика

На основе данных, полученных из анализа литературных источников или предварительно проведенных экспериментов, биотехнолог-исследователь строит гипотезу о наиболее существенных факторах процесса микробиологического синтеза. Гипотеза, как правило, формулируется словесно и представляет собой описательную модель на естественном языке.

Затем осуществляется постановка эксперимента, физическое моделирование биотехнологического процесса, на основе результатов которого подтверждаются или опровергаются первичные гипотетические представления о ходе процесса микробиологического синтеза. Полученные результаты затем используются как в лабораторной, так и промышленной биотехнологической практике.

В случае применения математического моделирования наряду с другими методами исследователь-биотехнолог после описательной модели создает вещественно-математическую модель (как правило, в виде систем дифференциальных уравнений), на основе которой после ее идентификации и проверки адекватности, он осуществляет поиск оптимального режима биотехнологического процесса.

Преимущество количественного теоретического подхода перед эмпирическим заключается в том, что после получения адекватной математической модели оптимальный биотехнологический режим выбирается на основе расчетов по математическому описанию (на основе имитации биотехнологического процесса), а экспериментально проверяется только лучший из найденных режимов, который рекомендуется к практическому использованию.

В настоящее время имеется большое количество работ по математическому моделированию биотехнологических процессов микробиологического синтеза, начиная от моделей накопления биомассы, антибиотиков, аминокислот и других продуктов жизнедеятельности микроорганизмов и кончая моделями, учитывающими возрастную структуру популяции, автоселекцию и адаптацию микробных сообществ. Математические описания основываются на законах биохимии и уравнениях ферментативного катализа; в последние годы для построения математических моделей биотехнологических процессов микробиологического синтеза с успехом используется аппарат L-систем.

Как правило, в биотехнологических исследованиях осуществляется построение схемы изучаемого процесса. Экспериментатор определяет набор:

1. начальных субстратов
2. ферментов и других внутриклеточных регуляторов, влияющих на кинетику микробного синтеза
3. конечных продуктов.

Затем он, обычно с помощью коллеги-математика, записывает уравнения, представляющие собой вещественно-математическую модель процесса.

Центральным моментом построения уравнений является фиксация ключевых реакций, скорость протекания которых ограничивает интенсивность накопления целевого продукта. Подобная методология была взята на вооружение Н. Д. Иерусалимским (1963, 1966) и широко используется в настоящее время при моделировании биотехнологических процессов микробиологического синтеза.

Примеры моделей биотехнологических процессов микробиологического синтеза

Получение полной информации об изучаемом объекте складывается из следующих этапов:

1. Словесная гипотеза исследователя.
2. Логико-математическая модель биотехнологической системы микробиологического синтеза.
3. Системная схема процесса (структурно-функциональный портрет системы).
4. Вещественно-математическая модель.
5. Идентификация модели.
6. Проверка адекватности модели.
7. Использование модели для управления биотехнологическим процессом.

Построение логико-математической модели биотехнологических процессов производится в соответствии с некоторыми положениями теории относительно обособленных систем (ООС). Под ООС понимается: на клеточном уровне - усредненная по ансамблю микробная клетка; на популяционном уровне - совокупность микробных клеток, усредненных по гомогенным частям популяции микроорганизмов одного вида; на биоценоотическом уровне - совокупность усредненных микробных клеток по популяциям разных видов микроорганизмов.

На входы ООС любого уровня поступают экзогенные субстраты, а с выходов снимаются целевые продукты биосинтеза. ООС в каждом конкретном случае состоит из набора относительно обособленных подсистем (ООПС), имеющих два входа и один выход. На структурный вход А поступает поток вещества, из которого синтезируется продукт на выходе данной ООПС; на управляющий вход В поступает вещество, регулирующее синтез продукта на выходе С данной ООПС. Необходимо выделять лишь те ООПС, постоянные времени накопления продуктов, на выходах которых одного порядка с постоянными времени накопления целевых продуктов. Именно они определяют биологическую инерцию и в дальнейшем называются ключевыми продуктами.

ООПС имеют три уровня иерархии:

1. ООПС, на управляющих выходах которых синтезируются ферменты;
2. ООПС, на управляющие выходы которых поступают вещества с выходов ООПС 1-го уровня;
3. ООПС, на управляющие выходы которых поступают вещества с выходов ООПС 2-го и 3-го уровней.

Концентрации ключевых продуктов на выходах описанных ООПС обозначим Φ_i , Y_i и X_i соответственно. При определении функциональных связей между ООПС необходимо учитывать, что:

- на управляющий вход ООПС, на выходе которой образуется фермент, поступает поток вещества с ООПС, синтезом продукта которой управляет данный фермент;
- на структурный вход ООПС, на выходе которой образуется фермент, поступает поток вещества, из которого образуется продукт ООПС, управляемой данным ферментом.

Приведенные положения удобно реализовать, применяя логико-математическую модель в виде прямоугольной матрицы. В общем случае, когда имеется несколько компонентов питательного субстрата и ферментов,

катализирующих биологические реакции.

Из логико-математических моделей однозначно выводятся структурно-функциональные портреты биотехнологических систем, а по ним строятся соответствующие вещественно-математические модели (И. Н. Блохина, В. И. Огарков, Г. А. Угодчиков, 1983). В. В. Бирюков и В. М. Кантере (1985) рассматривают логико-математические и вещественно-математические модели биотехнологических процессов микробиологического синтеза различного типа:

- модели, основанные на описании функции отклика;
- булевы модели для интегральной оценки состояния;
- кинетические модели для решения задач оптимизации зависимостей режимных параметров от времени;
- макрокинетические модели для решения вопросов управления режимами аэрации и перемешивания, а также масштабирования.

Для оптимизации биотехнологических процессов микробиологического синтеза практически всегда необходимо знать концентрацию целевого продукта в конце ферментации. Поэтому для анализа связи между входными и выходными факторами первостепенное значение имеет модель функции отклика, связывающая входные факторы с концентрацией целевого продукта в конце культивирования. Истинный характер этой связи определяется множеством закономерностей процесса и не может быть одним и тем же для различных конкретных процессов, входных и выходных параметров. Тем не менее, можно выделить наиболее существенную характерную особенность взаимодействия факторов в задаче оптимизации в случае поиска оптимальных рецептур питательных сред. Это взаимодействие типа лимитирования, известное в биологии как принцип Либиха.

