

Министерство сельского хозяйства и продовольствия  
Республики Беларусь

Витебская ордена «Знак Почета» государственная  
академия ветеринарной медицины

**Кафедра микробиологии и вирусологии**

**ВЕТЕРИНАРНАЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ  
БИОТЕХНОЛОГИЯ**

**Часть 1. Промышленная организация  
биотехнологических процессов**

Учебно-методическое пособие для студентов  
по специальности 1-74 03 05 «Ветеринарная фармация»



Витебск  
ВГАВМ  
2020

УДК 573.6.086.83:619  
ББК 30.16+48  
В39

Рекомендовано к изданию методической комиссией биотехнологического факультета УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины» от 26 сентября 2019 г. (протокол № 1)

Авторы:

кандидат ветеринарных наук, доцент *А. А. Вербицкий*; старший преподаватель *А. Г. Кошнеров*; кандидат ветеринарных наук, доцент *Р. Б. Корочкин*; ассистент *Е. Р. Велева*

Рецензенты:

и.о. заведующего лабораторией биотехнологии НИИ ПВМ и Б, доктор биологических наук, доцент *П. П. Красочко*; кандидат ветеринарных наук, доцент *Я. П. Яромчик*

**В39 Ветеринарная фармацевтическая биотехнология. Часть 1. Промышленная организация биотехнологических процессов : учеб.-метод. пособие для студентов по специальности 1-74 03 05 «Ветеринарная фармация» / А. А. Вербицкий [и др.]. – Витебск : ВГАВМ, 2020. – 160 с.**

Пособие написано в соответствии с программой дисциплины «Биотехнология». В нем рассматриваются основные принципы организации биотехнологического производства, методы промышленной микробиологии, клеточной и генной инженерии, а также вопросы качества биотехнологической продукции.

Пособие предназначено для студентов биотехнологического факультета, обучающихся по специальности 1-74 03 05 «Ветеринарная фармация», а также может быть использовано в качестве дополнительного источника литературы для студентов факультета ветеринарной медицины, аспирантов и магистрантов.

**УДК 573.6.086.83:619  
ББК 30.16+48**

© УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», 2020

## СОДЕРЖАНИЕ

<i>Введение</i>	4
<i>Тема 1.</i> Биообъект как средство производства лекарственных, профилактических и диагностических средств	8
<i>Тема 2.</i> Сырьевая база биотехнологического производства	21
<i>Тема 3.</i> Исходная обработка сырья в биотехнологическом производстве	29
<i>Тема 4.</i> Ферментация и биотрансформация. Промышленное культивирование микроорганизмов	45
<i>Тема 5.</i> Аппаратурное оформление биотехнологического производства	59
<i>Тема 6.</i> Слагаемые биотехнологического процесса	69
<i>Тема 7.</i> Выделение и очистка конечных продуктов биотехнологического процесса	82
<i>Тема 8.</i> Основы клеточной инженерии. Технология получения и культивирования линий растительных клеток	96
<i>Тема 9.</i> Технология получения и культивирования линий животных клеток	108
<i>Тема 10.</i> Основы генной инженерии. Технология рекомбинантных ДНК	116
<i>Тема 11.</i> Управление качеством при производстве биотехнологической продукции	124
<i>Тема 12.</i> Экологические аспекты биотехнологии. Роль биотехнологии в защите и оздоровлении биосферы	139
<i>Список использованной литературы</i>	159

## ВВЕДЕНИЕ

В соответствии с определением Европейской федерации биотехнологов (ЕФБ, 1984) под *биотехнологией* (от греч. *bios* – жизнь, *teken* – искусство, *logos* – слово, учение, наука) понимают отрасль научных знаний, которая базируется на интегральном использовании биохимии, микробиологии и инженерных наук в целях промышленной реализации способностей микроорганизмов, культур клеток тканей и их частей.

Уже в самом определении предмета отражено его местоположение как пограничного, благодаря чему результаты фундаментальных исследований в области биологических, химических и технических дисциплин приобретают выраженное прикладное значение. Биотехнология непосредственно связана с общей биологией, микробиологией, ботаникой, зоологией, анатомией и физиологией, биологической, органической, физической и коллоидной химией, иммунологией, биоинженерией, электроникой, технологией лекарств, генетикой и другими научными дисциплинами.

Первое определение термина «биотехнология» было дано венгерским инженером Карлом Эреки в 1917 г. применительно к результатам его работы по повышению продуктивности свиней при кормлении их сахарной свеклой: *«Биотехнология – это все виды работ, при которых из сырьевых материалов с помощью животного организма производятся те или иные продукты»*. По мере развития естественно-технических наук, биологической науки, генетики и биохимии клеток совершенствовались, усложнялись и расширялись технологии с использованием биологических объектов; появились специализированные производства в промышленном масштабе, на основе достижений клеточной инженерии разрабатываются новые технологии с использованием культуры клеток, что способствовало соответствующим изменениям и дополнениям в определении сущности биотехнологии как науки.

Существует несколько определений термина «биотехнология», каждое из которых имеет определенное значение и дополняет другие.

**Биотехнология** – это наука об использовании биологических процессов в производственных целях.

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

**Биотехнология** – это наука, изучающая возможности использования живых организмов, их систем или продуктов их жизнедеятельности для решения технологических задач, а также возможности создания живых организмов с необходимыми свойствами методами генной инженерии.

**Биотехнология** – это научное направление, занимающееся технологиями создания и использования биологических объектов, способствующими интенсификации производства или получению новых видов продук-

тов различного назначения на основе методов клеточной и генетической инженерии.

Биотехнология формировалась и эволюционировала по мере формирования и развития человеческого общества. Ее возникновение, становление и развитие условно можно подразделить на 4 периода: эмпирический, этиологический, биотехнический и генно-технический.

*Эмпирический (допастеровский) период* охватывает время от древних времен до 1868 г.

Древние народы того времени интуитивно использовали приемы и способы изготовления хлеба, пива и некоторых других продуктов, которые теперь мы относим к разряду биотехнологических. Египтяне выпекали хлеб из кислого теста, на востоке производили вино.

В течение нескольких тысячелетий известен уксус, издревле приготавливавшийся в домашних условиях, хотя о микроорганизмах-индукторах этого процесса мир узнал в 1868 г. благодаря работам Луи Пастера, несмотря на существование с XIV в. «орлеанского способа» приготовления уксуса; первая дистилляция вина осуществлена в XII в.; водку из хлебных злаков впервые получили в XVI в.; шампанское известно с XVIII в., но получение абсолютного этанола впервые удалось в XIV в. испанцу Раймунду Луллию благодаря перегонке вина с негашеной известью.

К эмпирическому периоду относятся получение кисломолочных продуктов и сыра, квашеной капусты, медовых алкогольных напитков, восточных продуктов (соевого соуса и темпеха), силосование кормов; мочка лубоволокнистых растений; культивирование грибов. Таким образом, народы исстари пользовались на практике микробиологическими процессами, ничего не зная о микроорганизмах; эмпиризм также был характерен и в практике использования полезных растений и животных.

*Этиологический (пастеровский) период* охватывает вторую половину XIX в. и первую треть XX в. Он связан с выдающимися исследованиями великого французского ученого Луи Пастера, который явился основоположником научной микробиологии и ряда микробиологических дисциплин.

Луи Пастер открыл микробиологическую природу брожения, доказал возможность жизни в бескислородных условиях, экспериментально опроверг представление о самопроизвольном зарождении живых существ, создал научные основы вакцинопрофилактики и вакцинотерапии; предложил метод термической обработки, называемый по его имени пастеризацией и т.д. В этот период удалось доказать индивидуальность микроорганизмов и получить их в чистых культурах. Более того, каждый вид мог быть размножен на питательных средах и использован в целях воспроизведения соответствующих процессов (бродильных, окислительных и др.). В этот период было начато изготовление прессованных пищевых дрожжей, а также некоторых продуктов метаболизма (ацетона, бутанола, лимонной и молочной кислот); во Франции приступили к созданию биоустановок для микробиологической очистки сточных вод.

Знание причин биологических процессов еще не исключало нестерильные операции, хотя и стремились к использованию чистых культур микроорганизмов. Для всестороннего изучения морфолого-физиологических свойств и продуктов обмена микроорганизмов все ранее предложенные способы их выращивания оказались малопригодными. Более того, накопление однородной по возрасту большой массы клеток оставалось исключительно трудоемким процессом. Поэтому требовался принципиально иной подход для решения многих задач в области биотехнологии.

*Биотехнический период* в развитии биотехнологии начинается с 1933 г., когда А. Ключвер и Л. Х. Ц. Перкин опубликовали работу «Методы изучения обмена веществ у плесневых грибов», в которой изложили основные технические приемы, а также подходы к оценке и интерпретации получаемых результатов при глубинном культивировании грибов.

Началось внедрение в биотехнологию крупномасштабного герметизированного оборудования, обеспечившего проведение процессов в стерильных условиях. Особенно мощный толчок в развитии промышленного биотехнологического оборудования был отмечен во время Второй мировой войны (1939–1945 гг.) в период становления и развития производства антибиотиков, когда возникла острая необходимость в противомикробных препаратах для лечения больных с инфицированными ранами. Все прогрессивное в области биологических и технических дисциплин, достигнутое к тому времени, нашло свое отражение в биотехнологии.

К 1950 г. Ж. Моно разработал теоретические основы непрерывного управляемого культивирования микроорганизмов. Были решены основные задачи по конструированию, созданию и внедрению в практику необходимого оборудования, в том числе главного из них – биореакторов. Это оборудование используют и в настоящее время. В этот период фундаментальная работа Ф. Крика и Дж. Уотсона (1953) по установлению структуры ДНК дала возможность достигнуть современных результатов в области биотехнологии. Выяснение механизмов функционирования и регуляции ДНК, выделение и изучение специфических ферментов привело к формированию строго научного подхода к разработке биотехнологических процессов на основе генно-инженерных работ.

*Генно-технический период* начался с 1972 г., когда П. Берг со своими сотрудниками в США создали первую рекомбинантную молекулу ДНК.

Для этого периода характерны разработка интенсивных процессов (вместо экстенсивных) на основе направленных фундаментальных исследований (с продуцентами антибиотиков, ферментов, аминокислот, витаминов); получение суперпродуцентов; создание продуцентов, несущих в себе бессмысленную генетическую информацию (например, генов интерферона человека в клетках *Pseudomonas aeruginosa*); создание необычных организмов, ранее не существовавших в природе (например, создание неклбеньковых организмов, несущих гены азотобактерий, ответственных за способность фиксировать молекулярный азот из воздуха); разработка и

внедрение экологически чистых и по возможности безотходных технологий; разработка и внедрение в практику специальной аппаратуры блочного (сменного) типа для различных биотехнологических схем; автоматизация и компьютеризация биотехнологических процессов; создание экономически оптимальных производственных процессов при максимальном использовании сырья и минимальном потреблении энергии. Одним из приоритетных направлений биотехнологии становится создание более продуктивных штаммов микроорганизмов для традиционных микробиологических процессов. Интенсивно развивается новое направление в биотехнологии – иммобилизация ферментов и клеток на специальных носителях, что обеспечивает многократное их использование. Крупным международным событием стал конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития», успешно прошедший в Москве в 2002 г. и приобретший статус постоянно действующего. Итоги Международных конгрессов по проблемам биотехнологии показали явный прогресс в развитии этой науки, которая все больше приобретает отраслевое значение.

В настоящее время биотехнология представляет собой биоиндустрию, которая включает в себя, с одной стороны, отрасли, в которых биотехнологические методы могут с успехом заменить широко используемые традиционные методы (в области химической промышленности относятся синтез искусственных приправ, полимеров и сырья для текстильной промышленности, в области энергетики – получение метанола, биогаза и водорода, в области биометаллургии – извлечение некоторых металлов из бедных руд), а с другой – отрасли, в которых биотехнология играет ведущую роль (производство продовольствия (широкомасштабное выращивание дрожжей, водорослей и бактерий для получения белков, аминокислот, витаминов и ферментов); увеличение продуктивности сельского хозяйства (клонирование и селекцию сортов растений, исходя из тканевых и клеточных культур, производство биопестицидов и биоинсектицидов); фармацевтическую промышленность (разработку вакцин, синтез гормонов, интерферонов и антибиотиков); защиту окружающей среды и уменьшение ее загрязнения (очистку сточных вод, переработку хозяйственных отходов, изготовление компоста, производство соединений, поддающихся расщеплению микроорганизмами).

Биотехнология как современная отрасль высоких технологий, основой которой является биология, биологические процессы с живыми организмами развивается по различным самостоятельным научным направлениям: сельскохозяйственная, фармацевтическая, промышленная, экологическая, молекулярная биотехнология, иммунобиотехнология и др. В современной биотехнологии в соответствии со спецификой сфер ее применения, можно выделить такие разделы, как промышленная микробиология, инженерная энзимология, клеточная и генная инженерия, технологическая биоэнергетика, биогеотехнология металлов, сельскохозяйственная биотехнология, экологическая биотехнология.

*Тема 1*  
**БИООБЪЕКТ КАК СРЕДСТВО ПРОИЗВОДСТВА  
ЛЕКАРСТВЕННЫХ, ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ И  
ДИАГНОСТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ**

**Цель занятия:** ознакомиться с биологическими объектами, используемыми для производства лекарственных, профилактических и диагностических средств.

**Время, отводимое на изучение темы:** 4 часа.

### ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Основу биологического производства составляют биологические объекты и технологические процессы, осуществляемые на биотехнологическом оборудовании.

Биологический объект является средством производства лекарственных субстанций и диагностических компонентов тест-систем.

Биообъектом в процессах биосинтеза лекарственных субстанций является продуцент целевого продукта, а в процессах биокатализа или биотрансформации – промышленный фермент-биокатализатор, находящийся в свободном состоянии или иммобилизованный на носителе.

Биообъекты как средство производства лекарственных, профилактических и диагностических средств можно разделить на 4 группы:

- биообъекты животного происхождения (млекопитающие, птицы, рептилии, рыбы, насекомые, паукообразные, морские позвоночные) – культуры тканей человека и др. млекопитающих;
- биообъекты растительного происхождения (дикорастущие и плантационные растения, водоросли) – культуры растительных тканей;
- биообъекты-микроорганизмы (эукариоты – простейшие, грибы, дрожжи; прокариоты – актиномицеты, эубактерии; акариоты – вирусы);
- биообъекты-макромолекулы с ферментативной активностью (промышленные катализаторы на основе индивидуальных ферментов и мультиферментных комплексов).

Для производства антибиотиков в качестве биообъектов используют различные виды грибов *Penicillium*, *Streptomyces*, *Actinomyces*; для производства ферментов – различные виды грибов *Penicillium* и *Aspergillus*, штаммы *Bacillus*; для производства витаминов – пропионовокислые и уксуснокислые бактерии; для производства аминокислот – иммобилизованные клетки кишечной палочки и сахаромицетов, коринебактерии; пробиотики получают на основе биомассы клеток нормальной и транзиторной микрофлоры желудочно-кишечного тракта.

Выбор этих объектов обусловлен следующими моментами:

- клетки вырабатывают в процессе жизнедеятельности разнообразные ценные продукты (белки, жиры, углеводы, витамины, нуклеиновые кислоты, аминокислоты, антибиотики, гормоны, антитела, антигены, ферменты, спирты и пр.), многие из которых пока недоступны для получения «не биотехнологическими» способами из-за дефицитности или высокой стоимости сырья или сложности технологических процессов;

- клетки чрезвычайно быстро воспроизводятся (бактериальная клетка делится через каждые 20-60 минут, дрожжевая – через каждые 1,5-2 часа, животная – через 24 часа), что позволяет за относительно короткое время искусственно нарастить на сравнительно дешевых и недефицитных питательных средах в промышленных масштабах огромные количества биомассы микробных, животных или растительных клеток, в процессе жизнедеятельности которых при их выращивании в среду поступает большое количество ценных продуктов, а сами клетки представляют собой «кладовые» этих продуктов;

- биосинтез сложных веществ, таких как белки, антибиотики, антигены, антитела и др. значительно экономичнее и технологически доступнее, чем химический синтез, а исходное сырье для биосинтеза, как правило, проще и доступнее, чем сырье для других видов синтеза (для биосинтеза используют отходы сельскохозяйственной, рыбной продукции, пищевой промышленности, растительное сырье);

- возможность проведения биотехнологического процесса в промышленных масштабах, т.е. наличие соответствующего технологического оборудования, доступность сырья, технологии переработки и т.д.

На каждой стадии биологического синтеза клетки можно определить те продукты, которые могут быть использованы в биотехнологии.

Обычно продукты микроскопических организмов делят на 4 категории:

*а)* сами клетки как источник целевого продукта (выращенные бактерии или вирусы используют для получения живой или инактивированной корпускулярной вакцины; дрожжи, как кормовой белок или основу для получения гидролизатов питательных сред и т.д.);

*б)* крупные молекулы, которые синтезируются клетками в процессе выращивания (ферменты, антигены, антитела, пептидогликаны и др.);

*в)* первичные метаболиты – низкомолекулярные вещества, необходимые для роста клеток (аминокислоты, нуклеотиды, витамины, органические кислоты);

*г)* вторичные метаболиты (идиолиты) – низкомолекулярные соединения, не требующиеся для роста клеток (антибиотики, алкалоиды, токсины, гормоны).

Биотехнология использует эту продукцию клеток как сырье, которое в результате технологической обработки превращается в конечный, пригодный для использования продукт.

В качестве биологических объектов или систем в биотехнологическом производстве используются, прежде всего, одноклеточные микроорганизмы, а также животные и растительные клетки. Выбор биологической системы зависит от целей биотехнологического процесса.

При выборе объекта основная задача биотехнолога – отбор более продуктивных объектов с качествами, повышающими возможность их использования в промышленном производстве.

Главный критерий при отборе продуцентов – способность синтезировать целевой продукт.

К наиболее важным качествам с точки зрения технологии производства относятся:

- высокая скорость роста;
- устойчивость к инфекции;
- рост на менее дефицитных средах;
- большее соответствие требованиям промышленной гигиены.

Все это позволяет значительно снизить затраты на производство целевого продукта. Чтобы с максимальной продуктивностью использовать биообъект в процессе, необходимо знать и учитывать его структурно-функциональные особенности применительно к конкретным условиям производства.

Продукты микробного синтеза для того, чтобы стать объектом рентабельного промышленного производства, должны выделяться микробной клеткой в питательную среду и накапливаться в среде в количествах, которые оправдывали бы сырьевые и энергетические затраты на культивирование микроорганизма и выделение продукта в необходимой для дальнейшего использования форме.

В большинстве случаев выбор микробиологического способа получения того или иного вещества обусловлен полным отсутствием или весьма ограниченной возможностью получения его другими способами, в первую очередь путем химического синтеза.

Многие антибиотики, ферменты, биологически активные изомеры ряда аминокислот, пуриновые нуклеотиды, токсины, факторы роста растений в настоящее время возможно или, по крайней мере, гораздо проще получать с помощью микроорганизмов из доступного и дешевого сырья, чем осуществлять сложный, многоступенчатый химический синтез, или даже 1-2 этапа ферментативного синтеза, но на основе сложного и часто малодоступного сырья.

Однако природные штаммы микроорганизмов, как правило, не обладают способностью выделять и накапливать в питательной среде (т.е. продуцировать) такое количество нужного продукта, которое обеспечило бы достаточно низкую его стоимость и требуемый объем производства.

Природные штаммы некоторых групп микроорганизмов (несовершенные грибы, актиномицеты, бациллы) способны выделять в окружающую среду сравнительно небольшие количества антибиотиков, токсинов или гидролитических ферментов.

Первичные метаболиты, как правило, микроорганизмами не выделяются в значительном количестве (синтезируемое количество этих веществ строго ограничено и рассчитано на потребности самой клетки). Исключение из этого правила – выделение глутаминовой кислоты природными штаммами (так называемой группы глутаматпродуцирующих коринебактерий) – не распространяется на подавляющее большинство других аминокислот.

В связи с этим задача селекционера – не только усиление природной способности микроорганизма продуцировать определенное вещество (антибиотик, фермент, токсин и др.), но во многих случаях и создание продуцента «заново» из штамма дикого типа, способного синтезировать вещество (например, аминокислоту), но не способного его продуцировать.

Генетическая программа клетки может быть изменена следующими методами:

- селекцией на основе спонтанных мутаций;
- индуцированным мутагенезом с селекцией на каждом этапе мутаций;
- клеточной инженерией на основе гибридизации соматических клеток и культивирования изолированных культур тканей и клеток растений и животных;
- генной инженерией на основе технологии рекомбинантных ДНК.

Традиционными методами (селекцией и мутагенезом) можно совершенствовать:

- способность роста продуцента на дешевой среде;
- устойчивость культуры к болезням;
- способность не снижать биосинтез при несовершенном технологическом оборудовании;
- устранение неприятного запаха при синтезе антибиотиков.

## ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

### Задание 1

#### Изучить отличительные особенности клеток прокариот и эукариот

В настоящее время основным объектом биотехнологии являются прокариоты.

**Прокариоты** (доядерные) – одноклеточные живые организмы, не обладающие (в отличие от эукариот) оформленным клеточным ядром и дру-

гими внутренними мембранными органоидами (за исключением плоских цистерн у фотосинтезирующих видов, например, у цианобактерий).

К прокариотам относятся бактерии, в том числе цианобактерии (сине-зеленые водоросли), и археи.

Потомками прокариотических клеток являются органеллы эукариотических клеток – митохондрии и пластиды.

Отличительные особенности прокариот:

- не имеют заключенного в мембрану ядра;
- генетический аппарат клеток представлен двойной замкнутой нитью ДНК, не отделенной мембраной от цитоплазмы;
- гистоны и митотический аппарат отсутствуют, нет интронов;
- отсутствуют органеллы, свойственные эукариотам (хлоропласты, митохондрии);
- имеют относительно небольшие размеры (от 0,5 до 3 мкм) и простое строение (могут иметь сферическую, палочкообразную или спиральную форму);
- обычно существуют изолированно, вне связи с другими клетками;
- клетка окружена жесткой стенкой толщиной около  $200\text{\AA}$ , непосредственно под стенкой располагается клеточная мембрана, толщиной около  $70\text{\AA}$ , внутри клетки имеются нуклеотиды, рибосомы (центры белкового синтеза), цитоплазма, резервные гранулы.

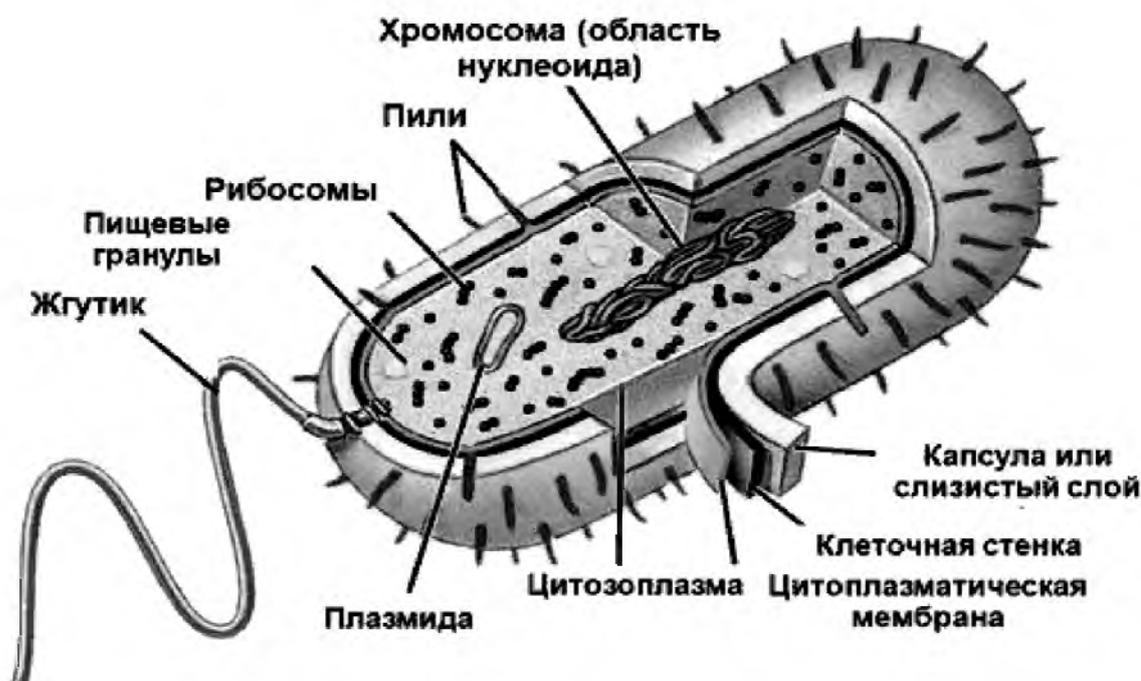


Рисунок 1.1 – Строение типичной клетки прокариот ([ppt-online.org](http://ppt-online.org))

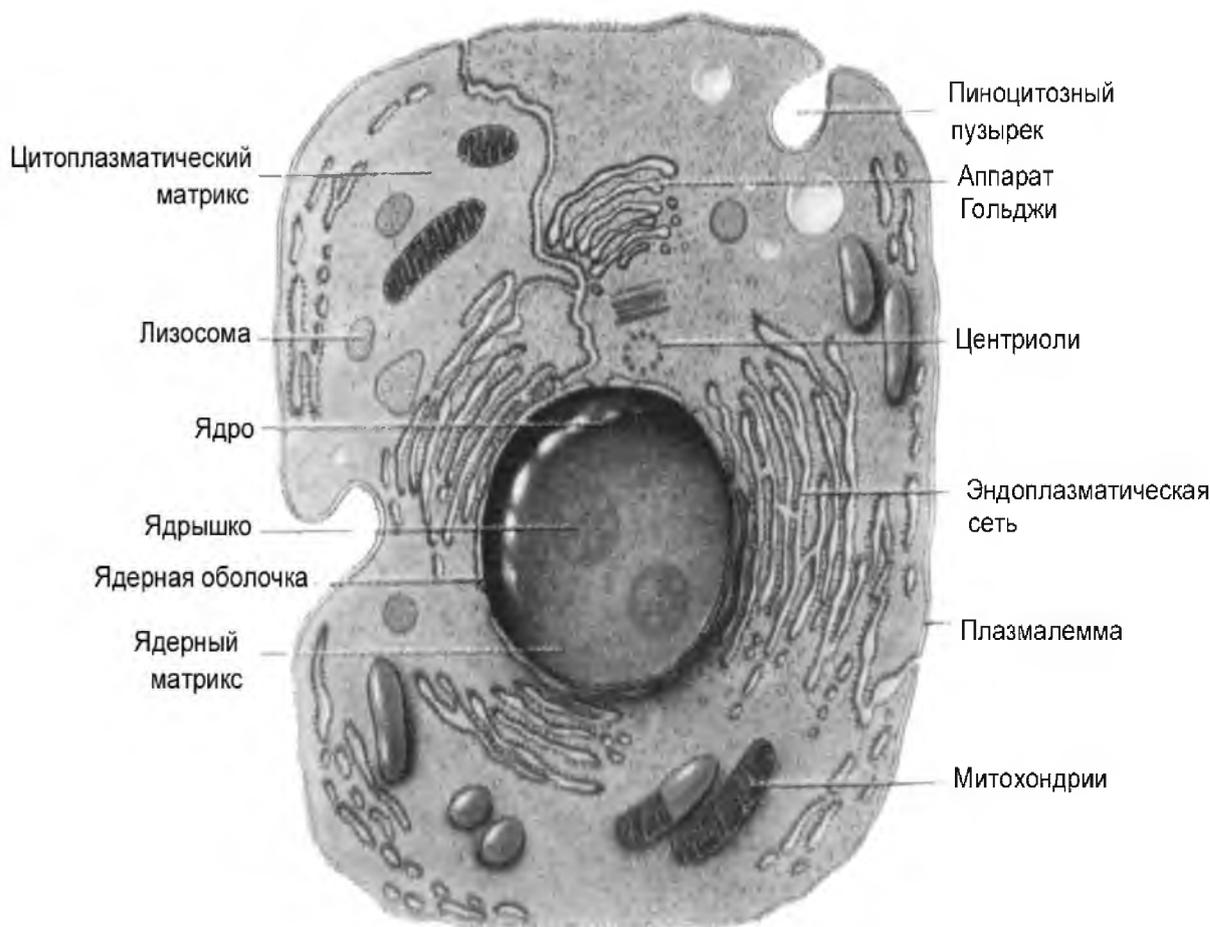
**Эукариоты** (ядерные) – живые организмы, клетки которых содержат ядро и мембранные органеллы.

Генетический материал у эукариот находится в ядре, а ДНК организовано в хромосомы. Эукариотические организмы могут быть одноклеточными и многоклеточными.

К эукариотам относятся животные, растения, грибы и простейшие.

Отличительные особенности эукариот:

- обладают отграниченными мембраной клеточными органеллами – митохондриями, хлоропластами и др.;
- как правило, эукариотическая клетка по объему в 1000-10000 раз больше прокариотической;
- отличаются большим разнообразием форм, что необходимо для обеспечения различных специализированных функций;
- в составе высших организмов эти клетки сосуществуют и взаимодействуют друг с другом различными путями и поэтому не нуждаются в биохимической гибкости и приспособляемости, столь необходимой для прокариот.



**Рисунок 1.2 – Строение клетки эукариот ([public.edu.asu.ru](http://public.edu.asu.ru))**

## Задание 2

### Изучить методы селекционной работы и направленного получения микроорганизмов-суперпродуцентов целевых продуктов

#### Методы селекционной работы

1. *Ступенчатый отбор спонтанных мутаций* – ступенчатый отбор на каждом этапе культивирования наиболее эффективного клона.

Спонтанные (неконтролируемые) мутации возникают с низкой частотой, т.к. вероятность ошибки в процессе репликации (самовоспроизведения ДНК) составляет  $10^{-9}$ .

Основной недостаток метода – низкая эффективность и длительность процесса.

2. *Ступенчатый отбор на основе индуцированного мутагенеза* – резкое увеличение частоты мутаций биообъекта при искусственном повреждении генома в результате воздействия мутагена.

Под мутагенами понимают ряд факторов физической, химической и биологической природы, вызывающие изменения первичной структуры ДНК.

Эффективность мутагена определяется дозой, продолжительностью воздействия, особенностями организма.

3. *Отбор продуцентов по их устойчивости к структурным аналогам целевого продукта.* Метод основан на регуляции ферментов в клетке по принципу обратной связи конечным продуктом биосинтетического пути и базируется на достижениях молекулярной генетики.

#### Направленное получение микроорганизмов-суперпродуцентов целевых продуктов

Задачи направленного получения микроорганизмов-суперпродуцентов осуществляются получением у природных штаммов наследственных изменений – мутаций, приводящих к усилению природной способности микроорганизмов синтезировать и продуцировать определенное вещество, а также появлению новой способности – синтезировать вещество в избытке – сверх своих потребностей и продуцировать его.

Дальнейшее повышение уровня продукции того или иного вещества у микроорганизма является постоянной целью работы селекционеров, т.к. наиболее эффективный способ интенсификации микробиологического производства, не требующий дополнительных капиталовложений, заключается в использовании более продуктивного штамма.

Синтез микроорганизмами первичных или вторичных метаболитов можно представить себе как процесс, начинающийся с поглощения клеткой субстрата (источников углерода и азота, микроэлементов и т.д.) и проходящий затем ряд этапов, катализируемых различными ферментами, часть которых участвует в регуляции синтеза нужного вещества или его предшественников.

На отдельных этапах промежуточные вещества могут служить предшественниками других метаболитов и расходоваться на их синтез. Предшественники определенного вещества могут быть промежуточными или конечными продуктами других путей синтеза, иметь собственную регуляцию и расходоваться на другие потребности клетки.

Кроме того, продуцируемое вещество должно преодолевать барьер проницаемости и накапливаться в среде культивирования, не подвергаясь деградации под действием ферментов, которые может синтезировать микробная клетка.

Теоретически мутации, способствующие сверхсинтезу продукта, могут затрагивать большое число структурных генов, кодирующих ферменты всех этапов синтеза, транспорта и катаболизма данного продукта, а также регуляторные гены. Результат таких мутаций может проявиться в различных изменениях метаболизма клетки:

- повышение скорости поглощения и утилизации субстрата клеткой;
- повышение уровня синтеза биосинтетических ферментов или их активности за счет нарушения негативного контроля синтеза и активности регуляторных ферментов в пути синтеза продукта или его предшественников;
- блокирование побочных реакций синтеза для снижения расхода общих предшественников на синтез других метаболитов;
- блокирование дальнейшего внутриклеточного превращения продукта, если оно происходит;
- обеспечение эффективной экскреции продукта из клетки;
- блокирование деградации продукта;
- усиление позитивных форм регуляции синтеза продукта.

Если желаемым продуктом является выделяемый клеткой фермент (чаще всего это гидролитические ферменты, хотя в последнее время большой интерес проявляется и к ряду оксидоредуктаз, в частности, участвующих в катаболизме аминокислот), то мутации, способствующие усилению его образования и активности, а также накоплению в среде, могут затрагивать:

- структурный ген, приводя к синтезу мутантного фермента, не чувствительного к ингибированию конечным продуктом реакции, и (или) повышая его активность (число оборотов, т.е. число молей превращаемого субстрата в минуту); мутация в промоторной части гена должна усилить частоту инициации транскрипции или вызвать синтез фермента;
- гены, кодирующие белки, участвующие в регуляции синтеза данного фермента (в частности, по типу катаболитной репрессии, имеющей разнообразные формы проявления и в общем виде выражающейся в обратной зависимости синтеза катаболит-

чувствительного фермента от скорости роста клеток), мутации в этих генах должны устранить или ослабить факторы, ограничивающие синтез фермента;

- гены, кодирующие ферменты, которые могут гидролизовать и инактивировать нужный фермент, мутации должны уменьшить или устранить такую возможность;

- гены, ответственные за синтез компонентов клеточных мембран, которые участвуют в «сборке» (у эукариотов) и экскреции ферментов, мутации в этих генах могут повысить эффективность указанных процессов.

Чаще всего требуется сочетание нескольких мутаций, среди которых могут быть «главные» и «вспомогательные». Последние необходимы для проявления или наибольшего выражения первых.

Вместе с тем возможно и отсутствие значительного уровня продукции даже в случае, когда большинство из теоретически необходимых для этого мутаций получено у микроорганизма и, наоборот, селекционер может быть избавлен от необходимости получать множество разных мутаций, если он удачно выбрал исходный природный тип микроорганизмов.

Разнообразие природных форм позволяет выбрать микроорганизм, который имеет меньшее число ограничений для сверхсинтеза какого-то вещества, хотя при этом и не продуцирует его.

В ряде случаев природные штаммы с менее сложными системами ограничений сверхсинтеза выделяют в среду некоторое количество первичного метаболита.

Такие микроорганизмы становятся объектами селекции на повышение уровня продукции выделяемого вещества.

Пригодность микроорганизма (не выделяющего нужное вещество, обычно первичный метаболит, но привлекающего исследователя какими-то свойствами) для использования в качестве объекта селекции на получение продуцента этого вещества можно проверить, введя ему одну или несколько определенных, легко тестируемых мутаций, которые теоретически должны вызвать сверхсинтез данного вещества и, может быть, уже были «апробированы» на другом микроорганизме.

Это самый надежный способ выбора исходного штамма, даже если для этого вида микроорганизма нет данных о регуляции синтеза желаемого вещества.

Для продуцентов вторичных метаболитов, а также ферментов или полисахаридов выбор исходного штамма предпринят способностью природного микроорганизма продуцировать какое-то количество нужного вещества.

В тех случаях, когда одно и то же вещество выделяют природные штаммы, относящиеся к разным таксономическим группам (например, грибы и бациллы), это может позволить выбрать более «технологичный» для будущего производства или более поддающийся селекции штамм.

Таким образом, селекционер чаще всего не свободен в выборе исходного для селекции штамма и не может считать критерием такого выбора генетическую изученность микробного объекта и возможность применения к нему разнообразных генетических методов.

Природные свойства штаммов, определяющие этот выбор, безусловно, облегчают и ускоряют селекционную работу. Однако отсутствие у многих промышленных микроорганизмов систем обмена информацией не позволяет ни изучить генетический контроль синтеза продуцируемого вещества, ни облегчить насыщение генома продуцента необходимыми для сверхсинтеза мутациями.

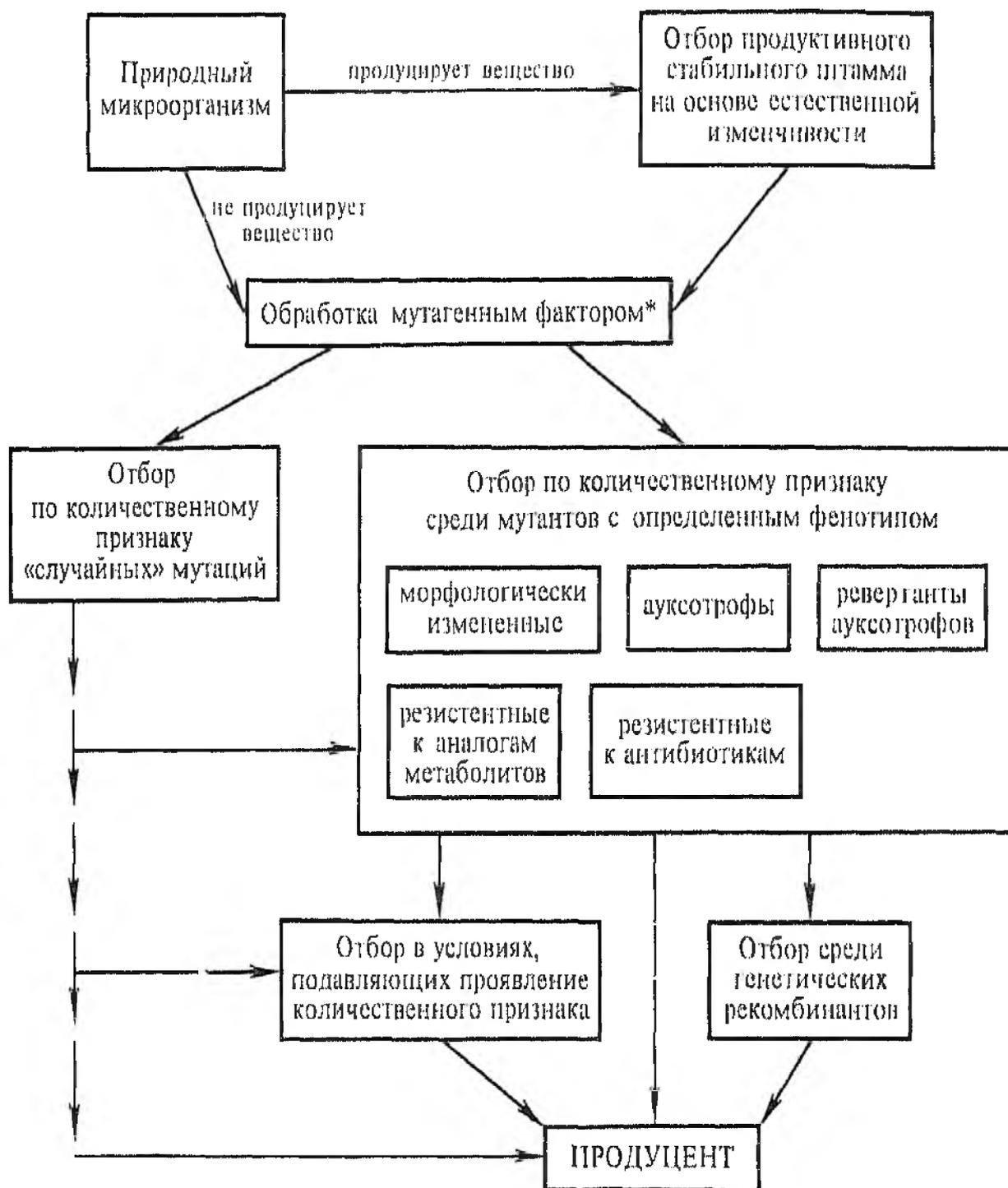
У микроорганизма, выделяющего продукт и взятого в качестве объекта селекции, необходимо изучить естественную изменчивость по морфологическим признакам и по количественному признаку – уровню продукции желаемого вещества.

После посева исходного штамма на чашки Петри среди не менее 100 (а лучше нескольких сотен) колоний выявляют типичную для данной культуры морфологическую форму и отклонения от нее.

Затем изолированные на косяки колонии (клоны) как типичной формы (не менее 100 клонов), так и доступное число ее морфологических вариантов (убедившись предварительно, что эти варианты сохраняют свои особенности при пересевах) оценивают после соответствующего способа культивирования по уровню продукции вещества, применяя надежный аналитический метод. Такая оценка позволяет выявить вполне возможную корреляцию между способностью продуцировать данное вещество и морфологией колоний.

Несколько клонов с наиболее высоким уровнем продукции по отношению к уровню контроля, которым является исходная (не рассевавшаяся) культура, отбирают и проверяют на продукцию в нескольких повторных опытах, а затем отбирают 1 клон, характеризующийся высоким и воспроизводимым уровнем.

Такая процедура, которую иногда называют «чисткой» исходной культуры, довольно часто приводит к отбору клона с заметно повышенной продукцией, а в некоторых случаях – и с отклонением от типичной морфологии.



Примечание: \* Обработка мутагеном может предшествовать всем этапам отбора

**Рисунок 1.3 – Схема селекционной работы с микроорганизмами-продуцентами биологически-активных веществ (Егоров Н.С., 1989)**

**Задание 3**  
**Изучить микроорганизмы, используемые для**  
**промышленного биосинтеза**

Продуцент (род)	Целевые продукты
<i>Бактерии</i>	
<i>Acetobacter</i>	органические кислоты, полисахариды
<i>Acinetobacter</i>	полисахариды
<i>Aerobacter</i>	спирты
<i>Agrobacterium</i>	полисахариды
<i>Alcaligenes</i>	полисахариды
<i>Arthrobacter</i>	аминокислоты
<i>Azotobacter</i>	полисахариды
<i>Bacillus</i>	аминокислоты, спирты, витамины, антибиотики, пробиотики, ферменты
<i>Bifidobacterium</i>	пробиотики
<i>Brevibacterium</i>	аминокислоты, витамины
<i>Clostridium</i>	полисахариды, спирты, органические кислоты, аминокислоты
<i>Corynebacterium</i>	аминокислоты
<i>Dunaliella</i>	спирты
<i>Enterococcus</i>	пробиотики
<i>Escherichia</i>	аминокислоты, антибиотики, пробиотики, ферменты
<i>Gluconobacter</i>	органические кислоты
<i>Klebsiella</i>	ферменты
<i>Lactobacillus</i>	органические кислоты, пробиотики
<i>Lactococcus</i>	пробиотики
<i>Leuconostoc</i>	полисахариды
<i>Metanobacterium</i>	витамины
<i>Methanococcus</i>	витамины
<i>Methanosarcina</i>	витамины
<i>Micrococcus</i>	витамины, аминокислоты
<i>Propionibacterium</i>	органические кислоты, витамины, пробиотики
<i>Pseudomonas</i>	органические кислоты, полисахариды
<i>Serratia</i>	аминокислоты
<i>Streptobacterium</i>	полисахариды
<i>Streptococcus</i>	антибиотики, пробиотики
<i>Thermoanaerobacter</i>	спирты, органические кислоты
<i>Xanthomonas</i>	полисахариды
<i>Zygomonas</i>	спирты, полисахариды, органические кислоты

Продуцент (род)	Целевые продукты
<i>Актиномицеты</i>	
<i>Actinoplanes</i>	ферменты
<i>Micromonospora</i>	антибиотики
<i>Saccharopolyspora</i>	антибиотики
<i>Streptomyces</i>	антибиотики
<i>Дрожжевые грибы (дрожжи)</i>	
<i>Candida</i>	органические кислоты, аминокислоты, витамины, ферменты
<i>Kluyveromyces</i>	спирты
<i>Saccharomyces</i>	спирты, витамины, полисахариды, пробиотики, ферменты
<i>Schizosaccharomyces</i>	спирты
<i>Плесневые грибы (микровицеты)</i>	
<i>Ashbya</i>	витамины
<i>Aspergillus</i>	органические кислоты, витамины, ферменты
<i>Aureobasidium</i>	полисахариды
<i>Blakslea</i>	витамины
<i>Cephalosporium</i>	антибиотики
<i>Eremothecium</i>	витамины
<i>Fusidium</i>	антибиотики
<i>Mucor</i>	антибиотики, спирты, ферменты
<i>Penicillium</i>	антибиотики, ферменты
<i>Rhizopus</i>	органические кислоты, ферменты
<i>Schizophyllum</i>	полисахариды
<i>Trichoderma</i>	антибиотики, ферменты
<i>Yarrowia</i>	ферменты

### Контрольные вопросы

1. Какие группы биообъектов используются в биотехнологии как средство производства лекарственных, профилактических и диагностических средств?
2. Какие принципы лежат в основе выбора биологических систем для биотехнологического производства?
3. Какие отличительные признаки характерны для клеток прокариот и эукариот?
4. Какие существуют методы совершенствования биообъектов?
5. В чем заключаются методы селекционной работы с микроорганизмами-продуцентами целевых продуктов?
6. На чем основано направленное получение микроорганизмов-суперпродуцентов целевых продуктов?

## *Тема 2*

### **СЫРЬЕВАЯ БАЗА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА**

**Цель занятия:** ознакомиться с основными источниками сырья, используемого в биотехнологическом производстве.

**Время, отводимое на изучение темы:** 4 часа.

#### **ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ**

В микробиологической промышленности основная доля сырья (более 90%) идет на производство этанола. Производство хлебопекарных дрожжей требует 5% расходуемого в микробиологической промышленности сырья, антибиотиков – 1,7%, органических кислот и аминокислот – 1,65%.

С точки зрения экономики, сырье в биотехнологических производствах (особенно в крупнотоннажных) занимает первое место в статьях расходов и составляет до 40-65% общей стоимости продукции. При тонком биосинтезе доля сырья в общей себестоимости продукции уменьшается.

Питательный субстрат (питательная среда) является сложной 3-фазной системой, содержащей жидкие, твердые и газообразные компоненты. Большинство ферментов расположено на поверхности клетки, часть выделяется в окружающую среду. Кроме того, значительная часть продуктов биосинтеза после экскреции из клеток накапливается в среде. Некоторые промежуточные метаболиты служат резервным питательным фондом, которым клетка пользуется после истощения основных источников питания.

Существует тесное взаимодействие между культивируемым биообъектом и физико-химическими факторами среды. С одной стороны, эти факторы (рН, еН, рО<sub>2</sub>, осмотическое давление и др.) контролируют рост клеток и биохимическую активность продуцентов. С другой стороны, химический состав и физико-химические свойства среды постоянно меняются в результате жизнедеятельности клеток. Эти обстоятельства заставляют рассматривать ферментируемый субстрат как составную часть внутренней среды клетки. Во время ферментации формируется совокупность субстрата и биообъекта. В принципе, микроорганизмы способны ассимилировать любое органическое соединение, поэтому потенциальными ресурсами для микробиологической технологии могут служить различные запасы органических веществ, включая первичные и вторичные продукты фотосинтеза, а также запасы органических веществ в недрах Земли.

