

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Учебная программа курса или дисциплины ДОП	Редакция 1	



УТВЕРЖДАЮ
Первый проректор –
проректор по учебной работе УлГУ

С.Б. Бакланов
_____ 2022г.

ЦДО «ДОМ НАУЧНОЙ КОЛЛАБОРАЦИИ»

ПРОЕКТ «УРОК БИОЛОГИИ»

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ОБЩЕОБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ ОБЩЕРАЗВИВАЮЩАЯ ПРОГРАММА

«Биотехнологии»

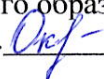
Направленность: естественнонаучная

Возраст обучающихся: 14-18 лет

Уровень: базовый

Срок реализации программы: 72 часа

Срок освоения: 1 год

Программу составил:
ст.преподаватель кафедры биологии,
экологии и природопользования, педагог
дополнительного образования
Окамова А.П. 
«26» 04 _____ 2022 г.

Рекомендовано к использованию
в учебном процессе.
Решение учебно-методического совета
ИОО
№166 от «17» 05 _____ 2022 г.

© Является интеллектуальной собственностью УлГУ.
При перепечатке ссылка обязательна.

Ульяновск, 2022

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Учебная программа курса или дисциплины ДОП	Редакция 1	

СОДЕРЖАНИЕ

- 1. ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА**
- 2. ПРОГНОЗИРУЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ОСВОЕНИЯ ПРОГРАММЫ**
- 3. ФОРМЫ И ВИДЫ УЧЕБНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ**
- 4. ФОРМЫ КОНТРОЛЯ И ПОДВЕДЕНИЯ ИТОГОВ РЕАЛИЗАЦИИ ПРОГРАММЫ**
- 5. ТЕМАТИЧЕСКАЕ ПЛАНИРОВАНИЕ**
- 6. СОДЕРЖАНИЕ УЧЕБНОГО ПРЕДМЕТА (ПРОГРАММЫ)**
- 7. МАТЕРИАЛЬНО-ТЕХНИЧЕСКИЕ УСЛОВИЯ РЕАЛИЗАЦИИ ПРОГРАММЫ**
- 8. ОРГАНИЗАЦИОННО - ПЕДАГОГИЧЕСКИЕ УСЛОВИЯ РЕАЛИЗАЦИИ ПРОГРАММЫ**
- 9. ПЕРЕЧЕНЬ РЕКОМЕНДУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ**

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Учебная программа курса или дисциплины ДООП	Редакция 1	

1. ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА

Прорыв биологической науки невозможен без углубления знаний учащихся об организации биологических систем на молекулярном, субклеточном и клеточном уровнях, расширения знаний о новых современных методах генетики и биотехнологии. Программа «Биотехнологии» призвана составить фундамент современного научного мировоззрения учащихся, подготовить их к последующему углубленному изучению современных направлений биологии.

Отличительными особенностями программы «Биотехнологии» являются углубленное изучение отдельных тем, использование активных форм обучения, разноуровневый принцип организации материала. Программа рассчитана на учащихся 9-11 классов средних образовательных школ, лицеев, гимназий, средних профессиональных образовательных учреждений. Реализация программы осуществляется на основе преемственности знаний, умений и компетенций, полученных в курсе биологии и химии общеобразовательных учебных заведений.

Нормативно-правовое обеспечение программы.

Программа разработана в соответствии со следующими нормативно-правовыми документами:

Федеральный закон от 29 декабря 2012 года № 273-ФЗ «Об образовании в Российской Федерации» (ст. 2, ст. 15, ст.16, ст.17, ст.75, ст. 79);

Проект Концепции развития дополнительного образования детей до 2030 года;

Приказ Минпросвещения РФ от 09.11.2018 года № 196 «Об утверждении Порядка организации и осуществления образовательной деятельности по дополнительным общеобразовательным программам»;

Приказ от 30 сентября 2020 г. N 533 «О внесении изменений в порядок организации и осуществления образовательной деятельности по дополнительным общеобразовательным программам, утвержденный приказом Министерства просвещения Российской Федерации от 9 ноября 2018 г. № 196»;

Методические рекомендации по проектированию дополнительных общеразвивающих программ № 09-3242 от 18.11.2015 года;

СП 2.4.3648-20 Санитарно-эпидемиологические требования к организациям воспитания и обучения, отдыха и оздоровления детей и молодежи;

Нормативные документы, регулирующие использование электронного обучения и дистанционных технологий:

Приказ Министерства образования и науки РФ от 23.08.2017 года № 816 «Порядок применения организациями, осуществляющих образовательную деятельность электронного обучения, дистанционных образовательных технологий при реализации образовательных программ»

«Методические рекомендации от 20 марта 2020 г. по реализации образовательных программ начального общего, основного общего, среднего общего образования, образовательных программ среднего профессионального образования и дополнительных общеобразовательных программ с применением электронного обучения и дистанционных образовательных технологий»;

Нормативные документы, регулирующие использование сетевой формы:

Письмо Минобрнауки России от 28.08.2015 года № АК – 2563/05 «О методических рекомендациях» вместе с (вместе с Методическими рекомендациями по организации образовательной деятельности с использованием сетевых форм реализации образовательных программ);

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Учебная программа курса или дисциплины ДОП	Редакция 1	

Приказ Министерства науки и высшего образования Российской Федерации и Министерства просвещения Российской Федерации от 05.08.2020 г. N 882/391 "Об организации и осуществлении образовательной деятельности при сетевой форме реализации образовательных программ»;

Актуальность программы

Современные методы исследования в биологии позволяют изучать биологические объекты не только как единое целое, но и выделять из них структуры соподчиненного уровня для изучения их жизнедеятельности в течение длительного времени, выделять отдельные клеточные органеллы и составляющие их макромолекулы (например, ДНК), исследовать их функциональные возможности. В настоящее время биотехнологические методы исследования характеризуются исключительными возможностями в изучении явлений жизни, что определяется использованием микроскопии различных видов, биохимических методов, высокоразрешающего генетического анализа, иммунологических методов, разнообразных способов культивирования и прижизненного наблюдения культур клеток, тканей и органов, методов конструкции биологически активных рекомбинантных молекул ДНК и т.д.

Данная программа опирается на полученные в течение предыдущих лет обучения знания, способствует их углублению при непосредственной работе с биологическими объектами с использованием микроскопической техники, что существенно расширит практическую подготовку учащихся.

Изучение фундаментальных методов современной биотехнологии и генной инженерии является основой для разработки современных диагностикумов, создания новых лекарственных средств и вакцин. На основе биотехнологий создаются и успешно применяются в клинической практике иммуномодуляторы и вакцины, современные высокоточные средства диагностики и терапии.

Прорыв биологической и медицинской науки невозможен без углубления знаний учащихся о современных достижениях биотехнологии. Вполне целесообразным на наш взгляд является преподавание основ технологии биологических систем и материалов у учащихся 9-11 классов, а также ознакомление с возможностями биотехнологий в биологии и медицине.

В совокупности лекционный и практический курсы призваны составить фундамент современного научного мировоззрения учащихся, подготовить их к последующему углубленному изучению современных направлений биологии и медицины.

Цели и задачи программы

Цель программы - формирование у обучающихся знаний по основным разделам биотехнологии, знаний о строении и функциях основных биообъектов, а также выработка самостоятельных исследовательских умений, способствующих развитию творческих способностей и логического мышления.

Задачи программы:

- приобретение знаний об общих принципах и методах использования метаболических процессов в клетках для получения различных лекарственных и биологически активных веществ;
- формирование умений и навыков для решения проблемных и ситуационных задач;
- формирование практических навыков постановки и выполнения экспериментальной работы;
- овладение понятиями современной биотехнологии.

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Учебная программа курса или дисциплины ДОП	Редакция 1	

- выработка умений использовать полученные знания при изучении последующих биологических дисциплин;
- формирование навыков сбора и обработки информации, материалов (уметь выбрать подходящую информацию и правильно ее использовать);
- развитие умения анализировать (креативного и критического мышления).

2. ПЛАНИРУЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ОСВОЕНИЯ ПРОГРАММЫ

В результате освоения программы учащийся должен:

знать:

- о строении и функциях нуклеиновых кислот;
- о ферментах репликации, транскрипции и трансляции;
- о строении и функции органоидов клеток;
- о биохимических процессах, протекающих в живых системах.

уметь:

- читать хромосомные карты;
- решать задачи по молекулярной генетике;
- решать генетические задачи.

владеть:

- навыками чтения таблицы генетического кода;
- навыками работы с микроскопом и другим оборудованием;
- навыками построения кариотипа.

3. ФОРМЫ И ВИДЫ УЧЕБНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ

Программа рассчитана на 72 часа и разработана для обучающихся в возрасте 14-18 лет.

В соответствии с нормами СанПиН продолжительность занятия составляет 90 минут.

Форма организации деятельности по программе – групповая.

Обучение и занятия будут проходить в форме лекций с использованием разнообразных наглядных пособий, показов видеофильмов, а также будут проводиться практические и семинарские занятия, лабораторные и самостоятельные работы, круглые столы, мастер-классы. Школьникам, в зависимости от их уровня деления, будут предложены оценочные материалы, ситуационные задачи и тесты, которые направлены на закрепление ранее изученного материала.

4. ФОРМЫ КОНТРОЛЯ И ПОДВЕДЕНИЯ ИТОГОВ РЕАЛИЗАЦИИ ПРОГРАММЫ

Контроль осуществляется в форме тестирования, собеседования, выполнения и защиты проектов. Итоговая аттестация: зачет.

5. ТЕМАТИЧЕСКОЕ ПЛАНИРОВАНИЕ

Тематический план

№ п/п	Раздел, тема	Количество часов
1.	Организация биотехнологического производства	24
1.1	Современная биотехнология в создании и производстве лекарственных средств	8

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Учебная программа курса или дисциплины ДОП	Редакция 1	

1.2	Структура биотехнологического производства	8
1.3	Субстраты, используемые в биотехнологии	8
2.	Характеристика биологических систем и материалов, как объектов биотехнологии	24
2.1	Подбор и совершенствование биообъектов	8
2.2	Совершенствование биообъекта методами генной инженерии	8
2.3	Векторные системы, применяемые для клонирования в клетках про- и эукариот	8
3.	Области применения биотехнологии	24
3.1	Биотехнология производства аминокислот, витаминов, рекомбинантных белков	8
3.2	Иммунобиотехнология	8
3.3	Биотехнология производства кормов, удобрений, пищевых добавок, пищевых продуктов, биотоплива	8
Всего часов		72

Учебно-тематический план

Название тем	Всего	Количество часов			Форма аттестации/ контроля
		Лекции	Практические занятия	Самостоятельная работа	
1	2	3	4	5	6
<i>Раздел 1. Организация биотехнологического производства</i>					
1. Современная биотехнология в создании и производстве лекарственных средств	8	2	2	4	тестирование, собеседование
2. Структура биотехнологического производства	8	2	2	4	тестирование, собеседование
3. Субстраты, используемые в биотехнологии	8	2	2	4	тестирование, собеседование
<i>Раздел 2. Характеристика биологических систем и материалов, как объектов биотехнологии</i>					
4. Подбор и совершенствование биообъектов	8	2	2	4	тестирование, собеседование
5. Совершенствование биообъекта методами генной инженерии	8	2	2	4	тестирование, собеседование
6. Векторные си-	8	2	2	4	тестирование,

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Учебная программа курса или дисциплины ДОП	Редакция 1	

стемы, применяемые для клонирования в клетках про- и эукариот					собеседование
<i>Раздел 3. Области применения биотехнологии</i>					
7. Биотехнология производства аминокислот, витаминов, рекомбинантных белков	8	2	2	4	тестирование, собеседование
8. Иммунобиотехнология	8	2	2	4	тестирование, собеседование
9. Биотехнология производства кормов, удобрений, пищевых добавок, пищевых продуктов, биотоплива	8	2	2	4	тестирование, собеседование
Итого	72	18	18	36	

6. СОДЕРЖАНИЕ УЧЕБНОГО ПРЕДМЕТА (ПРОГРАММЫ)

Раздел 1. Организация биотехнологического производства

Тема 1. Современная биотехнология в создании и производстве лекарственных средств

Теоретические вопросы. Определение понятия биотехнологии, цели и разделы биотехнологии. Краткая историческая справка по развитию биотехнологии в мире. Работы Л.Пастера и А.Флеминга. Роль биотехнологии в современной фармации. Биообъекты, используемые в биотехнологии. Биосинтез биологически активных веществ (БАВ) в условиях биотехнологического производства.

Практическое занятие №1.

Принцип конструкции биореакторов

Цель работы: Изучить принцип работы и конструкцию биореактора.

Теоретические сведения. В промышленном производстве фармацевтической продукции основной производительной силой является штамм-продуцент, поэтому стадия культивирования в специальных биореакторах или ферментерах является центральным этапом промышленного производства.

Принцип глубинного культивирования популяций микроорганизмов в аэробных условиях состоит в постоянном притоке в ферментационную среду источника O_2 – воздуха при интенсивном перемешивании питательной среды. При проектировании ферментеров учитываются кинетические особенности популяции, а не отдельных клеток.

Конструкция биореакторов в промышленной биотехнологии должна учитывать процессы массопередачи, т.е. обмена веществ между различными фазами (между клеткой и жидкой питательной средой). Поэтому важной составной частью реактора является система перемешивания, служащая для обеспечения однородных условий в аппарате.

Перемешивание является одним из основных факторов, определяющих гидродинамическую обстановку в ферментере. С увеличением его интенсивности возрастают скорости массообмена и происходит равномерное распределение по всему объему питательных веществ, возрастает скорость биохимических реакций в клетках микроорганизмов вследствие отсутствия лимитирующих факторов. Однако, чрезмерное увеличение интенсивности перемешивания может быть связано с механическим воздействием на клетку.

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Учебная программа курса или дисциплины ДОП	Редакция 1	

При производстве лекарств биотехнологическими методами используют аэробные культуры. Поэтому конструкция реакторов предусматривает наличие узлов аэрирования с тем, чтобы обеспечить перенос O_2 из газовой в жидкую среду и далее к клеткам в количествах, оптимальных для данного штамма в данной фазе роста.

Для аэрации культуральной среды используют воздух, или воздух, обогащенный O_2 , реже – кислород. В ходе метаболических процессов образуется CO_2 , подлежащий удалению.

Устройство ферментера

Ферментер представляет собой герметическую цилиндрическую емкость со сферической крышкой и днищем. Объем аппарата может быть от 0,01 до 100 м³. Лучший материал для изготовления ферментера – нержавеющая сталь.

