



Сибирский государственный университет  
науки и технологий имени академика М.Ф. Решетнева

---

**О. С. Федорова**

**ВВЕДЕНИЕ В СПЕЦИАЛЬНОСТЬ.  
БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ  
ПРОИЗВОДСТВА**

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
Сибирский государственный университет науки и технологий  
имени академика М. Ф. Решетнева

**О. С. Федорова**

**ВВЕДЕНИЕ В СПЕЦИАЛЬНОСТЬ.  
БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОИЗВОДСТВА**

*Утверждено редакционно-издательским советом университета  
в качестве учебного пособия для студентов бакалавриата  
по направлению подготовки 19.03.01 «Биотехнология»,  
направленность подготовки «Промышленная биотехнология»,  
всех форм обучения*

Красноярск 2022

УДК 573.6 (075.8)  
ББК 35.77я73  
Ф45

Рецензенты:

кандидат технических наук, доцент В. Г. КРЫМКОВА  
(Красноярский государственный аграрный университет);  
кандидат технических наук, доцент Н. С. РЕШЕТОВА  
(Сибирский государственный университет науки и технологий  
имени академика М. Ф. Решетнева)

**Федорова, О. С.**

Ф45 Введение в специальность. Биотехнологические производства : учеб. пособие / О. С. Федорова ; СибГУ им. М. Ф. Решетнева. – Красноярск, 2022. – 90 с.

Рассмотрены история, цели и задачи биотехнологии как комплекса науки и производства, приведена классификация направлений, требования к производителям, описаны сырье и стадии производства, рассмотрены основы таких процессов, как пищевые производства, биотехнология в медицине, сельском хозяйстве и энергетике, экологические проблемы биотехнологических предприятий и территорий, решаемые с использованием микробиоценозов.

Предназначено для студентов бакалавриата, обучающихся по направлению подготовки 19.03.01 «Биотехнология», направленность подготовки «Промышленная биотехнология», всех форм обучения.

**УДК 573.6 (075.8)**  
**ББК 35.77я73**

© СибГУ им. М. Ф. Решетнева, 2022  
© Федорова О. С., 2022

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>Введение</b> .....	4
<b>1. Предмет и содержание биотехнологии</b> .....	7
1.1. Биотехнология – движение в будущее .....	7
1.2. Преимущества и особенности производства, требования к продуцентам .....	13
1.3. Стадии производства продуктов биотехнологии .....	23
Контрольные вопросы и задания для самоконтроля .....	27
<b>2. Управляемый биосинтез в решении проблем населения</b> .....	28
2.1. Сырье и контроль биотехнологических процессов .....	28
2.2. Пищевые биотехнологии .....	34
2.3. Получение препаратов медицинской направленности .....	42
Контрольные вопросы и задания для самоконтроля .....	52
<b>3. Промышленное использование живых организмов</b> .....	53
3.1. Биотехнологии в энергетике и промышленности .....	53
3.2. Биотехнология для сельского хозяйства .....	61
3.3. Экологическая биотехнология .....	69
Контрольные вопросы и задания для самоконтроля .....	78
<b>Послесловие</b> .....	80
<b>Библиографический список</b> .....	81
<b>Приложения</b> .....	82

## ВВЕДЕНИЕ

Термин «биотехнология» был введен в 1917 г. венгерским инженером Карлом Эреки при описании процесса выращивания свиней с использованием в качестве корма сахарной свеклы: для крупномасштабного получения свинины (конечный продукт) с использованием дешевой сахарной свеклы (сырье) в качестве корма для свиней (биотрансформация)

Однако этот термин в те годы не получил широкого распространения. Только в 1961 г. к нему вновь вернулись, после того как шведский микробиолог Карл Герен Хеден порекомендовал изменить название научного журнала «*Journal of Microbiological and Biochemical Engineering and Technology*» («Журнал микробиологической и химической инженерии и технологии»), специализирующегося на публикации работ по прикладной микробиологии и промышленной ферментации, на «*Biotechnology and Bioengineering*» («Биотехнология и биоинженерия»). С этого момента биотехнология оказалась четко и необратимо связана с исследованиями в области «промышленного производства товаров и услуг при участии живых организмов, биологических систем и процессов».

Понятие «биотехнология» может быть представлено многими определениями:

– комплексное применение биохимических, микробиологических и инженерных знаний с целью промышленного использования потенциальных возможностей микроорганизмов, культур клеток и отдельных их компонентов или систем;

– технологическое использование биологических явлений для воспроизводства и получения (изготовления) различных типов полезных продуктов;

– приложение научных и инженерных принципов для обработки материалов биологическими агентами с целью получения необходимых продуктов или создания сервисных технологий.

Основные термины и понятия, используемые в биотехнологии, см. в прил. 1.

Биотехнология на самом деле не что иное, как название, данное набору технических приемов (подходов) и процессов, основанных на использовании для этих целей биологических объектов. Таким образом, биотехнология по существу сводится к использованию мик-

роорганизмов, животных и растительных клеток или же их ферментов для синтеза, разрушения или трансформации (превращения) различных материалов с целью получения полезных продуктов для различных нужд человека.

Последние два десятилетия характеризуются выдающимися достижениями биотехнологии, являющейся междисциплинарной областью знаний, базирующейся на микробиологии, биохимии, молекулярной биологии, биоорганической химии, биофизике, вирусологии, иммунологии, генетике, инженерных науках и электронике.

Развитие биотехнологии позволяет:

- существенно интенсифицировать производство;
- повышать эффективность использования природных ресурсов;
- решать экологические проблемы;
- создавать новые источники энергии.

Возможности биотехнологии при международном сотрудничестве специалистов могут быть направлены на решение мировых кризисных проблем, связанных с восполнением дефицита белка и энергии, предотвращением опасных заболеваний, охраной окружающей среды.

Одна из особенностей биотехнологии состоит в том, что она использует технологии производства продуктов на ранних этапах развития микробиологического синтеза. Выявлены существенные потенциальные возможности для усовершенствования традиционных технологий и расширения сфер приложения получаемых продуктов. Например, методом генетической инженерии созданы уникальные штаммы микроорганизмов для осуществления разного рода ферментативных превращений сырья в относительно простых условиях.

*Разработка биотехнологических процессов связана с большими капиталовложениями. Внедрение новейших биотехнологий особенно перспективно в тех случаях, когда продукт не может быть получен другими способами или может быть получен в недостаточных количествах, по более высокой цене.*

Главным звеном биотехнологического процесса, определяющим всю его сущность, является биологический объект, способный осуществлять определенную модификацию исходного сырья и образовывать тот или иной необходимый продукт. К таким объектам относятся клетки микроорганизмов, животных и растений, трансгенные животные и растения, а также многокомпонентные ферментные системы клеток и отдельные ферменты. Основой большинства современных

биотехнологических производств до сих пор все еще является микробный синтез, т. е. синтез разнообразных биологически активных веществ с помощью микроорганизмов. Объекты растительного и животного происхождения пока не нашли столь широкого применения.

Разделение микроорганизмов на промышленные и непромышленные для лиц, далеких от микробиологии, молекулярной биологии и молекулярной генетики, кажется достаточно определенным: те микроорганизмы, которые используются в промышленном производстве, – промышленные, а те, которые не используются, – непромышленные.

В биотехнологических процессах используется ограниченное число микроорганизмов, которые классифицируются как GRAS (generally recognized as safe – обычно считаются безопасными).

# 1. ПРЕДМЕТ И СОДЕРЖАНИЕ БИОТЕХНОЛОГИИ

## 1.1. Биотехнология – движение в будущее

*Введение в предмет. – Этапы развития биотехнологий. –  
Связь с другими науками. – Задачи. – Перспективы*

Биотехнологическое использование живых организмов и биологических процессов развивается в промышленном производстве: микробиологический синтез ферментов, витаминов, аминокислот, антибиотиков, других биологически активных веществ (гормональных препаратов, соединений, стимулирующих иммунитет, современных вакцин, моноклональных антител, диагностикумов с помощью методов генетической инженерии и культуры животных и растительных клеток.

К одним из самых древних областей человеческой деятельности относятся хлебопечение, виноделие, пивоварение, которые в основе своей имеют не что иное, как жизнедеятельность микроорганизмов – хлебопекарных и винных дрожжей. Сюда же можно отнести получение кисломолочных продуктов, сыров с помощью молочнокислых бактерий, пищевого уксуса с помощью уксуснокислых бактерий. Следы такого рода деятельности были обнаружены у древних народов, живших 8 тысяч лет назад. С тех пор как были открыты микроорганизмы и определены их физиологические особенности, практическое использование микробов стало осознанным, было поставлено на промышленную основу и получило бурное развитие.

**Биотехнология** (от греч. *bios* – жизнь, *techne* – искусство, мастерство и *logos* – слово, учение) – использование живых организмов и биологических процессов в производстве. Биотехнология представляет собой междисциплинарную область, возникшую на стыке биологических, химических и технических наук. С развитием биотехнологии связывают решение глобальных проблем человечества: ликвидацию нехватки продовольствия, энергии, минеральных ресурсов, улучшение состояния здравоохранения и качества окружающей среды.

Промышленное использование микроорганизмов потребовало разработки специальной аппаратуры и технологий.

Все основные технологии можно разделить на три основных класса.

**Физико-механические технологии** – исходный материал (сырье) в процессе получения продукта меняет форму или агрегатное

состояние, но не изменяет своего химического состава. Примерами могут служить изготовление досок из бревен или отливка металлических изделий.

**Химические технологии** – в процессе получения продукта сырье претерпевает изменения химического состава. Примеры: производство из природного газа спирта, полиэтилена, синтетического каучука, производство из природного газа и воздуха удобрения аммиачной селитры, получение красителей и многих лекарств из простых химических соединений (кислоты, щелочи, бензола и др.).

**Биотехнологии** в отличие от физико-механических и химических технологий предполагают использование живых организмов или их компонентов.

По определению Европейской биотехнологической федерации (ЕБФ) биотехнология является такой интеграцией естественных и инженерных наук, при помощи которой использование клеток, клеточных структур и отдельных биомолекул дает возможность получения качественно улучшенных и дешевых продуктов медицинского и промышленного назначения или проведения других полезных манипуляций.

Все высокоразвитые страны мира относят биотехнологию к одной из важнейших современных отраслей, считая ее ключевым методом реконструкции промышленности в соответствии с потребностями времени, и принимают меры по стимулированию ее развития.

Современная биотехнология родилась на стыке нескольких наук. Она опирается на теоретические и методические положения микробиологии, биохимии, генетики, молекулярной биологии, а также использует достижения органической, неорганической и аналитической химии, процессы и аппараты химической и пищевой промышленности.

Биотехнологические процессы многолики по своим историческим корням и по своей структуре, они объединяют элементы фундаментальных наук, а также ряда прикладных отраслей, таких как химическая технология, машиностроение, экономика. Лидерами в области биотехнологий являются фармацевтические фирмы США, Китая, Индии, Европы.

Биотехнологии принято условно подразделять на группы:

– красная биотехнология – связанная с медициной и «лечением» генетического кода, на рынке биотехнологий ей принадлежит доля более 70 %;

– зеленая – генная инженерия, работающая для сельского хозяйства;

- белая – производство биотооплива;
- серая – защита экологии, борьба с отходами;
- синяя – использование биологических ресурсов океана.

Лидерами «красной биотехнологии» выступают американские фирмы Genentech, Novartis, Merck&Co, Pfizer, Johnson & Johnson, Sanofi. В области разработки и производства ГМО лидирует транснациональная компания Monsanto Company.

Белая, серая, синяя биотехнологии существенно отстают от лидеров. Их полезная деятельность дает не слишком быстрый экономический эффект, поэтому в списках лидеров они не значатся.

Через биологию на биотехнологию влияют химия, физика, математика, кибернетика, механика. Современные биотехнологии также остро нуждаются в научно обоснованной проработке технологии и аппаратурном оформлении. Поэтому необходима органическая связь с техническими науками – машиностроением, электроникой, автоматикой.

