

БИОТЕХНОЛОГИЯ

Пищевые продукты

Основные технологии:

- **Сбраживание**
- **Энзиматическая инженерия**

Биологические процессы.

Брожение (ферментация) – процесс разложения органических веществ, преимущественно углеводов, на более простые соединения под влиянием микроорганизмов или выделенных ими ферментов. Освобождающуюся при этом энергию микроорганизмы расходуют для своей жизнедеятельности, а продукты брожения используют для биосинтеза.

Важнейшими типами брожения являются:

спиртовое (производство вина, пива, этилового спирта и др.),

молочнокислое (производство кефира, кваса, силосование кормов, квашение овощей и др.),

маслянокислое (происходит в заболоченных почвах, в испорченных консервированных продуктах),

метановое.

Брожение может быть **анаэробным** (типичным) и **аэробным** (окислительным). К анаэробным процессам брожения относятся спиртовое, молочнокислое, маслянокислое, пропионовокислое и другие виды брожений.

По выражению [Луи Пастера](#), «брожение — это жизнь без кислорода».

Квашение — разновидность **молочнокислого** брожения, в процессе которого образуется молочная кислота, оказывающая на продукты (**наряду с добавляемой поваренной солью**) консервирующее действие и размягчающее. Применяется при консервировании овощей и в кожевенном производстве.

Ферментация — биохимическая переработка сырья под воздействием **ферментов, содержащихся в нём самом** и в сапротрофах (чайного листа, листьев табака), а также вызываемая микроорганизмами.

Именно ферментация используется в процессе изготовления чая [пуэр](#), табака для курения, какао порошка иван-чая и др.

- Термин с.брожение:/ был введен голландским алхимиком **ван Гельмонтом** в XVII в. для процессов, идущих с выделением газов.
- В XIX в. основоположник современной микробиологии **Луи Пастер** показал, что **брожение является результатом жизнедеятельности микроорганизмов**, и установил, что **различные типы брожения вызываются разными группами микроорганизмов**.

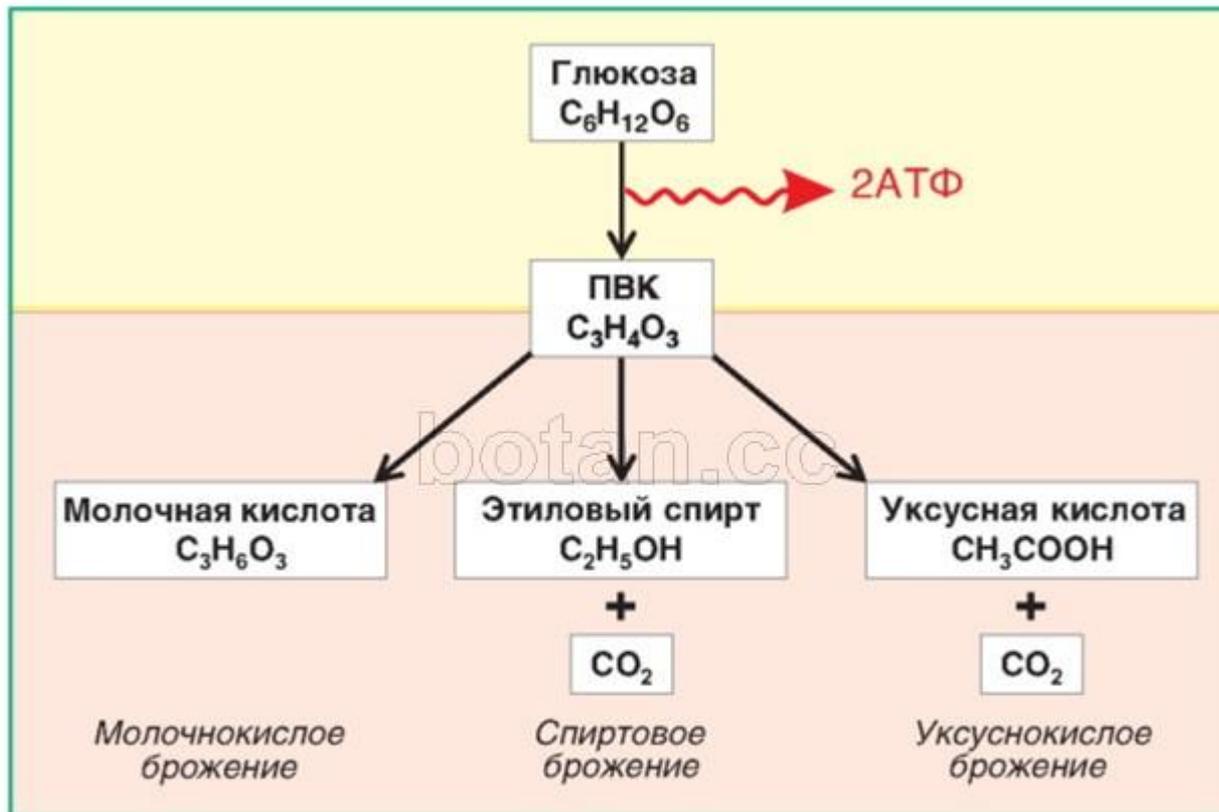


Схема основных типов брожения

- По Штейнкраузу (Steinkraus; 1995), брожение пищи выполняет пять главных задач:
- Обогащение видов пищи разнообразием вкусов, ароматов и текстуры
- Сохранение существенного количества пищи с помощью молочной кислоты, алкоголя, уксусной кислоты и щелочного брожения
- Биологическое обогащение пищи протеинами, важными аминокислотами протеинами, важными аминокислотами, важными жирными кислотами и витаминами
- Детоксификация в процессе брожения пищи
- Уменьшение времени и затрат на приготовление пищи
- У брожения есть несколько преимуществ, важных для приготовления или сохранения пищи. В процессе брожения можно получать важные питательные вещества или устранять непитательные. С помощью брожения пищу можно дольше сохранять, поскольку брожение может создать условия, неподходящие для нежелательных микроорганизмов. Например, при квашении кислота, получаемая из доминирующей бактерии, препятствует росту всех других микроорганизмов.

- По всему миру: дрожжевой хлеб дрожжевой хлеб, спирт дрожжевой хлеб, спирт, вино дрожжевой хлеб, спирт, вино, уксус дрожжевой хлеб, спирт, вино, уксус, сыр дрожжевой хлеб, спирт, вино, уксус, сыр, йогурт дрожжевой хлеб, спирт, вино, уксус, сыр, йогурт, пиво дрожжевой хлеб, спирт, вино, уксус, сыр, йогурт, пиво, сидр

- Азия

- Индия: achar: achar, gundruk, индийские пикули - маринованные в масле с приправами овощи или фрукты, использующиеся как закуска или приправа к блюдам, идли
- Юго-Восточная Азия: asinan: asinan, bai-ming: asinan, bai-ming, belacan: asinan, bai-ming, belacan, burong mangga: asinan, bai-ming, belacan, burong mangga, dalok: asinan, bai-ming, belacan, burong mangga, dalok, jeruk: asinan, bai-ming, belacan, burong mangga, dalok, jeruk, кимчхи: asinan, bai-ming, belacan, burong mangga, dalok, jeruk, кимчхи, рыбный соус: asinan, bai-ming, belacan, burong mangga, dalok, jeruk, кимчхи, рыбный соус, leppet-so: asinan, bai-ming, belacan, burong mangga, dalok, jeruk, кимчхи, рыбный соус, leppet-so, miang: asinan, bai-ming, belacan, burong mangga, dalok, jeruk, кимчхи, рыбный соус, leppet-so, miang, мисо: asinan, bai-ming, belacan, burong mangga, dalok, jeruk, кимчхи, рыбный соус, leppet-so, miang, мисо, nata de coco: asinan, bai-ming, belacan, burong mangga, dalok, jeruk, кимчхи, рыбный соус, leppet-so, miang, мисо, nata de coco, naw-mai-dong: asinan, bai-ming, belacan, burong mangga, dalok, jeruk, кимчхи, рыбный соус, leppet-so, miang, мисо, nata de coco, naw-mai-dong, pak-siam-dong: asinan, bai-ming, belacan, burong mangga, dalok, jeruk, кимчхи, рыбный соус, leppet-so, miang, мисо, nata de coco, naw-mai-dong, pak-siam-dong, paw-tsaynob в снегу: asinan, bai-ming, belacan, burong mangga, dalok, jeruk, кимчхи, рыбный соус, leppet-so, miang, мисо, nata de coco, naw-mai-dong, pak-siam-dong, paw-tsaynob в снегу, sake, seokbakji, соевый соус, соевый соус, сычуаньская капуста, tai-tan tsoi, соевый соус, сычуаньская капуста, tai-tan tsoi, такуан, соевый соус, сычуаньская капуста, tai-tan tsoi, tsa tzai, соевый соус, сычуаньская капуста, tai-tan tsoi, цукэмоно, соевый соус, сычуаньская капуста, tai-tan tsoi, такуан, tsa tzai, цукэмоно, yen tsai, пахучий соевый творог, некоторые виды чая
- Центральная Азия: кумыс: кумыс (кобылье молоко: кумыс (кобылье молоко), кефир: кумыс (кобылье молоко), кефир, шубат: кумыс (кобылье молоко), кефир, шубат (верблюжье молоко), айран -разновидность кисломолочного напитка разновидность кисломолочного напитка на основе катыка разновидность кисломолочного напитка на основе катыка или разновидность кефира у тюркских разновидность кисломолочного напитка на основе катыка или разновидность кефира у тюркских, северокавказских разновидность кисломолочного напитка на основе катыка или разновидность кефира у тюркских, северокавказских, южнокавказских разновидность кисломолочного напитка на основе катыка или разновидность кефира у тюркских, северокавказских, южнокавказских и балканских народов

- **Схема спиртового брожения:**

- *сахар ---> этиловый спирт + углекислый газ + энергия*

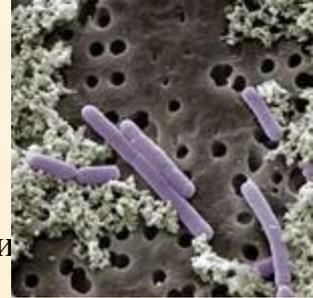


- В небольших количествах образуются **побочные продукты брожения: глицерин, уксусная кислота, уксусный альдегид, ацетальдегид и высшие спирты** (бутиловый, изобутиловый, амиловый, изоамиловый и др.), получившие название сивушных масел. Их возникновение связано с разложением аминокислот, используемых дрожжами в качестве источника азота.
- Спирт отделяют от сусла **перегонкой**, а затем очищают путем **фракционной дистилляции**. Для усиления роста дрожжей сусло вначале аэрируют, а затем создают анаэробные условия, чтобы обеспечить брожение, накопление спирта и предупредить окисление его в уксусную кислоту, а потом в воду и углекислый газ. Большинство дрожжей способно сбраживать моносахариды (глюкозу, фруктозу) и дисахариды (сахарозу, мальтозу).
- Наиболее благоприятны для спиртового брожения **концентрация сахара от 10 до 15%, рН 4–5, температура около +30 °С**. Концентрация менее 10% неблагоприятна для брожения, а при концентрации сахара 30–35% оно приостанавливается.
- Спиртовое брожение используется **в производстве спирта, вина, пива, кваса, глицерина, в хлебопечении** (для разрыхления теста), **при получении кефира, кумыса и др.** Самопроизвольно возникающее спиртовое брожение может быть причиной порчи сахаросодержащих продуктов: меда, варенья, соков, сиропов, компотов, ягод и др.

- **Верховое брожение** — способ производства пива — способ производства пива. Верховое брожение — способ производства пива. Верховое брожение производится с помощью дрожжей верхового брожения (*Saccharomyces cerevisiae*) и является более древним способом по сравнению с низовым брожением. Это связано с тем, что до изобретения холодильной машины в очень небольшом количестве пивоварен были условия для сбраживания пива в холодных условиях. Поэтому верховое брожение, происходящее при температурах от 15 до 24 °С, долгое время преобладало в мире. Поскольку дрожжи верхового брожения долго не разделяются после почкования, образуя разветвленные колонии, то на них скапливаются пузырьки углекислого газа, выталкивающие скопления дрожжей на поверхность. Отсюда «верховое» или «восходящее» брожение.
- При верховом брожении образуется много высших спиртов и эфиров, что сказывается на вкусе и аромате пива.
- Из типов пива верхового брожения можно выделить английские сорта (эль, стаут), бельгийские сорта (вит, траппистен, ламбик, гёз), немецкие сорта (пшеничное пиво, альтбир). **В настоящее время интерес к производству пива верхового брожения во всем мире резко возрос из-за увеличения количества крафтовых пивоварен. Для производства пива верхового брожения требуется в целом менее сложное оборудование, нежели для производства пива низового брожения.**

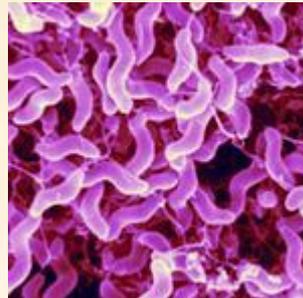
- **Низовое брожение** — способ производства **пива** — способ производства пива с использованием **дрожжей** вида ***Saccharomyces pastorianus***[\[en\]](#).
- Низовое брожение является более современным и более распространённым по сравнению с **верховым**. Низовое брожение является более современным и более распространённым по сравнению с верховым. Связано это, в первую очередь с тем, что пиво, приготовленное с использованием дрожжей низового брожения, может храниться без **пастеризации**. Низовое брожение является более современным и более распространённым по сравнению с верховым. Связано это, в первую очередь с тем, что пиво, приготовленное с использованием дрожжей низового брожения, может храниться без пастеризации до 2 лет, тогда как пиво, приготовленное с использованием дрожжей верхового брожения, хранится от 3 до 6 месяцев. Также риск заражения **сусла**. Низовое брожение является более современным и более распространённым по сравнению с верховым. Связано это, в первую очередь с тем, что пиво, приготовленное с использованием дрожжей низового брожения, может храниться без пастеризации до 2 лет, тогда как пиво, приготовленное с использованием дрожжей верхового брожения, хранится от 3 до 6 месяцев. Также риск заражения **сусла**[\[en\]](#) значительно меньше в связи с тем, что температура низового брожения находится в диапазоне от 7 до 10 °С, тогда как для верхового брожения она составляет от 17 до 20 °С.
- Отличие процесса низового брожения от верхового заключается в том, что в процессе брожения максимальная концентрация дрожжей наблюдается в районе дна бродильной ёмкости, тогда как для верхового брожения максимальная концентрация наблюдается сверху сбраживаемого сусла. После переработки всех углеводов (сахароза, фруктоза, глюкоза и т. д.) дрожжи низового брожения, так же, как и дрожжи верхового брожения, оседают на дно