Ферментер снабжен термостатирующим, перемешивающим и регулирующим pH среды устройствами, системой подачи питательной среды, пеногасителями воды и пара, змеевиком для стерилизации.

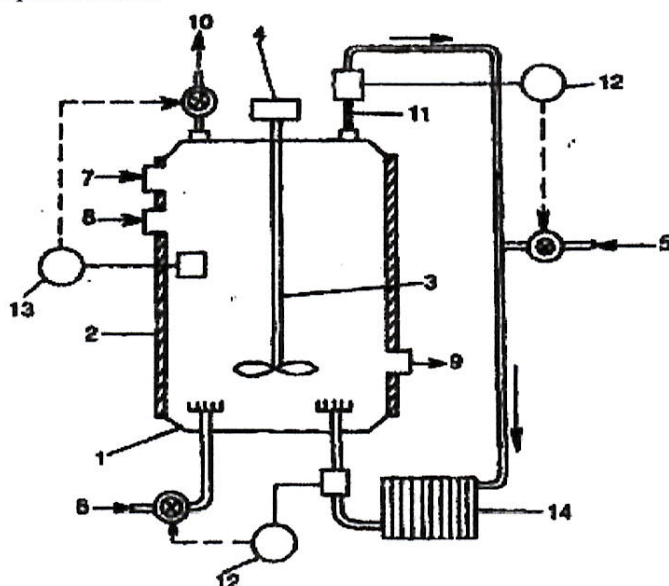


Рис. 1. - Ферментер для выращивания микроорганизмов на газообразных углеводородах: 1 - корпус ферментера; 2 - охлаждающая рубашка; 3 - мешалка; 4 - привод мешалки; 5 - подача газообразных углеводородов; 6 - подача кислородсодержащего газа; 7 - подача жидкой, питательной смеси; 8 - подача посевной культуры; 9 - выход дрожжевой суспензии по окончании ферментации; 10 - выпуск газа из ферментера; 11 - выход газовой смеси на рециркуляцию; 12 - газоанализатор, подающий сигнал на регулирующее устройство клапана; 13 - регулятор давления внутри ферментера; 14 - улавливатель углекислого газа

Производственное культивирование проводят в стерильных условиях. Перед заполнением ферментера питательной средой его моют, проверяют на герметичность, стерилизуют. Одновременно стерилизуют весь трубопровод. Заполняют ферментер питательной средой на 70%, доводят pH среды и температуру до оптимальных параметров, характерных для микроорганизма-продуцента.

Стадия культивирования длится 48-72 часа. Имеются бактериальные культуры, стадия культивирования которых составляет 24 часа. Для грибов характерно культивирование 12 суток. На продолжении всего цикла растущую глубинную культуру необходимо

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Учебная программа курса или дисциплины ДОП	Редакция 1	

снабжать кислородом. Обычно используют для этих целей барботажные устройства. При аэрации образуется пена, которая мешает процессу культивирования. Для ее погашения используют пеногасители - растительные и животные масла, силиконовые растворы или перемешивание культивируемой среды в верхнем слое.

По способу перемешивания и аэрации биореакторы подразделяются на аппараты с механическим, пневматическим и циркуляционным перемешиванием. Аппараты с механическим перемешиванием имеют механическую мешалку, состоящую из центрального вала и лопастей различной формы. Причем лопасти должны быть расположены в несколько этапов (для эффективного транспорта компонентов питательной среды непосредственно к клеткам). Аэрирующие устройства биореакторов барботажного типа имеют в нижней части реактора горизонтальную трубу с отверстиями, через которые разбрызгивают (барботируют) воздух в виде мелких пузырьков. Барботер снабжается механическим вибратором.

Ферментер с механическим перемешиванием барботажного типа

Это вертикальный аппарат цилиндрической формы объемом около 63 м^3 , изготовленный из высоколегированной стали X18H10 I с эллиптическими крышками и днищем. Н: Д = 2,6: 1. На крышках расположены приводы перемешивающего устройства, штуцеры для загрузки питательной среды и посевного материала, штуцер подачи и вывода воздуха, смотровые окна, люки для погружения моеющей механической головки, штуцеры для приборов кипа. Внутри аппарата – вал с перемешивающим устройством, барботер, для подачи воздуха. Аппарат снабжен рубашкой из 6-8 ярусов-секций, площадь поверхности охлаждения 60 м^2 , t стерилизации 130-140 °С, расход стерильного воздуха до $1 \text{ м}^3/\text{мин}$. Высота столба жидкости 5-6 м, при $\text{pH} = 8$.

Ферментеры с пневматическим перемешиванием и аэрирование среды

В ферментерах пневматического типа механическая мешалка отсутствует. Перемешивание жидкой питательной среды осуществляется пузырьками газа. Перемешивающим устройством является диффузор, выполненный в виде цилиндра, вмонтированный внутрь ферментера. Воздух под давлением поступает через отверстия в жидкость. Причем в месте ввода создается разрежение, и воздух поднимаясь снизу вверх, перемешивает культуральную жидкость. Коэффициент заполнения ферментеров с пневматическим перемешиванием на 10-15% ниже, чем с механическим. Аппараты рассчитаны для работы под избыточным давлением. Скорость массопередачи между газом и жидкостью в таких аппаратах ниже, чем с механическим перемешиванием и для преодоления этого недостатка вводятся различные модификации. Эрлифтный тип ферментера снабжен диффузором, причем через него проходит столб жидкой питательной среды, который расталкивается пузырьками воздуха, что способствует увеличению ее объема и жидкость перемешивается через верхний край диффузора вниз и это приводит к перемешиванию и аэрации жидкости в другом объеме аппарата, т.е. вне диффузора. В таких аппаратах практически нет угрозы избыточного пенообразования и коэффициент заполнения их выше.

Пневматические ферментеры характеризуются плановым перемешиванием и их можно применять при культивировании клеток высших растений и животных. Например, культура клеток *Digitalis lanata* образует в таком реакторе Р-метилдиоксины (средство для лечения сердечно-сосудистой ишемии). Ферментеры с пневматическим перемешиванием привлекают также простотой конструкции и малыми энергозатратами, т.е. перемешивание и аэрирование совмещено в одном узле. Однако их нельзя применять в биотехнологических процессах для выращивания грибов и актиномицетов, выращиваемых на питательных средах с высокой вязкостью.

Ферментеры с циркуляционным перемешиванием

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Учебная программа курса или дисциплины ДООП	Редакция 1	

Эти аппараты содержат специальные устройства (насосы), создающие направленный поток жидкости по замкнутому кругу. Жидкость увлекает за собой пузырьки газа. Создан специальный ферментер с циркуляционным перемешиванием и наличием диффузора, т.е. сочетание циркуляционного перемешивания и пневматического.

Ход работы:

1. Изучить строение биореактора.
2. Изучить виды биореакторов
3. Рассмотреть преимущества и недостатки каждого биореактора и сферы их применения.
4. Зарисовать схему строения в рабочую тетрадь.
5. Внести практические предложения по усовершенствованию работы биореактора.

Тема 2. Структура биотехнологического производства

Теоретические вопросы. Преимущества производства продуктов биотехнологическими методами. Строение биореакторов. Типы биореакторов. Подготовительные операции биотехнологического производства. Классификации биосинтеза. Параметры, влияющие на биосинтез (механические, физические, химические, биологические). Требования к продуцентам. Решения экологических проблем (предупреждение попадания продуцента во внешнюю среду).

Практическое занятие №2.

Воздухоподготовка и подготовка питательных сред в биотехнологическом производстве

Цель работы: Изучить процесс воздухоподготовки и подготовки питательных сред в биотехнологическом производстве.

Теоретические сведения.

Очистку воздуха можно осуществить принципиально разными методами, основанными на уничтожении организмов или удалении их. Одним из самых эффективных способов стерилизации воздуха является облучение ультрафиолетовыми лучами. Этот метод используется для обеззараживания воздуха в боксах.

Отечественным и зарубежным опытом доказано, что технологически и экономически оправданным в промышленности является способ очистки воздуха с помощью волокнистых и пористых материалов. Таким путем удается получить воздух со степенью чистоты 99,9999%.

Для стерилизации воздуха рекомендуют также мембраны диаметром пор 0,45 мкм. Пористость мембран достигает 80%. Удаление микроорганизмов с помощью мембраны основано на ситовом эффекте. В основном фильтрующие материалы поставляет фирма "Миллипор" (США), в нашей стране (г. Владимир) налажен выпуск мембраны "Владипор". Мембранам не требуются высокие перепады давления, но для их надежной работы необходимо точное выполнение условий стерилизации. Стерилизовать мембраны можно только насыщенным водяным паром, от перегретого пара в мембранах появляются трещины, и мембраны выходят из строя.

Биотехнологическое производство должно иметь продуцент, сырье для приготовления питательных сред, оборудование для всех этапов технологического процесса. Типичный элементарный состав микроорганизмов следующий: (в % к весу сухой биомассы) углерод – 50%, азот – 7-12% и микроэлементы. Все клетки содержат также кислород и водород. Среда для выращивания микроорганизмов должна включать элементы, которые входят в состав клеток, и сохранять правильное их соотношение.

Выбор состава питательных сред

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Учебная программа курса или дисциплины ДОП	Редакция 1	

Многие из применяемых в промышленности продуцентов являются хемотротрофами, потребности которых в энергии и углероде удовлетворяются простыми сахарами. В промышленности в качестве источников энергии и углерода часто применяют неочищенные сахара, а также те или иные полупродукты, например, свеклосахарную или кукурузную мелассу (50-70% ферментируемых сахаров), сыворотку или отходы консервной промышленности. Дрожжи получают на сульфатно-спиртовой барде, побочном продукте бумажного производства.

Для обеспечения разнообразных типов метаболизма микроорганизмов питательные среды должны соответствовать следующим требованиям:

1. Содержать все элементы, из которых строится клетка: макроэлементы (углерод, азот, кислород, сера, фосфор, калий, кальций, магний, железо) и микроэлементы (марганец, молибден, цинк, медь, кобальт, никель, ванадий, хлор, натрий, кремний и др.). Все элементы должны находиться в удобоусвояемых конкретным микроорганизмом соединениях. Источником углерода могут быть разнообразные органические соединения: углеводы, многоатомные спирты, органические кислоты, аминокислоты, белки и др. Источником азота служат аммонийные соединения, аминокислоты, пептиды, белки. Источником остальных макроэлементов являются неорганические соединения – соли фосфорной и других кислот. Микроэлементы поступают в питательную среду с органическими субстратами, солями и водой. Витамины (особенно группы В) и другие факторы роста вносят в среду в составе органических субстратов или в виде чистых веществ.

2. Иметь достаточную влажность (не менее 20% воды).

3. Концентрация солей в среде должна обеспечивать изотонию, т.е. соответствовать концентрации солей в микробной клетке (для большинства микроорганизмов – 0,5%; галофильных – 3%).

4. Концентрация водородных ионов (рН) среды должна быть оптимальной для выращиваемого микроорганизма (диапазон рН 4,5-8,5).

5. Окислительно-восстановительный потенциал (Еh среды должен соответствовать потребностям микроорганизма: для анаэробов – 0,120-0,60 В, для аэробов – более 0,80 В.

6. питательная среда должна быть стерильной.

Для производства фармацевтической продукции применяются натуральные, полусинтетические и синтетические питательные среды. Натуральные среды получают из животных тканей, микроорганизмов, растений, овощей, фруктов, зерна и других продуктов, а также отходов производства. Они содержат весь комплекс необходимых компонентов, но мало пригодны для крупнотоннажных производств из-за непостоянства состава. Комплексные натуральные среды, состоящие из бишопрота, пшеничных отрубей широко используются для получения ферментов.

Первоначально микроорганизмы и клетки тканей культивировали на естественных средах, представляющие собой экстракты растительного и животного материала (виноградный сок, молоко, пептон, сыворотка). подобные среды удобны, так как содержат все источники, необходимые для роста и размножения, но они обладают одним недостатком – неопределенностью содержания макро- и микроэлементов.

Полусинтетические среды состоят из соединений известной химической природы и комплекса неопределенных веществ. Это жидкие парафины, древесные гидролизаты, меласса, отруби, кукурузный экстракт и другие отходы пищевых и непищевых производств (антибиотики, аминокислоты, дрожжи, ферменты). Синтетические среды состоят из соединений известной химической природы: метанола, этанола, природного газа и метана.

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Учебная программа курса или дисциплины ДОП	Редакция 1	

Углеродсодержащее сырье. Наиболее характерным углеродсодержащим сырьем являются углеводы. Углеводы – одна из основных частей питательной среды для выращивания микроорганизмов. Они используются для синтеза клеточных структур и одновременно являются источником энергии. Для промышленного биосинтеза наиболее часто используют глюкозу и крахмал, гидролизаты различных отходов переработки сельскохозяйственного сырья (подсолнечная лузга, кукурузные кочерыжки, древесная щепа и др.).

Выбор источника углерода в биотехнологии белковых веществ, липидов и аминокислот имеет очень большое значение. Он не только представляет пути обмена веществ данного микроорганизма, но и часто предполагает состав остальных компонентов среды и даже технологию и аппаратное оформление производства целевого продукта, в особенности, если предполагается использование труднодоступного для микроорганизмов субстрата, нуждающегося в предварительной обработке.

Азотсодержащее сырье. Биосинтез многих биологически активных веществ осуществляют на питательных средах сложного, а зачастую непостоянного химического состава. В них различные источники азота могут быть представлены белками, пептидами или свободными аминокислотами. При промышленной ферментации используют кукурузный экстракт, соевую муку или гидролизат дрожжей. Кукурузный экстракт содержит весь комплекс аминокислот, но их количественный состав может значительно меняться от партии к партии.

Белковыми веществами богата соевая мука. Она также, как и кукурузный экстракт, содержит все аминокислоты, однако в основном они связаны в идее белков. При оценке природных веществ (соевая мука, кукурузный экстракт и т.п.) следует принимать во внимание, что их воздействие на направленный процесс обмена веществ микроорганизмов обусловлено не только наличием белков и аминокислот, но и присутствием наряду с ними углеводов, нуклеиновых кислот, микроэлементов, органических кислот и других соединений.

Из минеральных азотсодержащих веществ наиболее часто применяют аммонийный соли серной, соляной или азотной кислот. Сульфат аммония пригоден для биосинтеза многих соединений.

Потребность в тех или иных азотсодержащих соединениях определяется физиологическими возможностями микроорганизмов. Часть микроорганизмов способны синтезировать аминокислоты на основе компонентов среды с использованием азота неорганических соединений, другие требуют ведения в состав среды готовых форм аминокислот или других органических источников азота.