Словесное описание (описательная модель на естественном языке) данного принципа гласит: выход целевого продукта лимитируется скоростью наиболее медленной реакции.

Выражение этого принципа на математическом языке с помощью вещественно-математической модели имеет вид:

$$y = \min_i \{ b_i x_i \}$$

где $f_i(x_i)$ - зависимость выхода целевого продукта y от концентрации субстрата x_i если остальные субстраты не лимитируют процесс.

Вид функции $f_i(x_i)$ может быть различен. Обычно это линейные функции:

$$y = b_i x_i$$

где b_i - коэффициенты пропорциональности (стехиометрические коэффициенты) между начальной концентрацией i -го субстрата и конечной концентрацией продукта при отсутствии лимитирования другими субстратами.

Наряду с проблемой оптимизации состава питательных сред для биотехнологических процессов микробиологического синтеза существует

важная задача по разработке объективных методов оценки интегрального состояния исследуемого динамического процесса. Необходимость в интегральной оценке состояния, особенно в периодических процессах ферментации, связана с тем, что целевая функция, например количество целевого продукта, может быть измерена только после окончания цикла ферментации. В ходе процесса ферментации измеряются только частные параметры, ни один из которых не имеет прямой корреляции с целевой функцией. Формируемая на основе этих частных параметров интегральная оценка состояния обычно является необъективной. Между тем заблаговременный прогноз эффективности процесса позволяет не затрачивать время на проведение ферментации до конца цикла, а прекратить ее, загрузить аппарат заново и вести процесс с более высокой производительностью.

Для практических целей вполне достаточно, если оцениваемая биотехнологическая ситуация будет отнесена к одному из небольшого числа градаций (классов) интегрального состояния. Это может быть либо грубая градация (все операции делятся на «нормальные» и «дефектные»), либо более дифференцированная (например, «дефектные», «нормальные», «хорошие» операции и т.д.).

Булевы модели строятся на основе дискретной (логической) информации и представляют собой логико-математические модели. Следует отметить, что исходные данные в процессах ферментации представлены, как правило, непрерывными (аналоговыми) значениями, которые описывают параметры процесса на биохимическом, морфологическом, физиологическом и других языках. Для построения булевой модели необходимо осуществить перевод этих разнообразных значений в дискретные числа таким образом, чтобы уровень каждого фактора задавался лишь двумя или несколькими значениями поддиапазонов, в которых находится действительное значение фактора.

В связи с большим числом проверяемых конъюнкций процедуру анализа и отнесения конъюнкций к определенным классам (перебор) лучше проводить на ЭВМ. При отсутствии ЭВМ для небольшого числа факторов (до 10) и при ранге конъюнкции 2- 3 процедура может быть проведена также вручную.

Для решения задач оптимизации и управления биотехнологическими процессами микробиологического синтеза необходима информация о закономерностях кинетики этих процессов, т. е. их динамической реакции на изменение условий культивирования. В ряде случаев оправдывает себя подход, основанный на составлении каталога вещественно-математических моделей биотехнологических процессов микробиологического синтеза. Аналогично могут быть построены наборы более сложных зависимостей как удельной скорости накопления биомассы микроорганизмов, так и удельной скорости накопления метаболита для случая роста не только на односубстратной, но и полисубстратной среде.

Необходимо подчеркнуть, что наряду с вещественно-математическими

моделями все шире внедряются в практику научных биотехнологических исследований логико-математические модели. Выше говорилось об их применении для построения кинетических булевых моделей с целью описания и предсказания динамики биотехнологических процессов. Логико-математические модели могут быть применены также для классификации микроорганизмов, например по типам питания.

Согласно принятой классификации в основе деления микроорганизмов по типам питания лежат два параметра:

- природа источника энергии;
- природа основного источника углерода.

По способу получения энергии реакции разделяются на темновую окислительно-восстановительную (хемо-а1) и световую фотохимическую (фото-а2); различают неорганические (лито-б1) и органические (органо-б2) доноры электронов. По отношению к кислороду вводятся две категории микроорганизмов - аэробы (С1) и анаэробы (С2), характеризующие акцептор электрона в окислительно-восстановительной реакции.

По природе источника углерода для построения тела клетки микроорганизмы делятся на автотрофные (d1), способные использовать в качестве главного источника углерода CO₂, и гетеротрофные (d2), которым нужны органические источники углерода.

Распределение микроорганизмов по типам питания будет определяться следующей логико-математической моделью для трофической функции:

$$J_{\text{тп}}(a_1, a_2, b_1, b_2, c_1, c_2, d_1, d_2) = (a_1 \vee a_2) \wedge (b_1 \vee b_2) \wedge (c_1 \vee c_2) \wedge (d_1 \vee d_2).$$

Данная модель описывает пространство логических возможностей микроорганизмов по типам питания, которое в данном случае целиком заполнено. Распределение микроорганизмов на физиологические группы по типам питания может быть использовано для конструирования питательных сред, в том числе и в автоматизированном варианте.

Лекция №6

Тема: Многофакторные эксперименты. Задачи оптимизации биотехнологического процесса по методу полного и дробного факторного эксперимента.

План

1. Цели планирования экспериментов. Однофакторные и многофакторные эксперименты, преимущества многофакторных экспериментов.
2. Метод полного факторного эксперимента

Оптимизация процессов культивирования по плану полного факторного эксперимента

Для управления биотехнологическими процессами в целях получения биомассы или метаболитов из продуцентов необходимо создание оптимальных условий их культивирования. Для чего необходимо использовать элементы теории планирования эксперимента.

Математическая теория эксперимента определяет условия оптимального проведения исследования, в том числе и при неполном знании физической сущности явления. Для этого используются математические методы при подготовке и проведении опытов, что позволяет исследовать или оптимизировать процессы, обеспечивать высокую эффективность эксперимента и точность определения исследуемых факторов. Обеспечивается также эффективное управление экспериментом при неполном знании механизмов явления.