Рассмотрим этапы развития биотехнологии (примеры получаемых продуктов) (прил. 2).

*Допастеровский период (до 1865 г.):*

- спиртные напитки (пиво, вино);
- молочные продукты (сыры, йогурт);
- другие продукты, получаемые на основе брожения (уксус).

*Пастеровский период (1865–1940):*

- промышленное культивирование (для получения продуктов брожения этанола, бутанола, ацетона, глицерола);
- производство органических кислот (уксусной, лимонной, молочной).

*Начало производства антибиотиков (1940–1960):*

- промышленное производство антибиотиков (пенициллина, стрептомицина, хлортетрациклина и др.);
- микробное превращение стероидов (получение кортизона, тестостерона, эстрогена).

*Расширение круга промышленно-производственных микробных продуктов (1960–1975):*

- микробиологическое производство аминокислот (L-глутамата, L-лизина);
- разработка методик производства микробного белка;
- производство ферментов (протеаз, амилаз, глюкозоизомераз);
- промышленное применение иммобилизованных ферментов (глюкозоизомераза);
- производство бактериальных полисахаридов (ксантана).

*Развитие синтетической биотехнологии (с 1975 г. по настоящее время):*

- разработка технологии рекомбинантной ДНК (1974);
- поступление на рынок первых продуктов в 1982 г. (вакцины против диареи животных, инсулина человека).

Накопление знаний о микробном метаболизме способствовало расширению применения бактерий для получения разнообразных метаболитов и ферментов. Крупным достижением стало производство ферментов для использования, например, в составе моющих средств и в промышленном получении глюкозы и фруктозы из крахмала.

В 1980-е гг. началось активное развитие прикладной микробиологии, связанное с внедрением технологии рекомбинантной ДНК. С помощью этой технологии оказалось возможным непосредственно манипулировать с наследственным материалом клеток, получая новые сочетания полезных признаков и способностей. Возможности этих технических приемов, которые впервые были разработаны в лабораториях, вскоре оказались вполне приемлемыми в промышленных условиях.

Однако, несмотря на определенные, а порой и весьма значительные выгоды, которые несет технология рекомбинантных молекул, постоянно следует учитывать возможные опасности, связанные с вмешательством человека в природу.

Биотехнологии и геновая инженерия более чем все остальные связаны с фундаментальными научными исследованиями. Создание организмов с «заданными параметрами», лечение генетически обусловленных болезней, производство белковой массы вне организма, внедрение в организм «биологических чипов», влияющих на жизнедеятельность, – все эти направления нуждаются в дорогостоящих исследованиях, сложном оборудовании и высококвалифицированных специалистах.

На стыке двадцатого и двадцать первого веков был задуман и осуществлен грандиозный проект – прочитан геном человека. Это был большой труд, в котором участвовало много лабораторий в разных странах мира. Одним из продуктов этих исследований стало появление технологии идентификации личности по ДНК, получение информации о родстве (установление отцовства). Информация, зашифрованная в ДНК, огромна, и ее изучение, расшифровка еще сложнее, чем процедура исследований.

Если до этого времени методы мутагенеза и селекции использовались лишь для повышения уровня активности, присущей микробным клеткам, то применение методов генетической инженерии позволило придавать клеткам совершенно новые синтетические способности, например способность к синтезу гормонов человека бактерии *Escherichia coli*. По мере дальнейшего развития молекулярно-генетических методов стало возможным клонирование генов, связанных с разнообразными путями метаболизма, и это позволило свести к минимуму набор бактерий, используемых в промышленном производстве.

Научная многоликость биотехнологии в целом и ее разделов, имеющих целью решение природоохранных задач, удивительна: она использует достижения наук биологического цикла, изучающих надорганизменный уровень (экология), биологические организмы (микробиология, микология), суборганизменные структуры (молекулярная биология, генетика).

Таким образом, микробиология и биотехнология на протяжении XX века прошли путь развития от эмпирических до количественных дисциплин, открывающих новые перспективы практического использования микроорганизмов.

Одна из особенностей биотехнологии состоит в том, что она использует технологии производства продуктов на ранних этапах развития микробиологического синтеза.

Выявлены существенные потенциальные возможности для усовершенствования традиционных технологий и расширения сфер приложения получаемых продуктов. Например, методом генетической инженерии созданы уникальные штаммы микроорганизмов для промышленных и пищевых биотехнологий,

Иммунная биотехнология, с помощью которой распознают и выделяют из смесей одиночные клетки, может применяться не только непосредственно в медицине для диагностики и лечения, но и в научных исследованиях, в фармакологической, пищевой и других отраслях промышленности, а также использоваться для получения препаратов, синтезируемых клетками защитной системы организма.

Большое будущее биотехнологии связано с протоинженерией – технологией изменения свойств природных белков на генетическом уровне, получения новых белков (например, новых стимуляторов роста растений, инсектицидов, активных и устойчивых ферментов, высококачественных пищевых продуктов, биосенсоров и биоэлементов, медицинских приборов).

Растущая область биотехнологии – биоэлектроника. Использование биосенсоров революционизирует методы измерения и контроля в различных отраслях промышленности, медицине, научных исследованиях.

С внедрением биотехнологии в добывающую промышленность связан переход от тяжелой индустрии к высоким технологиям. Применение биотехнологии металлов перспективно для извлечения из руд платины и других драгоценных и стратегически важных металлов, а биотехнологических методов – для увеличения извлечения нефти из скважин, удаления серы из угля, метана из шахт.

Внедрение биотехнологии в практику изменяет соотношение в системе «человек – производство – природа», повышает производительность труда. Широкое использование биотехнологических процессов способствует стиранию грани между промышленным и сельским производством, поскольку продукты питания, корма и другие сельскохозяйственные продукты вырабатывают в индустриальных условиях. Так, на фермах применяют установки для переработки сельскохозяйственных отходов в биогаз, используемый для удовлетворения собственных потребностей в топливе; внедряются промышленные методы производства компонентов кормов.

В настоящее время достижения биотехнологии перспективны в следующих отраслях (прил. 3):

1) в промышленности (пищевая, фармацевтическая, химическая, нефтегазовая) – использование биосинтеза и биотрансформации новых веществ на основе сконструированных методами генной инженерии штаммов бактерий и дрожжей с заданными свойствами на основе микробиологического синтеза;

2) в экологии – повышение эффективности экологизированной защиты растений, разработка экологически безопасных технологий очистки сточных вод, утилизация отходов агропромышленного комплекса, конструирование экосистем;

3) в энергетике – применение новых источников биоэнергии, полученных на основе микробиологического синтеза и моделированных фотосинтетических процессов, биоконверсии биомассы в биогаз;

4) в сельском хозяйстве – разработка в области растениеводства трансгенных агрокультур, биологических средств защиты растений, бактериальных удобрений, микробиологических методов рекультивации почв; в области животноводства – создание эффективных кормовых препаратов из растительной, микробной биомассы и отходов сельского хозяйства, репродукция животных на основе эмбриогенетических методов;

5) в медицине – разработка медицинских биопрепаратов, моноклональных антител, диагностикумов, вакцин, развитие иммунобиотехнологии в направлении повышения чувствительности и специфичности иммуноанализа заболеваний инфекционной и неинфекционной природы.

К важнейшим отраслям биоиндустрии следует отнести некоторые отрасли пищевой промышленности (широкомасштабное выращивание дрожжей, водорослей и бактерий для получения белков, аминокислот, витаминов, ферментов); сельское хозяйство (клонирование и селекция сортов растений, производство биоинсектицидов, выведение трансгенных животных и растений); фармацевтическую промышленность (разработка вакцин, синтез гормонов, антибиотиков, интерферонов, новых лекарственных препаратов); экологию – защита окружающей среды и устранение загрязнений (очистка сточных вод, переработка хозяйственных отходов, изготовление компоста).

Биотехнология призвана не только совершенствовать традиционные методы, широко используемые в пищевой промышленности при производстве молочнокислых продуктов, сыра, пищевых кислот, алкогольных напитков, но и создавать современные технологии для синтеза полимеров, искусственных приправ, сырья (текстильная промышленность), для получения метанола, этанола, биогаза и водорода, для извлечения некоторых металлов из руд.

## **1.2. ПРЕИМУЩЕСТВА И ОСОБЕННОСТИ ПРОИЗВОДСТВА, ТРЕБОВАНИЯ К ПРОДУЦЕНТАМ**

*Применение микроорганизмов и их перспективы в промышленности. –  
Преимущества и недостатки организации биотехнологических  
производств. – Продукты биотехнологий. – Продуценты,  
их характеристика и селекция.*

Современная биотехнология родилась на стыке нескольких наук. Она опирается на теоретические и методические положения микробиологии, биохимии, генетики, молекулярной биологии, а также использует достижения органической, неорганической и аналитической химии, процессы и аппараты химической и пищевой промышленности.

Быстрыми темпами развиваются такие отрасли, как современные биологические методы защиты культурных растений, биоэнергетика и биodeградируемые полимеры, а также природоохранные биотехнологии.

Ведутся научные работы по созданию новых биополимеров, в будущем они могут заменить популярные ныне пластмассы. Биополимеры имеют большое преимущество в сравнении с пластмассами, так как они нетоксичны и могут разлагаться после применения, не загрязняя при этом окружающее пространство. Конструирование необходимых генов даст возможность управлять жизнедеятельностью не только растений, но и животных, создавать новые организмы с иными свойствами.

Посредством биотехнологий получают новые средства для диагностики, вакцины, продукты питания, лекарства. Биотехнология позволяет интенсифицировать отрасли сельского хозяйства, повышать урожайность злаковых культур, что более чем актуально, принимая во внимание рост численности населения нашей планеты.

В странах, где значительные объемы биомассы не используются полностью, в обозримом будущем есть перспективы их комплексной переработки в ценные продукты или в биологические виды топлива.

Биотехнология все больше перестает быть прикладной наукой, она активно входит в обычную жизнь людей, помогая решать насущные проблемы современного человечества.

В настоящее время достижения биотехнологии перспективны в следующих *отраслях*:

– в промышленности (пищевая, фармацевтическая, химическая, нефтегазовая) – использование биосинтеза и биотрансформации новых веществ на основе сконструированных методами генной инженерии штаммов бактерий и дрожжей с заданными свойствами на основе микробиологического синтеза;

– в экологии – повышение эффективности экологизированной защиты растений, разработка экологически безопасных технологий очистки сточных вод, утилизация отходов агропромышленного комплекса, конструирование экосистем;

– в энергетике – применение новых источников биоэнергии, полученных на основе микробиологического синтеза и моделированных фотосинтетических процессов, биоконверсии биомассы в биогаз. Ископаемое топливо (хотя и добываемое в настоящее время с большим избытком) и другие невозполняемые ресурсы вскоре станут крайне ограниченными, что заставляет искать новые, более дешевые и лучше сохраняемые источники энергии и питания, которые могли бы восполняться биотехнологическим путем;

– в сельском хозяйстве – разработка в области растениеводства трансгенных агрокультур, биологических средств защиты растений,

бактериальных удобрений, микробиологических методов рекультивации почв; в области животноводства – создание эффективных кормовых препаратов из растительной, микробной биомассы и отходов сельского хозяйства, репродукция животных на основе эмбриогенетических методов;

– в медицине – разработка медицинских биопрепаратов, моноклональных антител, диагностикумов, вакцин, развитие иммунобиотехнологии в направлении повышения чувствительности и специфичности иммуноанализа заболеваний инфекционной и неинфекционной природы.