Как правило, каждый конкретный вид микроорганизмов, используемый в биотехнологии, весьма избирателен к питательным веществам, и органическое сырье (кроме лактозы, сахарозы и крахмала) без предварительной химической обработки малоприспособлено для микробного синтеза. Тем не менее, целлюлозосодержащее сырье после химического или ферментативного гидролиза и очистки от ингибирующих или балластных примесей (фенол, фурфурол, оксиметилфурфурол и др.) может быть ис-

пользовано в биотехнологическом производстве. Каменный уголь, природный газ и древесина могут служить сырьем для химического синтеза технических спиртов или уксусной кислоты, а последние, в свою очередь, являются сырьем для микробиологической промышленности.

Из органического сырья наиболее часто в биотехнологии используется крахмал, хотя для его ассимиляции микроорганизмами требуется сложный комплекс амилалитических ферментов, которыми владеют только некоторые виды микроорганизмов (например, грибы рода *Aspergillus*, бактерии *Bac. subtilis* и др.). Много крахмала расходуется для производства этанола, а также для изготовления фруктозных сиропов.

При выборе сырья учитывают не только физиологические потребности выбранного продуцента, но и стоимость сырья.

**Источники углерода.** Углеродосодержащее сырье является основным сырьем микробного синтеза. При катаболизме большое значение имеют строение углеродного скелета молекул (прямой, разветвленный или циклический) и степень окисления углеродных атомов. Легкодоступными считаются сахара, особенно гексозы, многоатомные спирты (глицерин, маинит и др.) и карбоновые кислоты.

До недавнего времени существовало мнение, что органические кислоты малодоступны для большинства микроорганизмов, однако на практике довольно часто встречаются микроорганизмы, успешно утилизирующие органические кислоты, особенно в анаэробных условиях. К перспективным видам микробиологического сырья можно отнести низкомолекулярные спирты (метанол, этанол), т.к. их ресурсы существенно увеличиваются благодаря успешному развитию технологии химического синтеза. Многие дрожжи родов *Candida*, *Hansenula*, *Rhodospiridium*, *Endomycopsis* и др. способны ассимилировать этанол. Дрожжи родов *Pichia*, *Candida*, *Torulopsis* и др., бактерии из родов *Methylomonas*, *Protaminobacter*, *Flavobacterium* и др., используют в качестве единственного источника углерода метанол и образуют биомассу с высоким содержанием белков (60-70%).

Разные виды микроорганизмов способны использовать в качестве единственного источника углерода и энергии n-алканы и некоторые фракции нефти. Отличительной особенностью углеводов, по сравнению с другими видами микробиологического сырья, является низкая растворимость в воде. Этим объясняется тот факт, что только некоторые виды микроорганизмов в природе способны ассимилировать углеводороды.

В настоящее время ценным сырьем для микробиологической промышленности признаны многие виды побочной продукции (например, высокомолекулярные парафины, кукурузный экстракт, смесь карбоновых кислот (янтарной, кетоглутаровой, адипиновой и др.), сульфитный щелок, зерновая и картофельная барда, меласса, соапсток, гидрол и др.).

В асептических производствах (аминокислот, антибиотиков) распространенным компонентом питательных сред является отход свеклосахарного производства – *меласса*, которая представляет собой сиропообразную жидкость темно-коричневого цвета, содержащую 70-85% сухих веществ (в

том числе 45-50% сахарозы, 50-120 мг/т витамина В<sub>7</sub>). В мелассе содержатся аминокислоты, органические кислоты, макро- и микроэлементы. Состав мелассы непостоянен. Качество ее зависит от ряда факторов: климатических условий вегетации свеклы, времени уборки и условий хранения корнеплодов, технологии производства сахара, условий хранения мелассы и др. При длительном хранении мелассы ее качество ухудшается: развиваются микроорганизмы, расщепляются углеводные и белковые компоненты, протекают сахароаминные реакции, повышается температура в хранилище (до +70...+90°C), возрастает кислотность, в объеме мелассы скапливаются выделяющиеся газы (СО<sub>2</sub>, Н<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub> и др.), возникает угроза газового выхлопа.

При культивировании ауксотрофных мутантных штаммов, дефицитных по аминокислотам, необходимым компонентом питательной среды является *кукурузный экстракт*, представляющий собой сиропообразную жидкость коричневого цвета, которую получают в крахмало-паточном производстве в результате гидротермической обработки кукурузного зерна при температуре +50°C в течение 40-50 часов. Полученные замочные воды упаривают до содержания сухих веществ 40-50%. Кукурузный экстракт стабилен при хранении, широко применяется в микробиологическом синтезе. Он является источником азотистых веществ (40-50% от СВ), причем более половины из них представлены аминокислотами, а также содержит белки, витамины (биотин), углеводы, макро- и микроэлементы. Аналогом кукурузного экстракта может выступать *дрожжевой экстракт*, а также гидролизат кормовых или пищевых дрожжей. В составе питательных сред в качестве источника углеводов часто используется *кукурузная мука*, содержащая 65-75% крахмала, до 10% других углеводов (клетчатка, пентозаны), 10-12% белка, до 4% жира, 0,8-1% минеральных веществ. Соевая мука входит в состав питательных сред как источник азотистых веществ – белков (до 30% от СВ).

*Пшеничные отруби* – отход мукомольного производства – являются полноценным сырьем и могут входить в состав питательной среды единственным компонентом. Они широко используются в питательных средах для производства ферментных препаратов, а также как наполнитель в различных биопрепаратах кормового назначения. Основными компонентами пшеничных отрубей являются крахмал (16-20%), клетчатка (12-15%), белок (10-12%).

**Источники минерального питания. Азот.** Бактериальные клетки содержат до 12% азота (в пересчете на сухую биомассу), мицелиальные грибы – до 10%. Микроорганизмы могут использовать как органические, так и неорганические источники азота. Бактерии более требовательны к источникам азота, чем большинство микромицетов, актиномицетов и дрожжей. У клеток животных и растений особые требования к источникам азота. Продуктивность биомассы (в зависимости от источника азота) не всегда совпадает с продуктивностью целевого метаболита и зависит также от условий культивирования. При выращивании биомассы в концентрации

30-40 г/л потребность в добавках азотосодержащих солей обычно не превышает 0,3-0,4% от объема среды. В периодических режимах культивирования потребление азота заканчивается в первые 6-12 часов роста (в первой половине экспоненциальной фазы). При направленном биосинтезе азотосодержащих метаболитов потребность в азоте существенно возрастает.

Большинство дрожжей хорошо усваивает аммиачные соли (сульфат аммония, фосфат аммония), а также аммиак из водного раствора. Соли азотной кислоты не всегда хорошо усваиваются. Только некоторые виды дрожжей испытывают потребность в нитратах. Часто источником азота в состав сред включают мочевины. При направленном биосинтезе (например, целлюлозолитических ферментов грибом *Peniophora gigantea*) наивысшая биохимическая активность клеток наблюдается на средах с органическим азотом (аспарагин, пептон и др.).

*Фосфор* входит в состав нуклеиновых кислот, фосфолипидов и других важных компонентов клетки. Иногда фосфор накапливается в ней в виде полифосфатов. Небольшая часть усвоенного фосфора существует в форме макроэргических соединений (АТФ). Повышенная потребность микроорганизмов в микроэлементах возникает, если целевой метаболит содержит микроэлемент. Так, при биосинтезе витамина В<sub>12</sub> в состав питательной среды включают кобальт; молибден и бор стимулируют биосинтез тиамина в клетках клубеньковых бактерий; медь присутствует в ряде ферментов переносящих электроны от субстрата к кислороду. Распределение электрических зарядов на поверхности клеток зависит от минерального состава питательной среды. Обычно клетки микроорганизмов имеют отрицательный потенциал (16-20 мВ). При добавлении в среду электролитов он снижается, и тем сильнее, чем выше валентность добавляемого противоиона. Увеличение содержания К<sup>+</sup> или Na<sup>+</sup> до 500 мг/л уменьшает величину потенциала клеток до 10-12 мВ. Введение в среду 60-80 мг/л Са<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> или Cu<sup>2+</sup>, а также 5 мг/л Al<sup>3+</sup> может привести клетки в электронейтральное состояние. В отличие от бактерий дрожжи и мицелиальные грибы не перезаряжаются и не приобретают положительный потенциал. Изменение электрического потенциала клеток может изменить их физиологическую деятельность, воздействовать на селективность клеточной мембраны – вызвать флокуляцию или флотацию клеток.

**Комплексные обогатители сред.** Опыт культивирования микроорганизмов показал, что даже прототрофные микроорганизмы лучше растут в присутствии витаминов, аминокислот, цитокининов и других биологически активных веществ. С наступлением эры антибиотиков и в связи с широким применением микроорганизмов в промышленности остро встал вопрос об экономически выгодных, сбалансированных по составу питательных средах. Эффективной добавкой оказался кукурузный экстракт благодаря наличию в нем витаминов, аминокислот и минеральных элементов в легко ассимилируемых формах.

Кроме кукурузного экстракта в рецептуры сред промышленного микробного синтеза включают дрожжевой автолизат, дрожжевой экстракт,

гидролизат дрожжей, клеточный сок картофельных клубней, молочную сыворотку, экстракт пшеничных отрубей, экстракт солодовых ростков и другие продукты. Иногда добавляют мясной и рыбный пептоны. Для культивирования животных клеток используют экстракт плаценты, плазму крови животных. Для выращивания клеток растений или мицелия высших грибов применяют экстракты тыквы, листьев хлопчатника, отвар слив и др.

## ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

### Задание 1

#### Изучить характеристику источников углерода, применяемых для микробного синтеза

В производственной практике в качестве источника углерода чаще всего используют углеводы (прежде всего сахарозу, крахмал), а также органические кислоты (уксусная кислота), спирты (этанол, метанол), n-парафины (фракция C<sub>11</sub>–C<sub>18</sub>).

**Таблица 2.1 – Источники углерода, применяемые для микробного синтеза**

Субстрат	Содержание основного вещества	Характеристика
Кристаллическая глюкоза	РВ 99,5% в пересчете на СВ	Содержит до 9% воды, до 0,07% зольных веществ, в том числе железа не более 0,004%
Техническая сахароза	Сахарозы не менее 99,75%	Влажность до 0,15%, зольных веществ не более 0,03%
Техническая лактоза	Лактозы не менее 92%	Влажность до 3%, зольных веществ не более 2%, молочной кислоты 1%
Гидрол	РВ не менее 70% в пересчете на СВ	Сиропообразная жидкость, РВ представлена главным образом глюкозой, зольных веществ до 7%, рН 4,0
Крахмал	СВ не менее 80%	Зольных веществ 0,35-1,2% в пересчете на СВ
Уксусная кислота	Уксусной кислоты не менее 60%	Содержит формальдегид и муравьиной кислоты до 1,0%
Спирт этиловый синтетический	Этанола не менее 92%	Содержит изопропилового спирта до 0,21% и органических кислот до 15 мг/л
Узкая фракция Жидкого парафина	n-Алканов 87-93%	Содержит ароматических углеводородов до 0,5% и серы до 0,5%

### Задание 2

#### Изучить характеристику побочных продуктов, используемых

**в микробиологической промышленности в качестве основного сырья**

**Таблица 2.2 – Побочные продукты, используемые в микробиологической промышленности в качестве основного сырья**

Наименование продукта	Характеристика	Область применения
Сульфитный щелок	СВ 4,0-4,5%, в т.ч. РВ 3,3-3,5%	Производство кормовых дрожжей
Картофельная барда	СВ 4,3-4,5%, в т.ч. РВ 2,0-2,2%	Производство кормовых дрожжей
Зерновая барда	СВ 7,3-8,1%, в т.ч. РВ 2,5-2,9%	Производство кормовых дрожжей
Гидрол	СВ 76-78%, в т.ч. сбразживаемых сахаров 50%	Производство дрожжей, антибиотиков
Солодовое сусло	СВ 15-20%, в т.ч. РВ 8-12% (мальтоза, декстрины)	Выращивание дрожжей, бактерий, микромицетов
Молочная сыворотка	СВ 6,5-7,5%, в т.ч. лактозы 4,0-4,8%, белков 0,5-1,0%, жиров 0,05-0,4%, витамины	Получение дрожжей, этанола, лактанов
Депротеинизированный сок растений	СВ 5-8%, в т.ч. РВ 0,8-2,0%, аминокислоты, витамины	Выращивание кормовых дрожжей
Депротеинизированный картофельный сок	СВ 4-5%, в т.ч. РВ 0,5-1,0%, аминокислоты, витамины	Производство хлебопекарных дрожжей, антибиотиков
Гидролизат древесных отходов	СВ 6-9%, в т.ч. РВ 3-4%, органических кислот 0,3-0,4%	Получение кормовых дрожжей
Гидролизат торфа (упаренный)	СВ 48-52% в т.ч. РВ 26-33% (галактоза, глюкоза, манноза, ксилоза, рамноза); гуминовые вещества	Получение кормовых дрожжей
Пшеничные отруби	СВ 90-92%, в т.ч. экстрактивных веществ 48-50%, крахмала 25-30%, белков 11-13%, жиров 2,5-3,0%, целлюлозы 15-17%	Производство ферментов

### Задание 3

#### Изучить функции макро- и микроэлементов микроорганизмов

Таблица 2.3 – Макро- и микроэлементы микроорганизмов и их главные функции

Элемент	Источник	Функции
<i>Макроэлементы</i>		
<i>C</i>	Органические вещества, $CO_2$	Основные компоненты клеточного материала
<i>O</i>	Органические вещества, $O_2$ , $CO_2$ , $H_2O$	
<i>H</i>	Органические вещества, $H_2$ , $H_2O$	
<i>N</i>	Органические вещества $NH_4^+$ , $NO_3^-$ , $N_2$	
<i>S</i>	Органические вещества $SO_4^{2-}$ , $HS^-$ , $S_2O_3^{2-}$ , $S^0$	Компонент цистеина, метионина, тиаминпирофосфата, кофермента А, биотина и др.
<i>P</i>	$HPO_4^{2-}$	Компонент нуклеиновых кислот, фосфолипидов, нуклеотидов и др.
<i>K</i>	$K^+$	Основной неорганический катион в клетке; кофактор некоторых ферментов
<i>Mg</i>	$Mg^{2+}$	Кофактор многих ферментов (киназ); присутствует в клеточной мембране, в эфирах фосфорной кислоты, участвует в аминокислотном обмене и тРНК
<i>Ca</i>	$Ca^{2+}$	Кофактор многих ферментов; присутствует в экзоферментах (амилаза, протеаза), важный компонент эндоспор
<i>Fe</i>	$Fe^{2+}$ , $Fe^{3+}$	Содержится в цитохромах, железопорфириновых ферментах, ферридоксинах и других железосеропротеидах; кофактор многих ферментов
<i>Микроэлементы</i>		
<i>Zn</i>	$Zn^{2+}$	Присутствует в алкогольдегидрогеназе, щелочной фосфатазе, альдолазе, РНК- и ДНК-полимеразах
<i>Mn</i>	$Mn^{2+}$	Содержится в бактериальной пероксидазе; кофактор некоторых ферментов
<i>Na</i>	$Na^+$	Участвует в мембранных процессах
<i>Cl</i>	$Cl^-$	Необходим галофильным бактериям
<i>Mo</i>	$MoO_4^{2-}$	Содержится в нитратредуктазе, нитрогеназе, формиат- и ксантиндегидрогеназах и др. ферментах

<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>
<i>Se</i>	$\text{SeO}_3^{2-}$	Содержится в глицинредуктазе, формиатдегидрогеназе
<i>Co</i>	$\text{Co}^{2+}$	Содержится в коферменте витамина В <sub>12</sub> , глутаматмутазы, и др. ферментов
<i>Cu</i>	$\text{Cu}^{2+}$	Присутствует в цитохромоксидазе, оксигеназах и др.
<i>W</i>	$\text{WO}_4^{2-}$	Содержится в некоторых формиатдегидрогеназах
<i>Ni</i>	$\text{Ni}^{2+}$	Присутствует в уреазе; требуется для автотрофного роста водородных бактерий

### Контрольные вопросы

1. Какие источники углерода, применяются для микробного синтеза? Чем они характеризуются?
2. Какие побочные продукты используются в микробиологической промышленности в качестве основного сырья? Чем они характеризуются?
3. Какие макроэлементы необходимы для микроорганизмов? Какую функцию они выполняют?
4. Какие микроэлементы необходимы для микроорганизмов? Какую функцию они выполняют?
5. Какие вещества входят в состав комплексных обогатителей сред, предназначенных для культивирования микроорганизмов?
6. Какую роль выполняют кислород и вода при культивировании микробной биомассы?

**Тема 3**  
**ИСХОДНАЯ ОБРАБОТКА СЫРЬЯ**  
**В BIOTEХНОЛОГИЧЕСКОМ ПРОИЗВОДСТВЕ**

**Цель занятия:** ознакомиться с методами исходной обработки сырья на подготовительном этапе биотехнологического производства.

**Время, отводимое на изучение темы:** 4 часа.

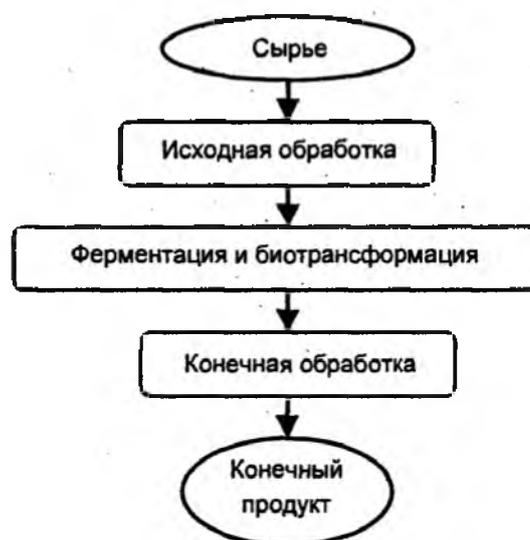
**ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ**

Промышленный биотехнологический процесс, в котором для производства целевых продуктов используются микроорганизмы, обычно состоит из 3 ключевых этапов (рисунок 3.1):

*1-й этап – исходная обработка (подготовительный):* обработка сырья для использования в качестве источника питательных веществ для микроорганизма-мишени;

*2-й этап – ферментация и биотрансформация (биотехнологический):* рост микроорганизма-мишени в промышленном биореакторе (ферментация) с последующим образованием нужного метаболита (биотрансформация);

*3-й этап – конечная обработка (заключительный):* очистка целевого продукта от компонентов культуральной среды или от клеточной массы.



**Рисунок 3.1 – Основные этапы биотехнологического процесса**  
(Прищеп Т.П., 2006)

**Подготовительный этап** необходим для приготовления сырья, используемого в биотехнологическом процессе.

В зависимости от целевого продукта при этом предусматриваются следующие операции:

- приготовление среды, включающей необходимые компоненты питания для микроорганизмов, и ее стерилизация (для асептических биотехнологических процессов, при которых нежелательно попадание посторонней микрофлоры);
- подготовка и стерилизация газов (обычно воздуха) путем очистки от пыли, влаги и присутствующих в воздухе микроорганизмов, включая споры;
- подготовка посевного материала, в том числе культивирование микроорганизмов, изолированных клеток растений или животных;

- подготовка биокатализатора или фермента в свободном или закрепленном на носителе виде, либо биомассы микроорганизмов, выращенных до состояния, в котором проявляется их ферментативная активность;
- предварительная обработка сырья, если оно поступает в непригодном для непосредственного использования в биотехнологическом процессе виде.

### Конструирование питательных сред

Важнейшим фактором, влияющим на рост микроорганизмов и биосинтез ими различных биологически активных веществ, является состав питательной среды, а также условия ее приготовления и стерилизации.

Питательные среды, применяемые для культивирования микроорганизмов, должны удовлетворять 2 основным требованиям:

- должны быть полноценными (должны содержать обоснованный и сбалансированный набор компонентов, необходимых для построения клеточной массы и синтеза целевого продукта);
- должны быть стерильными (не должны содержать примесей каких-либо микроорганизмов).

Состав среды для каждого вида используемого в производстве микроорганизма индивидуален.

Назначение питательных сред заключается в поддержании оптимальных для роста клеток физико-химических условий и обеспечении клеток питательными веществами для синтеза биомассы и других продуктов жизнедеятельности.

Понятие «среда для культивирования» включает не только определенный качественный и количественный состав компонентов или отдельных элементов, необходимых для конструктивного и энергетического обмена микроорганизма (источники азота, углерода, фосфора, ряда микроэлементов, витамины, ростовые вещества), но и физико-химические и физиологические факторы (кислотность, окислительно-восстановительный потенциал, температура, аэрация и др.).

Все эти факторы играют существенную роль в развитии микроорганизмов и в проявлении ими отдельных физиологических и биохимических функций. Обычно изменение одного из этих факторов среды влечет изменение других. Значительного повышения выхода нужного продукта, образуемого микроорганизмами, достигают, используя методы математического расчета соотношения компонентов субстрата и их свойства.

В зависимости от происхождения питательные среды подразделяются на следующие группы:

- *натуральные среды* – это комплексные среды неопределенного состава, полученные на основе природных веществ растительного или животного происхождения (молоко, пшеничные отруби,

кукурузный экстракт, зерновое сусло, молочная сыворотка и др.). Такие среды используют в производстве этанола, ферментных препаратов. Особенность натуральных сред состоит в том, что они сложны и непостоянны по составу, что делает их мало пригодными для крупнотоннажного производства;

- *синтетические среды* включают комплекс органических и неорганических химических соединений известной природы, взятых в определенных количествах. Преимуществом синтетических сред является постоянство состава и воспроизводимость, отсутствие балластных веществ, затрудняющих получение высокоочищенного целевого продукта. Однако для обеспечения полноценности таких сред необходимо, как правило, вносить специальные добавки – факторы роста;
- *полусинтетические среды*, кроме органических и неорганических веществ известного состава, содержат в определенном количестве компоненты природного происхождения (мелассу, пшеничную муку, кукурузный экстракт и др.). К таким средам относят кондиционированные гидролизаты растительных материалов.

По консистенции питательные среды подразделяются на жидкие, плотные (агаризованные) и сыпучие.

Основными компонентами питательных сред являются источники углерода, азота, фосфора, микроэлементов, факторов роста.

В наибольшем количестве в средах присутствует углеродсодержащий компонент. Основу питательных сред составляют смеси аминокислот, пуринов, пиримидинов, участвующих в синтезе белков и нуклеиновых кислот.

Многие нетребовательные микроорганизмы, например *Escherichia coli*, хорошо растут на среде очень простого состава. Такая среда называется минимальной (синтетической).

Иногда минимальной среды недостаточно для нормального роста микроорганизмов. В этом случае в состав среды вводят добавки, предварительно установив, в каких из них нуждается данный микроорганизм. Для многих почвенных бактерий используют смесь витаминов, которые добавляют в количестве 2-3 мл на 1000 мл минимальной среды – такая среда будет называться сложной (комплексной).

Наряду с рассмотренными компонентами в состав питательных сред входят минеральные соли, содержащие азот, фосфор, калий, магний и другие элементы.

Из минеральных азотсодержащих веществ наиболее часто применяют водный аммиак, мочевины и аммонийные соли серной, соляной или азотной кислот. Для биосинтеза многих соединений оказался наиболее пригодным сульфат аммония.

В результате использования азота микроорганизмами в ферментационной среде накапливаются неассимилируемые анионы кислот, возрастает кислотность среды (по этой причине такие соли называют «физиологиче-

ски кислыми»). Во избежание закисления в состав исходной среды добавляют мел в количестве около 1% или корректируют рН среды щелочью в процессе ферментации.

Источником фосфора в питательных средах являются диаммонийфосфат (полностью ассимилируемая соль), а также одно- и двухзамещенные фосфорнокислые соли калия.

Микроэлементы вводят в питательную среду в виде соответствующих солей – сульфатов, реже в виде хлоридов (ионы хлора обладают более высоким коррозионным действием на материал оборудования).

Процессы пенообразования и пеногашения играют важную роль при аэробном глубинном культивировании микроорганизмов. При сбалансированных пенных режимах увеличивается межфазная контактная поверхность и достигается интенсивный массообмен между средой и аэрирующим воздухом. Вспенивание питательной среды, устойчивость пены и ее реологические свойства (поверхностное натяжение, поверхностная вязкость) зависят от состава среды (содержания сахаров, липидов, белков, структурообразующих солей), режимов стерилизации и аэрации среды и пр.

В аэробных ферментационных процессах культуральная жидкость вспенивается в результате интенсивной аэрации. В связи с этим в составе среды предусматривается присутствие пеногасящего вещества (растительные масла, животный жир, синтетические полиэферы и др.).

В каждом конкретном процессе микробного синтеза экспериментальным путем подбирают оптимальный пеногаситель и рассчитывают его максимально допустимую дозировку.

Однако в процессе стерилизации питательной среды пеногаситель, обволакивая микробные клетки, повышает их устойчивость к температуре. По современным требованиям пеногаситель дозируют непосредственно в ферментер по сигналу датчика уровня пены в аппарате.

В некоторых микробиологических процессах целесообразно стимулировать флокуляцию (конгломеризацию) клеток продуцента, например, для более эффективного фракционирования клеток или с целью удерживания клеток в условиях непрерывной ферментации.

Применяют химические флокулянты (хлорид кальция, соли фосфорной кислоты) или синтетические полиэлектролиты (анион- либо катионактивные, или неионогены). На выпадающем в осадок фосфате кальция, например, адсорбируются клетки продуцента. Из анионактивных полиэлектролитов используют сополимер акриламида и натриевой соли акриловой кислоты. Катионактивные полиэлектролиты (например, цетазолакриламид с сополимером – катионогенным мономером) осаждают белковые вещества ферментируемой среды (до 20 г на 1 г полиэлектролита), и на них адсорбируются клетки.

Эффективность применения флокулянтов во многом зависит от температуры культивирования, рН среды и физиологического состояния клеток.

Потребность аэробных микроорганизмов в молекулярном кислороде зависит от окисляемого источника углерода, от физиологических свойств и активности роста микроорганизмов. Для биосинтеза 1 кг дрожжевой биомассы необходимо, например, 0,74-2,6 кг молекулярного кислорода. При интенсивном потреблении субстрата продуцент ассимилирует независимо от источника углерода 0,83-4,0 мг кислорода на 1 л среды в минуту.

Растворимость кислорода в среде сравнительно низка и зависит от температуры, давления, концентрации растворенных эмульгированных и диспергированных компонентов. При давлении 0,1 МПа (1 кгс/см<sup>2</sup>) и температуре +30°C в 1 л дистиллированной воды максимальное количество растворенного кислорода составляет 7,5 мг. В реальной питательной среде максимальная растворимость кислорода 2-5 мг/л. Запасы кислорода в среде обеспечивают жизнедеятельность аэробного продуцента в течение 0,5-2 мин.

При глубинном культивировании запасы кислорода в питательной среде возобновляются при подаче аэрирующего воздуха. Скорость адсорбции кислорода увеличивается с ростом интенсивности перемешивания среды.

Во время роста биомассы микроорганизмы обычно потребляют больше кислорода, чем во время сверхсинтеза целевого метаболита. Принято говорить о критической концентрации кислорода, при которой наблюдается лимитация дыхания клеток.

Для большинства аэробных микроорганизмов, растущих на сахаросодержащих субстратах, критическая концентрация кислорода – 0,05-0,1 мг/л, что соответствует 3-8% от полного насыщения среды кислородом. Лимитирование роста и физиологической активности клеток наблюдается при более высоких концентрациях кислорода: на средах с глюкозой рост дрожжей лимитируется при рО<sub>2</sub> на уровне 20-25% от полного насыщения, в средах с парафинами – при 50-60% от полного насыщения. Дальнейшее повышение интенсивности аэрации приводит к резким изменениям физиологической деятельности клеток.

Оптимальной для роста биомассы считается концентрация кислорода 50-60% от полного насыщения, для биосинтеза целевых метаболитов – 10-20%.

Вода составляет 80-90% биомассы микроорганизмов. Для приготовления питательных сред требуется чистая вода без привкуса, запаха и осадка, отвечающая требованиям ГОСТ 2874. В воде, используемой для приготовления питательных сред, должно содержаться не более 50 мг/л хлоридов и не более 60 мг/л сульфитов. Концентрации ионов металлов (мг/л) не должны превышать следующих значений: свинец – 0,2, мышьяк – 0,05, фтор – 1,5, цинк – 5,0, медь – 3,0.

При выделении микроорганизмов из природных источников часто появляется необходимость проводить культивирование таким образом, чтобы размножались преимущественно клетки определенного вида микроорганизмов. В таких случаях используется метод накопительных культур,

предложенный Виноградским и Байеринком. Для подобных ситуаций часто приходится составлять специальные среды, называемые селективными. Проводя несколько кратковременных пассажей на такой среде, можно получить чистую культуру целевого микроорганизма.

Основной принцип составления рецептур питательных сред – удовлетворение физиологических потребностей микроорганизмов. В каталогах и определителях культур указаны эти потребности, а также оптимальные значения pH и температуры.

Задача специалиста, оптимизирующего состав среды для конкретного штамма-продуцента целевого продукта, – выбрать из перечня источников углерода, азота, фосфора и других веществ наиболее оправданные в экономическом и экологическом отношении компоненты. С этой целью проводят лабораторные опыты, желательно с использованием математического планирования эксперимента.

Концентрация основного сырья определяется с учетом коэффициента его конверсии ( $Y_{p/s}$  и  $Y_{x/s}$ ). При соблюдении оптимальных условий культивирования коэффициент конверсии в биомассу ( $Y_x$ ) для метанола и глюкозы равен примерно 0,5; для этанола – 1,70-0,75; для гексадекана – 1,0-1,1; для жидких парафинов – 1,2-1,3. Это означает, что в условиях периодического культивирования для выращивания 30 г биомассы в 1 л среды в субстрат должны быть внесены 60 г метанола, 40 г этанола, 30 г гексадекана или 24 г жидких парафинов.

Концентрации метанола, превышающие 1,0%, или этанола, превышающие 1,5-2,0%, обычно токсичны для микроорганизмов. Глюкоза, сахароза, фруктоза и другие низкомолекулярные сахара в концентрациях более 7-8% также тормозят рост большинства микроорганизмов, поэтому при необходимости эти вещества вводят в питательный субстрат постепенно, по мере ассимиляции.

Количество азотосодержащих веществ для конструктивного метаболизма определяют из содержания азота в биомассе и предполагаемой ее продуктивности, учитывая, что около 5% азота остается неиспользованным. Кроме минерального азота, микроорганизмы усваивают азот белка, пептидов и аминокислот, внесенных в среду с органическим сырьем.

Точную потребность микроорганизмов в минеральном питании выясняют, культивируя их на строго синтетических средах, состоящих из компонентов в чистом виде (перекристаллизованные соли) и дистиллированной воды.

Таким образом, для составления рецептур все компоненты должны быть взяты в соотношениях, пропорциональных потребностям культивируемого микроорганизма, и с учетом предполагаемой продуктивности биомассы.

Формирование состава питательных сред осуществляют по следующей схеме:

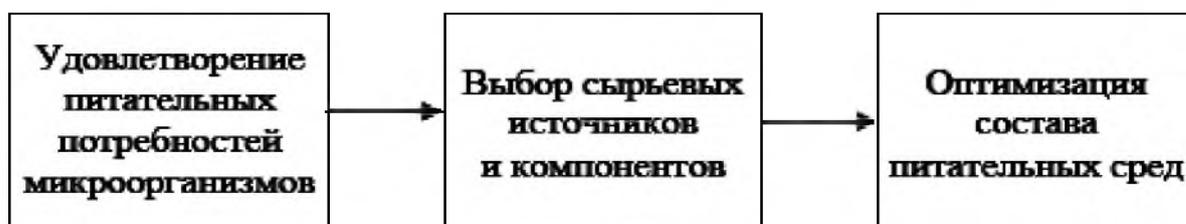


Рисунок 3.1 – Принципы формирования состава питательных сред  
(Ручай Н. С., 2014)

### Стерилизация питательных сред

Технология стерилизации питательных сред включает ряд разнообразных приемов.

Главным и наиболее традиционным является *термическая стерилизация* – прогревание среды при высоких температурах, когда большинство микроорганизмов погибают. Для большинства микроорганизмов достаточным оказывается кипячение среды (~100°C). Обычно среду прогревают при более высокой температуре, для чего нагревание проводят при повышенном давлении (3-5 атм.).

Для небольших количеств среды используют автоклавы, а при стерилизации больших объемов сред обработку проводят прямо в ферментере острым паром – струей сильно перегретого пара с температурой +130...+140°C.

В случае спорообразующих микроорганизмов термическая стерилизация непригодна, т.к. споры микроорганизмов обладают исключительно высокой термостабильностью, поэтому используют метод *многократной пастеризации*, сущность которого заключается в том, что среду прогревают при относительно невысокой температуре (~60°C), затем охлаждают и цикл повторяют несколько раз.

Микроорганизмы (вегетативные формы) при этих условиях погибают, а споры остаются жизнеспособными. После охлаждения стерилизуемой среды до нормальной для роста температуры, споры прорастают, и микроорганизмы переходят в стадию вегетативной культуры, после чего повторное прогревание вызывает их гибель.

При использовании питательных сред сложного состава, которые не выдерживают термической стерилизации, необходимо использовать щадящие методы стерилизации, такие, как *стерилизующая фильтрация*.

В качестве фильтров используют неглазурованные фарфоровые фильтры (свечи Шамберлана), фильтр Беркефельда (из прессованного кизельгура), асбестовые пластины, стеклянные и мембранные фильтры.

Современная технология изготовления мембран позволяет изготавливать мембраны с заданным размером пор.

Стерилизация фильтрацией является одним из процессов так называемой *мембранной технологии*, которая используется не только для стерилизации, но и для фракционирования сложных смесей.

При всех положительных качествах стерилизующей фильтрации через мембраны нельзя не отметить и недостатки этого способа, к которым относятся адгезия частиц к мембранам, неоднородность пор по диаметру, удержание части стерилизуемой дорогостоящей жидкости на мембране при фильтрации малых объемов ее, а также возможная селективная адсорбция ионов (чаще – катионов) из небольших объемов растворов, недостаточная или плохая смачиваемость мембран водой и др.

Другие способы стерилизации включают облучение УФ-светом, рентгеновскими и гамма-лучами. Также используют химические методы (например, обработку  $\beta$ -пропиолактоном, окисью этилена и др.). Наиболее часто применяют  $\beta$ -пропиолактон, его добавляют к готовой питательной среде в концентрации 0,2%.

В течение 2 часов при температуре +37°C все микроорганизмы погибают. После выдерживания среды в течение ночи  $\beta$ -пропиолактон полностью гидролизует, и среда становится пригодной к использованию.

### **Получение посевного материала**

**Посевной материал (инокулят)** – чистая культура микроорганизма, полученная путем последовательного постадийного накопления массы культуры продуцента.

Для получения посевного материала используют исходную музейную культуру продуцента, которая поступает в заводскую лабораторию из отраслевого НИИ или с посевной станции.

Необходимое количество посевного материала выращивается в отделении чистой культуры (ОЧК) в асептических условиях, гарантирующих отсутствие примесей других микроорганизмов.

Чистая культура поступает на предприятие, как правило, в пробирках на скошенных агаризованных средах.

Каждая производственная культура сопровождается паспортом, в котором указаны продуцент, его коллекционный номер, дата изготовления, средняя активность серии и срок годности, характеристика среды для выращивания и хранения.

Культуру проверяют на микробиологическую чистоту и биохимическую активность.

Хранение исходных штаммов продуцентов является ответственной и сложной задачей, т.к. при длительном хранении могут возникать спонтанные мутации. Наибольшая возможность проявления спонтанной изменчивости культуры возникает в тех случаях, когда исходным штаммом является мутант.

В связи с этим необходимо периодически проводить рассев культуры и проверку по морфологическим и физиологическим признакам. При рассевах отбирают колонии, дающие наилучшие результаты.

Такая непрерывная селекция позволяет сохранить в активной форме культуру продуцента. Длительные промежутки между пересевами недопустимы в связи с тем, что микроорганизмы в процессе роста и хранения потребляют из среды питательные вещества и выделяют в нее продукты обмена, вредно влияющие на их свойства.

Исходную культуру хранят чаще всего на агаризованной среде в пробирках при температуре +4...+6°C. Более длительное время можно хранить культуру под слоем стерильного медицинского вазелинового масла толщиной около 1 см.

Лиофильно высушенные культуры могут сохраняться до 5 лет без потери способности к быстрому росту и накоплению целевого продукта.

Грибные и дрожжевые культуры успешно хранят в замороженном состоянии в жидком азоте при температуре -165...-196°C. Культуру замораживают в 10%-ном водном растворе глицерина в запаянных ампулах, которые содержат в контейнере с жидким азотом. В этих условиях активность культуры полностью сохраняется до 5 лет.

Промышленные культуры актиномицетов хранят в производственных условиях на разваренном стерильном пшене.

Выросшую на зерне культуру продуцента высушивают под вакуумом при комнатной температуре до влажности зерна 7-8%. В таком виде культура актиномицетов может храниться несколько месяцев.

## ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

### Задание 1

**Изучить потребность в минеральных элементах, необходимых для выращивания биомассы**

**Таблица 3.1 – Потребность в минеральных элементах, необходимых для выращивания биомассы (30 г/л)**

Компонент	Концентрация, г/л
Источник азота – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	12,0
Источник фосфора – $\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,3
Источник магния – $\text{MgSO}_4$	1,5

<i>Компонент</i>	<i>Концентрация</i>
Макроэлементы:	
• Fe	$10^{-3}$
• Ca	$10^{-3}$
• Mg	$10^{-3}$
Микроэлементы:	
• Cu	$10^{-4}$
• Co	$10^{-4}$
• Zn	$10^{-4}$
• Mo	$10^{-4}$
• Mn	$10^{-4}$

### Задание 2

Изучить состав минимальной питательной среды, используемой для выращивания бактерий *Escherichia coli*

Таблица 3.2 – Состав минимальной питательной среды

Компонент	Концентрация, г/л
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,5 г
$\text{NH}_4\text{Cl}$	1,0 г
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 г
$\text{CaCl}_2$	0,01 г
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,01 г
Глюкоза	10,0 г
Раствор микроэлементов	1 мл
Вода	1000 мл

### Задание 3

Изучить принципиальную схему процесса приготовления и тепловой стерилизации питательной среды

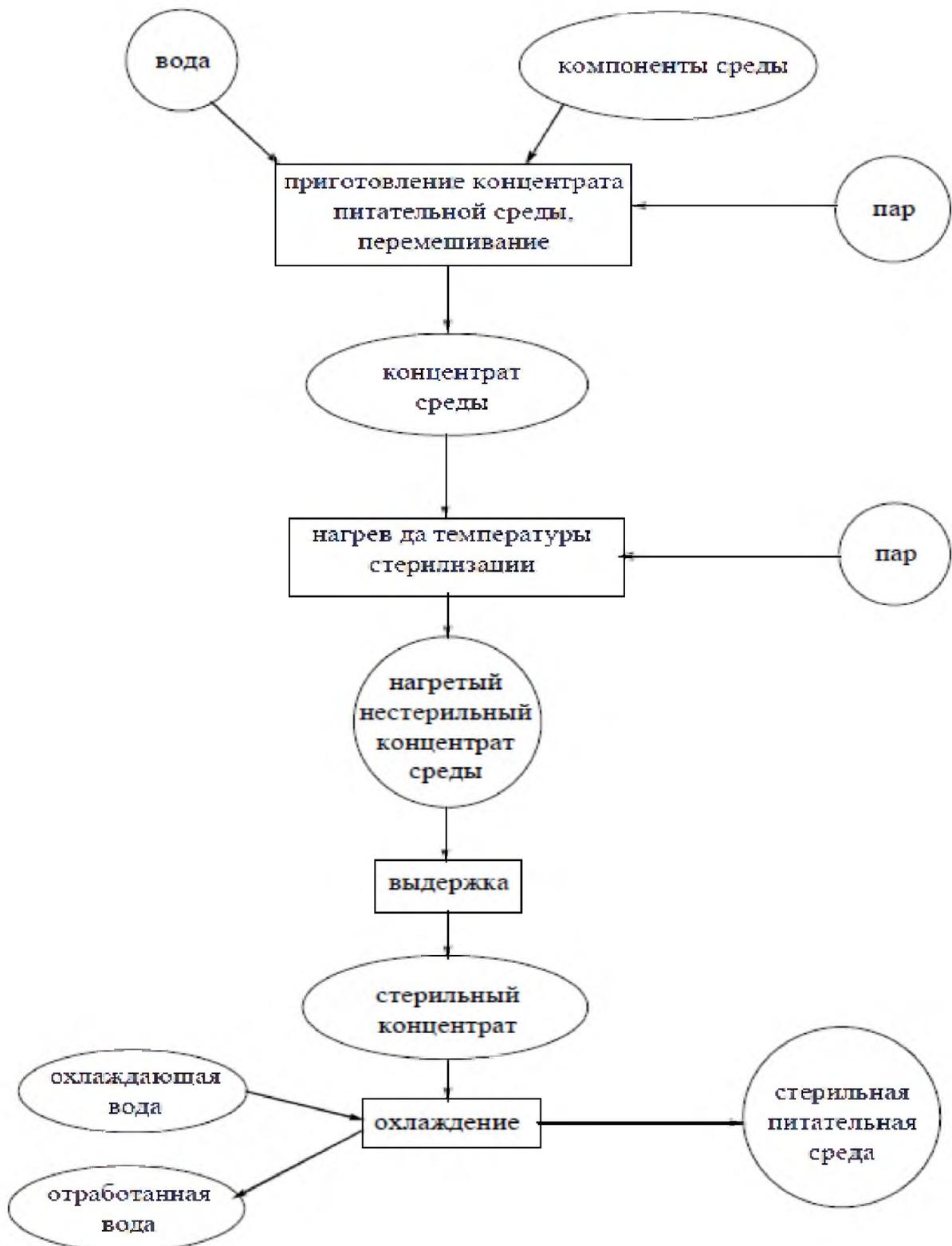


Рисунок 3.2 – Принципиальная схема процесса приготовления и тепловой стерилизации питательной среды (Тимощенко Л.В., 2009)

#### Задание 4

### Изучить основные факторы, которые определяют рост и биосинтетическую активность микроорганизмов-продуцентов

**Таблица 3.3 – Основные факторы, которые определяют рост и биосинтетическую активность микроорганизмов-продуцентов**

Фактор	Роль при культивировании	Методы управления
Состав и концентрация питательных веществ	Обеспечивают метаболизм	Составление оптимальной композиции; подпитка во время ферментации; непрерывность процесса; многостадийность с учетом потребностей продуцента по фазам развития и др.
Концентрация продукта и ингибиторов	Замедляет биохимические реакции	Осаждение продукта по мере накопления: ферментация с диализом; ферментация под разрежением с испарением летучего продукта и др.
pH	Оптимизирует скорости биохимических реакций (пределы от 3,5 до 9,0)	Регулирование путем добавления кислоты или щелочи
Температура	Оптимизирует скорость биохимических реакций (обычно равна 20...+70°C)	Охлаждение или подогрев культуральной жидкости при помощи теплообменников или температуры подаваемых в биореактор субстратов
Осмотическое давление или активность воды	Определяет границы жизни (составляет 0,6-0,998)	Составление сред с оптимальной концентрацией питательных веществ или влажностью твердой среды; поддержание на постоянном уровне во время ферментации путем разбавления водой или добавления отдельных компонентов
Содержание растворенного кислорода	Для аэробов обеспечивает аэробный метаболизм; является акцептором H <sup>+</sup> ; ингибирует развитие анаэробов	Для аэробных процессов регулируют интенсивностью аэрации или добавлением к газовой смеси кислорода; при атмосферном давлении и +20°C в 1 л среды растворяется 0,28 мМ O <sub>2</sub> . Анаэробные процессы реализуют в бескислородной среде, что достигается продуванием N <sub>2</sub> и CO <sub>2</sub> или добавками восстановителей (цистеина, аскорбиновой кислоты и др.)

## Задание 5

### Изучить особенности приготовления посевного материала для поверхностного культивирования микроорганизмов

Поверхностный способ применяют в основном при культивировании мицелиальных грибов. В этом случае посевной материал может быть приготовлен в виде:

- культуры, выращенной на твердой питательной среде;
- спорового материала;
- мицелиальной массы продуцента, выращенной на жидкой питательной среде глубинным способом.

*Посевную культуру на твердой питательной среде* готовят выращиванием микроорганизмов в возрастающем количестве в 3-4 этапа. Состав питательной среды определяется свойствами микроорганизма-продуцента. Чаще всего для этой цели используют увлажненные пшеничные отруби. Влажность среды после стерилизации должна составлять в зависимости от вида продуцента 35-65%. Для рыхлости к отрубям иногда добавляют древесные опилки, солодовые ростки, свекловичный жом.

На 1-м этапе приготовления посевного материала исходную культуру продуцента пересевают в пробирку с 1,0-1,5 г стерильных отрубей и выращивают при оптимальной температуре до обильного спорообразования.

На 2-м этапе продуцент культивируют в тех же условиях и на той же среде в колбах емкостью 0,75-1,0 дм<sup>3</sup>, содержащих 40-100 г влажной среды (из одной пробирки засевают среду в 3-4 колбах).

На 3-м этапе (дополнительный этап, при малом спорообразовании у продуцента) культивирование осуществляют в колбах с 300 г влажных отрубей до наступления обильного спорообразования.

На 4-м этапе полученный посевной материал используют для засева посевных кювет. Кюветы прямоугольной формы размером 600×400 мм и высотой борта 20-30 мм выполнены из сплошного листа оцинкованного железа, снабжены крышками с одним или двумя отверстиями, которые закрываются ватно-марлевыми подушками. Вместимость посевных кювет – 400-500 г воздушно-сухих отрубей. Питательную среду стерилизуют в автоклаве в биксах по 2 кг при давлении 0,15 МПа в течение 1 ч, а посевные кюветы – в стерилизационных шкафах при температуре +120...+130°С в течение 2,0-2,5 ч.

Содержимым одной колбы засевают 20 посевных кювет. Посевной материал смешивают с питательной средой в отдельной емкости с соблюдением всех правил асептики и раскладывают в кюветы слоем толщиной 0,8-1,2 см. Между кюветой и крышкой укладывают слой непроклеенной бумаги для предотвращения возможной конденсации влаги на крышке и создания зон излишнего увлажнения растущей культуры. Кюветы со средой помещают на стеллажи в растительные камеры, в которых поступающим через кондиционер воздухом поддерживается определенная влажность и температура. Камеры заполняют кюветами, исходя из удельной нагрузки

по культуре 1-2 кг засеянной среды (по сухой массе) на 1 м<sup>3</sup> объема камеры. При этом обмен воздуха в камере должен быть равен 2-3 объемам камеры за 1 ч.