Эксперименты обычно ставятся небольшими сериями по заранее согласованному алгоритму. После каждой небольшой серии опытов производится обработка результатов наблюдений и принимается строго обоснованное решение о том, что делать дальше. При использовании методов математического планирования эксперимента возможно: решать различные вопросы, связанные с изучением сложных процессов и явлений; проводить эксперимент с целью адаптации технологического процесса к изменяющимся оптимальным условиям его протекания и обеспечивать, таким образом, высокую эффективность его осуществления.

Теория математического эксперимента содержит ряд концепций рандомизации, последовательности эксперимента, математического моделирования, оптимального использования факторного пространства и ряд других.

Принцип рандомизации заключается в том, что в план эксперимента вводят элемент случайности. Для этого план эксперимента составляется таким образом, чтобы те систематические факторы, которые трудно поддаются контролю, учитывались статистически и затем исключались в исследованиях как систематические ошибки.

При последовательном проведении эксперимент выполняется не одновременно, а поэтапно, с тем, чтобы результаты каждого этапа анализировать и принимать решение о целесообразности проведения дальнейших исследований. В результате эксперимента получают уравнение регрессии, которое называют моделью процесса. Для конкретных случаев математическая модель создается исходя из целевой направленности процесса и задач исследования, с учетом требуемой точности решения достоверности исходных данных, что обычно производится по критерию Фишера. Так как степень полинома, адекватно описывающего процесс, предсказать невозможно, то сначала пытаются описать явление линейной моделью, а затем, если она неадекватна, повышают степень полинома, т.е. проводят эксперимент поэтапно.

Важное место в теории планирования эксперимента занимают вопросы оптимизации исследуемых процессов, свойств многокомпонентных систем или других объектов. Как правило, нельзя найти такое сочетание значений влияющих факторов, при котором одновременно достигается экстремум всех функций отклика. Поэтому в большинстве случаев за критерий оптимальности выбирают лишь одну из переменных состояния - функцию отклика, характеризующую процесс, а остальные принимают приемлемыми.

Оптимальные условия обеспечиваются различными факторами, такими как состав и концентрация питательных субстратов, температура, рН, аэрация и др. Параметры каждого фактора для создания оптимальных условий подбираются, с одной стороны, эмпирически, а с другой - методами планирования эксперимента. Безусловно, планирование эксперимента обеспечивает более быстрое достижение желаемого результата. Одним из методов планирования при проведении экспериментальных исследований в области биотехнологии является полный факторный эксперимент.

Сущность факторного эксперимента первого порядка состоит в одновременном варьировании всех факторов при его проведении по определенному плану, представлении математической модели (функции отклика) в виде линейного полинома и исследовании последнего методами математической статистики. Для проведения исследований и анализа полученных результатов введем несколько определений.

Уровнем фактора называют определенное значение фактора, которое будет фиксироваться при проведении эксперимента. Предположим, что объектом исследования является ферментер, в котором выход продукта (биомассы микроорганизма) Y зависит от температуры (X_1) и концентрации питательных веществ (X_2). Дополнительно известно, что изменение температуры от 20 до 40 °С и концентрации питательных веществ от 10 до 20 % изменяет выход продукта. Обозначим минимальные и максимальные значения факторов X_j и X_j символами +1 и -1. Тогда все возможные

комбинации факторов варьирования на двух уровнях (минимальном и максимальном) будут определены четырьмя опытами. Такой план эксперимента принято записывать в виде матрицы планирования (таблица 3).

В первой графе таблицы приводятся порядковые номера экспериментов, включающих все варианты, в которых каждый фактор сочетается с другими в определенной последовательности.

Таблица 3 - Матрица планирования эксперимента для двух факторов на двух уровнях

Номер эксперимента	X_0	Планирование		Переменная состояния, Y
		X_j	X_2	
1	+1	+1	+1	Y_j
2	+1	-1	+1	Y_2
3	+1	+1	-1	Y_3
4	+1	-1	-1	Y_4

Во второй графе таблицы приведены значения фиктивной переменной X_0 (тождественно равной +1), которая понадобится при вычислении свободного члена полинома. В первой строке таблицы спланирован первый опыт, когда факторам X_j и X_2 придают максимальные значения, во второй строке - когда фактору X_j придают минимальное значение, а фактору X_2 придают максимальное значение, и т.д. Подобное планирование имеет ряд достоинств и поэтому широко применяется для получения моделей. Пользуясь планом проведения эксперимента - таблица 3, можно после проведения эксперимента определить коэффициенты линейного уравнения регрессии:

$$Y = b_0 + b^X X_j + b_2 X_2 \quad (1)$$

Уровнем факторов можно назвать и средние значения рассматриваемых интервалов для факторов: температура и концентрация питательных веществ, т.е. 30 °С и 15 %. Эти значения факторов называются нулевыми уровнями, они определяют некоторую точку факторного

пространства, которая в предварительном эксперименте была оценена наилучшей по максимуму или по минимуму переменной состояния.

Обозначим нулевой уровень i -ого фактора, выраженного в натуральных единицах (в данном случае в градусах Цельсия или процентах), через X_{i0} и введём еще одно понятие - интервал варьирования. Это такое значение фактора в натуральных единицах, прибавление которого к нулевому уровню дает верхний, а вычитание - нижний уровень фактора. Обозначим его ΔX_j .

Экстремальные значения, которые могут принимать факторы, не изменяя своих физико-химических свойств и не искажая сути исследуемого процесса, называют границами существования изучаемых факторов, а интервал $(X_{i_{max}} - X_{i_{min}})$ - *областью определения факторов*. Очевидно, что интервал варьирования факторов должен составлять часть области определения факторов, если решается задача оптимизации. Это необходимо для того, чтобы осуществить движение к оптимуму в области определения факторов. В задачах аппроксимации (или интерполяции) интервал варьирования охватывает всю описываемую область таким образом, что для двухфакторной задачи верхними уровнями факторов являются $X_{1_{max}}$ и $X_{2_{max}}$, а нижними уровнями - $X_{1_{min}}$ и $X_{2_{min}}$. Эту область можно назвать интерполяционной, а область *определения факторов* - областью постановки экстремального эксперимента (М).