Условно можно выделить несколько направлений полезной для человека *деятельности микроорганизмов*:

наращивание клеточной массы, которая представляет собой продукт (получение кормовых и пекарских дрожжей, микопротеина, производство белково-витаминного концентрата, вакцин);

производство продуктов микробного биосинтеза, к числу которых относятся антибиотики, гормоны, ферменты, аминокислоты, витамины, красители, ароматизаторы, органические кислоты и др.;

биотрансформация – процесс, в результате которого под воздействием биохимической деятельности микроорганизмов или их ферментов происходит изменение химического состава исходного вещества (получение стероидных гормонов);

процессы *in situ* – очистка окружающей среды от загрязняющих ее веществ (очистка воды, переработка твердых и жидких отходов, нейтрализация химических стоков и газовых выбросов и т. д.);

производство энергоносителей (биогаза, биоэтанола, биобутанола);  
выщелачивание, то есть перевод в растворенное состояние некоторых веществ, находящихся в твердых телах (выщелачивание из руд ценных металлов – меди, цинка, урана и др.).

По сравнению с химическими технологиями биотехнологии имеют следующие основные *преимущества*:

Низкая энергоемкость. Биотехнологические процессы совершаются при нормальном давлении и температурах 20–40 °С.

Использовании стандартного однотипного оборудования. Однотипные аппараты применяются для производства разных продуктов: аминокислот, витаминов; ферментов, антибиотиков.

Возможность создания безотходных производств. Микроорганизмы усваивают самые разнообразные субстраты, поэтому отходы одного какого-то производства можно превращать в ценные продукты с помощью микроорганизмов в ходе другого производства.

Безотходность биотехнологических производств делает их экологически наиболее чистыми. Экологическая целесообразность определяется возможностью ликвидации с их помощью биологических отходов – побочных продуктов пищевой, деревообрабатывающей, целлюлозно-бумажной промышленности, в сельском и городском хозяйствах.

Исследования в области биотехнологических производств не требуют крупных капитальных вложений, для их проведения не нужна дорогостоящая аппаратура.

Возможность получения специфичных и уникальных природных веществ, часть из которых (белки, ДНК) еще не удастся получить путем химического синтеза.

Высокая скорость роста микроорганизмов, во много раз превышающая скорость роста животных и растений.

Но вместе с тем биологические способы в сравнении с химическими методами обладают рядом явных *недостатков*:

Биологические системы могут легко быть загрязнены посторонней нежелательной микрофлорой.

Целевой продукт, синтезируемый биологическим способом, присутствует в довольно сложной смеси, что обуславливает необходимость отделения его от примеси ненужных веществ.

Биотехнологические производства требуют больших количеств воды, которую в итоге необходимо удалять, сбрасывая в окружающую среду.

Биопроцессы обычно идут медленнее в сравнении со стандартными химическими процессами.

Исследования на этапах отбора продуцентов с нужными свойствами и создание коллекций микроорганизмов с полностью изученными свойствами достаточно длительны и требуют высококвалифицированных кадров и хорошо оснащенной лаборатории.

**Для промышленного использования важен отбор ограниченного числа оптимизированных штаммов.**

Из всего многообразия известных видов бактерий в промышленности используется относительно небольшое их число. Все важнейшие бактерии-продуценты относятся к хемоорганотрофам, т. е. используют в качестве источника энергии и углерода органические вещества.

**Продуценты и их селекция.** Любое микробиологическое производство можно представить в виде последовательно выполняемых технологических этапов.

Подготовительная работа проводится в лабораторных условиях, где в зависимости от цели использования производят отбор (или создание) наиболее эффективных штаммов микроорганизмов. Благодаря большому разнообразию синтезируемых ферментов микроорганизмы могут выполнять многие химические процессы более эффективно и экономично, чем если бы эти процессы проводились химическими методами.

Изучение биохимической деятельности микроорганизмов позволило подобрать условия для максимальной активности их как продуцентов различных полезных ферментов – возбудителей нужных химических реакций и процессов. Микроорганизмы все шире применяются в различных отраслях химической и пищевой промышленности, сельском хозяйстве, медицине.

Микроорганизмы, применяемые в микробиологической промышленности, принадлежат к разным таксономическим группам: бактерии, дрожжи, микромицеты, актиномицеты. Всего известно более 100 000 видов генетически однородных микроорганизмов, из них в промышленности используют около 100 (в один вид может входить несколько десятков штаммов).

**Прокариоты** – низшие протисты. К ним относят бактерии и синезелёные водоросли. По строению клетки они резко отличаются от всех живых организмов. Не имеют дифференцированного ядра, ДНК лежит свободно, погруженная в цитоплазму. Деление цитоплазмы на отсеки с помощью эндоплазматической сети выражено слабо. Митохондрии и хлоропласты отсутствуют. Размножаются делением надвое.

**Размеры бактерий** измеряются в микрометрах (мкм). Микрометр –  $10^{-6}$  метра, нанометр (нм)  $10^{-9}$ . В нанометрах выражают размеры компонентов бактерий.

Внешняя форма бактерий относительно однообразна (прил. 4). Наиболее часто встречаются шаровидные, палочковидные и извитые формы. В объеме одной капли воды может поместиться несколько сот миллионов микробов.

**Кокковидные бактерии (кокки)** – шаровидные клетки размером 0,5...1,0–2 мкм, имеют форму правильного шара или овала. Иногда встречаются кокки плоские, односторонне вогнутые или несколько вытянутые. В зависимости от взаимного расположения делятся на микрококки, диплококки, стрептококки, тетракокки, сарцины и стафилококки.

**Палочковидные бактерии (палочки)** различаются по размерам, форме концов клетки и взаимному расположению клеток. Бактерии –

палочковидные формы, не образующие споры (пишут *Bact*, например, *Bact.*, *aceti.*). Длина клеток варьирует от 1,0 до 8,0 мкм, толщина – от 0,5 до 2,0 мкм. Палочки могут иметь правильную (кишечная палочка и др.) и неправильную (коринебактерии и др.) форму, в том числе могут быть ветвящиеся, например актиномицеты. Палочковидные, или цилиндрические, формы принято делить на бактерии и бациллы.

*Бациллы* – палочковидные формы, образующие споры (пишут *Bac.*, например *Bac. subtilis*). Бактерии и бациллы бывают разными по форме и размерам. Концы палочек чаще закруглены, но могут быть срезаны под прямым углом (возбудитель сибирской язвы), иногда сужены.

Среди палочковидных форм, образующих споры, различают бациллы и клостридии. Бациллы, за исключением *Bac. anthracis*, подвижны. Бациллы – аэробы. У бацилл споры не превышают толщины вегетативной клетки.

*Клостридии* – анаэробы, споры толще вегетативной клетки. Такие формы напоминают веретено, ракетку, лимон, барабанную палочку.

*Извитые формы* микробов определяют не только по длине и диаметру, но и по количеству завитков. Слегка изогнутые палочки называются *вibriонами* (холерный вибрион). Вибрионы по форме напоминают запятую, изгиб их клетки не превышает половины окружности. *Спириллы* – извитые формы, до 3–5 завитков. Они могут передвигаться с помощью жгутиков.

*Ветвящиеся формы*, или переходные от бактерий к грибам, – актиномицеты. Палочковидные толстостенные бактерии, способные к ветвлению, имеют лучевую симметрию, образуют на твердых средах субстратный и воздушный мицелий, на котором образуются споры. В старых культурах распадаются на палочки и кокки.

**Эукариоты** – высшие микроорганизмы, или протисты. Клетки сходны по строению с растительными и животными клетками. К эукариотам относят водоросли, грибы и простейших. В клетках эукариотов имеется дифференцированное ядро, ограниченное от цитоплазмы ядерной мембраной. Внутри ядра находится набор хромосом, которые, удваиваясь в процессе деления – митоза, передаются дочерним клеткам. В цитоплазме эукариотов имеется развитая эндоплазматическая сеть, происходящая из цитоплазматической мембраны, а также митохондрии и пластиды.

**Грибы** – микромицеты (плесени) и макромицеты (имеющие плодовые тела) – это обширная группа (около 200 тыс. видов) микро-

организмов, которые отличаются большим разнообразием морфологических форм. Растут преимущественно в аэробных условиях. Большинство грибов живут свободно в почве или воде и получают энергию в результате дыхания.

Тело большинства грибов представляет собой вегетативную структуру – мицелий или грибницу. Мицелий состоит из многоядерной массы цитоплазмы, наполняющей разветвленную систему жестких трубочек (гифы) примерно одинаковой толщины. Гифы выполняют функцию защитной структуры подобно клеточной стенке одноклеточных организмов. Обычно мицелий образуется путем прорастания и разрастания одной репродуктивной клетки – споры.

При прорастании грибная спора дает длинную гифу, которая, удлиняясь, многократно ветвится и образует систему нитей – мицелий. Рост грибов апикальный – происходит только за счет кончиков гиф; по мере разрастания мицелия цитоплазма в старых центральных участках может исчезать. Размеры единичного мицелия не ограничены: периферийный рост путем удлинения гиф может продолжаться до тех пор, пока хватает питательных веществ в субстрате, у некоторых форм может занимать до 15 м в диаметре. У большинства грибов нет специальных приспособлений для питания, они всасывают питательные вещества всем телом – это осмотрофный тип питания.

**Дрожжи** – грибные организмы, находящиеся в одноклеточной форме в ростовой фазе и размножающиеся почкованием или делением. Они являются одноклеточными неподвижными организмами, широко распространенными в природе; встречаются в почве, на растениях, в разнообразных субстратах, содержащих сахар. Широкое использование дрожжей в промышленности основано на их способности вызывать спиртовое брожение – превращение сахара в этиловый спирт и углекислый газ. С другой стороны, развитие дрожжей в пищевых продуктах вызывает их порчу (вспучивание, изменение запаха и вкуса).

Дрожжи в сравнении с любыми другими микроорганизмами играют наиболее значительную роль в пищевой промышленности и других отраслях народного хозяйства. С давних времен дрожжи используют в заквасках для получения хлеба и кисломолочных продуктов, при изготовлении пива и вина, сидра, виноградных и ягодных вин, спирта и крепких напитков. Некоторые дрожжи являются патогенными формами для насекомых, теплокровных животных и человека и могут быть возбудителями тяжелых заболеваний.

Под дрожжами в настоящее время понимают все грибные организмы, находящиеся в одноклеточной форме в ростовой фазе и размножающиеся почкованием или делением

**Штамм (разновидность)** – культура микроорганизма, наследственная однородность которой поддерживается отбором по специфическим фенотипическим признакам, не связанным с его геномом.

Штамм – «продуцент», биологический объект, предназначенный для осуществления биотехнологического производства, его природа и физиолого-биохимические свойства определяют все другие качественные характеристики процесса.

Промышленный штамм должен соответствовать многим требованиям:

- расти на дешевых и доступных субстратах;
- иметь высокую эффективность (сверхпродуктивность при экономичном потреблении субстрата);
- быть генетически однородным, то есть стабильным в отношении продуктивности и питательных потребностей;
- быть устойчивым к фагам и посторонней микрофлоре;
- быть безвредным для людей и окружающей среды.

Природные штаммы микроорганизмов, как правило, не обладают способностью выделять и накапливать в питательной среде достаточное количество нужного продукта. Синтез большинства метаболитов ограничен и рассчитан на потребности самой клетки.

Природные штаммы некоторых групп микроорганизмов, таких как микромикеты, актиномицеты, бациллы, способны выделять в окружающую среду лишь сравнительно небольшие количества антибиотиков, токсинов или гидролитических ферментов.

В связи с этим необходимо усиление природной способности микроорганизма продуцировать определенное вещество (антибиотик, фермент, токсин и др.) или создание нового продуцента из штамма дикого типа, способного синтезировать вещество, но не способного его продуцировать. Эти задачи решаются с помощью методов селекции, например, получением у природных штаммов наследственных изменений (мутаций), приводящих к усилению природной способности микроорганизмов синтезировать и продуцировать определенное вещество,

Таким образом, в промышленности применяют три вида штаммов:

- 1) природные штаммы, улучшенные естественным или искусственным способом (продуценты органических кислот, спиртов, антибактериальных веществ);

- 2) штаммы, измененные в результате направленных мутаций;
- 3) штаммы культур, полученных методами генной инженерии.