- **Молочнокислородное брожение** вызывается молочнокислыми бактериями. Оно состоит в превращении сахаров в молочную кислоту. Схема молочнокислого брожения следующая:
- **САХАР ---> МОЛОЧНАЯ КИСЛОТА + ЭНЕРГИЯ**
- При этом выделяется небольшое количество побочных продуктов (пировиноградная кислота и водород).
- По характеру брожения различают **две группы молочнокислых бактерий. Гомоферментативные** (типичные) бактерии превращают приблизительно 90% лактозы в молочную кислоту с ничтожным содержанием побочных продуктов – CO₂ или уксусной кислоты.
- К типичным возбудителям молочнокислого брожения относятся кокковые и палочковидные бактерии, не образующие спор. К гомоферментативным молочнокислым бактериям принадлежат следующие: *молочнокислый стрептококк, сливочный стрептококк, термофильный стрептококк, болгарская палочка, ацидофильная палочка, сырная палочка, дельбрюковская палочка и др.*
- **Гетероферментативные** (нетипичные) бактерии образуют примерно 50% молочной кислоты и наряду с ней 25% уксусной кислоты и этилового спирта, 25% углекислого газа. К ним относится *кишечная палочка* – постоянный обитатель кишечника человека и животных.
- **Молочнокислые бактерии в качестве источника азота используют аминокислоты или пептоны.** Эти *бактерии очень требовательны к витаминам и особенно к витамину B₂* (лактофлавин). Источником углерода для них служат моносахариды (глюкоза, галактоза, левулоза), дисахариды (лактоза, сахароза, мальтоза), пентозы (арабиноза), многоатомные спирты, многоосновные кислоты и даже белки.
- Молочнокислородное брожение используется в молочной промышленности для изготовления *простокваши, творога, сметаны, кефира, кисломолочного масла, ацидофильного молока и ацидофильной простокваши, сыров, квашеных овощей, при приготовлении хлебных заквасок, молочной кислоты.* Молочнокислые бактерии широко применяют *также при силосовании кормов, при выделке меховых шкур и в производстве молочной кислоты.*
- Молочнокислородное брожение может быть и причиной порчи некоторых продуктов: скисания молока, вина, «кислотного брожения» в консервах и др.

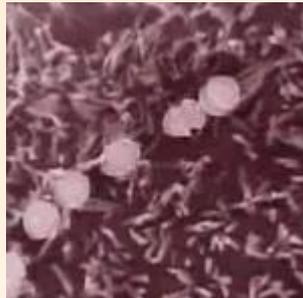


- **Закваска** (*инокулят*) — **микробиологический** — микробиологический (чаще всего, бактериальный) состав, вызывающий **брожение**) — микробиологический (чаще всего, бактериальный) состав, вызывающий брожение. Используется для сквашивания молока с целью получения **кисломолочных продуктов**) — микробиологический (чаще всего, бактериальный) состав, вызывающий брожение. Используется для сквашивания молока с целью получения кисломолочных продуктов (в том числе **сыра**) — микробиологический (чаще всего, бактериальный) состав, вызывающий брожение. Используется для сквашивания молока с целью получения кисломолочных продуктов (в том числе сыра, **йогурта**) — микробиологический (чаще всего, бактериальный) состав, вызывающий брожение. Используется для сквашивания молока с целью получения кисломолочных продуктов (в том числе сыра, йогурта, **простокваши**) — микробиологический (чаще всего, бактериальный) состав, вызывающий брожение. Используется для сквашивания молока с целью получения кисломолочных продуктов (в том числе сыра, йогурта, простокваши, **кефира**) — микробиологический (чаще всего, бактериальный) состав, вызывающий брожение. Используется для сквашивания молока с целью получения кисломолочных продуктов (в том числе сыра, йогурта, простокваши, кефира), для приготовления **теста**) — микробиологический (чаще всего, бактериальный) состав, вызывающий брожение. Используется для сквашивания молока с целью получения кисломолочных продуктов (в том числе сыра, йогурта, простокваши, кефира), для приготовления теста и напитков (в частности, **кваса**) — микробиологический (чаще всего,

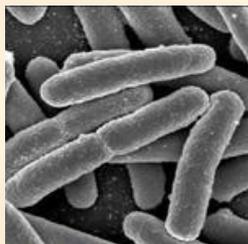
- **Маслянокислое брожение** вызывается маслянокислыми анаэробными бактериями, которые превращают многие углеводы (сахара, крахмал, декстрины, пектиновые вещества) и высшие спирты (маннит, глицерин) в масляную кислоту, образуя при этом углекислый газ, водород и энергию. Схема маслянокислого брожения следующая:
- *САХАР ---> МАСЛЯНАЯ КИСЛОТА + УГЛЕКИСЛЫЙ ГАЗ + ВОДОРОД + ЭНЕРГИЯ*
- Оптимальная температура для развития **маслянокислых бактерий** +30...40 °С. Маслянокислое брожение хорошо протекает при нейтральной реакции. Если оно идет в кислой среде, то накапливается бутиловый спирт и ацетон.
-
- Маслянокислым брожением *получают масляную кислоту, обладающую горьким вкусом и резким запахом. Она широко применяется в технике. Эфиры масляной кислоты имеют приятный запах цветов или фруктов и используются для приготовления ароматических эссенций в кондитерской промышленности и при производстве газированных напитков, а также в парфюмерной промышленности* (например, метиловый эфир с яблочным запахом, этиловый эфир с грушевым запахом, амиловый – с ананасным).
- В народном хозяйстве маслянокислое брожение может приносить значительный ущерб. Если маслянокислое брожение развивается в пищевых продуктах, то они приобретают неприятный запах и горький вкус. Часто это брожение вызывает гибель картофеля и овощей, вспучивание сыров, бомбаж консервов, прогоркание молока, творога, сметаны и др.



- **Пропионовокислое брожение** заключается в *превращении сахара или молочной кислоты, а также ее солей в пропионовую и уксусную кислоты с выделением углекислого газа, воды и энергии*. Это брожение вызывают **пропионовокислые бактерии**. По некоторым свойствам они близки к молочнокислым бактериям и часто развиваются вместе с ними. *Оптимальная температура их развития +30...35 °С, рН не ниже 5.*
-
- Пропионовокислое брожение играет **важную роль при созревании сыров**: присутствие пропионовой и уксусной кислот в сыре обуславливает его своеобразные вкус и аромат. Пропионовая кислота и ее соли **являются ингибиторами плесеней** и могут быть использованы для защиты продуктов от плесневения.
- **Метановое брожение** начинается с *разложения сложных веществ* (например, целлюлозы) *до одно- или двухуглеродных молекул* (CO, HCOOH, CHCOOH и др.), которое *осуществляют микроорганизмы, живущие в симбиозе (сожительство) с мета-нообразующими бактериями. Последние и синтезируют метан.*
- Метановое брожение **встречается в заболоченных водоемах**. Оно **используется в промышленности и бытовых очистных сооружениях** для обезвреживания органических веществ сточных вод. Образующийся при этом метан в смеси с CO² может применяться в качестве топлива.



- К **аэробным (окислительным) процессам брожения** относятся **биохимические реакции, вызываемые микроорганизмами и протекающие с участием кислорода воздуха**. Примерами таких брожений может быть **уксуснокислое** и **лимоннокислое**.
- **Уксуснокислое брожение** вызывается **уксуснокислыми аэробными бактериями**, которые **превращают спирт (в слабых растворах) в уксусную кислоту**, при этом выделяется вода и энергия. Схема уксуснокислого брожения следующая:
- **ЭТИЛОВЫЙ СПИРТ + КИСЛОРОД ---> УКСУСНАЯ КИСЛОТА + ВОДА + ЭНЕРГИЯ**
- На уксуснокислом брожении основано промышленное **получение уксуса для пищевых целей**. Вместе с тем уксуснокислые бактерии могут вызывать прокисание вина, пива, кваса, ягод, салатов и других продуктов.



- **Лимоннокислое брожение** вызывают некоторые **плесневые грибы** (например, грибы из рода аспергиллюс), **способные окислять сахар в растворах в лимонную кислоту**, при этом выделяются вода и энергия. Схема лимоннокислого брожения следующая:
- **САХАР + КИСЛОРОД ---> ЛИМОННАЯ КИСЛОТА + ВОДА + ЭНЕРГИЯ**
- Образование грибами лимонной кислоты используется в промышленности (**при изготовлении кондитерских изделий, сиропов, газированных напитков, в кулинарии и др.**).

- **Микробиологический синтез и ферментация**
- **Микробиологический синтез** – промышленный способ получения химических соединений и продуктов (например, дрожжей), осуществляемый *благодаря жизнедеятельности микробных клеток*. Иногда к микробиологическому синтезу относят также промышленные процессы, основанные на использовании *иммобилизованных клеток, т.е. инженерную энзимологию*.
- Основным этапом в получении продуктов метаболизма микробных клеток является **ферментация** – *совокупность последовательных операций по получению биологически активных и полезных веществ*.
- Для получения продуктов микробиологического синтеза используются специальные технологии, включающие особенности питательных сред, режимов культивирования, выделения и концентрирования продуктов.

В промышленной биотехнологии применяют 3 вида штаммов:

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

Промышленные штаммы должны удовлетворять следующим требованиям:

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

- Продуценты в биотехнологии:
 - Бактерии
 - Актиномицеты
 - Грибы
 - Простейшие
 - Позвоночные

Наиболее изучены и чаще применяются
в биотехнологии бактерии рода

Clostridium,

Thermoanaerobacter,

Bacillus,

Acetobacter,

Pseudomonas,

Brefibacterium



**Типовая схема
получения
микробных
биопрепаратов**

- Быстро размножаются (деление от 8-10 до 30-60 минут)
- Биохимически универсальны (усваивают самые разнообразные вещества)
- Большинство – облигатные аэробы, но есть также факультативные анаэробы (н-р, *Bacillus*, *Escherichia*) и аэротолерантные анаэробы (н-р, метанообразующие бактерии).
- Культивируются в основном на сложных органических средах, содержащих факторы роста. Многие могут расти на синтетических средах, содержащих всего одно органическое вещество в качестве источника углерода.

Архебактерии – древние представители прокариот

Метаногенные

Галобактерии

Серозависимые

Основные преимущества **термофильных**
анаэробных архебактерий:

- Сокращение сроков культивирования,
- Возможность обойтись без аэрации,
- Уменьшение вероятности заражения.

АКТИНОМИЦЕТЫ – группа грамположительных бактерий, клетки которых способны к ветвлению

Важнейшие продуценты группы:

Streptomyces griseus,

Saccharopolispora hisuta,

Micromonospora olivoasterospora,

Nocardia mediterranea

Используют в производстве белка, антибиотиков, витаминов, аминокислот, ферментов, полисахаридов, а также для биопревращения.

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

- Возможности использования отходов пищевых и химических производств для культивирования;
- Повышенное содержание незаменимых аминокислот в бактериальных клетках по сравнению с растительными белками;
- Высокая скорость реакции биосинтеза белка;
- Относительно несложная технология культивирования в промышленных масштабах, независимая от сезонов и других изменяющихся условий окружающей среды;
- Возможность направленного воздействия с помощью методов селекции на химический состав клеток для совершенствования биологической ценности целевого продукта.

Грибы

- В качестве продуцентов лекарственных веществ применяют микромицеты (дрожжи, *Penizillum*, *Aspergillum*) и макромицеты, формирующие в процессе роста и развития плодовые тела.
- В производстве спиртных напитков дрожжи представляют собой единственный промышленно используемый штамм микроорганизмов (штамы *Saccharomyces cerevisiae* низового и верхового брожения).
- Также дрожжи применяют в промышленных масштабах для получения технического спирта и глицерина, и в качестве добавок к кормам для животных.
- С точки зрения производства фармацевтической продукции наиболее важны продуценты родов: *Aspergillus*, *Cephalosporium*, *Fusarium*, *Penicillum*. К числу основных продуктов их метаболизма относятся антибиотики, органические кислоты и ферменты. Мицелиальные грибы образуют около 1200 антибиотических соединений. Наибольший интерес для клинической практики представляют пенициллины, цефалоспорины, гризеофульвин, трихотецин, фумагиллин и др. Большие затруднения при производстве антибиотиков на основе микромицетов представляет биомасса в виде мицелия.
- Дрожжи по содержанию таких аминокислот, как лизин, треонин, валин и лейцин значительно превышает многие растительные белки. Белковые препараты из дрожжевой биомассы применяются в качестве пищевых добавок. Это пивные и пищевые дрожжи *S. cerevisiae*, *Candida arborea*, *C. utilis*.

- В настоящее время искусственно выращивают **базидиомицеты**, грибы, образующие плодовые тела, более 70 стран как пищевые продукты и мировое производство их превышает 1,5 млн. т. Подсчитано, что по выходу белка грибы как сельскохозяйственные культуры во много раз превосходят производство говядины и рыбоводство и не имеют себе конкурентов. Белковая добавка к растительной пище.
- Завтрашний день грибной индустрии – это их использование для **фармацевтических** целей. Например, **белый гриб обладает естественным антихолестероловым и противовирусным действием, гриб шиитаке эффективен при лечении гипертонии.**

• Водоросли

Это фотосинтезирующие организмы, их можно выращивать как в фотобиореакторах, так и на углеродсодержащих субстратах. По белку водоросли имеют преимущество по сравнению с высшими растениями в **6-30 раз**. Не менее **100 видов** макрофитных водорослей употребляют в пищу во всех странах.

