

Лабораторна робота № 3

Тема: Мікроорганізми – класичні об'єкти біотехнології клітин. Клітини тварин – продуценти біологічно активних речовин. Рослинні клітини як об'єкти біотехнології

Мета роботи: ознайомитися з різними видами мікроорганізмів, які беруть участь у біотехнологічних процесах.

Матеріали та обладнання: мікроскоп МІКМЕД-1, препарувальна голка, предметні і покривні скельця, пінцет, піпетка, скальпель, таблиці, рисунки, фотокартки; суспензія добової культури дріжджів *Saccharomyces cereviceae*, цвілеві гриби (*Mucor*; *Penicillium*; *Aspergillus*), наочні препарати сухих та законсервованих шапкових грибів (*Pleurotus ostreatus*), водорості у пробах річної води (*Micrococcus*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Chara*), живі лишайники; застійна вода (мул) з представниками найпростіших (*Protozoa*); клітини рослин; клітини тварин.

Першою стадією біотехнологічного процесу є підбір **біоб'єктів-продуцентів**, які знаходяться на різних рівнях організації живої матерії.

Це об'єкти **організованого рівня**: віруси, фаги, бактерії, гриби (мікро- і макроміцети), водорості, протозойні організми (найпростіші), черв'яки, рослини, тварини, людина

або **надорганізованого**: їх тканини, клітини, структурні компоненти клітин (біомолекули, органели, продукти метаболізму) (див. рис. 2).

Мікроорганізми, як об'єкти-продуценти в біотехнології, мають перевагу завдяки ряду властивостей:

- малі розміри (морфологічні особливості);
- активність (висока швидкість росту на живильних середовищах);
- простота геному;
- “гнучкість” обміну речовин;
- значна адаптаційна здатність до умов зовнішнього середовища.

Основними вимогами до мікроорганізмів в біотехнології є висока швидкість росту, стійкість до зараження сторонньою мікрофлорою, культивування на дешевих, доступних, нехарчових субстратах.

Перші описи мікроорганізмів, які з'явилися наприкінці XVII століття, зробив голандський вчений Антоніо Ван Левенгук за допомогою мікроскопу.

Світ мікроорганізмів включає значну різноманітність форм, яким властиві малі розміри – від десятих долей до десятків, сотен мкм (мікрометрів).

Мікроорганізми відносяться до 3-х надцарств: без'ядерні (акаріоти), доядерні (прокаріоти), ядерні (еукаріоти); 6-ти Царств: віруси, бактерії, архебактерії, рослини, тварини, гриби (рис. 2).

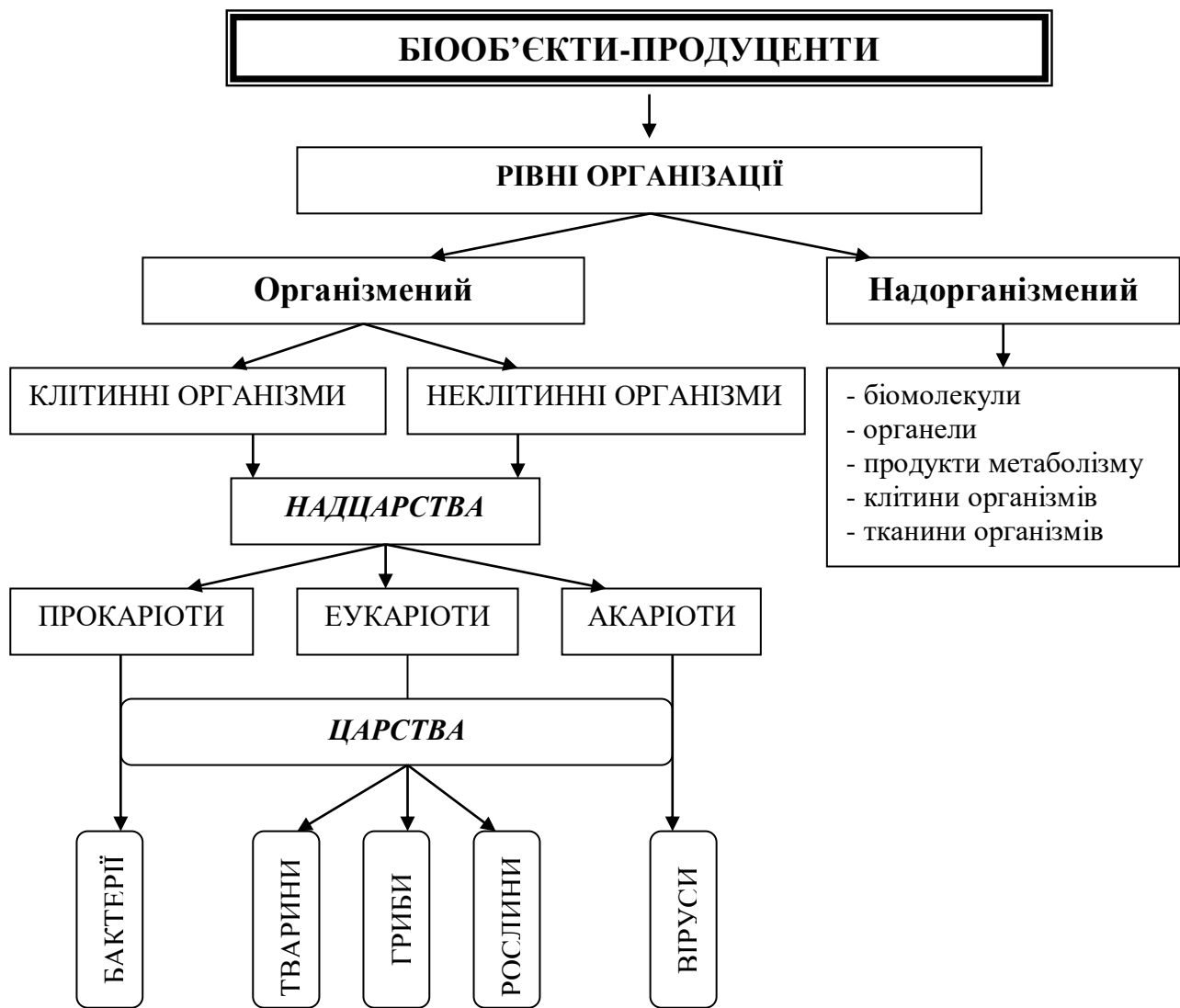


Рис. 2. Характеристика біоб'єктів-продуцентів за рівнями організації.

До акаріотичних організмів (неклітинні форми життя) – наноорганізмів відносяться *віруси*, *бактеріофаги*. Основою їх структурної будови є нуклеїнові кислоти (ДНК або РНК) та білки, які не пов'язані між собою ковалентними зв'язками.