**Принципы селекции микроорганизмов.** В отличие от селекции культурных растений и домашних животных, имеющей тысячелетнюю историю и богатый опыт, селекция микроорганизмов началась относительно недавно и развивалась параллельно с научными достижениями генетики.

Основными задачами селекции микроорганизмов является отбор микроорганизмов с необычными для диких типов свойствами. В основе этого лежит увеличение эффективности синтеза вещества, свойственного для данного вида микроорганизмов, либо создание микроорганизмов, способных к синтезу веществ, не свойственных данному виду или даже всему микробному миру.

На первом этапе проводится выбор подходящего микроорганизма или его выделение из естественных мест обитания в чистую культуру, для селекции обычно используются уже известные промышленные продуценты или микроорганизмы, выделенные из природных субстратов. В первую очередь рассматриваются микроорганизмы, способные продуцировать нужное вещество в ограниченных количествах или обладающие определенными качествами, облегчающими работу с ними. Они подвергаются многократному пересеву для получения изолированных колоний и отбора клонов с наиболее высоким уровнем продукции.

Отобранные клоны используют для получения микроорганизмов с новыми, заданными признаками. В основе появления новых признаков лежит *направленный мутагенез* (то есть получение мутантов и последующий отбор организмов с полезными свойствами), а также использование методов генной инженерии, введение фрагментов ДНК, кодирующих нужные признаки, в микробную клетку.

Процесс селекции наиболее эффективных продуцентов значительно ускоряется при использовании метода *индуцированного мутагенеза*.

Разнообразные типы мутаций получают с помощью различных физических и химических мутагенных факторов. К физическим факторам относятся ультрафиолетовое излучение, ионизирующая радиация; к химическим – алкилирующие агенты (алкилметансульфонаты, алкилсульфаты и др.). Среди выживших после обработки мутагеном клеток исходного штамма микроорганизма проводят отбор мутантов с нужными свойствами.

В качестве мутагенных воздействий применяются ультрафиолет, рентгеновское и гамма-излучения, определенные химические вещества и др. Однако и этот прием также не лишен недостатков, главным из которых является его трудоемкость и отсутствие сведений о характере изменений, поскольку экспериментатор ведет отбор по конечному результату.

Выделенные из природы штаммы микроорганизмов используются, за исключением пищевой промышленности, лишь в нескольких промышленных технологиях. В остальных случаях применяются оптимизированные штаммы, получение которых составляет важную часть разработки технологии микробиологического синтеза. Оптимизация штаммов позволяет понизить стоимость производства благодаря повышению их продуктивности, приобретению способности к росту на дешевых субстратах или более специфических свойств.

Наиболее эффективный современный метод получения штаммов с желаемым генотипом состоит в том, что в микробные клетки вводят определенные гены, полученные с использованием технологии рекомбинантной ДНК. Такие способы получили название *генной инженерии*.

Введение гетерологичных генов и регуляторных элементов позволяет конструировать новые пути метаболизма с выгодными для производства характеристиками. Стало возможным добиться того, что бактериальная клетка синтезирует нужный белок, кодируемый чужим для нее геном, в больших количествах. Так получают сейчас интерферон и инсулин, гормоны. Такой подход к оптимизации клеточной активности – изменение ферментативных, транспортных и регуляторных свойств бактерий с использованием технологии рекомбинантной ДНК – получил название *метаболическая инженерия*.

В связи с этим развивается промышленная микробиология, ведется интенсивная селекция новых штаммов микроорганизмов с повышенной продуктивностью веществ, необходимых человеку. Такие штаммы имеют большое значение для производства кормового белка, отдельных аминокислот, ферментных и витаминных препаратов, используемых в пищевой промышленности, медицине, животноводстве.

К особо перспективным относится использование микроорганизмов в металлургии, где биотехнология металлов основана на способности бактерий окислять минералы и переводить металлы в растворимые соединения, причем стоимость ее в 2–3 раза ниже, чем стоимость традиционных методов. Биотехнология также позволяет широко использовать бедные или сложные по составу руды. С помо-

щью бактерий извлекают из руды уран, золото и серебро, удаляют такую вредную примесь, как мышьяк.

Биологические процессы осуществляются в живом организме (*in vivo*), искусственных условиях (*in vitro*), в природных условиях (*in situ*).

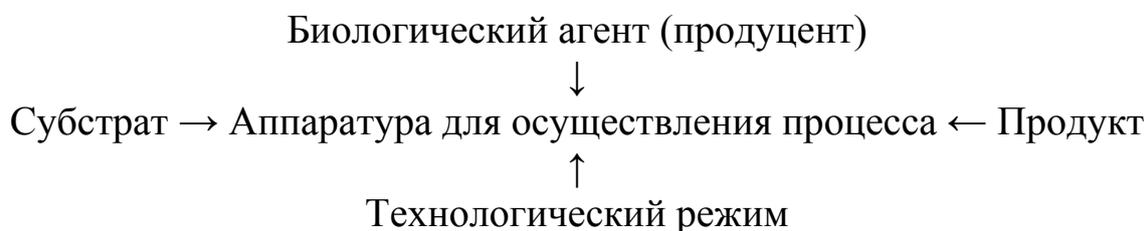
### 1.3. СТАДИИ ПРОИЗВОДСТВА ПРОДУКТОВ БИОТЕХНОЛОГИИ

*Задачи и компоненты технологического процесса. – Получение инокулята (лабораторный и производственный этап). – Подготовка питательной среды. – Методы культивирования (ферментации). – Выделение конечного продукта из биомассы. – Контроль производства*

Важнейшей задачей любого биотехнологического процесса является разработка и оптимизация научно обоснованной технологии и аппаратуры для ее применения. При организации биотехнологических производств частично был заимствован опыт развитой к тому времени химической технологии.

Основными признаками процессов с участием микроорганизмов являются следующие: чувствительность продуцентов к физико-механическим воздействиям; наличие межфазового переноса веществ (по типу «жидкость – клетки», «газ – жидкость – клетки»); требования условий асептики (отсутствия посторонней микрофлоры); нестабильность целевых продуктов; пенообразование; сложность механизмов регуляции роста и биосинтеза.

Компонентами биологического процесса являются: биологический агент, субстрат, целевой продукт, аппаратура и совместимость методов для управления процессом:



Любой биотехнологический процесс (лабораторный или промышленный) реализуют условно в три основных этапа.

Первый из них – подготовительный (предферментация), когда необходимо выполнить все подготовительные работы: подготовка

и стерилизация питательных сред (субстрата для культивирования микроорганизмов-продуцентов), наработка (накопление) используемого продуцента, стерилизация и подготовка основного оборудования (реактора-ферментера, трубопроводов).

Второй этап – основной (ферментация) – включает в себя стадию культивирования, т. е. размножения клеток микроорганизма продуцента за счет использования компонентов субстрата, и накопления (наработки) целевого продукта. Все условия в ферментере должны быть оптимальными для размножения культуры, и они относятся к режимным параметрам культивирования: доступность воды и субстрата, температура, аэрация (растворенный кислород), кислотность среды, отсутствие посторонней микрофлоры. Если продукт синтезируется продуцентом и необходим самой культуре в обмене веществ – это первичный метаболит, если продукт образуется по окончании роста – это вторичный метаболит, он не нужен для деятельности клетки и образуется ею на этапе выживания.

На третьем этапе – постферментационном – осуществляется выделение и очистка целевого продукта. В зависимости от локализации, назначения и химических свойств продукта, требований к степени его очистки подбираются специфические методы выделения и очистки.

Существуют два основных подхода к интенсификации биотехнологических процессов: внедрение новых высокопродуктивных биологических объектов (продуцентов) и применение эффективных технологических приемов для оптимизации условий их жизнедеятельности и накопления целевого продукта.

Это достигается подбором подходящего сырья (субстрата для выращивания продуцента), разработкой наилучшей конструкции биореактора (ферментера), оптимизацией условий культивирования продуцента, обеспечением эффективного контроля за самим технологическим процессом и усовершенствованием способов выделения, очистки и стабилизации целевого продукта.

**Получение посевного материала.** Для получения посевного материала используют исходную культуру штамма-продуцента. Поддержание чистой культуры – главная задача любого микробиологического производства. Перед введением в производственный процесс культура проходит несколько стадий выращивания на жидкой среде и в посевных аппаратах (масштабирование), что постепенно обеспечивает необходимый объем и качество посевного материала.

**Подготовка питательной среды.** Микроорганизмы способны использовать любое органическое соединение, поэтому потенциаль-

ными ресурсами для микробиологической биотехнологии могут служить все органические вещества. Основными компонентами питательных сред являются источники углерода и азота как главных биогенов клетки.

**Выращивание (ферментация)**, или производственное культивирование, составляет основную и самую длительную стадию технологического процесса. На этой стадии идет микробиологическое ферментативное превращение компонентов питательной среды и образование целевого продукта – биомассы или метаболитов.

Процесс осуществляется в ферментерах (прил. 5). Ферментер представляет собой цилиндрическую емкость из нержавеющей стали со сферической крышкой. Аппарат снабжен термостатирующим, перемешивающим, аэрирующим и регулирующим pH среды устройствами, оборудован системой подачи среды, воды, пара и т. д. Основное требование, предъявляемое к ферментеру, – сохранение стерильности при интенсивной аэрации питательной среды. Производственное культивирование проводят в абиотических условиях. В ферментер со стерильной питательной средой вводят биомассу засевной культуры (инокулят). Стадия производственного культивирования для большинства микроорганизмов составляет от 40 до 72 часов. Некоторые актиномицеты и микроскопические грибы культивируют до 12 суток. В процессе культивирования ведется контроль за состоянием культуры и накоплением продуктов синтеза, контроль состава среды, pH.

**Методы культивирования.** Для выращивания микроорганизмов применяют поверхностный и глубинный методы. Поверхностный метод применим только для аэробных культур, причем их можно выращивать как на твердых и сыпучих питательных средах, так и на поверхности тонкого слоя жидкой среды. Глубинный метод выращивания микроорганизмов может быть периодическим и непрерывным (проточным).

При периодическом процессе изменяется скорость роста, физиолого-биохимические и морфологические показатели культуры. Микробные клетки при этом претерпевают значительные изменения в течение всего периода роста, обусловленные непрерывным изменением окружающей среды.

Непрерывный процесс поддерживает культуру микроорганизмов в динамическом равновесии, он может быть гомогенным и гетерогенным.

Метод проточного культивирования может быть организован как процесс полного вытеснения (без перемешивания для анаэробных клеток) и как процесс полного смешения (для аэробов).

В первом случае сосуд для выращивания микроорганизмов представляет собой трубку, в которую подаются питательная среда и посевной материал, клетки которого находятся в начале своего развития. По ходу трубки происходит размножение и развитие культуры, на выходе она находится в стационарной фазе (то есть кривая роста реализуется не во времени, а в пространстве).

В процессе полного смешения рост культуры происходит в емкости ферментера в режиме интенсивного перемешивания и аэрации, размножение происходит во всем объеме питательной среды.

**Выделение и очистка конечного продукта** из культуральной жидкости (КЖ). Это сложная многофазная система, содержащая микробные клетки (или мицелий), продукты биосинтеза и остатки питательной среды. Набор стадий и выбор конкретного способа зависит от природы выделяемого продукта, его стабильности и требуемой чистоты.

Для большинства процессов стадия начинается с разделения двух фаз: твердой – биомассы и жидкой – раствора метаболитов, так как конечный продукт может находиться либо в растворе, либо в микробной массе.

Выделение конечного продукта из биомассы. Для отделения микробной массы применяют фильтр-прессы, сепараторы, вакуум-фильтры, центрифуги различной производительности. Биомасса для извлечения внутриклеточных биополимеров – белков, нуклеиновых кислот, ферментов, липидов – подвергается дезинтеграции (разрушению) клеточных оболочек несколькими способами.