Содержание азота в питательной среде должно быть сравнительно высоким, так как биомасса, например, дрожжей, состоит приблизительно на 45-55% сухой массы из белка, в которой около 6% азота. Поэтому для выращивания дрожжей требуется до 100 мг азота на 1 л питательной среды.

Иногда продуценты биологически активных веществ нуждаются в отдельных аминокислотах, реже – во всех 20. Органические азотсодержащие соединения и аммонийные азот обычно легко усваиваются микроорганизмами, нитраты – медленнее, так как азот нитратов должен быть сначала восстановлен и только потом реализован клеткой в обмене веществ.

Недостаток азота в питательной среде приводит к так называемому «ожирению» клеток, т.е. к повышению содержания в них липидов за счет уменьшения белковой или аминокислотной фракций.

Процесс подбора питательной среды для выращивания микроорганизмов и для проявления им максимальной биосинтетической активности целевого продукта очень

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Учебная программа курса или дисциплины ДОП	Редакция 1	

трудоемкий и сложный, требующий знаний физиологии микроорганизма. Разработка или выбор среды может осуществляться в течение нескольких месяцев или лет в зависимости от сложности поставленной задачи и степени изученности данного микроорганизма.

Принципиально состав каждой питательной среды для каждого микроорганизма может быть определен двумя способами: методом многостадийного эмпирического подбора или же с использованием математических методов планирования эксперимента.

Первый способ самый распространенный. Обычно на основе изучения физиологических особенностей микроорганизма определяют качественный состав среды, а количество компонентов устанавливают экспериментальным путем, когда один компонент среды изменяют в определенных пределах, а остальные оставляют на неизменном уровне. Этот метод является надежным, но довольно длительным.

При использовании математических методов планирования эксперимента можно значительно быстрее найти и научно обосновать оптимальный состав питательной среды. Математическое планирование экспериментов принимают при изучении новых продуцентов фармацевтических препаратов.

Существует понятие «минимальных» сред, содержащих лишь источники питания, необходимые для роста и «богатые» среды, которые содержат дополнительные вещества в форме аминокислот, витаминов (т.е. факторы роста). Обогащение сред для культивирования приводит к увеличению скорости роста и изменению ферментного состава биомассы.

Если основной целью биотехнологического процесса является синтез лекарственного препарата, то к среде добавляют определенные вещества – предшественники или его близкие аналоги, которые включаются в молекулу продукта. Так, в производстве пенициллина и витамина В₁₂ в качестве предшественников используют фенилуксусную кислоту.

Различают питательные среды общего назначения (универсальные) и специальные питательные среды. Питательные среды общего назначения пригодны для выращивания многих видов микроорганизмов и применяются в качестве основы для приготовления специальных питательных сред. К ним относятся, например, мясопептонный бульон, агар, бульон Хоттингера, агар Хоттингера и др. Специальные питательные среды предназначены для избирательного культивирования определенных видов микроорганизмов, изучения их свойств и хранения.

Приготовление и стерилизация питательных сред

Одним из важных этапов микробного биосинтеза является приготовление питательных сред. Отделение приготовления питательной среды на современном биотехнологическом производстве – это цех, оборудованный емкостями для хранения твердых и жидких веществ, средствами их транспортировки и аппаратами с перемешивающими устройствами для приготовления растворов, суспензий или эмульсий.

Для приготовления производственной питательной среды предварительно растворяют сахара и соли, тщательно суспендируют такие нерастворимые компоненты, как соевая мука и мел. Крахмалосодержащее сырье предварительно клейстеризуют. Для ускорения эти процессы проводят в небольших аппаратах с мешалками (реакторах), а затем растворы смешивают в смесителе-реакторе с плоским дном, снабженным барботажным устройством для ввода пара. Концентрат среды, составляющий около одной трети необходимого объема, для окончательного растворения и суспендирования нагревают острым паром до 70-80 °С. При этой температуре не происходит раз-

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Учебная программа курса или дисциплины ДОП	Редакция 1	

ложения термолабильных компонентов среды. Приготовление более концентрированных сред дает возможность использования смесителей меньшей вместимости.

Необходимое условие успешной стерилизации питательной среды – тщательная гомогенизация ее твердых компонентов. При температуре стерилизации крупные частицы медленно прогреваются, и в них может сохраняться постоянная микрофлора, способная инфицировать культуральную жидкость.

Для приготовления питательных сред в биотехнологическом производстве используют мелассу (побочный продукт сахарных заводов), ацетоно-бутиловую барду (отходы производства ацетона и бутанола), сыворотки (побочный продукт молочной промышленности), гидролизаты древесины, сульфитный щелок (отходы целлюлозно-бумажной промышленности). Ацетоно-бутиловая барда содержит около 1% углеводов, используется для получения витамина В₁₂ микробиологическим путем.

Щепа, опилки, сельскохозяйственные отходы, малоразложившийся торф и их гидролизаты используются в производстве кормовых дрожжей, этанола. Они содержат 2,5-8,0% моносахаридов (после гидролиза), кукурузная мука – 67-70%. Уксусная кислота применяется для приготовления питательных сред в производстве лизина. Метиловый спирт получают каталитическим синтезом из оксидов углерода и водорода. Это источник углеродсодержащего сырья для производства микробного, кормового и пищевого белка.

Питательная среда перед подачей в ферментер должна быть обеззаражена. На этом этапе подготовки субстрата необходимо решить две задачи: полностью уничтожить всю контаминантную микрофлору, которая содержится в необходимом для культивирования объеме жидкости, и сохранить биологическую полноценность питательной среды.

Существуют следующие методы стерилизации оборудования, питательных сред и воздуха: термический, химический, фильтрационный, радиационный. Термический метод чаще всего применяется для стерилизации оборудования и питательных сред и может осуществляться как нагревание объекта до того, пока не погибнет вся микропопуляция.

Жидкую питательную среду после загрузки в ферментер нагревают до определенной температуры путем подачи пара во внутренний объем ферментера. Этим приемом достигается стерилизация труб и арматуры.

Тепловая стерилизация приводит к определенным химическим изменениям в составе питательной среды. Некоторые из них сводятся к разложению нестойких к нагреванию соединений, что приводит к потере необходимых для питания микроорганизма веществ. В процессе стерилизации может происходить взаимодействие различных компонентов среды и образование продуктов, ингибирующих рост микроорганизмов. Большинство изменений химических ингредиентов среды возникает при температурах выше, чем температура стерилизации.

Следовательно, эффективная стерилизация в сочетании с минимальными изменениями среды может быть достигнута путем воздействия более высокой температуры, а также быстрого нагревания и охлаждения.

Если стерилизацию углеводов проводить отдельно, а затем асептически добавлять к остальной заранее простерилизованной питательной среде, то можно предотвратить реакции между углеводами и другими составными компонентами среды. Те компоненты, которые в высшей степени чувствительны к воздействию тепла, также могут быть простерилизованы раздельно. При этом для стерилизации может применяться ионизирующее облучение или фильтрация через специальные мембранные фильтры.

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Учебная программа курса или дисциплины ДОП	Редакция 1	

Для обеспечения контроля стерилизации используют споры тест микроорганизмов *Bacillus stearothermophilus* штамма 1518. Если после проведения стерилизации из ампулы с тест-культурой высев дает отрицательный результат, считают, что произошло уничтожение всех микроорганизмов, контаминировавших среду.

Решая задачу по гарантированной стерильности питательной среды, следует помнить, что режим обеззараживания не должен снижать ее биологическую полноценность. Если в состав стерилизуемой фазы входят термолабильные компоненты, то следует стремиться к повышенной температуре (более 140°C), а также к сокращению времени обработки. Лабильность компонентов может быть изменена за счет сдвига pH стерилизуемой среды. Например, для глюкозы оптимальными являются pH=3,0, а для сахарозы – pH=8,0.

Термический способ стерилизации применяется наиболее часто в микробиологической промышленности. Однако для стерилизации твердых питательных сред применяют токи высокой частоты. Стерилизация осуществляется в течение нескольких минут, при этом физико-химические свойства компонентов среды не изменяются.

Химический способ стерилизации – это применение дезинфицирующих агентов – β -пропионатов, окись этилена, окись пропилена. Основной проблемой в этом случае оказывается необходимость устранения стерилизующего агента из питательной среды после гибели посторонней микрофлоры. Поэтому химические антисептики должны легко разлагаться при изменении условий после завершения стерилизации. Выбор таких соединений невелик, и пока их нельзя считать легко доступными. К числу лучших из них можно отнести пропиолактон, обладающий сильным бактерицидным действием и легко гидролизующийся в нетоксичную молочную кислоту. Химическая стерилизация питательных сред не нашла промышленного применения, однако используют ее в лабораторных и опытных установках.

Фильтрационный метод стерилизации применяют для воздуха и газов, подводимых к реакторам. Из фильтров различных типов наиболее перспективны мембранные фильтры из тефлона.

Метод основан на способности полупроницаемых мембран (типа микрофильтрационных) пропускать жидкую фазу и задерживать клетки микроорганизмов.

Метод стерилизующей фильтрации является идеальным средством стерилизации термически неустойчивых жидких и газовых сред. Стерилизация осуществляется при низкой температуре и требует лишь градиента давления по разные стороны мембраны. Мембранная стерилизация имеет перспективы в развитии микробной биотехнологии. Основная трудность – наличие термостойких мембран, способных выносить многократную термическую стерилизацию их в процессе эксплуатации. Можно утверждать, что по мере создания совершенных конструкций мембранных аппаратов для стерилизации, рассчитанных на длительную эксплуатацию, данный метод будет широко применяться в крупнотоннажных производствах.

Подготовленное и соответствующим образом поданное в техногенную экологическую нишу сырье должно быть использовано биообъектом в процессе культивирования. Этап культивирования складывается из получения посевного материала (инокулята) и из стадии биосинтеза (биотрансформации), когда в максимальной степени используются возможности биообъекта для наработки целевых продуктов.

Ход работы:

1. Изучить процесс воздухоподготовки.
2. Изучить виды питательных сред.
3. Рассмотреть преимущества и недостатки каждой питательной среды и сферы их применения.

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Учебная программа курса или дисциплины ДОП	Редакция 1	

4. Законспектировать информацию об основных питательных средах в рабочей тетради.

5. Внести практические предложения по усовершенствованию данных этапов биотехнологического производства.

Тема 3. Субстраты, используемые в биотехнологии

Теоретические вопросы. Субстраты для культивирования биообъектов. Требования, предъявляемые к субстратам. Природные сырьевые материалы. Использование побочных продуктов в качестве сырья для биотехнологии. Химические и нефтехимические субстраты. Сырьевые материалы и перспективы биотехнологии.

Практическое занятие №3.

Основы организации биотехнологического производства лекарственных средств

Цель работы: Изучить этапы биотехнологического производства лекарственных средств.

Теоретические сведения. Эффективность производства фармацевтической продукции биотехнологическими методами зависит от всех слагаемых и общего материального и энергетического баланса. При этом следует помнить, что в биотехнологии есть два активных представителя средств производства и между ними существует взаимовлияние. Действительно, чем выше темп функционирования биообъекта, тем более высокие требования предъявляются к аппаратурному оформлению процессов с его использованием. Необходима оптимизация как биообъекта, так и процессов и аппаратов биотехнологических производств.

Общая технологическая схема производства включает:

- подготовку посевного материала или инокулята, куда входит ряд этапов, начиная от засева пробирок и качалок колб до проведения выращивания в засевном ферментере;
- подготовку питательной среды для производственного ферментера, которая включает выбор и реализацию рецептуры среды, а также стерилизацию, гарантирующую сохранность всех пластических и энергетических компонентов в исходном количестве и качестве;
- подготовку ферментационного оборудования, гарантирующего сохранность от попадания в процесс контаминационной флоры;
- стадию биосинтеза, где в максимальной степени используются возможности биообъекта для получения лекарственного начала, которое накапливается внутри клетки или же секретируется в культуральную среду;
- стадию концентрирования, одновременно предназначенную и для удаления балласта;
- стадию очистки, реализуемую за счет повтора ряда однотипных операций или же за счет набора различных препаративных приемов повышения удельной специфической активности лекарственного начала (ультрафильтрация, экстракция, сорбция, кристаллизация);
- стадию получения конечной субстанции или готовой лекарственной формы с последующими операциями расфасовки и упаковки.

Ход работы:

1. Изучить общую технологическую схему производства.
2. Рассмотреть отдельные этапы производства и проблемы, возникающие на каждом из этапов.

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Учебная программа курса или дисциплины ДОП	Редакция 1	

3. Внести в рабочую тетрадь технологическую схему биотехнологического производства.

4. Привести примеры лекарственных средств, получаемых методами биотехнологии.

5. Внести практические предложения по усовершенствованию процесса биотехнологического производства.

Раздел 2. Характеристика биологических систем и материалов, как объектов биотехнологии

Тема 4. Подбор и совершенствование биообъектов

Теоретические вопросы. Объекты биотехнологии. Особенности микроорганизмов как биообъектов. Подходы и требования в подборе микроорганизмов. Методы повышения продуктивности микроорганизмов. Особенности культивирования клеток растений. Основные этапы получения трансгенных животных. Селекция микроорганизмов. Мутагенез и методы выделения мутантов. Клоновые культуры. Типы мутаций. Цели биотехнологии при совершенствовании биообъекта.

Практическое занятие №4.

Общая характеристика продуцентов биологически активных веществ и лекарственных препаратов

Цель работы: Изучить особенности продуцентов биологически активных веществ и лекарственных препаратов.

Теоретические сведения: Из громадного разнообразия (более 2 млн. видов) живых организмов нашей планеты в биотехнологии исследуются для применения в качестве продуцентов и используются непосредственно лишь сотая доля процента. Для обозначения продуцента так же, как и в других биологических дисциплинах, применяют бинарную номенклатуру, т.е. латинское название рода и вида, за которым указывают номер штамма, полученного путем селекции, например, *Aspergillus awamori*.

В настоящее время в биотехнологии в качестве продуцентов используются одноклеточные и многоклеточные организмы, построенные из клеток одного типа (бактерии, грибы, водоросли), а также клетки и ткани высших растений и животных. Объектами биотехнологии являются ферменты, нуклеиновые кислоты, простагландины, лектины, нейропептиды и различные БАВ (биологически активные вещества).

В промышленной биотехнологии применяют 3 вида штаммов:

- 1) природные штаммы, улучшенные естественным и искусственным отбором (при производстве микробной биомассы);
- 2) штаммы, полученные в результате индуцированного мутагенеза;
- 3) генноинженерные штаммы (обладают самой высокой генетической нестабильностью).