Из определений следует, что областей М может быть несколько (в общем случае конечное множество). Можно также предположить несколько областей оптимума. Область определения факторов для данной задачи одна. Обозначение верхних и нижних уровней факторов символами «+1» и «-1» фактически соответствует кодированию факторов по формуле:

$$X_i = X_{i0} + \Delta X_j \cdot \begin{cases} +1 \\ -1 \end{cases} \quad (2)$$

Кодирование факторов означает переход от системы координат в натуральных единицах к системе координат в кодированной форме. Каждая точка факторного пространства - это опыт в исследованиях.

В общем случае эксперимент, в котором реализуются все возможные сочетания уровней факторов, называется полным факторным экспериментом

(ПФЭ). Если каждый фактор варьируется на двух уровнях, то получается ПФЭ типа 2^n . Для двух факторов ($n=2$) число опытов $N = 2^2 = 4$. Можно осуществлять планирование на трех уровнях (верхний, средний, нижний), тогда ПФЭ будет типа 3^n и для $n=2$ общее число опытов будет $N = 3^2 = 9$.

Выбор уровней и интервалов варьирования факторов. Этот этап по планированию экспериментов можно выделить как этап принятия решений перед составлением плана эксперимента. Действительно, построение плана эксперимента начинают с выбора определяющих его характеристик. Первой рассматривают область определения факторов, которая, как правило, фиксируется в предварительном эксперименте. Для этого используют результаты опытов и теоретические представления о процессе.

Далее из области определения факторов выбором нулевых уровней интервалов варьирования факторов выделяется часть области для планирования эксперимента. Правильный выбор нулевых уровней (центра эксперимента) и интервалов варьирования факторов имеет решающее значение для действенности математической модели.

Идеальным случаем при выборе нулевых уровней факторов является «попадание» центра эксперимента в область оптимальных значений переменной состояния. Основное требование к интервалу варьирования состоит в том, чтобы он превышал удвоенную квадратичную ошибку фактора:

$$2Sx < AX_i < (X_{imax} - X_{imin}), \quad (3)$$

где S_{xi} - среднеквадратическое отклонение факторов Xf , AX_i - интервал варьирования; $\{X_{imax} - X_{imin}\}$ - область определения фактора.

Это требование связано с тем, что интервал между двумя соседними уровнями должен значимо (неслучайно) влиять на переменную состояния. Обычно интервал варьирования выбирается на основании априорной информации (или интуитивно) и затем уточняется после получения математической модели. Определенные сведения о нулевых уровнях и интервалах варьирования удается получить на этапе предварительного эксперимента.

Построение матрицы планирования. План, содержащий запись всех комбинаций факторов или их части в кодированной форме, называется матрицей планирования. В таблице 3 приводится матрица планирования для двух факторов на двух уровнях. Для построения матрицы планирования с большим числом факторов используют ряд приемов. Первый из них состоит в том, что элементарное сочетание первого фактора (+1, -1) повторяется для каждого следующего фактора на верхнем и нижнем уровнях. Столбец X_0 -

это столбец значений фиктивной переменной. Доказано, что его участие в матрице планирования делает расчеты коэффициентов математической модели более общими. Иногда указанный прием построения матрицы планирования трактуется как прием чередования знаков. В первом столбце знаки не меняются, во втором - меняются поочередно, в третьем - они чередуются через два, в четвертом - через четыре и т.д. по показателям степени двойки.

Рассмотренные матрицы планирования обладают такими свойствами, которые позволяют считать, что их построение выполнялось оптимально с точки зрения получаемой по результатам реализации матрицы планирования математической модели. Если модель получаем в виде уравнения регрессии, то коэффициенты должны быть наилучшими и точность предсказания значений переменной состояния одинакова в любом направлении факторного пространства. Эти требования формулируются как условия *ортогональности* и *рототабельности*. Условие ортогональности предполагает равенство нулю суммы почленных произведений любых двух столбцов матрицы:

$$\sum_{u=1}^N \hat{u}_i \hat{u}_j X^u = 0 \quad (4)$$

Рототабельность предполагает равенство и минимальность дисперсий предсказанных значений переменной состояния для всех точек факторного пространства.

Основное преимущество факторного эксперимента заключается в том, что в эксперименте варьируются одновременно все факторы. Это приводит к тому, что дисперсия в оценке коэффициентов регрессии оказывается в N раз меньше ошибки опыта. При классическом подходе эксперименты ставятся в определенной последовательности: все факторы фиксируются на некотором уровне, а один переводят на другой уровень. Затем это повторяют для другого фактора и в оценке каждого из коэффициентов участвует только какая-то часть опытов. К достоинствам полного факторного эксперимента следует также отнести:

- независимость дисперсии переменной состояния от вращения системы

координат в центре плана;

- одинаковую и минимальную дисперсию коэффициентов регрессии;
- независимость определения коэффициентов регрессии друг от друга;
- простоту в вычислениях коэффициентов.

Организация матриц планирования при различном числе факторов от типа ПФЭ 2² до ПФЭ 2⁵ в эксперименте приведена в таблице 4.