*Химический способ* основан на разрушении клеточной стенки микроорганизмов, в результате чего увеличивается ее проницаемость, и биополимеры с большой молекулярной массой выходят из клетки. Наиболее широко применяют методы обработки клеточной суспензии щелочью, мочевиной, глицерином, аммиаком, перекисью водорода.

*Биологический способ* – это наиболее мягкий способ разрушения клеточной оболочки и выделения внутриклеточных метаболитов. Ведется разрушение клеток под действием внутриклеточных гидролитических ферментов (автолиз). Либо обработкой внесенными гидролитическими ферментами разрушают клеточные стенки микроорганизмов. В результате получают смесь продуктов гидролиза: аминокислоты, пептиды, полипептиды и др.

*Физический способ.* К наиболее известным способам физической дезинтеграции биологического материала относятся: замораживание-оттаивание, ультразвуковое воздействие, растирание клеток и др.

Для выделения метаболитов из среды применяют экстракционные и ионообменные методы, включающие большое количество стадий, фильтрацию, концентрирование полученных растворов, экстрагирование целевого продукта, кристаллизацию и т. д.

### **Контрольные вопросы и задания для самоконтроля**

1. Приведите сведения по истории развития и направления биотехнологии.
2. В чем отличия биологических и химических процессов?
3. Какие преимущества и недостатки биотехнологий вы можете назвать?
4. Какие науки и научные направления связаны с биотехнологией?
5. Охарактеризуйте научные основы и перспективы биотехнологий.
6. Какую роль играет генная инженерия в современных условиях развития?
7. Охарактеризуйте промышленные штаммы, селекцию и требования к ним.
8. Какую роль играют микроорганизмы в природе, жизни человека и биотехнологиях?
9. Какие значения имеют продуценты, редуценты в природе и биотехнологиях?
10. Какие методы получения и совершенствования продуцентов вам известны?
11. Дайте общую характеристику микроорганизмов: бактерии, грибы, дрожжи, водоросли.
12. Приведите общую характеристику производственного БТ-процесса.
13. Охарактеризуйте методы культивирования. Дайте их классификацию.
14. Охарактеризуйте отделения (чистой культуры, питательных сред, ферментации, разделения и сгущения биомассы, плазмолиза и сушки, упаковки) для биотехнологического производства.
15. Перечислите методы разделения суспензий и дезинтеграции клеток.
16. С помощью каких методов осуществляется выделение, концентрирование и очистка продуктов?

## 2. УПРАВЛЯЕМЫЙ БИОСИНТЕЗ В РЕШЕНИИ ПРОБЛЕМ НАСЕЛЕНИЯ

### 2.1. СЫРЬЕ И КОНТРОЛЬ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

*Источники элементов в питательных средах. – Технология получения питательных сред. – Контроль и управление процессом. – Параметры управляемого культивирования.*

Используемые в биотехнологии субстраты разнообразны, и их спектр непрерывно расширяется. С развитием промышленных процессов происходит накопление новых видов отходов, которые могут быть обезврежены и превращены в полезные продукты методами биотехнологии, что является безусловным преимуществом этих производств.

В настоящее время наблюдается рост интереса биотехнологов к природным возобновляемым ресурсам: многолетние быстрорастущие растения, одноклеточные фотосинтезирующие водоросли, растения с измененной структурой клеточной стенки, сельскохозяйственные и муниципальные отходы, синтез-газ, в который путем пиролиза может быть конвертирована любая биомасса.

В состав сред для биотехнологических процессов входят источники углерода и энергии, а также минеральные элементы и ростовые факторы.

Углеводы используются клетками для синтеза собственных веществ и одновременно служат источником энергии. Для промышленного синтеза наиболее часто применяют глюкозу или крахмал, возможно использование органических кислот и спиртов. В качестве источников органического азота могут служить белки, пептиды, свободные аминокислоты. В промышленных средах обычно используют кукурузный экстракт, соевую муку или гидролизат дрожжей. Из минеральных азотсодержащих веществ наиболее часто применяют аммонийные соли серной, соляной или азотной кислот.

Наиболее распространенными источниками углерода как основного биогена и источника питания и энергии при культивировании микроорганизмов являются углеводы, спирты, органические кислоты, углеводороды. Часто используют технические виды углеродсодержащего сырья:

мелассу (остаток после кристаллизации сахара);  
соки растений;

патоку (продукт неполной ферментации крахмала);  
сульфитный щелок (отход варки в производстве целлюлозы);  
барду (образуется после отгонки спирта из бражки);  
гидролизаты (ферментативные или кислотные) растительных полисахаридов и древесины.

Все эти технические источники углерода чаще всего представляют сложные многокомпонентные смеси различных веществ и служат источником не только углерода, но и других (необходимых для роста культуры микроорганизмов) химических элементов.

**Макроэлементы.** На первом месте стоит азот как второй по значению биоген, и потребность в нем у биологических объектов на порядок выше, чем в других элементах (фосфор, сера, калий и др.). Сера входит в некоторые аминокислоты, фосфор – в АТФ и нуклеиновые кислоты, фосфолипиды мембран, калий участвует в осмотическом регулировании и работе мембран.

Азот необходим микроорганизмам для обеспечения синтеза нуклеиновых кислот, белков и полимеров клеточной стенки. Источники азота могут быть простыми (аммиак и соли аммония, мочевины) и сложными (кукурузный экстракт – продукт замачивания зерен кукурузы в производстве крахмала, соевая мука, рыбная мука, дрожжевой экстракт и др.). Сложные источники азота лучше усваиваются микроорганизмами, но наличие в них сложных примесей затрудняет дальнейшие стадии технологического процесса и повышает количество отходов, что отрицательно сказывается на экономических показателях технологии.

Для нормального роста и развития помимо основных источников углерода, азота и минеральных веществ необходимы витамины и микроэлементы. Поэтому в качестве добавки часто используются продукты естественного происхождения, например кукурузный и дрожжевой экстракты, молочная сыворотка, бульоны.

Микроэлементы необходимы клеткам для синтеза сложных молекул, но потребности в них невелики, концентрация составляет  $10^{-6} \dots 10^{-8}$  М, поэтому их специально не вносят в среду, так как их примеси в основных солях и воде обеспечивают потребности продуцентов.

Отдельные продуценты нуждаются для роста в наличии в среде ростовых факторов (аминокислот, витаминов и пр.). Помимо чистых индивидуальных веществ такой природы на практике часто используют в качестве ростовых добавок кукурузный или дрожжевой

экстракт, картофельный сок, экстракт проростков ячменя, зерновых отходов и отходов молочной промышленности. Добавление ростовых факторов способно увеличить выход целевого продукта в десятки раз.

Все эти компоненты питательной среды называют *биохимическими факторами* роста. Существуют также и *биофизические факторы* роста, к которым относят физические условия, обеспечивающие нормальный рост культуры: температура культивирования и интенсивность перемешивания, обеспечивающие необходимый массообмен в культуре (прил. 6).

Поэтому производственная среда – это раствор компонентов с заданными свойствами (рН, температура, концентрация).

Различные продуценты имеют определенный диапазон температур, при которых наиболее эффективно работают их ферменты. Большинство используемых в биотехнологии продуцентов требуют температуры  $\sim 37$  °С (мезофильные микроорганизмы), известны термофильные микроорганизмы, оптимум роста которых находится в диапазоне 70...90 °С, а иногда и выше ( $>100$  °С – экстремальные термофилы).

Перемешивание культуры также является важным фактором роста, потому что микробная клетка для своего развития потребляет питательные вещества, в связи с этим вокруг клетки постепенно образуется пространство с пониженной концентрацией этих веществ, так что возникает перепад (градиент) концентрации питательных веществ.

Со временем этот градиент начинает лимитировать (ограничивать) рост клетки и всей культуры. Наиболее эффективным способом преодоления возникающих проблем является обеспечение эффективного массообмена в культуре, что и достигается путем перемешивания.

Традиционно состав питательной среды, оптимальной для каждого биотехнологического процесса, определяется методом длительного эмпирического подбора, но все шире используется математический метод планирования экспериментов, математическое моделирование биотехнологических процессов, что позволяет обоснованно подходить к конструированию питательных сред, делать их экономичными.

**Технология приготовления питательных сред.** Питательная среда для культивирования микроорганизмов должна удовлетворять

двум основным требованиям: 1) она должна содержать все необходимые для роста компоненты в доступной форме и необходимой концентрации; 2) должна быть стерильной и не должна содержать примесей каких-либо микроорганизмов.

Технология стерилизации питательных сред включает ряд разнообразных приемов. Главным и наиболее традиционным является термическая стерилизация – прогревание среды при высоких температурах, когда большинство микроорганизмов погибают. Обычно среду прогревают до температуры выше 100 °С, для чего нагревание проводят при повышенном давлении 3...5 атм, а при стерилизации больших объемов сред обработку проводят прямо в ферментаторе «острым» паром – струей сильно перегретого пара с температурой 130...140 °С. Для небольших количеств среды используют автоклавы.

*Пастеризация как вариант термической стерилизации.* В случае спорообразующих микроорганизмов термическая стерилизация непригодна, так как споры микроорганизмов обладают исключительно высокой термостабильностью, поэтому используют метод пастеризации, получивший свое название от имени выдающегося ученого второй половины XIX века Луи Пастера – одного из основателей современной микробиологии. Сущность этого метода заключается в том, что среду прогревают при относительно невысокой температуре (~60 °С), затем охлаждают, и цикл повторяют несколько раз. Микроорганизмы (вегетативные формы) при этих условиях погибают, а споры остаются жизнеспособными. После охлаждения стерилизуемой среды до нормальной для роста температуры споры прорастают, и микроорганизмы переходят в стадию вегетативной культуры, после чего повторное прогревание вызывает их гибель.

*Стерилизация фильтрацией.* Часто приходится использовать питательные среды сложного состава, не выдерживающие термической стерилизации. В таких случаях необходимо использовать щадящие методы стерилизации, такие как фильтрация.

Часто в качестве фильтров используют неглазурованные фарфоровые фильтры (свечи Шамберлана), в настоящее время применяют фильтр Беркефельда (из прессованного кизельгура), асбестовые пластины, стеклянные и мембранные фильтры. Современная технология изготовления мембран позволяет создавать мембраны с заданным размером пор.

Другие способы стерилизации включают облучение УФ-светом, рентгеновскими и  $\gamma$ -лучами, химические методы: обработку окисью

этилена, озоном, 0,2%-м Р-пропиолактоном. После выдерживания среды в течение 8 часов микроорганизмы погибают, Р-пропиолактон полностью гидролизуеться, и среда становится пригодной к использованию.

**Контроль и управление процессом.** Эффективное проведение биотехнических процессов тесно связано с совершенствованием *способов контроля и управления*. В последние десятилетия с внедрением управляемых культур биотехнологи переходят от простой задачи поддержания определенных параметров среды к управлению процессом в целом. Для реализации управляемого культивирования необходимо построение алгоритмов контроля и управления, основанных на моделях биотехнологического процесса.

При *экспериментальном моделировании* в лабораторных и промышленных условиях применяются модели объектов процессов, отличающиеся масштабами. Экспериментальное моделирование позволяет исследовать и оптимизировать процессы, сущность которых мало изучена.

На опытных установках отрабатываются все технологические детали будущего процесса, обучается персонал, создается оборудование, уточняются технико-экономические показатели. Затем проводятся крупномасштабные дорогостоящие промышленные эксперименты и испытания. Но этот процесс имеет ряд особенностей: трудоемкость, сложность реализации новой модели, особенно масштабирование.

*Математическое моделирование* устраняет недостатки и позволяет более эффективно решать поставленные задачи. Математические модели представляют собой удобное средство обобщения экспериментальных данных.

*Оптимизация* биотехнологических процессов осуществляется на основе сочетания экспериментального и математического моделирования и применения современных методов оптимизации (динамического и нелинейного программирования, вариационного исчисления).