- **Ламинария и хлорелла** – самые популярные съедобные и кормовые водоросли.
- К макрофитам, применяемым в пищу человека относятся ульва, алария, порфира, родимения, хондрус, ундария, фурцеллярии, спироулина.
- В нашей стране из черноморских водорослей добывают филлофору для производства **иода, агар-агар** производят из анфельции. Получают вкусовые и белково-витаминные добавки к овощам, консервам, соусам (содержит 9 незаменимых аминокислот).
- Биомассу хлореллы и спироулины применяют для замены пищевого сырья для приготовления **питательных сред** при культивировании микроорганизмов, клеток растений и животных.
- Хлорелла представляет интерес для **создания искусственных экологических систем для жизнеобеспечения экипажей космических кораблей**.

Использование водорослей в качестве компонентов пищевых продуктов связано с рядом технологических проблем:

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

Простейшие

В настоящее время не используются в промышленном масштабе ни для производства биомассы, ни для синтеза биологически активных веществ, они наряду с другими микроорганизмами **играют большую роль в биологической очистке сточных вод фармацевтических предприятий.**

- Простейшие относятся к числу **нетрадиционных** объектов биотехнологии. В настоящее время они лишь завоевывают себе место в исследовательской работе и микробиологической промышленности как продуценты БАВ.
- **Трипаносома** стала первым продуцентом противоопухолевого препарата круцина (Россия, Франция), обладающего цитотоксическим эффектом при прямом контакте с опухолью.
- Свободноживущий **жгутиконосец *Astasia longa*** культивируют для получения астазилида, обладающего противоопухолевым действием не через цитотоксический эффект, а при воздействии на клеточное звено иммунитета. Эвгленовые можно рассматривать как перспективные продуценты гликанов и других гетерополисахаридов.

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

Важнейшие продуценты лекарственной продукции царства животных:

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

Температура

- Большинство используемых в биотехнологии продуцентов по отношению к температуре являются **мезофилами**: их рост и развитие происходит при температуре 25-37°C. **Психрофильные** микроорганизмы растут при температуре 0-15°C, и **термофилы** – при температуре 60-80°C. Все перечисленные группы имеют промежуточные формы. Для биосинтетических процессов в промышленном производстве желательно использовать термофильные микроорганизмы. Отдельные термофилы растут при **110°C**, а в подводных выбросах сверхгорячих источников больших океанических глубин найдены микроорганизмы, развивающиеся при **t 300°C и под давлением**.
- Среди термофилов обнаружены ценные продуценты спиртов, аминокислот, ферментов, молекулярного водорода. Скорость роста и метаболическая активность у них выше, чем у мезофилов. Ферменты, синтезируемые термофилами (протеазы), имеют высокую устойчивость к нагреванию, действию окислителей, детергентов и других неблагоприятным условиям. Применение термофилов в микробной биотехнологии (продуценты протеаз *Thermus aquaticus* и *T. caldophilus*) позволяет снизить затраты на стерилизацию промышленного оборудования и на системы охлаждения биореакторов. Это позволит применять ферментеры без громоздких теплообменных устройств и упростить их конструкцию.

Кислотность среды

- В микробиологическом синтезе для каждой культуры микроорганизмов есть оптимум, минимум и максимум рН. **Большинство микроорганизмов лучше всего развивается при рН 7,0** (нейтральная среда). **Ацидофильным** микроорганизмам (некоторые дрожжи, плесени) необходимо иметь водородный показатель среды 1,5-4,5, **базофильным** – рН 8,5-9,5.
- **Ацидофильные** формы не растут при рН выше 5,0-5,5, *Thiobacillus ferrooxidans* встречается в шахтных водах месторождений сульфидных минералов (рН иногда меньше 1,0). **Алкалофильные** бактерии растут при рН более 10 (некоторые бактерии рода *Bacillus*), разлагающие мочевины до аммиака. В промышленности предпочтительнее применять ацидофильные штаммы, так как посторонняя микрофлора в таких субстратах погибает и уменьшаются средства, применяемые для стерилизации.

Осмотическое давление

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

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

Методы культивирования

Поверхностное

на жидких
питательных
средах

твёрдофазное
(2-3 см
толщина слоя)

Глубинное

непрерывное

периодическое

полунепрерывное

с подпиткой

с диализом

отъемно-доливочное

Классификация процессов ферментации

*По признаку целевого продукта процесса, **ферментация** может быть следующих типов:*

ферментация, в которой целевым продуктом является сама биомасса **микрорганйзмов**; именно такие процессы часто обозначают словами «культивирование», «выращивание»; целевым продуктом является не сама биомасса, а продукты **метаболизма** — внеклеточные или внутриклеточные; такие процессы часто называют процессами биосинтеза; задачей ферментации является утилизация определенных компонентов исходной среды; к таким процессам относятся **биоокисление** задачей ферментации является утилизация определенных компонентов исходной среды; к таким процессам относятся биоокисление, **метановое брожение** задачей ферментации является утилизация определенных компонентов исходной среды; к таким процессам относятся биоокисление, метановое брожение, **биокомпостирование** задачей ферментации является утилизация определенных компонентов исходной среды; к таким процессам относятся биоокисление, метановое брожение, биокомпостирование и **биodeградация**.

*По среде, в которой протекает процесс, **ферментация** бывает:*

поверхностная (твердофазная);
глубинная (жидкофазная);
газофазная ферментация.

*По числу видов **микрорганйзмов** различают:*

ферментацию на основе монокультуры;
смешанное культивирование, где участвует микробная ассоциация двух и более культур.

По способу организации во времени:

периодическая;
непрерывная;
многоциклическая;
отъемно-доливная;
периодическая с подпиткой субстрата;

Фазы периодической ферментации

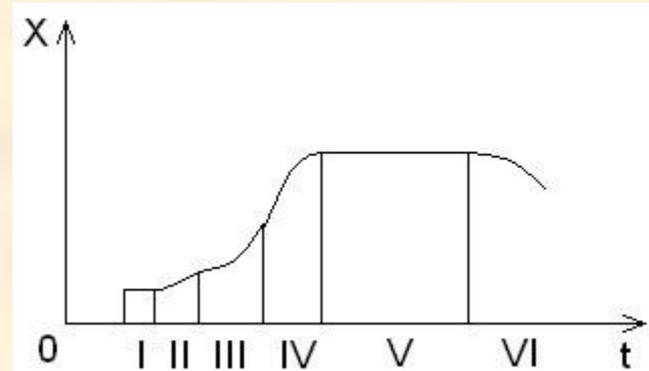
Определение фаз ферментации по кривой роста биомассы во времени.

I — лаг-фаза; II — фаза ускорения роста; III — фаза экспоненциального роста; IV — фаза замедления роста; V — стационарная фаза; VI — фаза отмирания.

Рассмотрим, как изменяется концентрация биомассы в процессе [периодической ферментации](#) (рисунок).

В начале [ферментации](#) в начале ферментации некоторое время [микроорганизмы](#) как бы приспосабливаются к новой среде, их концентрация не меняется. Этот период называется **лаг-фаза**. В этот период клетки не только адаптируются к новым условиям, но и частично изменяют среду, делая ее пригодной для себя. Чем полноценнее субстрат, тем короче лаг-фаза. Далее начинается рост клеток — это **фаза ускорения роста**. Третья фаза — **экспоненциального роста**, это фаза наиболее интенсивного роста клеток, здесь происходит наибольший относительный прирост биомассы. Затем относительная скорость роста начинает уменьшаться — это **фаза замедления роста**. Достигнув некоторой максимальной величины, концентрация биомассы далее перестает возрастать. В этой фазе — **стационарной** — в среде истощаются питательные вещества и накапливаются продукты обмена, тормозящие рост. Биомасса растет и одновременно происходит гибель части клеток (**автолиз**), так что общая концентрация клеток сохраняется постоянной. Наконец в **фазе отмирания** автолиз начинает преобладать над ростом, и концентрация биомассы [микроорганизмов](#) снижается.

В процессе роста культуры изменяется [морфология](#) В процессе роста культуры изменяется морфология клеток, их химический состав и физиологическое состояние. Культура может неопределенно долго задержаться на стадии интенсивного роста и высокой физиологической активности. Это определяется действием факторов среды. Создавая соответствующие условия, можно остановить развитие культуры на любой точке кривой роста и таким образом заставить [микроорганизмы](#) «работать» с наибольшей интенсивностью.



Определение фаз ферментации по кривой роста биомассы во времени.

I — лаг-фаза; II — фаза ускорения роста; III — фаза экспоненциального роста; IV — фаза замедления роста; V — стационарная фаза; VI — фаза отмирания.

Преимущества и недостатки периодической ферментации

Преимущества:

малая стоимость аппарата и системы управления;

гибкость – возможность наработки в одном биореакторе разных продуктов;

процесс менее подвержен инфицированию и мутациям клеток из-за отсутствия протока и притока и из-за относительно малого времени ферментации;

условия культивирования можно поддерживать в оптимуме, как в фазе роста биомассы, так и в фазе биосинтеза продукта;

процесс удобен для реализации биосинтеза вторичных метаболитов.

Недостатки:

необходимость приготовления посевного материала;

велико непродуктивное время ферментации; производительность по биомассе и продукту часто ниже, чем при непрерывном процессе;

труднее поддерживать необходимые параметры из-за нестационарности процесса.

В зависимости от осуществляемых в них процессов, ферментеры могут быть разделены на следующие группы:

1. аэробные, анаэробные;
2. периодические, непрерывные;
3. стерилизуемые, не стерилизуемые;
4. целевой продукт в клетках, вне клеток;
5. глубинные на растворимых и не растворимых субстратах;
6. близкие к идеальному перемешиванию, идеальному вытеснению.

Однако перечисленные группы процессов не равноценны по влиянию на конструкции ферментеров и определить их конструктивные особенности по данной классификации практически невозможно. В то же время на практике часто одни и те же ферментеры по этой классификации используют для проведения разных процессов.

Наиболее универсальна и чаще всего применяется на практике классификация ферментеров по **способу ввода энергии** в аппарат (по способу осуществления процессов аэрирования и перемешивания):

- 1.- с газовой фазой;
- 2.- с жидкой фазой;
- 3.- с газовой и жидкой фазой (комбинированные).

Для аэробных процессов аэрирование и перемешивание является, безусловно, важнейшей процедурой. Поскольку транспорт кислорода через клеточные мембраны осуществляется по диффузионному механизму, то это предполагает наличие более высокой концентрации кислорода в культуральной жидкости (вне клетки). Сложность достижения необходимого уровня аэрирования (насыщения культуральной жидкости кислородом) заключается в низкой растворимости кислорода в воде. При этом многие компоненты культуральной среды дополнительно снижают растворимость кислорода. Все это не позволяет использовать клеточные культуры с высокой плотностью (концентрацией), что в свою очередь снижает выход целевого продукта с единицы объема аппарата.

Твердофазная поверхностная ферментация осуществляется на увлажненной, сыпучей или пастообразной среде. Рост продуцента происходит на поверхности твердых частиц, а также в порах, заполненных водой или воздухом (например, приготовление силоса).

- Проблема – поддержание постоянной температуры во всем объеме питательной среды.
- При твердофазном культивировании в начале роста культуры, когда в среде отсутствует градиент концентрации субстрата, все клетки в колонии могут расти с максимальной для данной среды удельной скоростью роста, т.е. по экспоненциальному закону. В центральной части субстрата рост клеток лимитирован диффузией и, таким образом, биомасса растет с максимальной удельной скоростью лишь на поверхности питательной среды.
- Управляемый процесс твердофазного поверхностного культивирования применяется при производстве энзиматических лекарственных препаратов.