Таблица 4 - Организация матриц планирования типа ПФЭ от 2² до 2⁵

№	Тип эксперимента	Факторы
---	------------------	---------

⌘ ℒi 4^ o j i s) ^ 0' v O o o < i o n (^ - (^ o j i s)

>ч000<10\(^-(^00κ)

ΠΦΘ 2'

ΠΦΘ 2^

ΠΦΘ 2"

ΠΦΘ 2'

++

+ + + + +

++ + +

1 + 1 + 1 + 1 +

1 + 1 +

1 + 1 +

+ + I I + + ii++

ii++

| | | |

+

++ + +

| | | | | | | |

++ + +

| | | | | | | |

++ + +

++ + +

27	+1	+1	+1	+1	+1	-
28	+1	-1	+1	+1	+1	-
29	+1	+1	-1	+1	+1	-
30	+1	-1	-1	+1	+1	-
31	+1	+1	+1	-1	+1	-
32	+1	-1	+1	-1	+1	-
	+1	+1	-1	-1	+1	
	+1	-1	-1	-1	+1	
	+1	+1	+1	+1	-1	
	+1	-1	+1	+1	-1	
	+1	+1	-1	+1	-1	
	+1	-1	-1	+1	-1	
	+1	+1	+1	-1	-1	
	+1	-1	+1	-1	-1	
	+1	+1	-1	-1	-1	
	+1	-1	-1	-1	-1	

Реализация матрицы планирования. После построения матрицы планирования приступают непосредственно к эксперименту. Обычно матрицу планирования представляют в виде, удобном для реализации опытов - все кодированные значения факторов заменяют натуральными. Такую матрицу планирования называют рабочей. В рабочую матрицу переменных заносят время проведения опытов, значения ограничительных переменных и некоторые временные изменения в анализируемых пробах. Поскольку на изменение выходной переменной влияют помехи, план чаще всего реализуют несколько раз, получая m параллельных значений.

Алгоритм расчета полного факторного эксперимента типа 2ⁿ. В матрицу планирования экспериментов включают параллельные опыты. Если априорные сведения предполагают невысокую воспроизводимость результатов, далее проводят расчет коэффициентов уравнения регрессии по формуле:

$$b_i = \sum_{u=1}^N X_{iu} Y_u / N \quad (i = 1, 2, \dots, n), \quad (5)$$

$$Y_u = \sum_{k=1}^m Y_{uk}, \quad (6)$$

где Y_u - среднее значение по параллельным опытам u -й строки матрицы планирования.

Объединив формулы (5) и (6), можно вычислять коэффициенты регрессии:

$$b_i = \sum_{u=1}^N \sum_{k=1}^m X_{iu} Y_{uk} / Nm \quad (7)$$

Далее рассчитывают ошибку опыта (дисперсию воспроизводимости). Для этого вычисляют построчные дисперсии по формуле:

$$S_u^2 = \sum_{k=1}^m \{ Y_{uk} - Y_u \}^2 / (m-1), \quad (8)$$

Однородность дисперсий S_u^2 проверяют по критерию Кохрена:

$$G_p = \sum_{u=1}^N S_{u \max} / S_u \quad (9)$$

где $S_{u \max}$ - максимальная из рассчитанных построчных дисперсий;

$\sum_{u=1}^N S_u^2$ - сумма всех дисперсий по N строкам.

Если выполняется условие $G_p < G_t$, то гипотеза об однородности дисперсий принимается. G_t находят по таблицам для чисел степеней свободы $f_i = m - 1$ и $f_t = N$ и уровня значимости q . В технических и биологических расчетах принимается 5 % уровень значимости $q = 0,05$.

Построчные дисперсии усредняют по формуле:

$$S_{\dots}^2 = \sum_{u=1}^N \sum_{k=1}^m (Y_{uk} - Y_u)^2 / N(m-1) \quad (10)$$

где $N(m-1) = f_0$ - число степеней свободы.

Таким образом получают ошибку опыта.

Проверка значимости коэффициентов регрессии. Очевидно, что один фактор влияет на переменную состояния больше, а другой - меньше. Для чего проводят оценку значимости коэффициентов регрессии двумя

способами. В обоих случаях сначала находят дисперсию коэффициентов регрессии по формуле:

$$S^2 b_i = S^2_{0l} / N \quad (11)$$

т.е. дисперсии всех коэффициентов равны, поскольку зависят только от ошибки опыта S^2_0 и числа строк матрицы планирования N .

По первому способу оценку значимости коэффициентов осуществляют по формуле:

$$t_{ip} = |b_i| / S b_i \text{ и условию} \quad (12)$$

где $|b_i|$ - абсолютное значение i -того коэффициента регрессии;

t - табличное значение критерия Стьюдента, которое находят по числу степеней свободы $f_0 = N(m - 1)$ и уровню значимости q ;

$S b_i$ - среднеквадратичное отклонение b_i .

По второму способу для проверки значимости коэффициентов регрессии используют доверительный интервал Ab_i , который вследствие равенства S_{b_i} для всех коэффициентов регрессии одинаков для всех b_i . Тогда значимость коэффициентов оценивают, сравнивая абсолютные значения коэффициента и доверительного интервала:

$$b_i > Ab_i \quad (13)$$

Если выполняются оба условия (12) и (13), то i -й коэффициент признается значимым.

Проверка адекватности линейного уравнения регрессии. Для оценки пригодности линейного уравнения регрессии для решения задачи поиска оптимума сравниваются две дисперсии - одна показывает рассеяние средних опытных данных переменной состояния Y_u относительно тех значений переменной состояния Y_u , которые предсказаны полученным линейным уравнением регрессии. Эта дисперсия называется дисперсией адекватности и рассчитывается по формуле:

$$N \sum_{u=1}^m (Y_u - Y_{u,})^2 / (N-1) \quad (14)$$

где m - число параллельных опытов;

N - число строк матрицы планирования;

l - число членов в уравнении регрессии, оставшихся после оценки значимости.

Вторая дисперсия - это ошибка опыта. Адекватность проверяют, оценивая отношение:

$$F_p = IS, \quad (15)$$

по критерию Фишера

$$F_p < F_t \quad (16)$$

для степеней свободы $f_a = N - l$, $f_s = N(m - 1)$ и заданного уровня значимости q . Если выполняется условие (16), то линейное уравнение регрессии признается адекватным, т.е. рассеяние экспериментальных данных переменной состояния относительно уравнения регрессии того же порядка, что и рассеяние, вызванное случайными изменениями в объекте исследования (ошибка опыта).

Лекция № 7

Тема: Постферментационная стадия: выделение продуктов биосинтеза и компонентов клеток

План

1. Выделение микробной биомассы
2. Освобождение продуктов из биомассы продуцента.
3. Выделение продуктов биосинтеза методами экстракции.
4. Выделение продуктов методами сорбции.