Контроль качества продукции. Это завершающая стадия любого производства. Контроль производства продуктов микробиологического синтеза включает весь комплекс химических, биохимических и микробиологических анализов и измерений по учету качественных, количественных показателей технологического режима на всех этапах

производства, начиная с определения качества сырья и заканчивая оценкой качества готовой продукции.

В зависимости от назначения продукции (для медицинских целей, промышленности, сельского хозяйства) предъявляются требования к степени ее обсемененности. Так, продукты, реализуемые в медицинской промышленности, должны быть практически свободны от микроорганизмов.

Для сохранения требуемых свойств получаемых продуктов в процессе их хранения, реализации и использования потребителями применяют различного рода физико-химические воздействия с целью повышения их стабильности. Проводится обязательная стандартизация конечного продукта, то есть продукт должен отвечать как определенным требованиям государственного стандарта России, так и международных стандартов.

Производственные лаборатории на предприятиях размещают в специально оборудованном помещении с изолированным входом, вблизи обслуживаемых цехов. Микробиологическая лаборатория (или микробиологическое подразделение производственной лаборатории) предназначена осуществлять санитарно-микробиологический контроль сырья, вспомогательных материалов, готовой продукции, санитарно-гигиенического состояния производственных помещений, технологического оборудования, инвентаря, тары, рук, санитарной одежды работающих

Она состоит из изолированного помещения с установленными в нем одним-двумя стационарными боксами (каждый с предбоксником, раздвижными дверями на шарнирах, подвесными бактерицидными лампами, естественным и искусственным освещением), препаративной для подготовки лабораторной посуды и других вспомогательных работ; средоварочной для приготовления, розлива, стерилизации и хранения питательных сред; автоклавной; термостатной; биологической; моечной; помещения для хранения реактивов, посуды, инвентаря, аппаратуры. Основные точки контроля представлены на рис. 1.

Контроль и управление процессом ферментации осуществляется с помощью дозаторов, титраторов, различных блоков управления. Во время производственного процесса снимаются показания температуры ферментации в средней зоне ( $^{\circ}\text{C}$ ), температуры в нижней зоне ферментера ( $^{\circ}\text{C}$ ), расхода воздуха (в  $\text{м}^3/\text{ч}$ ), давления (в МПа), кислотности среды (в единицах рН), уровня культуральной жидкости, охлаждения.



Рис. 1. Схема микробиологического контроля

Управление современными процессами полностью автоматизировано. Параллельно ведется отбор проб для проведения лабораторного контроля состояния культуры и накопления метаболитов.

## 2.2. ПИЩЕВЫЕ БИОТЕХНОЛОГИИ

*Производство кисломолочных продуктов. – Квашение овощей. –  
Получение пищевого уксуса из виноматериалов.*

Получение пищевых продуктов и напитков с помощью различных процессов брожения составляет важнейший сектор пищевой промышленности для производства кисломолочных продуктов, таких как хлеб, сыр, вино, пиво, творог, для обработки мяса и получения уксуса.

Получение молочных продуктов в пищевой промышленности построено на процессах ферментации. Основой биотехнологии молочных продуктов является молоко.

Молоко (секрет молочных желез) – уникальная естественная питательная среда. Она содержит 82...88 % воды и 12...18 % сухого остатка. В состав сухого молочного остатка входят белки (3,0...3,2 %), жиры (3,3...6,0 %), углеводы (молочный сахар лактоза – 4,7 %), соли (0,9...1 %), минорные компоненты (0,01 %): ферменты, иммуноглобулины, лизоцим и т. д. Молочные жиры очень разнообразны по своему составу. Основные белки молока – альбумин, казеин. Благодаря такому составу молоко представляет собой прекрасный субстрат для развития микроорганизмов.

Молочнокислородное брожение, используемое человеком уже в течение тысячелетий, осуществляют бактерии, присутствующие в самом молоке. В настоящее время для приготовления различных кисломолочных продуктов используются стартовые культуры (отобранные штаммы) с более предсказуемыми свойствами и характеристиками.

Все технологические процессы производства продуктов из молока делятся на две части:

– первичная переработка – уничтожение побочной микрофлоры в несколько этапов. Сначала молоко очищают от механических примесей и охлаждают, чтобы замедлить развитие естественной микрофлоры. Затем молоко сепарируют (при производстве сливок) или гомогенизируют. После этого проводят пастеризацию молока, при этом температура поднимается до 80 °С, и оно закачивается в танках или ферментерах;

– вторичная переработка молока может идти двумя путями: с использованием микроорганизмов и с использованием ферментов. С использованием микроорганизмов выпускают кефир, сметану, творог, простоквашу, казеин, сыры, биофруктолакт, биолакт; с ферментами – пищевой гидролизат казеина, сухую молочную смесь для коктейлей и т. д. При внесении микроорганизмов в молоко лактоза гидролизруется до глюкозы и галактозы, глюкоза превращается в молочную кислоту, кислотность молока повышается, и при pH 4...6 казеин коагулирует.

Сбраживание молока, обычно осуществляемое различными видами *Streptococcus* и *Lactobacillus*, и заключается в превращении лактозы в молочную кислоту. Другие реакции используются для образования разнообразных кисломолочных продуктов: твердых и мягких сыров, йогуртов, сметаны, пахты, кефира и пр.

При сбраживании молока образуется несколько кислот: молочная, пропионовая, лимонная, уксусная и масляная. Наиболее важным продуктом любого молочнокислого брожения является молочная

кислота, вызывающая снижение рН, при снижении до изоэлектрической точки белка казеина (рН 4,6) образуется творог – исходный продукт в производстве сыров. Благодаря низкому рН в скисшем молоке не происходит распада белков (протеолиза) и порчи продукта.

**Кисломолочные продукты (молочнокислые продукты)** – вырабатываются из цельного молока путем сквашивания его заквасками (молочнокислыми бактериями или дрожжами), вызывающими брожение. В результате *гомоферментативного* молочнокислого брожения происходит накопление молочной кислоты, продукты имеют достаточно плотный, однородный сгусток и кисломолочный вкус: ряженка, простокваша различных видов, ацидофильное молоко, творог, сметана, йогурт. Смешанное (*гетероферментативное*) молочнокислое и спиртовое брожение используется для напитков типа айран, тан, кефир, кумыс. Они обладают кисломолочным освежающим, слегка щиплющим вкусом, обусловленным присутствием этилового спирта и углекислоты, сгусток легко разбивается при встряхивании, благодаря чему продукты приобретают однородную жидкую консистенцию.

Состав заквасок зависит от конечного продукта (например, для получения ацидофилина используется ацидофильная палочка, для производства простокваши – молочнокислые стрептококки). Виды родов *Streptococcus* и *Lactobacillus* сбраживают лактозу с образованием молочной кислоты, а также продуктов, обладающих специфическим вкусом.

Штаммы должны отвечать определенным требованиям:

- образовывать продукты соответствующей консистенции;
- иметь определенную активность кислотообразования;
- быть устойчивыми к заражению бактериофагом;
- образовывать ароматические вещества;
- сочетаться с другими штаммами без антагонизма;
- обладать бактериостатическим действием по отношению к патогенным микроорганизмам;
- быть устойчивыми к высушиванию.

**Приготовление бактериальных заквасок.** Сначала готовят материнскую (первичную) закваску: 2 л обезжиренного молока пастеризуют, охлаждают (в той же посуде) до 35...45 °С (в зависимости от культуры), после чего вносят в него сухую чистую культуру, содержащуюся в пробирке (флаконе), молоко каждый час перемешивают в течение первых трех часов, после чего оставляют в покое до сквашивания (16–20 часов).

Готовую закваску охлаждают до 8...10 °С и хранят в холодильнике до приготовления вторичной закваски. Материнская закваска должна иметь кислотность 70...80 °Т, чистый вкус и плотную консистенцию. Она непригодна для использования, так как активность культуры невысокая. Вторичную закваску готовят из материнской. В обезжиренное молоко вносят 5 % тщательно перемешанной материнской закваски, предварительно удалив 1–2 см верхнего слоя.

Сквашивание вторичной закваски в термостате длится 8–12 часов. Получается плотный сгусток с приятным вкусом и запахом, имеющий кислотность 70...90 °Т. Из вторичной закваски готовят рабочую, при этом каждый раз новую, чистые культуры готовят в лаборатории бактериальных заквасок. 1 уч. ед. ( $10^{11}$  живых клеток) – количество биомассы бактерий, предназначенных для сквашивания 1 000 кг нормализованного молока.

Резервуарный способ производства осуществляют в следующем порядке: приемка и подготовка сырья, нормализация; очистка, пастеризация, охлаждение смеси; сквашивание и сквашивание смеси; перемешивание и охлаждение молочного сгустка; разлив, упаковка, маркировка; созревание.

Термостатный способ производства отличается на этапе разлива: разлив, упаковка, маркировка; сквашивание смеси; охлаждение молочного сгустка. Заквашенную смесь разливают в емкости при непрерывном перемешивании во избежание оседания закваски и немедленно направляют в термостатную камеру для сквашивания.

**Производство сыров** – одно из старейших бродильных производств. При всем широком разнообразии сортов сыра их производство основано на ряде общих стадий.

Первая стадия – это пастеризация молока и засев в него стартовой культуры. За ней следует стадия створаживания молока, вызванного как его подкислением в результате образования молочной кислоты, так и добавлением свертывающих молочные белки ферментов, например, сычужного фермента реннина, выделяемого из желудка телят. После свертывания молока створоженную массу отделяют от сыворотки, солят и прессуют в формах.

Возникающие попутно другие брожения создают специфические вещества: вторичные реакции ферментации, идущие при созревании сыров, определяют вкус отдельных их сортов. В таких реакциях принимают участие пептиды, аминокислоты и жирные кислоты, находящиеся в молоке. Пропионовокислое брожение используется

в производстве швейцарских сыров; оно придает сыру специфический вкус и вызывает образование характерных «дырок».

---

*Кислотность молока, выраженную в градусах Тернера, определяют при титровании децинормальным раствором едкого натра с индикатором фенолфталеином. Для титрования берут 10 см<sup>3</sup> молока, разбавленного 20 см<sup>3</sup> воды или в 2 раза меньше. Объем щелочи (в см<sup>3</sup>), пошедшей на нейтрализацию кислоты, умножают на 10, то есть производят пересчет на 100 см<sup>3</sup> молока, и получают кислотность молока в градусах Тернера (1 °Т соответствует 9 мг молочной кислоты в 100 см<sup>3</sup> молока).*

Для получения разнообразных сортов сыра используют различные дополнительные процедуры, внесение специфических культур, придающих иные вкусовые качества: споры плесневых грибов или бактерий. Созревание сыров происходит в специальных помещениях с регулируемыми параметрами при анаэробных условиях, создаваемых воздухо непроницаемой оболочкой, различается длительностью, температурой, влажностью и сопровождается гидролизом жиров, белков и других компонентов створоженной массы под действием бактерий и внеклеточных ферментов.

Продукты разложения этих веществ придают сырам их характерный вкус. Созревание сыра может быть ускорено путем добавления ферментов (протеаз и липаз) или мутантных бактерий, продуцирующих большое количество этих ферментов.

Особый вкус пахты и сметаны обусловлен продуктами лимоннокислого брожения и определяется соотношением диацетила, пропионовой и уксусной кислот, а также ряда других компонентов. Свойства конечного продукта зависят от характера и интенсивности реакций ферментации.

Процессы ферментации при производстве многих молочных продуктов, таких как сметана, творог, многие сыры, идут в ферментерах открытого типа, весьма просты и занимают немного времени, доступны для воспроизводства в домашних условиях.

**Квашение, соление овощей** относят к биохимическим методам консервирования. Метод основан на образовании в процессе молочнокислого брожения естественного консерванта – молочной кислоты. Молочная кислота придает продукту специфический вкус и запах, а также препятствует размножению посторонней микрофлоры. Механизм состоит в преобразовании углеводов в молочную кислоту под действием молочнокислых бактерий.