Готовый посевной материал снимают с кювет и во влажном состоянии помещают в стерильные пакеты, которые затем хранятся при температуре +3...+4°C. Длительность хранения посевного материала не должна превышать 5-6 суток (влажная культура подвержена лизису, и активность ее снижается). При необходимости более длительного хранения посевной материал подсушивают до влажности 10-12% в растительной камере воздухом при температуре +28...+30°C, предварительно сняв крышки с кювет. Приготовленный посевной материал представляет собой спорносящую культуру продуцента и должен содержать не менее 0,7 млрд спор в 1 г. Для получения засеваемой суспензии посевной материал смешивают со стерильной водой в специальной емкости. Суспензия используется для засева среды в производственных условиях.

*Споровой материал* отличается от спорносящей культуры незначительным содержанием самой питательной среды и состоит главным образом из спор продуцента при небольшом содержании мицелия. Споровой материал содержит 7-10 млрд спор в 1 г. Для получения спорового материала поверхностную культуру подсушивают до влажности 9-10% и подают в вибросепаратор, из которого воздушным потоком (вакуум-насосом) конидии отделяются от среды и собираются в приемник. Споровой материал расфасовывают в полиэтиленовые пакеты в бокс-манипуляторе. Полученный таким образом конидиальный материал может храниться без значительных изменений при температуре +8...+24°C до 1,5 лет. За 1 год хранения конидии теряют всхожесть в среднем на 8%.

Споры (конидии) обладают свойством гидрофобности – плохо смачиваются водой. Это приводит к неравномерности засева среды и, следовательно, к неодинаковой скорости роста культуры. Однородную суспензию конидий можно получить добавлением в воду на каждый грамм спорового материала 25-50 см<sup>3</sup> ПАВ (алкилбензол-сульфата). При этом смачиваемость спор сильно возрастает при неизменной всхожести.

Применение спорового материала облегчает технологический процесс, позволяет более полно механизировать его. Однако получение спорового посевного материала приводит к сильному загрязнению воздуха конидиями. Несмотря на наличие аспирационных устройств, насыщенность воздуха конидиями может достигать от 300 до 10000 на 1 м<sup>3</sup>, что недопустимо в санитарно-гигиеническом отношении. Это приводит к необходимости применять специальную одежду и индивидуальные средства защиты. Чтобы исключить возможность проникновения посторонней микробиоты, в помещениях цеха чистой культуры поддерживается подпор воздуха (с избыточным давлением 0,01-0,02 МПа).

Наиболее безопасным является получение *посевного материала глубинным культивированием в виде мицелиальной массы*. При этом способе культура, выращенная в колбах на отрубях, поступает для засева жидкой

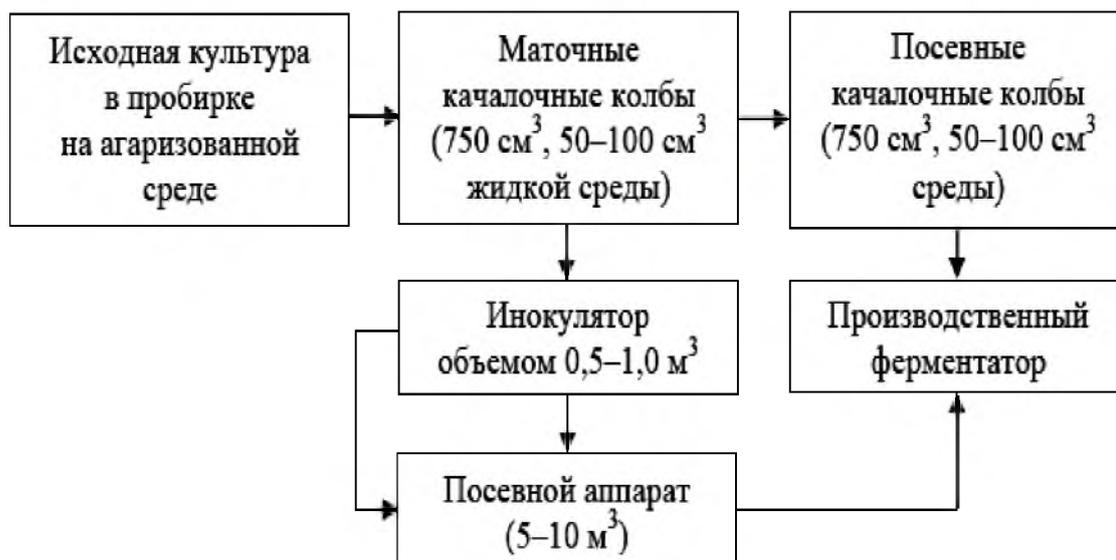
питательной среды в лабораторных ферментерах объемом до 40 дм<sup>3</sup>. Продолжительность культивирования обычно составляет 24-30 ч. Молодая, активно растущая мицелиальная масса служит посевным материалом для засева производственной среды. Такой способ позволяет в несколько раз сократить длительность приготовления посевного материала, уменьшить площадь отделения чистой культуры, улучшить условия труда, снизить спорообразование в готовой производственной культуре.

### Задание 6

#### Изучить особенности приготовления посевного материала для глубинного культивирования микроорганизмов

При глубинном культивировании микроорганизмов посевной материал готовят также глубинным способом с постадийным увеличением массы культуры-продуцента. В зависимости от мощности предприятия число стадий колеблется от 2 до 5.

Общая схема получения посевного материала в асептических производствах представлена на рисунке 3.3.



**Рисунок 3.3 – Общая схема получения посевного материала в асептических производствах (Ручай Н. С., 2014)**

Ферментеры малого объема (до 10 м<sup>3</sup>) засевают посевным материалом из качалочных колб. На предприятиях большой мощности биомассу чистой культуры накапливают в инокуляторе, а затем в посевном аппарате с соблюдением условий строгой асептики.

Число стадий получения посевного материала стремятся максимально сократить, чтобы снизить вероятность появления инфекции. Продолжительность каждой стадии накопления биомассы культуры составляет, как правило, от 24 до 36 часов (культура передается с одной стадии на другую в логарифмической фазе роста).

Питательная среда для получения посевного материала часто отличается от производственной по качественному и количественному составу. Передачу посевного материала из одного аппарата в другой осуществляют пережимом сжатым стерильным воздухом без нарушения асептики.

Количество посевного материала составляет 8-10% от объема засеваемой питательной среды.

В нестерильных производствах (производство кормового белка) посевной материал получают в отделении чистой культуры накоплением биомассы в каскаде ферментеров с последовательно возрастающим объемом:  $0,63 \text{ м}^3$ ;  $6,3 \text{ м}^3$ ;  $63 \text{ м}^3$ .

### **Контрольные вопросы**

1. Какие операции осуществляются на подготовительном этапе биотехнологического производства?
2. Каким основным требованиям должны удовлетворять питательные среды, применяемые для культивирования микроорганизмов?
3. В чем заключается основной принцип составления рецептур питательных сред, предназначенных для культивирования микроорганизмов?
4. Какие методы применяются для стерилизации питательных сред, применяемых для культивирования микроорганизмов? На чем они основаны?
5. Как осуществляется приготовление посевного материала?

**Тема 4**  
**ФЕРМЕНТАЦИЯ И БИОТРАНСФОРМАЦИЯ.**  
**ПРОМЫШЛЕННОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ**

**Цель занятия:** ознакомиться с промышленными способами культивирования микроорганизмов, процессами ферментации и биотрансформации.

**Время, отводимое на изучение темы:** 4 часа.

### ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Культивирование микроорганизмов является основной стадией технологического процесса и во многом определяет количественные и качественные характеристики производства биопрепаратов.

На стадии культивирования осуществляется накопление как самой биомассы (*ферментация*), так и продуктов метаболизма (жизнедеятельности) микроорганизмов (*биотрансформация*).

Иногда (например, при производстве бактериальных препаратов) целевым продуктом является сама биомасса, в других случаях продукты, синтезируемые клеткой (антибиотики, ферменты, аминокислоты и др.). При этом синтезируемый продукт может накапливаться как внутри клеток, так и выделяться в культуральную жидкость.

Необходимые полезные свойства целевых продуктов (клеток или продуктов метаболизма) создаются, в основном, на стадии культивирования. Основная задача на последующих стадиях состоит, главным образом, в том, чтобы при выделении, сушке и других операциях максимально сохранить и стабилизировать эти полезные свойства.

Рост и культивирование биомассы требуют определенных условий:

- жизнеспособности посевного материала;
- наличия источника энергии (тепла);
- достаточного количества соответствующей питательной среды;
- необходимых физико-химических условий для жизнедеятельности.

Культивирование микроорганизмов основано на взаимодействии 3 фаз: твердой, жидкой и газообразной.

Производственное культивирование микроорганизмов является основной стадией технологического процесса, во многом определяющей технико-экономические показатели производства биопрепаратов.

В биотехнологической практике находят применение различные методы культивирования микроорганизмов, в основе которых лежит глубинное или поверхностное культивирование.

*Поверхностный метод* культивирования применим только для аэробных микроорганизмов, которых выращивают на поверхности жидкой или твердой (плотной или сыпучей) среды.

В промышленных условиях поверхностное культивирование микроорганизмов находит ограниченное применение (например, выращивание мицелиальных грибов в производстве ферментных препаратов, органических кислот (лимонная, итаконовая)) по ряду причин:

- низкий уровень механизации и автоматизации технологического процесса (большие затраты ручного труда);
- невысокая производительность ферментационного оборудования –растельных камер, занимающих большие производственные площади;
- не исключается контакт работающих с поверхностной культурой (мицелиальные грибы и их конидии), что недопустимо по санитарно-гигиеническим требованиям;
- низкая степень использования компонентов питательной среды.

При *глубинном методе* культивирования микробные клетки растут во всем объеме жидкой питательной среды, в которой они суспендированы и находятся во взвешенном состоянии.

Глубинный метод пригоден для выращивания как аэробных, так и анаэробных микроорганизмов. Подавляющее большинство производственных продуцентов – аэробные культуры, требующие интенсивной принудительной аэрации среды.

Глубинное культивирование имеет ряд очевидных преимуществ перед поверхностным:

- позволяет исключить тяжелый непроизводительный ручной труд и значительно сократить производственные площади;
- обеспечивает высокий уровень стерильности процесса;
- улучшает гигиену труда;
- упрощает автоматизацию производства;
- дает возможность осуществлять непрерывный процесс ферментации;
- обеспечивает более полное использование питательных веществ среды.

В производственной практике глубинное культивирование микроорганизмов осуществляют в периодическом, полунепрерывном (продленное периодическое, отъемно-доливное, многоциклическое) или непрерывном режиме.

### **Периодическое культивирование микроорганизмов**

Периодический способ культивирования часто применяется в различных отраслях микробиологической промышленности (при накоплении биомассы чистой культуры дрожжей в лаборатории и на первых производственных стадиях в цехе чистых культур).

Периодический процесс происходит при одновременной загрузке всех компонентов питательной среды и посевного материала в аппарат в

начале процесса, и культивируют культуру до достижения ею заданной фазы роста. Через определенное время аппарат полностью разгружают.

Концентрация микроорганизмов в периодической культуре нарастает и останавливается из-за ограничения питательных веществ или из-за ингибирования токсичными продуктами жизнедеятельности микроорганизмов.

При периодическом культивировании происходит непрерывное изменение физиологического состояния клеток вследствие меняющихся условий внешней среды.

Периодический способ культивирования осуществляется как в стационарных условиях, так и в условиях с перемешиванием на лабораторной качалке, шейкере или с помощью перемешивающего устройства, встроенного внутрь производственного ферментера. Когда клетки распределены по всему объему жидкой питательной среды, происходит перемешивание культуры, что выравнивает условия роста в различных частях рабочей емкости. Системы с перемешиванием называются динамическими.

Наиболее часто в производстве применяется глубинное выращивание в ферментере с принудительной аэрацией и перемешиванием. Глубинное культивирование с перемешиванием ускоряет рост микроорганизмов, клетки в такой системе находятся во взвешенном состоянии и равномерно рассредоточены по всему объему, имеют одинаковые условия. Субстраты и продукты метаболизма рассредоточены по всему объему равномерно.

Закономерности размножения микроорганизмов при периодическом культивировании:

- размножение микроорганизмов определяется протеканием двух противоположных процессов – образования и гибели клеток, т.е. синтеза и деструкции;
- скорость образования микроорганизмов (синтеза биомассы) пропорциональна увеличивающейся в процессе культивирования их концентрации и снижается с уменьшением концентрации лимитирующего субстрата;
- скорость отмирания клеток (деструкции биомассы) пропорциональна квадрату их концентрации;
- величина субстрата (набора компонентов питательной среды, необходимых для образования микроорганизмов) определяется содержанием в питательной среде одного или нескольких лимитирующих компонентов;
- продукты лизиса погибших клеток в кинетическом отношении (количественно) эквивалентны исходному субстрату;
- процесс размножения заканчивается установлением равновесия, при котором скорости синтеза и деструкции биомассы равны (поэтому концентрации микроорганизмов и субстрата не меняются во времени).

## **Продленное периодическое культивирование микроорганизмов (периодическое культивирование с добавлением субстрата)**

Этот способ, который еще называется приточно-доливным, используется в основном при культивировании пекарских дрожжей, как в цехе чистых культур, так и на производстве.

При реализации данного способа в процессе культивирования первично вносят питательную среду до засева культуры. Затем с целью регулирования энергетического обмена осуществляют периодическое внесение в ферментер увеличивающегося количества питательных веществ (при этом культуральную среду не удаляют до окончания процесса). Аппарат, как и при периодическом способе культивирования, разгружают одновременно.

Добавление питательных веществ или других компонентов в ходе ферментации позволяет создать благоприятные условия для жизнедеятельности культуры в различных фазах культивирования (периодическое добавление субстрата приводит к удлинению экспоненциальной и стационарной фаз, к увеличению биомассы и количества метаболитов, синтезируемых во время стационарной фазы).

При этом экономический коэффициент в такой культуре выше по сравнению с простой периодической культурой, т.к. такой способ культивирования позволяет снизить и даже исключить эффект Кребтри (репрессию глюкозой, т.е. торможение дыхания и активацию брожения у дрожжей в высокосахаристой среде).

Подпитка переводит периодический процесс в продленный периодический и используется в основном для получения продуктов биосинтеза, что существенно увеличивает производительность процесса. При таком способе микроорганизмы не покидают ферментер в процессе всего культивирования.

В периодической культуре, как известно, постепенно накапливаются продукты метаболизма, которые приостанавливают рост. Для увеличения выхода продуктов или с целью повышения концентрации биомассы применяют процесс **диализа**.

Суть метода диализного культивирования заключается в том, что культура развивается в пространстве, ограниченном полупроницаемой мембраной, а продукты диффундируют во внешний раствор. Наиболее простым диализным методом является культивирование в целлофановых мешках, погруженных в питательную среду (метод был разработан рядом авторов для получения экзотоксинов и позволил получать высокоактивные препараты, но не нашел широкого практического применения из-за сложности осуществления его в производственных масштабах и невозможности получения токсина в больших количествах).

К продленным периодическим процессам можно отнести культивирование микроорганизмов в диализной системе с протоком среды, поскольку проток удлиняет период роста и развития микробной популяции, но систе-

ма не является непрерывной из-за отсутствия оттока биомассы. В диализной системе с протоком среды общая биомасса увеличивается до тех пор, пока плотность культуры не станет такой, что дальнейшее перемешивание биомассы будет невозможным. Таким образом, метод дает возможность выращивать культуру до достижения высокой плотности биомассы.

Диализные культуры применяют в основном в следующих случаях:

- для концентрирования недиффундирующего продукта;
- для уменьшения концентрации диффундирующего продукта, ингибирующего рост, и повышения выхода биомассы;
- для накопления и отделения от клеток диффундирующего продукта.

### **Многоциклическое культивирование микроорганизмов**

Многоциклическими процессами культивирования называют такие, в которых цикл выращивания культуры повторяется многократно без многократной стерилизации емкости.

Зависимость концентрации микроорганизмов и удельной скорости роста от времени в каждом цикле многоциклического процесса имеет характер, аналогичный таковому в периодическом процессе.

Многоциклическое культивирование может быть различным. Его можно вести в одном ферментере, многократно повторяя полный цикл развития культуры без перерыва на стерилизацию. В одном ферментере можно повторять и укороченный цикл, заканчивая его, например, экспоненциальной фазой роста. Процессы, осуществляемые в одном ферментере, называются одностадийными.

Возможны и многостадийные многоциклические процессы, основанные на принципе повторного и последовательного периодического культивирования, протекающего в нескольких ферментерах, соединенных в батарею, с целью длительного использования культуры.

Многоциклические процессы культивирования микроорганизмов применяют как для получения биомассы, так и продуктов микробного синтеза (токсинов, антибиотиков, внеклеточных ферментов, аминокислот). Применение подобного метода позволяет сократить в несколько раз затраты труда на производство продукта по сравнению с получением его периодическим способом.

### **Отъемно-доливное полунепрерывное культивирование микроорганизмов**

В полунепрерывных системах полная загрузка и разгрузка ферментера осуществляются однократно, однако в процессе роста культуры часть ее сливается, а освободившийся объем заливается свежей питательной средой (в середине экспоненциальной фазы роста отбирают половину культураль-

ной жидкости, а вместо нее вносят свежую питательную среду). Таким образом функционирует отъемно-доливная система.

Следовательно, полунепрерывное культивирование характеризуется частотой и объемом сливаемой выросшей культуры и добавлением свежей питательной среды в рабочую емкость ферментера.

Установившиеся режимы полунепрерывного культивирования характеризуются колебанием концентрации микроорганизмов около одной и той же постоянной величины и постоянством средней удельной скорости роста популяции.

Отъемно-доливной способ рассматривают как дальнейшее совершенствование периодического способа культивирования и шаг к переходу к непрерывному культивированию микроорганизмов.

При этом способе обеспечивается омолаживание или обновление культуры и существенно замедляется наступление фазы отмирания.

Однако такой способ имеет существенный недостаток, заключающийся в том, что добавляется питательная среда полного состава, а это невозможно для синтеза вторичных метаболитов.

Полунепрерывное культивирование микроорганизмов осуществляется в открытой динамической гомогенной одностадийной системе в любом ферментере для периодического культивирования, оснащенном системой перемешивания и аэрации.

Различные варианты полунепрерывных систем используются в производстве дрожжей, водорослей, антибиотиков, лимонной кислоты и др.

### **Непрерывное культивирование микроорганизмов**

Метод проточного непрерывного культивирования пришел в микробиологию из химической технологии.

Непрерывные процессы имеют значительные преимущества перед периодическими:

- возможность специализации аппаратуры для каждой операции (стадии) непрерывного процесса;
- стабилизация процесса культивирования во времени;
- улучшение качества продукта;
- легкость регулировки и возможность автоматизации.

Этими преимуществами объясняется тенденция микробиологов к переходу от периодических процессов к непрерывным.

В непрерывной культуре рост микроорганизмов может поддерживаться в течение длительного времени, а также может быть достигнуто и поддерживаться установившееся состояние, при котором концентрация клеток, удельная скорость роста и окружающая клетки среда (т.е. концентрация питательных веществ и продуктов) не изменяются со временем.

Такое состояние является прямой противоположностью росту в периодической культуре, когда условия в культуральной среде изменяются непрерывно.

Вследствие этого непрерывная культура предоставляет уникальные возможности для исследования реакций микроорганизмов на изменение окружающей среды и для непрерывного продуцирования клеточной массы или других продуктов в оптимальных условиях.

Принцип непрерывного проточного культивирования состоит в том, что в сосуд, где размножаются микроорганизмы, непрерывно подается свежая питательная среда и одновременно из него такой же объем культуры.

Проточное культивирование проводят в специальных биореакторах, которые снабжены устройствами для поддержания температуры и pH на постоянном уровне, а также для автоматической подачи свежей питательной среды и удаления культуральной жидкости с продуктами метаболизма. Микробная популяция тем самым поддерживается необходимое время в логарифмической фазе роста.

Различают открытые и замкнутые системы непрерывного культивирования:

- в *открытых системах* клетки постоянно вымываются вытекающей жидкостью со скоростью образования в системе новых клеток (в этих условиях легко достигается их устойчивая концентрация);
- в *замкнутых системах* клетки в какой-то мере задерживаются в системе и их количество все возрастает (в этих условиях одни лимитирующие факторы сменяют другие, большая часть клеток отмирает, и такая система не в состоянии достигнуть установившегося динамического равновесия).

Замкнутые системы значительно менее пригодны, чем открытые для осуществления точного регулирования всех условий культивирования, управления ими и автоматизации процесса.

Непрерывный процесс может быть гомогенно- и гетерогенно-непрерывным:

- при *гомогенно-непрерывном процессе* в ферментере с интенсивным перемешиванием все параметры (концентрация питательных веществ, скорость роста микроорганизмов) постоянны во времени;
- при *гетерогенно-непрерывном процессе* несколько ферментеров соединяют в батарею (при этом не обеспечиваются постоянные условия роста клеток, т.к. в каждом ферментере поддерживаются постоянные условия культивирования, но отличные от условий в другом ферментере).

Способ проточного культивирования может быть организован как процесс полного вытеснения и как процесс полного смешения.

**Система полного вытеснения** применяется в промышленности в тех случаях, когда желательно избежать потери времени на опорожнение, стерилизацию и заполнение емкости.

Этот способ культивирования используется для анаэробных процессов. Его применяют в пищевой промышленности, когда используются сложные среды и стоит задача наиболее экономично провести процесс, аналогичный тому, который ведется в периодическом режиме.

При процессе полного вытеснения сосуд для выращивания микроорганизмов представляет собой трубку (тубулярный ферментер), в который подается питательная среда и посевной материал и из которого вытекает культура (перемешивания культуры не производится).

Когда среда и посевной материал поступают в ферментер, клетки находятся в начале своего развития. По ходу трубки происходит развитие культуры, выражающееся в использовании субстрата, накоплении продуктов метаболизма, и перед вытеканием культура находится в состоянии, аналогичном стационарной фазе роста периодической культуры.

Таким образом в трубке воспроизводится полная кривая роста, но не во времени, а в пространстве. Подобная картина наблюдается в батарее проточных ферментеров.

В *системе полного смешения* рост культуры происходит в емкости-ферментере при интенсивном перемешивании, достигаемом продуванием воздуха и работой мешалки.

Микроорганизмы растут в культуральной среде, постоянной по своему составу, и, следовательно, в каждый данный момент времени находятся в одном и том же физиологическом состоянии, т.е. в состоянии установившегося динамического равновесия.

По количеству ферментеров гомогенные системы могут быть одностадийными, двухстадийными и многостадийными.

*Одностадийные системы* используют для получения высоких концентраций биомассы. Они заключаются в возврате клеток, отделенных от культуральной жидкости, с помощью насоса обратно в ферментер.

Возврат клеток (рециркуляция) имеет большое значение в тех процессах, в которых за время пребывания в ферментере клетки не успевают реализовать свои потенциальные возможности в отношении синтеза целевого продукта.

*Многостадийные системы* состоят из ряда последовательно соединенных ферментеров (батареи).

При таком методе может быть воспроизведена любая точка роста периодической культуры: от начала стадии замедления роста после логарифмической фазы и до конца стадии замедления роста.

В ферментере создаются условия, соответствующие одной точке кривой роста культуры.

При больших потоках среды эти условия близки к быстрому логарифмическому росту, при малых – приближаются к условиям стационарной фазы роста культур.

Воспроизведение в потоке определенной точки кривой роста культур широко применяется в промышленности при наращивании биомассы микроорганизмов.

Многостадийное культивирование применяется при получении молочной кислоты, этилового спирта.

В биотехнологической промышленности в основном применяются 2 способа полного гомогенного перемешивания: хемостатный и турбидостатный.

В *хемостатах* управление культивированием проводят путем лимитирования концентрации одного из ростовых факторов в поступающей в хемостат среде, тем самым изменяют плотность микробных клеток в единице объема среды.

В простейшей форме рост бактерий можно представить как совокупность реакций, в которых скорость роста культуры определяется самой медленной реакцией метаболизма. Хотя в растущей культуре осуществляется метаболизм многих питательных веществ, скорость роста культуры в любой момент времени определяется скоростью метаболизма лишь одного питательного субстрата.

Тот субстрат, или тот компонент питательной среды, метаболизм которого осуществляется медленнее всего и который таким образом определяет скорость роста бактериальной культуры, называют лимитирующим фактором.

В промышленности хемостатный метод культивирования применяется при наращивании биомассы микроорганизмов, если известно, какой именно фактор ограничивает рост.

В *турбидостате* управление культивированием проводят путем измерения мутности выходящего потока с использованием фотоэлектрического элемента.

Скорость разбавления свежей средой устанавливают в зависимости от требуемой плотности выходящей из турбидистата культуры. При этом состояние равновесия или стационарное состояние культуры достигается путем удаления биомассы и замещения ее свежей средой со скоростью, равной скорости роста культуры.

При превышении установленной точки включается насос, подающий свежую питательную среду.

Турбидостатное культивирование осуществляют обычно в тех случаях, когда лимитирующий фактор не известен или в лимитирующих количествах субстрата нет необходимости. Поэтому субстрат добавляется в ферментер в избытке.

Хемостат в отличие от турбидостата позволяет с высокой скоростью регулировать условия лимитирования роста (субстратное лимитирование), тогда как турбидостат предпочтительнее для изучения микроорганизмов в условиях, близких к максимальной удельной скорости роста.

## ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

### Задание 1

#### Изучить общую схему промышленной ферментации

Общая схема промышленной ферментации представлена на рисунке 4.1.

Процесс начинается с приготовления и стерилизации культуральной среды и оборудования. Вначале выращивают исходную культуру (5-10 мл), затем инкубируют ее во встряхиваемой колбе (200-1000 мл), далее переносят в ферментер для посевного материала (10-100 л), а затем в промышленный ферментер (1000-100000 л).

По завершении ферментации выделяемый продукт находится в клетках или в культуральной среде, но не в обеих фракциях одновременно, поэтому дальнейшие манипуляции проводят с одной из этих фракций.

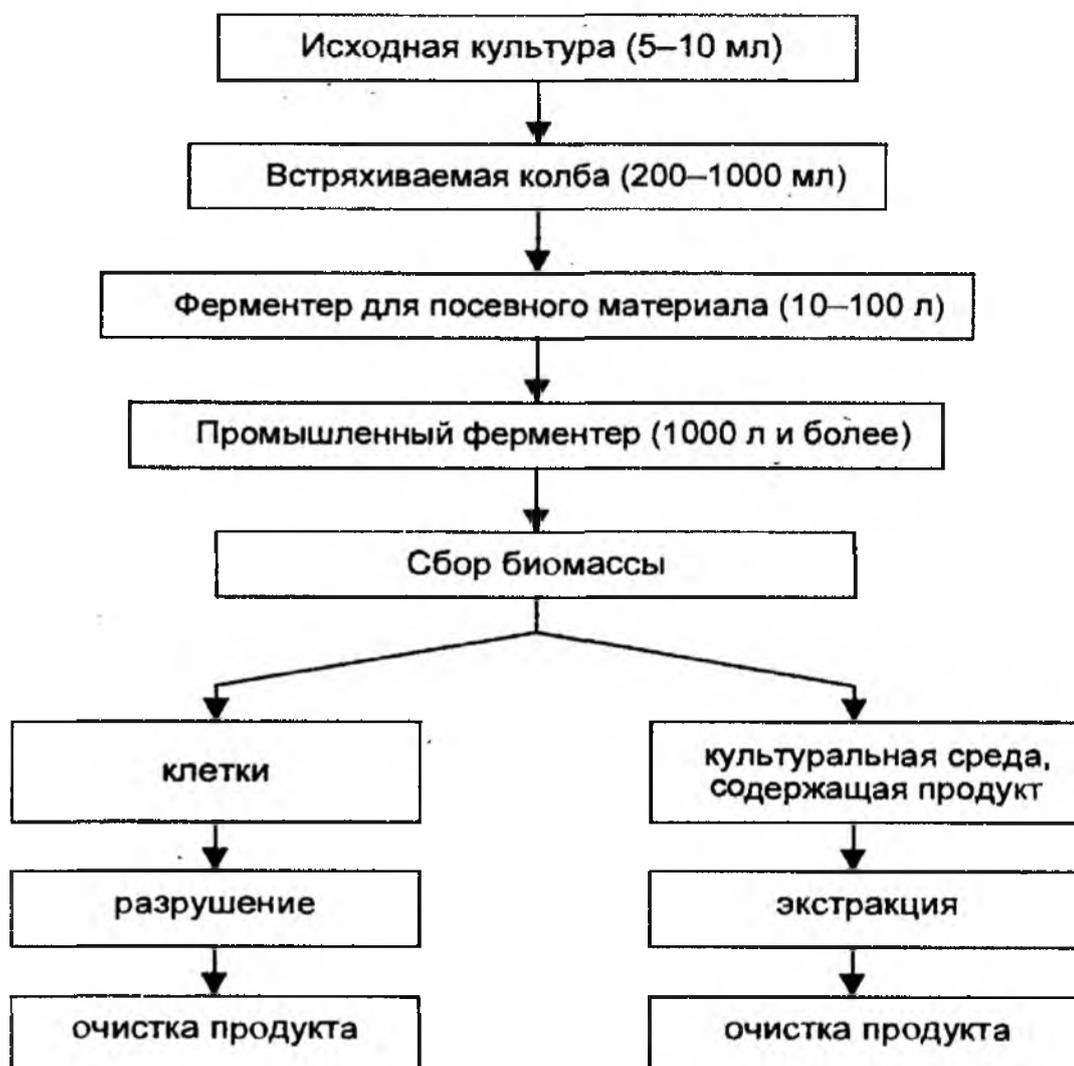


Рисунок 4.1 – Общая схема промышленной ферментации

(Прищеп Т.П., 2006)

**Задание 2**  
**Изучить классификацию процессов культивирования микроорганизмов**



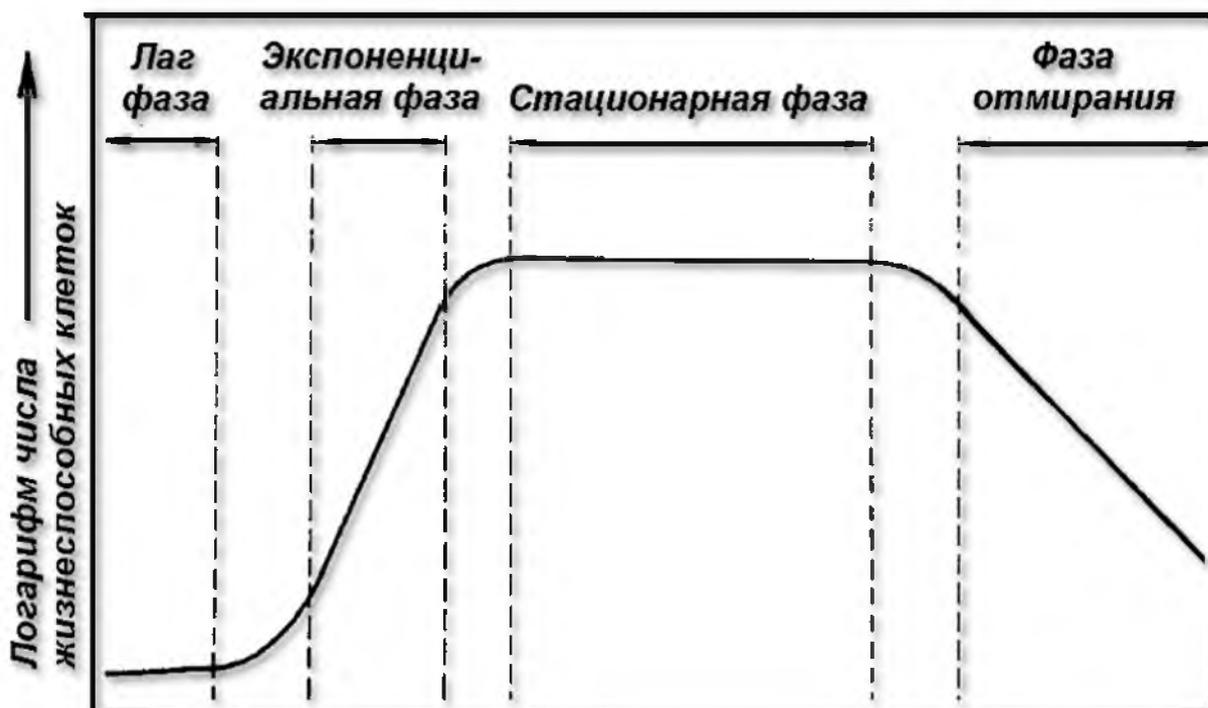
**Рисунок 4.2 – Процессы культивирования микроорганизмов**  
 (<http://www.myshared.ru>)

**Задание 3**  
**Изучить кинетические особенности фаз роста биомассы при периодической ферментации**

При периодической ферментации состав культуральной среды, концентрация микроорганизмов (биомассы), количество белкового продукта или метаболита зависят от фазы роста, клеточного метаболизма и наличия питательных веществ.

Различают 4 основные фазы роста (рисунок 4.3):

- лаг-фаза;
- экспоненциальная фаза (фаза ускорения; фаза логарифмического роста; фаза замедленного роста);
- стационарная фаза;
- фаза отмирания.



**Рисунок 4.3 – Кинетическая кривая роста бактериальной культуры при периодической ферментации (<http://www.myshared.ru>)**

Цикл развития периодической культуры начинается с засева среды. Микроорганизмы, попав в свежую полноценную среду, начинают размножаться не сразу. Этот период называют *лаг-фазой*. Только после определенного времени, иногда через несколько часов, клетки приспосабливаются к окружающей среде. В этот период активизируются ферменты, а также, при необходимости, синтезируются новые ферментные системы. В период лаг-фазы стремительно возрастает количество нуклеиновых кислот, особенно РНК, что необходимо для биосинтеза белков.

Засев осуществляется в таком количестве, которое обеспечивает начало роста микроорганизмов с минимальной задержкой или даже без лаг-фазы.

Лаг-фаза мало дает для понимания хода биосинтеза, ее наличие свидетельствует только о недостаточно хорошем качестве и количестве посевного материала или о неоптимальности условий для роста. Для многих микробиологических процессов активный «омоложенный» посевной материал применяют в количестве около 2% от объема среды.

Если посевным материалом служит культура, находящаяся в экспоненциальной фазе, выраженная лаг-фаза может отсутствовать и рост клеток начнется немедленно после инокуляции.

Между лаг-фазой и фазой логарифмического роста есть короткий период – *фаза ускорения*, когда скорость роста клеток увеличивается до достижения постоянной величины.

После лаг-фазы следует *экспоненциальная (логарифмическая) фаза роста*. Клетки размножаются с максимальной для данной культуры скоростью. Вследствие этого, запас необходимых питательных веществ в среде уменьшается, что является основной причиной снижения скорости роста. Кроме того, накапливаются продукты метаболизма, которые в определенной концентрации могут мешать нормальному протеканию биохимических процессов обмена веществ. Иногда плотность клеток в культуральной среде достигает максимума, исчерпывая все источники питательных веществ.

В ходе интенсивного роста и размножения внутри закрытой системы возрастает негативное влияние лимитирующих факторов (снижение концентрации питательных веществ и накопление ингибиторов), в результате скорость роста уменьшается, наступает *фаза замедленного роста*.

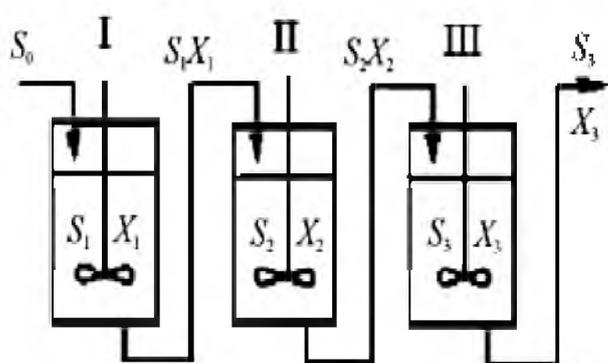
Через определенное время в *стационарной фазе* наступает равновесие между числом вновь образованных и погибших клеток. Уменьшается количество субстрата, увеличивается плотность клеток в популяции, усиливается токсическое действие продуктов обмена – все это обуславливает гибель клеток.

Когда масса клеток в питательной среде достигает максимального уровня, наступает период, когда число отмерших и автолизированных клеток превышает прирост. В результате количество биомассы уменьшается и наступает *фаза отмирания*.

Наиболее интенсивно рост и размножение происходят в логарифмической фазе, где еще не действуют лимитирующие факторы. Основным физиологическим показателем, характеризующим кинетические свойства культуры, является удельная скорость роста, величина которой зависит от концентрации субстрата.

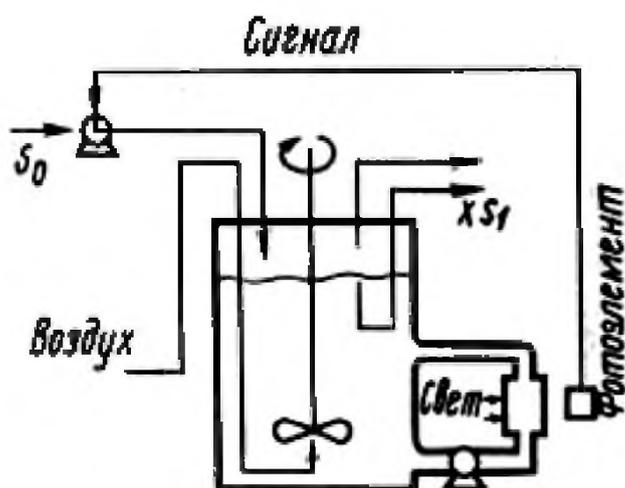
#### Задание 4

**Изучить принципиальную схему функционирования систем полного смешения и полного вытеснения при непрерывном культивировании микроорганизмов**



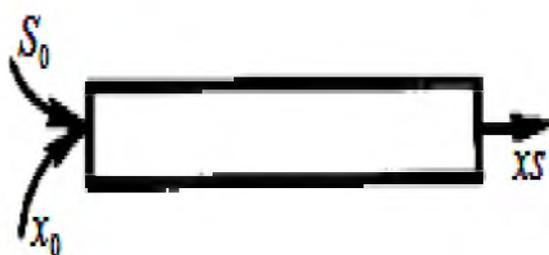
*I, II, III – номера ферментеров;*  
 *$S_0$  – концентрация субстрата в подаваемой среде;*  
 *$S_1, S_2, S_3$  – концентрация субстрата в ферментерах;*  
 *$X_1, X_2, X_3$  – концентрация клеток в ферментерах*

**Рисунок 4.4 – Схема функционирования трехстадийного хемостата**  
*(Блажевич О.В., 2004)*



$S_0$  – концентрация субстрата в подаваемой среде;  
 $S_1$  – концентрация субстрата в вытекающей культуре;  
 $X$  – концентрация клеток

**Рисунок 4.5 – Схема функционирования турбидостата**  
 (Блажевич О.В., 2004)



$S_0$  – концентрация субстрата в поступающей среде;  
 $S$  – концентрация субстрата в вытекающей среде;  
 $X_0$  – начальная концентрация биомассы;  
 $X$  – концентрация вытекающей биомассы

**Рисунок 4.6 – Схема функционирования трубчатого ферментера полного вытеснения**  
 (Блажевич О.В., 2004)

### Контрольные вопросы

1. Какие условия требуются для роста и культивирования биомассы?
2. В чем заключается метод периодического культивирования микроорганизмов? Чем характеризуется рост биомассы при периодической ферментации?
3. В чем заключается метод непрерывного культивирования микроорганизмов? Чем характеризуется рост биомассы при непрерывной ферментации?
4. Какими особенностями характеризуются биотехнологические процессы в отличие от химических?

*Тема 5*  
**АППАРАТУРНОЕ ОФОРМЛЕНИЕ**  
**БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА**

**Цель занятия:** ознакомиться с промышленными аппаратами (ферментерами), используемыми в биотехнологическом производстве и принципами их функционирования.

**Время, отводимое на изучение темы:** 4 часа.

### ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Промышленное производство биопрепаратов представляет собой сложный комплекс взаимосвязанных физических, химических, биофизических, биохимических, физико-химических процессов и предполагает использование большого количества разнотипного оборудования, которое связано между собой материальными и энергетическими потоками, образующими технологические линии.

Основным аппаратным элементом биотехнологического процесса является биореактор-ферментер.

Биореакторы предназначены для культивирования микроорганизмов, накопления биомассы, синтеза целевого продукта.

Типовые ферментеры представляют собой вертикальные емкости различной вместимости (малые – от 1 до 10 л, многотоннажные – более 1000 л) с минимальным числом штуцеров и передающих устройств, в которых обеспечиваются оптимальные гидродинамические и массообменные условия. Биореакторы изготавливают из высоколигированных марок стали, иногда из титана. Внутренняя поверхность биореактора должна быть отполирована.

Ферментеры снабжены паровой рубашкой, мешалками, барботерами, стерилизующими воздушными фильтрами, отбойниками, обеспечивающими необходимые температурный, газовый режим, гидродинамическую обстановку в биореакторе (т.е. процессы массо- и теплообмена).

В биореакторах имеются пробоотборники для отбора проб культуральной жидкости в процессе биосинтеза. Могут быть и другие конструктивные особенности, учитывающие специфику биотехнологического процесса.

Работа отдельных узлов контролируется измерительными приборами, фиксирующими как параметры технологического процесса, так и отдельные физико-химические показатели культивирования (температуру стерилизации и культивирования, скорость вращения мешалки, давление, расход воздуха или газов на аэрацию, пенообразование, pH, eH, pO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub> среды).

На процесс культивирования микроорганизмов и клеток влияют тип биореактора, чистота обработки внутренних стенок аппарата и отдельных его узлов, емкость, коэффициент заполнения, поверхность теплоотдачи,

способ отвода тепла, тип перемешивающих, аэрирующих устройств, арматура и запорные приспособления, способ пеногашения, – далеко не полный перечень отдельных элементов.

Наиболее сложна и специфична аппаратура для ферментационной стадии. Технически наиболее сложным процессом ферментации является аэробный глубинный стерильный непрерывный (или с подпиткой субстратом). Аппараты для поверхностной и анаэробной ферментации менее сложны и энергоемки.

Многочисленность методов культивирования, чрезвычайное многообразие используемых биологических агентов привели к огромному разнообразию конструктивных решений биореакторов, отличающихся по конструкции, принципу работы и размерам, которые зависят от ряда факторов: типа продуцента и среды, технологии и масштабов производства, целевого продукта и пр.

Биотехнологические процессы (в отличие от чисто химических) характеризуются следующими особенностями:

- чувствительность биологических агентов к механическим воздействиям;
- наличие межфазового переноса веществ (по типу «жидкость – клетки», «газ – жидкость – клетки»);
- требование условий асептики;
- низкая скорость протекания многих процессов в целом;
- нестабильность целевых продуктов;
- пенообразование;
- сложность механизмов регуляции биосинтеза.

*Аппараты для анаэробных процессов* применяются в процессах конверсии растительного сырья, а также различных других отходов. При метановом брожении для получения биогаза, а также в ряде других процессов (получения ацетона, шампанских вин) используют ферментационные аппараты (метантенки). Эти аппараты имеют различную конструкцию (от простой выгребной ямы до сложных металлических дайджестеров или железобетонных сооружений) и объемы (от нескольких до сотен кубометров). Данные аппараты оборудованы системой подачи сырья, системой теплообменных труб для стабилизации температуры, несложным перемешивающим устройством для гомогенного распределения сырья и биомассы продуцента, газовым колпаком и устройством переменного объема (газгольдером) для сбора образуемого биогаза.

*Аппараты для аэробной поверхностной ферментации* широко применяются для производства органических кислот (жидкофазные) и ферментов (твердофазные).

Поверхностная жидкофазная ферментация протекает в так называемых бродильных вентилируемых камерах, в которых на стеллажах размещены плоские металлические кюветы. В кюветы наливают жидкую питательную среду, высота слоя составляет 80-150 мм, затем с потоком пода-

ваемого воздуха среду инокулируют порами продуцента. В камере стабилизируется влажность, температура и скорость подачи воздуха. После завершения процесса культуральная жидкость сливается из кювет через смонтированные в днища штуцеры и поступает на обработку.

При твердофазной ферментации процесс также протекает в вентилируемых камерах, но вместо кювет на стеллажах размещают лотки, в которые насыпают сыпучую твердую среду слоем 10-15 мм. Для лучшей аэрации среды подаваемый в камеру воздух проходит через перфорированное днище лотков.

*Аппараты для аэробной глубинной ферментации* наиболее сложны как конструктивно, так и с точки зрения их эксплуатации. Главная задача, возникающая при их конструировании, – обеспечение высокой интенсивности массо- и энергообмена клеток со средой. Массообмен определяется транспортом (переносом) кислорода и других биогенных элементов из среды в микробную клетку и отводом из нее продуктов обмена.

Главным показателем массообменных характеристик ферментера служит коэффициент массопередачи кислорода, т.к. кислород является основным лимитирующим фактором аэробных ферментационных процессов. Расход кислорода на образование 1 кг биомассы, в зависимости от типа углеродосодержащего сырья и степени его восстановленности, может составлять от 0,75 до 5,00 кг. Клетки способны утилизировать кислород только в растворенном виде, поэтому необходимо постоянно поддерживать его концентрацию в культуре на уровне, оптимальном для конкретного продуцента. При этом скорость поступления кислорода к клеткам должна превышать скорость его включения в клетки, и в околклеточном пространстве не должно возникать так называемых «концентрационных ям».

Кроме этого, концентрации клеток и растворенного субстрата должны быть равномерными по всему объему ферментера. Поэтому перемешивание является также одним из основных факторов, обеспечивающих требуемую гидродинамическую обстановку в аппарате.

При интенсивном перемешивании пузырьки воздуха дробятся в аппарате и, диспергируясь, увеличивают площадь контакта фаз «среда – клетка». Однако очень сильное перемешивание может вызвать механическое повреждение биологических объектов.

В зависимости от подвода энергии для перемешивания ферментационные аппараты для аэробной глубинной ферментации подразделяются на 3 группы (таблица 5.1).

- ферментеры группы ФГ (с подводом энергии газовой фазой);
- ферментеры группы ФЖ (с подводом энергии жидкой фазой);
- ферментеры группы ФЖГ (комбинированные).

В *ферментерах группы ФГ* подвод энергии в аппарат осуществляется через газовую фазу, которая является ее носителем. Ферментеры характеризуются достаточно простой конструкцией (отсутствуют трущиеся, движущиеся узлы), высокой эксплуатационной надежностью, но имеют не очень высокие массообменные характеристики (коэффициент массопере-

дачи кислорода – менее 4 кг/м<sup>3</sup>·ч). Данные аппараты представляют собой вертикальную емкость, снабженную газораспределительным устройством одного из известных типов.

В ферментерах группы ФЖ подвод энергии осуществляется жидкой фазой, обычно самовсасывающими мешалками или насосами; в последнем варианте жидкость вводится в аппарат через специальное устройство (сопло, эжектор, диспергатор). Данные аппараты наиболее сложны по конструкции и энергоемки, но обеспечивают более высокие по сравнению с группой ферментаторов ФГ значения коэффициента массопередачи кислорода (свыше 6 кг/м<sup>3</sup>·ч).