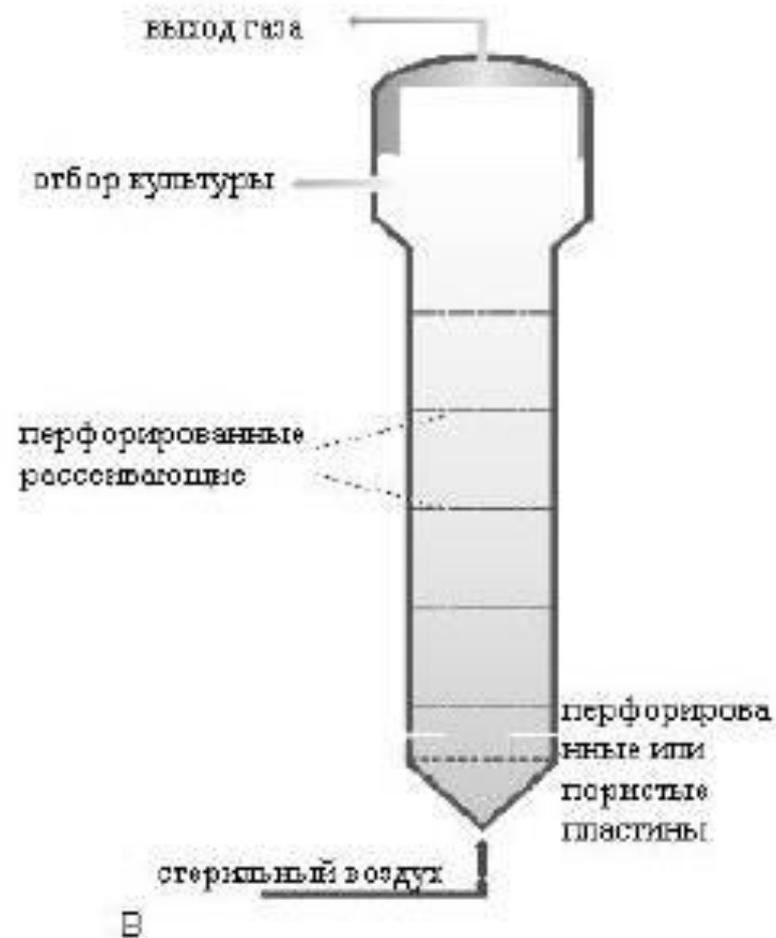
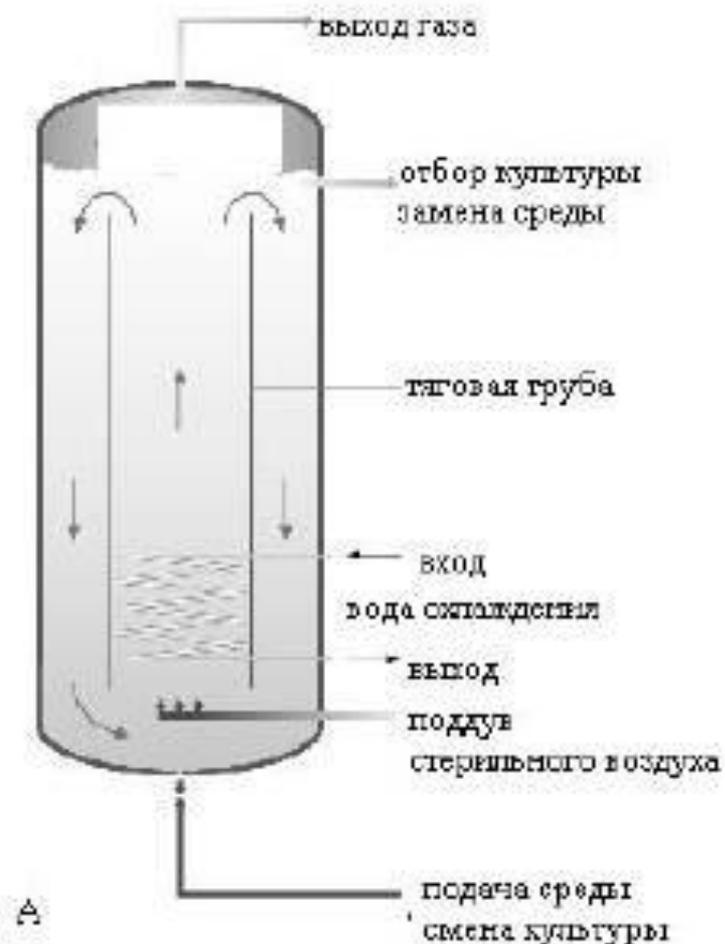


Рис.3. Ферментеры с пневматическим перемешиванием:

а) эрлифтный;

б) пузырькового типа

Обычно энергия в аппаратах этой группы передается жидкой фазе с помощью насоса. При этом подаваемая в ферментер жидкость вводится в аппарат через специальное устройство (сопло, эжектор, диспергатор и т.д.). Различают в общем случае три типа конструкций таких аппаратов:

- а) ферментеры эжекционные (ФЖЭ);
- б) ферментеры струйные (ФЖС).
- в) ферментеры с самовсасывающими мешалками (ФЖСМ);

В ферментерах эжекционного типа, работающих в режиме рециркуляции, подаваемая в ферментер культуральная жидкость проходит под давлением через специальное устройство называемое эжектором (инжектором), в котором происходит ее интенсивное перемешивание с воздухом и насыщение кислородом. Далее образовавшаяся газо-воздушная струя под большим давлением вводится в ферментер с боку, перемешивая содержимое и распределяя пузырьки воздуха по всему объему аппарата.

Недостатком аппаратов является необходимость применения специальных насосов для перекачивания газосодержащих культуральных жидкостей.

Струйные ферментеры конструктивно разделяются на два типа: с “затопленной” и “падающей” струей. В первом случае струя газо-жидкостной смеси вводится в культуральную жидкость сверху через погруженную в нее трубу, во втором - подается в нее под давлением с определенной высоты. Образование газожидкостной смеси, как и в случае эжекционных ферментеров, осуществляется при помощи эжектора, находящегося во внешнем циркуляционном контуре. Недостатки струйных ферментеров аналогичны недостаткам эжекционных.

В отличие от эжекционных и струйных, ферментеры с самовсасывающими мешалками являются довольно простыми аппаратами, так как не требуют специальных воздухоподводящих машин для подачи воздуха в аппарат. Поступление воздуха осуществляется за счет разрежения, возникающего за задней кромкой лопасти мешалки при ее движении в жидкости. В лопастях такой мешалки воздушные каналы, которые через полый вал соединяются с воздухопроводом. Такие аппараты широко применялись в СССР при микробиологическом производстве кормового белка. К недостаткам этой схемы можно отнести трудность оптимизации и управления всей совокупностью массообменных и гидродинамических процессов в таком ферментере.

Обеспечение оптимальной температуры процесса культивирования является одной из самых сложных и ответственных технических проблем. На практике теплоотвод связан с большими капиталовложениями и необходимостью строительства сложных систем оборотного водоснабжения, теплообменных устройств в ферментерах, а иногда и дополнительных холодильных установок. Затраты на теплоотвод соизмеримы с затратами на обеспечение клеток кислородом (аэрирование, перемешивание) и поэтому они могут быть решающими при выборе конструкции ферментера.

Проблема обусловлена следующими причинами:

- а) низким коэффициентом теплопередачи (малой теплопроводностью) клеточной стенки, и как следствие малоинтенсивной теплоотдачей со стороны микробной суспензии, а также с образованием отложений клеток на внешней стороне охлаждающих элементов. Малый коэффициент теплопередачи объясняется так же практически ламинарным обтеканием вязкой микробной суспензией поверхности охлаждающих элементов;
- б) небольшой величиной движущей силы теплопереноса, т.е. перепада температур между охлаждающей водой (в летнее время 26-28 С) и микробной суспензией (обычно 32-34 С);
- в) необходимость отводить не только тепло, выделяющееся при жизне- деятельности микроорганизмов, но и все тепло, которое выделяется при работе перемешивающих устройств за счет трения слоев жидкости друг о друга и о стенки и внутренние узлы аппарата;

В зависимости от тепловой нагрузки для отвода тепла используют поверхность корпуса аппарата (тепловые рубашки) или встроенные внутрь аппарата теплообменники змеевикowego типа. Наилучшим решением проблемы является использование выносных теплообменников (кожухотрубных, пластинчатых), располагаемых на внешних циркуляционных трубах, если такие имеются.

Биореакторы или ферментаторы (устройство, системы)

Биореактор (ферментатор) представляют собой аппарат для культивирования микроорганизмов, растительных и животных клеток, в котором происходят биохимические реакции.

Системы биореакторов изготавливаются из стекла (лабораторные) и нержавеющей стали (пилотные и промышленные). Биореакторы можно подразделить на биореакторы для культивирования грибов и бактерий, клеток и тканей растений, а также клеток и тканей животных.

Устройство биореакторов - это герметичные цилиндрические емкости, объемом 0,05-200 м³. Размеры ферментаторов определяются соотношением внешнего диаметра к высоте, которое варьирует обычно в пределах от 1:2 до 1:6.

В биореакторе устанавливают мешалки турбинного, пропеллерного или иного типа.

Для поддержания температуры в системе биореактора является двойной кожух или теплообменник по типу змеевика.

Кроме этого, устройство биореактора имеет трубопроводы для подвода питательной среды, воды, пара, воздуха, пеногасителей и других веществ.

Для контроля и регулирования процессов биосинтеза устройства биореакторов оборудованы измерительными и регулирующими устройствами: измерение температуры, рН, обороты мешалки, уровня пены, концентрации биомассы и др.

. В некоторых случаях используют предварительную обработку системы биореактора химическими веществами.

Система биореактора используют для проведения аэробных и анаэробных процессов ферментации. Во время аэрации и перемешивания питательной среды в процессе ферментации образуется пена, которая может нарушить стерильность процесса и вызвать потерю культуральной жидкости. В связи с этим рабочий объем внутренней системы биореактора не должен превышать 7/10 общего объема. Для пеногашения используют как химические вещества, так и механические методы.

Различают установки для глубинного и поверхностного культивирования. Для поверхностного культивирования микроорганизмов на твердых питательных средах используют установки биореакторов различных конструкций.

Аппараты периодического действия обычно имеют вид горизонтальных барабанов, а аппараты непрерывного действия - колонн, разделенных на определенное количество секций в зависимости от мощности производства и технологии культивирования.

Биореакторные установки для глубинного культивирования, в свою очередь, подразделяют на 3 группы:

с подводом энергии в газовой фазе;

в жидкой фазе;

в жидкой и газовой фазе.

Устройство биореакторов указанных групп имеют большое количество общих элементов. Разница заключается в конструкциях перемешивающих устройств и таких, по которым осуществляется аэрация. К ферментаторам 1-й группы относятся барботажные, барботажно-эрлифтные, колонные и др.

Среди аппаратов 2-й группы можно выделить три основные группы: ферментаторы с Самовсасывающие мешалками, струйные и эжекционного. В Б. 3-й группы энергия подводится к жидкой фазы с помощью перемешивающих устройства, а к газовой фазы - путем принудительной подачи воздуха.

К. Шюгерль (1982) предложил подразделять устройства биореакторов на 3 основные группы по способу потребления энергии для диспергирования и перемешивания стерильного воздуха:

- энергия используется на механическое движение внутренних элементов;
- энергия используется на работу внешнего насоса, который обеспечивает рециркуляцию жидкости и / или газа;
- энергия используется на подачу и сжатие газа в культуральную жидкость.

Одним из главных требований к системе биореактора является сохранение стерильности в процессе культивирования, поэтому они должны быть герметичными. Стерилизацию оборудования биореактора и системы трубопроводов осуществляют термическим путем «острой» парой, или паром, который регенерируется в самом устройстве биореактора с помощью электронагревателей. В некоторых случаях используют предварительную обработку системы биореактора химическими веществами.

Глубинная ферментация характеризуется присутствием клеток во взвешенном состоянии.

При периодическом культивировании выделяют несколько фаз в развитии культуры.

- 1. **Латентная фаза.** Культура микроорганизмов осваивает питательную среду, заметного увеличения числа клеток не происходит. В этот период перестраивается метаболизм клетки, синтезируются ферменты, необходимые для использования новых субстратов, активируется биосинтез белка.
- 2. **Фаза экспоненциального роста** характеризуется быстрым накоплением биомассы и продуктов метаболизма. При этом запас питательных веществ в среде в оптимальной концентрации, увеличение числа клеток пропорционально времени, т.е. линейный рост культуры.
- 3. **Фаза замедления роста** – это непродолжительный период, в течение которого скорость роста культуры снижается, что связано с накоплением токсических продуктов метаболизма и расходом питательных веществ среды.
- 4. **Стационарная фаза** – это скорость прироста биомассы полностью компенсируется скоростью гибели и лизиса клеток.
- 5. **Фаза отмирания культуры** – характеризуется полным истощением субстрата, накоплением веществ, ингибирующих рост, скорость прироста биомассы равно нулю.
- При производстве лекарственных препаратов важную роль играет любая фаза. Биотехнологически ценные продукты синтезируются в экспоненциальной фазе (нуклеотиды, ферменты, витамины – первичные метаболиты). В стационарной фазе и фазе отмирания синтезируются вторичные метаболиты - антибиотики, красящие вещества.

- Довольно широко в биотехнологии используется периодическое культивирование **с подпиткой**, при котором, помимо первичного внесения питательного субстрата до засева культуры, в процессе культивирования в аппарат через определенные интервалы добавляют питательные вещества либо порциями, либо непрерывно "по каплям".
- Существует также **отъемно-доливочное** культивирование, когда часть содержимого биореактора периодически изымается и добавляется равное количество питательной среды. Такой прием обеспечивает регулярное "омолаживание" (обновление) культуры и задерживает (отдаляет) ее переход в фазу отмирания. Этот прием иногда называется **полунепрерывным** культивированием.
- Модификацией периодического культивирования является культивирование с **диализом**, при котором питательный субстрат постоянно поступает в реактор через специальную мембрану. Диализ ведет к снижению концентрации продуктов жизнедеятельности клеток, неблагоприятно влияющих на их жизнеспособность. Помимо этого, диализ удаляет из культуры часть жидкости, что позволяет получать в конце процесса концентрированную биомассу.

При непрерывном культивировании процесс постоянно протекает в экспоненциальной фазе.

- Непрерывный процесс можно использовать в производстве БАВ, если культура при длительном выращивании не теряет способности к синтезу, т.е. генетически устойчива и однородна.
- Следует отметить, что высокая продуктивность процесса может быть достигнута при большем значении D (скорости разбавления), а это может быть связано с выносом не утилизованного субстрата. Поэтому данный метод далеко не всегда можно применять, например, в производстве антибиотиков и других препаратов медицинского назначения.
- Непрерывное культивирование в одном биореакторе называется **одностадийным**. **Многостадийное** выращивание предусматривает последовательное или каскадное расположение биореакторов, позволяющее обеспечивать внедрение принципа дифференцированных режимов в непрерывные биотехнологические процессы, основанные на создании системы биореакторов.

- **Выращивание микроорганизмов** осуществляется поверхностным (твердофазным) или глубинным (жидкофазным) способами. Выбор способа зависит главным образом от аэрофильности организма, природы образуемого целевого продукта и энергетической целесообразности производства.
- **Поверхностное выращивание** осуществляется на твердых, сыпучих средах, на поверхности тонкого слоя жидкой питательной среды. *В качестве основной питательной среды используют увлажненные пшеничные отруби (отходы мукомольного производства), содержащие в определенных соотношениях соли фосфора, магния и кальция, а также основные питательные элементы – углерод и азот в соотношении 7:1, обеспечивающие интенсивное развитие культуры микроорганизма и биосинтез конечного продукта.*
- На твердых питательных средах с использованием принудительной аэрации и добавок разрыхлителей успешно выращивают, например, *мицелиальные грибы*.
- Наиболее перспективен **глубинный способ выращивания**, при котором процесс осуществляется *в специальных емкостях–ферментаторах, снабженных термостатирующим, аэрирующим, перемешивающим и регулирующим рН среды устройствами.*
- Клетки микроорганизмов суспендируются в жидкости и находятся во взвешенном состоянии. Глубинное культивирование на жидких питательных средах находит широкое применение для анаэробных и аэробных продуцентов. Но *активность получаемых ферментных препаратов в большинстве случаев ниже, чем при поверхностном культивировании.*
- Глубинный способ выращивания микроорганизмов может быть как **периодическим**, так и **непрерывным**, поверхностный бывает только периодическим. При периодическом способе микроорганизмы выращиваются на какой-либо среде без ее смены, в аппарат загружается весь объем питательной среды и **посев материала (инокулят)** одновременно. Процесс ведут до определенного количества биомассы или продукта метаболизма. Периодически культура ведет себя как многоклеточный организм с ограниченным ростом.