Квашение – способ консервирования овощных продуктов, не требует упаковки продуктов в герметичные ёмкости, проходит в контакте с воздухом. Овощи квасят в рассоле (целиком или кусками) либо в собственном соку (для этого измельчают, шинкуют на машинах, рубят сечками), добавляют поваренную соль, под действием эпифитных (поверхностных) молочнокислых бактерий идёт процесс брожения и квашения.

Соль не является необходимым компонентом, однако она влияет на вкус и задерживает развитие патогенной микрофлоры, для рассола берется обычно в размере 5 % от количества воды, для заквашивания в собственном соку обычно берется в размере 1,5...2 % от веса овощей. Овощи солят и квасят, используя в основном самопроизвольное брожение, в котором участвует вся эпифитная микрофлора овощей. Поэтому при квашении участие принимают не только молочнокислые бактерии, но и дрожжи, маслянокислые и уксуснокислые бактерии.

Квашеные продукты хранятся при температуре от 0 до 2 °С. Коллоиды клеточной ткани под действием соли и кислоты частично разрушаются или необратимо коагулируют, сильно набухая, что приводит к потере клеткой жизненных функций, в результате в ней останавливаются все биохимические процессы гидролитического и окислительного характера, свойственные живой ткани; тормозится жизнедеятельность большинства микроорганизмов (гнилостных бактерий и плесеней), действие которых в обычных условиях приводит к уничтожению овощей. Квашение служит примером микробного природного сбраживания твердого субстрата.

Молочнокислые бактерии, участвующие в процессе, различаются по количеству образующейся в единицу времени кислоты и условиям развития. Одни из них выделяют газы, другие превращают сахар в молочную кислоту без выделения газов; некоторые бактерии вырабатывают ароматические вещества – сложные эфиры.

**Брожение используют при изготовлении мясных продуктов.** Основные мясные продукты, получаемые с использованием брожения, – это сухие и варено-копченые колбасы. В качестве стартовых культур для бродильной ферментации мяса используют молочнокислые бактерии; образование ими молочной кислоты необходимо для получения определенного вкуса и снижения рН. Благодаря подкислению увеличивается сочность продукта и происходит денатурация белков мяса, что необходимо для формирования определенной текстуры колбасы.

Кроме того, кислая реакция препятствует развитию некоторых патогенных бактерий, таких как *Salmonella* и *Staphylococcus aureus*. Добавление стартовой культуры приводит также к снижению уровня гистамина и увеличивает срок хранения продукта. Для обработки мяса часто используют промышленные штаммы *Pediococcus*, образующие в достаточном количестве молочную кислоту. В производстве сухих колбас применяют непатогенный вид *Staphylococcus carnosus*, не образующий коагулазу. Виды *Micrococcus* обладают способностью восстанавливать нитраты до нитритов и подавлять развитие *Clostridium botulinum*.

Технологию ферментации мяса применяют и при изготовлении продуктов, обычно не обрабатываемых с использованием брожения, с целью улучшения их вкусовых свойств, увеличения срока хранения, предотвращения заражения патогенными микроорганизмами и присутствия токсичных веществ. Исследования в этой области направлены на получение быстро образующих кислоту штаммов *Pediococcus* и *Lactobacillus* для сокращения времени ферментации при варьировании температуры в широком диапазоне (20...45 °С).

В производстве сухих колбас важную роль играет применение молочнокислых бактерий, поскольку молочная кислота необходима для придания вкуса этим продуктам и для подавления роста патогенных бактерий.

**Получение пищевого уксуса.** Микробиологический способ экономически оправдан в случае получения пищевого уксуса (окисление этанола ацетобактериями). Производство столового уксуса (9%-й кислоты) составляет в мире 8–10 млн м<sup>3</sup> в год. Один из самых «древних» способов производства уксуса принято называть орлеанским. В деревянные бочки особой формы, расположенные в утепленном помещении в несколько рядов одна над другой, в начале процесса заливают 10–12 л готового нефильтрованного уксуса. Эта порция – своего рода закваска, ведь в нефильтрованном уксусе содержится достаточно большое количество бактерий. К уксусу приливают примерно 10 л профильтрованного вина. Через восемь дней, если процесс идет нормально, доливают еще 10 л, и так до тех пор, пока бочка не заполнится до половины объема. После этого около 40 л готового продукта сливают, а к оставшемуся вновь добавляют фильтрованное вино, и цикл повторяется.

Весь цикл занимает от недели до месяца, зато продукт обладает таким высоким качеством, что этот неэффективный способ до сих пор применяется в винодельческих районах Франции.

С 1732 года существует технология под названием «метод Шуценбаха», в котором спиртосодержащую жидкость пропускают сверху вниз через объем, заполненный тщательно вымоченными в уксусе крупными буковыми стружками. Этот способ более производителен и во всем мире используется до сих пор.

Стерильный раствор спирта в воде на открытом воздухе практически не окисляется, а образование уксусной кислоты происходит благодаря работе уксусных бактерий, для чего в жидкости необходимо создать оптимальные условия для их развития: температуру около 30 °С, концентрацию спирта 3–4 %, доступность кислорода в высокой концентрации. При орлеанском методе бактерии развиваются в основном в верхнем слое жидкости в виде слизистой пленки, а при методе Шуценбаха жидкость стекает тонким слоем по поверхности стружек.

Основным аппаратом, в котором получают уксусную кислоту по методу Шуценбаха, является деревянный чан конической формы. На расстоянии 200–300 мм от основного днища в нем устанавливают горизонтальную перфорированную перегородку. Верхнюю часть аппарата на 2/3 заполняют стружками, которые орошаются питательной для бактерий средой, добавляют 6%-й раствор уксусной кислоты, этиловый спирт (3...4 %) и небольшое количество аммонийных и фосфатных солей. По мере протекания раствора бактерии, иммобилизованные на стружках, окисляют спирт в уксусную кислоту. В нижней части аппарата скапливается готовая продукция – 9%-й уксус. В процессе окисления выделяется теплота, создающая температуру внутри аппарата до 30–35 °С. Воздух поступает в патрубки под ложным днищем, проходит через аппарат и выходит в верхней его части.

Стружки – это не просто отходы от обработки древесины. Для загрузки в аппараты подходят только буковые стружки, закрученные в рулон диаметром от 2 до 5 см и высотой от 3 до 6 см. Производительность аппаратуры при работе по данному способу низка и составляет не более 1,5 кг уксусной кислоты на 1 м<sup>3</sup> стружек в сутки (в пересчете на 100%-ю уксусную кислоту).

Процесс ведется непрерывно, десятилетиями, без смены бактерий и стружки. Высокая кислотность заливаемого в аппарат раствора необходима для того, чтобы другие бактерии не могли «заселить» аппарат и испортить продукт. Производство уксуса ведется без соблюдения стерильности.

В настоящее время производство уксуса ведут циркуляционным способом Фрингса. Эта технология имеет различия в размерах аппа-

ратов: объем их заполненной стружками рабочей камеры достигает 60 м<sup>3</sup>. В такой аппарат через специальную распределительную систему подают 10%-й раствор спирта с высокой скоростью. При помощи насоса раствор многократно циркулирует через аппарат до тех пор, пока весь спирт не окислится и не образуется 9%-й раствор кислоты. Цикл длится 5–6 дней, после чего повторяется.

Водные растворы уксусной кислоты широко используются в пищевой промышленности (пищевая добавка E260) и бытовой кулинарии, а также в консервировании.

### 2.3. ПОЛУЧЕНИЕ ПРЕПАРАТОВ МЕДИЦИНСКОЙ НАПРАВЛЕННОСТИ

*Антибиотики-ингибиторы природного происхождения. –  
Продуценты и получение антибиотиков. – Вакцины, сыворотки,  
витамины, гормоны.*

**Антибиотики** (от *anti* – против, *bios* – жизнь) – самый большой класс фармацевтических соединений природного или полусинтетического происхождения, которые подавляют рост живых клеток. Антибиотики – органические соединения. Они синтезируются живой клеткой и способны в небольших концентрациях замедлить развитие или полностью уничтожить чувствительные к ним виды микроорганизмов.

Их продуцируют не только клетки микроорганизмов и растений, но и клетки животных. Антибиотики растительного происхождения называют фитонцидами. В некоторых случаях природные микробные антибиотические продукты химическим или ферментативным путем могут быть превращены в так называемые полусинтетические антибиотики, обладающие более высокими терапевтическими свойствами.

Исторически первый антибиотик пенициллин впервые выделил английский ученый А. Флеминг из плесневых грибов в *Penicillium notatum*. В 1928 г. он обнаружил, что на агаре одной из чашек Петри с бактериями *Staphylococcus aureus* выросла колония плесневых грибов. Колонии бактерий вокруг них стали прозрачными из-за разрушения клеток. Флемингу удалось выделить активное вещество – пенициллин, которое разрушало бактериальные клетки.

Современное определение термина «антибиотик» дано в 1961 г. М. М. Шемякиным и А. С. Хохловым, которые предложили считать антибиотическими веществами все продукты обмена любых организ-

мов, способные избирательно убивать или подавлять рост и развитие микроорганизмов.

К вторичным метаболитам относятся антибиотики, алкалоиды, гормоны роста растений и токсины. Получение такого рода веществ послужило основой для создания целого ряда отраслей микробиологической промышленности. Первым в этом ряду стало производство пенициллина; микробиологический способ получения пенициллина был разработан в 1940-х годах и заложил фундамент современной промышленной биотехнологии.

*Основное свойство антибиотиков – избирательность и низкие концентрации воздействия*, т. е. он действует не на все микроорганизмы подряд, да это и нежелательно: ведь наряду с болезнетворными будут уничтожаться полезные микробы, которые всегда есть в человеческом организме. Поэтому должен быть набор различных антибиотиков, пригодных для лечения разных болезней.

Но есть и другая сторона: болезнетворные микроорганизмы постепенно «привыкают» к действию антибиотиков. Возникают виды, которые вызывают заболевание, но они нечувствительны к «старому» антибиотику. Такое привыкание происходит не быстро, а в течение 10–15 лет. Но раз это все-таки происходит, ученым необходимо искать все новые и новые антибиотики и продуцирующие их микроорганизмы.

Образование антибиотиков – это наследственно закрепленная особенность метаболизма микроорганизмов, проявляющаяся в том, что каждый вид (или даже штамм) способен продуцировать один или несколько строго специфичных для него антибиотических веществ, что является результатом эволюции данного микроорганизма.

*Специфичность действия* антибиотиков объясняется их высокой биологической активностью в отношении чувствительных к ним организмов даже в очень низких концентрациях; избирательностью действия, т. е. способностью конкретного антибиотика проявлять свое действие в отношении определенных микроорганизмов, не оказывая заметного эффекта на другие ткани и клетки, в отличие от дезинфицирующих веществ.

*Величину биологической активности антибиотиков выражают в условных единицах, содержащихся в 1 мл (ед/мл) или в 1 мг (ед/мг) препарата.*

За единицу антибиотической активности принято минимальное количество антибиотика, способное подавить развитие или задержать рост определенного числа клеток стандартного штамма в тест-микроб единице объема питательной среды.

Так, за единицу активности пенициллина принято минимальное количество препарата, способное задерживать рост золотистого стафилококка (штамм 209) в 50 мл питательного бульона; стрептомицина – минимальное количество антибиотика, задерживающее рост *E. coli* в 1 мл питательного бульона.

Синтез микроорганизмами антибиотиков – одна из форм проявления *антагонизма*, который связан с определенным характером обмена веществ, возникшим и закрепленным в ходе эволюции при переходе продуцента к выживанию при неблагоприятных условиях среды и остановке роста культуры.

Воздействуя на постороннюю микробную клетку, это соединение вызывает нарушения в ее развитии. Антибиотики способны подавлять синтез оболочки бактериальной клетки в период размножения, изменять проницаемость цитоплазматической мембраны или ингибировать реакции обмена веществ.

Молекулы антибиотиков очень разнообразны по составу и механизму действия на микробную клетку. При этом в связи с возникновением устойчивости патогенных микроорганизмов к старым антибиотикам постоянно существует потребность в новых.