Віруси – мікроорганізми, які не мають клітинної будови, містять тільки один тип нуклеїнових кислот: або молекулу РНК – рибовіруси, або молекулу ДНК – дезоксивіруси ($\approx 10^3$ нуклеотидів або пар нуклеотидів). Віруси є облигатними паразитами та характеризуються дуже малими розмірами. Їх діаметр вимірюються нанометрами та дорівнює 20-300 нм. Нуклеїнові кислоти у вірусній частинці існують у різних формах: одноланцюгова або лінійна молекула, дволанцюгова кільцева або лінійна молекула, чи окремі фрагменти молекули нуклеїнової кислоти (рис 3). Молекули нуклеїнових кислот знаходяться у білковій оболонці, яка має назву – *капсид*. Віруси не здатні до росту та бінарного поділу. Позаклітинна форма вірусу має назву *віріон*. Розмноження вірусу (*репродукція*) – це чіткий цикл, який призводить до синтезу нових молекул вірусних білків та великої кількості копій вірусної ДНК, а потім до формування зрілих вірусних часток. Саме після проникнення вірусів

у клітини живого організму завдяки мобілізації метаболічних систем клітини-хазяїна утворюється велика кількість копій вірусних геномів, які пригнічують біосинтез клітин та примушують їх утворювати власні білки і нуклеїнові кислоти.

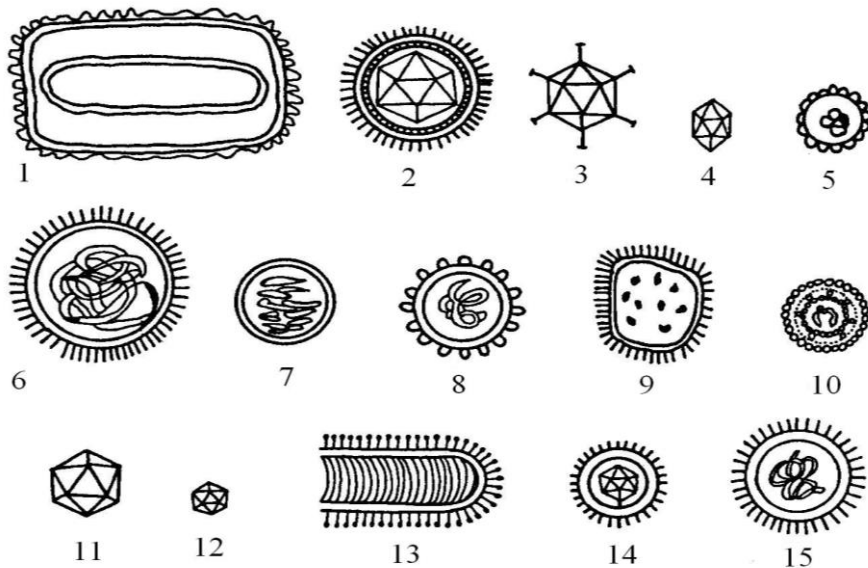


Рис. 3. Різні форми вірусів (за Воробйовим А.А., Кривошеїним Ю.С., 2001):

- 1 – вірус оспи; 2 – вірус герпесу; 3 – аденовірус; 4 – паповавірус;
 5 – гепаднавірус; 6 – параміксовірус; 7 – вірус грипу; 8 – коронавірус;
 9 – аренавірус; 10 – ретровірус; 11 – реовірус; 12 – пікорнавірус;
 13 – вірус бешихи; 14 – тогавірус, флавівірус; 15 – бун'явірус.

Бактеріофаги – облігатні паразити мікроорганізмів (віруси бактерій). Звичайно бактеріофаги мають багатогранну призматичну голівку та відросток (розміри 60-200 нм). Вони відносяться до дезоксивірусів: усередині голівки є одна чи дві нитки ДНК. Через відросток ДНК із голівки бактеріофагу переходить у клітину мікроорганізму. Морфологічні особливості елементів сформованих вірусних часток віріонів та бактеріофагу T2 зображені на рис. 3.

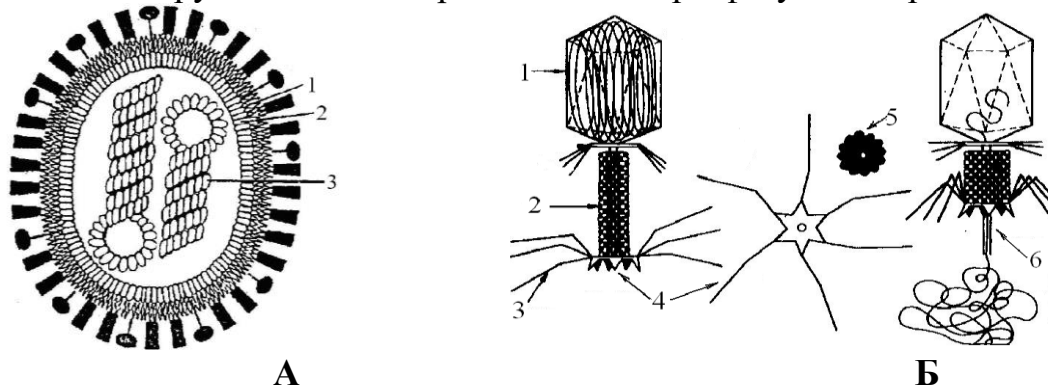


Рис. 4. Структура віріону (А) та бактеріофагу (Б)
 (за Єліновим Н.П., 1995):

- А:** 1 – біліпідний шар; 2 – білковий шар; 3 – рибонуклеопротеїн;
Б: 1 – голівка з ДНК; 2 – чохол; 3 – хвостові нитки; 4 – базальна пластинка; 5 – поперечний розріз чохла;
 6 – фаг з чохлам, що скоротився після адсорбції та ін'єкції.

Бактеріофаги використовують для діагностики, профілактики та лікування бактеріальних інфекцій: стафілококкової, стрептококкової, дизентерійної та ін. Механізм дії фагів – лізис клітин бактерій.

Бактерії (Eubacteria) – перші живі мікроскопічні організми (діаметр їх складає 0,2-10,0 мкм), що виникли приблизно 3,5 мільярди років тому. Вони мають різну форму: кулясту (коки), паличкоподібну (бактерії, бацили), звиту (вібріони, спірили, спірохети) (рис. 5).