Отделение биомассы от культуральной жидкости

Совокупность клеток продуцента после культивирования называется биомассой. Трансформированная питательная среда после культивирования продуцентов называется культуральной жидкостью. Для отделения биомассы от культуральной жидкости используют методы, основанные на физико-химических свойствах частиц продуцента:

- размер,
- плотность,
- поверхностные свойства.

Методы отделения биомассы по плотности частиц. Методы включают различные способы отделения биомассы, основанные на размерах клеток.

- Седиментация (для частиц от 2 мкм до 1 мм);
- Гидроциклонирование (во вращающемся режиме. Для частиц от 5 до 700 мкм);
- Центрифугирование (для частиц от 400 до 900 нм);
- Ультрацентрифугирование (для частиц от 10 нм до 1 мкм).

Отстаивание и осаждение.

Этот метод наиболее простой. Он используется для очистки сточных вод и при осаждении клеток дрожжей и мицелия грибов. Для полного осаждения в культуральную жидкость добавляют коагулянт.

Метод имеет недостатки: 1. большая продолжительность процесса, 2. плохое разделение осадка, 3. некоторые мелкие клетки не осаждаются.

Центрифугирование и сепарация.

Используют центрифуги и сепараторы, которые оцениваются по фактору разделения (Φ_r) и индексу производительности (F_{oc}). Часто используют тарельчатые сепараторы, потому что они имеют высокую производительность и хорошую степень концентрирования биомассы.

Методы отделения биомассы по размеру частиц

Основной способ фильтрации - задержание взвешенных частиц сетчатой или пористой перегородкой. Движущая сила - разность давлений, вызывающая протекание жидкости.

Разделяют:

Фильтрацию, которая используется для частиц размером от 10 мкм до 1мм. Обычно через тканевые или крупнопористые материалы фильтруют культуральную жидкость.

Микрофильтрация - используется для частиц размером от 200 нм до 10мкм.

Проводят с пропусканием через мелкопористые фильтры.

Ультрафильтрация используется для частиц размером от 10 нм до 5 мкм.

Проводят с пропусканием через мелкопористые полу-проницаемые мембраны.

Методы отделения биомассы по поверхностным свойствам продуцентов

Процесс флотации - способность клеток удерживаться на пузырьках газа.

Получают флотат - обогащенную по биомассе жидкость.

Пневматическая или барботажная флотация (размеры пузырьков более 100 мкм).

Напорная флотация (размеры пузырьков менее 40 мкм).

Электрофлотация. Пузырьки создаются за счет электролиза.

Освобождение продуктов из биомассы продуцента

Дезинтеграция клеток - разрушение клеточной стенки и освобождение цитоплазмы. Метод имеет ряд трудностей:

- клетки мелких размеров;
- нельзя дробить клетки;
- клетки имеют плотность, близкую к раствору;
- имеют очень эластичную клеточную стенку.

По чувствительности клетки различные наиболее чувствительны клетки животных.

Методы дезинтеграции клеток

Физико-механические: 1. твердофазные (размол, экструзия), 2. жидкофазные (перемешивание, декомпрессия, ультразвук).

Немеханические: 1. лизис (физический, химический, ферментативный), 2. сушка.

Для механической дезинтеграции клеток используют:

- баллистические дезинтеграторы (шаровые мельницы, коэффициент разрушения R высокий);
- воздействие на клетки перепада давлений (пропускают взвешенные в воде клетки через сопло или замороженные клетки методом экструзии через щель);

ультразвуковая дезинтеграция: действуют ультразвуком на клетки в

суспензии частотой 15-25 Кгц. Для больших масштабов мало применим, так как не хватает мощностей.

Немеханические методы дезинтеграции клеток.

Сушка - наиболее простой метод, но имеет недостаток: *разрушаются биологически активные соединения.*

Лизис - разрушение клеточной стенки

Методы лизиса: физические (осмотический шок раствором, замораживание-оттаивание), химические (обработка реагентами, антибиотиками, рН среды).

Ферментативные

Автолиз - разрушение клеточных стенок собственными ферментами;

Ферментолиз - действие ферментами (лизоцим, пектиназы, хитиназы);

Действие антибиотиков, в частности, пенициллина.

Действие бактериофагов.

Выделение продуктов биосинтеза методами экстракции

Экстрагент - жидкость для экстракции. Экстрагирование проводят из твердой фазы (дезинтегрированной биомассы - рафината). Жидкостная двухфазная экстракция (извлечение из жидкости - рафината). Шрот - твердый остаток после экстракции.

Экстрагирование «суперкритическими» жидкостями.

Это экстрагирование легкокипящими жидкостями: низкомолекулярные спирты (этанол, метанол, изопропанол), гексан, ацетон. Экстрагируют неполярные соединения: углеводороды, липиды, стероиды, алкалоиды и др.

Углекислый газ - CO_2 - обладает свойствами «суперкритического» вещества: *процесс выпарки экстрагента идет при обычной температуре, не требует нагревания.*

Сорбционные методы

Это выделение продукта из жидкой фазы с помощью сорбента. Растворенное вещество переводится в твердую фазу. Затем проводят отделение рафината из твердой фазы и выделение продукта, далее проводят десорбцию, при которой продукт растворяют в новом растворителе.

Виды сорбции включают:

1. ионный обмен (проводят на ионообменных смолах).
2. адсорбция мелкопористыми сорбентами (сорбцию проводят на сорбенте целых молекул, уголь и др.).
3. хроматография (колоночная, ВЭЖХ с обращенной колонкой);
4. биосорбция (*использование клеток микроорганизмов*) и иммуносорбция (*использование антител*).

Ионный обмен проводят с использованием ионообменных смол - твердых веществ, способных сорбировать активные химические вещества, имеющие заряженные (ионные) группы. Ионообменные смолы или иониты, это синтетические соединения, которые прочно связаны с фиксированными или анкерными ионами (прочные связанные с носителем). Анкерные ионы связаны

с противоположно заряженными ионами - подвижными или противоионами. По подвижному иону ионообменные смолы бывают катионообменниками и анионообменниками. Существуют и амфотерные иониты. Они имеют подвижные как катионы, так и анионы.