В ферментерах группы ФЖГ (с подводом энергии газовой и жидкой фазы) основными конструкционными элементами являются перемешивающие устройства всех известных типов, а также наличие в совокупности насосов и перемешивающих устройств. Это могут быть аппараты с группой самовсасывающих мешалок и насосом для перекачивания культуральной жидкости и другие сочетания перемешивающих и аэрирующих устройств. Коэффициент массопереноса кислорода в таких ферментерах может в принципе иметь любое из известных значений.

Ферментеры периодического действия из групп ФЖГ применяют в промышленности для получения антибиотиков, витаминов и других биологически активных веществ. Их конструкции обеспечивают стерильность ферментации в течение длительного времени (нескольких суток) при оптимальных условиях для роста и жизнедеятельности продуцента.

**Таблица 5.1 – Характеристика ферментеров по способу ввода энергии для перемешивания**

Ферментеры	Характеристика конструкции аппарата	Тип аппарата
Ферментеры с подводом энергии газовой фазой (ФГ)	Простота конструктивного оформления и высокая надежность в связи с отсутствием движущихся узлов и деталей	- барботажный; - барботажно-эрлифтный; - колоночный (колоночный); - форсуночный
Ферментеры с подводом энергии жидкой фазой (ФЖ)	Обычно энергия передается жидкой фазе самовсасывающейся мешалкой или насосом	- эжекционный; - с циркуляционным контуром; - с всасывающей мешалкой
Ферментеры комбинированные (ФЖГ)	Основным конструктивным элементом является перемешивающее устройство, обеспечивающее высокую интенсивность растворения кислорода и высокую степень диспергирования газа. В то же время энергия газовой фазой выводится обычным способом	- барботажный с механическим перемешиванием

Прогресс в области получения клеточных и рекомбинантных культур выдвигает специальные требования к биореакторам. При этом на первый план выдвигаются такие показатели, как стабильность биологических агентов, повышенные требования к асептике, лимитация срезовых условий при перемешивании и др.

Для стерилизации биореактора применяют пар под давлением. Внутри биореактора не должно быть «мертвых зон», недоступных для пара во время стерилизации. Стерилизации подлежат все клапаны, датчики, входные и выходные отверстия.

Стерильность обеспечивается и герметизацией биотехнологического оборудования, работающего в асептических условиях. Стерильная передача жидкости осуществляется через штуцеры парового затвора.

Технологическая обвязка биореактора исключает контаминацию культуральной жидкости посторонней микрофлорой и возможности попадания продуктов биосинтеза в окружающую среду.

Очистка воздуха от микроорганизмов и аэрозольных частиц осуществляется через фильтры предварительной очистки (комбинированные глубинные фильтры – бумага, картон, тканевые материалы), которые устанавливают на всасывающей линии перед компрессором (воздух очищается от частиц размером более 5 мкм) и фильтры тонкой очистки (ткань ФП, удаляющая частицы размером до 0,3 мкм, металлокерамические и мембранные фильтры).

Выбор фильтрующего материала зависит от объекта фильтрации и Z-потенциала суспендированных частиц.

Отработанный воздух, отводимый из лабораторных и производственных помещений, контролируется на чистоту (отсутствие микроорганизмов).

Для обслуживания установок глубинного культивирования применяют автоматизированную модульную систему, включающую следующие элементы:

- металлокерамические и титановые фильтрующие элементы, предназначенные для очистки и стерилизации воздуха и пара;
- модули технологической обвязки, содержащие автономную систему термостатирования, запорную и регулирующую арматуру, индивидуальные входные и выходные фильтры, электропневмообразователи и другие регулирующие устройства;
- блок автоматического контроля и управления, содержащий программное устройство, преобразователи сигналов от измерительных электродов, газоанализаторы для измерения физических характеристик;
- системы цифровой и диаграммной индикации текущих параметров культивирования.

Установки глубинного культивирования снабжены блоками дистанционного измерения давления в биореакторе и его рубашке, блоками дис-

танционного контроля интенсивности аэрации воздухом или газовой смесью (кислорода и азота, кислорода и углекислого газа, воздуха и углекислого газа, азота и углекислого газа).

Блок автоматического управления позволяет контролировать и поддерживать на заданном уровне программную стерилизацию биореактора и арматуры, скорость вращения мешалки и дистанционный контроль открытия или закрытия вентилей и регулирующих клапанов.

## ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

### Задание 1

Изучить принципиальную схему устройства биореактора

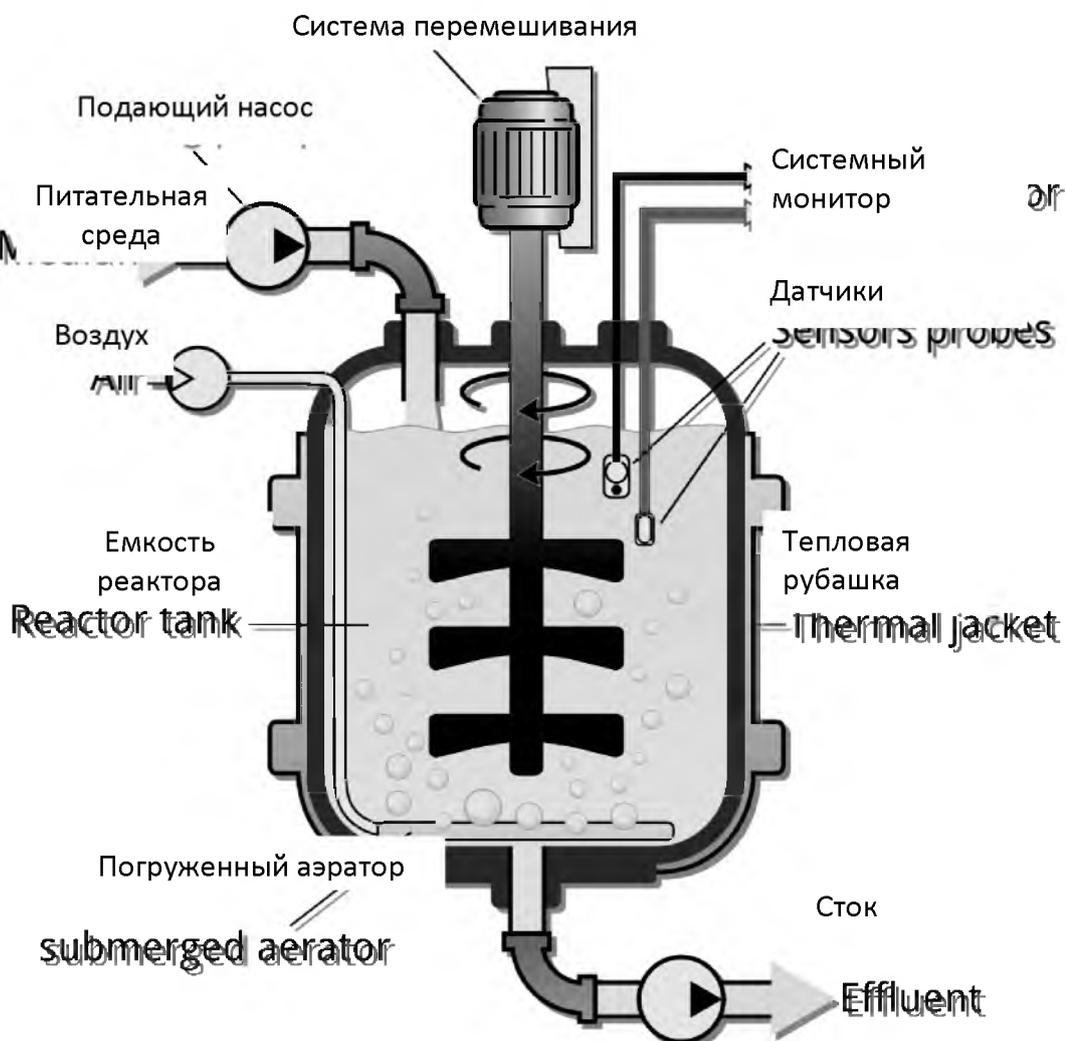


Рисунок 5.1 – Схема устройства биореактора (<https://upload.wikimedia.org>)

## Задание 2

### Изучить особенности ферментеров с подводом энергии к газовой фазе

**Барботажный реактор.** Газораспределительное устройство данного типа обычно устанавливается в нижней части аппарата; подаваемый сверху через распределительную трубу воздух, пройдя через барботер, насыщает кислородом толщу среды.

Коэффициент массопереноса кислорода невысок, 1-2 кг/м<sup>3</sup>·ч.

**Барботажно-колонный реактор.** В нижней части корпуса такого аппарата устанавливается перфорированная пластина с диаметром отверстий 0,0005 м или сопловой эжектор с диаметром сопла 0,004 м.

**Барботажно-эрлифтный реактор.** Характеризуется наличием внутри одного или нескольких диффузоров («стаканов») или нескольких перегородок для принудительного разделения восходящих и нисходящих потоков циркулирующей жидкости; эти элементы расположены равномерно по сечению аппарата или концентрично.

**Газлифтный колонный реактор.** Состоит из 2 колонн разного диаметра, соединенных между собой; одна представляет собой барботажную колонну с восходящим потоком воздуха, другая – циркуляционную с нисходящим потоком.

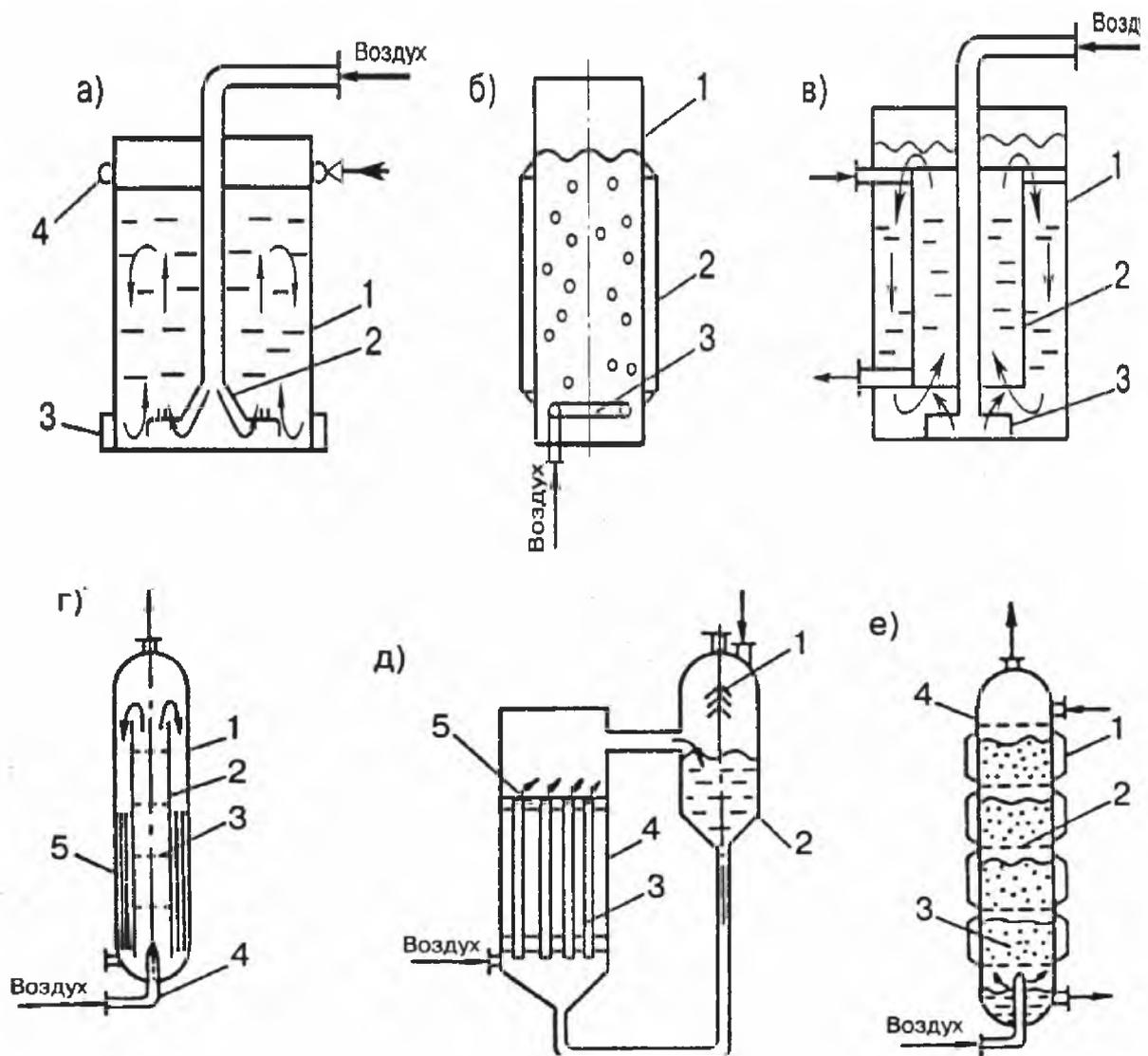
Воздух вводится в нижнюю зону аппарата, в барботажную колонну; камера, соединяющая колонны в верхней части аппарата, образует большую поверхность контакта фаз.

**Трубчатый реактор.** Сконструирован по типу теплообменных труб; взаимодействие газа в трубе при высоких скоростях продувки более интенсивное, чем в большом объеме, поэтому массообмен интенсивнее.

**Реактор с плавающей насадкой.** Позволяет интенсифицировать массообмен за счет увеличения поверхности контакта фаз и турбулизации жидкости при работе с большими скоростями подачи газовой и жидкой фаз.

В аппарат введены секционные элементы в виде решеток, оборудованных лопастной насадкой; в центре аппарата находится труба, через которую вводится воздух, а жидкая фаза поступает противотоком сверху.

Газ, поступая в лопастную насадку, сделанную обычно из полиэтилена, вращает ее; это существенно увеличивает поверхность контакта газовой и жидкой фаз.



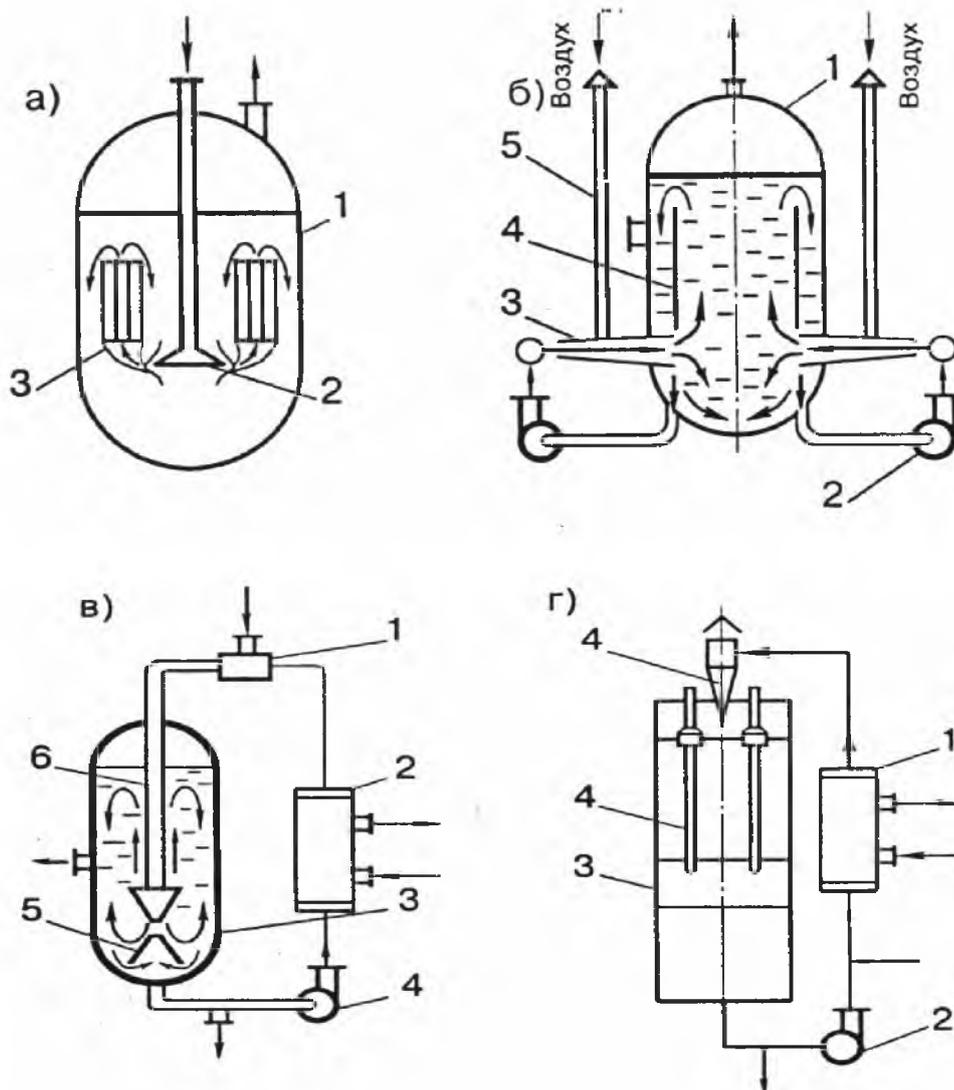
- а) барботажный:** 1 – корпус, 2 – воздухораспределитель, 3 – карман, 4 – коллектор; **б) барботажно-колонный:** 1 – корпус, 2 – рубашка, 3 – воздухо-распределитель; **в) барботажно-эрлифтный:** 1 – корпус, 2 – диффузор-теплообменник, 3 – воздухораспределитель; **г) газлифтный:** 1 – корпус, 2 – диффузор, 3 – диспергатор, 4 – воздухораспределитель, 5 – теплообменник; **д) трубчатый:** 1 – пеногаситель, 2 – емкость, 3 – трубы, 4 – корпус, 5 – распределительная перегородка; **е) с плавающей насадкой:** 1 – рубашка, 2 – тарелка, 3 – насадка, 4 – корпус

**Рисунок 5.2 – Схема устройства ферментеров с подводом энергии газовой фазой**

(Виестур и др., 1986)

### Задание 3

**Изучить особенности ферментеров с подводом энергии к газовой фазе**



*а) с самовсасывающей мешалкой: 1 – корпус, 2 – мешалка, 3 – циркуляционный контур-обменник; б) эжекционный: 1 – корпус, 2 – насос, 3 – эжектор, 4 – диффузор-теплообменник, 5 – воздухозаборник; в) струйный с затопленной струей: 1 – эжектор, 2 – теплообменник, 3 – корпус, 4 – насос, 5 – рассекатель, 6 – труба с насадкой; г) струйный с падающей струей: 1 – теплообменник, 2 – насос, 3 – корпус, 4 – эжектор*

**Рисунок 5.3 – Схема устройства ферментеров с вводом энергии жидкой фазой**

*(Виестур и др., 1986)*

**Реакторы с самовсасывающими мешалками.** Не требуют специальных воздуходувных машин, т.к. поступление в них воздуха происходит в результате разрежения в воздушной камере мешалки, соединенной с воздухопроводом и с жидкостью, отбрасываемой лопатками мешалки.

В **эжекционных реакторах** возможна рециркуляция газовой фазы, что экономит субстрат, однако требуется наличие специальных насосов для перекачки газосодержащей культуральной среды.

Применение эжекционного ввода газовых субстратов в ферментер может интенсифицировать массообмен на порядок.

**Струйные реакторы (с затопленной или падающей струей).** Оборудуются мощными насосами, которые забирают культуральную жидкость из нижней части аппарата и через напорный трубопровод подводят поток к аэрирующему устройству (по типу шахтного перепада или напорно-струйные).

Струя жидкости под давлением свободно падает сверху и пронизывает аэрируемую жидкость до дна аппарата. Происходит интенсивная турбулизация и перемешивание жидкости. Внизу жидкость вновь засасывается насосом и снова подается вверх аппарата, т.е. возникает замкнутый контур циркуляции. Недостатком данных аппаратов являются потери энергии при перекачке жидкости, трудности проектирования в связи с отсутствием надежных методик расчета конструкций и режимов работы струйных и эжекционных устройств.

### **Контрольные вопросы**

1. Что является основным аппаратурным элементом биотехнологического производства?
2. Какие требования предъявляются к биореакторам, используемым для культивирования микроорганизмов?
3. Какие типы биореакторов-ферментеров применяются в биотехнологическом производстве и чем они характеризуются?

## *Тема 6*

### **СЛАГАЕМЫЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА**

**Цель занятия:** ознакомиться с явлениями и процессами, составляющими биотехнологическое производство.

**Время, отводимое на изучение темы:** 4 часа.

#### **ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ**

##### **Массообменные процессы**

*Массообменные процессы* – это такие технологические процессы, скорость протекания которых определяется скоростью переноса вещества (массы) из одной фазы в другую конвективной и молекулярной диффузией. Движущей силой массообменных процессов является разность концентраций распределяемого вещества во взаимодействующих фазах.

В биосистемах массообмен связан с доставкой кислорода к клеткам, выведением углекислоты и транспортом различных соединений через мембраны клеток.

При выращивании биообъекта в ферментере образуется сложная система массопереноса кислорода: газ – жидкость – твердое тело (т.е. биообъект). Эту систему можно разделить на 3 части: газ – жидкость, жидкость – жидкость и жидкость – твердое тело.

В этих системах перемещение кислорода будет неравноценным и зависит от растворимости газа в жидкой фазе, мощности барботажа, размеров пузырьков, скорости вращения вала и формы мешалки, химического состава питательной среды, температуры и т.д. Поэтому необходим постоянный контроль содержания кислорода в среде, который осуществляют с помощью специальных приборов, обеспечивающих поддержание необходимого уровня растворимого кислорода.

Кислород нередко действует как реагент, а избыток растворенного кислорода может быть токсичен для биообъекта, т.к. кислород способен образовывать свободные радикалы (супероксидный, пероксидный, гидроксильный и синглетный), которые имеют высокую химическую активность и являются потенциальными разрушителями липидов, белков и нуклеиновых кислот. Защита клеток от негативного действия свободных радикалов кислорода осуществляется с помощью ферментов супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы, а также витамина Е.

Для эффективного переноса кислорода необходимо добиваться разности его концентрации в направлении от газового пузырька к клетке. С этой целью, учитывая низкую растворимость кислорода в воде и водных растворах, приходится подавать его в биореактор в повышенных количествах.

Следует добиваться, чтобы все аэробные клетки были насыщены кислородом. Причем общая потребность в кислороде достигает максимума в

конце фазы логарифмического роста и начале стационарной фазы. Это означает, что удельная скорость размножения клеток достигает своего пика раньше, чем скорость использования кислорода.

Эффективная и адекватная доставка кислорода к биообъекту зависит от морфофункциональных особенностей культивируемого микроорганизма и условий его выращивания.

Скорость потребления кислорода биообъектом зависит от следующих факторов:

- возраст культуры (размножающиеся клетки потребляют больше кислорода);
- межклеточная адгезия (конгломераты клеток потребляют меньше кислорода, чем отдельные клетки);
- скорость накопления биомассы клеток (чем она выше, тем быстрее скорость поглощения кислорода);
- динамические изменения питательной среды (большая вязкость снижает поступление кислорода к клеткам);
- качество источников питания (отношение количества потребляемого кислорода к количеству превращенной глюкозы всегда меньше, чем аналогичное соотношение при окислении углеводородов из нефти);
- продукты метаболизма (секретируемые белки снижают массопередачу кислорода);
- используемые пеногасители (лаурилсульфат натрия снижает коэффициент массопередачи кислорода).

В биосистемах массообмен связан не только с доставкой кислорода к клеткам, но и выведением углекислоты и транспортом различных соединений через мембраны клеток.

Диоксид углерода может находиться в среде в виде карбоната, гидрокарбоната, угольной кислоты и углекислого газа. Растворимость диоксида углерода зависит от рН жидкости. Диоксид углерода транспортируется через границу раздела фаз «газ – жидкость» только в растворенном виде.

Транспорт питательных веществ через мембраны клеток осуществляется пассивной диффузией, облегченной диффузией, за счет активного транспорта, а в ряде случаев у эукариот – путем эндоцитоза.

## Теплообменные процессы

**Теплообмен** – это перераспределение тепловой энергии между взаимодействующими фазами.

Термостатирование ферментативного процесса, т.е. подвода или отвода тепла в ходе ферментации, является важной проблемой для многих биотехнологических производств. Это связано как с выделением значительного количества тепла при культивировании микроорганизмов, так и с узким температурным оптимумом роста культуры.

Узкий диапазон температур обуславливается резким спадом активности ферментов при снижении температуры, а также денатурацией биомолекул при значительном повышении температуры.

Поэтому в биотехнологических процессах всегда, с одной стороны, требуется подача тепла (стерилизация, культивирование анаэробов при +55...+56°C), а с другой – отведение тепла, образующегося в ферментере.

В ферментерах 40-50% тепла образуется за счет жизнедеятельности продуцента, а также в результате работы мешалки. Еще одним источником тепла является горячий стерильный воздух, который необходим для аэробных микроорганизмов. При барботаже он мгновенно охлаждается и отдает превнесенное тепло.

Теплообмен зависит от следующих факторов:

- ламинарное и турбулентное движение теплоносителя;
- толщина и качество материала стенок биореактора;
- вязкость среды, скорость потока при полунепрерывном и непрерывном способах культивирования биообъектов;
- характер охлаждения биореактора.

Расчет и оптимизация системы теплообмена усложняется тем, что в биореакторе много контактирующих поверхностей: между клеткой и питательной средой, между средой и стенкой аппарата, между стенкой и охлаждающей жидкостью рубашки биореактора, между рубашкой и наружной средой и т.д.

Большинство биотехнологических процессов протекает при температуре +30...+50°C (мезофильные условия). Поэтому всегда необходим отвод тепла, особенно в биореакторах, в которых выращивают аэробные клетки. Для отвода тепла используют рубашки аппаратов, змеевики, которые монтируют внутри биореактора, выносные теплообменники и др.

Для поддержания теплового режима в ферментере чаще всего используют артезианскую воду температурой +12...+15°C или смесь артезианской и оборотной воды, т.е. воды, которая прошла через ферментер, с температурой +18...+20°C. Используют также «захоложенную» воду (с температурой +10°C), получаемую на специальных установках.

### **Пенообразование и пеногашение**

В процессе выращивания аэробных микроорганизмов, который сопровождается подачей воздуха в ферментер и перемешиванием среды, наблюдается сильное пенообразование. Возникновение пены в процессе биосинтеза обусловлено введением газовой фазы, а также содержанием в среде питательных субстратов, солей, продуктов метаболизма микроорганизмов и поверхностно-активных веществ (ПАВ).

В чистой воде и других химически чистых жидкостях пены не бывает. Молекулы ПАВ образуют пленки на поверхности газовых пузырей, затрудняя их коалесценцию (слияние нескольких мелких пузырьков) и раз-

рушение. В стойких пенах длительность существования пузырька составляет от 1 до 15 мин.

Пена в процессах культивирования микроорганизмов играет двойную роль: способствует повышению скорости абсорбции кислорода в среде вследствие образования большой поверхности массообмена, а также вынуждает снижать коэффициент заполнения ферментера жидкостью. Кроме того, может произойти выброс пены с выходящим воздухом, что приводит к потерям продукта и опасности инфицирования культуры.

От эффективности способов пеногашения зависят такие технологические показатели, как выход продукции с 1 м<sup>3</sup> культуральной жидкости и ее себестоимость.

Самопроизвольный распад монодисперсных пен (с пузырьками равных размеров) происходит равномерно. Полидисперсные пены разрушаются быстрее, но неравномерно.

В настоящее время имеются разнообразные средства как для разрушения пены, так и для предупреждения ее образования.

Чтобы предупредить образование пены в процессе культивирования можно удалить вспениватели из исходной питательной среды, вводя в нее адсорбенты (активный уголь, иониты), которые связывают белковые пенообразователи.

При составлении питательной среды целесообразно выбирать такие компоненты, которые имеют меньшую склонность к вспениванию. На вспениваемость некоторых питательных сред влияют не только состав, но и условия обработки (температура, длительность стерилизации и количество вносимого посевного материала), что необходимо учитывать при отработке технологии биосинтеза. Однако полностью избежать образования пены в процессах микробиологического синтеза все же не удастся.

Для регулирования уровня пены при культивировании микроорганизмов и предотвращения ее выброса из ферментера используют следующие методы:

1. Удаление из культуральной жидкости пенообразователей и воздействие на пену химическими и физико-химическими средствами:
  - использование питательных сред с пониженными пенообразующими свойствами;
  - добавление веществ, связывающих пенообразователи в поверхностно-неактивные комплексы;
  - добавление ПАВ, уменьшающих прочность пленок пены.
2. Разрушение пены механическими, гидро- и аэродинамическими способами:
  - ударное воздействие поверхностей деталей и элементов;
  - воздействие жидкости или газа;
  - сепарирование пены инерционными, центробежными и другими методами;

- резкое изменение давления газа в пене;
  - захват и разрушение пены потоками перемешиваемой жидкости.
3. Разрушение пены при физических воздействиях:
    - колебания звуковой и ультразвуковой частоты;
    - термическое пеногашение острым паром или при помощи нагретой жидкости;
    - электрическое пеногашение.
  4. Стабилизация уровня пены путем:
    - временного уменьшения расхода аэрирующего воздуха;
    - отключения механической мешалки;
    - вывода избыточной пены из аппарата.
  5. Комбинированные воздействия.

На практике применяются в основном химические и механические способы пеногашения, а также их сочетания.

**Химический метод пеногашения** состоит в добавлении в исходную питательную среду и (или) в культуральную жидкость по ходу ферментации специальных веществ-пеногасителей.

Химические пеногасители могут быть жировые (натуральные), и синтетические.

Действие *жировых пеногасителей*, к которым относятся легкоплавкие животные жиры (костный, свиной и др.), растительные масла (подсолнечное, соевое, оливковое и др.), основано на том, что в процессе самопроизвольного эмульгирования в ферментационных жидкостях жиры адсорбируют пенообразователи. Жиры, не обладающие способностью к эмульгированию, обычно не обладают пеногасящими свойствами.

Физико-химические и пеногасящие свойства жиров зависят главным образом от жирнокислотного состава. Важное значение имеет температура плавления жира: если она выше +60°C, то жир не обладает пеногасящим действием из-за неспособности к эмульгированию в процессе ферментации. Особенность жировых пеногасителей состоит в том, что они одновременно могут быть источником углеродного питания для микроорганизмов. Оптимальный режим добавления пеногасителей с учетом их влияния на выход целевого продукта приходится подбирать индивидуально для каждого процесса.

Натуральные пеногасители обладают следующими недостатками:

- большой расход жировых пеногасителей (0,5-2,5% к объему питательной среды), являющихся ценным пищевым сырьем;
- высокая стоимость;
- добавление больших количеств жира в процессе ферментации затрудняет последующие процессы фильтрации и выделения целевого продукта;
- резкое снижение качества животных жиров при длительном хранении;

- непостоянный химический состав и, следовательно, технологические свойства жировых пеногасителей в различных партиях.

Действие *синтетических пеногасителей*, к которым относятся кремнийорганические полимеры (силоксаны), четырехзамещенные аммониевые основания, алкиламиносульфонаты, сложные эфиры, спирты и др., заключается в полном или частичном вытеснении молекул пенообразователя с поверхности пленок пены. Следовательно, пеногасители должны обладать большей поверхностной активностью, чем содержащиеся в культуральной жидкости пенообразователи. Поэтому пеногасители, как правило, нерастворимы в воде и в культуральной жидкости.

Синтетические ПАВ содержат гидрофильную группу, определяющую диссоциацию в культуральной жидкости. Большинство синтетических ПАВ рекомендуется использовать не в чистом виде, а в смеси с подходящим носителем (чаще всего свиным жиром или парафиновым маслом). Чем медленнее происходит высвобождение молекул ПАВ из носителя, тем выше его эффективность. На эффективность действия химических пеногасителей влияет степень их диспергирования в ферментационной среде. Применяют механические способы диспергирования, нередко для лучшего распределения применяют эмульсии пеногасящих препаратов.

Химические пеногасители часто вызывают нежелательные побочные явления, поэтому следует проводить биосинтез с минимальным расходом таких пеногасителей, а пену разрушать механическим способом.

***Механические методы пеногашения*** основаны на том, что при контакте рабочего органа с пузырьками происходит их разрушение, уменьшение их в размере или происходит отброс уплотненной эмульсии в более отдаленные зоны, при этом выделяется газ (обработка в центробежном поле).

Механические методы пеногашения, в отличие от химических, не оказывают ингибирующего воздействия на культуру микроорганизмов. Однако их применение связано с большими затратами энергии, которые не всегда достаточно эффективны.

На практике обычно механические устройства для пеногашения применяют в сочетании с химическими пеногасителями. При этом достигается наилучший эффект пеногашения.

Пеногасящее устройство может быть смонтировано в ферментер или присоединено к нему.

В биотехнологическом производстве широко применяются пеногасители, имеющие пакет конических тарелок на полом валу. Пеногаситель устанавливают на самостоятельном валу, который не зависит от вала системы перемешивания. Устройства работают как в лабораторных, так и в пилотных и промышленных аппаратах. Пеногасители с коническими тарелками особенно рекомендуются для гашения мелкодисперсной пены, которая плохо поддается механическому разрушению. В этой ситуации наи-

более эффективно сепарирование системы в центробежном поле (на поверхности сепарационных тарелок).

Известны конструкции пеногасителей с рабочими органами на горизонтальном валу.

Для разрушения пены используют также центробежные насосы и специальные насосы Фогельбуша для двухфазных смесей.

Разработаны ферментеры, в которых перемешивание и пеногашение обеспечивает одно устройство. В таких ферментерах концентрично приводному валу пеногасителя-мешалки установлена коническая воронка. Пена, переливаясь через верхний край воронки, стекает вниз на лопасти мешалки, где разрушается.

К статическим механическим устройствам для пеногашения относятся циклоны, вихревые сепараторы, пеноразрушающие колонны и отстойники.

### **Подготовка стерильного воздуха**

При культивировании микроорганизмов в глубинных условиях требуется непрерывная подача стерильного воздуха в ферментеры для аэрации культуральной жидкости. Воздух, подаваемый в ферментер, не только снабжает растущую культуру кислородом, но и отводит газообразные продукты обмена и физиологическое тепло, выделяемое микроорганизмами в процессе развития, позволяет достигать однородности микробной суспензии, увеличивает скорость массопередачи и перемешивания жидкой питательной среды.

Так как использование кислорода с экономической точки зрения не оправдано и не безопасно, то в связи с этим рекомендуется применять воздух. Забор воздуха, который под давлением поступает в ферментер, производится непосредственно на территории предприятия (в ферментер объемом  $50 \text{ м}^3$  подается стерильный воздух порядка  $3000 \text{ м}^3$  в час, а время ферментации измеряется несколькими сутками).

В воздухе атмосферы содержатся пары воды, мелкодисперсные частицы, клетки и споры микроорганизмов. В технологическом воздухе находится до 4,5% актиномицетов, 33,5% кокков, 22,5% палочек, 18,7% спор бацилл и 8,1% плесневых грибов. Такой состав микроорганизмов в воздухе непостоянен и зависит от времени года, погодных условий, места расположения предприятий, высоты забора воздуха и т.д. Поэтому очистка воздуха является одной из важных задач биотехнологии.

Обработку технологического и вентиляционного воздуха необходимо рассматривать как элемент технологии, играющий существенную роль в обеспечении выпуска продукции высокого качества.

Очистка и стерилизация воздуха достигаются различными способами, предусматривающими, прежде всего, уничтожение микроорганизмов или их отделение.

В процессах микробиологического синтеза воздух, подаваемый на аэрацию, должен быть очищен на 99,99% от примесей и микроорганизмов размером до 1 мкм. Это требование заставляет отказаться от многих методов газовой очистки (седиментация, механическая фильтрация, инерционные и центробежные методы, аппараты мокрой очистки) как неэффективных, обеспечивающих удаление только грубых частиц.

Наибольшее распространение получил метод фильтрации воздуха через волокнистые (маты, бумага, картон), пористые (полимеры, металло-керамика) или зернистые материалы. Такие материалы недорогостоящи в изготовлении и обладают высокой эффективностью стерилизации. Несмотря на то, что волокнистые фильтры имеют диаметр не менее 5 мкм и слабое уплотнение (промежутки не менее 50 мкм), они легко задерживают большинство микроорганизмов со средним размером около 1 мкм.

Применение электрофильтров дает возможность очистить воздух только на 85-99%.

Системы стерилизации воздуха классифицируются по технологическим признакам:

- подготовка и подача воздуха или смеси газов на аэрацию культуральной жидкости в ферментерах при аэробном культивировании;
- подготовка и подача инертных газов (диоксид углерода, азот или их смеси) для «отдувки» из культуральной жидкости газообразных продуктов, ингибирующих рост микроорганизмов при анаэробном культивировании;
- подготовка и подача сжатого воздуха (транспортного) и обеспечение вакуума для передачи микробных суспензий и стерильных жидкостей из одной емкости в другую (ферментеры, дозаторы, мерники и т.д.) или в аппараты для дальнейшей обработки (центрифуги, сепараторы, отстойники, испарители, флотаторы);
- очистка воздуха или смеси газов, отводимых от всех видов технологического оборудования.

Каждая из этих систем имеет свои особенности, но процессы стерилизации связаны общей теоретической основой.

В настоящее время широко применяется технологическая схема получения, очистки и стерилизации сжатого воздуха, включающая следующие стадии: предварительную (грубую) очистку от механических примесей, сжатие, охлаждение, отделение сконденсированных паров влаги и масла (при поршневых компрессорах), стерилизацию.

Получение сжатого, очищенного от микроорганизмов воздуха определенной температуры и влажности является сложной технологической задачей, осуществляемой в специальной системе, которая состоит из 3 частей, соединенных последовательно:

- в первой части происходит очистка атмосферного воздуха от пыли и его сжатие;
- во второй части происходит подготовка и поддержание воздуха в оптимальном термодинамическом состоянии по влажности и температуре;
- в третьей части происходит окончательная очистка воздуха (в фильтрах тонкой очистки) перед подачей в ферментеры.

Для защиты компрессора атмосферный воздух предварительно очищают от крупных частиц пыли, а затем сжимают до требуемого давления. При сжатии воздух нагревается до температуры  $+100\dots+200^{\circ}\text{C}$ , поэтому его необходимо охладить до оптимальной температуры культивирования микроорганизма-продуцента, т.к. температура воздуха, подаваемого на аэрацию, оказывает существенное влияние на накопление конечного продукта.

Поддержание определенной температуры сжатого воздуха обуславливается не только самой культурой микроорганизма, но и высоким влажностью атмосферного воздуха. При охлаждении сжатого воздуха выпадает 50-70% исходной влаги, которая увлажняет волокна аэрозольных фильтров, и эффективность их действия резко снижается. Чтобы насадки аэрозольных фильтров не увлажнялись, воздух после компрессора охлаждают до температуры  $+25\dots+30^{\circ}\text{C}$ . После отделения влаги воздух нагревается до температуры культивирования. Окончательное подсушивание воздуха может проводиться в сушилке между головным и индивидуальными фильтрами.

На предприятиях микробиологической промышленности очистка и стерилизация воздуха осуществляется с помощью системы различных фильтров: предварительной очистки периодического или непрерывного действия, грубой и тонкой очистки.

*Фильтры предварительной очистки* устанавливают на всасывающей линии перед компрессором. Путем инерционного осаждения такие фильтры очищают воздух от крупных частиц размером более 5 мкм. В фильтрующих материалах предусматриваются большие промежутки между улавливающими элементами для максимального снижения сопротивления потоку при высокой скорости фильтрации воздуха (1,5-3,0 м/с). Чтобы сухие частицы после осаждения при такой скорости потока не выносились из фильтра, его слои промасливают. Фильтры этого класса часто называют масляными, или висциновыми.

*Фильтры грубой очистки* предназначены для улавливания основной массы загрязнений, попавших в систему после прохождения фильтров предварительной очистки и компрессора, а также для удлинения срока службы фильтров тонкой очистки, выполняющих основной процесс стерилизации на стадии фильтрации. Как правило, это фильтры большой емкости. Они обслуживают несколько ферментеров и называются головными. Головной фильтр дублирует работу индивидуальных фильтров и повышает степень очистки и стерилизации воздуха.

*Фильтры тонкой очистки* и стерилизации необходимы для улавливания загрязнений, пропущенных другими фильтрами, а также попавших в систему по случайным причинам. Работа этих фильтров должна быть особенно надежной, т.к. это последняя ступень очистки и стерилизации воздуха на пути к ферментеру. Конструктивно фильтры тонкой очистки во многом похожи на фильтры грубой очистки, только они значительно меньше размерами и в них используются более эффективные фильтрующие материалы.

Для надежной работы всей технологической схемы очистки и стерилизации воздуха и ее отдельных узлов необходимы соблюдение определенных требований к технологической обвязке фильтров, поддержание определенного термодинамического режима воздуха в системе.

### **Очистка отработанного воздуха**

Для биотехнологических процессов важна не только очистка поступающего в ферментеры воздуха, но и очистка отработанного воздуха.

Воздух, удаляемый из ферментера, содержит большое количество микроорганизмов (среднее количество клеток дрожжей составляет  $3,4-3,6 \times 10^6$  в  $1 \text{ м}^3$  отработанного воздуха), а также вещества с неприятным запахом (амины, альдегиды, жирные кислоты, кетоны, спирты, эфиры и т.д.).

Для очистки такого воздуха применяют следующие методы:

- *метод каталитического дожигания*, основанный на том, что отработанный воздух при температуре  $+320...+350^\circ\text{C}$  пропускают через катализатор, состоящий из слоя пиролюзита и слоя палладиевого катализатора (эффективность очистки составляет 87-98,5%);
- *метод жидкофазного окисления*, основанный на том, что отработанный воздух орошается растворами окислителей (перманганатом калия или гипохлоритом натрия), 20%-ным раствором гидроксида натрия, водой и выбрасывается в атмосферу (эффективность очистки составляет 90-95%);
- *метод фильтрации*, основанный на использовании сетчатых фильтров, фильтрующий элемент которых изготовлен из металлических сеток трикотажного плетения с диаметром проволоки из нержавеющей стали 0,28 мм (эффективность очистки составляет 99,6%).

Выбрасываемый из ферментеров воздух имеет высокую влажность. Для отделения влаги используют жалюзийные конструкции, отличающиеся низким гидравлическим сопротивлением. Высокую эффективность при этом показывают вязаные и тканевые сетки из нержавеющей стали или термостойкого пластика (на них сепарируется около 99% влаги).

## ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

### Задание 1

#### Изучить принципиальную схему устройства комбинированной системы пеногашения

Пеногасящее устройство может быть вмонтировано в ферментер или присоединено к нему. На рисунке 6.1 показан вариант наружного устройства комбинированной системы пеногашения.

Пена со скоростью 10-14 м/с из ферментера *1* тангенциально поступает через патрубок *2* в циклонное устройство и сепарируется в кольцеобразном пространстве между корпусом циклона и вставным цилиндром *15*. Жидкость или уплотненная эмульсия стекает по патрубку *16* обратно в аппарат, а газ отводится через патрубок *10*. Непогашенная в циклонном устройстве пена гасится быстровращающимся ротором *13*, а если и этого оказалось недостаточно, то химическим пеногасителем, подаваемым из мерника с помощью специальных приборов *4* или *5* на верхнюю поверхность ротора для лучшего распыления.

Целесообразно подавать пену в механический пеногаситель, а отработанный газ – в циклон. Это позволяет полностью использовать мощность механического устройства и, кроме того, обеспечить постоянную сепарацию мелких капель из отработанного газа.

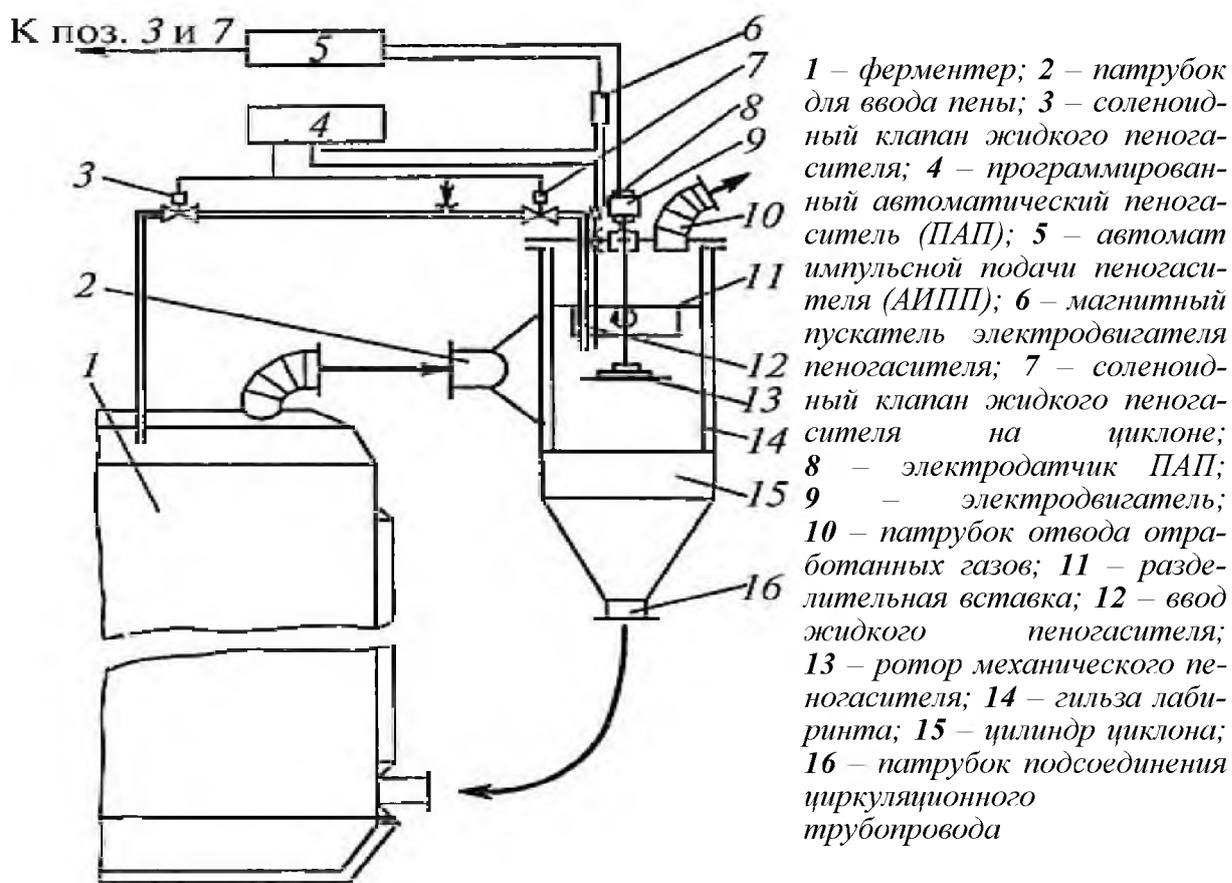


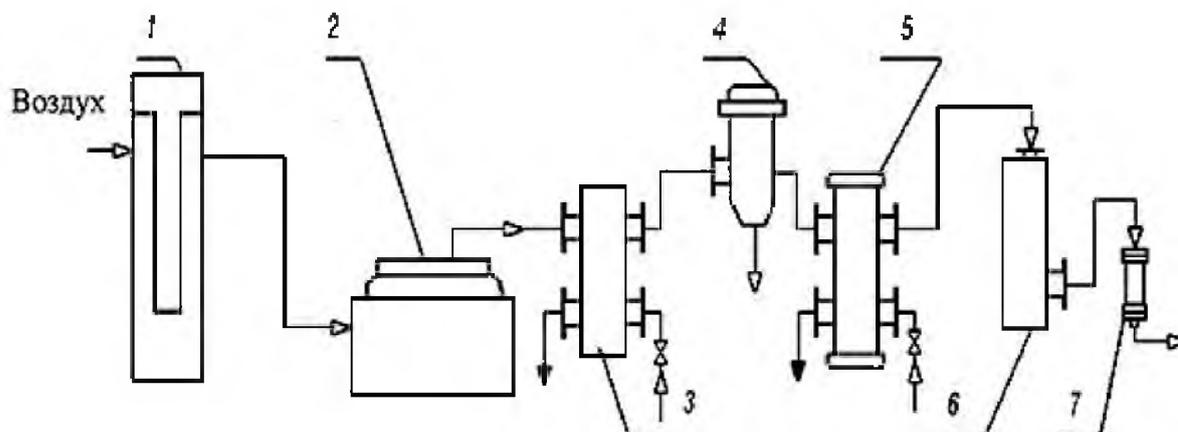
Рисунок 6.1 – Комбинированная система пеногашения

(<https://studref.com>)

## Задание 2

### Изучить принципиальную технологическую схему очистки и стерилизации воздуха

Принципиальная технологическая схема очистки и стерилизации воздуха представлена на рисунке 6.2.