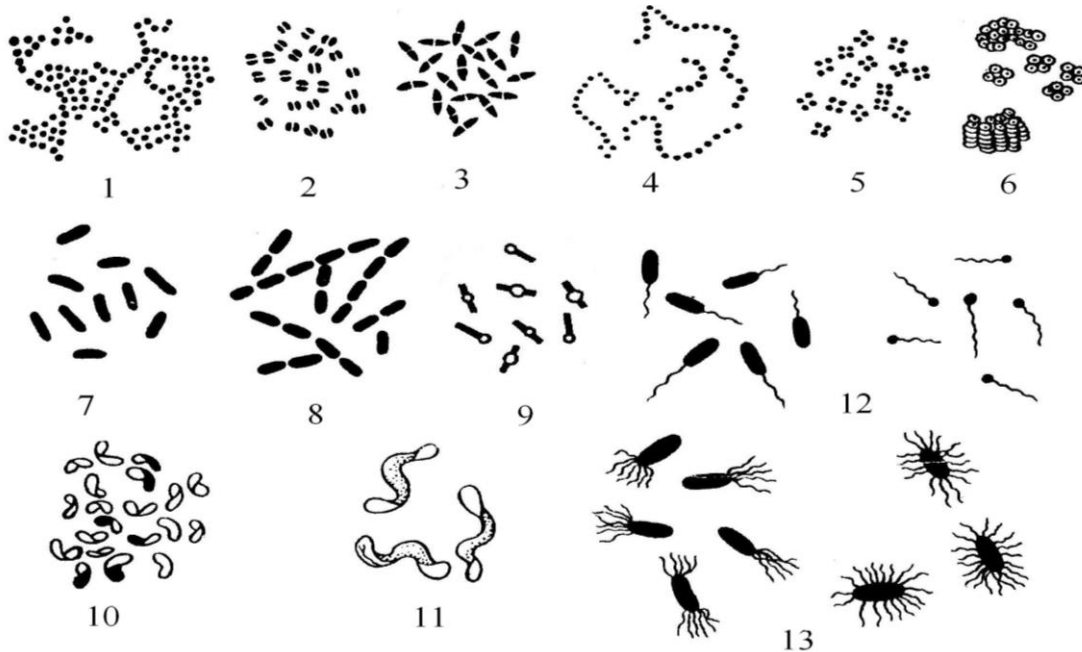


Рис. 5. Різноманітна форма бактерій:

- 1 – коки; 2, 3 – диплококи; 4 – стрептококи; 5 – тетракоки; 6 – сарцини;
7 – палички; 8 – ланцюги паличок; 9 – бацили; 10 – вібріони;
11 – спірили; 12 – джгутикові форми; 13 – війкові форми.

Окрім ядерного еквіваленту нуклеоїду, бактерії мають додатковий периферійний ДНК-вмісний елемент – *плазмиду* – маленьку кільцеву структуру з декількох генів, які здатні кодувати певні ферменти клітини. Плазміда використовується у біотехнології як вектор (транспортний засіб) для перенесення генів у методах генетичної інженерії. Основними речовинами клітинної стінки бактерій є гігантська молекула пептидоглікану (муреїн, мукопептид) і тейхоєві кислоти.

Бактерії є гетеротрофами, тобто живляться готовими органічними речовинами, які розкладають на більш прості і при цьому одержують енергію для свого існування. Деякі з них використовують енергію, що утворюється в результаті окислення мінеральних речовин. Лише невелика група бактерій (зелені та пурпурні сіркобактерії) має бактеріохлорофіл і здатна синтезувати органічні речовини, поглинаючи сонячну енергію.

Багато бактерій з несприятливих умов здатні в своїх клітинах утворювати спори. Такі бактерії називаються бацилами. В одній клітині формується одна товстостінна спора. Спороутворення у бактерій не є нестатевим розмноженням, а лише тимчасова форма існування. Спори можуть тривалий час зберігати

життєздатність. Потрапивши в сприятливі умови: достатньої вологості, температури та інших факторів, спора проростає. При цьому її щільна оболонка руйнується. Вона покривається новою клітинною стінкою і бактеріальна клітина переходить до нестатевого розмноження. Типового статевого процесу у бактерій немає.

Одні групи бактерій – *аероби* – вимагають для свого існування наявності кисню, інші – *анаероби* – розвиваються без кисню, він для них шкідливий. Є проміжні в цьому відношенні форми бактерій – факультативні аероби, які можуть розвиватися як при наявності, так і у відсутності кисню.

Бактерії обумовлюють процеси азотфіксації, амоніфікації, нітрифікації, денітрифікації, бродіння, гниття, тощо. Більшість бактерій є корисними організмами, але чимало і патогенних. Патогенні бактерії викликають захворювання людини, тварин, рослин. Для людини це дуже небезпечні хвороби: туберкульоз, холера, пневмонія, гонорея, дифтерія, сифіліс та ін. До корисних бактерій відносяться азотфіксуючі, молочнокислі, оцтовокислі, пропіонові, метаноутворюючі, кишкова та сенна палички та багато інших. Всі вони дуже широко використовуються у біотехнологічних процесах.

Бактерії, що живляться за рахунок мертвої органічної речовини, називаються сапрофітами, ті, що за рахунок живих організмів – паразитами.

Згідно класифікації Берджі, бактерії розподіляють на чотири відділи: грацилікути (*Gracilicutes*) – бактерії з тонкою клітинною стінкою, грамнегативні; фірмікути (*Firmicutes*) – бактерії з товстою клітинною стінкою, грампозитивні; тенерікути (*Tenericutes*) – бактерії “м’яккі”, “ніжні” без ригідної клітинної стінки, включаючи мікоплазми; мендозікути (*Mendosicutes*), так звані *архебактерії*, які відрізняються дефектною клітинною стінкою, особливостями будови рибосом, мембран та рибосомних РНК (рРНК).

Архебактерії були відкриті недавно (у 70-ті роки) і відрізняються від інших видів бактерій за своїми ознаками. До них відносять групи бактерій, стійких до екстремальних умов – ряд термофільних, метаноутворюючих та галофільних (солелюбів).

Малі розміри бактерій не дозволяють їм накопичувати продукти метаболізму, ферменти у резервний запас, тому вони виділяють їх зовні за певними умовами. Мікробний синтез бактерій дозволяє отримувати ферменти, гормони, кормовий білок на різних субстратах, біогаз, одержувати вітаміни (С, В₂, В₁₂, провітамін А – β-каротин), антибіотики та інші дуже корисні для людини речовини.

Ціанобактерії або *синьо-зелені водорості* (*Cyanea*) – автотрофні прокаріоти, займають проміжне положення між бактеріями і рослинами. Їх основним пігментом є хлорофіл *a*; крім того, присутні також каротиноїди і фікобіліни (фікоціанін, фікоерітрин та аллофікоціанін). У системі фототрофних мікроорганізмів мають особливе значення, тому що здатні до фотосинтезу із виділенням кисню, на відміну від бактерій. Найчастіше утворюють різні колонії із одноклітинних форм або нитчастих. Клітинна оболонка синьо-зелених водоростей відповідає за складом оболонці грам-негативних бактерій (одношарова). При надлишку органічних речовин здатні переходити на

міксотрофне (змішане) живлення. Багато видів можуть вступати у симбіоз з грибами, утворюючи лишайники. Деякі можуть вступати в симбіоз з папороттю (наприклад, *Anabaena spp.*). У біотехнологічних процесах ціанобактерії використовують як біодобрива (“зелені добрива”), як джерело білка (спіруліна), підсилювач смаку (носток) та ін. (рис. 6).