Промышленные штаммы должны удовлетворять следующим требованиям:

1. Безвредность для потребителя и обслуживающего персонала.
2. Высокая скорость роста биомассы и целевого продукта (БАВ) при экономичном потреблении питательной среды.
3. Направленная биосинтетическая активность при минимальном образовании побочных продуктов.
4. Генетическая однородность и стабильность в отношении к субстратам и условиям культивирования.
5. Отсутствие токсических веществ в целевом продукте и промышленных стоках.
6. Устойчивость к фагам и другой посторонней микрофлоре.
7. Способность расти на дешевых и доступных субстратах, отходах пищевой и

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Учебная программа курса или дисциплины ДООП	Редакция 1	

химической промышленности при высокой плотности клеток.

Только по совокупности этих и других свойств можно оценить полезность и рентабельность продуцента. Наиболее изучены и чаще применяются в биотехнологии бактерии рода *Clostridium*, *Thermoanaerobacter*, *Bacillus*, *Acetobacter*, *Pseudomonas*, *Brefibacterium*. Охарактеризуем их особенности как продуцентов в биотехнологии.

Бактерии имеют очень высокую скорость размножения, их клетки делятся через 30-60 минут (некоторые виды через 8-10 минут). Они могут перерабатывать в сутки объем биомассы, превышающий массу клетки в 30-40 раз (масса 10^{-12} г, объем – 10^{-12} мл), и за 2-4 суток способны образовывать биомассу 10^{10} т.

В зависимости от отношения к O_2 бактерии принято делить на облигатные аэробы, факультативные анаэробы, аэротолерантные анаэробы. Большинство продуцентов в микробной биотехнологии являются облигатными аэробами, поэтому культивирование их протекает при постоянном притоке O_2 , некоторые продуценты растут при низком содержании O_2 (2-10%), их называют микроаэрофилами, а условия, в которых их культивируют, микроаэробными. К факультативным анаэробам относятся некоторые представители рода *Bacillus*, *Escherichia*, к аэротолерантным анаэробам – метанобразующие бактерии.

Большинство бактерий культивируют на сложных органических средах, содержащих факторы роста (витамины, аминокислоты, пурины, пиримидины). Продуценты, нуждающиеся в факторах роста, называют ауксотрофами, штаммы, не обнаруживающие эту потребность, прототрофами. Молочнокислые бактерии можно отнести к ауксотрофам. Многие продуценты могут расти на синтетических средах, содержащих всего одно органическое вещество в качестве источника углерода. Некоторые продуценты используют в качестве источника энергии метан, метанол, метилированные амины. В микробной биотехнологии широко используется способность ряда бактерий осуществлять жизнедеятельность в результате окисления молекулярного водорода, сероводорода, аммония, нитратов, солей двухвалентного железа и некоторых других неорганических соединений. Для многих продуцентов характерен лабильный метаболизм.

Это выражается в способности использовать большое число разных соединений углерода, азота и др. элементов, а также переключения с одного типа питания на другой. Большинство бактерий имеют в составе клеточной стенки пептидогликаны (состоят из N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмуравовой кислоты).

Особое значение как продуценты имеют архебактерии, древние представители прокариот. Они обитают в средах с экстремальными условиями (высокие концентрации неорганических веществ, повышенные температуры). Среди архебактерий галобактерии представляют большой интерес для биотехнологии. Они растут в среде, содержащей 20-30% NaCl (концентрированный раствор, Мертвое море), живут на сухой соленой рыбе, кожаных изделиях, имеют белки, нормальное функционирование которых происходит только при высоких концентрациях NaCl. Это палочки и кокки, содержащие фотоактивные пигменты бактериородопсин и галородопсин. Галородопсин способен превращать электромагнитную энергию света в химическую энергию, за счет которой происходит фосфорилирование и синтез АТФ. Если пурпурные бактерии *Halobacterium* иммобилизовать на носителе, то при освещении можно получать электричество, АТФ и обессоливать морскую воду.

В будущем предполагают с помощью таких микропреобразователей энергии обеспечивать электричеством отдельные жилища в странах с высокой солнечной радиацией. Метаногенные (архебактерии) бактерии широко изучаются в биотехнологии как способ получения дополнительной энергии из возобновляемого субстрата. Биологический метаногенез был известен в Китае еще во II веке до н.э. В 1911 году в г. Бирменгеме был построен завод по анаэробному разложению сточных вод. Газовый генератор превращал ме-

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Учебная программа курса или дисциплины ДОП	Редакция 1	

тан в электричество, обеспечивая жизнь целого города. В настоящее время в Китае работает более 7 млн. биогазовых установок. Биомассу метаногенных бактерий можно применять как концентрат витамина В₁₂ для сельскохозяйственных животных.

Серозависимые архебактерии и термоплазмы также вызывают большой интерес биотехнологов. Они обитают в горячих и кислых водоемах, в вулканических расщелинах. Энергию получают за счет окисления H₂, S, Fe²⁺ сульфитов металлов. Например, *Thermoproteales* живут при 108 °С, (не ниже 80 °С), анаэробы, причем ферменты, синтезированные в их клетках, обладают высокой термостойкостью. Основное преимущество термофильных анаэробных архебактерий состоит в следующем: 1. сокращение сроков культивирования; 2. возможность обойтись без аэрации; 3. уменьшение вероятности заражения.

Актиномицеты – группа грамположительных бактерий, клетки которых способны к ветвлению. Внешнее сходство с грибами нашло отражение в их названии («лучистые грибы», актис – луч, микес – гриб). Но фактически никакого родства с грибами, являющимися эукариотами, эти прокариотические организмы не имеют. Нити, образующие мицелий актиномицетов, имеют диаметр 0,3–1 мкм (у грибов – около 50 мкм).

Колонии многих актиномицетов окрашены различными пигментами. Многие актиномицеты образуют плотный субстратный мицелий, врастающий в питательную среду. К антибиотикам, продуцируемым актиномицетами, относятся разнообразные химические соединения с широким спектром биологического действия: аминогликозидазы, тетрациклин, актиномицины, макролиды, акзамидины.

Важнейшими продуцентами этих групп антибиотиков являются *Streptomyces griseus*, *Saccharopolispora hisuta*, *Micromonospora olivoasterospora*, *Nocardia mediterranea*.

Известно несколько основных вариантов использования бактерий для приготовления лекарств. Самый популярный основан на получении биомассы и последующем ее использовании в качестве полупродукта или же искомого препарата. Так готовят некоторые вакцины, лечебные диагностические бактериофаги. Другой вариант основан на использовании биообъектов, с целью синтеза метаболитов, которые накапливаются в среде выращивания. На этом принципе основано производство аминокислот, витаминов, ферментов, антиферментов, антибиотиков, полисахаридов.

Микробные клетки используются в качестве источника белка главным образом в кормах для животных. Также их используют для проведения биологических превращений. Микробные превращения, называемые также микробиологическими трансформациями, можно проводить с помощью растущих или не растущих или даже высушенных клеток, а также спор. Суть таких превращений заключается в том, что одно соединение превращают в другое, родственное по структуре, с помощью одного или нескольких образуемых клетками ферментов. В отличие от большинства небиологических химических реакций биологические превращения происходят при биологических температурах, а растворителем служит вода. Полученные продукты отличаются высокой степенью чистоты, практически не содержат побочных продуктов. Биологическое превращение – строго специфичный процесс, т.е. каждый фермент катализирует только один вид реакции в специфическом месте молекулы субстрата. Однако при применении бактерий как продуцентов фармацевтической продукции должен быть тщательно изучен состав их липидов, так как у некоторых из них (например, у микобактерий) могут содержаться токсические компоненты. К тому же бактериальные клетки мелкие и процесс концентрирования биомассы из-за этого затруднен.

Использование бактерий в качестве продуцентов белка и витаминов при производстве фармацевтической продукции имеет ряд приоритетов:

1. Возможности использования отходов пищевых и химических производств для

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Учебная программа курса или дисциплины ДООП	Редакция 1	

культивирования;

2.повышенное содержание незаменимых аминокислот в бактериальных клетках по сравнению с растительными белками;

3.Высокая скорость реакции биосинтеза белка;

4.Относительно несложная технология культивирования в промышленных масштабах, независимая от сезонов и других изменяющихся условий окружающей среды;

5.Возможность направленного воздействия с помощью методов селекции на химический состав клеток для совершенствования биологической ценности целевого продукта.

Однако фармацевтическая продукция, полученная на основе клеток бактерий, должна подвергаться тщательной медико-биологической проверке для выявления канцерогенного, мутагенного, эмбриотропного действия на организм человека.

Известно около 30 видов бактерий, являющихся продуцентами различной биотехнологической продукции, в том числе и лекарственных веществ.

Источником углерода при культивировании бактерий могут служить отходы различных видов промышленности, в том числе природный и попутный газы (водород), а также метанол, этанол, пропанол. На газовых питательных средах культивируются бактерии рода *Methylococcus*, *Pseudomonas*, *Methylophilus*. На метаноле в Великобритании организовано производство белкового препарата прутин, содержание белка в котором 74% от сухой массы. В России разработана технология промышленного получения меприна с использованием в качестве питательной среды метанол.

В производстве белковых препаратов можно применять в качестве продуцентов и водородоокисляющие бактерии, накапливающие в клетках до 80% белка, особенно вблизи химических предприятий.

Грибы имеют сходство и с растениями (верхушечный, или апикальный рост, прочная клеточная стенка, наличие вакуолей и поперечных перегородок у многих из них), и с животными (гетеротрофный тип питания, большая или меньшая потребность в витаминах, наличие хитина или хитозана, синтез гликогена). В то же время лишь грибам присуще мицелиальное строение и как следствие абсорбционный способ питания (осмотротфия); для них известны явления дикариозиса (раздельное нахождение двух ядер в одной клетке, способных к одновременному делению и имитирующих диплоидное ядро) и гетерокариозису (нахождение разнокачественных ядер в одной клетке).

Среди грибов в качестве продуцентов лекарственных веществ применяют микромицеты (дрожжи, *Penizillum*, *Aspergillum*) и макромицеты, формирующие в процессе роста и развития плодовые тела.

Грибы имеют диаметр клеток в 3-5 раз больше, чем бактерии, и более устойчивы к фагам.

Удельная производительность ферментеров по биомассе при применении бактерий в качестве продуцентов выше, чем при культивировании грибов (для *Candida* 7 г/кг·ч, для бактерий *Micrococcus lactis* 22 г/кг·ч). Это связано не только с высокой скоростью роста бактерий, но и со способностью окисления более широкого спектра углеводов.

В производстве спиртных напитков дрожжи представляют собой единственный промышленно используемый штамм микроорганизмов.

Помимо производства пива и вина дрожжи применяют в промышленных масштабах для получения технического спирта и глицерина, а также в качестве добавок к кормам для животных.

В качестве продуцентов используют *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida lipolytica*. Из соединений углерода дрожжи лучше всего используют гексозы, из полисахаридов утилизируют инулин и крахмал, некоторые можно культивировать на метаноле и этаноле, органических кислотах. В качестве источника азота при производстве дрожжей применяют

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Учебная программа курса или дисциплины ДОП	Редакция 1	

соли аммония (нитраты, нитриты). Большинство дрожжей растет в границах pH 3,0-8,0, оптимальная температура культивирования 28-30 °С, причем пивные дрожжи имеют более широкий оптимум температуры. Спиртовое брожение у дрожжей отличается от гликолиза у высших растений лишь последними этапами (образуется этиловый спирт), что обусловлено наличием фермента пируват декарбоксилазы, катализирующей превращение пирувата в ацетальдегид, который затем восстанавливается в этанол.

Штаммы *S. cerevisiae* подразделяются на расы низового и верхового брожения. К расам низового брожения относят винные и пивные дрожжи, к расам верхового – спиртовые, хлебопекарные. Дрожжи низового брожения функционируют в производстве при 6-10 °С, верховые – при 14-25 °С. В конце брожения низовые дрожжи оседают на дно, а верховые образуют «шапку».

При культивировании дрожжей на этаноле выход по массе составляет 30%, ферментеры, имеют производительность больше в 2-3 раза, чем при выращивании на п-алканах. Применение этанола для получения дрожжевой биомассы не встречает психологических возражений. В Чехии организовано производство биомассы *C. utilis* на этаноле для добавления в продукты питания человека с целью улучшения их органолептических свойств. Дрожжи используют при производстве эргостерина и β-каротина. С точки зрения производства фармацевтической продукции наиболее важны продуценты родов: *Aspergillus*, *Cephalosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*. К числу основных продуктов метаболизма их относятся антибиотики, органические кислоты и ферменты.

Для культивирования дрожжей в качестве питательной среды применяют неразветвленные углеводороды с 10-30 углеродными атомами в молекуле, т.е. жидкие фракции углеводородов нефти, а также молочную сыворотку. 1 т сыворотки содержит 10 кг белка и 50 кг лактозы. В настоящее время разработана эффективная промышленная технология получения белка из молочной сыворотки методом ультрафильтрации, который применяется для получения сухого обезжиренного молока.

Жидкие отходы от этого производства (перлиат) используются далее для выращивания кормовых дрожжей. Дрожжи культивируют на метаноле и этаноле. При такой технологии препарат содержит 56-62% белков и значительно меньшее количество вредных примесей (производных бензола, аминокислот, аномальных липидов, токсинов), чем при выращивании на п-парафинах нефти.

Дрожжи по содержанию таких аминокислот, как лизин, треонин, валин и лейцин значительно превышает многие растительные белки.

Белковые препараты из дрожжевой биомассы применяются в качестве пищевых добавок. Это пивные и пищевые дрожжи *S. cerevisiae*, *C. arborea*, *C. utilis*. В США разработана рецептура приготовления сосисок из мяса индейки с добавлением 25% дрожжевого белка. В Великобритании при производстве колбас применяют белковый препарат мукопротеин. 14 видов дрожжей вида *Candida* применяются для утилизации молочной сыворотки и получения биомассы богатой белками и витаминами. Дрожжи *Rhodotorula glutinis* применяют при производстве пищевого и медицинского назначения. Пивные дрожжи *S. carlsbergensis* содержат не менее 48% белка, 14 различных витаминов и характеризуются хорошей сбалансированностью по незаменимым аминокислотам, поэтому широко применяются в медицине и пищевой промышленности при производстве колбас в качестве заменителя казеина.