• **Непрерывное культивирование**

- Более перспективно непрерывное культивирование. Его сущность заключается в том, что в ферментаторе поддерживаются постоянные условия среды, в результате чего микроорганизмы остаются в определенном физиологическом состоянии. Подается свежая питательная среда и удаляется избыток среды с продуктами метаболизма, поддерживается фаза экспоненциального роста.
- Если для культивирования продуцента используется один ферментатор, то говорят о гомогенно-непрерывном процессе. Если же используется батарея, то это гетеро-непрерывный процесс, так как в каждом ферментаторе, соединенном в батарею, поддерживаются постоянные условия.
- При **непрерывном культивировании** микроорганизмов отсутствует смена фаз развития культуры. В таких процессах скорость потока питательной среды и отвода культуральной жидкости из системы необходимо отрегулировать, чтобы концентрация клеток оставалась постоянной. В стерильных условиях непрерывный метод обеспечивает сохранение культуры в физиологически активном состоянии длительное время.
- **Поддержание динамики равновесия в реакторе осуществляется двумя методами: *турбидостатным и хемостатным.***
- По ***турбидостатному*** принципу **концентрация биомассы поддерживается скоростью потока среды**, а по ***хемостатному*** – **концентрацией подаваемого субстрата**. Известен также способ **регулирувания роста культуры по рН**.
- При турбидостатном методе регулирования контролируются концентрации суспензии входящей жидкости, создаваемой микробными клетками. Метод осуществляется с помощью фотоэлемента или рН-электрода, если в культуральной жидкости образуются органические кислоты.
- Хемостатный контроль проще, так как он происходит по входящему потоку. Этот метод регулирования применим ко всем типам микроорганизмов и клеток различных тканей животных и растений. Биореактор в хемостатном режиме снабжен устройствами для вливания и выпуска питательной жидкости, имеет систему контроля скорости потока, перемешивание.
- **Например, используемый ферментер Labfors 3 бактериальный (13л) позволяет контролировать до 16 параметров: температуру, рН, скорость вращения мешалки, концентрацию растворенного кислорода, контроль уровня пены, контроль массового потока газов, оптическую плотность, окислительно-восстановительный потенциал, массу, давление, анализ субстрата (например, уровень глюкозы и метанола) и др.**

• **Препараты микробиологического синтеза**

- Все препараты, получаемые **микробиологическим синтезом** при промышленном производстве, подразделяются на три группы:
- **1. биопрепараты, содержащие в товарном продукте в качестве основного активного компонента жизнеспособные микроорганизмы** (средства защиты растений, закваски, бактериальные удобрения и др.);
- **2. биопрепараты, в состав которых входит инактивированная биомасса** (кормовые дрожжи, грибной мицелий и др.);
- **3. биопрепараты, получаемые на основе очистки продуктов метаболизма.**
- Если искомое вещество по окончании процесса находится в культуральной жидкости, то биомассу используют как побочный продукт, а целевой продукт выделяют из раствора. При этом применяют отгонку, осаждение, упаривание и подобное в соответствии с разработанной технологией.
- Микробиологический синтез используется для получения ряда ценных продуктов, производство которых методами химической технологии невозможно или экономически нецелесообразно. Например, получение *ферментов, бактериальных препаратов, белка, антибиотика, ряда витаминов возможно только путем микробиологического синтеза; фермент амилазы - активный продуцент некоторых грибов и бактерий широко применяют в спиртовом, дрожжевом, пивоваренном производствах* (осахаривание заторов, улучшение качества хлеба) и других отраслях.
- *Протеолитические ферменты (протеазы)* гидролизуют белковые вещества. Для промышленного получения этих ферментов используют активные штаммы некоторых бактерий, а также в больших количествах их вырабатывают некоторые плесневые грибы. Протеазы применяют в пивоварении, хлебопечении, кожевенной промышленности (для смягчения кож), текстильной промышленности (для удаления белковой шлихты). Широко используют в народном хозяйстве также пектолитические, окислительные и другие ферменты микробного происхождения.
- **Ферментные препараты специально вносятся в субстрат для ускорения технологического процесса.**
- **Микробная биотехнология глубоко проникла во все сферы и отрасли народного хозяйства, особенно перспективна связь с перерабатывающими отраслями АПК, медициной и сельским хозяйством.**

- 1. Что такое брожение? Может ли брожение протекать в клетках аэробных организмов?
- 2. Какие типы брожения вам известны? Назовите конечные продукты каждого типа брожения.
- 3. Охарактеризуйте практическое значение различных типов брожения. Чем обусловлено использование дрожжей в виноделии? В хлебопечении?
- 4. Известно, что при изготовлении вина в домашних условиях иногда вместо вина образуется продукт с высоким содержанием уксусной кислоты. Чем это можно объяснить?
- 5. Почему при брожении высвобождается меньше энергии, чем при клеточном дыхании?
- 6. В чем заключается сходство брожения и клеточного дыхания? Чем брожение отличается от клеточного дыхания?
- 7. Определите массу глюкозы, расщепленной молочнокислыми бактериями, если ими было образовано 135 г молочной кислоты. Какое максимальное количество АТФ (моль) могло синтезироваться в клетках молочнокислых бактерий?
- 8. Дрожжи утилизировали 90 г глюкозы, при этом часть глюкозы подверглась полному окислению, а другая часть была расщеплена в ходе спиртового брожения. В результате было образовано 61,6 г углекислого газа. Какое максимальное количество АТФ (моль) могло образоваться при этом в клетках дрожжей? Какая часть глюкозы (%) была расщеплена в ходе брожения?

- **Ферментация** — биохимическая переработка сырья под воздействием **ферментов, содержащихся в нём самом** и в сапротрофах (чайного листа, листьев табака), а также вызываемая микроорганизмами. Именно ферментация используется в процессе изготовления чая [пуэр](#), табака для курения, какао порошка, иван-чая и др.

ФЕРМЕНТАЦИЯ, метаболический процесс, протекающий с выделением энергии, в результате которого молекулы сахара и крахмала без поступления воздуха разлагаются на углекислый газ и этанол (как при АНАЭРОБНОМ дыхании). Этот процесс катализируется при помощи энзимов. Обычно он протекает в микроорганизмах (прежде всего в дрожжах). Ферментация (иначе называемая брожением) применяется при изготовлении теста для хлеба, в виноделии и пивоваренном деле, а также для выдержки сыра. О том, что размятые фрукты, если их выдержать в теплом месте (благодаря чему начинается процесс брожения), выделяют одурманивающие вещества, было известно, вероятно, еще шесть тысяч лет назад.

- Что же такое ферментация? Это процесс, который происходит внутри чайного листа под воздействием кислорода, температуры, влаги и механических манипуляций. Возьмем яблоко. Разрежем его на маленькие кусочки, побрызгаем на него водой, хорошенько помнем его руками и поставим в теплое место до завтрашнего утра. На следующий день вы получите порцию темного месива, над которым будут кружить дрожжи. Это и есть отлично ферментированное яблоко.
- Почти то же самое происходит с чайным листом, когда его ферментируют. Его мнут, потом ему дают полежать, чтобы он окислился, потом его подогревают, поливают водой, высушивают, мнут опять, опять подогревают и так далее, в различных вариациях.



Чем больше манипуляций совершается с чайным листом во время обработки, чем больше его «мучают», тем выше степень ферментации.

В чайной литературе вы часто можете встретить выражения «слабо ферментированный чай» или «сильно ферментированный чай», или, например, «ферментированный на 30%». По большому счету, эти термины отображают, насколько долго и активно «колдовали» над чайным листом, прежде чем его прожарить окончательно. И еще одно. Внимание! Ферментация останавливается в тот самый момент, когда чай прожаривают в специальных высокотемпературных шкафах. Это происходит на финальной стадии производства.



- После этого процесса он полностью теряет влагу и «фиксируется» в таком состоянии. После финальной прожарки чайный лист не меняется.
- И последнее. Чем темнее цвет настоя в вашей пиалке, тем более ферментированный чай вы пьете. Таким образом, зеленые и белые чаи – ферментированы едва-едва. А красные чаи и Шу Пуэры – ферментированы по полной программе.



- Заготовка, сушка и ферментация иван-чая
Источник: <http://kivahan.ru/zagotovka-ivan-chaya/>
- (сбор, завяливание, скручивание, ферментация, сушка, хранение)

- **Биореакторы**

Биореактор — прибор, осуществляющий *перемешивание* культуральной среды в процессе микробиологического синтеза.

- Применяется в биотехнологической промышленности при **производстве лекарственных и ветеринарных препаратов, вакцин, продуктов пищевой промышленности** (ферменты, пищевые добавки, глюкозные сиропы), а также при **биоконверсии крахмала** и производстве **полисахаридов и нефтепродуктов**.

Различают **механические**,

- **аэрлифтные** и
- **газо-вихревые** биореакторы, а также а
- **эробные** (с подачей воздуха или газовых смесей с кислородом),
- **анаэробные** (без подачи кислорода) и
- **комбинированные** — аэробно-анаэробные. В последнем случае в комбинированном биореакторе проводят культивирование как аэробных, так и анаэробных культур одновременно. Обычно это применяется для получения биогаза, когда тепловыделения в аэробном процессе используют для подогрева анаэробной культуры.

Принцип действия биореактора

- Назначением всякого биореактора является создание оптимальных условий для жизнедеятельности культивируемых в нём клеток и микроорганизмов, а именно обеспечивать дыхание, подвод питания и отвод метаболитов путём равномерного перемешивания газовой и жидкой составляющих содержимого биореактора. При этом нежелательно подвергать клетки тепловому или механическому воздействию.
- В механическом биореакторе перемешивание осуществляется механической *мешалкой*, что приводит к недостаточно равномерному перемешиванию с одной стороны, и к гибели микроорганизмов с другой.
- В аэрлифтном биореакторе перемешивание осуществляется за счёт продувки газовой фазы через жидкость (*барботажное перемешивание*), что не всегда обеспечивает достаточно интенсивное перемешивание и приводит к нежелательному **пенообразованию**.
- В биореакторе газо-вихревого типа перемешивание осуществляется квазистационарным потоком с осевым противотоком, который создаётся аэрирующим *газовым вихрем* за счёт перепада **давления** над поверхностью и силы трения воздушного потока о поверхность суспензии.
- Пионером методологии непрерывного культивирования микроорганизмов в СССР был [М. Д. Утёнков](#).

В соответствии с основными принципами реализации биотехнологических процессов современные биореакторы должны обладать следующими системами:

- эффективного **перемешивания** и **гомогенизации** среды выращивания;
- обеспечения свободной и быстрой **диффузии** газообразных компонентов системы (аэрирование в первую очередь);
- **теплообмена**, обеспечивающего поддержание оптимальной температуры внутри реактора и ее контролируемые изменения;
- **пеногашения**;
- **стерилизации** сред, воздуха и самой аппаратуры;
- **контроля и регулировки** процесса и его отдельных этапов.

Различают **хеMOSTATный** и **турбидостатный** режимы непрерывного культивирования.

- Биореактор, работающий в **хеMOSTATном** режиме культивирования, называют хеMOSTАТОМ. Его конструкция предусматривает наличие:
 - 1) приспособления для подачи питательной среды;
 - 2) устройства, обеспечивающего отток культуральной жидкости вместе с клетками, и
 - 3) системы, контролирующей концентрацию элементов питательной среды и управляющей скоростью подачи питательной среды.
- **Турбидостатный** режим культивирования базируется на прямом контроле концентрации биомассы. По своей конструкции турбидостаты отличаются от хеMOSTАТОВ лишь системами контроля скорости потока.

По *турбидостатному* принципу концентрация биомассы поддерживается скоростью потока среды, а по *хеMOSTATному* – концентрацией подаваемого субстрата. Известен также способ регулирования роста культуры по **pH**.

Одностадийное и многостадийное культивирование (в одном или нескольких, расположенных последовательно или каскадно, биореакторах).

Открытые и замкнутые ферментационные системы

- В практике современной индустриальной биотехнологии существует три главных типа биореакторов и две формы биокатализаторов.
- Биореакторы могут функционировать на основе **разовой** (однократной), **восполняемой** (неполностью) и **непрерывной** (продолженной) загрузки. А в самих реакторах культуры могут быть *статическими* и *перемешивающимися*, находиться в присутствии кислорода (*аэробы*) или без него (*анаэробы*), а также в *водной* фазе или условиях *низкого увлажнения*.
- **Биокатализаторы** (цельные клетки или ферменты) могут быть свободными или иммобилизованными путем прикрепления к поверхности биореактора или к специальным устройствам.
- Биореакторные системы для выращивания микроорганизмов могут быть классифицированы как "**замкнутые**" и "**открытые**". Система рассматривается в качестве замкнутой, когда многие компоненты данной системы не могут быть из нее удалены или добавлены (например, производство пива, антибиотиков). В противоположность этому, ферментационная система, рассматривается как открытая, если ее компоненты (микроорганизмы и питательные субстраты) могут постоянно добавляться и удаляться из биореактора.

Периодическое культивирование включает:

- а) стерилизацию сред и всего оборудования;
- б) загрузку биореактора питательной средой;
- в) внесение посевного материала (клеток или спор);
- г) выращивание культуры (это может совпадать во времени с последующим этапом или предшествовать ему);
- д) синтез целевого продукта;
- е) отделение и очистку готового продукта.