1 – фильтр предварительной очистки воздуха; 2 – турбокомпрессор;  
3 – теплообменник-охладитель; 4 – влагоотделитель; 5 – теплообменник-нагреватель; 6 – головной фильтр; 7 – индивидуальный фильтр тонкой очистки

**Рисунок 6.2 – Принципиальная технологическая схема очистки и стерилизации воздуха**

*(<https://medbe.ru>)*

Воздух из воздухоразборника поступает в фильтр предварительной очистки 1. Сжатие воздуха до 350-500 кПа осуществляется в компрессоре 2, охлаждение до температуры +30...+40°C – в холодильнике 3 с последующим отделением образующегося аэрозоля во влагоотделителе 4. На входе и выходе из холодильника температура воздуха контролируется приборами. Относительная влажность воздуха и температура определяются после выхода из нагревателя 5 термодатчиком.

Принцип действия автоматического контроля параметров воздуха заключается в том, что если приборы регистрируют отклонение температуры от заданной на входе в фильтр 6, то специальные регуляторы будут воздействовать на подачу пара в нагреватель таким образом, чтобы изменить температуру воздуха до величины, определяемой регламентом.

Окончательная стерилизация воздуха осуществляется в индивидуальном фильтре тонкой очистки 7. Для оценки эффективности работы схемы очистки и стерилизации воздуха применяется метод улавливания искусственных аэрозолей. При этом используются аэрозоли жидкие (масляный туман (0,3 мкм)) и твердые (бактериальный, бихромат калия (0,6-0,8 мкм), красители метиленового синего (0,5 мкм)).

## Контрольные вопросы

1. Что понимают под термином «массообмен»? От каких факторов зависит скорость потребления кислорода биообъектом?
2. Что понимают под термином «теплообмен»? От каких факторов зависит теплообмен?
3. Чем обусловлено образование пены при ферментации? Какие методы используют для регулирования уровня пены при культивировании микроорганизмов и предотвращения ее выброса из ферментера?
4. Какими способами осуществляется очистка и стерилизация воздуха, используемого для ферментации?
5. Какими методами осуществляется очистка отработанного воздуха?

*Тема 7*  
**ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА КОНЕЧНЫХ ПРОДУКТОВ  
БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА**

**Цель занятия:** ознакомиться с методами отделения, очистки, модификации и выделения конечных продуктов биотехнологического процесса.

**Время, отводимое на изучение темы:** 4 часа.

### ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Завершающей стадией любого биотехнологического процесса является выделение и очистка целевого продукта. Эта стадия существенно различается в зависимости от того, накапливается ли необходимый продукт в самом микроорганизме, на его поверхности или выделяется в культуральную жидкость.

Культуральная жидкость, полученная в процессе выращивания микроорганизмов, представляет смесь, включающую микроорганизмы или клетки растений или животных (биомассу), растворимые продукты метаболизма, пеногаситель, компоненты питательной среды и внутриклеточные продукты биосинтеза.

В большинстве случаев культуральная жидкость не может быть использована без дальнейшей обработки. Почти во всех случаях для получения целевого продукта необходимо отделить взвешенную фазу (массу микроорганизмов) от культуральной жидкости. Накопленный в ней полезный продукт микробиологического синтеза (антибиотик, фермент, витамины и т.п.), а также биомассу микроорганизмов необходимо сконцентрировать и выделить.

Содержание микроорганизмов в культуральной жидкости, как правило, очень низкое (в 1 л содержится обычно 5-10 г сухой биомассы). Отделение такого количества взвешенной фазы представляет трудную технологическую задачу, которую приходится решать путем концентрирования биомассы различными способами.

При выборе схемы концентрирования и извлечения биомассы проводят предварительную экономическую ее оценку с учетом товарной формы биопрепаратов, концентрации микроорганизмов в культуральной жидкости и др. Очень часто выделить целевой продукт с помощью одного метода практически невозможно. Поэтому применяют комбинацию нескольких методов. Количество операций возрастает с повышением требований к чистоте продукта. Операции выделения и очистки по технологическим признакам могут быть расположены в следующей последовательности:

- отделение нерастворимых веществ;
- дезинтеграция микроорганизмов;
- выделение продуктов микробиологического синтеза;
- первичная очистка;
- вторичная очистка и концентрирование;

- кристаллизация и стабилизация.

Количество целевых продуктов биосинтеза нестабильно и подвержено влиянию различных факторов. Так, белки (ферменты) исключительно чувствительны к нагреванию, изменениям pH, а также ко многим другим физическим и химическим воздействиям. При получении биомассы (в частности, при производстве вакцин) одним из важнейших требований является максимально возможное сохранение числа клеток.

При выборе метода выделения и очистки микроорганизмов и того или иного продукта микробного синтеза необходимо учитывать следующие факторы:

- свойства культуральной жидкости (вязкость, pH, температура и др.);
- свойства выделяемого продукта (термолабильность, стойкость к различным химическим элементам и др.);
- требования к конечной форме продукта (общая и биологическая концентрация, лекарственная форма, степень чистоты и др.);
- технологические и технико-экономические показатели (выход продукта, производительность оборудования, необходимость дальнейшей обработки продукта и т.д.).

В большинстве производств переработка культуральной жидкости начинается с отделения микробной массы.

Целевыми продуктами микробного синтеза могут быть внутриклеточные биополимеры (нуклеиновые кислоты, белки, липиды), а также экзометаболиты (антибиотики, витамины, ферменты).

Некоторые компоненты можно извлечь без предварительного разрушения клеточной стенки (например, экстракцией), в других случаях (для выделения внутриклеточных биополимеров) требуется дезинтеграция клеточной массы, которую осуществляют различными методами.

Выделение целевых компонентов из сложной смеси дезинтегратов клеток является трудоемким и дорогостоящим процессом, который целесообразен в производстве только очень ценных биологически активных веществ. В биотехнологии предпочтение отдают использованию штаммов микроорганизмов, секретирующих целевой компонент. В этом случае технология получения чистых препаратов существенно упрощается.

Все методы выделения и очистки микроорганизмов и продуктов микробиологического синтеза делятся на 2 группы в зависимости от того, находится ли выделяемое вещество в растворе или в виде твердой фазы:

- если целевой продукт в виде твердой фазы, применяют такие методы выделения, как осаждение (седиментация), флотирование, фильтрация (микрофильтрация, ультрафильтрация), центрифугирование, сепарирование;
- если целевой продукт в растворенном виде, применяют такие методы выделения, как экстракция, адсорбция, кристаллизация, обратный осмос (диализ), упаривание.

В последнее время сформировалось новое и исключительно перспективное для биотехнологии направление – мембранные методы разделения сложных смесей, главной отличительной особенностью которых является наличие полупроницаемой мембраны, обладающей избирательной проницаемостью по отношению к компонентам разделяемой смеси. Мембранные технологии обладают явными преимуществами перед традиционными методами разделения:

- осуществление процесса при температуре окружающей среды без фазовых превращений и подвода тепла, что позволяет уменьшить потери термолабильных биологически активных веществ;
- малая энергоемкость;
- возможность одновременной очистки от низкомолекулярных примесей и концентрирования продуктов;
- исключение применения химических реагентов, что снижает стоимость процессов и уменьшает загрязнение сточных вод;
- универсальность – использование одной и той же установки для получения различных препаратов.

Существенным недостатком мембран является невысокая водопроницаемость, что в значительной степени связано с явлением концентрационной поляризации мембран, сущность которого заключается в формировании примембранного слоя молекул и ионов, тормозящего транспорт через мембрану низкомолекулярных соединений. На практике пропускная способность мембран составляет обычно  $20-100 \text{ дм}^3/(\text{м}^2 \cdot \text{ч})$ . Этот недостаток можно компенсировать только большой удельной поверхностью мембран в промышленных установках.

В производствах высокоактивных и дорогостоящих соединений, получаемых путем тонкого микробиологического синтеза, применяют такие современные методы разделения веществ, как гель-хроматография, аффинная и препаративная жидкостная хроматография, хроматография на молекулярных ситах. Получение готовой продукции связано с сушкой и консервированием биопрепаратов.

Для высушивания биопрепаратов применяют методы, не приводящие к потере биологической активности, самым распространенным из которых является сублимационная сушка. Использование распылительных сушилок ограничено по причине сравнительно жестких условий сушки.

Термолабильные и неустойчивые по ряду показателей биопрепараты при высушивании в суспензиях (не содержащих защитных сред) подвержены существенным структурным и морфологическим изменениям. Это может сопровождаться утратой жизнеспособности и разрушением клеточных структур.

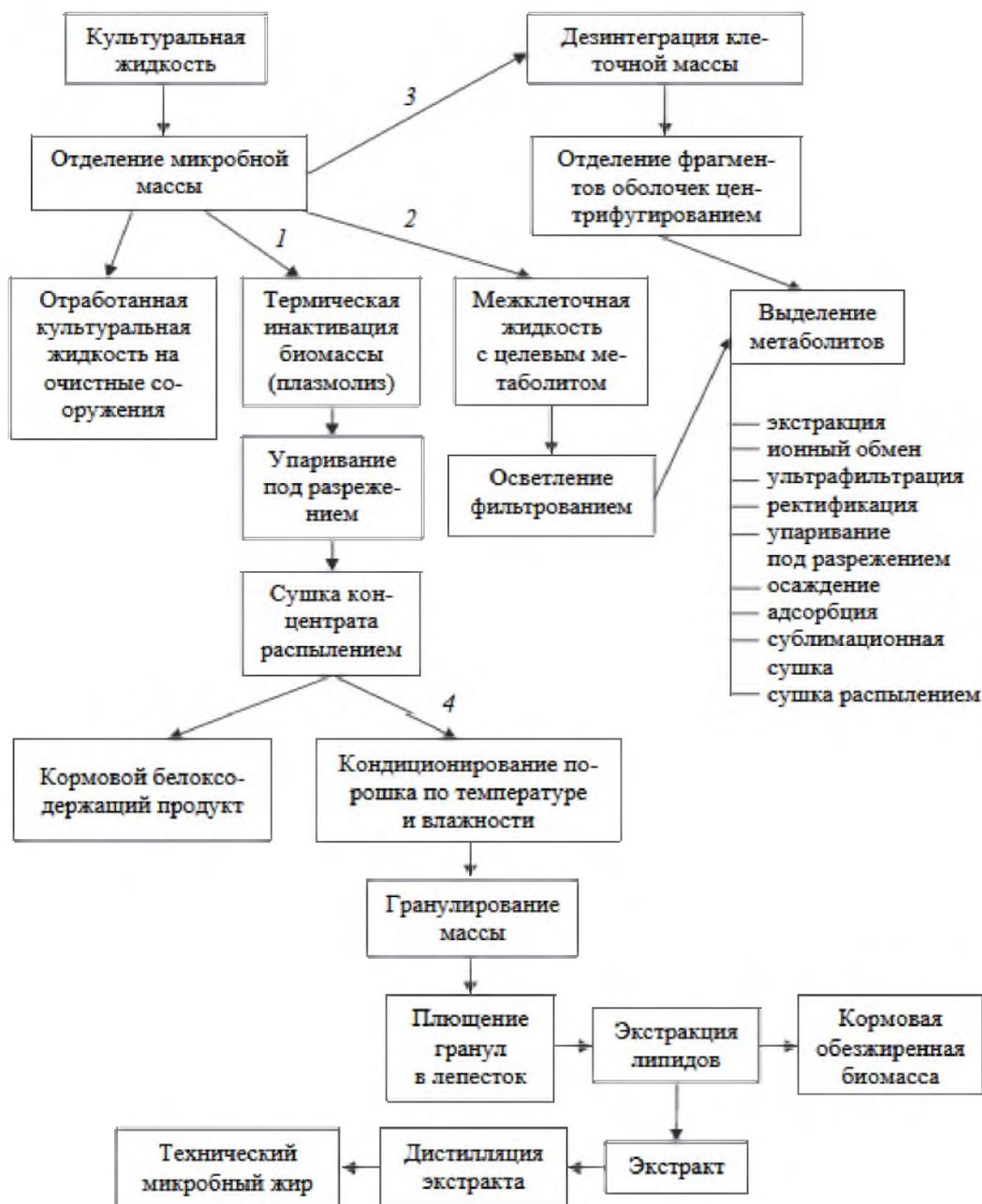
Получение готовой формы продукта завершает биотехнологическое производство. Продукт приобретает товарную форму за счет проведения

процессов гранулирования, дражирования, таблетирования, розлива или фасовки, ампулирования.

## ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

### Задание 1

Изучить схему заключительного этапа биотехнологического процесса



1 – производство кормовой биомассы; 2 – получение целевых продуктов - экзометаболитов; 3,4 – получение целевых продуктов - эндометаболитов

Рисунок 7.1 – Общая схема переработки культуральной жидкости (Ручай Н. С., 2014)

## Задание 2

### Изучить классификацию методов дезинтеграции

**Дезинтеграция** – это разрушение клеток микроорганизмов методом разрыва клеточных оболочек.

Под механизмом разрушения клеточной оболочки в упрощенном виде понимают ее нагружение и разрыв.

Разрушение клеточной оболочки происходит при достижении в ней механических напряжений, равных пределу прочности оболочек мембраны.

Дальнейшее измельчение полученного дезинтеграта нежелательно. В «однократности» процесса разрушения клетки и состоит различие этих процессов от измельчения обычных материалов.

Все методы дезинтеграции могут быть поделены на 4 основные группы: физико-механические, химические, энзиматические, биологические.

**Таблица 7.1 – Классификация методов дезинтеграции (Фихте, Гуревич, 1988)**

Группа методов		Методы
Физические	механические	<ul style="list-style-type: none"> <li>• баллистические</li> <li>• экструзионные</li> <li>• ультразвуковые</li> <li>• гадодекомпрессионные</li> <li>• гидроударные</li> <li>• электрогидроударные</li> <li>• комбинированные методы</li> </ul>
	немеханические	<ul style="list-style-type: none"> <li>• осмотический шок</li> <li>• тепловой шок</li> <li>• холодный шок</li> <li>• замораживание – оттаивание</li> <li>• замораживание – высушивание</li> <li>• дегидратация – регидратация</li> <li>• медленная газовая декомпрессия</li> <li>• фазовые переходы при высоких давлениях</li> </ul>
Химические		<ul style="list-style-type: none"> <li>• действие щелочей, кислот, солей, детергентов, антибиотиков, ингибиторов, хелатных агентов, органических растворителей</li> </ul>
Энзиматические (биохимические)		<ul style="list-style-type: none"> <li>• действие бактериолитических, дрожжелитических, миколитических, иммобилизованных литических ферментов</li> </ul>
Биологические		<ul style="list-style-type: none"> <li>• действие фагов, бактериоцинов, других «киллеров», внутриклеточных паразитов, плазмидоподобных факторов</li> <li>• ингибирование синтеза клеточной оболочки</li> <li>• автолиз</li> </ul>

На практике для дезинтеграции микроорганизмов используют такие методы физического разрушения, как осмотический шок, быстрое многократное замораживание-оттаивание, обработка ультразвуком, соударение, гомогенизация под давлением.

*Экструзионная дезинтеграция.* Экструзия – разрушение клеток за счет взаимодействия их с однородно движущейся средой при возникновении поперечных градиентов скорости и неоднородного распределения давления.

Гидроэкструзионная дезинтеграция микроорганизмов основана на использовании энергии сжатой жидкости для разрушения.

Рабочая среда экструзионных дезинтеграторов может быть жидкой, реологически сложной и твердой (в случае замороженных суспензий).

Главным требованием к экструзированию замороженной биомассы клеток является однородность обработки всего объема биомассы.

Одним из преимуществ гидроэкструзионной дезинтеграции микроорганизмов является однократное силовое воздействие на целые оболочки клеток практически без выделения тепла.

*Ультразвуковая дезинтеграция* микроорганизмов и клеток животных обусловлена явлением кавитации (физическое явление, вызывающее при действии ультразвука возникновение высокоградиентных микропотоков, ударных волн, локальных скачков давления и температуры).

*Энзиматический (биохимический) метод дезинтеграции* основан на лизисе с помощью ферментов (лизозим яичного белка применяется для лизиса стенок грамположительных бактерий, для разрушения клеток грамотрицательных бактерий используют лизоцим и ЭДТА, а клеточные стенки дрожжей и плесневых грибов гидролизуют такими ферментами, как фосфоманназа, глюканаза, хитиназа или комплексным дрожжелитическим препаратом).

### Задание 3

**Изучить характеристику методов выделения целевых продуктов, находящихся в культуральной среде в виде твердой фазы**

**Осаждение (седиментация)** – это процесс, в котором при добавлении некоторых реагентов или при изменении физико-химических условий происходит расслоение дисперсных систем под действием силы тяжести и отделение дисперсной фазы в виде нерастворимого осадка. Седиментацию осуществляют посредством таких методов, как отстаивание, коагуляция, флокуляция, высаливание, осаждение органическими растворителями, осаждение высокомолекулярными полимерами, осаждение ионами металлов, применение носителей.

*Отстаивание* – метод разделения под действием гравитационных сил.

Применяется при диаметре частиц более 3 мкм; при выделении стабильных продуктов, когда фактор времени не имеет решающего значения; в особых случаях, когда необходимо разделить частицы на фракции по размеру

или плотности на основании их различных скоростей осаждения; если необходимо предварительно разделить суспензию на 2 фракции (осадок и надосадочную жидкость), которые в дальнейшем можно обрабатывать на различном оборудовании.

*Коагуляция* – образование агрегатов частиц при изменении их электрических свойств под влиянием электролитов.

В качестве коагулянтов (веществ, переводящих взвешенные частицы в агрегатно неустойчивое состояние) применяют желатин, рыбный клей, казеин, органические полиэлектролиты.

*Флокуляция* – агрегация частиц (белков) под влиянием поверхностно-активных веществ, которые гидрофобизируют поверхность твердой фазы.

В качестве флокулянтов (веществ, способствующих разрушению коллоидных структур и образованию крупных хлопьев) применяют неорганические вещества (активная кремниевая кислота, квасцы, соли железа и кальция), природные полимеры (крахмал, декстран, метилцеллюлоза, пектин и др.), синтетические полимеры (полиэтиленоксид, полистиролсульфокислота и др.).

Методы коагуляции и флокуляции применяют при осаждении микробных клеток, их фрагментов и растворимых белков.

*Высаливание* – метод осаждения белков высококонцентрированными нейтральными солями (наиболее часто используют сульфат аммония или сульфат натрия).

*Осаждение органическими растворителями* заключается в добавлении органических растворителей (метиловый, этиловый и изопропиловый спирты, ацетон, диэтиловый эфир, изопропаноламин) к водным растворам белков, что приводит к снижению растворимости белков и их свертыванию, при этом они меняют свою форму.

При использовании органических растворителей, для избежания необратимой денатурации белков, осаждение осуществляют при пониженных температурах.

*Осаждение высокомолекулярными полимерами* используется для стабилизации растворов белков, концентрирования белков посредством удаления воды из белкового раствора через мембрану при диализе, при этом осаждение обеспечивается добавлением к растворам твердых полимеров или их концентрированных растворов. Для осаждения белков широко применяются такие высокомолекулярные полимеры, как декстраны и полисахариды, продуцируемые из сахарозы бактериями *Zenconostic mesenteroids*, или полиэтиленгликоль.

*Осаждение ионами металлов* заключается в образовании соединений белков с солями металлов, имеющими низкую растворимость (этакридина лактата или риванола).

*Использование носителей* рекомендуется для фильтратов культур с низким содержанием белка, но является неэффективным при работе с внутриклеточными экстрактами. Для получения гранулированных осадков

применяют такие носители, как крахмал, лактоза, кизельгур (обычно со спиртами и сульфатом натрия).

**Флотирование** – метод выделения и концентрирования твердой фазы путем вспенивания культуральной жидкости воздухом, при котором взвешенный в культуральной жидкости биологический материал (микроорганизмы) адсорбируется на поверхности раздела фаз «воздух – жидкость» и всплывает вместе с пузырьками воздуха (поднимается на поверхность жидкой фазы вместе с пеной, которую легко отделить от культуральной жидкости).

Процесс флотирования осуществляется в специальных аппаратах (флотаторах). Наибольшее применение способ нашел при производстве кормового белка для концентрирования дрожжей.

**Фильтрация** – процесс разделения твердой и жидкой фаз культуральной жидкости при пропускании ее через пористые перегородки (полупроницаемые мембраны), изготовленные из полимерных или неорганических материалов и способные эффективно разделять частицы различных видов (ионы, молекулы, макромолекулы и коллоидные частицы), находящиеся в смеси или растворе.

Конечная цель фильтрации – получение твердой или жидкой фазы (когда одна из них является отходом), а также одновременное получение твердой и жидкой фаз.

При фильтровании культуральной жидкости большей частью образуются студенистые, хлопьевидные или мелкозернистые осадки, обладающие большим сопротивлением и, поэтому, плохо фильтрующиеся. Для увеличения скорости фильтрования обычно используют 2 приема:

- предварительная обработка суспензий кислотами, электролитами, тепловая коагуляция;
- применение вспомогательных фильтровальных материалов (фильтровальные порошки, которые вносятся в фильтруемую жидкость как наполнители или предварительно наносятся на рабочую поверхность фильтра в виде грунтового слоя).

Для выделения твердой фазы (взвешенных частиц) используют такие мембранные методы, как микрофильтрация и ультрафильтрация.

Специфической особенностью *микрофильтрации* является использование в качестве фильтрующих перегородок пластинчатых мембран с диаметром пор от 0,1 до 10 мкм (100-10000 нм) для отделения мелких частиц твердой фазы, в том числе микроорганизмов.

*Ультрафильтрация* представляет собой процесс, при котором частицы, имеющие значительно больший размер, чем частицы растворителя, при пропускании раствора под давлением через трубчатую мембрану с малым размером пор (от 1 до 100 нм) задерживаются на внешней стороне мембраны.

**Центрифугирование** – разделение неоднородных систем и осаждение взвешенных в жидкости микроорганизмов или других частиц под воздействием центробежных сил.

Эффективность центрифугирования повышается при увеличении диаметра частиц (клеток), разности между их плотностью и плотностью жидкости, уменьшении вязкости жидкости, повышении угловой скорости жидкости вращения ротора, радиуса центрифугирования, увеличении объема жидкости и уменьшении толщины слоя жидкости, подвергнутой центрифугированию.

По принципу разделения центрифуги делят на следующие типы:

- *фильтрующие центрифуги* применяют для глубокого обезвоживания и высокой степени промывки и отжима осадка;
- *осадительные центрифуги* применяют для разделения хорошо и плохо фильтрующихся суспензий;
- *обезвоживающие осадительные центрифуги* применяют для разделения высококонцентрированных суспензий средней дисперсности;
- *универсальные центрифуги* применяют для средне- и малоконцентрированных суспензий при умеренных требованиях к чистоте фугата и влажности осадка;
- *осветляющие центрифуги* применяют для выделения высокодисперсной твердой фазы из малоконцентрированных суспензий.

**Сепарирование** – центрифугирование в сепараторах, представляющих собой центрифуги, имеющие высокий фактор разделения (до 12000 об/мин) и оснащенные тарельчатым барабаном.

Сепараторы характеризуются высокой производительностью и высокой степенью концентрирования.

В микробиологической промышленности сепараторы являются одним из самых распространенных типов центрифуг. Сепараторы позволяют осуществлять центробежные разделения жидкости с наибольшей полнотой извлечения отдельных компонентов.

По технологическому назначению сепараторы делят на 3 основных класса:

- *сепараторы-разделители*, применяемые для выделения жидкостей, не растворимых одна в другой, и для концентрирования суспензий и эмульсий;
- *сепараторы-осветлители*, предназначенные для выделения твердых частиц (в том числе и клеток) из жидкости;
- *комбинированные сепараторы*, используемые для выполнения 2 или более операций переработки жидкой смеси.

## Задание 4

### Изучить характеристику методов выделения целевых продуктов, находящихся в культуральной среде в растворенном виде

**Экстракция** – процесс разделения смеси твердых и жидких веществ с помощью избирательных (селективных) растворителей (экстрагентов).

Физическая сущность экстракции состоит в переходе извлекаемого компонента из одной фазы (жидкой или твердой) в фазу жидкого экстрагента при их взаимном соприкосновении. Экстрагируемые компоненты переходят из исходного раствора в растворитель вследствие разности концентрации.

Экстракция подразделяется на *твердо-жидкофазную*, при которой продукт из микробной клетки переходит в жидкость, и *жидкофазную*, при которой продукт переходит из одной жидкой фазы в другую.

При жидкофазной экстракции для выделения из культуральной жидкости витаминов, липидов, гидрофобных белков используется фенол и его производные (алкилфенолы, галогениды), бензиловый спирт, хлороформ.

Эффективность экстракции можно повысить при использовании многократного экстрагирования, выборе оптимального растворителя, нагреванием экстрагирующего вещества или жидкости, понижением давления в экстракторе.

Для того чтобы избежать отрицательного действия повышенных температур на целевой продукт, широко применяют метод холодной экстракции (криоэкстракция), при котором используют жидкий пропан или бутан, снижающие температуру раствора.

**Адсорбция** – процесс поглощения одного или нескольких компонентов из газовой смеси или раствора твердым веществом (адсорбентом).

Процессы адсорбции избирательны и обычно обратимы, благодаря чему становится возможным выделение поглощенных веществ из адсорбента или проведение процесса десорбции.

Первые сорбционные методы выделения и очистки биологически активных веществ и антибиотиков были основаны на применении молекулярных сорбентов (активированные угли, окись алюминия и т.д.). Они обладают универсальной сорбционной способностью, т.е. одинаково хорошо сорбируют выделяемое вещество и ряд примесей.

Ионообменные сорбенты характеризуются различной избирательностью и высокой специфичностью.

*Иониты* – органические и неорганические вещества, практически нерастворимые в воде и обычных растворителях, которые содержат активные группы с подвижными ионами и способные обменивать эти ионы с их растворами. Наиболее перспективны синтетические ионообменные смолы (КУ-2, КБ-4, КБ-4П-2, КМД, АВ-17 и др.). Иониты нашли широкое применение в технологии производства антибиотиков на этапе их сорбции из культуральной жидкости.

**Кристаллизация** – выделение твердой фазы в виде кристаллов из раствора в результате изменения физико-химических свойств целевого продукта путем резкого уменьшения его растворимости с помощью изменения температуры раствора (обычно понижения) или перевода его в нерастворимую химическую форму путем изменения рН раствора или добавлением определенного реагента (например, солей) часто с одновременным снижением температуры.

Метод кристаллизации нашел применение в технологии получения антибиотиков (тетрациклина, эритромицина и др.), витаминов, полисахаридов.

Кристаллизация является не только важнейшим способом получения антибиотиков в твердом виде, но и очень эффективным средством очистки целевого продукта от сопутствующих примесей, что является существенным преимуществом по сравнению с некоторыми другими методами разделения.

**Обратный осмос** (диализ, гиперфильтрация) является мембранным методом разделения на пористых мембранах, используемым для концентрирования растворов целевого продукта путем удаления избытка воды.

Мембраны для диализа характеризуются меньшими порами, по сравнению с УФ-мембранами, более низкой пористостью и повышенной плотностью. Поры мембран имеют размеры от 1 нм до 10 Å и менее, т.е. они пропускают только молекулы воды и ионы.

На производстве используют специальные устройства для диализа – диализаторы, которые заполняют концентрированным солевым раствором и помещают в раствор диализаторные ванны (мешки) с целевым продуктом.

**Упаривание** – процесс концентрирования растворов путем частичного удаления растворителя испарением при нагревании жидкости.

Обычно упаривание в производстве антибиотиков осуществляют при температуре +60...+70°C под вакуумом.

Концентрированные растворы и твердые вещества, получаемые в результате упаривания, легче и дешевле перерабатывать, хранить и транспортировать. Однако данный метод недопустим при переработке термолабильных биологически активных веществ.

## Задание 5

### Изучить характеристику современных тонких методов разделения вещества

**Хроматрография** – разделение ионитов, представляющее собой гетерогенную химическую реакцию, в которой участвуют подвижные ионы, а неподвижный макромолекулярный ион противоположного знака образует полимерную основу (матрицу).

*Катиониты* – полимеры, способные поглощать из растворов положительно заряженные ионы (катионы) и обменивать их в эквивалентных коли-

чествах на другие катионы.

*Аниониты* – полимеры, способные поглощать из растворов отрицательно заряженные ионы (анионы) и обменивать их в эквивалентных количествах на другие анионы.

Катиониты обладают свойствами поликислот, аниониты – полиоснований.

*Амфотерные иониты* (полиамфолиты) занимают промежуточное положение между катионитами и анионитами.

К группе ионитов относятся и комплексообразующие сорбенты, поглощающие вещества из растворов хемосорбцией.

Особую группу полимеров, обладающих обменными свойствами, представляют окислительно-восстановительные полимеры, способные к обмену электронов, и электронные полимеры.

Ионитовые мембраны представляют собой пленки, состоящие из нерастворимого ионита или из инертного связывающего ионита.

Разделение веществ методом хроматографии связано с их неодинаковым распределением между двумя несмешивающимися фазами.

На практике используется 3 основных вида хроматографии:

- хроматография на бумаге;
- хроматография на пластинках;
- колоночная хроматография.

При *хроматографии на бумаге* движущийся растворитель (бутанол или другое подобное вещество) служит одной из несмешивающихся фаз, а другой неподвижной фазой являются волокна специальной бумаги.

Малые молекулы можно разделить с помощью противоточного распределения, когда препарат многократно уравнивается между двумя жидкими фазами, причем одна фаза более полярна, чем другая.

Хроматография на бумаге предусматривает использование в качестве иммобилизованной фазы высококачественной фильтровальной бумаги, хорошо адсорбирующей воду.

*Хроматография на пластинке* – тонкослойная хроматография, когда используется тонкий слой силикагеля, нанесенный на стеклянную пластинку. Этот метод дает более быстрое и качественное разделение, чем на бумаге.

*Колоночная хроматография* обычно используется в производственных условиях и может быть легко смасштабирована для любых объемов. Имеет несколько разновидностей.

- *ионообменная хроматография* применяется для выделения ионизированных соединений из жидкости и для очистки нейтральных соединений от примесей ионной природы;
- *методы «молекулярных сит» (гель-хроматография, гель-фильтрация)* основаны на хроматографическом разделении веществ с различной молекулярной массой и диаметром;
- *аффинная хроматография* заключается в задерживании компо-

нента, образующего прочный комплекс с лигандами, фиксированный на частицах носителя. Аффинная хроматография используется для очистки ферментов, антител и других белков.

Создание иммуносорбентов позволило развить целое направление одной из разновидностей аффинной хроматографии – *иммуносорбции*. Для этих целей используется целая группа нерастворимых носителей (декстрановые, агарозные, полиакриламидные гранулированные гели и полистироловые бусы), присоединяющих реагентов (карбодиимиды, глутаровый альдегид и т.д.) и разнообразных лигандов.

Хроматография, основанная на взаимодействии антигенов и антител, называется *иммуноаффинной*. Особенно это направление стало развиваться при использовании моноклональных антител, позволяющих провести 500-кратную очистку.

Аффинная хроматография может обеспечить полную очистку культуральной жидкости, экстракта клеток в 1 стадию в периодическом режиме.

Наряду с аффинной хроматографией (аффинная адсорбция в геле) для отделения и очистки в биотехнологии применяют аффинную преципитацию и аффинное разделение.

При *аффинной преципитации* вещество прикрепляется к растворимому носителю. При добавлении смеси, содержащей очищаемый белок, образуется комплекс, который выпадает в осадок.

*Аффинное разделение* основано на применении двух водорастворимых полимеров, например, полиэтиленгликоля-6000, имеющего специфические лиганды, и другого полимера, например, высокомолекулярного декстрана, обладающего родством к примесям.

**Электрофорез** – процесс разделения белков на основе дифференцировки их в электрическом поле, при котором направление и скорость движения ионов определяется знаком их заряда и другими физическими характеристиками, которые обозначают как электрофоретическую подвижность. Для этих целей используются пластинки или колонки с наполнителем (агарозой, полиакриламидом, сефарозой, оксиапотитом), образующим гель.

При *электрофорезе в потоке* жидкая фаза движется перпендикулярно направлению электрического поля, что позволяет осуществить непрерывный процесс разделения.

Широко применяется *двухмерный электрофорез*, когда на разделяемую смесь действуют 2 электрических поля, направленные перпендикулярно друг другу.

С целью равномерного распределения полос разделенных белков, электрофорез используется в неоднородном электрическом поле, при котором напряженность поля убывает в направлении движения ионов.

Одной из модификаций электрофореза является *иммуноэлектрофорез*. В одном из вариантов иммуноэлектрофореза (так называемом «ракетном») к гелю добавляют антитело, а материал с антигеном вносят в лунку на краю пластинки с гелем. При приложении электрического поля антиген

электрофоретически перемещается по гелю и образуется хорошо видимая зона его распространения в виде комплекса антиген-антитело.

Другая модификация электрофореза – *изотахофорез*, основанный на разделении ионных компонентов смеси с различной электрофоретической подвижностью при использовании двух электролитов.

При этом методе разделяемую смесь вносят в гель на границу раздела лидирующего и терминирующего электролита. При наложении электрического поля анионные компоненты смеси образуют в геле четко разграниченные зоны.

Из рассмотренных методов ионообменная и афинная хроматография нашли широкое промышленное применение, а другие в основном используются в лабораторной практике.

### **Контрольные вопросы**

1. Какие факторы необходимо учитывать при выборе метода выделения и очистки микроорганизмов и продуктов микробного синтеза?
2. Что понимают под термином «дезинтеграция»?
3. Какие методы выделения продуктов микробного синтеза применяют, если целевой продукт находится в культуральной среде в виде твердой фазы?
4. Какие методы выделения продуктов микробного синтеза применяют, если целевой продукт находится в культуральной среде в растворенном виде?

## Тема 8

# ОСНОВЫ КЛЕТОЧНОЙ ИНЖЕНЕРИИ. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЛИНИЙ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК

**Цель занятия:** ознакомиться с основами технологии получения и культивирования линий растительных клеток.

**Время, отводимое на изучение темы:** 4 часа.

## ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

**Клеточная инженерия** – это один из основных разделов современной биотехнологии, основанный на выделении и культивировании тканей и клеток высших многоклеточных организмов.

Культивирование тканей и клеток происходит вне организма (*in vitro*) в специально подобранных условиях.

Клеточная инженерия включает реконструкцию жизнеспособной клетки из отдельных фрагментов разных клеток, объединение целых клеток, принадлежавших различным видам, с образованием клетки, несущей генетический материал обеих клеток, и другие операции.

В отличие от микроорганизмов культуры клеток высших организмов являются сравнительно новыми объектами, использование которых позволяет наладить производство ценных биологически активных веществ, вакцин, моноклональных антител, создание новых форм растений, обладающих полезными признаками и одновременно устойчивых к болезням и т.п.

Идея о возможности культивирования клеток вне организма впервые была высказана в конце прошлого столетия, но первые культуры клеток были получены в начале XX века, и ими явились клетки животных, а не растений. А культивирование растительных клеток на искусственных питательных средах долгое время не удавалось. И лишь в 30-е годы XX века были достигнуты первые успехи в этой области, которые и обеспечили бурный расцвет данного направления.

Применение клеточных культур позволяет преодолеть многие проблемы биоэтики (биологической этики), связанные с умерщвлением животных. Поэтому культуры клеток широко используются в научных исследованиях.

В культуре можно выращивать строго определенные клетки в неограниченном количестве. Поэтому культуры клеток и тканей, выделенные из природного материала, широко используются при промышленном производстве биологически активных веществ (на клеточно-тканевом уровне выращиваются женьшень, родиола розовая и другие лекарственные растения).

Из апикальных меристем путем микроклонирования получают посадочный материал ценных сортов растений, свободный от многих болезней

(например, от вирусов и микоплазм). На питательной среде размножают и каллусные ткани, которые в дальнейшем дифференцируются с образованием целостных растений.

Решаются проблемы получения отдаленных гибридов растений. Во-первых, путем соматической гибридизации можно скрещивать растения, которые не скрещиваются обычным путем. Во-вторых, полученные отдаленные гибриды можно воспроизводить, минуя семенное размножение и мейотический фильтр.

На культурах клеток получают вакцины, например, против кори, полиомиелита. В настоящее время решается вопрос крупномасштабного производства моноклональных антител на основе гибридомных культур.

Сохраняя культуры клеток, можно сохранять генотипы отдельных организмов и создавать банки генофондов отдельных сортов и даже целых видов, например, в виде мериклонов (культур меристем).

Манипуляции с отдельными клетками и их компонентами используются для клонирования животных. Например, ядра из клеток кишечного эпителия головастика внедряются в энуклеированные яйцеклетки лягушки. В результате из таких яйцеклеток развиваются особи с генетически идентичными ядрами.

### **Технология получения и культивирования линий растительных клеток**

Развитие метода культуры клеток растений приходится на 70-е гг. XX в., когда были разработаны методические приемы получения изолированных протопластов растительных клеток, а также метода гибридизации соматических клеток растений.

Культуры изолированных клеток и тканей применяют в биотехнологических работах по 3 направлениям.

Первое направление – использование изолированных клеток в селекции растений *in vitro* на устойчивость к различным неблагоприятным факторам среды: засухе, засолению, низким и высоким температурам, фитопатогенам, тяжелым металлам и др. Также в рамках этого направления предусматриваются создание новых растений путем слияния изолированных протопластов и получение неполовых (соматических) гибридов; перенос в изолированные протопласты чужеродных генов методами генетической инженерии; культивирование изолированных пыльников и семяночек на искусственных питательных средах (создание гаплоидных растений); культивирование изолированных зародышей и оплодотворение в условиях *in vitro* (преодоление прогамной и постгамной несовместимости растений).

Второе направление – использование культуры изолированных тканей для размножения и оздоровления посадочного материала. Этот метод, названный клональным микроразмножением растений, позволяет получать от одной меристемы сотни тысяч растений в год. За последнее десятилетие данная технология становится уже коммерческим производством. Наи-

большее распространение метод клонального микроразмножения получил при культивировании декоративных, тропических и цветочных растений. Для картофеля, аспарагуса, земляники, некоторых подвоев яблони и персика он начинает заменять традиционные способы размножения и селекции.

Третье направление – получение ценных для медицины, парфюмерии и других отраслей промышленности веществ вторичного синтеза (алкалоиды, стероиды, гликозиды, гормоны, эфирные масла и др.) на основе клеточных культур растений. Как правило, вторичные вещества получают из каллусной ткани, культивируемой на твердой (агаризованной) или жидкой (суспензионная культура) питательной среде.

На основе клеточных технологий получают такие медицинские препараты, как диосгенин (из клеток диоскореи), аймалин (из клеток раувольфии змеиной), тонизирующие вещества (из клеток женьшеня). Продуктивность культивируемых клеток в результате их селекции *in vitro* может значительно превышать продуктивность целых растений. Преимущества данного способа заключаются также в возможности использовать для этой цели растения, не произрастающие в наших природных условиях, и получать продукцию круглый год.

Методы культивирования изолированных фрагментов растений основаны на исследовании важного свойства растительной клетки – тотипотентности.

**Тотипотентность** (от лат. *totus* – весь, *potentia* – сила) – это свойство клетки реализовать генетическую информацию, обеспечивающую ее дифференцировку и развитие до целого организма.

Тотипотентностью обладают оплодотворенные яйцеклетка растений и яйцо животных организмов. Что касается дифференцированных клеток, то у животных тотипотентность присуща только некоторым клеткам кишечнорастворимых. У высших животных с ранних этапов эмбриогенеза, с началом специализации клеток, тотипотентность не реализуется. Однако клетки, изолированные из эмбрионов млекопитающих, в условиях культивирования способны сохранять *плюрипотентность* – способность дифференцироваться во все типы клеток как собственно зародыша, так и экстраэмбриональных тканей. Такие клетки получили название эмбриональных стволовых клеток, с ними связывают решение проблемы пересадки тканей.

У растений в природных условиях тотипотентность могут проявлять и специализированные клетки.

Тотипотентность у растений реализуется при заживлении ран; на раневой поверхности растений в результате неорганизованной пролиферации клеток происходит развитие каллуса (от лат. *callus* – мозоль, толстая кожа). Каллус способствует заживлению ран. Однако многие однодомные растения утратили способности к образованию каллуса и вегетативному размножению.

В экспериментальных условиях *in vitro* при выращивании фрагментов тканей, органов (эксплантов) или клеток на искусственных питательных

средах возможна реализация супрессированной (подавленной) *in vivo* тотипотентности. Это осуществляется под действием регуляторов роста и развития фитогормонов. Реализация супрессированной *in vivo* тотипотентности легче всего осуществляется как при культивировании меристематических клеток, изолированных из кончиков корней и почек и использования сложных по составу культуральных сред, так и при культивировании каллуса. Эти подходы были удачно реализованы в 30-е гг. в работах американского исследователя Филиппа Уайта и французского исследователя Роже Готре, которых принято считать родоначальниками современных методов культивирования изолированных органов и тканей растений.

Для производства биологически активных веществ (БАВ) используют каллусную ткань, которую получают твердофазной ферментацией и глубинным суспензионным культивированием, осуществленным в периодическом и непрерывном (проточном) режимах.

**Калусная культура** – это неорганизованная профилирующая ткань, состоящая из дедифференцированных клеток. В дальнейшем они специализируются как каллусные, т.е. становятся таким образом дифференцированными.

Каллус, может образовываться как на изолированных кусочках ткани (эксплантах) *in vitro*, так и на растении при поражении.

Каллусная ткань *in vitro* в основном бывает белого или желтоватого, реже – светло-зеленого цвета. Темно-коричневая окраска возникает чаще при старении каллусных клеток и связана с накоплением в них фенолов. Последние окисляются в хиноны. Для избавления от них в питательные среды вносят антиоксиданты.

Каллусная ткань аморфна и не имеет конкретной анатомической структуры, но в зависимости от происхождения и условий выращивания она может быть разной консистенции – рыхлой, средней плотности, плотной.

Основным условием превращения растений клетки в каллусную является присутствие в питательной среде фитогормонов. Ауксины вызывают процесс дедифференцировки клетки, приготавливающий ее к делению, а цитокинины – пролиферацию (деление) дедифференцированных клеток.

Если в питательную среду без гормонов поместить кусочек стебля, листа, корня (без верхушки) или любой другой эксплант, состоящий из специализированных (дифференцированных) клеток, то деление клеток не произойдет и каллусная ткань не образуется.

Это связано с неспособностью дифференцированных клеток к делению. Каждая клетка имеет 3 фазы роста: 1) деление; 2) растяжение; 3) дифференцировку.

Характерной чертой заключительной фазы роста является утолщение вторичной клеточной оболочки и потеря клеткой способности к делению. Для того, чтобы дифференцированные клетки вновь приобрели способность к делению, необходимо, чтобы произошла их дедифференцировка, т.е. клетки как в меристематическое состояние. Размножение дифференци-

рованных клеток приводит к анархическому, неорганизованному росту, в результате чего образуется каллусная ткань. Таким образом, превращение специализированной ткани в каллусную связано с индукцией клеточного деления, способность к которому она потеряла в процессе дифференцировки.

Процесс перехода к каллусному росту в базальной части апекса начинается с остановки клеточных делений. Лаг-фаза продолжается 24-48 часов, в течение которых клетки увеличиваются в размерах и ткань разрыхляется. После лаг-фазы клетки начинают быстро делиться, образуя каллусную ткань.

Таким образом, если дедифференцировка специализированной клетки связана с индукцией деления под влиянием фитогормонов, то дедифференцировка делящейся меристематической клетки связана с остановкой деления, деспециализацией клетки и только после этого – с индукцией деления, приводящей к каллусообразованию.

Переход клетки *in vitro* из дифференцированного состояния к дедифференцировке и активным клеточным делениям обусловлен изменением активности генов. Активирование одних генов и репрессирование других приводит к изменению в белковом составе клеток. В каллусных клетках появляются специфические белки и одновременно исчезают белки, характерные для фотосинтезирующих клеток листа.

В клетках каллусной ткани происходят биохимические и цитологические изменения. Через 6-12 часов после индукции дедифференцировки клеточная стенка разрыхляется и разбухает, увеличивается число свободных рибосом, число элементов аппарата Гольджи, а также размеры и число ядрышек. Все эти изменения предшествуют началу деления, которые начинаются через 48-72 часа.

Следует учитывать, что в клетках экспланта в начале культивирования могут наблюдаться изменения в метаболизме, вызванные как дедифференцировкой, так и травматическими синтезами. Для разделения этих процессов лучше проводить предынкубацию экспланта на безгормональной среде на 3-6 сутки.

Каллусная клетка имеет свой цикл развития и повторяет развитие любой клетки, включая деление, растяжение и дифференцировку, после чего наступает старение и отмирание клетки.

Для того чтобы не произошло старения, утраты способности к делению и отмирания каллусных клеток, первичный каллус, возникающий на эксплантах, через 4-6 недель переносят на свежую питательную среду. Эту операцию называют *пассированием*. При регулярном пассировании способность к делению может поддерживаться в течение десятков лет.

Кривая роста каллусных клеток имеет S-образную форму. Такой характер роста легко обнаружить у суспензионных культур каллусных клеток.

Каллусные клетки *in vitro* сохраняют многие физиолого-биохимические свойства нормальных клеток:

- каллусные клетки сохраняют способность к синтезу вторичных метаболитов;
- морозостойкость и способность к закаливанию присущи каллусным клеткам, полученным из морозостойких растений;
- общим у каллусных и пористых клеток является устойчивость к действию высоких температур, осмотически активных веществ, засолению.