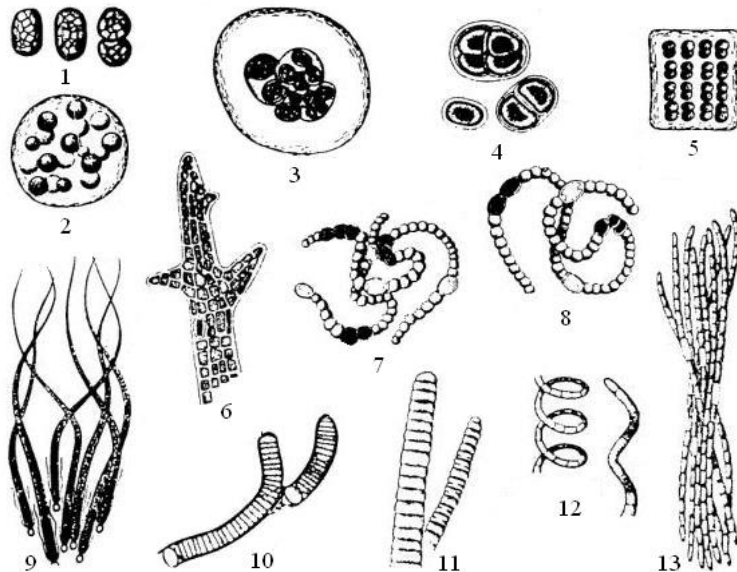


Рис. 6. Синьо-зелені водорості:

- 1 – *Synechococcus*;
- 2 – *Micrococcus*;
- 3 – *Gleocapsa*;
- 4 – *Chroococcus*;
- 5 – *Merismopedia*;
- 6 – *Stigonema*; 7 – *Nostoc*;
- 8 – *Anabena*; 9 – *Ribularia*;
- 10 – *Tolypothrix*;
- 11 – *Oscillatoria*;
- 12 – *Spirulina*;
- 13 – *Aphanizomenon*.

Гриби (Fungi) – це велика група еукаріотичних, гетеротрофних, безхлорофільних організмів. Вегетативне тіло грибів складається з системи розгалужених тонких ниток – *гіф*, які утворюють *грибницю (міцелій)*. За структурою міцелію гриби поділяють на вищі та нижчі. У вищих грибів міцелій – багатоклітинний, а у нижчих – неклітинний, багатоядерний. У клітинному міцелії чітко проглядаються перегородки (септи). Основною речовиною клітинної стінки грибів є хітин. Ядер у грибних клітинах може бути одне, два або багато, пластиди відсутні, запасними речовинами у цитоплазмі є жири, глікоген, волютин. Деякі гриби здатні синтезувати отруйні речовини (мускарин, фаллоїдин). Гриби розмножуються вегетативним, нестатевим та статевим шляхом. Вегетативне розмноження відбувається частинами міцелію. Нестатеве – за допомогою спеціальних спор або конідій.

Гриби мають схожість з рослинними та тваринними організмами. З тваринами гриби поєднує наявність хітину у клітинній стінці, запасний вуглевод глікоген, відсутність пластид, гетеротрофне живлення, потреба у вітамінах. Риси схожості з рослинами є здатність до неогмеженого росту, живлення шляхом всмоктування речовин, нерухомість, розмноження спорами, присутність вакуолей.

До мікроскопічних грибів – мікроміцетів – відносяться дріжджі, цвілеві гриби (мукор, пеніцил, аспергил, дріжджі та ін.) (рис. 7, А-Г).

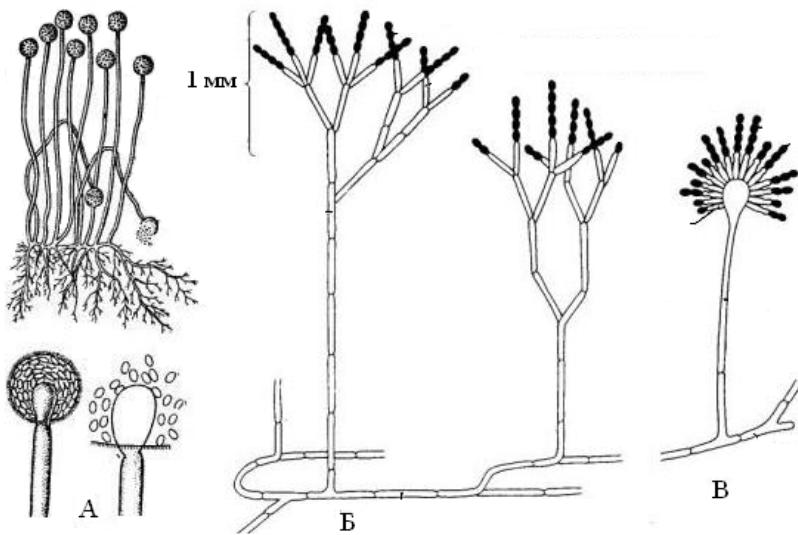


Рис. 7. Мікроміцети та макроміцети:

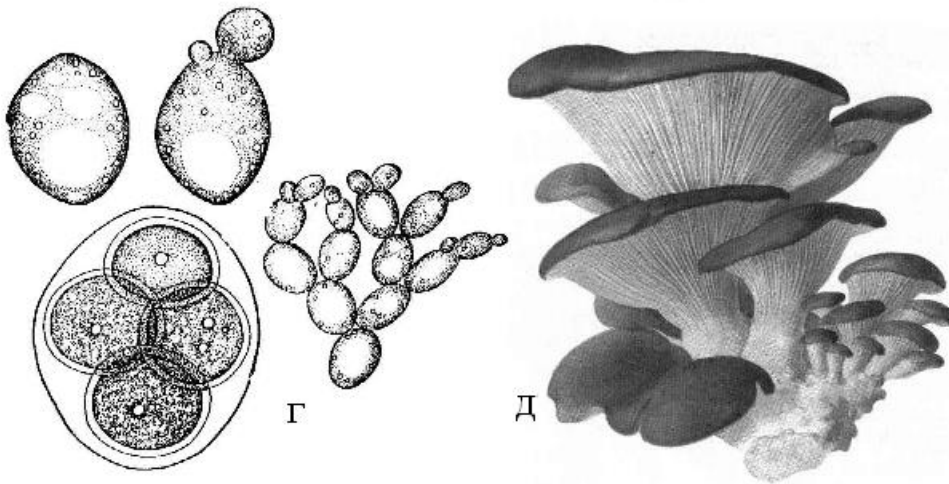
А – міцелій та спорангієносці зі спорами гриба *Mucor*;

Б – мікроскопічна китиця конідієносця *Penicillium*;

В – мікрофотографія *Aspergillus niger*;

Г – клітини дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* окремі та ті, що брунькуються;

Д – Глива звичайна *Pleurotus ostreatus*.



Використання мікроскопічних грибів дозволяє одержувати амілолітичні, ліполітичні ферменти, вітаміни (β -каротин, вітаміни групи В), харчовий білок, антибіотики. Вони є активними продуцентами ферментів для виготовлення сирів, кисломолочної продукції. В отриманні етанолу, пива, вина, харчового та кормового білка широко застосовуються дріжджі.

Макроскопічні гриби (рис. 7, Д) – макроміцети (базидіоміцети: глива, печериця, білий гриб, лисички та ін.) – є продуцентами харчового білка. В останні роки була з'ясована бактерицидна, протипухлинна і, навіть, антиснідова активність вищих базидіоміцетів.