Все этапы представлены во временном аспекте; после окончания последнего этапа производится мойка биореактора и подготовка его к новому циклу.

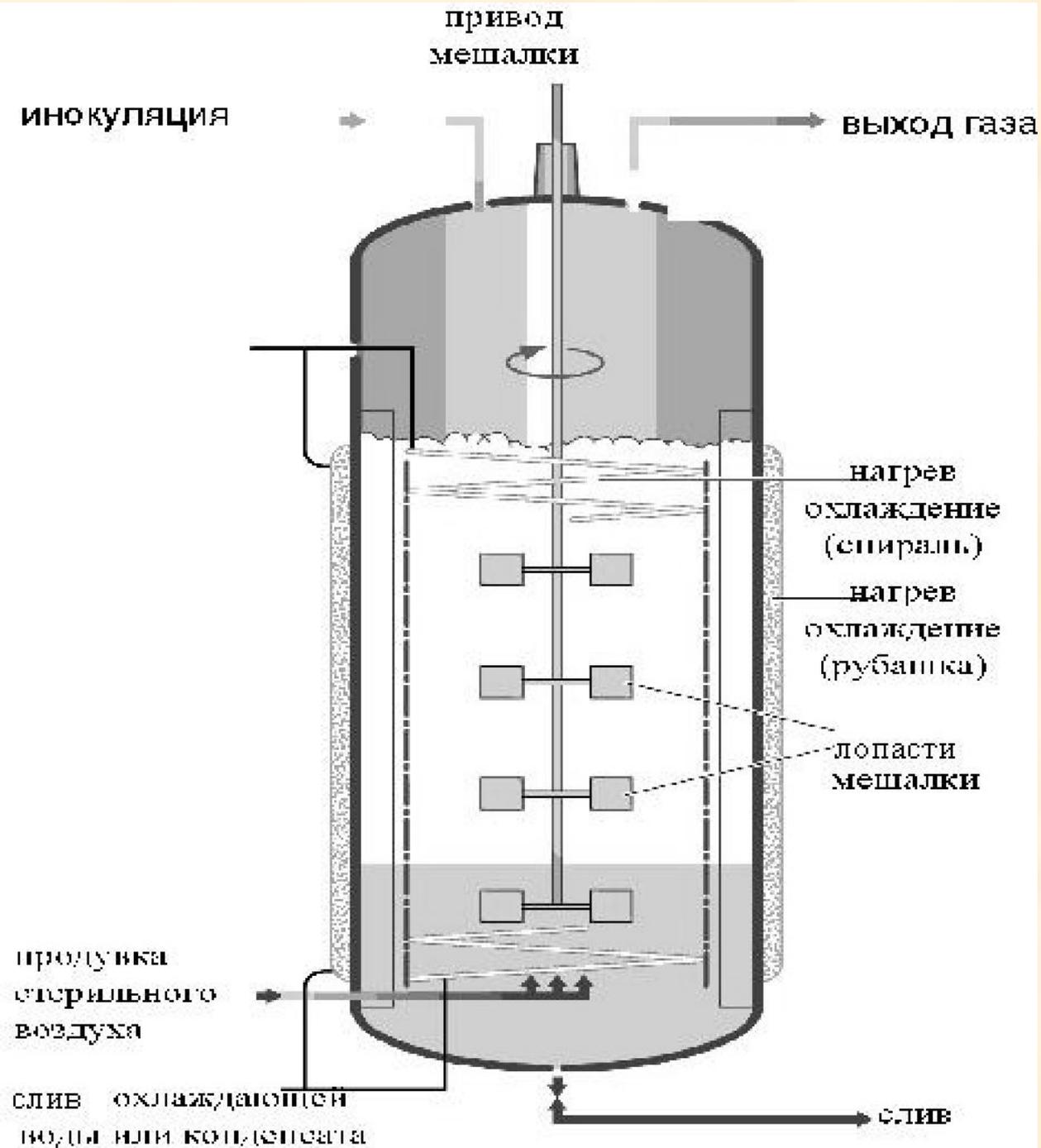
Рост клеточной популяции подразделяется на несколько фаз:

- 1) лаг-фаза, или фаза задержанного роста, при которой клетки растут медленно и адаптируются к новой среде обитания в объеме ферментатора;
- 2) экспоненциальная фаза, характеризующаяся интенсивным делением клеток и сбалансированностью роста всей популяции;
- 3) фаза замедленного роста, связанная с исчерпанием питательных субстратов и накоплением токсических продуктов метаболизма;
- 4) стационарная фаза, при которой прирост новых клеток количественно равняется числу погибающих;
- 5) фаза отмирания, характеризующаяся прогрессирующей гибелью клеток.

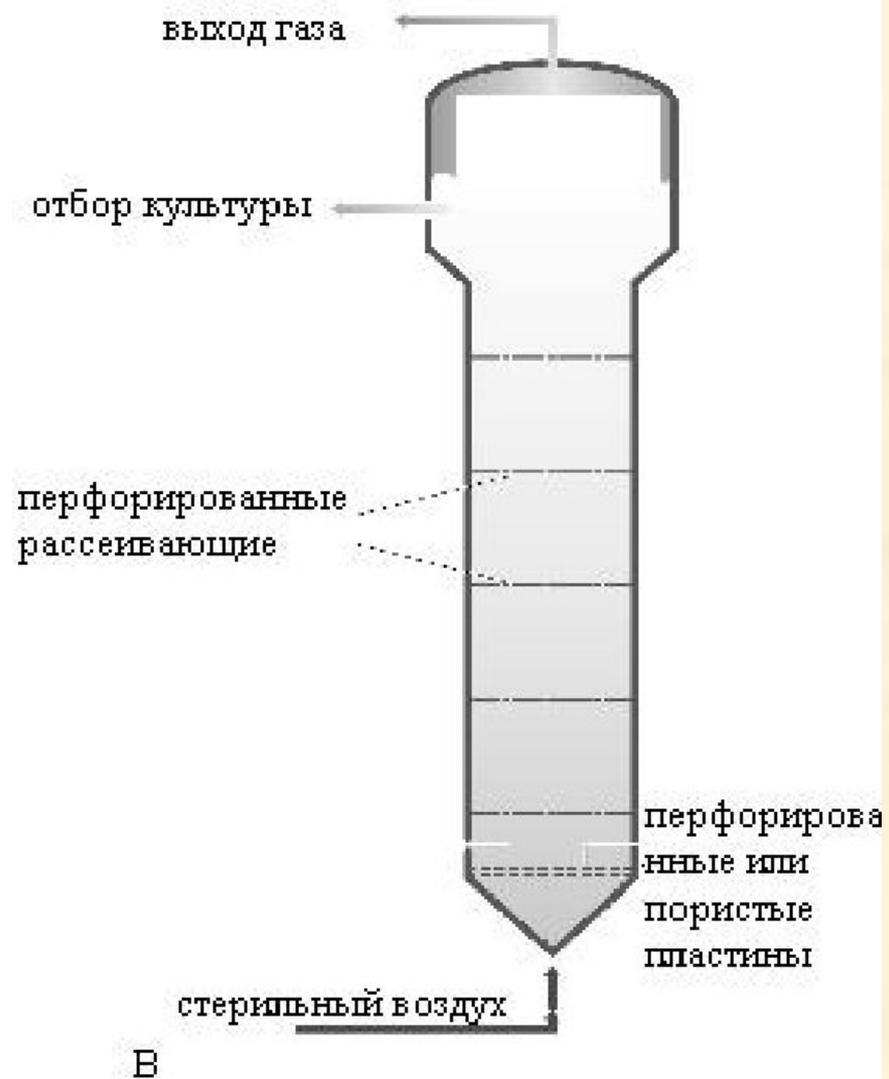
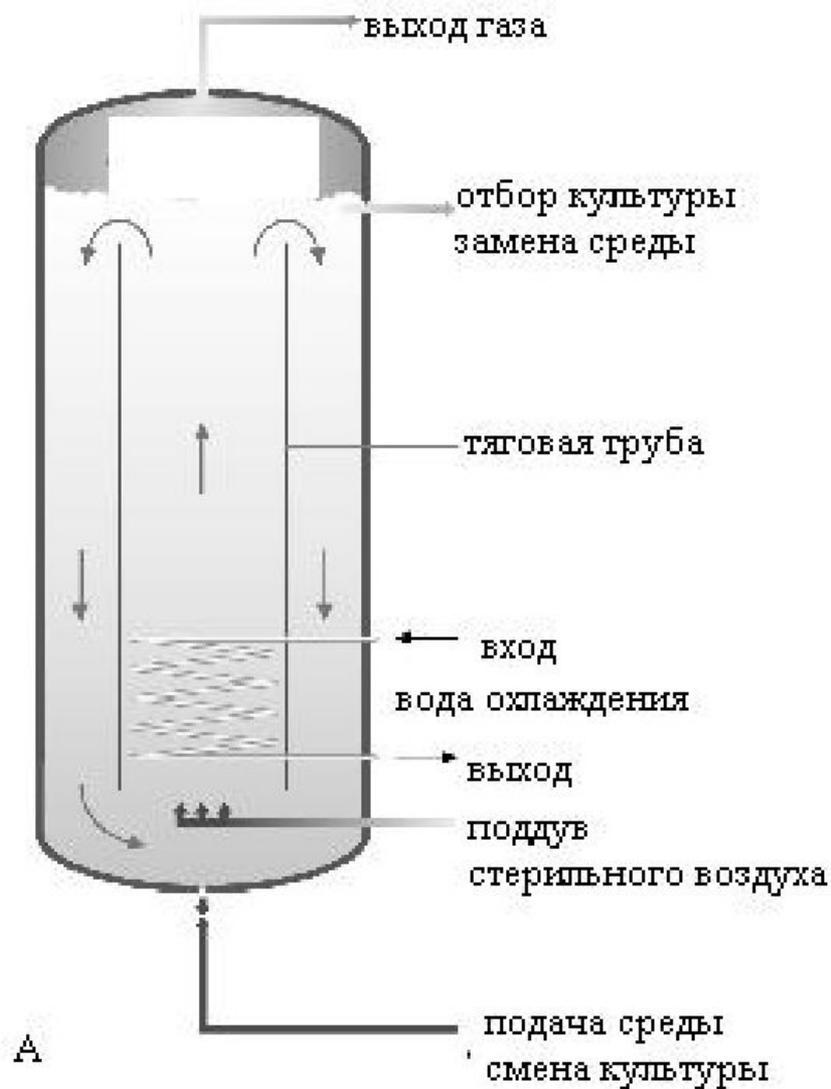
Требования к биореактору:

- Биореактор должен быть сконструирован так, чтобы исключить попадание загрязняющих микроорганизмов, а также обеспечить сохранения требуемой микрофлоры.
- Объем культивируемой смеси должен оставаться постоянным, т. е. чтобы не было утечки или испарения содержимого.
- Уровень растворенного кислорода должен поддерживаться выше критических уровней аэрирования культуры аэробных организмов.
- Параметры внешней среды, такие, как температура, рН и т. п., должны постоянно контролироваться.
- Культура при выращивании должна быть хорошо перемешиваемая.

- а) все материалы, вступающие в контакт с растворами, подающимися в биореактор, соприкасающиеся с культурой микроорганизма, должны быть устойчивыми к коррозии, чтобы предотвратить загрязнения металлами даже в следовых количествах;
- б) материалы должны быть нетоксичными и, чтобы даже при самой малой растворимости они не могли бы ингибировать рост культуры;
- в) компоненты и материалы биореактора должны выдерживать повторную стерилизацию паром под давлением;
- г) перемешивающая система биореактора и места поступления и выхода материалов и продуктов должны быть легко доступными и достаточно прочными, чтобы не деформироваться или ломаться при механических воздействиях;
- д) необходимо обеспечить визуальное наблюдение за средой и культурой, так что материалы, используемые в процессе, по возможности должны быть прозрачными.



Ферментер с
 механическим
 перемешивани
 ем.



Ферментеры с пневматическим перемешиванием:
а) эрлифтный; б) пузырькового типа

- Технология производственного процесса отрабатывается поэтапно: в лабораторных, пилотных (опытно-промышленных) и промышленных установках. Чаще встречаются аппараты с объемами ферменторной камеры: 0,5–100 л (**лабораторные**), 100-5000 л (**пилотные**) и 5000–1000000 л и более (**промышленные**). На каждом этапе увеличения масштаба ферментации (процесса) – масштабном переходе (масштабировании биотехнологического процесса) – решаются конкретные задачи отработки (налаживания) производства и его оптимизации.

Анаэробные процессы

- Биореакторы для таких процессов лишены приспособления для аэрирования среды, хотя некоторые из анаэробных процессов сопровождаются потреблением газообразных продуктов водорода, метана, поэтому требуют соответствующих приспособлений для подачи газов в жидкую среду. Ведущим моментом является обеспечение наэробнобиоза, что сопряжено со значительными сложностями.