Каллусные клетки обладают отдельными свойствами, отличающими их от нормальных:

- в них появляются специфические белки и уменьшается количество белков, характерных для фотосинтезирующих клеток листьев, или они совсем исчезают;
- каллусные клетки отличаются физиологической асинхронностью (в результате выхода из-под контроля организма рост каллусных клеток происходит неорганизованно, асинхронно и является неограниченным);
- клеточный цикл у каллусных клеток более длителен, чем у растений, произрастающих в открытом грунте;
- каллусные клетки отличаются большой генетической гетерогенностью по возрасту (одновременно присутствуют в каллусной ткани клетки молодые и старые);
- значительные отличия наблюдаются в энергетическом обмене каллусных клеток (они потребляют меньше кислорода по сравнению с нормальными, что свидетельствует о сдвиге соотношения между дыханием и брожением в сторону усиления брожения).

Каллусные клетки могут делиться только при наличии гормонов в питательной среде. Однако при длительном культивировании они в ряде случаев могут приобрести способность расти на среде без гормонов, т.е. становятся автономными по отношению к ауксинам и цитокининам. Такие клетки называются «привыкшими».

Нередко ткани, образованные «привыкшими» клетками, называют химическими опухолями.

«Привыкшие» ткани, как и опухолевые, в большинстве случаев не способны к нормальной регенерации и образуют лишь тератомы.

У всех каллусных тканей, у некоторых культур уже начиная с 4 пассажа, заметно снижается, а затем и полностью утрачивается способность к регенерации. Из старых пересадочных культур получить растения-регенеранты не удастся.

Кроме «привыкших» тканей, представляющих собой химические опухоли, существуют опухоли растительного происхождения, вызываемые бактериями, вирусами, а также генетические опухоли, возникающие на межвидовых гибридах различных растений.

В «привыкших» тканях, также как и опухолях, идет интенсивный синтез собственных гормонов, поэтому они не нуждаются во внесении их в питательные среды.

У «привыкших» тканей гормонезависимость достигается в результате изменения активности генов, отвечающих за синтез ферментных белков, участвующих в построении молекул гормонов, следовательно, отвечающих за синтез гормонов.

В опухолевых тканях синтез гормонов связан с переносом в растительную клетку бактериального гена, отвечающего за этот процесс.

**Изолированный протопласт** – это часть клетки, которая остается после удаления клеточной стенки, осуществленного, как правило, ферментативным способом.

Для проведения ферментативного способа изоляции цитопластов используют препараты целлюлаз и пектиназ, получаемых из различных грибов (*Myrothecium*, *Aspergillus*, *Trichoderma* и др.) и из пищеварительного сока улитки *Helix pomatia*.

В зависимости от происхождения растения и взятой для изоляции протопластов ткани подбирается вид ферментов, их комбинация и концентрация. Для выделения протопластов используют разные ткани растения, а также каллусные и суспензионные культуры.

С целью получения большого числа однотипных протопластов у двудольных используют мезофилл молодых листьев.

Отсутствие клеточной стенки у протопластов обуславливает им свойства, отличные от целых клеток. Благодаря тому, что протопласты способны поглощать макромолекулы и органеллы, их используют в качестве реципиентов при трансформации, а также в экспериментах по клеточной селекции и мутагенезу.

Изолированные протопласты служат источником для выделения неповрежденных и функционально активных субклеточных и цитоплазматических структур и органелл (хлоропластов, ядер, хромосом).

Способность протопластов сливаться друг с другом нашла применение для получения соматических гибридов.

## ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

### Задание 1

#### Изучить методы выращивания культур растительных клеток

Существует 2 способа культивирования растительных клеток (рисунок 8.1):

- поверхностное культивирование на плотной (агаризованной) питательной среде (калусные культуры);
- глубинное культивирование клеток в жидкой питательной среде (суспензионные культуры).



Рисунок 8.1 – Методы выращивания культур растительных тканей

#### Глубинное суспензионное культивирование

Для глубинного культивирования и получения суспензионных культур необходимо использовать линии клеток, образующих небольшие агрегаты (по 5-10 клеток). Более пригодна калусная ткань рыхлого типа, которая легко фрагментируется на отдельные клетки и небольшие агрегаты при ее перемешивании.

Трансплантат желательно обрабатывать пектиназой. Рекомендуется использовать среды, содержащие 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту и не содержащие ионы кальция. При подборе среды культивирования важно из среды исключить цитокинины или снижать их концентрацию, а концентрацию ауксинов увеличивать.

Перед пересевом первичную культуру фильтруют через 2 слоя марли или через сита (нейлоновые, металлические), чтобы отделить крупные агрегаты калусной ткани и остатки трансплантата. На образование клеточных агрегатов также оказывает влияние интенсивность перемешивания

среды, так как клетки чрезвычайно чувствительны и быстро лизируются. Большинство клеток погибает.

Суспензионные культуры, как правило, состоят из отдельных клеток, варьирующих по форме и размеру, и неоднородных многоклеточных агрегатов. Соотношение отдельных клеток и таких агрегатов в суспензии зависит от видовой принадлежности растения и условий культивирования.

В процессе культивирования активно делящиеся клетки не только поглощают питательные вещества, но и выделяют продукты собственной жизнедеятельности, в том числе и ферменты ( $\alpha$ -амилаза, фосфогидролаза и др.), которые изменяют дисперсность суспензии. Повышать дисперсность суспензионных культур можно добавлением в среду низких концентраций пектиназы и целлюлозы. При управлении процессом выращивания клеток важно иметь гомогенную систему.

Глубинное культивирование можно осуществлять в колбах на качалках при частоте вращения 100-120 об/мин. На 60-100 мл среды используют 2-3 г свежей каллусной ткани, чтобы начальная плотность клеточной популяции составила  $0,5 \times 10^5 - 2,5 \times 10^5$  клеток/мл среды.

Сосуды с суспензией закрепляют на платформе тейкера или устанавливают на качалки ротационного типа. В этих условиях обеспечивается аэрация и, кроме того, нарастающая масса клеточных агрегатов распадается на отдельные фрагменты. В лабораторных условиях обычно используют сосуды объемом 100-250 мл с небольшим объемом питательной среды.

Растительные клетки растут и размножаются значительно медленнее, чем клетки микроорганизмов. Время их удвоения – 1-3 суток.

Процесс культивирования растительных клеток занимает 2-3 недели, что повышает требования к обеспечению асептических условий.

Как правило, клеточная популяция суспензионных культур не только гетерогенна, но и асинхронна, т.к. содержит клетки, различающиеся по времени вхождения в митоз.

Для синхронизации клеточных культур используют методы индукции, когда течение клеточного цикла блокируется в определенном периоде под влиянием физических факторов (например, пониженной температурой) или химических соединений (индукторами синхронизации в системе культивируемых клеток могут быть ингибиторы синтеза ДНК – тимидин, 5-аминоурацил, оксимочевина).

Другой способ синхронизации заключается в создании условий «голодания» по одному из компонентов культуральной среды (например, ауксину, цитокинину, углеводам, азоту). Затем пассирование суспензии на среду с недостающим компонентом приводит к синхронизации клеточного деления.

## **Твердофазный способ культивирования**

Каллусные клетки получают из фрагментов тканей разных органов высших растений, помещая кусочки такой ткани в питательную среду (пробирки, колбы, чашки Петри). Соблюдают строгую стерильность.

Чтобы обеспечить развитие каллусных клеток в питательных средах, содержащих необходимые для роста вещества, клетки тканей, запасавшей паренхимы, корня и стебля, мезофилла листа и других тканей должны терять способность дифференцировки. Недифференцированному развитию клеток способствует прединкубация эксплантов на среде без гормонов в течение 3-6 суток.

Через 4-6 недель культивирования трансплантата возникает первичный каллус, который необходимо перенести на свежую питательную среду. При культивировании на агаризованных средах кусочек каллуса должен иметь массу 60-100 мг на 30-40 мл свежей среды. Каллусная ткань, выросшая на поверхности твердой питательной среды, имеет аморфную структуру, представляющую собой массу тонкостенных паренхимных клеток. Химический состав каллусной ткани обычно незначительно отличается от соответствующего органа растения.

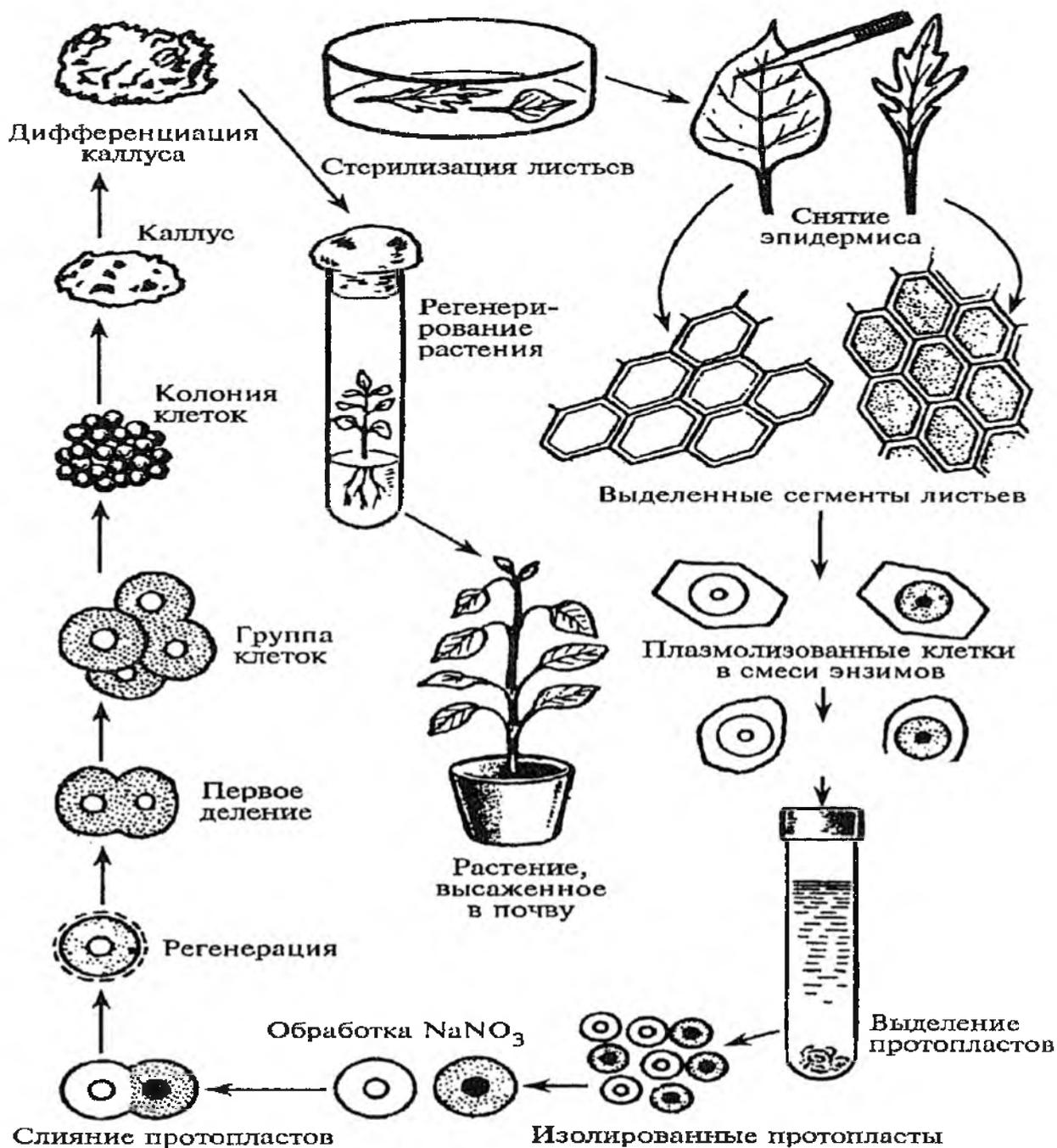
Каллусные клетки после ряда делений переходят на обычный для данного растения цикл развития, т.е. начинается дифференциация. Этот процесс регулируют гормоны.

### **Задание 2**

#### **Изучить принципиальную схему культивирования протопластов растительных клеток**

Изолированные листья молодых растений стерилизуют в течение 1 минуты в 70° спирте, а затем в течение 20 минут – в 2%-ном растворе гипохлорида натрия. После промывания листьев стерильной водой у них удаляют нижний эпидермис и нарезают на мелкие части. Нарезанные фрагменты листьев помещают в чашки Петри в смесь ферментов пектиназы и целлюлазы.

Инкубируют фрагменты листьев в ферментной смеси в темноте или при рассеянном свете до 15-18 часов при температуре +25°С. После этого следует очистка протопластов от эпидермиса и листовых жилок посредством фильтрации через капроновую ткань. Отмывание протопластов от ферментов производится при последующем трехкратном центрифугировании при 170g в течение 2 минут.



**Рисунок 8.2 – Принципиальная схема культивирования протопластов растительных клеток (Гужов Ю.Л. и др., 1999)**

Отмытые протопласты ресуспендируют в культуральной среде, содержащей 13% маннитола, до концентрации протопластов  $4 \times 10^5$  в 1 мл. Плотность протопластов должна быть оптимальной для каждой культуры.

Суспензию протопластов переносят в чашки Петри с жидкой или агаризованной средой.

Культивирование проводят при температуре  $+26...+28^\circ\text{C}$  в темноте или при рассеянном свете. Образовавшиеся клеточные колонии переносят на поверхность агаризованной среды и культивируют на свету.

Для культивирования протопластов могут быть использованы модификации сред Мурасиге или Гамборга с добавлением комплекса витаминов и фитогормоном. До того как протопласты синтезируют клеточную стенку, необходимо обеспечить в среде соответствующий уровень осмотического давления для поддержания стабильности протопластов. В качестве осмотиков используют сахара (глюкозу, манитол, сорбит, ксилозу, сахарозу) или их разные сочетания. После регенерации клеточной стенки и развития клеточных колоний осмотики из среды исключают.

Другой важный фактор успешного культивирования протопластов – плотность их посева, которая может составлять  $10^4 - 10^5$  протопластов в 1 мл среды.

### **Контрольные вопросы**

1. Что понимают под клеточной инженерией? По каким направлениям осуществляются работы с культурами изолированных клеток и тканей растений?
2. Что понимают под тотипотентностью растительной клетки?
3. Какие методы клеточной инженерии применяются для работы с растительными клетками?
4. Какими свойствами характеризуется каллусная ткань растений?
5. Какими свойствами характеризуется изолированный протопласт растений?

**Тема 9**  
**ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И КУЛЬТИВИРОВАНИЯ**  
**ЛИНИЙ ЖИВОТНЫХ КЛЕТОК**

**Цель занятия:** ознакомиться с основами технологии получения и культивирования линий животных клеток.

**Время, отводимое на изучение темы:** 4 часа.

**ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ**

**Технология получения и культивирования  
линий животных клеток**

Совершенствование методик культивирования клеток животных позволило использовать их для накопления больших количеств вирусного материала с целью производства из него вакцин. Стало возможным вставлять в клетки специфические экзогенно полученные гены и получить их экспрессию, а также подтверждена возможность выращивания в культуре из одиночной клетки целой популяции. Когда такие популяции получают из клетки, выделявшей в окружающую среду антитела, то все молекулы антител в надосадочной жидкости одинаковы. Первое – дает возможность получения трансгенных клеток, тканей или организмов, второе – незаменимо для получения моноклональных антител.

Чтобы показать способность клеток животных расти и делиться в культуре, потребовалось овладеть рядом подходов и методик:

- методики получения клеток, свободных от экзогенных прокариотов и грибов;
- методики разработки среды, в которых рост «вырезанных из ткани» или изолированных клеток не подавляется;
- методики наблюдения за клетками в динамике их развития;
- методики непрерывного культивирования культур клеток животных *in vitro* и поддержания их свободными от других биологических агентов.

Выделяют 2 направления культивирования животных клеток:

- культуры клеток;
- культуры органов и тканей.

Клетки в культурах размножаются, что обеспечивает получение большой массы клеток, затем их идентифицируют, разделяют на идентичные параллели и, если это необходимо, сохраняют. Динамические свойства культивируемых клеток часто трудно контролировать, также трудно реконструировать *in vitro* некоторые клеточные взаимодействия, наблюдаемые *in vivo*.

Список типов клеток, которые уже введены в культуру, достаточно велик. Это элементы соединительной ткани человека (фибробласты), ске-

летные ткани (кость и хрящи), скелетные, сердечные и гладкие мышцы, эпителиальные ткани (печень, легкие, почки и др.), клетки нервной системы, эндокринные клетки (надпочечники, гипофиз, клетки островков Лангерганса), меланоциты и различные опухолевые клетки.

Популяция клеток не всегда гомогенна и обладает фиксированным фенотипом. Некоторые культуры (кератиноциты эпидермиса) содержат стволовые клетки, клетки-предшественники и кератинизированные чешуйчатые клетки. В такой культуре происходит постоянное обновление за счет стволовых клеток, пролиферация и созревание клеток-предшественников, а также необратимая дифференцировка, сопровождающаяся «слушиванием» чешуйчатых клеток в культуральную среду.

Культуры, полученные из эмбриональных тканей, характеризуются лучшей выживаемостью и более активным ростом по сравнению с соответствующими зрелыми тканями. Причиной этого служит низкий уровень специализации и наличие реплицирующихся клеток-предшественников в эмбрионах. Пролиферативная способность взрослых тканей ниже, они содержат больше неделящихся специализированных клеток. Получение первичных культур клеток взрослых тканей и их размножение является более сложной задачей, продолжительность жизни таких культур, как правило, невелика.

Нормальные ткани дают начало культурам с ограниченным временем жизни, тогда как культуры, полученные из опухолей, способны пролиферировать неограниченно долгое время. Дифференцировка нормальных клеток в культуре сопровождается обычно полным прекращением пролиферации клеток. В культурах опухолевых клеток возможна частичная дифференцировка при сохранении способности к пролиферации.

Различают 3 основных типа культур животных клеток:

- *первичные культуры*, получаемые практически из любого органа и существующие лишь до первого пересева;
- *диплоидные культуры*, чаще получаемые из эмбриональных тканей и сохраняющие диплоидный набор хромосом до 50 пересевов, которые затем трансформируются в постоянные (перевиваемые) гетероплоидные культуры;
- *перевиваемые (постоянные) культуры*, существующие вне организма десятки лет.

Клетки, полученные от животного и поддерживаемые в культуре, называют *первичными* до тех пор, пока они не будут пассированы (субкультивированы), т. е. до первого пересева. Клетки первичной культуры обычно гетерогенны и характеризуются малым пролиферативным пулом, но в них наиболее полно представлены типы клеток той ткани, откуда они были получены, и четко обнаруживается экспрессия ряда свойств, присущих данной ткани. Однако первичная культура лишена многих клеток, присутствующих в исходной ткани, поскольку не все клетки способны прикрепиться к субстрату и выжить в условиях *in vitro*.

Культуры первичных клеток легко получить из многих тканей. Какое-то время эти клетки экспоненциально размножаются, но затем примерно через 6 месяцев скорость роста культуры снижается, а через 10 месяцев клетки деградируют и погибают. Это наблюдается примерно после 20-50 генераций (в зависимости от возраста тканей-источников первичных клеток: из эмбриональной – 50, из взрослой – 20).

На ранних стадиях клетки остаются эуплоидными, т.е. обладают правильным диплоидным набором хромосом, а позднее они становятся анеуплоидными. В некоторых случаях отдельные анеуплоидные клетки выживают и продолжают размножаться, что приводит к установлению клеточного штамма. Частоту таких трансформаций можно увеличить, обработав клетки мутагенами или некоторыми вирусами.

При успешном установлении культуры первичные клетки начинают размножаться и их необходимо периодически пересевать (субкультивировать). Субкультивирование обеспечивает возможность продления существования культуры (получение линии клеток), клонирования, исследования и сохранения клеток, а также получения более однородных популяций. Главным преимуществом получения клеточных линий из первичных культур является наработка большого количества стабильного материала, пригодного для продолжительного использования.

После нескольких пересевов линия клеток либо гибнет (ограниченная линия клеток), либо трансформируется и становится *постоянной* клеточной линией.

Появление постоянной линии клеток констатируется по морфологическим изменениям (уменьшение размера клеток, снижение их адгезивности, округление, увеличение ядерно-цитоплазматического соотношения), по увеличению скорости роста (время удвоения клеток снижается в 1,5-3 раза), по снижению зависимости от сыворотки и возможности поддержания в более простых средах, по снижению зависимости от субстрата и, следовательно, их способности к росту в суспензии, по увеличению гетероплоидности и анеуплоидности, а также по увеличению опухолеродности. Однако нормальные клетки, спонтанно трансформируясь в постоянную линию, не становятся при этом злокачественными (несмотря на некоторые черты сходства).

Таким образом, постоянные клеточные линии имеют определенные преимущества: высокая скорость роста, возможность достижения более высокой плотности и, следовательно, более высокого выхода биомассы, возможность использования более дешевых сред, способность к суспензионному росту. Но также они имеют и недостатки, заключающиеся в повышенной хромосомной нестабильности, отклонении от фенотипа донора, утрате специфических маркеров.

Для культивирования животных клеток применяют естественные и искусственные (полусинтетические и синтетические) питательные среды.

Естественные питательные среды – это биологические жидкости: сыворотка крови, эмбриональный экссудат, тканевые экстракты и др.

Питательные среды из естественных компонентов применяют редко, главным образом для выращивания вновь изолированных тканей в начале культивирования и для поддержания очень прихотливых тканей животных.

К полусинтетическим питательным средам относят гемогидролизаты, аминокислоты и др.

Лучшими искусственными питательными средами являются синтетические среды: Игла и среда 199.

Для приготовления питательных сред обычно используются солевые растворы Эрла и Хенкса. Эти растворы используются также для орошения и промывки клеток при пассировании культур, выделении клеточных линий и других манипуляциях с культурами клеток.

Многие клетки млекопитающих, прежде чем приступить к пролиферации и образовать клеточный монослой, должны прикрепиться к субстрату и распластаться на нем.

В качестве субстрата в настоящее время используют следующие материалы:

- пирекс (алюмоборосиликатное стекло);
- пластик (полистирол, поликарбонат, поливинилхлорид, тефлон и др.);
- металлы (нержавеющая сталь, титан).

Клетки прикрепляются к поверхности за счет электростатических взаимодействий, поэтому поверхность культуральных сосудов должна быть смачиваемой и отрицательно заряженной. Этого можно достичь химической обработкой окисляющими агентами или физическими воздействиями (высоковольтным разрядом, ультрафиолетовым светом, бомбардировкой высокоэнергетическими электронами).

Существует 2 подхода к культивированию животных клеток: непроточные и проточные культуры.

*Непроточные культуры* – тип культур, в котором клетки вводят в фиксированный объем среды. По мере роста клеток происходит использование питательных веществ и накопление метаболитов, поэтому среда должна периодически меняться, что приводит к изменению клеточного метаболизма, называемого еще и физиологической дифференцировкой. Со временем, в результате истощения среды происходит прекращение пролиферации клеток. Все системы непроточных культур характеризуются накоплением отходов в той или иной форме и непостоянством внешних условий.

*Проточные культуры* обеспечивают истинные гомеостатические условия без изменения концентрации питательных веществ и метаболитов, а также числа клеток. Гомеостаз обусловлен постоянным вхождением среды в культуру и одновременным удалением равного объема среды с клетками. Такие системы пригодны для суспензионных культур и монослойных культур на микроносителях.

Существует 2 направления в культивировании животных клеток: суспензионные культуры и монослойные культуры.

*Суспензионные культуры* предполагают выращивание клеток во взвешенном состоянии и дают больший выход клеток.

В *монослойных культурах* клетки прикреплены к поверхности культурального сосуда, что дает ряд преимуществ:

- легко провести полную замену среды и промыть клетки перед добавлением свежей питательной среды (это важно в тех случаях, когда рост клеток идет в одних условиях, а наработка продукта – в других условиях, например при переносе клеток из среды с сывороткой в бессывороточную среду), а также можно полностью удалять нежелательные компоненты;
- обеспечивается высокая плотность клеток;
- у многих клеток экспрессия требуемого продукта идет эффективнее, если клетки прикреплены к субстрату;
- монослойные культуры могут быть использованы для любого типа клеток, что обеспечивает наибольшую гибкость исследований;
- в некоторых случаях, например для распространения вирусов, требуются тесные межклеточные контакты.

Недостатками монослойных культур являются:

- требования большого пространства;
- возрастание стоимости и трудоемкости при увеличении масштаба;
- недостаточно эффективный контроль, обусловленный трудностями отбора пробы;
- сложности в определении и контроле рН, концентрации кислорода.

Существует 3 основных способа культивирования клеток в виде монослоя:

- культивирование в плоских флаконах (матрацах);
- культивирование во вращающихся бутылках (в каждый момент времени 15-20% поверхности бутылки покрыто питательной средой, а клетки находятся попеременно то в среде, то в воздухе);
- культивирование в колонках на микроносителях (в качестве которых выступают плотно упакованные, не смещающиеся стеклянные бусы диаметром 35 мм, стопка пластин и др., а питательная среда омывает их, протекая сверху вниз).

Клеточные линии применяют для тестирования и изучения механизма действия различных веществ, которые могут быть использованы в качестве лекарственных препаратов, детергентов, косметических средств, инсектицидов, консервантов. Результаты, полученные на клеточных культурах, нельзя экстраполировать на целый организм, но если изучаемое вещество оказывает повреждающее действие в нескольких линиях культивируемых клеток, то следует ожидать неблагоприятного эффекта и на организм человека.

Кроме того, если в ряду поколений воспроизводится дефект, свойственный клеткам *in vivo*, значит это дефект наследственный. Благодаря возможностям генной инженерии изменение генотипа клеток стало реальностью. Можно выделить из организма мутантные клетки, заменить *in vitro* дефектные гены, получить линию здоровых генно-модифицированных клеток и ввести их опять в организм.

## ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

### Задание 1

#### Изучить технологию получения первично-трипсинизированных культур клеток

Первичные культуры клеток получают путем стерильного удаления фрагмента ткани и его механической или ферментативной дезагрегации. В случае механической дезагрегации фрагмент ткани измельчают до кусочков размером около 1 мм, которые прикрепляются к субстрату благодаря собственной адгезивности, поверхности субстрата или сгустку плазмы. Ферментативная дезагрегация дает более высокий выход клеток, хотя метод является селективным, поскольку не все клетки переживают диссоциацию.

На практике наиболее успешное получение первичных клеток из многих тканей связано с использованием коллагеназы, приводящим к снижению размера экспланта до небольшого кластера клеток, который прикрепляется к субстрату и распластывается.

*Этап 1. Трипсинизация ткани.* После 3-кратного отмывания эмбриональную ткань измельчают ножницами на кусочки размерами 2-3 мм. Измельченную ткань 3 раза отмывают в растворе Хенкса с антибиотиками от слизи и элементов крови и переносят в колбу для трипсинизации. Ткань в колбе заливают двойным объемом 0,25%-ного раствора трипсина, подогретого до температуры +37°C, и вносят стерильный магнит. Колбу ставят на магнитную мешалку.

Раствор трипсина и механическое воздействие вращающегося магнита способствуют растворению межклеточного вещества, разделению клеток и переходу их в отдельности в раствор.

Первый этап трипсинизации продолжается 3-5 минут. Затем отделившиеся клетки вместе с трипсином сливают в центрифужные пробирки и помещают в кювету со льдом, чтобы ограничить дальнейшее воздействие трипсина на клетки.

К оставшейся ткани добавляют вторую порцию трипсина, и колбу снова помещают на магнитную мешалку. Скорость вращения регулируют так, чтобы не наступало вспенивания содержимого колбы. Трипсинизацию проводят 3-4 раза до полного истощения ткани, которое определяют по белесоватому оттенку кусочков и их разбуханию.

*Этап 2. Центрифугирование клеточной суспензии.* После окончания трипсинизации полученную взвесь клеток в течение 10-15 минут подвергают центрифугированию при частоте 1000 об/минуту. Надосадочную жидкость сливают, а осадок клеток ресуспендируют в питательной среде (1:10), подогретой до температуры +37°C, и сливают в колбу через 3-4-слойный марлевый фильтр.

*Этап 3. Подсчет клеток.* После тщательного перемешивания суспензии клеток берут 2 ее пробы по 0,5 мл. К каждой из них добавляют по 0,5 мл 0,1%-ного кристаллвиолета в 0,1N растворе лимонной кислоты.

После перемешивания каплю суспензии помещают в счетную камеру Горяева и подсчитывают клетки, имеющие хорошо заметное ядро и неповрежденную цитоплазму. Клетки подсчитывают не менее чем в 3 больших квадратах камеры. Количество клеток в 1 мл определяют по формуле:

$$X = \frac{a \times b}{c} \times 4000,$$

где  $a$  – общее количество подсчитанных клеток;

$b$  – степень разведения суспензии красящим раствором;

$c$  – общее количество малых квадратов, в которых проводили подсчет;

4000 – коэффициент, получаемый исходя из объема малого квадрата камеры Горяева.

*Этап 4. Внесение клеток в питательную среду.* Точный подсчет клеток необходим, поскольку качественный монослой можно получить лишь при определенной оптимальной посевной дозе.

В соответствии с результатами подсчета к суспензии добавляют необходимое количество питательной среды, чтобы в 1 мл содержалось 250-300 тыс. клеток (оптимальная доза). К питательной ростовой среде добавляют 10% бычьей сыворотки и антибиотики (пенициллин, стрептомицин, тетрациклин по 100 ЕД/мл), устанавливают рН 7,2-7,4.

Для культивирования клеток в каждую пробирку засевают 1,5 мл суспензии; во флаконы емкостью 100 мл – 20 мл, а во флаконы емкостью 1 л – 100 мл клеточной взвеси.

Флаконы и пробирки плотно закрывают стерильными резиновыми пробками. На пробирках маркером проводят продольную черту, укладывают их чертой вверх в ящики с наклонным дном (под углом 6°) и помещают в термостат при температуре +37°C.

Клетки фиксируются на внутренней поверхности пробирки. Через 24-48 часов образуется сплошной слой клеток, располагающихся в 1 ряд – так называемый монослой.

### **Контрольные вопросы**

1. Какие основные направления выделяют в культивировании животных клеток?
2. Какие питательные среды применяют для культивирования животных клеток?
3. Чем характеризуются непроточные и проточные культуры животных клеток?
4. Чем характеризуются суспензионные и монослойные культуры животных клеток?
5. Какие существуют основные способы культивирования животных клеток в виде монослоя? Чем они характеризуются?

**Тема 10**  
**ОСНОВЫ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ.**  
**ТЕХНОЛОГИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ ДНК**

**Цель занятия:** изучить технологию рекомбинантных ДНК, применяемую для создания биотехнологической продукции.

**Время, отводимое на изучение темы:** 4 часа.

**ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ**

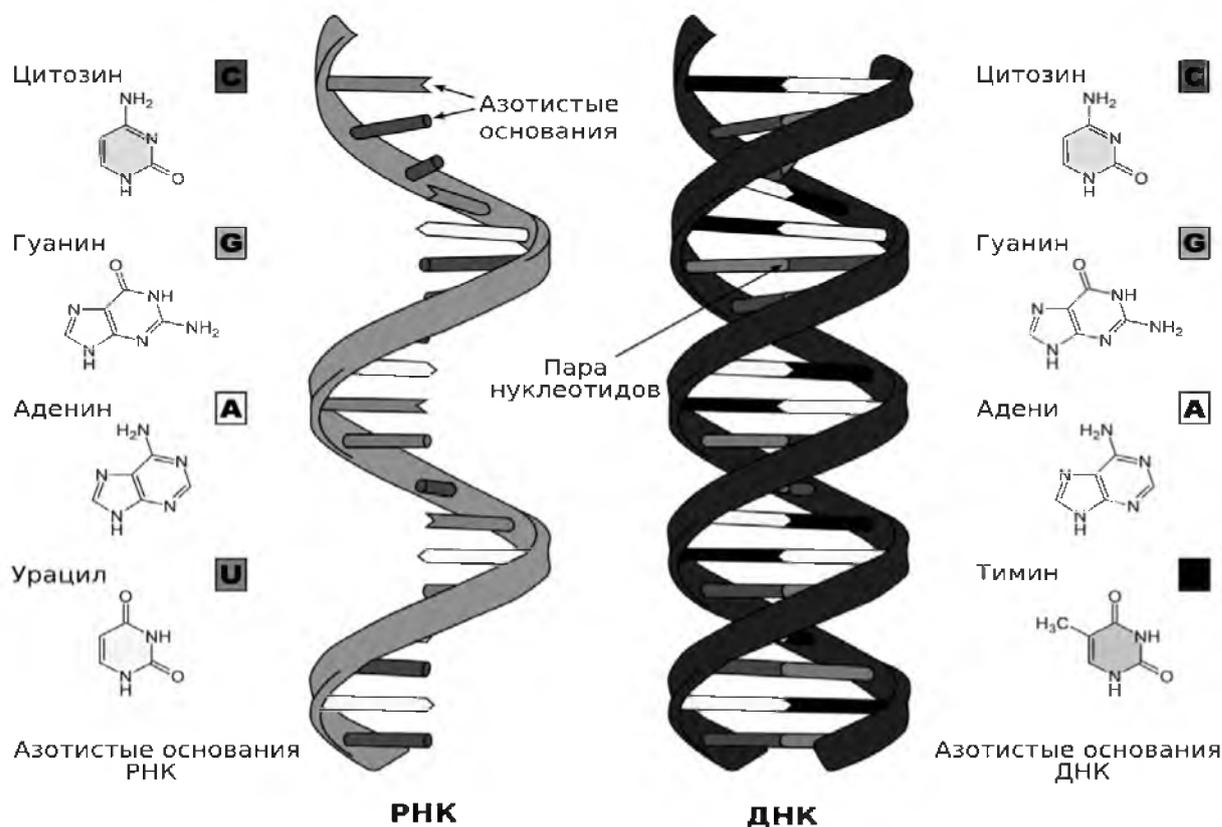
**Генная (генетическая) инженерия** – одно из наиболее быстро развивающихся направлений биотехнологии, зародившееся на стыке молекулярной биологии, генетики и биохимии, позволяющее осуществлять всевозможные манипуляции с генами различных организмов посредством конструирования лабораторным путем (*in vitro*) функционально активных генетических структур (рекомбинантных ДНК).

Впервые о нуклеиновых кислотах сообщил Ф. Мишер в 1869 г. Через 75 лет (в 1944 г.) О.Т. Эвери с сотрудниками доказали, что именно молекула ДНК служит хранилищем наследственной информации. Они провели трансформацию неvirulentного штамма пневмококка в virulentный с помощью очищенного препарата дезоксирибонуклеиновой кислоты, выделенной из virulentных клеток. В 1953 г. Д. Уотсон и Ф. Крик создали модель структуры ДНК, а в 1966 г. М. Ниренберг, С. Очоа и Х.-Г. Корана расшифровали генетический код и выделили ферменты (лигазы и рестриктазы), участвующие в метаболизме нуклеиновых кислот.

Датой основания генетической инженерии считается 1973 г., поскольку в 1972-1973 гг. П. Берг, Г. Бойер и С. Коэн с сотрудниками создали первую рекомбинантную ДНК, содержащую фрагменты ДНК вируса SV40, бактериофага *лямбда* и лактозного оперона *E. coli*. Через 10 лет после этого были получены трансгенные растения, позднее – трансгенные мыши, а через 20 лет – трансгенные овцы.

Основным объектом генетической инженерии является молекула ДНК, в которой закодирована вся информация о строении и функционировании любой живой клетки.

ДНК – это полимерная двухцепочная молекула, построенная по принципу комплементарности (рисунок 10.1). Мономером ДНК служат 4 типа нуклеотидов, каждый из которых состоит из сахара (дезоксирибозы), фосфатной группы и азотистого основания. Нуклеотиды различают по азотистым основаниям, которые подразделяют на 2 группы: пуриновые (аденин и гуанин) и пиримидиновые (цитозин и тимин); в молекулах другой нуклеиновой кислоты – РНК – вместо тимина встречается урацил. Между пуриновыми и пиримидиновыми основаниями возникают комплементарные взаимодействия (А–Т и Г–Ц), которые удерживают цепочки, состоящие из дезоксирибозы и фосфатной группы, относительно друг друга.



**Рисунок 10.1 – Строение молекул нуклеиновых кислот**  
 (<http://dnkworld.ru>)

Размер молекулы ДНК измеряется числом пар комплементарных нуклеотидов – от нескольких тысяч пар нуклеотидов до миллионов пар нуклеотидов.

Молекулы ДНК представляют собой генетическую информацию, важной единицей которой являются гены – элементарные носители, кодирующие информацию о синтезе одного определенного продукта. Поэтому каждый ген характеризуется строго определенной последовательностью нуклеотидов. Большая часть генов содержит информацию о строении белков, некоторые кодируют только определенные молекулы РНК (например, рибосомальную РНК).

В основе генетической инженерии лежит целенаправленное конструирование искусственных генетических систем вне организма и их введение в живой организм с целью создания нового организма (или модификации существующего). Это предполагает, что часть генов можно с помощью специальных ферментов вырезать из молекулы ДНК одного организма (донорная ДНК) и перенести в другой организм (реципиентный). Такой перенос генов называется *трансгенозом*, а организмы, в ДНК которых включены чужеродные гены, носят название *трансгенных*.

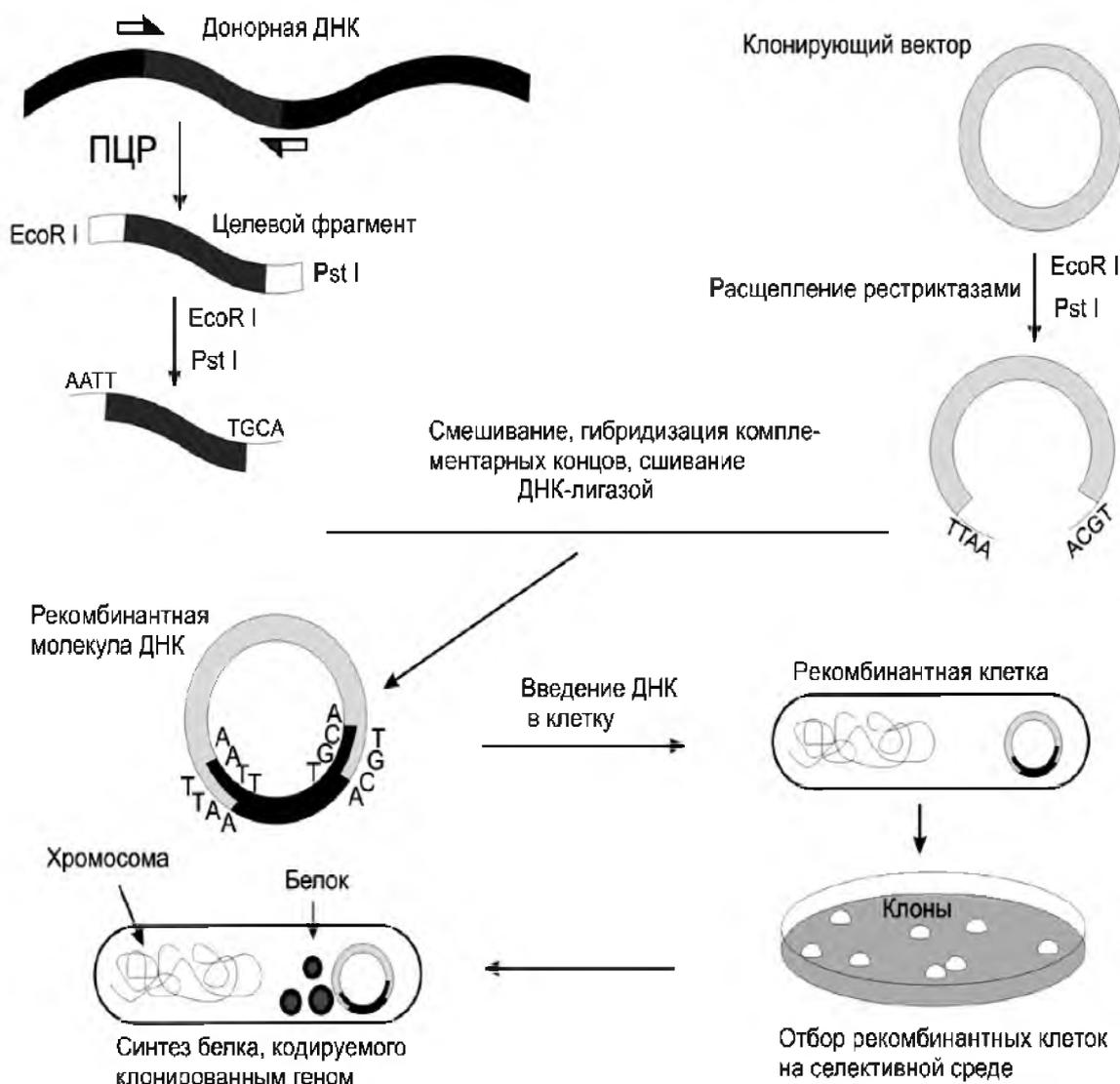
Используемые для переноса генетические конструкции носят название *рекомбинантных ДНК*. В их состав входят фрагмент донорной ДНК (клонлируемая ДНК) и векторная ДНК (вектор, который отвечает за перенесение и встраивание (интеграцию) клонируемой ДНК).

Молекулы рекомбинантной ДНК создают для клонирования необходимых участков ДНК, картирования ДНК, создания трансгенных организмов, массового получения продуктов, закодированных данным участком ДНК. Рекомбинантные ДНК становятся составной частью генетического аппарата реципиентного организма и обеспечивают ему новые уникальные генетические, биохимические, а затем и физиологические свойства.

### Технология рекомбинантных ДНК

Технология рекомбинантных ДНК представляет собой совокупность процедур, позволяющих осуществить конструирование нового генного комплекса и перенос его в организм-реципиент, где новый генетический материал начинает работать.

Не существует единого универсального набора методик, все зависит от конкретной задачи, но чаще всего эксперименты с рекомбинантной ДНК проводят по следующей схеме (рисунок 10.2).



**Рисунок 10.2 – Общая схема молекулярного клонирования на примере трансформации бактерий или дрожжей рекомбинантным плазмидным вектором (Войнов Н.А., 2009)**

1. *Получение нужной последовательности.* ДНК для клонирования может быть получена химико-ферментативным синтезом, обратной транскрипцией мРНК и путем непосредственного расщепления геномной ДНК нужной рестрикционной эндонуклеазой. Но самым распространенным путем сейчас является синтез ДНК методом ПЦР.

Учитывая генетическое родство всех живых организмов на Земле, самая распространенная ситуация в настоящее время – когда целевая последовательность для предполагаемого клонирования известна, хотя бы частично. После выбора и синтеза праймеров к известной последовательности, ДНК можно амплифицировать методом ПЦР с использованием, в том числе, и вырожденных праймеров (с неполной комплементацией). В качестве матрицы для синтеза используют геномную ДНК или матричную РНК. В этом случае первым шагом в синтезе целевой последовательности будет синтез комплементарной ДНК (кДНК) обратной транскриптазой (ревертазой – РТ). Затем проводят обычную ПЦР. Иногда эти реакции объединяют в одну РТ-ПЦР. Как правило, в концы ПЦР-праймеров вводят сайты рестриктаз для удобства дальнейшего клонирования синтезированной последовательности.

Нужную последовательность ДНК также можно получить химико-ферментативным синтезом, при котором производят сборку полноразмерного гена из отдельных синтетических олигонуклеотидов различными способами. Химический синтез гена осуществляют, как правило, когда организм-донор ДНК не доступен или когда нуклеотидная последовательность природного гена может плохо транслироваться в выбранном организме-реципиенте вследствие несовпадения частоты использования кодонов, а также по другим причинам.

2. *Конструирование фрагментов рекомбинантных ДНК («сшивки»).* После обработки рестриктазами полученный ген соединяют (лигируют) с клонирующим вектором с образованием новой, рекомбинантной молекулы – конструкция «клонировующий вектор – встроенная ДНК».

Под вектором понимают молекулу ДНК, способную к включению чужеродной ДНК и к автономной репликации, которая служит инструментом для введения генетической информации в клетку.

Не каждая молекула ДНК может быть вектором. Векторы должны обладать определенными свойствами, в числе которых:

- способность к автономной (т.е. независимо от хромосомы реципиента) репликации в клетке реципиента (для репликации в клетке бактерии вектор должен содержать участок инициации репликации);
- наличие области, в которую возможно встраивание необходимого фрагмента ДНК (для этого вектор должен содержать один или более участков (сайтов рестрикции), чувствительных к определенным рестриктазам, которые расщепляют вектор и позволяют встроить желаемую последовательность нуклеотидов);

- небольшой размер (т.к. при длине более 15 т.п.н. значительно снижается эффективность клонирования чужеродной ДНК);
- наличие маркерных генов, позволяющих отличить трансформированные клетки от исходных (это могут быть селективные или репортерные гены);
- наличие соответствующего промотора, под который необходимо поместить чужеродный ген для экспрессии в клетке бактерии.

В качестве векторных молекул могут служить:

- плазмиды бактерий или дрожжей (простых эукариотических организмов);
- ДНК бактериофагов или вирусов;
- искусственные хромосомы дрожжей и бактерий;
- фазмиды – гибридные векторы, объединяющие преимущества плазмид и фагов.

3. *Введение нового (рекомбинантного) гена в клетку.* Полученную рекомбинантную конструкцию вводят в клетку-мишень (реципиент), где она реплицируется и передается потомкам. Этот процесс называется трансформацией (в основном для прокариот и дрожжей) и трансфекцией (для эукариот). В зависимости от типа вектора и схемы эксперимента рекомбинантная ДНК может либо реплицироваться автономно, либо встроиться в хромосому клетки-хозяина.

4. *Молекулярная селекция.* Используя селективный маркер, идентифицируют и отбирают клетки, несущие рекомбинантную ДНК.

В процессе генетической трансформации *E. coli* могут образоваться 3 типа клеток: а) клетки, не содержащие плазмиду, б) содержащие плазмиду без встройки (без рекомбинантной ДНК), в) содержащие плазмиду с рекомбинантной ДНК.

Для этого, например, высевают трансформированные клетки на селективную среду с антибиотиком, ген устойчивости к которому несет использованный вектор. При этом расти будут только колонии (клоны) рекомбинантных клеток.

5. *Синтез определенного белка – продукта введенного гена.* Получают специфический белковый продукт, синтезированный клетками-хозяевами, что служит подтверждением клонирования искомого гена. После введения в реципиентную клетку фрагмента чужеродной ДНК происходит ее клонирование с целью получения большого числа копий или начинается синтез продукта, закодированного во введенном гене. Чаще всего эти процессы осуществляются в бактериальных клетках. Поэтому клонирование прокариотической ДНК в клетках прокариот не вызывает осложнений.

## ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

### Задание 1

#### Изучить характеристику основных типов клонирующих векторов, используемых в рекомбинантной технологии

**Плазмидные векторы** – кольцевые двухцепочечные молекулы ДНК, имеющие клонирующий лимит до 10 т.п.н. Плазмиды найдены практически у всех исследованных бактерий, у некоторых до 10 видов разных плазмид, каждая из них выполняет свои характерные функции. Плазмиды также обнаружены у некоторых эукариот (у дрожжей – 3 типа различных плазмид). В одной клетке могут сосуществовать только плазмиды, принадлежащие к разным группам совместимости.