Гриби здатні виділяти у навколишнє середовище ферменти і шляхом абсорбції поглинати живильні речовини, продукти ферментативного гідролізу природних біополімерів та інших розчинних сполук. Такий спосіб живлення дозволяє віднести ґрунтових представників Царства Fungi у найбільшу екологічну групу, яка бере участь в мінералізації органічних речовин в екосистемах, тобто колообігу речовин.

Водорості (Algae) – це нижчі таломні рослини, первинним середовищем існування яких є вода. Вони включають десять самостійних відділів: зелені,

жовто-зелені, золотисті, діатомові, бурі, червоні, пиррофітові, евгленові, харові, синьо-зелені. Синьо-зелені або ціанобактерії – водорості Надцарства Procariotae, інші відділи водоростей відносяться до Надцарства Eucariotae. До їх складу входять пігментами хлорофіл *a* і *b*, каротиноїди; резервним вуглеводом є крохмаль. Деякі види (рис. 8, А-Д) мають джгутики для переміщення. Нестатеве розмноження відбувається зооспорами, вегетативно, поділом навпіл або брунькуванням. Статевий процес відбувається у формі гологамії та мерогамії.

За типами водорості підрозділяються на активно рухомі одноклітинні та колоніальні, нерухомі одноклітинні та багатоклітинні, нитчасті, пластинчасті і сифонові (мають багатоядерний талом) (рис. 8, А-Д).

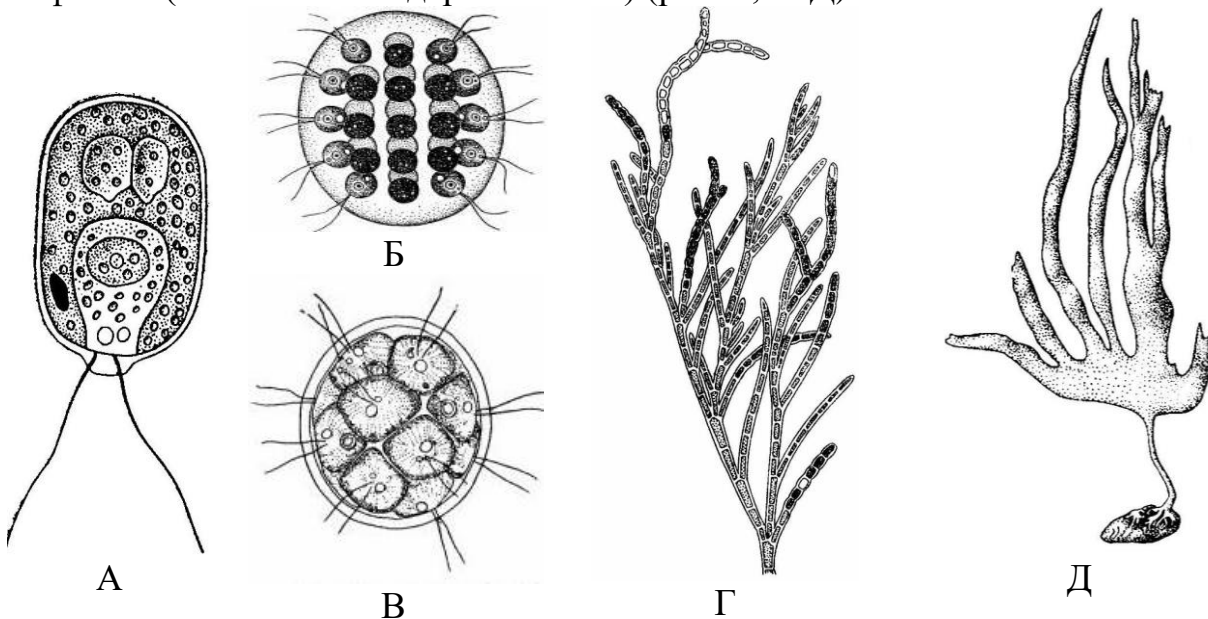


Рис. 8. Типи водоростей:

А – вегетативна особина *Chlamydomonas*; Б – ценобій *Eudorina elegans*;
В – ценобій *Pandorina*; Г – *Cladophora*; Д – *Laminaria saccharina*

Фотосинтезуючі клітини водоростей, поглинаючи енергію видимого світла, перетворюють її в хімічну енергію фосфатних зв'язків АТФ. При цьому фіксуються карбон, нітроген, фосфор і включаються до складних молекул органічних речовин (накопичується біомаса).

На основі водоростей отримують харчові добавки, кормовий білок, мікроелементи (йод, бром), ферменти, органічні кислоти, агар-агар - складний полісахарид, здатний до гелеутворення, який застосовують для ущільнення живильних середовищ у мікробіології. За допомогою водоростей можливе отримання біомаси та біологічно активних речовин у системах життєзабезпечення космічних кораблів, енергії (фотоліз води), очищення стічної води в аеротенках, очищення води за допомогою біофільтрів тощо.

Лишайники (Lichenes) є потенційними біооб'єктами для біотехнології. Це симбіотичні організми, які утворені грибом – гетеротрофним мікобіонтом (переважно аскоміцетами, іноді базидіоміцетами) та автотрофним фікобіонтом – водоростями (частіше зеленими, рідко ціанобактеріями).

Вегетативне тіло лишайників – це талом (слань). Гіфи гриба сплітаються з водоростю, утворюючи міцну структуру. За морфологічною ознакою виділяють три основні групи лишайників:

– накипні або коркові – тіло у вигляді накипі, яка вкриває субстрат та тісно зростається з ним усією поверхнею (рис. 9, А), що практично невіддільна від нього; накипні лишайники складають біля 80% всіх лишайників;

– листові – тіло у вигляді листоподібних пластинок, які прикріплені до субстрату пучками гіф (ніжка) та легко відділяються від нього (рис. 9, В);

– кущові – талом у вигляді більш або менш розгалужених кущів довжиною до 15 см (можуть досягати і 7-8 м – тайговий лишайник уснея), які підіймаються від субстрату (грунту) або звисають з гілок. У кущових лишайників талом є циліндричним із “серцевиною” у центрі (рис. 9, Б).

Розмноження лишайників переважно вегетативне: фрагментами талому. Ростуть вони дуже повільно – за рік у різних видів слань зростає від 1 до 10 мм.