При переработке дрожжей в пищевой белок они подвергаются специальной обработке. Сначала стенки пищевых клеток разрушают (механическим, щелочным, кислотным воздействием или с помощью специальных ферментов), далее обрабатывают гомогенную дрожжевую массу подходящим органическим растворителем с целью освобождения от низкомолекулярных примесей и сопутствующих органических веществ. Следующая ста-

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Учебная программа курса или дисциплины ДОП	Редакция 1	

дия – обработка растворами щелочей для растворения белков и диализ. Очищенные с помощью таких методических приемов белки осаждают, высушивают и применяют в пищевой технологии и медицине.

Мицелиальные грибы образуют около 1200 антибиотических соединений. Наибольший интерес для клинической практики представляют пенициллины, цефалоспорины, гризеофульвин, трихотecin, фумагиллин и др. Пенициллины синтезируются определенными видами *Penicillium* (*P. chrysogenum*, *P. brevicompactum*, *P. nigricans*) и некоторыми видами *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. nidulans*). Основным продуцентом при промышленном получении этого антибиотика является *P. chrysogenum*, в процессе жизнедеятельности которого образуются различные формы пенициллинов, отличающиеся строением боковой части молекулы антибиотика, биологической активностью и спектром противомикробного действия. Важнейшим продуцентом антибиотиков цефалоспоринового ряда, применяемым в фармацевтической промышленности, является *Cephalosporium acremonium* и актиномицет *Streptococcus clavuligerus* (цефалоспорин С, цефамицин С, цефалексин, цефтрадин). В последние годы получены новые химические модификации цефалоспоринов (цефепарол, цефатризин, цефамандол, цефакситин).

Большие затруднения при производстве антибиотиков на основе микромицетов представляет биомасса в виде мицелия, что усложняет конструкции биореакторов и приводит к изменению гидродинамических свойств культуральной жидкости.

В настоящее время искусственно выращивают базидиомицеты, грибы, образующие плодовые тела, более 70 стран как пищевые продукты и мировое производство их превышает 1,5 млн. т. Подсчитано, что по выходу белка грибы как сельскохозяйственные культуры во много раз превосходят производство говядины и рыбоводство и не имеют себе конкурентов. Они характеризуются необычно быстрым по сравнению с другими организмами ростом плодовых тел (растут, как грибы). Грибы – это добавка к бедной белком растительной пище. В то же время это низкокалорийная пища и подходит малоподвижным людям. Главными производителями грибов являются США, Франция, Япония, Германия, Венгрия. В промышленности выращивают 7-10 видов базидиомицетов: шампиньон двухспоровый, шиинтаке, вольвариелла, вешенка обыкновенная, опенок зимний, черный трюфель и др. Например, шиинтаке является экспортным продуктом Японии. Выращивают в закрытых помещениях на опилках с различными добавками и на рисовой соломе, смоченной экстрактом из бобов, при температуре 20 °С. Из микоризных грибов только черный трюфель культивируют искусственно в дубовых и буковых рощах. Имеется фирма, снабжающая микоризными саженцами хозяйства.

Выращивание грибов (и др. грибов) является специализированным стерильным микробиологическим производством и осуществляется на заводах, оборудованных современными биотехнологическими приборами и аппаратами. В нашей стране более 80 хозяйств занимается выращиванием базидиомицетов как продуктов питания. Завтрашний день грибной индустрии – это их использование для фармацевтических целей. Например, белый гриб обладает естественным антихолестероловым и антивирусным действием, гриб шиинтаке эффективен при лечении гипертонии.

Таким образом, проблема искусственного разведения грибов является актуальной биотехнологической задачей, решение которой позволит удешевить и упростить утилизацию бытовых и промышленных отходов, дать целый ряд нужных для медицины веществ, без серьезных затрат увеличить количество белковых пищевых продуктов для людей и кормов для скота.

Водоросли как продуценты БАВ, медленнее растут, чем грибы. Общее содержание белка в них может достигать 40-70%, причем белки полноценные по аминокислотному

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Учебная программа курса или дисциплины ДООП	Редакция 1	

составу. При культивировании водорослей можно получить в 2-10 раз больше сухого вещества, чем при культивировании высших растений.

Водоросли, как грибы, легко отделяются от субстрата, содержат меньше нуклеиновых кислот в биомассе. Это фотосинтезирующие организмы, их можно выращивать как в фотобиореакторах, так и на углеродсодержащих субстратах. По белку водоросли имеют преимущество по сравнению с высшими растениями в 6-30 раз. Не менее 100 видов макрофитных водорослей употребляют в пищу во всех странах. Из них готовят много диетических блюд: салатов, приправ, конфет, варенья, желе. Ламинария и хлорелла – самые популярные съедобные и кормовые водоросли.

К макрофитам, применяемым в пищу человека относятся ульва, алария, порфира, родимения, хондрус, ундария, фуцеллярии, спиролина.

В Японии культивирование порфиры занимает 60 000 г акватории.

В нашей стране из черноморских водорослей добывают филлофору для производства иода, агар-агар производят из анфельции. Общая добыча водорослей около 3 млн. т (КНР, Япония), из них 2,2 млн т культивируют. Спирулина добывается и культивируется в водоемах, это традиционный продукт питания на территории Мексики и Центральной Африки. В России из нее получают вкусовые и белково-витаминные добавки к овощам, консервам, соусам (содержит 9 незаменимых аминокислот). Биомассу хлореллы и спирулины применяют для замены пищевого сырья для приготовления питательных сред при культивировании микроорганизмов, клеток растений и животных. Хлорелла представляет интерес для создания искусственных экологических систем для жизнеобеспечения экипажей космических кораблей. Следует отметить, что использование водорослей в качестве компонентов пищевых продуктов связано с рядом технологических проблем:

1. необходимость удаления клеточной стенки для уменьшения количества неперевариваемых компонентов;
2. обезжиривание, так как некоторые компоненты липидной фракции придают продукту неприятный вкус;
3. детоксикация пигментированных белков.

Потенциальный продуцент биотехнологии царства животных – простейшие и различные группы почвенных беспозвоночных (дождевые черви и др.).

Хотя **простейшие** в настоящее время не используются в промышленном масштабе ни для производства биомассы, ни для синтеза биологически активных веществ, они наряду с другими микроорганизмами играют большую роль в биологической очистке сточных вод фармацевтических предприятий. Эти процессы, широко применяющиеся во всем мире, с точки зрения микробиолога, очень сложны. Сточные воды – это многокомпонентная смесь различных питательных веществ и микроорганизмов. Поэтому для обработки стоков необходимо также большое число различных представителей простейших, конкурирующих в потреблении питательных веществ.

Простейшие относятся к числу нетрадиционных объектов биотехнологии. В настоящее время они лишь завоевывают себе место в исследовательской работе и микробиологической промышленности как продуценты БАВ. При этом рациональнее использовать свободноживущих простейших. Они являются важной составной частью геологических пород, почвы, пресных и морских вод, некоторые продуцируют целлюлазный мультиферментный комплекс.

Трипаносома стала первым продуцентом противоопухолевого препарата круцина (Россия, Франция), обладающего цитотоксическим эффектом при прямом контакте с опухолью.

Свободноживущий жгутиконосец *Astasia longa* культивируют для получения астазилида, обладающего противоопухолевым действием не через цитотоксический эффект, а

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Учебная программа курса или дисциплины ДОП	Редакция 1	

при воздействии на клеточное звено иммунитета. Эвгленовые можно рассматривать как перспективные продуценты гликанов и других гетерополисахаридов.

Важнейшие продуценты лекарственной продукции царства животных:

№ п/п	Продуцент	Использование в биотехнологическом производстве	
	Вид	Лекарственное средство	Орган
1.	Человек	Эритроцитарная масса для гемотрансфузии, лейкоцитарная масса	Кровь
2.	Лошадь, осел, мул	Антистафилококковая плазма, гетерологические антитоксические сыворотки, противодифтерийная, противостолбнячная, сыворотки	Кровь
3.	Марал (изюбр, пятнистый олень)	Пантокрин	Панты
4.	Корова, як	Инсулин Панкреатин Паратиреоидин Тиреотропин Гиалуронидаза Румалон	Ткани поджелудочной железы, паратитовидной железы, гипофиза, семенников, хрящей
5.	Баран	Нормальные эритроциты для постановки ИФА	Кровь
6.	Коза	Гетерологичная антисыворотка к вирусу клещевого энцефалита	Кровь
7.	Свинья	Пепсин Инсулин	Слизистая желудка
8.	Кролик Новорожденный крольчонок	Диагностические сыворотки Вакцина против бешенства	Кровь Среда для размножения вируса
9.	Курица	Лизоцим Лецитин	Белковая фракция, желтка яиц
10.	Змеи	Антитоксические сыворотки (анти-эфа, анти-гюрза)	Антигены для иммунизации
11.	Пчелы	Пчелиный яд	Ткань брюшных желез
12.	Скорпионы	Антитоксическая сыворотка	яд

Большинство используемых в биотехнологии продуцентов по отношению к температуре являются мезофилами: их рост и развитие происходит при температуре 25-37°C. Психрофильные микроорганизмы растут при температуре 0-15°C, и термофилы – при температуре 60-80°C. Все перечисленные группы имеют промежуточные формы. Для биосинтетических процессов в промышленном производстве желательно использовать термофильные микроорганизмы. Отдельные термофилы растут при 110°C, а в подводных выбросах сверхгорячих источников больших океанических глубин найдены микроорганизмы, развивающиеся при t 300°C и под давлением.

Среди термофилов обнаружены ценные продуценты спиртов, аминокислот, ферментов, молекулярного водорода. Скорость роста и метаболическая активность у них вы-

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Учебная программа курса или дисциплины ДОП	Редакция 1	

ше, чем у мезофилов. Ферменты, синтезируемые термофилами (протеазы), имеют высокую устойчивость к нагреванию, действию окислителей, детергентов и других неблагоприятным условиям. Применение термофилов в микробной биотехнологии (продуценты протеаз *Thermus aquaticus* и *T. caldophilus*) позволяет снизить затраты на стерилизацию промышленного оборудования и на системы охлаждения биореакторов. Это позволит применять ферментеры без громоздких теплообменных устройств и упростить их конструкцию.

В микробиологическом синтезе для каждой культуры микроорганизмов есть оптимум, минимум и максимум pH. Большинство микроорганизмов лучше всего развивается при pH 7,0 (нейтральная среда). Ацидофильным микроорганизмам (некоторые дрожжи, плесени) необходимо иметь водородный показатель среды 1,5-4,5, базофильным – pH 8,5-9,5.

Ацидофильные формы не растут при pH выше 5,0-5,5, *Thiobacillus ferrooxidans* встречается в шахтных водах месторождений сульфидных минералов (pH иногда меньше 1,0). Алкалофильные бактерии растут при pH более 10 (некоторые бактерии рода *Bacillus*), разлагающие мочевину до аммиака. В промышленности предпочтительнее применять ацидофильные штаммы, так как посторонняя микрофлора в таких субстратах погибает и уменьшаются средства, применяемые для стерилизации.

Одним из факторов, ограничивающих рост микроорганизмов, является высокое осмотическое давление среды. К осмофильным видам относятся некоторые дрожжи (*Xeromyces bisporus*) и мицелиальные грибы, они могут расти на субстратах, содержащих 20% сахара и более.

В настоящее время особую значимость для производства фармацевтической продукции приобретают исследования процессов перестройки генетических программ клеток продуцентов в направлении увеличения скорости биосинтеза целевых продуктов и конверсии питательной среды методами современной генетики.

Ход работы:

1. Заполните таблицу и ответьте на вопросы.

Тип продуцента	Общая характеристика	Промышленно значимые представители	Примеры использования / получаемые метаболиты
бактерии		1 2 ...	
грибы		1 2 ...	
водоросли		1 2 ...	

2. Какой метод культивирования микробиообъектов является наиболее технологичным?

3. Какой тип перемешивания используют при культивировании животных и растительных клеток, почему?

3. Каким методом осуществляют стерилизацию технологических газовых сред для ферментера?

4. В чем заключается основная сложность при стерилизации многокомпонентных питательных сред и каким образом ее преодолевают?

Тема 5. Совершенствование биообъекта методами генной инженерии

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Учебная программа курса или дисциплины ДОП	Редакция 1	

Краткая история развития генной инженерии. Этапы генной инженерии. Методы выделения нуклеиновых кислот. Ферменты генной инженерии: ДНК-полимеразы, ДНК-лигазы, рестриктазы, обратная транскриптаза. Построение рестрикционных карт. Анализ и использование фрагментов ДНК. Блоттинг по Саузерну. Нозерн-блоттинг. Вестерн-блоттинг. Иммуноблоттинг. Дот-блоттинг. Разделение гигантских молекул ДНК. Гибридизация нуклеиновых кислот.

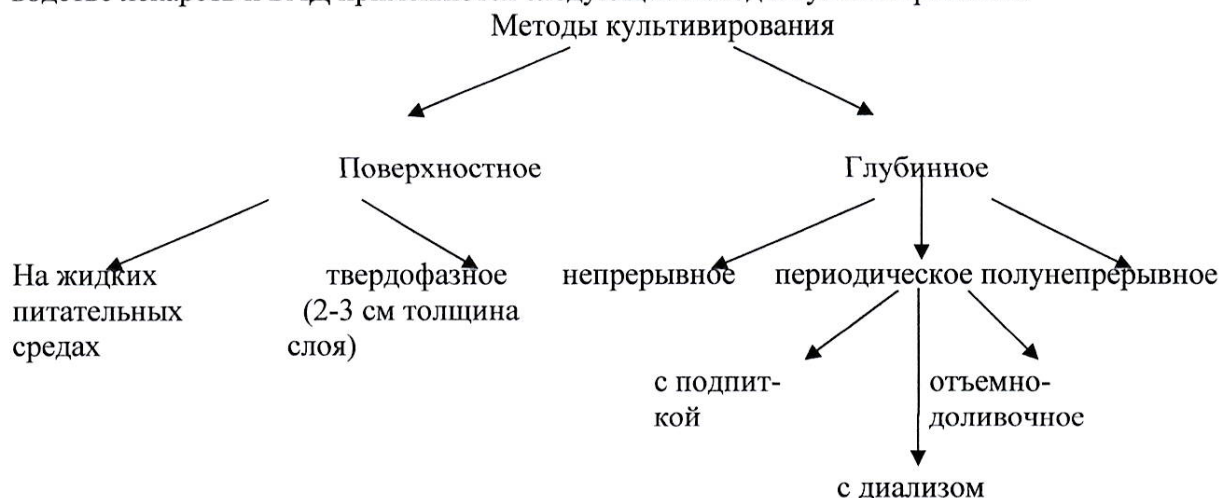
Практическое занятие №5.