Каждая плазида содержит сайт инициации репликации (ориджин), специфичность которого определяет круг хозяев плазмиды, некоторые могут реплицироваться только в клетках одного вида, другие имеют широкий спектр хозяев. Размеры плазмид варьируют приблизительно от 1 до 500 т.п.н. Каждая плазида имеет постоянную определенную копийность в клетке – количество молекул на клетку.

На основе плазмид сконструировано огромное количество различных векторов, поскольку единственным обязательным элементом плазмиды является небольшой сайт инициации репликации, с остальной последовательностью можно проводить любые манипуляции.

Основным недостатком плазмидных векторов является их малая емкость в отношении клонируемых фрагментов ДНК. Выраженное делегирование больших вставок чужеродной ДНК в плазмидах связано с тем, что селективное преимущество в бактериях получают плазмиды с минимальным временем репликации.

**Вирусные векторы.** К вирусным векторам относят бактериофаги, космиды и бакуловирусы.

**Бактериофаг лямбда** имеет линейную молекулу ДНК с 48,5 т.п.н. Емкость клонирующих векторов была существенно повышена с разработкой векторов на основе фага лямбда. Центральную треть вирусного генома можно заменить чужеродной ДНК без нарушения жизненного цикла фага, клонирующий лимит от 8 до 24 т.п.н., что составляет половину генома лямбды дикого типа.

**Нитевидные бактериофаги** представляют собой одноцепочечную кольцевую ДНК, упакованную в белковую трубочку из одинаковых белковых субъединиц, двухцепочечная репликативная форма похожа на плазмиду. Вставки чужеродной ДНК до 1 т.п.н. очень стабильны. Наиболее широко ранее использовались векторы на основе фага M13.

**Космиды** – кольцевые молекулы ДНК, объединяющие свойства фага и плазмиды, содержат сайт инициации репликации и *cos*-сайты (комплементарные липкие концы) фага лямбда. Сконструированы для клонирования больших фрагментов ДНК в 35-50 т.п.н.

*Бакуловирусы* – большая и разнообразная группа вирусов, поражающих насекомых и других членистоногих, но абсолютно безвредных для позвоночных. Геном представлен кольцевой двухцепочечной ДНК, варьирующей в размере от 80 до 180 т.п.н. Замена несущественной для репликации части вирусного генома позволяет клонировать чужеродную ДНК до 15 т.п.н. Внедрение чужеродной ДНК происходит путем гомологичной рекомбинации (двойной кроссинговер) бакуловируса с небольшим плазмидным транспортным вектором, содержащим клонированный ген.

*Искусственные хромосомы* применяются для клонирования больших фрагментов ДНК. Бактериальные и дрожжевые искусственные хромосомы применяют для создания геномных библиотек.

*Бактериальные искусственные хромосомы* сконструированы на основе полового фактора *F E. coli* со строгим контролем репликации. Его генетическая система обеспечивает правильное распределение фактора F между делящимися клетками и поддерживает его копийность в 1-2 молекулы на клетку. Такие векторы позволяют клонировать фрагменты ДНК в 75-300 т.п.н.

*Дрожжевые искусственные хромосомы* представляют собой линейную ДНК, которая имеет все необходимое для репликации в дрожжах: теломеры, несколько сайтов инициации репликации (репликонов), дрожжевую центромеру, а также дополнительно содержит селективный маркер для идентификации и поддержания популяции рекомбинантных клеток. Клонированный лимит – 100-1000 т.п.н.

## Задание 2

### Изучить методы доставки рекомбинантной ДНК в клетки прокариот

В настоящее время известно около 40 различных способов доставки рекомбинантной ДНК в клетки, по-разному решающих проблему преодоления плазматической мембраны. Каждый из методов доставки чужеродной ДНК в клетки имеет свои особенности, преимущества и недостатки в отношении выживаемости клеток, эффективности введения, универсальности, возможностей технического осуществления. Выбор метода зависит от типа клеток-хозяев и типа использованного вектора.

Для доставки рекомбинантной ДНК в клетки прокариот применяют такие методы, как трансформация, конъюгация, трансдукция, электропорация и др.

*Трансформация* – метод введения рекомбинантной ДНК в клетку благодаря увеличению проницаемости клеточной оболочки (за счет локального разрушения последней). Клетки обрабатываются ледяным раствором хлористого кальция, а затем подвергаются тепловому шоку при температуре +42°C в течение 1-1,5 минуты.

*Конъюгация* – метод передачи рекомбинантной ДНК посредством бактериальных конъюгативных плазмид, обладающих способностью создавать межклеточные контакты, через которые они и переходят из одной

клетки в другую. Образование контактов между донорной и реципиентной клетками обеспечивается конъюгативными свойствами плазмид, а сам перенос ДНК – мобилизационными. При этом конъюгативная плазида может увлекать за собой обычный плазмидный вектор, находящийся в той же клетке. Таким образом можно трансформировать клетки-реципиенты, с трудом поддающиеся трансформации другими способами. В процессе конъюгации переносится только одна цепь донорской плазмиды, на которой затем синтезируется вторая цепь. Это приводит к тому, что конъюгативно передаваемая плазида не подвергается атаке хозяйских рестриктаз. Эффективность этого метода для бактерий сопоставима с трансформацией.

*Трансдукция* – процесс переноса (передачи) бактериальной ДНК из одной клетки в другую бактериофагом. Общая трансдукция используется в генетике бактерий для картирования генома и конструирования штаммов.

*Электропорация* – метод, заключающийся в воздействии импульсов высокого напряжения электрического тока на клеточную мембрану, которое вызывает временное образование большого количества пор, что обратимо увеличивает проницаемость мембран. Через образующиеся на короткое время поры чужеродная ДНК проникает в клетку. При работе с *E. coli* подготовленную клеточную суспензию (~50 мкл) и ДНК помещают между электродами и подают единичный импульс тока длительностью ~4,5 мс при напряжении 1,8 кВ, расстояние между электродами составляет 1 мм. Электропорирующий эффект высоковольтного разряда на бислойную липидную мембрану зависит от радиуса ее кривизны. Поэтому мелкие бактериальные клетки эффективно поглощают ДНК при значительно большей напряженности (12-18 кВ/см), чем крупные животные и растительные клетки, эффективно поглощающие ДНК при напряженности поля 1-2 кВ/см.

### **Контрольные вопросы**

1. Что понимают под понятием «генная инженерия»? Охарактеризуйте основные объекты генной инженерии.
2. Какие основные этапы технологии рекомбинантных ДНК? Чем они характеризуются?
3. Какие типы клонирующих векторов используются в рекомбинантной технологии?
4. Какими методами осуществляют доставку рекомбинантной ДНК в клетки прокариот? Чем они характеризуются?

*Тема 11*  
**УПРАВЛЕНИЕ КАЧЕСТВОМ ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ  
БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ**

**Цель занятия:** ознакомиться с системой контроля качества GMP на биотехнологическом предприятии.

**Время, отводимое на изучение темы:** 4 часа.

### **ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ**

Под *качеством* понимают степень соответствия характеристик продукции, системы или процесса установленным требованиям. Качество является одной из основополагающих характеристик продукции, оказывающих решающее влияние на создание потребительских предпочтений и формирование конкурентоспособности.

Биотехнологическая продукция и лекарственные средства относятся к тому виду продукции, оценить качество, эффективность и безопасность которого потребителю, как правило, не представляется возможным самостоятельно.

*Управление качеством* – это совокупность организационных мер, предпринимаемых в целях обеспечения соответствия качества лекарственных средств их назначению.

Для достижения цели управления качеством должна быть внедрена всесторонне разработанная и правильно функционирующая система качества, включающая в себя надлежащую производственную практику, контроль качества, управление рисками для качества.

Правила надлежащего производства и контроля качества применяются ко всем стадиям жизненного цикла биотехнологической продукции: производству средств для клинических исследований, переносу технологии, промышленному производству, а также прекращению производства.

#### **Надлежащая производственная практика (GMP – *Good Manufacturing Practice*)**

Правила GMP представляют собой требования к регламенту производства лекарственных средств, обеспечивающему высокую культуру работы на предприятии в отношении всей выпускаемой продукции. Эти правила носят официальный характер и составляют перечень руководящих нормативных документов.

Законодательная база по вопросам фармацевтического производства воплощена в государственных стандартах и технических кодексах установившейся практики Республики Беларусь и ЕАЭС. При этом нормативно-правовые акты, связанные с утверждением и изложением правил GMP, носят не только законодательный, но обязательный для исполнения характер.

Строгое соблюдение правил GMP требуется в связи с тем, что конечный потребитель самостоятельно не может оценить качество конечной продукции за исключением случаев грубых нарушений. Поэтому необходимо соблюдение предписанных указаний на всех этапах промышленного производства: от момента поступления исходного сырья и упаковочных материалов на предприятие до отгрузки готовой продукции на склад.

Надлежащая производственная практика является той частью управления качеством, которая гарантирует, что продукция постоянно производится и контролируется по стандартам качества, соответствующим ее назначению, а также в соответствии с требованиями регистрационного досье, протокола клинических исследований и спецификации на эту продукцию.

#### *Основные требования Надлежащей производственной практики*

1. Все производственные процессы определяются, систематически пересматриваются с учетом накопленного опыта и подтверждают способность постоянно производить лекарственные средства требуемого качества в соответствии со спецификациями.

2. Критические стадии производственного процесса и существенные изменения процесса должны пройти валидацию (т.е. действия, которые подтверждают, что определенная методика, процесс, оборудование, исходные материалы, деятельность или система действительно приводят к ожидаемым результатам).

3. Должны быть обеспечены все необходимые условия для выполнения требований правил GMP, включая наличие надлежащим образом обученного персонала, имеющего необходимую квалификацию; соответствующих помещений и площадей; соответствующих оборудования и обслуживания; соответствующих материалов, контейнеров и этикеток; утвержденных процедур и инструкций в соответствии с фармацевтической системой качества; соответствующих условий хранения и транспортирования.

4. Инструкции и процедуры должны быть изложены в письменной форме ясно и недвусмысленно, они должны быть конкретно применимы к имеющимся в наличии средствам.

5. Процедуры должны точно соблюдаться, и персонал должен быть обучен правильному их выполнению.

6. В процессе производства следует составлять записи (рукописным способом или с применением технических средств), документально подтверждающие фактическое проведение этапов, предусмотренных установленными методиками и инструкциями, а также то, что количество и качество продукции соответствуют установленным нормам.

7. Любые существенные отклонения должны быть полностью оформлены документально и расследованы с целью определения причины отклонения и осуществления соответствующих корректирующих и предупреждающих действий.

8. В понятной и доступной форме сохраняются записи, относящиеся к серии, включая документацию по реализации, которые позволяют проследить полную историю серии.

9. При оптовой реализации продукции необходимо свести к минимуму риски для ее качества и учитывать правила надлежащей практики оптовой реализации.

10. Должна быть в наличии система отзыва любой серии продукции из продажи или поставки.

11. Должны рассматриваться претензии на поставленную продукцию, расследоваться причины дефектов и приниматься соответствующие меры как в отношении недоброкачественной продукции, так и для предотвращения подобных случаев.

### **Контроль качества биотехнологического производства**

Контроль качества является частью надлежащей производственной практики, связанной с отбором проб, спецификациями и проведением испытаний, а также с процедурами организации, документирования и выдачи разрешения на выпуск, гарантирующими, что фактически проведены все необходимые испытания и что материалы не будут разрешены для использования, а готовая продукция не будет допущена к реализации или поставке до тех пор, пока их качество не будет признано удовлетворительным.

Деятельность по контролю качества не ограничивается лабораторными работами и должна распространяться на все решения, касающиеся качества продукции. У каждого производителя должно быть подразделение контроля качества, независимое от других подразделений и отделов. Подразделение должно быть обеспечено достаточными ресурсами для эффективного выполнения мероприятий по контролю качества.

Подразделение контроля качества может иметь такие обязанности, как разработка, валидация и обеспечение выполнения всех процедур по контролю качества, наблюдение за контрольными и архивными образцами материалов и продукции, обеспечение правильной маркировки упаковок с материалами и продукцией, мониторинг стабильности продукции, участие в расследовании претензий в отношении качества продукции и др.

Персонал подразделения контроля качества должен иметь доступ в производственные зоны для осуществления отбора проб и при необходимости проведения расследования. Оценка готовой продукции должна охватывать все относящиеся к ней факторы, включая условия производства, результаты испытаний в процессе производства, обзор производственной документации (включая документацию по упаковке), соответствие требованиям спецификаций на готовую продукцию и проверку окончательной упаковки.

Следует регулярно проводить *обзоры качества* всей производимой продукции с целью подтверждения постоянства имеющегося процесса, соответствия действующим спецификациям как на исходные материалы, так

и на готовую продукцию, чтобы выявить какие-либо тенденции (тренды) и установить возможность усовершенствования продукции и процесса. Такие обзоры следует оформлять документально и проводить, как правило, ежегодно, принимая во внимание предыдущие обзоры.

Они должны включать следующее:

- обзор исходных материалов (включая упаковочные материалы), используемых при производстве, особенно отмечая те, которые получены от новых поставщиков, и отдельный обзор прослеживаемости цепи поставки активных фармацевтических субстанций;
- обзор критических точек контроля в процессе производства и результатов контроля готовой продукции;
- обзор всех серий, которые не соответствовали установленным спецификациям, и результатов соответствующих исследований;
- обзор всех существенных отклонений или несоответствий, связанных с ними исследований, эффективности и результативности предпринятых корректирующих и предупреждающих действий;
- обзор всех изменений, внесенных в процессы или аналитические методики;
- обзор поданных, утвержденных или отклоненных изменений в регистрационное досье;
- обзор результатов мониторинга стабильности и любых неблагоприятных тенденций;
- обзор всех связанных с качеством продукции возвратов, претензий и отзывов, а также проведенных в это время исследований;
- обзор достаточности любых ранее проведенных корректирующих действий в отношении производства или оборудования;
- обзор пострегистрационных обязательств при получении новых регистрационных удостоверений или внесении изменений в регистрационные досье;
- состояние квалификации соответствующих оборудования и технических средств;
- обзор любых контрактных соглашений с целью подтверждения их соответствия действующим требованиям.

Производитель и держатель регистрационного удостоверения (если они являются разными организациями) должны оценивать результаты обзора качества и делать выводы о необходимости осуществления корректирующих и предупреждающих действий или проведения повторной валидации в рамках фармацевтической системы качества.

Должны быть в наличии процедуры для постоянного управления и анализа таких действий. Эффективность этих процедур должна быть подтверждена во время самоинспекции.

## Управление рисками для качества

Под **рисками** понимают комбинацию вероятности причинения вреда и тяжести такого вреда.

Управление рисками для качества является системным процессом, который предназначен для общей оценки, контроля, информирования и обзора рисков для качества биотехнологической продукции на протяжении ее жизненного цикла. Этот процесс может проводиться как перспективно, так и ретроспективно.

При производстве и применении биотехнологической продукции в определенной степени обязательно присутствуют риски. Риски для качества являются только одной составляющей общего риска.

Эффективный подход к управлению рисками для качества может в дальнейшем гарантировать конечному потребителю высокое качество биотехнологической продукции с помощью установления в ходе разработки и производства предупреждающих методов идентификации и контроля возможных проблем, связанных с качеством. Кроме того, применение управления рисками для качества может усовершенствовать процедуру принятия решений в случае возникновения проблем с качеством.

Существуют 2 основополагающих принципа управления рисками для качества:

- оценка рисков для качества должна базироваться на научных данных и быть непосредственно связанной с защитой пациента;
- уровень усилий, формализации и документального оформления процесса управления рисками для качества должен соответствовать уровню рисков.

Деятельность по управлению рисками для качества, как правило, осуществляется группами, включающими специалистов разных областей знаний. При формировании групп в них следует включать экспертов в соответствующих областях (например, отдела качества, развития бизнеса, инжиниринга, регуляторной деятельности, технологии, продаж и маркетинга, юридической службы, статистики и клиники), в дополнение к лицам, владеющим знаниями процесса управления рисками для качества.

Управление рисками для качества должно включать систематические процессы, предназначенные для координации, облегчения и совершенствования принятия научно обоснованных решений в отношении рисков.

Этапы, применяемые для **планирования** и **начала выполнения процесса управления рисками для качества**, могут включать:

- определение проблемного или представляющего риск вопроса, включая соответствующие предположения, устанавливающие возможность риска для качества;
- сбор исходной информации и данных о потенциальной опасности, вреде или влиянии на здоровье человека, имеющих отношение к общей оценке рисков;

- определение руководителя и необходимых ресурсов;
- создание графика, связывающего уровень принятия решения с возможностью осуществления процесса управления рисками для качества.

**Общая оценка рисков** состоит из идентификации опасностей, а также анализа и оценки рисков, связанных с воздействием этих опасностей.

Общую оценку рисков для качества начинают с четкого описания проблемы или аспекта риска. Если рассматриваемый риск для качества четко определен, будет легче установить соответствующий инструмент управления риском, а также виды информации относительно аспекта риска.

Для четкого определения рисков в целях общей оценки рисков, как правило, применяются 3 основных вопроса:

- что может происходить неверно;
- какова вероятность (возможность) того, что это будет происходить неверно;
- каковы последствия (их тяжесть).

*Идентификация риска* – систематическое использование информации для установления опасностей относительно аспекта риска или для описания проблемы.

*Анализ риска* – оценка риска, связанная с идентификацией опасностей (процесс установления качественной и количественной связи между вероятностью происшествя и тяжестью вреда).

*Оценка риска* – сравнение идентифицированного и проанализированного риска с установленными критериями приемлемости риска.

Результатом общей оценки рисков является либо количественная оценка рисков, либо качественное описание диапазона рисков.

**Контроль рисков** предполагает принятие решения по снижению или принятию рисков. Количество приложенных для контроля рисков усилий должно быть пропорционально важности рисков.

Контроль рисков должен сосредоточиться на следующих вопросах:

- превышает ли риск приемлемый уровень;
- что может быть сделано для снижения или устранения риска;
- каков приемлемый баланс между выгодой, рисками и ресурсами;
- возникают ли новые риски в результате проведения контроля установленных рисков.

*Снижение рисков* сосредоточено на процессах уменьшения или устранения рисков для качества при превышении установленного (приемлемого) уровня риска.

*Принятие рисков* – формальное решение принять окончательные риски или пассивное решение, если окончательные риски не установлены.

*Информирование о рисках* – передача информации относительно рисков и управления рисками лицам, ответственным за принятие решения, и другим заинтересованным лицам.

*Обзор (мониторинг) рисков.* Результаты процесса управления рисками следует пересматривать с учетом новых знаний и опыта. Частота любого обзора должна основываться на уровне рисков. Обзор рисков может включать пересмотр решения о принятии рисков.

## ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

### Задание 1

#### **Изучить гигиенические требования к персоналу биотехнологических предприятий в соответствии с правилами GMP**

Надлежащее производство лекарственных средств и биотехнологической продукции зависит от персонала. Поэтому на предприятии должно быть достаточное количество квалифицированного персонала для решения всех задач, относящихся к сфере ответственности производителя. Каждый сотрудник должен понимать индивидуальную ответственность, которая должна быть документально оформлена. Весь персонал должен знать принципы надлежащей производственной практики, касающиеся его деятельности, а также пройти первичное и последующее обучение в соответствии с его обязанностями, включая инструктаж по выполнению гигиенических требований.

На предприятии должны быть разработаны детальные программы по гигиене труда с учетом особенностей конкретного производства. Эти программы должны содержать процедуры, касающиеся здоровья, соблюдения гигиенических правил и требований к одежде персонала. Каждый сотрудник, обязанности которого предполагают пребывание в зонах производства и контроля, должен понимать и точно соблюдать эти процедуры. Руководство предприятия должно содействовать развитию программ по гигиене, которые следует обсуждать при обучении.

Лица, принимаемые на работу, должны пройти медицинский осмотр. Производитель обязан утвердить инструкции, обеспечивающие его осведомленность о состоянии здоровья персонала, которое может повлиять на качество продукции. После первичного медицинского осмотра должны проводиться регулярные последующие медицинские осмотры персонала.

Производитель должен принять меры, обеспечивающие недопущение лиц с инфекционными заболеваниями или открытыми повреждениями на открытых участках тела к производству лекарственных средств.

Лица, входящие в производственные зоны, должны носить защитную одежду, соответствующую выполняемым в этих зонах операциям.

В производственных и складских зонах запрещаются курение, прием пищи, питье, жевание, а также хранение пищевых продуктов, напитков, табачных изделий и личных лекарственных средств. Не допускаются лю-

бые действия, нарушающие гигиенические требования в производственных помещениях (зонах) или других местах, которые могут оказать неблагоприятное влияние на качество продукции.

Необходимо избегать непосредственного контакта рук персонала с открытой продукцией, а также с любой частью оборудования, контактирующей с продукцией.

Персонал должен быть обучен правилам мытья рук.

## **Задание 2**

### **Изучить требования к помещениям и оборудованию биотехнологических предприятий в соответствии с правилами GMP**

Помещения и оборудование следует располагать, проектировать, строить, оснащать и эксплуатировать таким образом, чтобы они соответствовали проводимым операциям. Их расположение и конструкция должны сводить к минимуму риск ошибок и обеспечивать возможность эффективной очистки и обслуживания в целях исключения перекрестной контаминации, накопления пыли или грязи и любых неблагоприятных факторов для качества продукции.

*Функциональные зоны:*

- производственная зона;
- складские зоны;
- зоны контроля качества;
- вспомогательные зоны.

Производственная среда помещений, учитывая все меры по защите производства, должна представлять минимальный риск контаминации материалов или продукции.

Следует проводить тщательное техническое обслуживание помещений, гарантируя, что ремонт и обслуживание не будут представлять никакой опасности для качества продукции. Помещения следует убирать и, где применимо, дезинфицировать в соответствии с подробными письменными инструкциями.

Освещение, температура, влажность и вентиляция должны быть соответствующими и не оказывать неблагоприятного воздействия (прямого или косвенного) ни на лекарственные средства во время их производства и хранения, ни на надлежащее функционирование оборудования.

Помещения должны быть спроектированы и оснащены таким образом, чтобы обеспечивать максимальную защиту от проникновения в них насекомых и животных.

Должны быть приняты меры, предотвращающие вход в помещения лиц, не имеющих права доступа в них. Зоны производства, хранения и контроля качества не должны использоваться как проходные для персонала, который в них не работает.

### Задание 3

#### Изучить требования к документации биотехнологических предприятий в соответствии с правилами GMP

Надлежащая документация составляет неотъемлемую часть системы обеспечения качества и является ключевым элементом работы в соответствии с правилами GMP.

В системе управления качеством производителя должны быть четко установлены различные виды используемой документации и носителей информации.

Документация может существовать в различных формах, в том числе на бумажном, электронном или фотографическом носителе.

Главной целью применяемой системы документации должно быть создание, управление, контроль и регистрация всей деятельности, которая может непосредственно или опосредовано влиять на все аспекты качества лекарственных средств и биотехнологической продукции.

В дополнение к надлежащему документальному оформлению различных процессов и оценки каких-либо наблюдений система управления качеством должна содержать достаточно подробные указания, которые способствуют общему пониманию требований таким образом, чтобы можно было продемонстрировать их постоянное соблюдение.

Существует 2 основных вида документации для выполнения требований правил GMP и регистрации их соблюдения:

##### *1. Регламентирующие документы:*

- *спецификации* – документы, содержащие подробные требования, которым должны соответствовать исходные и упаковочные материалы и продукция, использующиеся или получаемые при производстве (они являются основой для оценки качества продукции);
- *производственные рецептуры, технологические инструкции, инструкции по упаковке, методики испытаний* – документы, содержащие подробную информацию обо всех используемых исходных материалах, оборудовании и компьютеризированных системах (в этих документах должны содержаться все инструкции по осуществлению технологических процессов, упаковке, отбору проб и проведению испытаний; где применимо, следует указать все точки контроля в процессе производства, а также используемые процессно-аналитические технологии вместе с критериями приемлемости);
- *процедуры (стандартные операционные процедуры – СОП)* – документы, содержащие требования к выполнению определенных операций;
- *протоколы* – документы, содержащие требования к проведению и регистрации отдельных операций;

- *технические соглашения* – соглашения, заключенные между заказчиками и исполнителями относительно работ, которые выполняются сторонними организациями (аутсорсинг).

## 2. Регистрирующие документы:

- *записи* – свидетельства, подтверждающие выполнение различных действий для доказательства соответствия инструкциям (например, мероприятий, происшествий, расследований), для произведенных серий также содержат историю каждой серии продукции, включая информацию о ее реализации (записи содержат исходные данные, используемые для формирования других записей; записи, относящиеся к конкретной серии, могут быть собраны в досье на серию);
- *сертификаты анализа* – документы (паспорта, аналитические листки и др.), содержащие резюме результатов испытаний образцов продукции или материалов вместе с оценкой соответствия установленной спецификации;
- *отчеты* – документы, отражающие выполнение конкретных заданий, проектов или расследований вместе с результатами, выводами и рекомендациями.

Должен быть внедрен соответствующий контроль для обеспечения точности, целостности, доступности и четкости документов.

Регламентирующие документы должны быть доступны в письменном виде и не должны содержать ошибок (понятие «в письменном виде» используется в значении «записанный или задокументированный на носителях информации, с которых данные могут быть получены в читаемой форме»).

## Задание 4

### Изучить требования к биотехнологическому производству в соответствии с правилами GMP

Технологические операции должны осуществляться по четко установленным процедурам, они должны отвечать требованиям правил GMP для получения продукции требуемого качества и соответствовать разрешению (лицензии) на производство и регистрационному досье.

Производственный процесс должен осуществляться и контролироваться квалифицированным персоналом.

Все действия, проводимые с материалами и продукцией (приемка и карантин, отбор проб, хранение, маркировка, выдача в производство, технологический процесс, упаковка и реализация), следует осуществлять согласно письменным процедурам или инструкциям и оформлять документально.

Все поступающие материалы должны быть проверены, чтобы гарантировать, что поставка соответствует заказу.

Тара должна быть очищена (при необходимости) и маркирована с указанием требуемой информации. Факты повреждения тары и упаковки и любые другие проблемы, которые могут неблагоприятно повлиять на качество материалов, должны быть расследованы, оформлены документально, а информация о них должна быть доложена в подразделения контроля качества.

Поступающие материалы и произведенная готовая продукция должны немедленно помещаться в карантин, организованный по принципу раздельного хранения или за счет организационных мер, и содержаться в нем до получения разрешения на их использование или реализацию.

Приемку закупаемых промежуточной и нерасфасованной продукции проводят в соответствии с правилами, действующими для исходных материалов.

Все материалы и продукцию следует хранить в соответствующих условиях, установленных их производителем, в определенном порядке, обеспечивающем разделение по сериям и установленную очередность использования складских запасов.

Следует проводить проверки выходов и материального баланса, чтобы убедиться в отсутствии расхождений с допустимыми предельными значениями.

Не допускается одновременное или последовательное проведение операций с различными продуктами в одном и том же помещении, за исключением случаев, если не существует риска перепутывания или перекрестной контаминации.

Продукция и материалы должны быть защищены от микробной и другой контаминации на всех стадиях производства.

При работе с сухими материалами и продукцией необходимо принимать особые меры предосторожности по предотвращению образования и распространения пыли. Это особенно важно при работе с высоко активными и сенсibiliзирующими веществами.

В течение всего процесса производства все используемые материалы, тара для нерасфасованной продукции, основные единицы оборудования и, при необходимости, помещения должны быть маркированы этикетками или иным способом с указанием производимой продукции или обрабатываемых материалов, а также их дозировки (где применимо) и номера серии.

Там, где это приемлемо, такая маркировка должна также указывать стадию технологического процесса.

Этикетки, прикрепленные к контейнерам, оборудованию или помещениям, должны быть четкими, однозначными, а также соответствовать установленной на предприятии форме.

Рекомендуется в дополнение к информации на этикетках для указания статуса (например, «в карантине», «принято», «отклонено», «чистое» и др.) использовать цветовую маркировку.

Следует контролировать правильность соединения трубопроводов и других частей оборудования, применяемых для транспортировки продукции из одной зоны в другую.

Насколько это возможно, следует избегать любого отклонения от инструкций или процедур. Если происходит отклонение, оно должно быть письменно санкционировано лицом, имеющим соответствующие полномочия, с привлечением (при необходимости) подразделения контроля качества.

В производственные помещения может входить только персонал, имеющий право доступа в них.

### **Задание 5**

#### **Изучить требования к предотвращению перекрестной контаминации при производстве в соответствии с правилами GMP**

Для оценки и контроля риска перекрестной контаминации производимой продукции должен быть использован процесс управления рисками для качества, включая оценку активности и токсикологическую оценку. Также следует принять во внимание такие факторы, как дизайн (проект) и использование помещений и оборудования, потоки персонала и материалов, микробиологический контроль, физико-химические характеристики активных веществ, параметры процесса, возможности процессов очистки и аналитические возможности в отношении соответствующих пределов, установленных исходя из оценки производимой продукции.

Результат процесса управления рисками для качества должен являться основанием для определения необходимости и уровня, до которого помещения и оборудование должны быть выделены для конкретного лекарственного средства или группы лекарственных средств. Уровень выделения может варьироваться от специально выделенных частей, контактирующих с продуктом, до выделения всего производства.

Может быть приемлема локализация производственной деятельности в выделенных автономных производственных зонах на многоцелевом участке, где это оправдано.

Результаты процесса управления рисками для качества должны стать основой для определения уровня технических и организационных мер, необходимых для контроля рисков перекрестной контаминации.

#### *Технические меры:*

- выделенные производства (помещения и оборудование);
- автономные производственные площади, имеющие отдельное технологическое оборудование и отдельные системы вентиляции и кондиционирования воздуха (также может быть желательным изолировать определенные вспомогательные системы от тех, которые используются в других зонах);

- дизайн производственного процесса, помещений и оборудования, позволяющий свести к минимуму возможность перекрестной контаминации в процессе обработки, эксплуатации, технического обслуживания и очистки;
- использование «закрытых систем» для обработки и передачи материала (продукта) между оборудованием;
- использование систем с физическим барьером, в том числе изоляторов, как меры по локализации;
- контролируемое удаление пыли вблизи источника загрязнения, например через локальные вытяжные устройства;
- выделение технологического оборудования, частей, контактирующих с продуктом, или отдельных частей, которые труднее всего очищать (например, фильтры), инструментов для обслуживания;
- использование одноразовых технологий;
- использование оборудования, спроектированного с учетом облегчения очистки;
- надлежащее использование воздушных шлюзов и каскада давлений для локализации потенциального содержащегося в воздухе контаминанта в пределах определенной зоны;
- сведение к минимуму риска загрязнения, вызванного рециркуляцией или повторным использованием неочищенного или недостаточно очищенного воздуха;
- использование систем автоматической очистки на месте с валидированной результативностью;
- разделение зон мойки оборудования, сушки и хранения для общих зон очистки.

*Организационные меры:*

- выделение всего производства или автономных производственных площадей на основе кампаний (выделение с разделением во времени) с последующей очисткой с валидированной результативностью;
- хранение специальной защитной одежды внутри зон, где обрабатываются продукты с высоким риском перекрестной контаминации;
- верификация очистки после выпуска каждого продукта в целях поддержания эффективности подхода управления риском для качества в отношении продукции высокого риска;
- верификация очистки поверхностей, не контактирующих с продукцией, и мониторинг воздуха в производственной зоне и прилегающих зонах в зависимости от риска контаминации для подтверждения эффективности мер против контаминации взвешенными частицами или путем механического переноса;

- специальные меры по обращению с отходами, загрязненными промывными водами и загрязненной одеждой;
- регистрация случаев проливания и рассыпания, инцидентов или отклонений от процедур;
- разработка процессов очистки для помещений и оборудования таким образом, чтобы процессы очистки сами по себе не представляли риска перекрестной контаминации;
- разработка подробных форм для записей в процессе очистки для обеспечения выполнения очистки в соответствии с утвержденными процедурами и использование этикеток статуса очистки оборудования и производственных зон;
- использование общих зон очистки по принципу кампаний;
- надзор за поведением персонала для обеспечения уверенности в эффективности обучения и соответствия надлежащим мероприятиям процедурного контроля.

Мероприятия по предотвращению перекрестной контаминации и их эффективность следует периодически проверять в соответствии с установленными процедурами.

### Задание 6

#### Изучить типовую модель управления рисками для качества биотехнологического производства

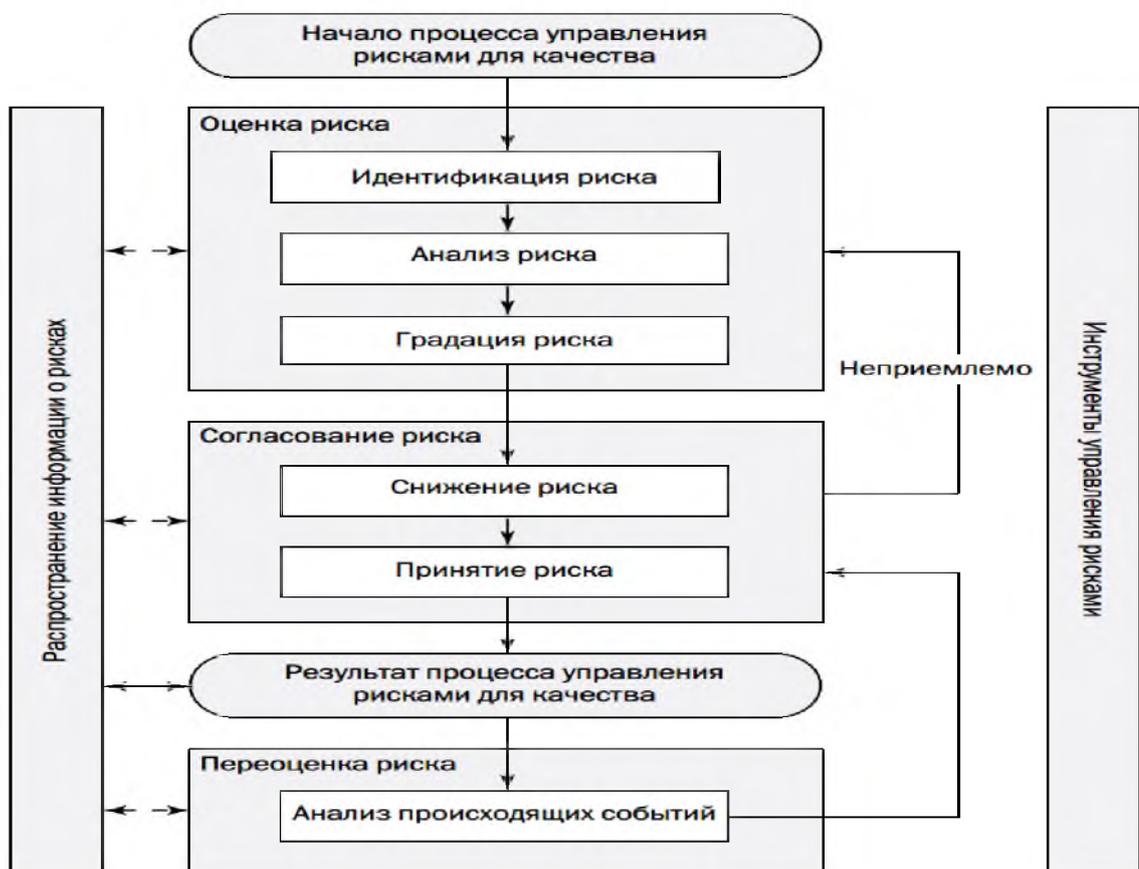


Рисунок 11.1 – Типовая модель управления рисками для качества  
(<https://gmpnews.ru>)

## Контрольные вопросы

1. Что понимают под качеством биотехнологической продукции? Какие составляющие включает в себя система управлением качества биотехнологического производства?
2. Какие основные требования предъявляются в соответствии с правилами GMP к биотехнологическому производству?
3. Каким образом должен быть организован контроль качества на биотехнологическом производстве?
4. Что понимают под рисками для качества? В чем заключается управление рисками для качества?

*Тема 12*  
**ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ БИОТЕХНОЛОГИИ.  
РОЛЬ БИОТЕХНОЛОГИИ В ЗАЩИТЕ И ОЗДОРОВЛЕНИИ  
БИОСФЕРЫ**

**Цель занятия:** ознакомиться с биотехнологическими методами, применяемыми для очистки твердых бытовых отходов, сточных вод, газо-воздушных выбросов.

**Время, отводимое на изучение темы:** 4 часа.

### ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Специфическое применение биотехнологических методов для решения проблем окружающей среды, таких, как переработка отходов, очистка воды, устранение загрязнений, составляет предмет экологической биотехнологии.

К основным направлениям экологической биотехнологии относят:

- расширение спектра и объема применяемых в растениеводстве, животноводстве и других отраслях биопрепаратов вместо синтетических;
- ремедиация окружающей среды путем активного извлечения и деструкции загрязняющих элементов (пестициды, тяжелые металлы, нефть и нефтепродукты);
- утилизация ила сточных вод, твердых коммунальных отходов;
- нитрификация, восстановление структуры, гумуса почв, сапробности (характеристика степени загрязненности водоема органическими веществами) водоемов путем разработки и промышленного применения безопасных для здоровья людей, животных и растений биологических технологий;
- сохранение генофонда ценных животных, растений и микроорганизмов путем применения биотехнологических подходов в восстановлении нарушенной экологии биогеоценоза.

Темпы загрязнения почвы, воды и воздуха ксенобиотиками, химическими веществами, в том числе токсическими соединениями, тяжелыми металлами, пестицидами, коммунальными отходами возможно приостановить, используя биологические технологии их утилизации.

Экологическая биотехнология основана на использовании живых организмов при переработке опасных отходов и борьбе с загрязнением окружающей среды. Эти методы обеспечивают более эффективное, по сравнению с традиционными подходами, обезвреживание, а также значительно снижают нашу зависимость от утилизации мусора путем сжигания и создания хранилищ токсичных отходов.

Использование биотехнологии для решения экологических проблем не новая идея. Уже более 100 лет смешанные бактериальные популяции

применяют для очистки сточных вод. Для поддержания жизни все живые организмы (животные, растения, бактерии и др.) поглощают и переваривают питательные вещества и выделяют в окружающую среду образующиеся при этом продукты жизнедеятельности.

В процессе круговорота загрязняющих веществ в экосистемах огромную роль играют микроорганизмы. Помимо использования деятельности микроорганизмов в пищевой, фармацевтической, химической промышленности и в генной инженерии появилась возможность их применения для переработки отходов жизнедеятельности человека. В связи с ростом городов и развитием промышленности возникли серьезные экологические проблемы: загрязнение водоемов, накопление ядовитых веществ, бытового мусора и отходов, загрязнение воздуха. Однако многие из созданных человеком низкомолекулярных соединений (ядохимикаты, детергенты) и высокомолекулярных полимеров оказались устойчивыми и не разлагаются микроорганизмами, т.е. требуется разработка более усовершенствованных технологий.

Обычно для утилизации отходов применяют комплексы микроорганизмов и специальные приборные устройства.

### **Биотехнологические методы утилизации твердых отходов**

Твердые отходы, являющиеся продуктами жизнедеятельности человека, складывают на городских свалках. В настоящее время увеличиваются не только площади свалок, но и неуправляемое попадание отходов в окружающую среду (в частности за счет рассыпания при транспортировке).

Несмотря на все возрастающий интерес к повторному использованию сырья, очевидно, что простая ликвидация отходов на свалках существенно дешевле любого способа их переработки. Когда же стало ясно, что при анаэробной переработке отходов образуется в больших количествах ценный энергетический носитель – биогаз, основные усилия стали направляться на соответствующую организацию свалок и получение на месте их переработки метана.

Состав отходов, вывозимых на городские свалки, становится все более однотипным: увеличивается объем бумаги и пластмасс на фоне снижения доли органических и растительных отходов. Исследования химического состава содержимого свалок показали, что фракция, поддающаяся биодеградации, составляет до 70% от общего количества твердых отходов.

На свалке постоянно происходит наслаивание нового материала через различные временные промежутки. В результате меняются температура, значения рН, потоки жидкости, ферментативная активность микроорганизмов и т.п., что негативно сказывается на переработке отходов.

В общей массе материала свалок присутствует сложная ассоциация микроорганизмов, которые развиваются на поверхности твердых частиц и служат для них источником биогенных элементов. Внутри ассоциации складываются разнообразные взаимосвязи и взаимодействия.

Состояние и биокаталитический потенциал микробного сообщества зависят от спектра химических веществ материала свалок, степени доступности этих веществ, наличия градиентов концентраций различных субстратов, в особенности градиентов концентраций доноров и акцепторов электронов и водорода. На типичной европейской свалке, где отходы размещены по отсекам, система их переработки является, по существу, совокупностью реакторов периодического действия, в которых субстрат (отходы) находится на разных стадиях биodeградации.

На начальной стадии биodeградации твердых отходов доминируют **аэробные процессы**, в ходе которых под воздействием микроорганизмов (грибов, бактерий, актиномицетов), а также беспозвоночных (клещей, нематод и др.) окисляются наиболее деградируемые компоненты, а затем деструкции подвергаются трудно и медленно окисляемые субстраты (лигнины, лигноцеллюлозы, меланины, танины).

В течение аэробной стадии температура среды может повышаться до +80°C, что вызывает инактивацию и гибель патогенной микрофлоры, вирусов, личинок насекомых. Повышение температуры увеличивает скорость протекания процессов деструкции органических веществ, но при этом снижается растворимость кислорода, что является лимитирующим фактором. Исчерпание молекулярного кислорода *in situ* приводит к снижению тепловыделения и накоплению углекислоты. Это, в свою очередь, стимулирует развитие в микробной ассоциации сначала факультативных, а затем облигатных анаэробов.

В **анаэробной минерализации**, в отличие от аэробного процесса, участвуют разнообразные микроорганизмы, взаимодействующие между собой. При этом виды, способные использовать более окисленные акцепторы электронов, получают термодинамические и кинетические преимущества. Происходит процесс гидролиза полимеров типа полисахаридов, липидов, белков; образованные при этом мономеры расщепляются с образованием водорода, диоксида углерода, а также спиртов и органических кислот; затем при участии метаногенов образуется метан.

В результате процессов, происходящих при биodeградации содержимого свалок, формируется 2 типа продуктов: фильтрующиеся в почву воды и биогазы.

*Фильтрующиеся воды*, помимо микроорганизмов, содержат разнообразные вещества, включая аммонийный азот, летучие жирные кислоты, алифатические, ароматические и ациклические соединения, терпены, минеральные макро- и микроэлементы, металлы. Поэтому важным условием при выборе и организации мест свалок является защита поверхности земли и грунтовых вод от загрязнений. Для борьбы с фильтрацией вод применяют малопроницаемые засыпки, создают непроницаемые оболочки вокруг свалки или специальные ограждения.

При биodeградации материала свалок образуется *биогаз* – ценный энергоноситель, который также может вызывать негативные явления в окружающей среде (неприятный запах, закисление грунтовых вод, снижение

урожайности сельскохозяйственных культур). Ограничить утечку биогаза помогают специальные приспособления (преграды; траншеи, наполненные гравием; системы экстракции газа), а также создание над массивом свалок оболочек, препятствующих этому процессу.

В последние десятилетия существенно возрос интерес к извлечению метана в процессах переработки свалок. Сбор и последующее применение биогаза, образующегося на свалках в больших количествах, имеет большие перспективы. Теоретический выход метана может составлять 0,266 м<sup>3</sup>/кг сухих твердых отходов. Огромное влияние на процесс метаногенеза оказывают температура и рН среды, влажность, уровень аэрации, химический состав отходов, наличие в них токсических компонентов и др. Газ, образуемый на свалке, извлекается с помощью вертикальных или горизонтальных перфорированных труб из полиэтилена. Применение воздуходувок и насосов повышает степень его извлечения. Газ используют для обогрева теплиц, получения пара, а после дополнительной очистки его можно перекачивать по трубам к местам потребления.

Таким образом, проблема анаэробной переработки твердых отходов, помимо экологического, носит и экономический характер, т.к. использование образуемого на свалках биогаза снижает материальные затраты на борьбу с загрязнениями, опасными и дурнопахнущими отходами.

### **Биотехнологические методы очистки сточных вод**

Использование и получение огромного количества продуктов в различных сферах человеческой деятельности сопровождается образованием сточных вод, загрязненных разнообразными органическими и неорганическими соединениями, многие из которых являются токсичными для живых организмов.

Сброс неочищенных сточных вод отрицательно сказывается на содержании в воде растворенного кислорода, ее рН, прозрачности и цветности и т.д., что отрицательно влияет на состояние компонентов водной экосистемы, снижает продуктивность и способность водоемов к самоочищению.

Сточные воды по источнику происхождения подразделяются на:

- *производственные (промышленные) сточные воды*, образующиеся в технологических процессах при производстве или добыче полезных ископаемых (отводятся через систему промышленной или общесплавной канализации);
- *бытовые (хозяйственно-фекальные) сточные воды*, образующиеся в жилых помещениях, а также в бытовых помещениях на производстве (отводятся через систему хозяйственно-бытовой или общесплавной канализации);
- *атмосферные сточные воды*, образующиеся в результате выпадения осадков, а также при таянии снега, льда, града (отводятся, как правило, через систему ливневой канализации).

Производственные сточные воды, в отличие от бытовых и атмосферных, не имеют постоянного состава.

Комплекс мероприятий по удалению загрязнений, содержащихся в бытовых и промышленных сточных водах, называется очисткой сточных вод. Это система методов, вызывающих разрушение или удаление из них присутствующих веществ, а также патогенных микроорганизмов.

Очистка сточных вод включает 3 этапа: механический, биологический и физико-химический. Иногда производят дезинфекцию сточных вод.

На **механическом этапе** осуществляют предварительную очистку сточных вод. Он необходим для подготовки поступающих на очистные сооружения сточных вод к дальнейшим этапам очистки.

Для вылавливания крупных загрязнений применяют решетки и сита. Затем стоки проходят через песколовки, где осаждаются мелкие частицы (песок, молотый кофе и т. п.) и жироловушки, в которых происходит удаление с поверхности воды гидрофобных веществ. Песок из песколовок обычно складывают или применяют в дорожных работах. Очищенные таким образом сточные воды переходят на первичные отстойники для выделения взвесей. В результате удаляется до 60-70% минеральных загрязнений, а БПК<sub>5</sub> (биохимическое потребление кислорода) снижается на 30%.

Механический этап очистки важен для создания равномерного движения сточных вод и позволяет избежать колебаний объема стоков на биологическом этапе.

**Биологический этап** (биологическая очистка) предполагает деградацию органической составляющей сточных вод микроорганизмами (бактериями и простейшими), которые используют в качестве ростовых субстратов различные соединения, входящие в их состав. При этом происходит минерализация вод, удаление органического азота и фосфора, а главной целью является снижение БПК<sub>5</sub>.

Достоинства биологической очистки заключаются в возможности удаления из стоков широкого спектра органических и неорганических веществ, простоте используемой аппаратуры и относительно невысоких эксплуатационных расходах.