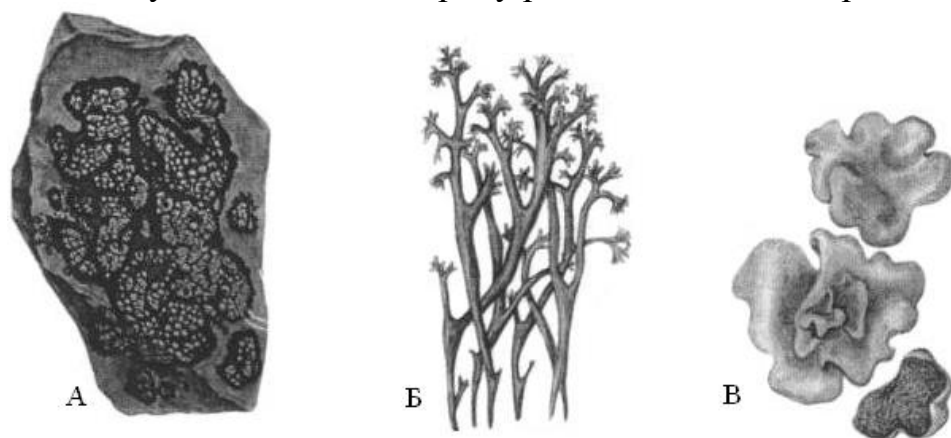


Рис. 9. Морфологічні групи лишайників:

А – накипний *Ryzocarpon*; Б – кущовий *Spherophorus*;

В – група таломів листового *Dermatocarpon*

У біотехнології лишайники можливо застосовувати для отримання натуральних барвників, закріплювачів запахів у парфумах, як продукт харчування, як джерело ліхенових кислот, що володіють бактерицидною активністю. Із тайгового лишайника уснеї отримують антисептичну речовину – уснінову кислоту.

Найпростіші (Protozoa) – мікроскопічні одноклітинні тварини Надцарства Eucariotae, які мешкають у воді, ґрунті або паразитують у тілі тварин. Підцарство включає п’ять типів: Саркодові, Джгутикові, Споровики, Інфузорії, Кнідоспоридії. Класифікація найпростіших заснована на способах переміщення: за допомогою псевдоподій (псевдоніжки) – амьоба, форамініфери, радіолярії; джгутиків – евглена зелена, лямблії, трипаносома; чи війок – інфузорія-туфелька, сувоїки або нерухомі форми – малярійний плазмодій. Тіло найпростіших складається з цитоплазми, одного або декількох ядер і органоїдів, які виконують певні життєві функції. За несприятливих умов найпростіші виділяють захисну оболонку і утворюють цисту. Більшість найпростіших живе у водному середовищі (рис. 10, А-Г).

Найпростіші входять до складу ґрунтових біоценозів, активних мулів (зооглея), які використовуються у процесах біологічного очищення водоймищ, стічних вод. В активному мулі найпростіші виконують функції підтримання чисельного складу мікроорганізмів. Живлячись бактеріями та плаваючими речовинами, вони сприяють також освітленню води. Protozoa здатні виконувати функцію тест-індикаторів якості очищення стоків.

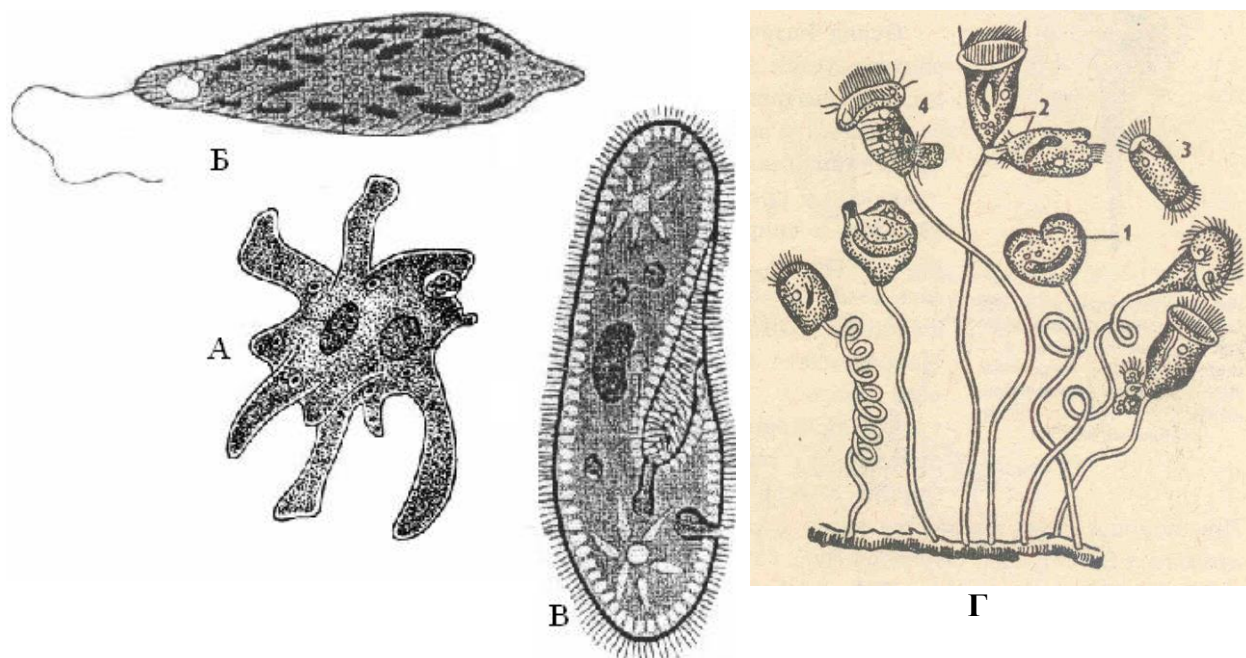


Рис. 10. Найпростіші:

А – Амеба; Б – Зелена евглена; В – Інфузорія туфелька;
Г – Коловійкові інфузорії – сувойки Vorticella

Черв'яки (Annelida). Серед багатоклітинних тварин у біотехнології використовують черв'яків типу Кільчасті черв'яки (Клас Малощетинкові черв'яки-олігохети). Олігохети – велика та ще недостатньо вивчена група тварин, поширених переважно в ґрунті та прісних водоймах. Все черв'якоподібне тіло поділено перетяжками на окремі ділянки – кільця, які називаються *сегментами* або *сомітами*. Число сегментів тіла може коливатися від 5-6 до 500-600, які звичайно несуть по чотири пучка щетинок. Пересуваються за рахунок почергових скорочень шкірно-м'язового мішка. Малощетинкові черв'яки – гермофродити з прямим типом розвитку.

Одними із найбільш відомих представників олігохет є дощові черв'яки (рис. 11). Дощові черв'яки та інші ґрунтові малощетинкові черви відіграють надзвичайно важливу роль у процесах ґрунтоутворення. Дощові черв'яки живляться відмерлими рештками рослин, зтягуючи їх у свої ходи, і там збагачують ґрунт органічними речовинами. У процесі перетравлення залишок рослин у кишечнику черв'яків формуються органічні речовини, з яких утворюється гумус. Дощовий черв'як *Eisenia foetida* (гнойовий) часто зустрічається у купах гною чи компосту. Він переробляє органічну масу на високоєфективне добриво (біогумус). Вченими штучно створена високопродуктивна порода цих тварин – “каліфорнійський черв'як”.

Вермікультивування – перспективна галузь біотехнології, в якій використовуються властивості каліфорнійського черв'яка: одержання його біомаси, біогумусу, біогумату (витяжка з біогумусу, яка містить комплекс біологічно активних речовин, зокрема фітогормонів).