Методы культивирования продуцентов

Цель работы: Изучить методы культивирования продуцентов.

Теоретические сведения. Центральным этапом фармацевтического производства – ферментация. Под ферментацией понимают всю совокупность последовательных операций от внесения в питательную среду посевного материала (инокулята) до завершения процесса роста или биосинтеза биологически активных веществ. В основе процесса ферментации лежит культивирование продуцентов, т.е. выращивание культуры микроорганизмов, клеток высших растений или плесневых грибов.

Культура микроорганизмов – это популяция микроорганизмов, выращиваемая в питательной среде и находящаяся в стадии размножения или закончившая его. При производстве лекарств и БАД применяются следующие методы культивирования.



Твердофазная поверхностная ферментация осуществляется на увлажненной, сыпучей или пастообразной среде. Рост продуцента происходит на поверхности твердых частиц, а также в порах, заполненных водой или воздухом. Перемешивание не допускается, если культивируются микромицеты. Типичным примером является приготовление силоса или компоста в кучах. Управляемый процесс твердофазной ферментации имеет место при производстве ферментов с помощью микромицетов.

Для поверхностного культивирования на твердых средах применяют свекловичный или виноградный жом, зерновую шелуху, пшеничные или рисовые отруби, к которым добавляются различные питательные вещества. Оптимальная влажность субстрата 40-70%. Стерилизация осуществляется путем прямого введения пара в среду при перемешивании. Если увлажнение проводят подкисленными растворами, то стерилизация происходит 15-20 мин. при 95 °С. Обеспечение O₂ затрудняется с увеличением слоя субстрата, поэтому для каждого штамма или производства своеобразная толщина слоя питательной среды. При выращивании мицелиальных грибов перемешивание не допускается. При твердофазной поверхностной ферментации очень большая проблема - поддержание постоянной температуры во всем объеме питательной среды. Например, температура компостов увеличивается от поверхности к глубинным слоям.

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Учебная программа курса или дисциплины ДОП	Редакция 1	

Кинетика роста популяции на поверхности (пленке) отличается от глубинных условий. При твердофазном культивировании в начале роста культуры, когда в среде отсутствует градиент концентрации субстрата, все клетки в колонии могут расти с максимальной для данной среды удельной скоростью роста, т.е. по экспоненциальному закону. В центральной части субстрата рост клеток лимитирован диффузией и, таким образом, биомасса растет с максимальной удельной скоростью лишь на поверхности питательной среды.

Управляемый процесс твердофазного поверхностного культивирования применяется при производстве энзиматических лекарственных препаратов.

Пример: производство амилолитических ферментов. В качестве питательной среды используют пшеничные отруби. Стерилизованную питательную среду после засева соответствующего штамма микромицета распределяют по кюветам и транспортируют в растительные камеры, где поддерживается определенная температура и влажность воздуха, а также обеспечивается вентиляция вдоль поверхности субстрата с целью аэрации.

Для *Aspergillus awamori* как продуцента амилаз различают 3 стадии выращивания культуры: 1) Рост до начала прорастания конидий ($t = 32^\circ - 38^\circ\text{C}$, 100% влажность воздуха); 2) Стадия интенсивного прироста биомассы при $t = 27^\circ\text{C}$; 3) На третьей стадии прекращают подачу в камеру кондиционированного воздуха. Общая продолжительность процесса 42 часа. Существенным недостатком этого метода является наличие больших производственных площадей, трудность автоматизации технологического процесса. В настоящее время разработаны типы механизированных растительных установок, которые в той или иной мере устраняют указанные недостатки кюветного способа. Применяют выращивание биомассы микромицетов на специальных лотках, установленных на движущемся транспортере, причем каждый лоток имеет специальный воздуховод и ворошитель.

Глубинная ферментация характеризуется присутствием клеток во взвешенном состоянии. В условиях лаборатории в колбы, объемом 50-250 наливают жидкую питательную среду, в которую засевают чистую культуру (из ампул или колбы), затем ее помещают на сутки в термостат с определенной температурой, где она растет и размножается. Аэробные продуценты выращивают в специальных колбах на качалках в термокамере. Вот этот пример является периодическим глубинным культивированием, т.е. рост продуцента осуществляется в закрытой системе (обмен газами, теплом), но питательная среда и посевной материал не вводятся в процессе роста продуцента.

При периодическом культивировании выделяют несколько фаз в развитии культуры.

1. Латентная фаза. Культура микроорганизмов осваивает питательную среду, заметного увеличения числа клеток не происходит. В этот период перестраивается метаболизм клетки, синтезируются ферменты, необходимые для использования новых субстратов, активируется биосинтез белка.

2. Фаза экспоненциального роста характеризуется быстрым накоплением биомассы и продуктов метаболизма. При этом запас питательных веществ в среде в оптимальной концентрации, увеличение числа клеток пропорционально времени, т.е. линейный рост культуры.

3. Фаза замедления роста – это непродолжительный период, в течение которого скорость роста культуры снижается, что связано с накоплением токсических продуктов метаболизма и расходом питательных веществ среды.

4. Стационарная фаза – это скорость прироста биомассы полностью компенсируется скоростью гибели и лизиса клеток.

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Учебная программа курса или дисциплины ДОП	Редакция 1	

5. Фаза отмирания культуры – характеризуется полным истощением субстрата, накоплением веществ, ингибирующих рост, скорость прироста биомассы равно нулю.

При производстве лекарственных препаратов важную роль играет любая фаза. Так, при производстве первичных метаболитов важно сокращение до минимума латентной фазы и увеличение экспоненциальной фазы. Продолжительность латентной фазы зависит от состава питательной среды, возраста и массы инокулята. Перенос клеток из одной среды в другую, резкое изменение условий при масштабировании может оказывать на продуцент разностороннее воздействие. Системы контроля и регуляции ферментативной активности включают и адаптационные механизмы, т.е., сталкиваясь с новыми питательными веществами, клетки начинают усваивать их только после синтеза ферментов.

Биотехнологически ценные продукты синтезируются в экспоненциальной фазе (нуклеотиды, ферменты, витамины – первичные метаболиты). В стационарной фазе и фазе отмирания синтезируются вторичные метаболиты - антибиотики, красящие вещества.

При непрерывном культивировании процесс постоянно протекает в экспоненциальной фазе, нет смены фаз развития культуры, как при периодическом культивировании (можно сравнить с оранжереей, где вегетация и плодоношение растений идет в течение всего года). Можно сказать, что при непрерывном культивировании жизнедеятельность культуры продлевается за счет постоянной подачи питательной среды и отбора культуральной жидкости, вместе с которой из реактора удаляются и токсические метаболиты.

Непрерывное культивирование может осуществляться в условиях крупнотоннажного производства в каскаде реакторов. Впервые данный метод был применен в 1915 году при производстве спирта в 1940 году – для получения ацетона.

Непрерывный процесс можно использовать в производстве БАВ, если культура при длительном выращивании не теряет способности к синтезу, т.е. генетически устойчива и однородна.

Для штамма *Brethibacterium flavium* (производство лизина) экономическая эффективность при непрерывном режиме в 6 раз выше, чем при периодическом культивировании.

Характеризуя непрерывное культивирование, надо отметить, что высокая продуктивность процесса может быть достигнута при большем значении D (скорости разбавления), а это может быть связано с выносом неутилизованного субстрата. Поэтому данный метод далеко не всегда можно применять, например, в производстве антибиотиков и других препаратов медицинского назначения.

Ход работы:

1. Изучить методы культивирования биообъектов.
2. Рассмотреть преимущества и недостатки каждого метода.
3. Перерисовать схему методов в тетрадь.
4. Заполнить таблицу

Метод культивирования биообъектов	Преимущества и сферы применения	Недостатки
1.		
...		

5. Внести практические предложения по усовершенствованию процесса культивирования биообъектов.

Тема 6. Векторные системы, применяемые для клонирования в клетках про- и эукариот

Теоретические вопросы. Понятие о векторе. Классификация бактериальных векторов. Требования, предъявляемые к векторам. Плазмиды. Преимущества плазмид неболь-

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Учебная программа курса или дисциплины ДОП	Редакция 1	

шого размера. Фаговые векторы. Космиды. Фазмиды. Способы прямого введения генов в клетку. Трансфекция. Микроинъекция. Электропорация. Метод «мини-клеток». Упаковка в липосомы. Электронная пушка.

Практическое занятие №6.

Получение посевного материала

Цель работы: Изучить процесс получения посевного материала в биотехнологическом производстве.

Теоретические сведения.

Для получения посевного материала используют исходную музейную культуру продуцента, которая поступает в заводскую лабораторию из научно-исследовательского института или с посевной станции.

Как правило, посевной материал, содержащий молодые, растущие клетки микроорганизмов на начальной стадии спорообразования (споры, конидии) поступает в пробирках на скошенных агаровых средах или в виде чистых культур в ампулах.

Каждая производственная культура имеет паспорт, в котором указаны продуцент и его коллекционный номер, серия и дата изготовления, средняя активность серии и срок годности. В паспорте представлена характеристика среды для выращивания и хранения культуры. Полученный посевной материал подвергают тщательному микробиологическому и биохимическому контролю, так как от его активности и чистоты зависит дальнейший производственный цикл.

В зависимости от вида продуцента, его физиолого-биохимических способностей приготовление посевного материала (до стадии производственной ферментации) проходит в несколько этапов:

1. исходная культура
2. скошенная агаровая среда
3. выращивание на качалке в колбах на жидкой питательной среде (одна или две стадии)
4. посевные аппараты (одна, несколько стадий)
5. стадия производственной ферментации.

Исходную культуру при оптимальных температурах выращивают в пробирках на скошенной агаровой питательной среде. Для микроскопических грибов, актиномицетов продуценты культивируют до наступления оптимального спорообразования (72-120 час), для бактериальных культур фаза устанавливается экспериментально.

Выращенную культуру (1-5% от объема) с поверхности скошенной агаровой среды стерильно смывают водой и переносят в колбы Эрленмейера на 750 мл, содержащие 50-100 мл жидкой питательной среды. Засеянные колбы выращивают на качалке (120-240 об/мин) при температуре 28-30-50°C в течение 18-36 часов, т.е. глубинным способом, что увеличивает скорость роста культуры. Все стадии роста продуцента контролируют по морфологическим показателям микроорганизмов. При этом установлено, что наилучшие результаты дает культура, которая находится в стадии физиологической зрелости.

Готовую культуру стерильно переносят в посевной аппарат (малый инокулятор) с предварительно простерилизованной питательной средой. Посевной аппарат оснащен мешалкой, аэрирующим устройством, а также контрольно-измерительной аппаратурой для регулирования pH среды, температуры и степени аэрации.

Масштабирование при получении инокулята желательно осуществлять тогда, когда рост популяции происходит с максимальной скоростью, т.е. в экспоненциальной фазе.

Ход работы:

1. Изучить процесс получения посевного материала.

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Учебная программа курса или дисциплины ДОП	Редакция 1	

2. Изучить этапы этого процесса.
3. Рассмотреть проблемы, которые могут возникнуть на каждом из этапов.
4. Законспектировать информацию об основных этапах получения посевного материала в рабочей тетради.
5. Внести практические предложения по усовершенствованию данного этапа биотехнологического производства.

Раздел 3. Области применения биотехнологии

Тема 7. Биотехнология производства аминокислот, витаминов, рекомбинантных белков

Теоретические вопросы. Методы получения аминокислот. Механизмы регуляции биосинтеза аминокислот. Особенности культивирования штаммов-продуцентов. Контроль качества аминокислот. Спектр биотехнологического производства рекомбинантных белков. Требования к микроорганизмам в производстве рекомбинантных белков. Промышленное производство рекомбинантного инсулина. Интерфероны. Гормоны роста человека. Значение витаминов для человека. Источники витаминов. Водорастворимые витамины. Рибофлавин (витамин В₂). Цианокоболамин (витамин В₁₂). Пантотеновая кислота (витамин В₃). Аскорбиновая кислота (витамин С). Жирорастворимые витамины. Эргостерин (витамин Д₂). Убихиноны. Перспективы развития биотехнологии в получении витаминных препаратов.

Практическое занятие №7.

Стандартизация биопрепаратов. Контроль и управление биотехнологическими процессами

Цель работы: Изучить процесс стандартизации биопрепаратов и методы контроля и управления биотехнологическими процессами.

Теоретические сведения.

По мере дальнейшего развития биотехнологии все более остро встает проблема контроля качества сырья, используемого для составления питательных сред, и качества продуктов биосинтеза. В настоящее время сырье и питательные субстраты для микробного промышленного биосинтеза оценивают по составу тех или иных компонентов, связанных с качеством.

Исключительно важен контроль качества продуктов биосинтеза, используемых в медицине: антибиотиков, ферментов, других биоорганических соединений.

В соответствии с официальной методикой существует классификация показателей для оценки качества микробиологической продукции. Показатели назначения характеризуют свойства продукции, определяющие основные функции, для выполнения которых она предназначена, и обуславливают область ее применения. К группе показателей назначения относятся две важные подгруппы: показатели состава и показатели функциональной эффективности.

Показатели содержания основного вещества включают:

- содержание (%) сырого протеина в дрожжах в пересчете на абсолютно сухое вещество (АСВ);
- содержание (%) белка в пересчете на АСВ;
- содержание (г) антибиотиков на 1 кг препарата;
- содержание (мг) витамина на 1 кг препарата;
- титр препарата;
- активность ферментных препаратов;
- коэффициент биологической активности;
- другие показатели.

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Учебная программа курса или дисциплины ДОП	Редакция 1	

Показатели содержания посторонних примесей:

- содержание (%) углеводов в белке;
- содержание металломагнитных примесей в белке;
- содержание в продукции веществ, отличных по составу от основного компонента и снижающих качество продукции;
- содержание (%) золы в пересчете на АСВ и др.

Показатели структуры и физико-химические характеристики:

- крупность частиц;
- влажность (%);
- насыпная масса (г/л);
- скорость растворения;
- плотность (г/см³) и др.

Контроль качества биопрепарата по показателям назначения сводится к анализу его состава и физико-химических свойств.

Качественные характеристики продукции (внешний вид, цвет, запах, вкус) рекомендуется определять органолептическим методом в сравнении с базовым образцом.

Также любой биотехнологический препарат (например, вакцина) подвергается стандартизации (контрольная проверка готового продукта) с помощью следующих тестов:

- 1) тест на стерильность;
- 2) тест на присутствие консерванта;
- 3) проверка на присутствие адъювантов (например, алюминиевые квасцы);
- 4) проверка на активность и идентичность.