На этом этапе необходимо строго соблюдать технологии режима очистки и, главное, учитывать чувствительность микроорганизмов к высоким концентрациям загрязнителей. Поэтому перед биологической очисткой стоки необходимо разбавлять.

На этом этапе очистки сточных вод можно применять как аэробные микроорганизмы, которые используют для окисления веществ кислород, так и анаэробные микроорганизмы, не имеющие доступа ни к свободному растворенному кислороду, ни к предпочтительным акцепторам электронов типа нитрат-ионов. В этих процессах в качестве акцептора электронов микроорганизмы могут использовать углерод.

При выборе между аэробными и анаэробными процессами предпочтение обычно отдают первым: аэробные системы более надежны, стабильно функционируют и больше изучены. Биологическая очистка стоков прово-

дится в различных по конструкции сооружениях: биофильтрах, аэротенках (с активным илом) и метантенках (анаэробное брожение).

**Физико-химический этап.** Для улучшения параметров очистки применяют различные химические методы, например дополнительное осаждение фосфора солями железа и алюминия, хлорирование, озонирование.

Наиболее распространенным способом дезинфекции воды является ввод в нее хлора – сильного окислителя, который добавляется к воде в виде газа или концентрированного водного раствора. Эффективность обработки хлором зависит от ряда факторов, в том числе от рН, времени обработки, температуры и наличия взаимодействующих с хлором органических веществ. Небольшое количество свободного хлора оставляют в воде на случай попадания загрязнений в потребительскую водопроводную сеть.

### **Биотехнологические методы очистки газо-воздушных выбросов**

Основными загрязнителями атмосферы являются предприятия нефтеперерабатывающей, химической, пищевой и других отраслей промышленности, а также крупные сельскохозяйственные комплексы, отстойники сточных вод, установки по обезвреживанию отходов.

В воздухе крупных промышленных городов содержится огромное количество вредных веществ, а концентрация многих токсикантов превышает допустимые уровни. Это органические (ароматические и непредельные углеводороды, азот-, кислород-, серо- и галогенсодержащие соединения) и неорганические вещества (сернистый газ, сероуглерод, окислы углерода, аммиак, хлор, водород, галогены).

Биологические методы очистки газо-воздушных выбросов базируются на способности микроорганизмов разрушать в аэробных условиях широкий спектр веществ и соединений до конечных продуктов (углекислого газа и воды).

Микроорганизмы способны метаболизировать алифатические, ароматические, гетероциклические, ациклические и различные соединения хлора, аммиак, окислять сернистый газ, сероводород и диметилсульфоксид. Образующие сульфаты утилизируются другими микробными видами. Аэробные карбоксидобактерии эффективно окисляют монооксид углерода, представители рода *Nocardia* – стерины и ксилол, *Hyphomicrobium* – дихлорэтан, *Xanthobacterium* – этан и дихлорэтан, *Mycobacterium* – винилхлорид.

Для биологической очистки воздуха применяют 3 типа установок: биофильтры, биоскрубберы и биореакторы с омываемым слоем.

Основные требования, предъявляемые к установкам биологической очистки газов, заключаются в простоте и эксплуатационной надежности конструкции, высокой удельной производительности (отношение объема воздуха, прошедшего через нее за 1 ч, к общему объему установки) и высокой степени очистки.

Масштабы промышленного применения методов биологической очистки воздуха в настоящее время весьма незначительны.

Наиболее распространенным типом установок являются *биофильтры*. Они достаточно дешевы, малоэнергоёмки, требуют незначительных расходов воды. Однако из-за низкого содержания микроорганизмов в единице объема материала фильтрующего слоя производительность биофильтров сравнительно невысока – от 5 до 400 м<sup>3</sup> очищаемого воздуха на 1 м<sup>2</sup> поперечного сечения фильтрующего слоя в час. Высота биофильтров невелика – около 1 м (это обусловлено требованиями однородности структуры и газодинамическими ограничениями), поэтому биофильтры занимают большие площади (от 10 до 1600 м<sup>2</sup>).

*Биоскрубберы*, по сравнению с биофильтрами, занимают меньшую площадь, т.к. представляют собой башни высотой несколько метров. Эксплуатационные затраты при использовании биоскрубберов выше, т.к. процесс биоочистки воды требует существенных затрат. Применение биоскрубберов эффективно при наличии в воздухе хорошо растворимых токсических веществ. Их производительность существенно выше, по сравнению с биофильтрами; эффективность очистки также высока.

Наиболее перспективными для очистки воздуха являются *биореакторы с омываемым слоем*. Практически не уступая в степени очистки другим установкам, они характеризуются более высокой удельной производительностью (несколько тысяч кубометров очищаемого воздуха в час). Такие малогабаритные биореакторы очень эффективны для очистки воздуха предприятий интенсивного животноводства. Степень очистки воздуха от ацетона, бутанола, пропионового альдегида, этилацетата в реакторе с иммобилизованными на активированном угле микроорганизмами достигает 90% при удельной производительности установки 10 тыс. м<sup>3</sup>/ч.

## ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

### Задание 1

#### **Изучить особенности промышленного производства биогаза**

Промышленные установки для получения биогаза отличаются наличием механизации, систем подогрева, гомогенизации, автоматике. Наиболее распространенным промышленным методом получения биогаза является анаэробное сбраживание в метантанках.

Принцип работы промышленной биогазовой установки заключается в том, что биомасса (отходы) периодически подается с помощью насосной станции или загрузчика в реактор, который представляет собой подогреваемый и утепленный резервуар (из железобетона или стали с покрытием), оборудованный миксерами. В реакторе находятся полезные бактерии, питающиеся биомассой. Продуктом жизнедеятельности бактерий является биогаз. Для поддержания жизни бактерий требуется подача субстрата, подогрев до температуры +35...+38°C и периодическое перемешивание. Об-

разующийся биогаз скапливается в хранилище (газгольдере), затем проходит систему очистки и подается к потребителям (котел или электрогенератор). Реактор работает без доступа воздуха.

Для сбраживания некоторых видов сырья в чистом виде требуется особая технология. Например, спиртовая барда перерабатывается с использованием химических добавок.

Для кислой меласной барды используется щелочь. Возможна переработка этих же субстратов по одностадийной технологии без химических добавок, но при коферментации (смешивании) с другими видами сырья, например, с навозом или силосом.

Метановые бактерии проявляют свою жизнедеятельность в пределах температуры  $0...+70^{\circ}\text{C}$ . Если температура выше – они начинают гибнуть, за исключением нескольких штаммов, которые могут жить при температуре среды до  $+90^{\circ}\text{C}$ . При минусовой температуре они выживают, но прекращают свою жизнедеятельность. В литературе как нижнюю границу температуры указывают  $+3...+4^{\circ}\text{C}$ .

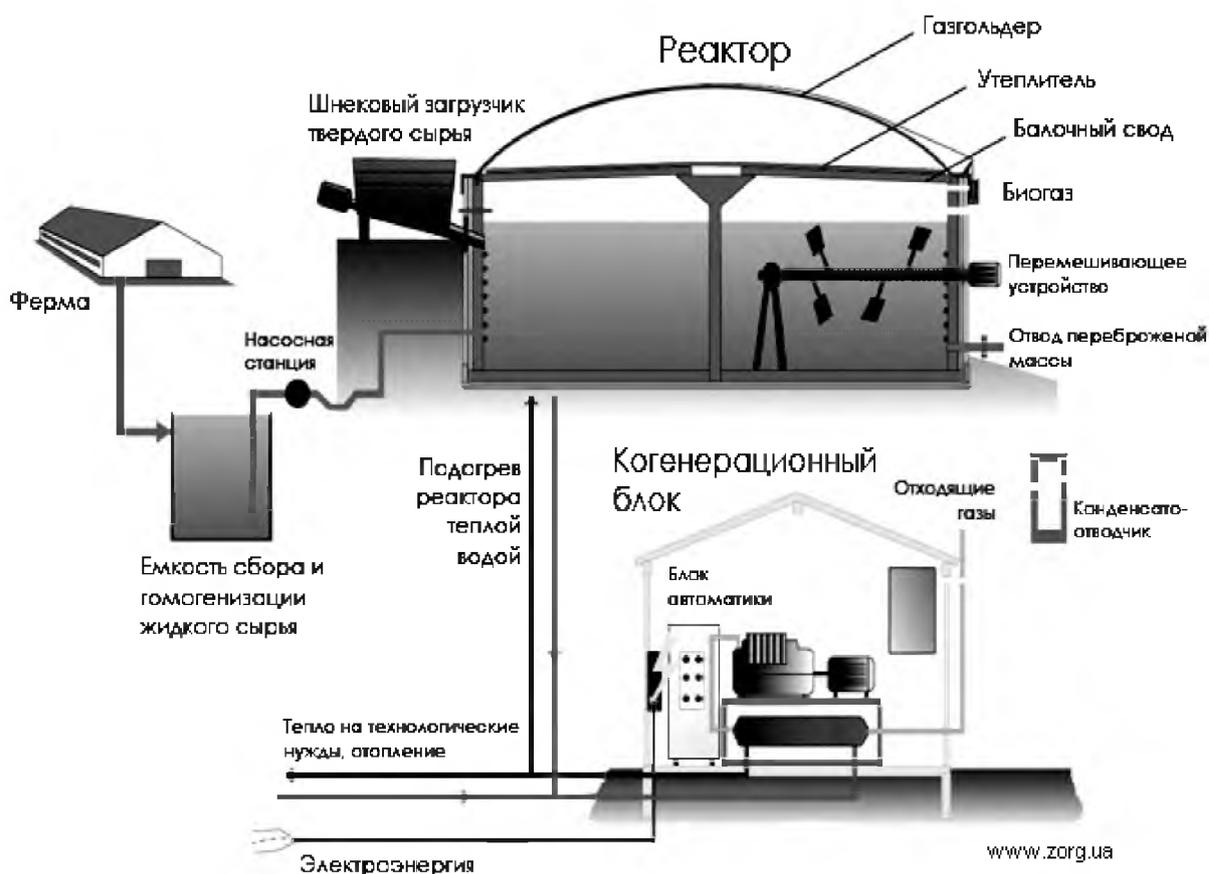


Рисунок 12.1 – Принципиальная схема промышленной установки производства биогаза (*www.zorg.ua*)

## Задание 2

### Изучить особенности аэробных и анаэробных процессов очистки сточных вод

#### Аэробные процессы очистки сточных вод

Аэробный метод основан на использовании аэробных групп организмов, для жизнедеятельности которых необходим постоянный приток кислорода и температура  $+20...+40^{\circ}\text{C}$ . При аэробной очистке микроорганизмы культивируются в активном иле или биопленке. Процесс биологической очистки происходит в аэротенках, в которые подают сточную воду и активный ил.

*Биофильтр* – наиболее распространенный тип биореактора с неподвижной биопленкой, применяемый для очистки стоков. По существу, это реактор с неподвижным слоем и противотоком воздуха и жидкости. Биомасса растет на поверхности насадки в виде пленки. Особенности насадки или фильтрующего слоя являются значительная удельная поверхность для развития микроорганизмов и большая пористость. Последнее придает необходимые газодинамические свойства слою и способствует прохождению через него воздуха и жидкости.

В биофильтре происходит непрерывный прирост и отмирание биопленки. Отмершая биопленка смывается током очищаемой воды и выносятся из биофильтра. Очищенная вода поступает в отстойник, в котором освобождается от частиц биопленки, и далее сбрасывается в водоем. Процесс окисления органических веществ сопровождается выделением тепла, которое используется для обогрева биофильтра.

Эксплуатация биофильтров достаточно несложный процесс. Важное условие их эффективной работы – тщательная предварительная очистка стоков от взвешенных частиц, способных засорить распределительное устройство. Неблагоприятными факторами при эксплуатации биофильтров являются вероятность их переполнения, размножение мух на поверхности, дурной запах как следствие избыточного образования микробной биомассы.

Около 70% очистных сооружений Европы и Америки представляют собой капельные биофильтры. Срок службы таких биореакторов исчисляется десятками лет (до 50). Основной недостаток конструкции – избыточный рост микробной биомассы, что приводит к засорению биофильтра и вызывает сбой в системе очистки.

*Аэротенк* относится к гомогенным биореакторам. Типовая конструкция биореактора представляет собой железобетонный герметичный сосуд прямоугольного сечения, связанный с отстойником. Подача воздуха в «коридоры» аэротенка осуществляется через пористые железобетонные плиты или через систему пористых керамических труб. Обычно воздухораспределительное устройство располагают не по центру, а около одной из стен коридора. В результате этого в аэротенке происходит турбулизация потока, и сточные воды не только продвигаются вдоль коридора, но и закручи-

ваются по спирали внутри него. Это улучшает режим аэрации и условия очистки.

В аэротенке происходит непрерывная ферментация. Частицы активного ила, образованные бактериями и простейшими, являются флокулирующей смесью. По сравнению с биопленкой, функционирующей в биофильтрах, в активном иле аэротенков беднее экологическое разнообразие видов.

Биологическая очистка в аэротенке осуществляется в 2 этапа:

- на первом этапе микроорганизмы активного ила адсорбируют загрязняющие вещества стоков;
- на втором – окисляют их и восстанавливают свою окислительную способность.

Число микроорганизмов в активном иле достигает многих миллиардов бактериальных клеток в 1 г ила. Количество бактерий, как и их видовой состав, может быстро меняться, в зависимости от химического состава поступающей в данный момент воды.

Микроорганизмы формируют скопления в виде слизи (зооглеи), в которой много палочковидных бактерий, кокков. Все группы микроорганизмов осуществляют первичное окисление и разложение жиров и углеводов и усваивают продукты их распада. При этом образуются промежуточные вещества: спирты, органические кислоты.

В качестве самостоятельного очистного сооружения или конечного пункта очистки стоков, прошедших стадию биологической очистки в биофильтре или аэротенке, используют *биологические (очистные) пруды*. Если таковые функционируют как самостоятельные системы водоочистки, сточные воды перед поступлением в них разбавляются 3-, 5-кратными объемами технической или хозяйственно-питьевой воды. Для отстоянных стоков без разбавления нагрузка на пруды составляет до 250 м<sup>3</sup>/га/сут., для биологически очищенных вод – до 500 м<sup>3</sup>/га/сут. Средняя глубина прудов составляет от 0,5 до 1,0 м. Срок «созревания» прудов в зонах умеренного климата – не менее 1 месяца.

Методы аэробной биологической очистки сточных вод непрерывно совершенствуются. В последние годы стали внедряться более эффективные системы биоочистки, например *шахтные реакторы*, с использованием для аэрирования кислорода. Такие биореакторы называют *окситенками*. Концентрация растворенного в них кислорода достигает 10-12 мг/л, что в несколько раз превосходит уровень аэрации в аэротенках. В результате повышенной аэрации стоков концентрация активного ила в них возрастает до 15 г/л и их окислительная мощность в 4-5 раз превосходит аэротенки.

Шахтные биореакторы позволяют реализовать процесс очистки стоков аналогично протеканию его в окислительном канале, но расположенном вертикально. Такие реакторы занимают небольшие площади и большей частью заглублены в грунт. Высота шахтных аппаратов достигает 50-150 м при диаметре 0,5-10,0 м. Внутри аппарата вмонтирован полый стержень или специальное устройство, обеспечивающее образование зон восходящего и нисходящего потоков для циркуляции очищаемой воды.

Однако при эксплуатации окситенков возникает проблема отделения твердых частиц от иловой смеси: микропузырьки воздуха прилипают к твердым частицам и ухудшают осаждение. Для улучшения осаждения применяют вакуумную дегазацию, флотацию, отдувку воздуха. По завершении стадии дегазации иловая смесь направляется в аэротенк, где после удаления микропузырьков происходит доокисление оставшейся органики. Далее стоки поступают по обычной схеме в отстойник.

### Анаэробные процессы очистки сточных вод

Анаэробные процессы очистки сточных вод не получили достаточно широкого развития. Они существенно уступают аэробным процессам в скорости очистки, хотя имеют ряд преимуществ:

- масса образуемого в них активного ила практически на порядок ниже (0,1-0,2), по сравнению с аэробными процессами (1,0-1,5 кг/кг удаленного ВПК);
- существенно ниже энергозатраты на перемешивание;
- дополнительно образуется энергоноситель в виде биогаза.

Вместе с тем анаэробные процессы очистки мало изучены, и для них требуются дорогостоящие очистные сооружения больших объемов.

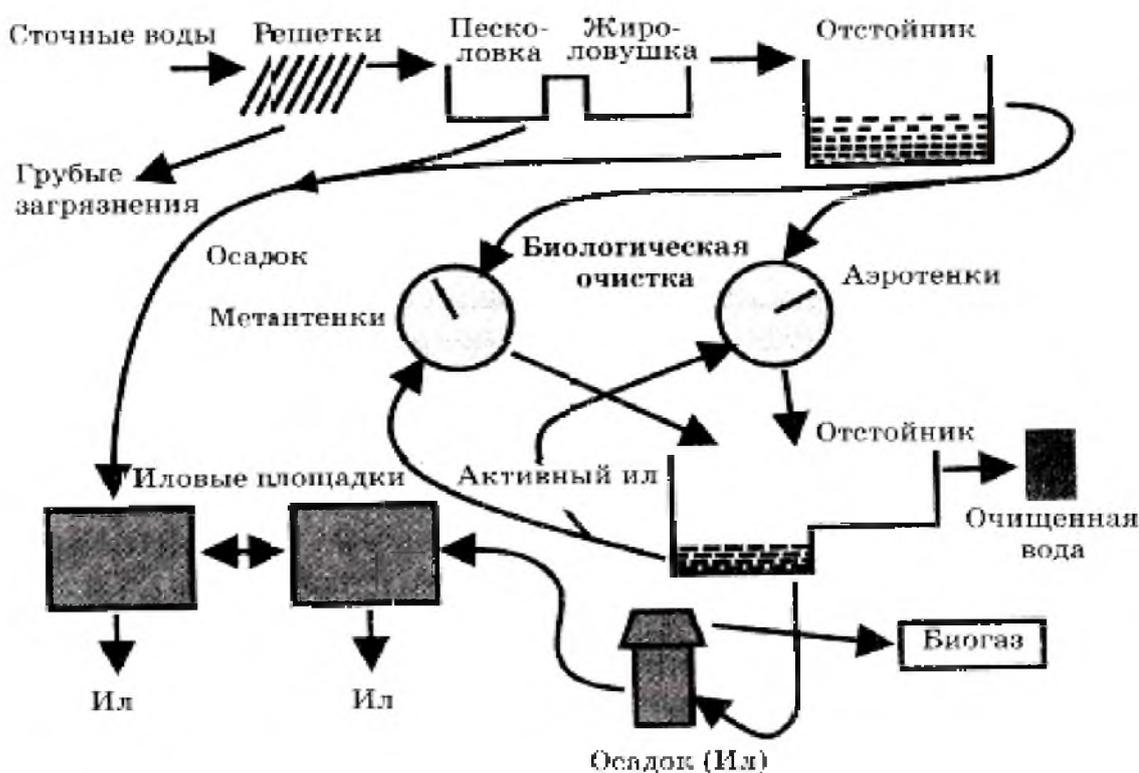


Рисунок 12.2 – Схема гидромеханической очистки сточных вод (Загоскина Н. В., 2009)

Используемые для этих целей биореакторы – септиктенки и метантенки – представляют собой отстойники, в которых осадок ила подвергается анаэробной деградации.

Например, в первичном отстойнике остался избыточный осадок ила, содержащий недоокисленные вещества.

Этот осадок плохо сохнет, содержит много болезнетворных микробов, имеет неприятный запах, привлекает мух.

Его направляют на сбраживание в бескислородных условиях в специальные резервуары – метантенки, где развиваются анаэробные микроорганизмы, функционирующие при температуре + 23...+55°C.

В процессах метанового сбраживания с образованием газа метана участвуют микроорганизмы родов *Methanococcus* и *Methanobacterium*. Разные виды клостридий разлагают целлюлозу, пектины, жиры. Очищение осадка в метантенках может длиться от 6 до 15 суток.

За это время погибают яйца гельминтов (например, болезнетворные микроорганизмы), остаются единичные особи кишечной палочки, а общее количество бактерий составляет не более 100 клеток в 1 мл.

Высушенный осадок недоокисленных примесей содержит до 20 микроэлементов и служит неплохим удобрением.

Анаэробные проточные сбраживатели такого типа применяют для анаэробной биологической очистки промышленных и сельскохозяйственных стоков.

Особенно эффективно применение сравнительно недорогих анаэробных систем для сильно загрязненных стоков пищевой промышленности и отходов интенсивного животноводства, которые имеют высокие уровни нагрузки по БПК и ХПК (химическая потребность в кислороде), а навозные стоки – также и высокое содержание нерастворимых компонентов, не поддающихся биодegradации.

Для их очистки применяют сбраживатели полного смешения. Стоки свино- и птицекомплексов освобождаются в ходе анаэробной биоочистки только на 50% ХПК, а стоки ферм крупного рогатого скота – на 30%.

Высокие концентрации органики и аммонийного азота (до 4000 мг/л) способны ингибировать процесс дegradации. В целом же анаэробные процессы очистки стоков, обладая рядом несомненных достоинств, не находят пока такого широкого применения, как аэробные системы биологической очистки.

**Задание 4**  
**Изучить особенности основных устройств,**  
**применяемых для биологической очистки воздуха**

**Таблица 12.1 – Особенности установок биологической очистки воздуха**

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

**Таблица 12.2 – Преимущества и недостатки установок биологической очистки воздуха**

Преимущества и недостатки	Тип установки
	<i>Биофильтр</i>
<i>Преимущества</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• простота конструкции;</li> <li>• низкие капитальные затраты;</li> <li>• низкие текущие расходы;</li> <li>• малая энергоемкость;</li> <li>• незначительность расходов воды;</li> <li>• возможность разложения слаборастворимых в воде веществ;</li> <li>• применимость для устранения запахов</li> </ul>

<i>Недостатки</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• низкая объемная скорость потока;</li> <li>• небольшая высота биофильтров из-за требований однородности структуры и газодинамических ограничений (около 1 м), приводящая к необходимости выделения больших площадей (от 10 до 1600 м<sup>2</sup>) для размещения;</li> <li>• обработка потоков с низкими концентрациями устранимых компонентов;</li> <li>• невозможность контроля процесса;</li> <li>• каналообразование в фильтрующем слое;</li> <li>• ограниченность срока службы фильтрующего слоя;</li> <li>• невозможность удаления избытка биомассы;</li> <li>• потребность в некотором периоде для созревания и адаптации микробиологического ценоза (от нескольких часов до нескольких недель)</li> </ul>
<b><i>Биореактор с омываемым слоем</i></b>	
<i>Преимущества</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• простота;</li> <li>• низкие капитальные затраты;</li> <li>• низкие текущие расходы;</li> <li>• возможность разложения слаборастворимых в воде веществ;</li> <li>• возможность удаления избытка биомассы;</li> <li>• возможность автоматизации процесса;</li> <li>• высокая производительность;</li> <li>• компактный размер;</li> <li>• возможность сокращения периода достижения стационарного режима биореактора после его запуска до нескольких часов при использовании заранее адаптированных к очищаемым веществам микроорганизмов;</li> <li>• отсутствие засорения загрузки;</li> <li>• большой срок службы загрузки</li> </ul>
<i>Недостатки</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• потребность в более значительных количествах воды;</li> <li>• большие энергозатраты (на рециркуляцию воды) по сравнению с обычным биофильтром</li> </ul>
<b><i>Биоскруббер</i></b>	
<i>Преимущества</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• возможность контроля и моделирования процесса;</li> <li>• высокий коэффициент массопередачи;</li> <li>• обработка потоков с высокими концентрациями загрязнителей;</li> <li>• высокая стабильность в работе;</li> <li>• меньшая занимаемая площадь по сравнению с биофильтрами;</li> <li>• существенно более высокая производительность;</li> <li>• отсутствие стоков</li> </ul>
<i>Недостатки</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• высокие капитальные затраты;</li> <li>• высокие текущие расходы;</li> <li>• образование избыточной биомассы;</li> <li>• проявление эффективности только при удалении хорошо растворимых токсических веществ</li> </ul>

## Задание 5

### Изучить технологическую схему биологической очистки воздуха в биологической фильтрующей системе

Основным элементом *биофильтра для очистки воздуха*, как и водоочистного биофильтра, является фильтрующий слой, который сорбирует токсические вещества из воздуха. Далее эти вещества в растворенном виде диффундируют к микробным клеткам, включаются в них и подвергаются деструкции.

В качестве носителя для фильтрующего слоя используют природные материалы – компост, торф и др. Эти материалы содержат в своем составе различные минеральные соли и вещества, необходимые для развития микроорганизмов. Поэтому в биофильтры не вносят каких-либо минеральных добавок.

Воздух, подлежащий очистке, подается вентилятором в систему, проходит через фильтрующий слой в любом направлении (снизу вверх или наоборот). При этом воздух должен проходить через всю массу фильтрующего слоя равномерно, для чего требуются однородность слоя и определенная степень влажности. Оптимальная для очистки воздуха влажность фильтрующего слоя составляет 40-60% от веса материала носителя. При недостаточной влажности материала фильтрующего слоя в нем образуются трещины, материал пересыхает. Это затрудняет прохождение воздуха и снижает физиологическую активность микроорганизмов. Увлажнение материала обеспечивается распылением воды на поверхности фильтрующего слоя. При избыточной влажности в толще слоя происходит образование анаэробных зон с высоким аэродинамическим сопротивлением. В результате снижается время контакта потока воздуха с поглотителем, падает эффективность очистки.

В толще фильтрующей массы не должно образовываться более плотных зон или комков материала, что бывает при использовании компоста, так как при этом снижается удельная площадь поверхности фильтрующего слоя. В материале фильтрующего слоя не должно возникать температурных градиентов и не должно происходить резких изменений pH среды. Поэтому температурный режим в биофильтре поддерживается постоянным. Для этого воздух, подаваемый в биофильтр, подогревается, установка в целом термостатируется.

Эффективность работы биофильтра определяется газодинамическими параметрами фильтрующего слоя, спектром и концентрацией присутствующих в воздухе веществ, ферментативной активностью микроорганизмов-деструкторов. При этом скорость удаления вредных примесей из воздуха в процессе биологической очистки может лимитироваться как диффузией веществ из газовой фазы в биокаталитический слой, так и скоростью протекания биохимических реакций в микробных клетках. При высокой входной концентрации вредных веществ в воздухе процесс их деструкции в ходе прохождения потока через фильтрующий слой неравномерен: сна-

чала разрушаются легкодоступные вещества, и только в конце процесса начинается разрушение труднодеградируемых соединений.

Стационарное состояние и наиболее высокая скорость биологической очистки наступают спустя некоторое время после запуска биофильтра, поскольку необходим некоторый период для созревания и адаптации микробиоценоза (длительность периода адаптации зависит от концентрации веществ в воздухе и микробного состава в диффузионном слое и может составлять от нескольких часов до нескольких недель).

Иногда концентрация микроорганизмов в ходе очистки возрастает и может стать избыточной, поэтому материал фильтрующего слоя периодически приходится обновлять. Длительность циклов достаточно велика и составляет несколько лет.

Для биологической очистки и дезодорирования промышленных газозвудушных выбросов, содержащих органические компоненты различной природы, широко используется биологическая фильтрующая система БФС-8 (рисунок 12.3).

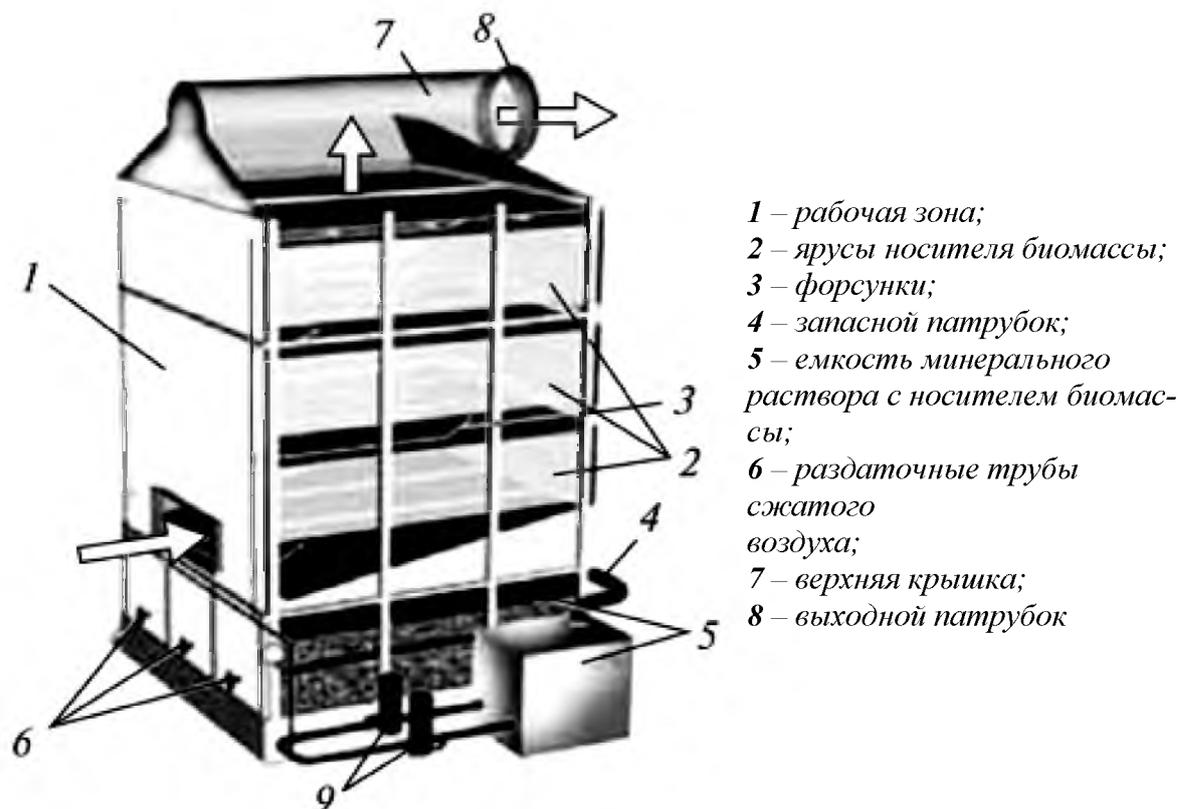


Рисунок 12.3 – Установка БФС-8 (<https://studref.com>)

Она предназначена для применения в химических, лакокрасочных, резинотехнических, мебельных, табачных, деревообрабатывающих, пищевых и других производствах.

Технология очистки газозвудушных выбросов основана на разложении микроорганизмами вредных органических веществ, содержащихся в газозвудушной смеси и являющихся источником энергии для биомассы. Органические соединения разлагаются на углекислый газ и воду. Подбор

консорциумов микроорганизмов осуществляется в зависимости от состава очищаемых смесей.

Суммарная концентрация углеводов в очищаемых газах должна находиться в пределах от 400 до 7000 мг/м<sup>3</sup>.

При запыленности очищаемых вентвыбросов более 5 мг/м<sup>3</sup> необходима установка предварительной очистки от пыли.

Система эксплуатируется при температуре воздуха в помещении +18...+35°C, относительной влажности до 60%. Температура рабочей зоны +25...+35°C.

Принцип работы установки заключается в том, что вытяжной вентилятор создает в системе воздуховодов установки разрежение, необходимое для преодоления аэродинамического сопротивления биофильтра, и обеспечивает необходимый расход воздуха через установку.

Выбросы загрязненного воздуха через патрубок попадают в рабочую зону 1 биофильтра и увлажняются посредством контакта с разбрызгиваемым в объеме рабочей зоны и стекающим по отбойному листу питательным раствором. Поток воздуха проходит последовательно ярусы 2 носителей бактерий, орошаемых питательным раствором из форсунок 3. На поверхности носителя происходит биодеструкция органических веществ. Из рабочей зоны очищенный воздух через каплеуловитель поступает в выходной патрубок 8, который присоединяется к воздуховоду выброса очищенного воздуха в атмосферу.

Питательный раствор, стекая по отбойному листу, попадает в емкость 5 с питательным раствором. Из накопительного бака через сетчатый фильтр, предотвращающий попадание крупных конгломератов биомассы, питательный раствор электронасосным агрегатом подается в форсунки системы увлажнения.

При необходимости загрязненный воздух подогревается насыщенным водяным паром или в электро-(паровых) калориферах.

## **Задание 6**

### **Изучить технологическую схему биологической очистки воздуха в биореакторах с омываемым слоем**

Биореакторы с омываемым слоем являются наиболее перспективными для очистки воздуха. Такие малогабаритные установки очень эффективны для очистки воздуха предприятий интенсивного животноводства.

Рабочим телом биореактора с омываемым слоем являются иммобилизованные микроорганизмы (биослой реактора представляет собой гранулы с этими клетками; он омывается водой, содержащей необходимые для развития клеток минеральные вещества). Загрязненный воздух проходит через него; при этом вещества, подлежащие деструкции, диффундируют в водную пленку, покрывающую частицы биокатализатора, и далее окисляются микроорганизмами.

Скорость деструкции может лимитироваться скоростью диффузии веществ из газовой фазы в жидкую, а также скоростью протекания реакций в микробных клетках. Скорость диффузии, в свою очередь, зависит от природы токсических веществ и их концентраций. Стационарный режим биореактора с омываемым слоем наступает через 5-10 дней после его запуска. При использовании заранее адаптированных к очищаемым веществам микроорганизмов этот срок может быть сокращен до нескольких часов. Периодически (обычно раз в несколько месяцев) биослой очищают от избытка биомассы и наполняют свежими гранулами.

Капельный биофильтр (рисунок 12.4) отличается от обычного биофильтра только тем, что биопленка образуется на поверхности синтетической загрузки, которая не способна обеспечить микроорганизмы требуемыми питательными веществами, поэтому они должны подаваться с водой, постоянно циркулирующей через реактор при прямо- или противоточном течении относительно газового потока. При этом избыточная биомасса удаляется с поверхности загрузки, что предотвращает ее засорение и увеличивает срок службы.

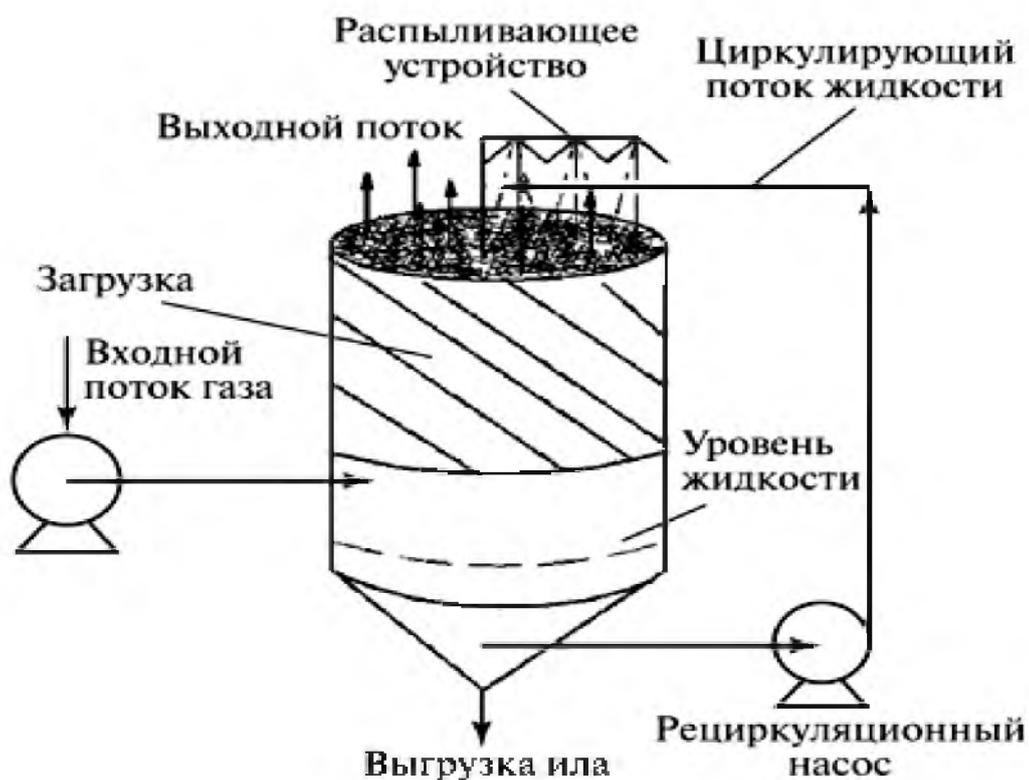


Рисунок 12.4 – Капельный биофильтр (<https://studref.com>)

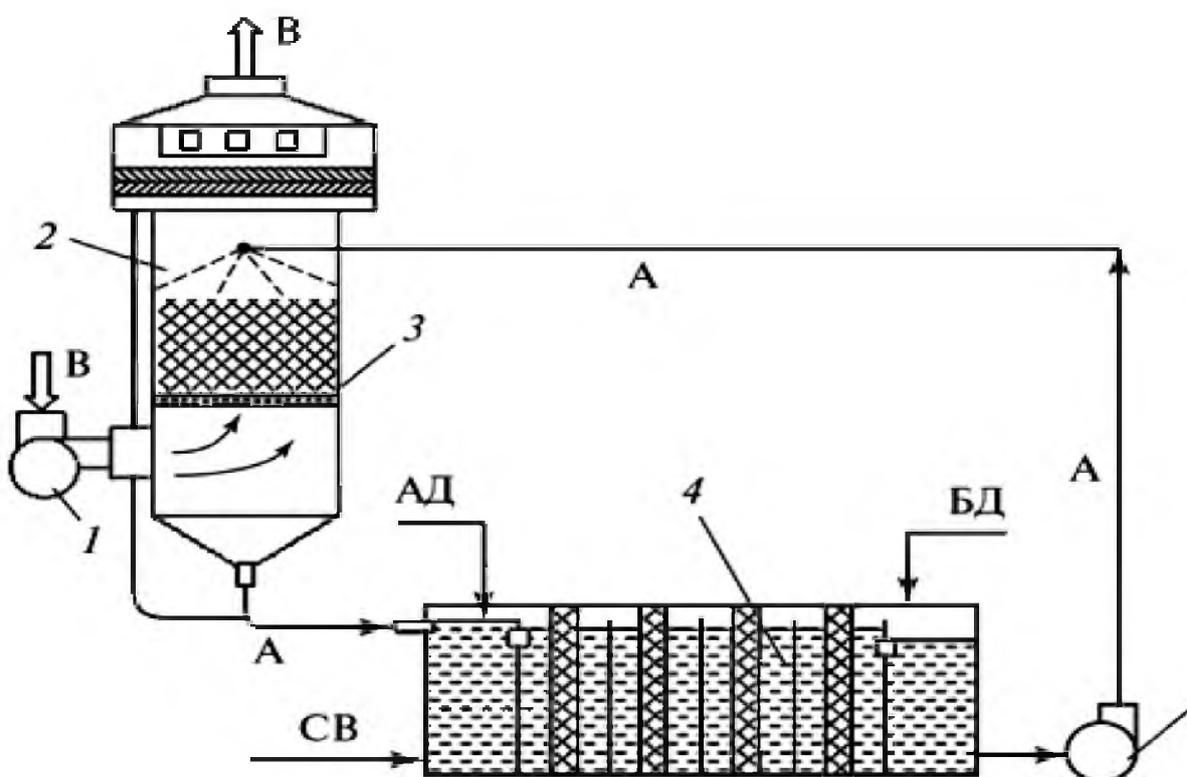
Загрязняющие вещества абсорбируются водной фазой и затем диффундируют в пленку жидкости на поверхности биокатализатора, где разлагаются микроорганизмами. Переход из газовой фазы в жидкую может легко становиться лимитирующим фактором в таких системах, особенно для соединений с высокой константой Генри.

Капельный биофильтр весьма эффективен при очистке от сероводорода и других основных источников эмиссий от сточных вод, включая аммиак, меркаптаны, амины и восстановленные соединения серы.

Эта система устраняет 99,9% одорантов процесса кондиционирования ила без использования дорогостоящих химикатов или адсорбционной загрузки. Капельный биофильтр также эффективен при очистке от одорантов при компостировании ила, которое выделяет различные эмиссии, включая соединения серы, летучие жирные кислоты, кетоны, аммиак и другие азотсодержащие соединения.

### Задание 7

#### Изучить технологическую схему биологической очистки воздуха в биоскрубберах



1 – вентилятор; 2 – абсорбер (скруббер); 3 – массообменная решетка;  
4 – биореактор; 5 – насос; А – абсорбент; В – вентиляционный воздух;  
АД – абсорбционные добавки; БД – биогенные добавки; СВ – сжатый воздух

Рисунок 12.5 – Схема устройства биоскруббера (<https://studref.com>)

Принцип функционирования **биоскрубберов** (рисунок 12.5) отличается от биофильтров тем, что процесс очистки воздуха реализуется в 2 стадии в двух различных установках:

- на первом этапе в абсорбере токсические вещества, находящиеся в воздухе, а также кислород растворяются в воде. В результате воздух выходит очищенным, а загрязненная вода далее сле-

дует на очистку. Применяют различные типы абсорберов (барботажные, насадочные, распылительные, форсуночные и т.д.);

- на втором этапе загрязненная вода поступает в биореактор с активным илом (аэротенк), где она регенерируется. Очищение воды в биореакторе происходит по обычной схеме с участием кислорода. В ходе очистки сложные органические вещества окисляются микроорганизмами, формирующими активный ил, до конечных продуктов с образованием биомассы.

Биоскрубберы особенно хорошо подходят для очистки отходящих потоков с высокой концентрацией загрязняющих веществ, т.к. массообмен и деградация происходят в разных местах.

Таким образом, промывная колонна и биореактор могут быть оптимизированы отдельно. Биоскрубберы особенно хорошо подходят для удаления соединений с относительно низким коэффициентом разделения.

Биоскрубберы предназначены для мокрой очистки вентиляционного воздуха от вредных органических веществ в литейных, покрасочных, деревообрабатывающих, мебельных, химических и других производствах.

Производительность биоскрубберов существенно выше по сравнению с биофильтрами, при этом эффективность очистки также довольно высока.

### **Контрольные вопросы**

1. Какие направления относятся к основным направлениям экологической биотехнологии?
2. На чем основаны биотехнологические методы утилизации твердых отходов?
3. На чем основаны биотехнологические методы очистки сточных вод?
4. На чем основаны биотехнологические методы очистки газозо-воздушных выбросов?

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Биотехнология : учебник / под ред. Е. С. Воронина. – Санкт-Петербург : ГИОРД, 2008. – 704 с.
2. Биотехнология биологически активных веществ : учебное пособие для студентов высших учебных заведений / ред.: И. М. Грачева, Л. А. Иванова. – Москва : НПО «Элевар», 2006. – 453 с.
3. Биотехнология: теория и практика : учебное пособие для вузов / Н. В. Загоскина [и др.] ; ред.: Н. В. Загоскина, Л. В. Назаренко. – Москва : Оникс, 2009. – 496 с.
4. Блажевич, О. В. Культивирование клеток : курс лекций / О. В. Блажевич. – Минск : БГУ, 2004. – 78 с.
5. Волова, Т. Г. Введение в биотехнологию. Версия 1.0 [Электронный ресурс] : электронное учебное пособие / Т. Г. Волова. – Красноярск : ИПК СФУ, 2008. – 1 электрон. опт. диск (DVD).
6. Гужов, Ю. Л. Селекция и семеноводство культивируемых растений : учебник / Ю. Л. Гужов, А. Фукс, П. Валичек ; под ред. Ю. Л. Гужова. – Москва : Издательство РУДН, 1999. – 536 с.
7. Егорова, Т. А. Основы биотехнологии : учебное пособие для высших педагогических учебных заведений / Т. А. Егорова, С. М. Клунова, Е. А. Живухина. – Москва : Академия, 2003. – 208 с.
8. Коростелева, Н. И. Биотехнология : учебное пособие / Н. И. Коростелева, Т. В. Громова, И. Г. Жукова. – Барнаул : АГАУ, 2006. – 127 с.
9. Краснопольский, Ю. М. Фармацевтическая биотехнология. Технология производства иммунобиологических препаратов : учебное пособие / Ю. М. Краснопольский, М. И. Борщевская. – Харьков : НТУ «ХПИ», 2009. – 352 с.
10. Основы фармацевтической биотехнологии : учебное пособие / Т. П. Прищеп [и др.]. – Ростов-на-Дону : Феникс ; Томск : НТЛ, 2006. – 256 с.
11. Промышленная микробиология : учебное пособие для вузов по специальностям «Микробиология» и «Биология» / З. А. Аркадьева [и др.] ; под ред. Н. С. Егорова. – Москва : Высшая школа, 1989. – 688 с.
12. Пшеничникова, А. Б. Основы биотехнологии : учебное пособие / А. Б. Пшеничникова. – Москва : МИТХТ им. М. В. Ломоносова, 2010. – 92 с.
13. Разговоров, П. Б. Технология получения биологически активных веществ : учебное пособие / П. Б. Разговоров. – Иваново : Ивановский государственный химико-технологический университет, 2010. – 72 с.
14. Ручай, Н. С. Технология микробного синтеза : электронный курс лекций для студентов специальности 1-48 02 01 «Биотехнология» / Н. С. Ручай, И. А. Гребенчикова. – Минск : БГТУ, 2014. – 167 с.
15. Современные проблемы и методы биотехнологии [Электронный ресурс] : электронное учебное пособие / Н. А. Войнов [и др.] ; под ред. Т. Г. Воловой. – Красноярск : ИПК СФУ, 2009. – 1 электрон. опт. диск (DVD).
16. Тимощенко, Л. В. Основы микробиологии и биотехнологии : учебное пособие / Л. В. Тимощенко, М. В. Чубик. – Томск : Издательство Томского политехнического университета, 2009. – 194 с.

*При оформлении обложки использована иллюстрация с сайта  
<https://ru.pngtree.com>*

Учебное издание

**Вербицкий** Анатолий Анатольевич,  
**Кошнеров** Андрей Геннадьевич,  
**Корочкин** Рудольф Борисович и др.

**ВЕТЕРИНАРНАЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ**  
**Часть 1. Промышленная организация**  
**биотехнологических процессов**

Учебно-методическое пособие

Ответственный за выпуск А. А. Вербицкий  
Технический редактор О. В. Луговая  
Компьютерный набор Е. А. Капранова  
Компьютерная верстка Т. А. Драбо  
Корректоры Т. А. Драбо, Е. В. Морозова

Подписано в печать 18.02.2020. Формат 60×84 1/16.  
Бумага офсетная. Ризография.  
Усл. печ. л. 10,0. Уч.-изд. л. 8,01. Тираж 65 экз. Заказ 2019.

Издатель и полиграфическое исполнение:  
учреждение образования «Витебская ордена «Знак Почета»  
государственная академия ветеринарной медицины».  
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,  
распространителя печатных изданий № 1/ 362 от 13.06.2014.  
ЛП №: 02330/470 от 01.10.2014 г.  
Ул. 1-я Доватора, 7/11, 210026, г. Витебск.  
Тел.: (0212) 51-75-71.  
E-mail: rio\_vsavm@tut.by  
<http://www.vsavm.by>