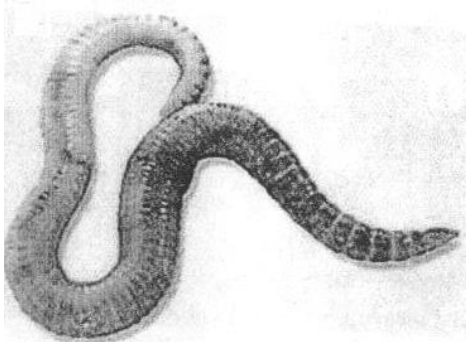


Рис. 11. Біотехнологічний об'єкт – червоний каліфорнійський черв'як

Завдання:

Виготовити тимчасові препарати і розглянути за допомогою мікроскопічного методу представників різних груп мікроорганізмів (дріжджових клітин, цвілевих грибів: *Mucor*, *Aspergillus*; водоростей: *Microcystis*, *Chara*; найпростіших: сувойки), а також візуально розглянути представників лишайників, шапкових грибів. Зробити рисунки та їх підписи з визначенням основних структурних (морфологічних) компонентів об'єктів біотехнології. Визначити зв'язок морфологічних особливостей мікроорганізмів з речовинами, які вони продукують, їх використання у біотехнології. Скласти таблицю, яка характеризує ці особливості (зразок схеми пропонується).

Таблиця 1

Порівняльна характеристика біооб'єктів-продуцентів біотехнологічної продукції

№ п/п	Біооб'єкт-продуцент	Фізіологічні особливості (за трофічним фактором)	Використання у біотехнологічних процесах
1			
2			
3			

Звіт з виконаної роботи здати викладачу.

Контрольні питання для самоперевірки

1. Поняття про мікроорганізми, їх значення як об'єктів-продуцентів в біотехнології.
2. Біотехнологічні переваги мікроорганізмів-продуцентів різних біотехнологій в екології.
3. Характеристика біоб'єктів-продуцентів за рівнями організації.
4. Внесок Луї Пастера та Антонія Левенгука у розвиток науки про мікробів.
5. Різноманітність мікроорганізмів: віруси, фаги, бактерії, водорості, гриби, найпростіші.
6. Природні середовища мешкання мікроорганізмів.
7. Елементи живлення мікроорганізмів: автотрофи, гетеротрофи.
8. Значення мікроорганізмів для розвитку біотехнологічних наук.
9. Шкода, яку наносять мікроорганізми.
10. Використання мікроорганізмів для здобуття екологічно безпечної продукції для народного господарства.
11. Клітини тварин як об'єкти-продуценти в біотехнології.
12. Клітини рослин як об'єкти-продуценти в біотехнології.

2. ТЕОРЕТИЧНІ ОСНОВИ БІОТЕХНОЛОГІЧНИЙ ПРОЦЕСІВ

Біотехнологічними продуктами є речовини, що утворюються в результаті життєдіяльності живих клітин, тканин біооб'єктів у штучних умовах. Найбільш поширена *біотехнологічна продукція* являє собою біологічно активні речовини (вітаміни, ферменти, гормони, амінокислоти, білки, вуглеводи, нуклеотиди, антибіотики, стероїди, імуноглобуліни, алкалоїди, пестициди та ін.), продукти бродіння (спирти, органічні кислоти, ацетон), енергетичні речовини (біогаз, етанол, водень), рідкі метали (біометалургія), речовини харчового (фруктозо-глюкозний сироп) та кормового призначення, продукти на основі технології культури клітин – вакцини, компоненти крові, моноклональні антитіла.

Біотехнологічний процес – це виробничий процес, у якому використовується життєдіяльність організмів або продукти їх метаболізму. Біотехнологічний процес включає три основні стадії: 1 – підготовчу (підготовка біологічного об'єкту); 2 – культивування біооб'єкту; 3 – відділення, очищення та модифікація цільового продукту.

Основою сучасних біотехнологічних виробництв є мікробіологічний синтез. Об'єкти рослинного та тваринного походження знаходять менш широке використання, ніж мікроорганізми, завдяки високим вимогам до умов культивування (значне подорожчання виробничих процесів). Характерна особливість мікроорганізмів – їх здатність до надсинтезу, тобто надлишковому утворенню деяких продуктів обміну речовин (багатьох амінокислот, нуклеотидов, вітамінів), які перевищують потреби мікробної клітини.

Реалізація біотехнологічного процесу здійснюється за наступною принциповою схемою (рис. 1).

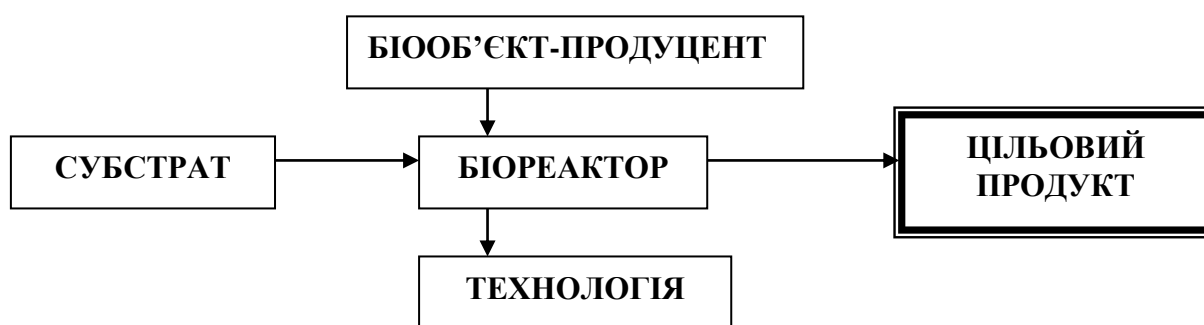


Рис. 1. Блок-схема біотехнологічного процесу

Існуючі біотехнологічні виробництва можуть відрізнятися своїми біооб'єктами-продуцентами, сировиною, кількістю виробничих стадій та технологічними режимами. Однак їх можна представити однією узагальненою типовою схемою (рис.2).

Схема включає ряд стадій, в кожній з яких сировина послідовно перетворюється через проміжні продукти у кінцевий продукт.

Основною стадією є власно *біотехнологічна стадія*, на якій з використанням того або іншого біологічного об'єкту-продуценту

(мікроорганізмів, ізольованих клітин, тканин, ферментів чи клітинних органел), виникає утворення цільового продукту за такими технологічними процесами:

– *ферментація* – процес, який здійснюється шляхом культивування мікроорганізмів (виробництво кефіру, йогурту шляхом молочнокислого бродіння; виробництво спирту, пива – спиртовим бродінням; виробництво амінокислоти лізину, лимонної кислоти з м'яса – відходів цукрового виробництва; виробництво кормового білка шляхом нарощування дріжджової біомаси);

– *біотрансформація* – процес перетворення хімічної структури речовини під впливом ферментативної активності клітин мікроорганізмів або готових ферментів. При цьому не виникає накопичення клітин мікроорганізмів, а здійснюється хімічна модифікація речовин субстрату шляхом додавання чи віднімання радикалів, гідроксильних іонів або дегідрування (виробництво стероїдних гормонів, алкалоїдів, антибіотиків);