Проверке подлежат документация, образцы, маркировка и упаковка. Все вышеперечисленные тесты необходимы для того, чтобы готовый продукт обладал необходимыми свойствами: был безопасен, надёжен и обладал необходимыми профилактическим или лечебным действием. Международные рекомендации (рекомендации ВОЗ), касающиеся таких требований, облегчают обмен биологическими препаратами между отдельными странами и служат руководством для работников, ответственных за изготовление этих препаратов, а также для тех, кто принимает решение по вопросам, касающимся методов их анализа и контроля.

На современном этапе развития биотехнологического производства лекарственных, профилактических и диагностических средств высокое качество продукции может быть достигнуто с учетом ряда общих требований к организации и контролю производства. Такие требования должны предупреждать возможные ошибки при проведении технологических процессов и вести к созданию экологически безопасных предприятий.

Их общее название - GMP расшифровывается как "Good Manufacturing Practice" и переводится как "Правила хорошего (или надлежащего) производства".

GMP следует понимать, как единую систему требований по организации производства и контролю качества любых лекарственных средств от начала переработки сырья до производства готовых продуктов, включая общие требования к помещениям, оборудованию и персоналу; они также полностью распространяются на все биотехнологические производства, занятые изготовлением лекарственных средств.

Правила GMP содержат лишь минимальные практические указания, но являются общим руководством, регламентирующим, как должен быть организован производственный процесс и как должны быть организованы контрольные испытания.

Существуют национальные GMP (у более чем 40 стран - США, Япония, Германия, Индия и др.), региональные GMP (ЕЭС), GMP ВОЗ. Правила, разработанные ВОЗ, составляют один из основных элементов "Системы удовлетворения качества фармацевтических препаратов в международной торговле, которая рекомендована всем странам-членам ВОЗ.

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Учебная программа курса или дисциплины ДОП	Редакция 1	

Она является особым видом многостороннего соглашения с целью оказания помощи органам здравоохранения импортирующих (в том числе развивающихся) стран в оценке юридического статуса и технического уровня закупаемых ими лекарственных средств. Она дает определенную гарантию странам-импортерам.

Следует отметить, что требования GMP относятся только к препаратам медицинского применения.

Все национальные и другие правила GMP включены в сборник "International drug GMP", который периодически переиздается (в США).

Правила GMP - национальные, региональные, международные, - содержат следующие основные главы: введение, терминология, персонал, здания и помещения, оборудование, процесс производства и экологическая безопасность, лабораторный контроль, регистрация и отчетность.

Не анализируя подробно всех частей соответствующего официального документа (документов), отметим отдельные требования по некоторым из разделов.

Требования к персоналу связаны с уровнем его квалификации, состоянием здоровья, личной гигиеной, порядком использования технологической одежды и обуви, материалами для их изготовления (например безворсовая ткань), переподготовкой и медицинскими осмотрами персонала.

Требования к зданиям и помещениям уточняют их расположение, планировку с целью, например, предотвращения смешения различных видов и серий исходного сырья, полупродуктов и готовых лекарственных средств. Перечисляются специальные помещения для проведения конкретных технологических операций и т.д. Небезынтересно в этой связи отметить, что в ряде национальных руководств по GMP указывается, в частности, на технологические операции, связанные с производством, обработкой и упаковкой антибиотиков пенициллинов и цефалоспоринов, которые рекомендуется проводить в помещениях, изолированных от тех, где изготавливаются другие лекарственные средства. Это объясняется тем, что беталактамы могут проявлять аллергенное действие в крайне незначительных количествах, попадающих в другие лекарственные средства, для того, чтобы у сенситивизированных больных возникли серьезные осложнения.

Значительное внимание уделяется в GMP облицовочным материалам, сантехнике и вопросу поддержания чистоты в помещениях.

Под особый контроль попадают помещения, где производятся стерильные лекарственные средства - в отношении их изолированности, особенностей планировки, вентиляции, поддержания постоянной разности давлений между отдельными помещениями в 3-5 мм вод.ст., причем, в помещениях более высоких классов чистоты давление должно быть выше. Нестерильные лекарственные средства не должны производиться в тех помещениях, где изготавливается стерильная продукция.

Многочисленны требования GMP к конструкции, размерам и расположению оборудования, особенно используемого при производстве стерильных лекарственных средств. В качестве одного из примеров можно отметить указание на то, что при производстве инъекционных препаратов следует избегать фильтров, отделяющих волокна. Если они вынужденно применяются (асбест и т.п.), после них следует использовать дополнительные мембранные фильтры с размером пор не более 0,45 мкм.

Во всех GMP даются подробные указания, имеющие целью оптимальное проведение всех этапов процесса производства. Правила касаются: 1) отбора проб, контроля качества сырья; 2) осуществления контроля непосредственно за процессами производства, обработки, упаковки. Даются правила для переработки бракованных серий.

Применительно к производству антибиотиков (стадия ферментации) непосредственно относится указание на карантин, которому должно подвергаться сырье (т.е. ком-

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Учебная программа курса или дисциплины ДООП	Редакция 1	

поненты, входящие в комплексные среды), на необходимость статистических критериев вариабельности компонентов сырья, на проверку определенных видов сырья на пирогенность.

Нормируется содержание микроорганизмов в воде для очистки и промывки получаемых лекарственных средств.

Контроль процесса производства лекарственных препаратов должен осуществляться в соответствии с технологической документацией. Следует отметить, что правила GMP разных стран не совпадают с предлагаемыми методами стерилизации готового продукта. В целом преимущество отдается термическим методам стерилизации. GMP некоторых стран допускают также радиационную стерилизацию и стерилизацию окисью этилена.

Большое внимание в GMP уделяется обеспечению четкого выполнения производственных инструкций.

Подробно регламентируется перечень документов, точек контроля, возможных отклонений от принятых норм. Регламентируются способы фиксации результатов.

Набор требований по регистрации и отчетности, содержащийся в GMP, позволяет проследить за ходом выполнения производственного процесса и точно установить в случае необходимости всю последовательность действий персонала, приведшую к отклонению качества продукта от требуемого параметра.

Само собой разумеется, что правила GMP предусматривают строгую регламентацию тех выбросов, которые могут поступать от фармацевтических и биотехнологических предприятий в окружающую среду. Правила рекомендуют практически полное предотвращение поступления штаммов-продуцентов рекомбинантных белков в стоки и газо-воздушные выбросы, исключение попадания аллергенноактивных продуктов микробиологического синтеза в атмосферу с помощью различных технических решений, предотвращение сброса со сточными водами биотехнологических полупродуктов, способных повлиять на активность и состав биоценозов, используемых на установках биологической очистки загрязненной воды.

Имеющие силу закона в ряде стран правила GMP позволяют предприятиям выпускать конкурентоспособную продукцию. Как показал международный опыт внедрения в медицинскую практику новых лекарственных препаратов, производимых биотехнологическими способами, организация их предварительных испытаний также должна подчиняться определенным правилам. Официальные инстанции, дающие разрешение на промышленный выпуск нового препарата, требуют соблюдения этих правил и соответствующего оформления документации. Всем этим повышается достоверность и объективность экспериментальных результатов и результатов испытаний в клинике.

Правила GLP расшифровываются как "Good Laboratory Practice", что означает правильную (надлежащую) организацию проведения лабораторной работы при исследовании препарата. Правила GLP охватывают всю систему предклинических испытаний. В качестве лишь одного из примеров отметим, что правилами предъявляются определенные требования к планировке помещений вивария, где содержатся подопытные животные, к условиям содержания животных, их подбору и т.п. Организация предклинических лабораторных испытаний должна обеспечивать объективность при сопоставлении данных в контроле и опыте.

Весьма существенное значение для разрешения на промышленный выпуск нового препарата имеют правила GCP "Good Clinical Practice", т.е. надлежащая организация работы при проведении клинических испытаний. Соблюдение правил GCP позволяет получать объективные результаты и дает определенные гарантии приближения к максимальной безопасности в случае впервые вводимых человеку препаратов.

Ход работы:

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Учебная программа курса или дисциплины ДОП	Редакция 1	

1. Изучить показатели содержания основного вещества.
2. Изучить показатели содержания примесей.
3. Рассмотреть показатели структуры и физико-химические характеристики.
4. Законспектировать информацию об основных этапах стандартизации биопродукта в рабочей тетради.
5. Изучить особенности контроля и управления биотехнологическим производством.
6. Изучить правила и требования стандарта GMP для лекарственных препаратов.
7. Законспектировать информацию об особенностях контроля и управления биотехнологическим производством в рабочей тетради.
8. Внести практические предложения по усовершенствованию данного этапа биотехнологического производства.

Тема 8. Иммунобиотехнология

Теоретические вопросы. Вакцины: живые вакцины, неживые вакцины, комбинированные вакцины. Получение вакцин. Иммунобиотехнологические препараты. Сыворотки. Применение сывороток. Получение сывороток. Проблемы роста животных клеток. Процесс культивирования животных клеток. Процесс консервирования животных клеток.

Практическое занятие №8.

Сушка биотехнологической и фармацевтической продукции

Цель работы: Изучить процесс сушки биотехнологической и фармацевтической продукции.

Теоретические сведения.

Получаемая в конце цикла культуральная жидкость содержит от 0,1 до 5% сухих веществ. На последующих стадиях из нее извлекают полезные продукты (биомасса, антибиотки, ферменты, аминокислоты и другие вещества), которые затем превращаются в конечную товарную форму.

Большинство продуктов биологического синтеза выпускаются в сухом виде с остаточной влажностью не более 5-12%.

Удаление влаги и тепловое воздействие в ходе сушки биомассы ведут к существенным изменениям, влияющим на качество готового продукта. Наибольшие трудности возникают при необходимости сохранить такие термолабильные объекты, как живые микроорганизмы (бактериальные препараты) или ферментные препараты. Основными причинами их термолабильности являются денатурация белка и инактивация ферментов при тепловом воздействии, увеличение концентрации электролитов и токсичных веществ при удалении влаги, а также структурные и механические повреждения в процессе сушки.

По исходному агрегатному состоянию влаги различают следующие методы сушки: сушку из жидкого состояния, испарение из твердого состояния, минуя жидкую фазу - сублимацию.

Сушка культуральной жидкости или биомассы осуществляется контактным, конвективным и радиационным способом.

При контактной сушке тепло передается высушиваемому материалу через нагретые поверхности и испаряющаяся влага переходит в воздух. Для сушки продуктов биологического синтеза применяются одно- и двухвальцовые шкафные сушилки.

При конвективной сушке тепло, необходимое для процесса сушки, доставляется газообразным сушильным агентом, который играет роль теплоносителя и среды, в которую переходит влага из материала. Этот метод широко применяется для сушки продуктов биологического синтеза и, прежде всего, в пневматических, аэрофонтанных, распылительных сушилках и сушилках в кипящем слое.

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Учебная программа курса или дисциплины ДООП	Редакция 1	

Поскольку большинство продуктов биологического синтеза являются термолабильными веществами, то для их сушки применяются наиболее щадящие методы. При этом стремятся снизить температуру и время сушки. Для этих целей используют вакуум или сушку тонкодисперсного материала. Еще более выгодные условия для сушки термолабильных веществ создаются при сублимации.

Сублимационный метод сушки основан на удалении влаги из замороженного состояния, причем, влага переходит в газообразную фазу, минуя жидкую.

Характерными особенностями сублимации являются минимальные по сравнению с другими методами сушки изменения структуры высушиваемого материала и более низкие температуры высушивания. Поэтому сублимационная сушка применяется для особо термолабильных продуктов, например живых микроорганизмов, ферментов, некоторых антибиотиков.

Причиной гибели клеток может быть чрезмерное обезвоживание в процессе сублимационной сушки. Для защиты клеток от гибели при замораживании и последующем высушивании применяются специальные защитные среды, включающие глицерин, сахарозу, поливинилпирролидон и другие вещества, замедляющие образование внутриклеточного льда, уменьшающие концентрирование электролитов и защищающие клетки от грубого необратимого обезвоживания.

Полученные сухие продукты биосинтеза обычно используются в измельченном состоянии. Иногда, при распылительной сушке дополнительного измельчения высушенного продукта не требуется. В других случаях, когда готовый продукт предварительно очень быстро должен растворяться или смешиваться до гомогенного состояния, вводят операцию измельчения.

Измельчение зависит от размера кусков исходного материала и соответственно делится на несколько классов:

- дробление - крупное, среднее, мелкое;
- помол - грубый, средний, тонкий, коллоидный.

Высушенные порошковидные препараты трудно дозировать, расфасовывать и транспортировать. Для увеличения средней плотности, уменьшения объема и снижения пылеобразования препараты гранулируют. Известны различные способы *гранулирования*: экструзия с последующим центробежным скатыванием, псевдоожижение и орошение жидкостью порошка с нанесением глазированной пленки на поверхность гранулята, пресование и формовка с помощью формовочных машин сухим или жидким способом.

Для объемного напорного дозирования жидких сред в точных и регулируемых количествах используют насосы и дозирочные агрегаты.

Для дозирования и расфасовки сыпучих материалов предназначены пневматические дозаторы, автоматические дозирочные весы, весовыбойные аппараты, ленточные дозаторы, вибродозаторы.

В значительной степени эффективность фармацевтического производства зависит от постановки микробиологического контроля. Контролируются музейная культура микроорганизма-продуцента, посевной материал, питательные среды, воздух, культуральная жидкость, а также готовая продукция. В зависимости от назначения микробиологической продукции предъявляются различные требования к ее обсемененности. Продукты, используемые в медицинской промышленности, должны быть практически свободными от микроорганизмов.

Одна из главных задач биотехнологического производства – поддержание в активном состоянии производственного штамма. В процессе неоднократных переносов микроорганизмов, а также длительного воздействия условий культивирования с течением времени могут возникнуть спонтанные мутации, которые приводят к снижению продуктив-

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Учебная программа курса или дисциплины ДООП	Редакция 1	

ности производственной культуры. В связи с этим периодически, два раза в год, а в отдельных случаях и чаще проводят пересевы производственного штамма и отбор вариантов с наиболее высокой продуктивностью.

Биохимический контроль количества и специфической активности продуктов микробиологического синтеза позволяет проследить за выходом промежуточного и конечного продуктов. Этот вид контроля обеспечивает выпуск фармацевтической продукции, отвечающей требованиям стандартов.

Ход работы:

1. Изучить процесс сушки и его последовательные технологические операции.
2. Изучить методы сушки.
3. Рассмотреть преимущества и недостатки различных методов сушки биопродукции.
4. Законспектировать информацию об основных способах сушки биопродукта в рабочей тетради.
5. Изучить особенности биотехнологического контроля.
6. Законспектировать информацию о биотехнологическом контроле в рабочей тетради.
7. Внести практические предложения по усовершенствованию данного этапа биотехнологического производства.