Преимущества ионного обмена:

1. Высокая селективность;
2. Возможность выделить соединение из большого количества примесей в смеси;
3. Простота аппаратного оформления;
4. Многократное использование ионообменников;
5. Полная автоматизация и механизация процессов;
6. Протекание процессов в водных растворах без использования токсичных растворителей.

Недостатки ионного обмена:

1. Нельзя использовать для извлечения неполярных соединений (в основном используют для очистки антибиотиков, орг. кислот);
2. Селективность метода не всегда достаточна (если в смеси несколько близких по строению и функциям соединений);
3. Невозможно использование противотока (жидкость-жидкость);
4. Велико гидравлическое давление колонн при малых гранулах ионитов.

Иммуносорбция.

Этот метод высоко селективный. Используют моноклональные антитела, которые получают обычно из гибридом.

Они распознают из смеси белков один, который способен связываться с моноклональным антителом.

Этот метод обычно используют в качестве диагносткумов в медицине, криминалистике. Пищевой промышленности для контроля токсинов и других соединений.

Лекция № 8

Тема: Основные направления развития нанобиотехнологии

План

1. Определение нанобиотехнологии.
2. Основные направления и перспективы нанобиотехнологий.
3. Значение нанобиотехнологии в медицине.

Нанобиотехнология - это междисциплинарный научно-технический комплекс знаний, основанный на средствах и методах биотехнологии и нанотехнологии, занимающийся изучением и воздействием объектов нанодиапазона на биологические объекты с целью создания и производства полезных для человека продуктов, технологий и процессов.

Появившаяся в начале 21 века нанобиотехнология имеет междисциплинарный

характер, который основан, прежде всего, на комплексе знаний биотехнологий (из которых наиболее выделяется молекулярная биология) и нанотехнологий.

Основополагающими факторами, которые повлияли на появление, становление и развитие нанобиотехнологии, являются: высокий рост в развитии таких научных дисциплин, как микробиология, молекулярная биология и инженерия, белковая инженерия и, собственно, биотехнология, которая объединяет данные дисциплины, а также высокий рост в развитии материаловедения, электроники и других областей нанотехнологии, наноинженерии и нанонауки, фундаментальной основой которых является физика.

Существование и развитие нанобиотехнологии было невозможным, если бы не процесс взаимной интеграции научных отраслей, кардинально отличающихся своей природой, методами и средствами. Благодаря такому «союзу» стало возможным появление совершенно новых отраслей научного знания, как нанобиотехнология.

Предпосылкой для начала развития и оценки перспектив в развитии данной научной области является философский аспект, так как появление своего рода «синтетической» технологии и науки может кардинально изменить научную картину мира, полностью перевернув представление человечества о таких материальных категориях, как материя, субстанция, форма и о понятиях «живого» и «неживого».

Однако данные категории и понятия необходимо будет осмыслить заново с новой точки зрения, благодаря чему существующая ныне научная картина мира будет изрядно дополнена и переосмыслена, что будет способствовать новому технологическому рывку человечества в своем развитии.

В настоящее время нанобиотехнология имеет три сформировавшихся направления, развитие которых сейчас идет усиленным темпом. Это: наномедицина, биомиметика и разработка методов и способов привнесения искусственных наноразмерных частиц, различных материалов и интерфейсов в живые системы. Каждое из этих направлений заслуживает отдельного рассмотрения.

С развитием нанобиотехнологии тесно связано качественно новое направление медицинской науки - молекулярная наномедицина. Основные исследования этой области заключаются в изучении и создании следующего: лабораторий на чипе, адресной доставки лекарств к пораженным клеткам, новых бактерицидных и противовирусных средств и диагностики заболеваний с помощью квантовых точек.

Развитие наномедицины тесно связано с революционными достижениями геномики и протеомики, которые позволили ученым приблизиться к пониманию молекулярных основ болезней. Наномедицина развивается там, где данные геномики и протеомики сочетаются с возможностями, позволяющими создать материалы с новыми свойствами на нанометрическом уровне.

Успехи последних лет в описании функционирования генома человека, молекулярных механизмов клеточных процессов обеспечивают основу для существенного повышения информативности медицинской диагностики. Вместо контроля немногих соединений, традиционно трактуемых как

характерные маркеры для той или иной болезни, становится возможным получать надежные и информативные сведения о функционировании организма и развитии патологического процесса на основании комплексного учета уровня значительного числа соединений, тем или иным образом связанных с патологическим процессом (М.П. Кирпичников, К.В. Шайтан). Прежде всего, это связано с использованием лабораторий на чипе, которые могут производить диагностику как *in vivo* (при вживлении их в организм), так и *in vitro*, а также с использованием методов диагностики при помощи квантовых точек (в режиме *in vitro*).

Следующая отрасль наномедицины позволит в скором времени осуществлять бесперебойную доставку лекарств внутри организма в необходимом направлении без потерь транспортируемого агента. В настоящее время именно адресная доставка лекарств из всех направлений наномедицины развивается наибольшими темпами. В этой области уже получены некоторые прикладные результаты, которые могут способствовать тому, что в ближайшее время практически все лекарства будут доставляться именно таким образом, обеспечивая тем самым более эффективное воздействие на пораженную зону внутри организма.

Создание бактерицидных и противовирусных средств на основе нанобиотехнологий и их использование в медицине позволит создать принципиально новые лекарственные средства на основе наночастиц различного происхождения. Уже сейчас многочисленные научные коллективы всего мира работают над изучением и разработкой различных универсальных платформ по созданию различных видов лекарств и вакцин. Особое внимание при изучении таких основ создания лекарств уделяется вирусам, как наиболее универсальным платформам, обеспечивающим создание различных лекарств и вакцин при использовании всего одного вируса. Также необходимо учесть, что работа с вирусами позволяет получить еще одно преимущество при использовании таких лекарств в борьбе с вирусными инфекциями и профилактикой их появления, что позволит надежно контролировать проявление таких заболеваний.