Твердофазные процессы

Твердофазные осуществляются, как правило, на основе растительного сырья и используют чаще всего мицелиальные грибы и дрожжи или их комбинации. Различают три типа твердофазных процессов:

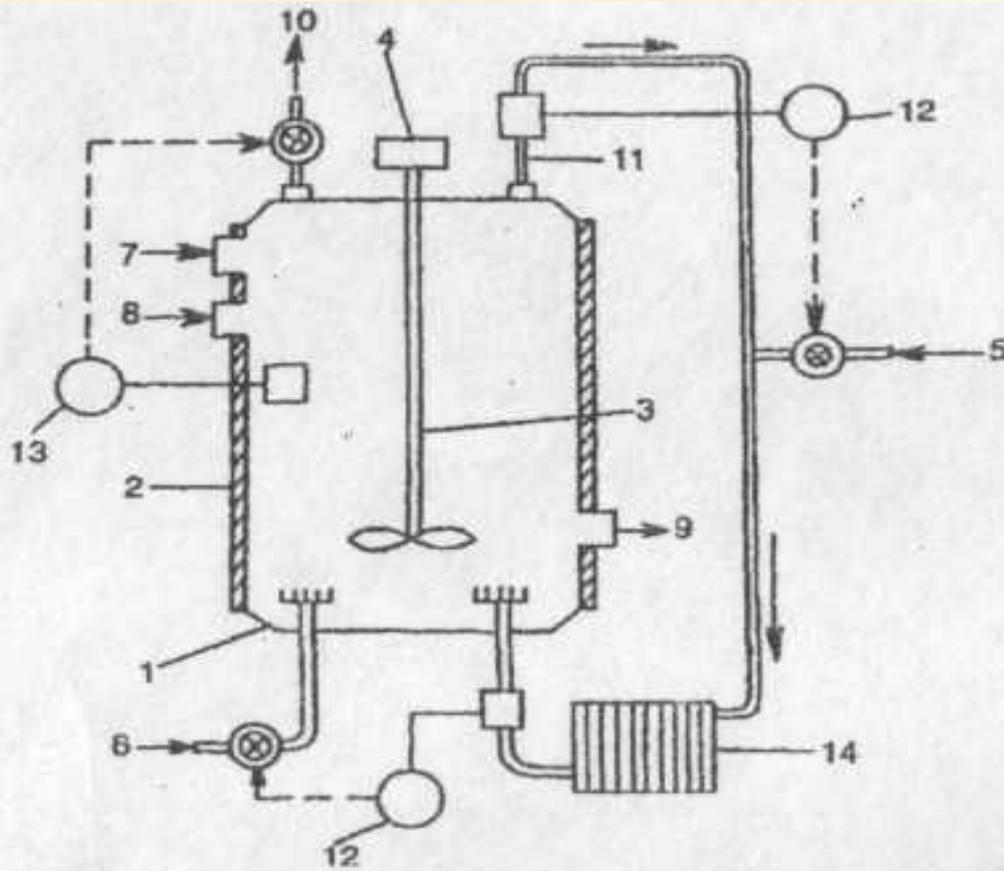
- 1. Поверхностные, когда слой субстрата не превышает 3–7 см ("тонкий слой"). В качестве "биореакторов" используются большие (до нескольких квадратных метров) подносы или культуральные камеры.
- 2. Глубинные процессы, идущие в не перемешиваемом слое ("высокий слой"). Биореакторы представляют собой глубокие открытые сосуды. Для аэробных твердофазных процессов разработаны приспособления, обеспечивающие диффузионный и конвекционный газообмен.
- 3. Перемешиваемые процессы, протекающие в перемешиваемой и аэрируемой массе субстрата, который может быть гомогенным (полужидкой консистенции) или состоять из частиц твердого вещества, взвешенных в жидкости (переходный вариант от твердофазного процесса к процессу в жидкой фазе). Для этого обычно используют биореакторы с низкоскоростным перемешиванием.

Преимущества:

- 1) они требуют меньших затрат на оснащение и более дешевые в эксплуатации;
- 2) характер субстрата облегчает отделение и очистку продукта;
- 3) низкое содержание воды препятствует заражению культуры продуцента посторонней микрофлорой;
- 4) твердофазные процессы не связаны со сбросом в окружающую среду больших количеств сточных вод.

Газофазные процессы

- Процессы этого типа осуществляются в аппаратах с твердым наполнителем, через который пропускают газ. В таких аппаратах получают, например, спирт на основе дрожжей, а также их биомассу, мелкие агрегаты дрожжевых клеток, предварительно увлажненные концентрированной питательной средой, "парят" в потоке газа, подаваемого под сильным давлением через сопло в днище реактора. Газ, покидающий аппарат, несет с собой летучие продукты жизнедеятельности дрожжей (в том числе и спирт), которые конденсируются в холодильнике. Процесс может осуществляться как в аэробных, так и в анаэробных условиях (в зависимости от используемого газа).



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

ВЫДЕЛЕНИЕ, КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ И ОЧИСТКА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОДУКТОВ

- **Первой стадией** подготовки культуральной жидкости для дальнейшей переработки является отделение взвешенной фазы или микробной массы, в состав которой входят микроорганизмы, продукты их жизнедеятельности, а также остатки неиспользованной питательной среды. Разделение твердой и жидких фаз проводят с предварительной **коагуляцией** высокомолекулярных веществ (обработка их высокомолекулярными полиэлектролитами – флокулянтами) с последующим естественным (отстаивание и фильтрация) или принудительным **осаждением** центрифугах. Основное преимущество центрифугирования по сравнению с другими методами обработки неоднородных систем, например, отстаиванием и фильтрованием заключается в увеличении производительности разделения, широко применяется в биотехнологических производствах лекарственной продукции .

- Для извлечения внутриклеточных продуктов биосинтеза широко используются методы дезинтеграции. **Дезинтеграция**, т.е. разрушение клеточных оболочек микроорганизмов, осуществляется несколькими способами: химическими, биологическими, физическими (механическими).
- **Химические способы дезинтеграции** основаны на деструкции упорядоченных структур клеточной стенки микроорганизма. Наиболее известные химические способы: обработка клеточной суспензии непосредственно щелочью, мочевиной, глицерином, аммиаком, перекисью. Химический способ предназначен для выделения суммарных белков пищевого назначения и не нашел широкого применения в химической и фармацевтической промышленности вследствие невозможности получить чистый продукт.
- **Биологические способы** осуществляются при помощи литических ферментов.
- **Физические способы.** Физическая (механическая) дезинтеграция - это процесс, происходящий при высоких скоростях и сопровождающийся быстрым перемешиванием разрушаемого материала в зоне действия дезинтегрирующих сил. Физическую дезинтеграцию можно проводить в непрерывном режиме с автоматизацией процесса. Наиболее известные способы разрушения биоматериала - **замораживание и оттаивание, ультразвуковое воздействие, истирание клеток, экструзия** (выталкивание, выдавливание).

- **Экстракцию** проводят органическими растворителями из клеток (например, антибиотика гризеофульвина ацетоном, или бензилпенициллина при рН 2,0-3,0 – бутилацетатом). Экстракция ферментов осуществляется в двухфазных системах, например, глюкана-декстрана и несовместимого с ним полиэтиленгликоля.
- **Метод адсорбции** применяют в микробиологических производствах в основном при получении кристаллических аминокислот, а также высокоочищенных и иммобилизованных ферментов. При выделении и иммобилизации ферментов используют органические сорбенты (крахмал, целлюлозу, синтетические и ионообменные смолы) или неорганические (цеолиты, гидроксид алюминия, силикагели и др.).

Процессы адсорбции осуществляют в аппаратах периодического или непрерывного действия с неподвижным или подвижным слоем адсорбента. Перспективны адсорберы с кипящим слоем адсорбента. Вертикальные адсорберы (ионнообменники) используются для выделения из культуральных жидкостей аминокислот

Хроматографическое разделение БАВ используют в различных вариантах: гель-фильтрация, ионнообменная хроматография, аффинная хроматография.

В случае аффинной хроматографии используют высокую специфичность таких природных веществ, как ферменты, антитела и лектины. Ферменты образуют комплексы с ингибиторами, антитела - с соответствующими антигенами (иммуносорбционная хроматография), лектины - со специальными рецепторами клеточных стенок.

К мембранным методам разделения относятся диализ и электродиализ, обратный осмос, ультрафильтрация и микрофильтрация. Общность всех мембранных методов разделения заключается в том, что основным элементом их аппаратного оформления являются мембраны.

Мембранные методы разделения обладают рядом преимуществ:

- концентрирование и очистка происходят без изменения агрегатного состояния и фазовых превращений;
 - перерабатываемый продукт не подвергается тепловым и химическим воздействиям;
 - механическое и гидродинамическое воздействие на биологический материал незначительно;
 - - легко обеспечивают герметичность и асептические условия.
-
- Основные ограничения в применении мембранных методов разделения связаны с тем, что некоторые материалы, из которых изготавливаются мембраны, не выдерживают очень низких и очень высоких значений рН и высоких температур.

СУШКА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ (измельчение, гранулирование, дозирование, биохимический контроль)

СТАНДАРТИЗАЦИЯ БИОПРЕПАРАТОВ

Показатели содержания основного вещества включают:

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

Показатели содержания посторонних примесей:

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

Показатели структуры и физико-химические характеристики:

- крупность частиц;
- влажность (%);
- насыпная масса (г/л);
- скорость растворения;
- плотность (г/см³) и др.
- Контроль качества биопрепарата по показателям назначения сводится к анализу его состава и физико-химических свойств.

- **КОНТРОЛЬ И УПРАВЛЕНИЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИМИ ПРОЦЕССАМИ**
- На современном этапе развития биотехнологического производства лекарственных, профилактических и диагностических средств высокое качество продукции может быть достигнуто с учетом ряда общих требований к организации и контролю производства. Такие требования должны предупреждать возможные ошибки при проведении технологических процессов и вести к созданию экологически безопасных предприятий.
- Их общее название - GMP расшифровывается как "Good Manufacturing Practice" и переводится как "Правила хорошего (или надлежащего) производства".

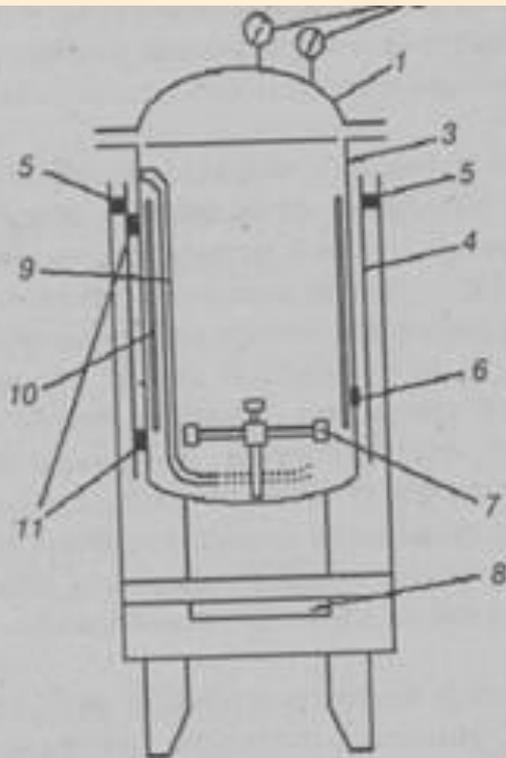
- **Побочные продукты – биотехнологическое сырье**
- **Химические и нефтехимические субстраты**



- Автоклавируемые
Лабораторный
ферментер,
биореактор



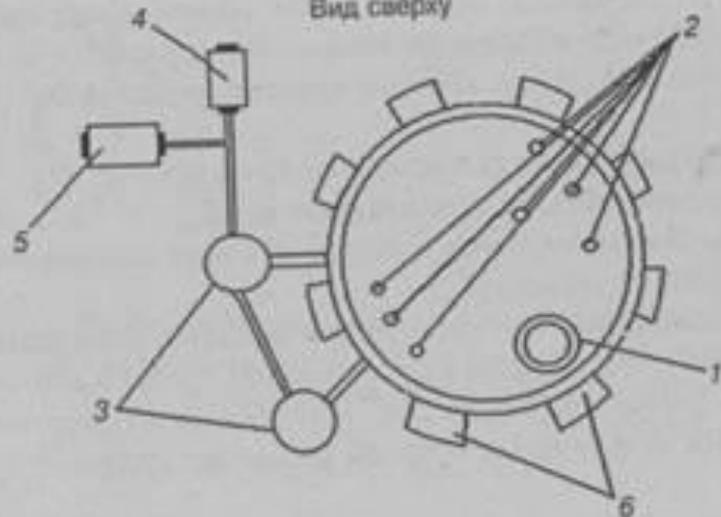
- Биореактор для исследования целлюлозного этанола



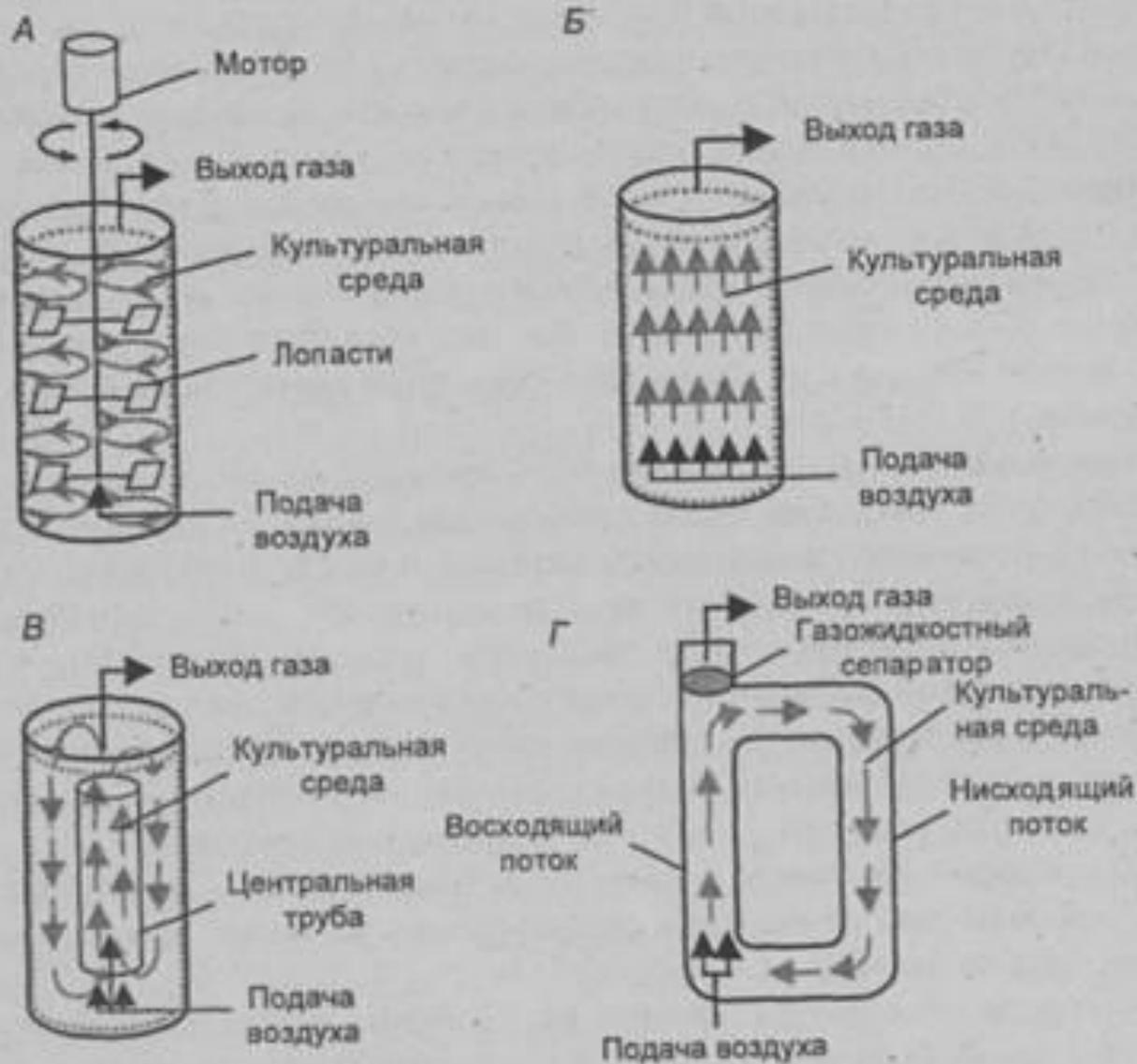
- 1 - крышка;
- 2 - манометры паровой и воздушный;
- 3 - сосуд;
- 4 - паровая рубашка;
- 5 - узел крепления и поворота биореактора;
- 6 - датчик температуры;
- 7 - турбинная лопастная мешалка;
- 8 - двигатель с магнитным приводом;
- 9 - газораспределительный барботер;
- 10 - отжатая перегородка (отбойники);
- 11 - вход и выход теплоносителей из паровой рубашки