Тема 9. Биотехнология производства кормов, удобрений, пищевых добавок, пищевых продуктов, биотоплива

Теоретические вопросы. Методы получения биотоплива. Механизмы регуляции биосинтеза пищевых добавок. Особенности культивирования штаммов-продуцентов. Контроль качества пищевых продуктов. Спектр биотехнологического производства рекомбинантных белков. Требования к микроорганизмам в производстве рекомбинантных белков. Промышленное производство удобрений. Гормоны роста растений. Перспективы развития биотехнологии в получении кормовых добавок для сельскохозяйственных животных.

Практическое занятие №8.

Биоочистка сточных вод. Расчет гидроксидного индекса загрязнения воды

Цель работы: Изучить процесс биологической очистки сточных вод, а также изучить методику расчета ИЗВ.

Теоретические сведения.

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Учебная программа курса или дисциплины ДОП	Редакция 1	

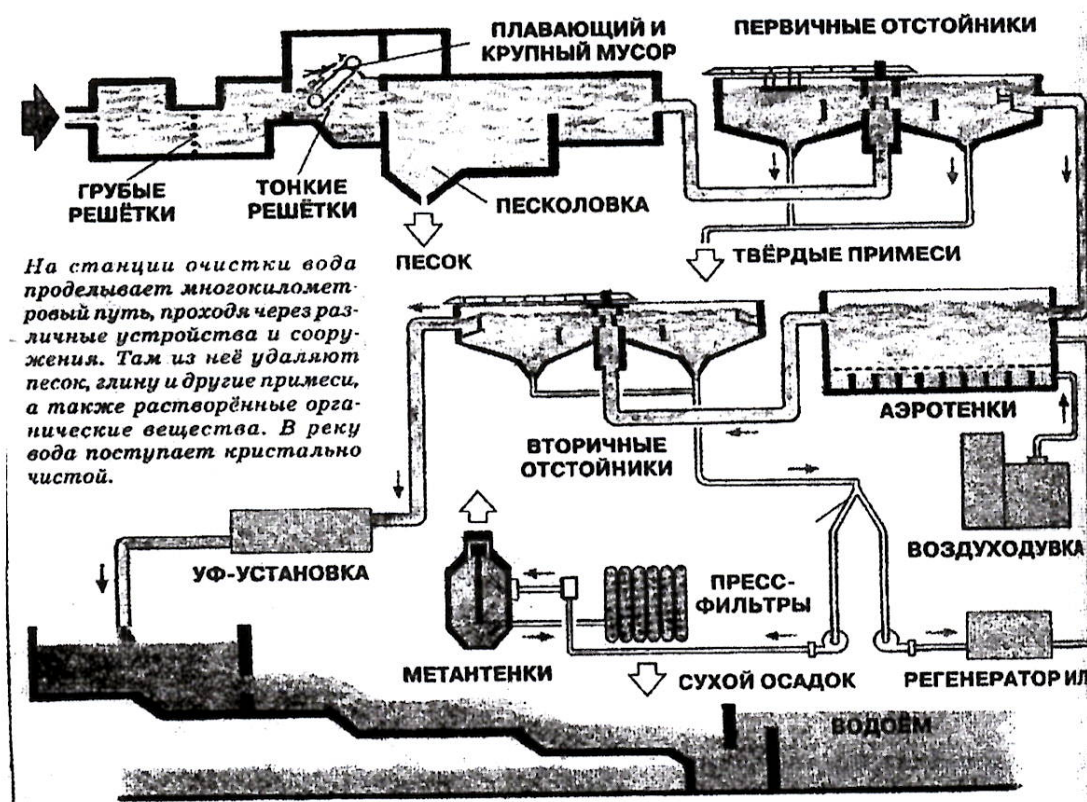


Рис. 2 - Схема очистного сооружения

Гидрохимический индекс загрязнения воды (ИЗВ)

ИЗВ установлен Госкомгидрометом СССР [Временные методические..., 1986] и относится к категории показателей, наиболее часто используемых для оценки качества водных объектов (впрочем, необходимость его применения не подтверждается ни одним из опубликованных позже официальных нормативных документов). Этот индекс является типичным аддитивным коэффициентом и представляет собой среднюю долю превышения ПДК по строго лимитированному числу индивидуальных ингредиентов:

$$\text{ИЗВ} = \frac{1}{n} * \sum_{i=1}^n \frac{C_i}{\text{ПДК}_i},$$

где: C_i – концентрация компонента (в ряде случаев – значение физико-химического параметра); n – число показателей, используемых для расчета индекса, $n = 6$; ПДК_i – установленная величина норматива для соответствующего типа водного объекта.

Для расчета индекса загрязнения вод для всего множества нормируемых компонентов, включая водородный показатель pH, биологическое потребление кислорода БПК₅ и содержание растворенного кислорода, находят отношения $C_i / \text{ПДК}_i$ фактических концентраций к ПДК и полученный список сортируют. ИЗВ рассчитывают строго по шести показателям, имеющим наибольшие значения приведенных концентраций, независимо от того превышают они ПДК или нет.

При расчете ИЗВ для составляющих $C_i / \text{ПДК}_i$ по неоднозначно нормируемым компонентам применяется ряд следующих условий:

- для биологического потребления кислорода БПК₅ (ПДК – не более 3 мг О₂/дм³ для водоемов хозяйственно-питьевого водопользования и не более 6 мг О₂/дм³ для водоемов хозяйственно-бытового и культурного водопользования) устанавливаются специальные значения нормативов, зависящие от самого значения БПК₅:

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Учебная программа курса или дисциплины ДОП	Редакция 1	

<u>Показатель</u> <u>БПК₅ (мгО₂/л)</u>	<u>Значение норматива</u> <u>(ПДК)</u>
Менее 3	3
От 3 до 15	2
Свыше 15	1

• *концентрация растворенного кислорода* нормируется с точностью до наоборот: его содержание в пробе не должно быть ниже 4 мг/дм³, поэтому для каждого диапазона концентраций компонента устанавливаются специальные значения слагаемых $C_i/\text{ПДК}_i$:

<u>Концентрация (мгО₂/л)</u>	<u>Значение слагаемого $C_i/\text{ПДК}_i$</u>
Более или равно 6	6
Менее 6 до 5	12
Менее 5 до 4	20
Менее 4 до 3	30
Менее 3 до 2	40
Менее 2 до 1	50
Менее 1	60

• для *водородного показателя pH* действующие нормативы для воды водоемов различного назначения регламентируют диапазон допустимых значений в интервале от 6,5 до 8,5, поэтому для каждого сверхнормативного значения pH, выходящего за границы этого диапазона, устанавливаются специальные значения слагаемых $C_i/\text{ПДК}_i$:

<u>Значения pH</u> <u>ниже диапазона</u> <u>нормы (< 6.5)</u>	<u>Значения pH</u> <u>выше диапазона</u> <u>нормы (> 8.5)</u>	<u>Значение</u> <u>слагаемого</u> <u>$C_i/\text{ПДК}_i$</u>
Менее 6.5 до 6	Свыше 8.5 до 9	2
Менее 3 до 5	Свыше 9 до 9.5	5
Менее 5	Свыше 9.5	20

Вызывает недоумение требование методики: “При равенстве величин $C_i/\text{ПДК}_i$ предпочтение дается веществам, имеющим токсикологический признак вредности”, поскольку результат расчета ИЗВ никак не зависит от того, какие ингредиенты попали в отбираемую “шестерку”.

В зависимости от величины ИЗВ участки водных объектов подразделяют на классы (табл. 3.6). Устанавливается требование, чтобы индексы загрязнения воды сравнивались для водных объектов одной биогеохимической провинции и сходного типа, для одного и

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Учебная программа курса или дисциплины ДОП	Редакция 1	

того же водотока (по течению, во времени, и так далее), а также с учетом фактической водности текущего года.

Классы качества вод в зависимости от значения индекса загрязнения воды

Воды	Значения ИЗВ	Классы качества вод
Очень чистые	до 0,2	I
Чистые	0,2–1,0	II
Умеренно загрязненные	1,0–2,0	III
Загрязненные	2,0–4,0	IV
Грязные	4,0–6,0	V
Очень грязные	6,0–10,0	VI
Чрезвычайно грязные	>10,0	VII

Ход работы:

1. Изучить биологические методы очистки сточных вод.
2. Зарисовать в тетрадь схему очистного сооружения.
3. Изучить методику расчета ИЗВ.
4. Рассчитать ИЗВ для определенного водного объекта (по вариантам).
5. Сделать вывод о классе качества воды данного водного объекта.

7. МАТЕРИАЛЬНО-ТЕХНИЧЕСКОЕ ОСНАЩЕНИЕ

- экран для проектора
- компьютер Lenovo
- проектор AcerPD113DLP
- микроскоп биологический Микромед С-11
- центрифуга для 12 стеклянных и пластиковых пробирок, на 15 мл
- шейкер-инкубатор для планшет
- фотометр планшетный
- морозильный шкаф
- рН-метр стационарный
- термостаты ТС-80
- набор микропрепаратов по клеточной биологии, цитологии и генетике
- весы аналитические
- стерилизатор воздушный
- ламинарный шкаф II класса защиты
- холодильник-морозильник лабораторный
- весы электронные с точностью измерений до сотых грамм

программное обеспечение

1. ОС Microsoft Windows
2. Microsoft Office 2016
3. «МойОфисСтандартный»
4. Statistica Basic Academic for Windows 13

8. ОРГАНИЗАЦИОННО-ПЕДАГОГИЧЕСКИЕ УСЛОВИЯ РЕАЛИЗАЦИИ ПРОГРАММЫ

Преподаватель:

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Учебная программа курса или дисциплины ДОП	Редакция 1	

- Владеет формами и методами обучения, в том числе: проектная деятельность, лабораторные эксперименты и пр.
- Использует специальные подходы к обучению всех обучающихся, в том числе с особыми потребностями в образовании.
- Владеет ИКТ-компетентностями.
- Может разрабатывать и реализовывать индивидуальные образовательные маршруты.

9. ПЕРЕЧЕНЬ РЕКОМЕНДУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

- *профессиональные базы данных, информационно-справочные системы*
 - 1.1. IPRbooks [Электронный ресурс]: электронно-библиотечная система / группа компаний Ай Пи Эр Медиа . - Электрон. дан. - Саратов , [2019]. - Режим доступа: <http://www.iprbookshop.ru>.
 - 1.2. ЮРАЙТ [Электронный ресурс]: электронно-библиотечная система / ООО Электронное издательство ЮРАЙТ. - Электрон.дан. – Москва , [2019]. - Режим доступа: <https://www.biblio-online.ru>.
 - 1.3. Консультант студента [Электронный ресурс]: электронно-библиотечная система / ООПОлтехресурс. - Электрон.дан. – Москва, [2019]. - Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/pages/catalogue.html>.
- 2. База данных периодических изданий [Электронный ресурс] : электронные журналы / ООО ИВИС. - Электрон.дан. - Москва, [2019]. - Режим доступа: <https://dlib.eastview.com/browse/udb/12>.
- 3. Национальная электронная библиотека [Электронный ресурс]: электронная библиотека. - Электрон.дан. – Москва, [2019]. - Режим доступа: <https://нэб.рф>.
- 4. Электронная библиотека диссертаций РГБ [Электронный ресурс]: электронная библиотека / ФГБУ РГБ. - Электрон.дан. – Москва, [2019]. - Режим доступа: <https://dvs.rsl.ru>.
- 5. Федеральные информационно-образовательные порталы:
 - 5.1. Информационная система Единое окно доступа к образовательным ресурсам. Режим доступа: <http://window.edu.ru>
 - 5.2. Федеральный портал Российское образование. Режим доступа: <http://www.edu.ru>
- 6. Образовательные ресурсы УлГУ:
 - 6.1. Электронная библиотека УлГУ. Режим доступа : <http://lib.ulsu.ru/MegaPro/Web>
 - 6.2. Образовательный портал УлГУ. Режим доступа : <http://edu.ulsu.ru>

3. Список литературы

основная:

а) основная литература

1. Егорова Т.А. Основы биотехнологии: Учеб.пособ. - М.: Академия, 2016. – 208 с.

б) дополнительная литература

1. Воронин Е.С. Сельскохозяйственная биотехнология: Учеб. М.: Высш. шк., 2013.

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Учебная программа курса или дисциплины ДОП	Редакция 1	

2. Горленко В.А. Научные основы биотехнологии [Электронный ресурс]: учебное пособие/ Горленко В.А., Кутузова Н.М., Пятунина С.К.- Электрон. текстовые данные.- М.: Московский педагогический государственный университет, 2013
3. Жимулёв И.Ф. Общая и молекулярная генетика [Электронный ресурс]: учебное пособие для вузов/ Жимулёв И.Ф.- Электрон. текстовые данные.- Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2007.- 479 с.- Режим доступа: <http://www.iprbookshop.ru/4155>
4. Загоскина Н.В. Биотехнология: теория и практика. М.: Оникс 21 век, 2014.
5. Коничев А.С. Молекулярная биология: Учебник. - М.: Академия, 2012. - 400 с.
6. Кузнецов А.Е. Прикладная экобиотехнология. М.: Бином. Лаборатория знаний, 2010.



КАЛЕНДАРНЫЙ УЧЕБНЫЙ ГРАФИК

на 2022-2023 учебный год

приложение к программе

«Биотехнологии»

Уровень / год обучения	Сроки реализации, кол-во уч.недель	Кол-во занятий/нед, продолжит. занятия (мин.)	Раздел (модуль)	Всего академических часов в год	Место проведения
первый год	36	1 (90 мин)	1. Организация биотехнологического производства	24	ЦДО «Дом научной коллаборации им. Ж.И.Алферова ул. 12 Сентября,9А
			Современная биотехнология в создании производств лекарственных средств	8	
			Структура биотехнологического производства	8	
			Субстраты, используемые в биотехнологии	8	
			2. Характеристика биологических систем и материалов, как объектов биотехнологии	24	
			Подбор и совершенствование биообъектов	8	
			Совершенствование биообъекта методами генной инженерии	8	
			Векторные системы, применяемые для клонирования в клетках про- и эукариот	8	
			3. Области	24	

			применения биотехнологии		
			Биотехнология производства аминокислот, витаминов, рекомбинантных белков	8	
			Иммунобиотехнология	8	
			Биотехнология производства кормов, удобрений, пищевых добавок, пищевых продуктов, биотоплива	8	
			Всего часов	72	