Помимо этого, следует отметить, что также возможна интеграция или взаимодействие наночастиц неорганической природы с биологическими наночастицами, обеспечивая тем самым появление комбинированных лекарств, которые будут содержать в себе преимущества обоих видов наночастиц, обеспечивая при этом универсальность и надежность своего воздействия.

Важнейшим направлением нанобиотехнологии является биомиметика.

Живые организмы производят нанотехнологические операции на протяжении более 4,5 миллиардов лет. Живая клетка использует ДНК, РНК и большое количество белков, чтобы строить клеточные структуры нанометровых размеров. Именно этим свойством живых клеток пользуются биомиметические нанобиотехнологии при создании искусственных наномашин и наноконструкций.

Данная область нанобиотеха находится в зачаточном состоянии, но ее развитие существенно ускорит создание таких конструкций. Как и наномедицина, биомиметика также имеет четыре сформировавшихся направления развития, это: создание наноконструкций из белка, использование в конструировании

молекул ДНК и РНК и работа с вирусами при создании наномеханизмов.

В своем развитии на настоящем этапе биомиметика находится в зачаточном состоянии. В настоящее время создаются фундаментальные основы биомиметических нанобиотехнологий. Но, не исключены и разработки чисто прикладного характера. Хотя об их практическом применении говорить пока слишком рано.

При конструировании различных конструкций нанометрового размера преимущество отдается работе с белками. Так как белки в настоящее время наиболее изучены и существует гипотетическая возможность широкого использования различных белковых наноконструкций в жизнедеятельности человека. Но, практическое применение таких конструкций обусловлено рядом проблем, главными из которых являются отсутствие на данном этапе развития науки и техники средств точного проектирования и производства таких конструкций и, что самое главное, не изучено влияние искусственных «деталей» на организм человека и окружающую среду.

При работе с молекулами ДНК и РНК уже сейчас имеются многочисленные прикладные результаты, показывающие, что нуклеиновые кислоты вправе использоваться в биомиметике наравне с белками и даже в агрегации с ними. Но, с точки зрения автора, использование подобных конструкций не сможет принести много пользы в прикладном использовании. Хотя не исключена возможность, что при определенной доработке биомиметических нанобиотехнологий в области работ с ДНК и РНК вполне возможно их прикладное применение в качестве нанороботов внутри живого организма.

Особое внимание следует уделить использованию вирусов в разработке биомиметических технологий.

На данный момент в мире до конца не изучена возможность использования вирусов в качестве платформы для разработки конструкций или механизмов нанометрового масштаба. Хотя при теоретическом обосновании вполне доказуемо их использование в качестве различных наномеханизмов. При этом в качестве преимуществ вирусов можно отметить их устройство, избирательность действий и механизм репликации вирусных частиц. Последнее качество вирусов может быть использовано при репродуцировании наномеханизмом или нанороботом себе подобных в неограниченных количествах.

Но следует отметить, что все разработки в области биомиметических нанобиотехнологий находятся либо на стадии теоретического обоснования либо только начинают проверяться практически в реальных условиях.

И, наконец, третье направление нанобиотехнологии - разработка методов и способов привнесения искусственных наноразмерных частиц, различных материалов и интерфейсов в живые системы. Данная область нанобиотеха являет собой разработку различных технологий и транспортных средств, которые будут доставляться посредством этих технологий в необходимое место живого организма, а в будущем, возможно, и в различные места неорганического мира.

Мировая научная общественность имеет практические результаты исследований в данных направлениях нанобиотехнологии, которые представлены такими прикладными средствами, как нанолекарства, биосенсоры, наноэмульсии различных биологических жидкостей и т.д.

Помимо этого разными научными коллективами в мире ведется активная работа в области исследования бактерий и нанобактерий, как потенциальных «умных» транспортных систем, которые могли бы служить своеобразным транспортом при доставке различных веществ нанометрового масштаба в необходимые места живого организма или, в будущем, и в различные места неорганического мира.

Так, например, в медицине можно использовать наноматериалы полимеры (бактериальную целлюлозу, гиалуроновую кислоту и другие), которые могут быть модифицированы путем изменения состава источников питания и условий культивирования.

Кроме того, наноматериалы можно использовать для иммобилизации клеток бактерий, при транспорте лекарственных средств.

Большое значение нанобиотехнологии имеют и в фундаментальных перспективах ее развития в будущем.

Одной из самых важных перспектив будущего развития нанобиотехнологии может служить создание идеальной технической системы. Под этим понятием понимают систему, масса, габариты и энергоемкость которой стремятся к нулю, а ее способность выполнять работу при этом не уменьшается. Предельный случай идеализации техники заключается в уменьшении её размеров (вплоть до полного «исчезновения») при одновременном увеличении количества выполняемых ею функций. В идеале - технического устройства не должно быть видно, а функции, нужные человеку и обществу, должны выполняться. Таким примером могут служить бионанороботы и различные биологические конструкции нанометрового размера. Используя же для решения этой задачи возможности нанобиотехнологии можно если не решить, то хотя бы кардинально приблизиться к созданию этой системы.

Также при помощи нанобиотехнологических методов станет возможным создавать роботизированные технические системы с использованием в их конструкции биологических элементов.

Третьей перспективой может служить создание нейроэлектронной системы сознания. Такая система будет представлять собой взаимодействие центральной нервной системы и искусственного интеллекта, созданного на основе достижений наноэлектроники.

Принципиальная возможность объединения биологических и электронных компонентов может стать возможной благодаря нейроэлектрическим интерфейсам - устройствам, позволяющим соединять компьютеры с нервной системой.

Огромные перспективы нанобиотехнологии и в других отраслях науки и техники. Таковы возможности лишь некоторых перспектив развития нанобиотехнологии, количество которых очень огромно и разнообразно.

ДОКУМЕНТ ПОДПИСАН
ЭЛЕКТРОННОЙ ПОДПИСЬЮ

Сертификат: 4E4C8F6C0D0FDC62FAAF7108E6CEFD6A
Владелец: Глыбочко Петр Витальевич
Действителен: с 19.05.2025 до 12.08.2026