- Схема биореактора (по А.Я. Самуйленко, Е.А. Рубану)

Вид сверху



- 1 - смотровое окно;
- 2 - штуцеры с заглушками для дробного введения ингредиентов;
- 3 - входной и выходной стерилизующие воздушные фильтры;
- 4 - клапан для выхода воздуха из биореактора;
- 5 - предохранительный клапан;
- 6 - запорные приспособления



Упрощенные
схемы
биоректоров
различных типов
(по Б. Глику, Дж.
Пастернаку):

А – реактор с
механическим
перемешиванием

Б – барботажная
колонна

В – эрлифный
реактор с
внутренней
циркуляцией

Г – эрлифный
реактор с внешней
циркуляцией

Стрелки –
направление
потока
культуральной
среды.

- 2.2 Принципы действия и конструкции биореакторов.
- Биотехнологические процессы принципиально не отличаются от процессов химического синтеза. Для них характерны такие этапы, как загрузка субстратов для реакций синтеза, превращения субстратов, отделение и очистка целевого продукта. Процессы обоих типов могут быть периодическими и непрерывными. Существуют принципы, общие по форме, но различающиеся по практической реализации.
- В первую очередь, это *принцип масштабирования* – поэтапного увеличения объема аппаратов и *принцип однородности физико-химических условий* – температуры, pH, концентрации растворенных веществ, включая кислород и другие газы, во всем объеме аппарата.
- В биотехнологических процессах нередко используют реакторы для химического синтеза, что, однако, порождает серьезные проблемы. Нередко терпят неудачу попытки непосредственно применить в области биотехнологии уравнения для расчета параметров процесса, разработанные для химической технологии. Специфика биотехнологических процессов состоит в том, что в них принимают участие живые клетки, субклеточные структуры или выделенные из клеток ферменты и их комплексы, что оказывает существенное влияние на процессы *массопередачи* – обмена веществом между различными фазами (например, перенос кислорода из газовой фазы в жидкую) и *теплообмена* – перераспределения тепловой энергии между взаимодействующими фазами. Поэтому важной составной частью биореактора является *система перемешивания*, служащая для обеспечения однородности условий в аппарате, эффективной массопередачи между водной фазой в биореакторе и пузырьками газа или частицами твердого субстрата, между культуральной жидкостью и культивируемыми клетками, а также в пределах жидкости между ее различными слоями.
- Расчет системы перемешивания требует ясного понимания особых свойств среды в биореакторе. Клетки, часто соединенные в длинные цепочки, и особенно гифы грибов или актиномицетов значительно увеличивают вязкость среды. Помимо этого, жидкость, содержащая нитевидные образования, как бы приобретает жесткую арматуру. Усилия ниже пороговой величины, приложенные в такой жидкости не вызывает ее перемешивания. Подобные свойства не характерны для жидких сред, не содержащих биообъекта, поэтому в биотехнологии предъявляются особые требования к системе перемешивания, в частности, приходится резко повышать мощность мешалки. Повышение мощности и соответственно ускорение вращения мешалки создают другую проблему. Приложение значительных усилий к жидкости может повлечь за собой угнетение роста биообъекта, снижение эффективности синтеза целевого продукта, повреждение и гибель клеток.
- Существенные различия между биотехнологическими и химико-технологическими процессами касаются массопередачи между газовой и жидкой фазами в реакторе. Многие биотехнологические процессы относятся к числу *аэробных* – они требуют для своего осуществления *аэрации*, т.е. снабжения кислородом. Для аэрации культуральной среды используют воздух или воздух, обогащенный кислородом, реже чистый кислород. Процессы, протекающие без доступа кислорода (*анаэробные*), нередко зависят от газообразных субстратов или требуют отвода газообразных продуктов жизнедеятельности.
- *Системы газоснабжения и газоотведения*, важнейшим примером которых служат *аэраторы* – установки для обеспечения кислородом, должны функционировать эффективно, надежно и в то же время экономично. Технологию приходится балансировать между угрозой перерасхода кислорода, без необходимости пропускаемого через жидкость, уже насыщенную этим газом, и риском исчерпания кислорода в среде, особенно если клетки активно потребляют кислород для дыхания. Кислород плохо растворим в воде; в то же время кислород относится к числу быстро расходуемых газов, и поэтому его запас в жидкости без подпитки исчерпывается за несколько секунд. Все это обуславливает необходимость слаженной работы систем аэрации и перемешивания и постоянного контроля за этими системами. Во многих случаях потребность в кислороде меняется по мере развития культуры. Аэратор должен во время реагировать на эти изменения, увеличивая или уменьшая подачу кислорода. В некоторых производственных процессах концентрацию кислорода в среде поддерживают на уровне, не обеспечивающем максимальное потребление клетками, и тогда необходима точная регулировка скорости его подачи в биореактор.
- Фундаментальной характеристикой массопередачи между газом и жидкостью служит *объемный коэффициент массопередачи* соответствующего газа. Этот коэффициент показывает, какова скорость переноса молекул газа из газовой фазы в жидкую при заданной разности концентраций газа между двумя фазами.
- Объемный коэффициент массопередачи зависит от характеристики среды культивирования и аппарата. Он существенно меняется при внесении в среду биообъекта, обычно в сторону увеличения, что объясняется активным поглощением кислорода клетками – это способствует поступлению его новых порций в жидкость из газовой фазы. Увеличение объемного коэффициента массопередачи особенно характерно для разработанных в последние годы биотехнологических процессов, поскольку:
 - применяют концентрированные популяции клеток;
 - широко используется иммобилизация клеток и их компонентов на носителях ведет к активации поглощения кислорода из среды.
- Коэффициент массопередачи представляет собой важнейшую характеристику процесса, исходя из которой, проводят расчет, оптимизацию и масштабирование уровня аэрации для культивирования биообъекта.
- Оценка этого коэффициента, проводимая по скорости поглощения кислорода с сульфитом (сульфитный метод) или с глюкозой при участии глюкозооксидазы (глюкозооксидазный метод) в отсутствие биообъекта, часто дает ошибочные результаты. Учет влияния растущей популяции клеток на коэффициент массопередачи кислорода, необходимый для корректных инженерно-технических расчетов, достигается с помощью прямых методов регистрации динамики поступления и расхода кислорода, в первую очередь, с использованием кислородных датчиков.

- 2.2 Принципы действия и конструкции биореакторов.
- *Теплообмен* представляет собой также важную составную часть процессов, протекающих в биореакторе, поскольку жизнедеятельность и метаболическая активность биообъекта в существенной мере зависит от температуры. Узкий диапазон температур, оптимальный для биотехнологического процесса, диктуется:
- резким спадом активности ферментов по мере снижения температуры;
- необратимой инактивацией (денатурацией) биологических макромолекул (белков и нуклеиновых кислот) при повышении температуры до определенного уровня.
- Температурный оптимум варьирует от организма к организму, от процесса к процессу. Большинство биотехнологических процессов протекает при температурах 30 – 50 °С (мезофильные условия), что имеет свои преимущества, т.к. для поддержания оптимума температуры лишь в редких случаях приходится прибегать к специальному нагреву. Серьезной проблемой, однако, является удаление избыточной теплоты, выделяемой в процессе жизнедеятельности культивируемых клеток, поэтому биореактор должен иметь *систему теплообмена*.
- Расчет и оптимизация системы теплообмена усложняется наличием в биореакторе большого количества контактирующих поверхностей. Теплообмен происходит между клеткой и питательной средой, между средой и стенкой и охлаждающей жидкостью рубашки биореактора, между этой жидкостью и внешней стенкой рубашки, между рубашкой и наружной поверхностью. Система теплообмена должна чутко реагировать на изменение теплопродукции, проходящее в ходе культивирования объекта, поддерживать температуру на постоянном уровне (режим термостатирования) или контролировать ее изменения по заданной программе. Например, на первых этапах роста культуры биореактор прогревают, а далее встает задача отвода избыточной теплоты, выделяемой в процессе жизнедеятельности. Основным параметром процесса теплообмена является *коэффициент теплопередачи*, который соответствует количеству теплоты, передаваемой в единицу времени через единичную поверхность при разности температур в 1°С.
- Увеличить эффективность работы системы теплообмена можно путем:
 - повышения коэффициента теплопередачи;
 - увеличения поверхности теплообмена;
 - увеличения разности температур.
- Первые два пути связаны с инженерно-конструкторскими разработками. Коррозия стенок биореактора или их загрязнение снижают коэффициент теплопередачи. Отсюда вытекает необходимость изготовления аппаратов из неподверженных коррозии материалов и его поддержания в чистоте.
- Серьезной проблемой для аэрируемых процессов в биотехнологии является вспенивание культуральной среды – образование на ее поверхности слоя из пузырей. *Пенообразование* связано с наличием в среде поверхностно-активных веществ, к числу которых относятся продукты распада жиров – мыла, а также белки. Белковые вещества содержатся в среде как питательные субстраты (белки соевой, кукурузной муки и т.д.) или представляют собой продукты жизнедеятельности организмов. Как правило, ПАВ включают как полярные, так и неполярные группировки. Заряженные группы имеют сродство к воде и локализируются в водной фазе, а нейтральные выталкиваются из воды в воздушную фазу. Это придает ПАВ ориентацию на границе раздела фаз вода/воздух. Встраиваясь в стенки газовых пузырей, ПАВ значительно удлиняют время их жизни.
- Пенный слой поверх среды культивирования в биореакторе имеет двойное значение. Пена способствует росту многих аэробных микроорганизмов. В пенном слое – «кислородном коктейле» - наибольший приток дают дрожжи. Внедряясь в границу раздела вода/воздух, пенообразующие ПАВ стимулируют массопередачу между этими фазами, снижая затраты на перемешивание и аэрацию. Нежелательные последствия вызывает избыточное пенообразование. Оно ведет к сокращению полезного объема биореактора, создает угрозу заражения культуры посторонней микрофлорой. Поэтому необходимой составной частью реактора служит *система пеногашения*.
- На практике стремятся вообще не допустить в биореактор постороннюю микрофлору, создав в нем соответствующие условия. *Система стерилизации* представляет собой специфический элемент биореактора, не имеющий аналогов в аппаратах химической технологии. Устранение посторонней микрофлоры из реактора до введения в него штамма продуцента, поддержание чистоты культуры на всем протяжении биотехнологического процесса, надежная стерилизация питательных сред, добавочных компонентов, пеногасителей, воздуха, подаваемого в биореактор – все это рассматривается как *принцип асептики* биотехнологического производства.
- Все более широкое применение в биотехнологии находит *принцип дифференцированных режимов культивирования*: разные этапы одного процесса целесообразно осуществлять при различных условиях, варьируя такие параметры, как температура, pH среды и т.д.
- Нередко к повышению эффективности биотехнологического процесса ведет разобщение роста культуры и синтез целевого продукта. Показательный пример – технологический способ стабилизации генно-инженерных мутантов. Полученные путем плазмидного переноса сверхпродуценты тех или иных соединений, как правило, отстают в росте от представителей дикого типа, более экономно расходующих материальные и энергетические ресурсы клетки. Чтобы избежать вытеснения сверхпродуцента диким штаммом, плазмиду, отвечающую за сверхпродукцию, ставят под контроль термолabileного репрессора. Генно-инженерный штамм выращивают при пониженной температуре, при которой репрессор подавляет синтез целевого продукта. Плазмидный штамм не расходует материал на его синтез и растет с нормальной скоростью. После накопления достаточного количества клеток в биореакторе температуру повышают до уровня, при котором наступает инактивация репрессора, и вся масса клеток с активно функционирующими плазмидами «выстреливает» целевой продукт.
- Таким образом, в согласии с основными принципами реализации биотехнологических процессов современный биореактор должен обладать системами:
 - эффективного перемешивания и гомогенизации питательной среды;
 - обеспечения доступа и быстрой диффузии газообразных агентов (наиболее часто речь идет о системе аэрации среды);
 - теплообмена, отвечающего за поддержание температуры внутреннего объема биореактора и (или) за ее контролируемые изменения;
 - пеногашения;
 - стерилизации сред, аппаратуры и воздуха;
 - контроля и регулировки процесса.