– *біокаталіз* – хімічне перетворення речовини, що протікає з використанням ферментів-біокаталізаторів (культивування грибів шляхом ферментативного руйнування целюлозовмісних рослинних відходів, використання біосенсорів);

– *біоокиснення* – утилізація речовин-забруднювачів за участю мікроорганізмів або асоціації мікроорганізмів в аеробних умовах (початкова аеробна стадія силосування, очищення стічних вод з використанням біофільтрів);

– *метанове бродіння* – переробка органічних відходів за допомогою асоціації метаногенних мікроорганізмів в анаеробних умовах (виробництво біогазу з використанням органічних відходів);

– *біокомпостування* – це зниження кількості шкідливих органічних речовин у твердих відходах за допомогою асоціації мікроорганізмів (мікробне очищення ґрунту від нафтових забруднень);

– *біосорбція* – сорбція шкідливих домішок із газів або рідин мікроорганізмами, які закріплені на спеціальних твердих носіях (очищення стічних вод з використанням біофільтрів);

– *біодеградація* – руйнування шкідливих сполук під впливом мікроорганізмів-деструкторів (анаеробна стадія силосування, мікробне розкладання пестицидів);

– *бактеріальне вилуження* – процес переведення сполук металів, що не розчиняються у воді, за допомогою мікроорганізмів у розчинний вигляд (виділення металів із піритних руд).



Рис. 2. Типова узагальнена схема основних стадій біотехнологічного виробництва

Екологічні галузі застосування біотехнологічної продукції базуються на екологічній безпечності та на біосинтетичних можливостях біооб'єктів-продуцентів:

– вірусів, в медицині: розробка вакцин, біопрепаратів для створення в організмі штучного імунітету, використання рекомбінантних вакцин; в *фармацевтичній промисловості*: розробка діагностикумів, вакцин, векторів на основі ДНК-вмісних вірусів рослин;

– бактерій: отримання кормового білка на різних субстратах, біогазу, одержання вітамінів (B_2 , B_{12}), гормонів, ферментів, органічних кислот;

– грибів: одержання амілолітичних, ліполітичних ферментів, вітамінів (β -каротину, D , C), отримання харчового білка, при виготовленні сирів, кисломолочної продукції; використання дріжджів для отримання етанолу, пива, вина, харчового та кормового білка тощо;

– водоростей: отримання харчових добавок, кормового білка, енергії (фотоліз води), очищення стічної води в аеротенках, очищення води за допомогою біофільтрів;

– використання найпростіших: як складова частина активного мулу при очищення водоймищ та стічних вод, в якості тест-індикаторів;

– використання черв'яків: для одержання біогумусу (як добрива), біогумату (фітогормонів).

– одержання трансгенних рослин: покращення якості та підвищення продуктивності рослин за допомогою методів генної інженерії; одержання нових сортів та гібридів сільськогосподарських та інших рослин за допомогою методів селекції, використання культури ізольованих рослинних тканин для розмноження та оздоровлення садового матеріалу (методи клітинної інженерії);

– використання клітинних культур людини та тварин: виділення та перенесення диференційованих клітин на штучне живильне середовище *in vitro*, які стануть продуцентами фізіологічно активних речовин - гормонів росту, мукополісахаридів, колагену, кортикостероїдів, білків, ферментів та ін.; одержання моноклональних антитіл, які синтезуються гібридомними лімфоїдними клітинами (метод клітинної інженерії).

– клонування та експресія генів в різних організмах.

Якщо біооб'єктом є визначений штам мікроорганізму, то *перша стадія* (підготовча) складається з методів одержання спочатку в лабораторних умовах (в чашках Петрі або пробірках) накопичувальної культури шляхом виділення клітин мікроорганізму із невеликих проб будь-якого субстрату (грунту, водного середовища, мулу, повітря), а далі – чистої культури (одного виду клітин). Малі розміри мікроорганізмів дають можливість в умовах однієї пробірки одержати чисту культуру та вивчити особливості передачі спадкових ознак.

Шляхом простого підбору важко отримати високоактивні продуценти. Тому існують методи зміни природи живого організму у заданому напрямку. *Основними методами*, які використовуються при *підборі біооб'єкту-продуценту* є методи *селекції* (спрямований відбір мутантів, тобто організмів зі зміненою спадковою інформацією – штучний відбір особин з необхідними ознаками; індукований мутагенез, відбір клонів); методи *генної інженерії* *in*

vivo та in vitro (введення у геном реципієнтної клітини одного або декількох чужорідних генів, або утворення в геномі нових типів регуляторних зв'язків); методи *клітинної інженерії* (гібридизація соматичних клітин; одержання гібридомних клітин – метод отримання моноклональних антитіл; у рослинництві – метод клонального мікророзмноження з використанням ізольованих клітин, тканин, які бувають представленими у вигляді калусних та рідко пухлинних тканин; in vitro – метод ізольованих органів – тканинних зрізів та ін.)

Стадія культивування мікроорганізмів у біореакторі певного типу за заданою технологією передбачає підбір субстрату для забезпечення клітин організму комплексом розчинених живильних речовин (органічних, неорганічних), що йому необхідні, і використовуються для життєдіяльності (росту і розмноження, тобто конструктивних та енергетичних процесів).

Способи заключної *стадії біотехнологічного процесу* залежать від хімічної природи цільового продукту, знаходження його (в клітині або в культуральній рідині) та якщо продуктом є сама клітинна біомаса.

При культивуванні біооб'єктів в багатьох біотехнологічних процесах утворюються двофазні системи, в яких тверда фаза – маса клітин продукту біосинтезу (біомаса), а рідка – рідина з розчиненими залишками живильних речовин та продуктами біосинтезу, в якій проходив процес культивування біомаси (культуральна рідина).

Методами відділення біомаси від культуральної рідини є сепарування та центрифугування; фільтрація; осадження за допомогою флокулянтів; дистиляція; сублимація; зневоднення (випаровування, сушіння); ліофілізація; заморожування; осадження шляхом змін розчинності речовини; кристалізація; сорбція; екстракція; ультрафільтрація на мембранних фільтрах.

Важливим та відповідальним етапом заключної стадії є модифікація (змінення) продукту для його подальшого використання людиною, а також зберігання продукту. Модифікація – необхідний етап в отриманні ряду ферментів, гормонів, препаратів медичного призначення. Мова йде про перебудову сполук тваринного, рослинного або мікробного походження з метою надання їм специфічних властивостей, необхідних людині. Наприклад, у бичачого інсуліну “відстригають” амінокислотні залишки, після чого він становиться ідентичним людському гормону.

Збереження клітин мікроорганізмів без втрати цінних якісних властивостей є можливим, якщо гальмувати їх життєво важливі процеси, в тому числі, і генетичні зміни (клітини у стані, який схожий на анабіоз).

Методи збереження (консервації) біопродукції: ліофілізація (зневоднення під вакуумом після заморожування); повітряне сушіння; збереження у вигляді спор; кріоконсервація (глибоке заморожування у рідкому азоті при -196°C), що запобігає змінам генофонду; комбіновані методи (часткове сушіння з подальшою ліофілізацією).