Способностью вырабатывать антибиотики обладают не все микроорганизмы, а лишь некоторые штаммы отдельных видов. Так, пенициллин образуют некоторые штаммы *Penicillium notatum* и *P. chrysogenum*, а стрептомицин – определенный штамм *Streptomyces griseus*, тогда как другие штаммы тех же видов либо вообще не вырабатывают антибиотики, либо вырабатывают, но другие.

Существуют также различия между штаммами-продуцентами антибиотиков, причем эти различия могут быть количественными или качественными. Один штамм, например, дает максимальный выход данного антибиотика, когда культура растет на поверхности среды и находится в стационарных условиях, а другой – лишь когда его культура погружена в среду и постоянно аэрируется.

Основными продуцентами антибиотиков являются бактерии, актиномицеты и микроскопические грибы. Бактерии, продуцирующие антибиотики, представлены в основном родом *Bacillus*. К антибиотикам, образуемым бактериями, относятся: грамицидин С (*B. Brevis*) полимиксины (*B. polymyxa*), бацитрацины (*B. licheniformis*), низины (*Streptococcus Lactis*).

Актиномицеты, синтезирующие антибиотики, в основном представлены родом *Streptomyces* (*S. griseus*, *S. fradiae*, *S. kanamyceticus*, *S. aureofaciens* и др.).

Антибиотики, образуемые актиномицетами, разнообразны по химическому строению: аминогликозиды, тетрациклины, актиномицины, макролиды и др. К настоящему времени выделено или описано более 200 таких соединений группы стрептомицинов, тетрациклинов, эритромицинов, новобиоцинов, неомицинов.

Грибы-продуценты антибиотиков представлены родами *Penicillium* и *Aspergillus*. К антибиотикам, образуемым мицелиальными грибами, относятся пенициллин и цефалоспорин, клавацин, гризеофульвин, и многие другие соединения.

### ***Прочие организмы***

*Водоросли.* Многие водоросли способны вырабатывать вещества, обладающие антибиотическими свойствами, но пока ни одно из них не нашло клинического применения.

*Лишайники.* К антибиотикам, вырабатываемым лишайниками, относятся лихенин и усниновая кислота.

*Высшие растения.* Высшие зеленые растения также образуют антибактериальные вещества, сходные по своим свойствам с истинными антибиотиками. К ним относятся фитонциды – аллицин, томатын и др.

*Животные.* Среди продуктов животного происхождения, обладающих антибактериальными свойствами, важное место занимает лизоцим. Многие простейшие, личинки насекомых и некоторые животные могут лизировать (растворять) микроорганизмы.

Производство антибиотика пенициллина с момента открытия в 1928 г. спасло миллионы жизней. С тех пор благодаря селекции высокопродуктивных мутантных штаммов, а также разработке методов культивирования, выделения и очистки производство пенициллина возросло примерно в 2 000 раз, а каждый год открывается примерно 50 новых антибиотиков.

Биотехнология предлагает новые подходы к разработке и производству лекарственных, профилактических и диагностических медицинских препаратов, а также позволяет производить в достаточных количествах широкий спектр лекарственных средств, которые ранее были малодоступны.

## **Основные этапы промышленного получения антибиотиков**

После установления высоких лечебных свойств первого антибиотика – пенициллина – сразу же возникли задачи организации его производства в больших количествах. На первом этапе промышлен-

ное получение этого препарата носило примитивный, экономически нерентабельный характер.

Выращивание продуцента антибиотика осуществлялось на средах, находящихся в небольших сосудах, при поверхностном культивировании гриба. Процесс развития гриба продолжался 8–10 суток. Такой способ культивирования гриба при большой затрате труда давал весьма низкий выход антибиотика, и себестоимость препарата была соответственно очень высокой. В результате поисков путей наиболее рационального способа производства антибиотика был предложен метод глубинного выращивания гриба в специальных емкостях – ферментаторах при продувании воздухом и перемешивании культуральной жидкости.

Современное промышленное получение антибиотиков – это сложная многоступенчатая биотехнологическая схема, состоящая из ряда последовательных стадий:

Стадия биосинтеза (образования) антибиотика. Это основная биологическая стадия сложного процесса получения антибиотического вещества. Главная задача на этой стадии – создание оптимальных условий для развития продуцента и максимально возможного биосинтеза антибиотика, он характеризуется двухфазностью процесса: на первой фазе идет накопление биомассы продуцента и потребление доступного субстрата, ограничивающих дальнейшее размножение клеток (трофо-фаза), а максимальный синтез антибиотика протекает при переходе к «выживанию» в условиях ограничения питания и биосинтеза целевого продукта – антибиотика (идиофаза).

Стадия предварительной обработки культуральной жидкости, клеток (мицелия) микроорганизма и фильтрации (отделение культуральной жидкости от биомассы продуцента). Эффективность стадии определяется составом среды для выращивания продуцента антибиотика, характером его роста, местом основного накопления биологически активного вещества (в культуральной жидкости или внутриклеточно).

Стадия выделения и очистки антибиотика. На этой стадии в зависимости от свойств антибиотика, его химического строения и основного места накопления антибиотического вещества применяют различные методы выделения и очистки. В качестве основных методов используются экстракция, осаждение, сорбция на ионообменных материалах, упаривание, сушка. На первой стадии культуральная жидкость имеет небольшую концентрацию антибиотика, на последующих этапах его концентрация увеличивается до 20...30 %. Все это

требует применения различных емкостей и разных объемов используемых реагентов.

Стадии получения готовой продукции, изготовления лекарственных форм, расфасовки. Особенность стадии определяется очень высокими требованиями к качеству конечного продукта. В случае выпуска антибиотиков, предназначенных для инъекций, препараты должны быть стерильными; получение таких антибиотических препаратов, приготовление различных лекарственных форм, дозировка (расфасовка) и упаковка должны осуществляться в асептических условиях.

Для максимального выхода антибиотика необходим подбор наиболее благоприятных для этих целей питательных сред и режимов культивирования продуцента, что включается в понятие «управляемый биосинтез».

В промышленных условиях требуется строгое соблюдение технологического процесса: на стадии подготовки инокулята это состав среды, возраст инокулята (клеток или мицелия); на стадии биосинтеза – скорость потребления компонентов, предшественники, скорость аэрации культуры, поддержание температуры и рН среды.

Принимают меры к максимальному снижению себестоимости препаратов путем интенсификации всех стадий технологического процесса и, прежде всего, повышением эффективности биосинтеза антибиотического вещества. Для этого необходимо:

- внедрение в производство наиболее высокопродуктивных штаммов микроорганизмов – продуцентов антибиотиков;
- создание и обеспечение самых благоприятных условий развития продуцента антибиотика на относительно дешевых средах;
- широкое использование математических методов планирования процесса развития организма и электронно-вычислительной техники с целью оптимизации и моделирования условий его культивирования, обеспечивающих максимальный выход антибиотика;
- применение современного оборудования на всех стадиях технологического процесса с автоматизированными контролирующими устройствами основных параметров развития организма и стадий биосинтеза антибиотика.

#### *Методы культивирования продуцентов антибиотиков*

Перспективным методом выращивания микроорганизмов-продуцентов антибиотиков признан метод глубинного культивирования: микроорганизм развивается в толще жидкой питательной среды, через которую непрерывно подается стерильный воздух, и среда перемешивается.

Существует четыре основных модификации глубинного способа выращивания микроорганизмов.

Периодическое культивирование. При этом способе весь процесс развития микроорганизмов полностью завершается в одном ферментаторе, после чего ферментатор освобождается от культуральной жидкости, тщательно промывается, стерилизуется и вновь заполняется свежей питательной средой. Среда засеивается изучаемым микроорганизмом, и процесс возобновляется.

Отъемный метод. Культивирование микроорганизмов осуществляется в ферментаторах с периодическим отбором части объема культуральной жидкости в ферментаторе и доводится свежей питательной средой до исходного уровня.

Батарейный способ. Микроорганизмы развиваются в ряду последовательно соединенных ферментаторов. Культуральная жидкость на определенной стадии развития микроорганизма перекачивается из первого ферментатора во второй, затем из второго в третий и т. д. Освобожденный ферментатор немедленно заполняется свежей питательной средой, засеянной микроорганизмом.

Для каждого продуцента антибиотика разрабатывается оптимальная питательная среда, подбираются специфические параметры концентраций, температуры, аэрации, кислотности.

Среда должна соответствовать определенным требованиям: обеспечивать максимальный выход антибиотика; состоять из относительно дешевых компонентов; иметь хорошую фильтрующую способность; обеспечивать применение наиболее экономичных приемов выделения и очистки антибиотиков.

Важный вклад микробной биотехнологии в медицину состоит в получении профилактических препаратов – *вакцин* и *сывороток*, причем этот вид продукции не имеет дублера в химической промышленности.

**Вакцины** – препараты, предназначенные для создания активного иммунитета в организме привитых людей или животных. Основным действующим началом каждой вакцины является иммуноген (антиген), т. е. субстанция, аналогичная компонентам возбудителя заболевания (антителу), ответственным за выработку иммунитета.

В зависимости от природы иммуногена вакцины подразделяются на следующие виды:

– цельномикробные, состоящие из микроорганизмов, соответственно бактерий или вирусов, сохраняющих в процессе изготовления свою целостность;

– химические – из продуктов жизнедеятельности микроорганизма (классический пример – анатоксины);

– генно-инженерные, содержащие продукты экспрессии отдельных генов микроорганизма, наработанные в специальных клеточных системах;

– химерные, или векторные, вакцины, в которых ген, контролирующий синтез протективного белка, встроен в безвредный микроорганизм в расчете на то, что синтез этого белка будет происходить в организме привитого.

Наиболее просты в изготовлении живые вакцины, так как технология в основном сводится к выращиванию аттенуированного (ослабленного) вакцинного штамма с соблюдением условий, обеспечивающих получение чистых культур штамма, исключение возможностей загрязнения другими микроорганизмами с последующей стабилизацией и стандартизацией конечного препарата.

Вакцинные штаммы бактерий выращивают на жидких питательных средах (гидролизаты казеина или другие белково-углеводные среды) в аппаратах-ферментаторах емкостью от 0,1 м<sup>3</sup> до 1–2 м<sup>3</sup>. Полученная чистая культура вакцинного штамма подвергается лиофильному высушиванию с добавлением протекторов.

Живые штаммы бактерий и вирусов, применяемые для приготовления живых вакцин, получены, как правило, из природных штаммов путем их селекции или пассажей через биологические системы (организм животных, эмбрионы кур, культуры клеток, питательные среды).

В связи с успехами генетики и генетической инженерии появились возможности целенаправленного конструирования вакцинных штаммов. Получены рекомбинантные штаммы вируса гриппа, а также штаммы вируса вакцины со встроенными генами протективных антигенов вируса гепатита В.

Сыворотка – полученные на антиген готовые антитела, вводимые уже заболевшему человеку или животному для быстрого ответа на инфекцию. Может вводиться больному в лечебных целях или в качестве временной защиты (для создания пассивного иммунитета) от различных заболеваний. Для приготовления иммунной сыворотки в больших количествах используется биологический материал, взятый у лошадей. Из крови животных выделяют плазму, затем из нее удаляют фибрин и получают сыворотку.

**Витамины.** Основные потребности промышленности в этих соединениях удовлетворяются за счет природных источников и химиче-

ского синтеза. Биологическим способом получают витамины В<sub>2</sub>, В<sub>12</sub> (β-каротин, предшественники витамина D).

Рибофлавин (В<sub>2</sub>) до 30-х г. XX в. выделяли из природного сырья. В наибольшей концентрации он содержится в моркови и печени трески. Однако из 1 тонны моркови можно выделить всего 1 г рибофлавина, а из 1 тонны печени – 6 г. В 1935 г. обнаружен активный продуцент рибофлавина – гриб *Eremothecium ashbyii*, способный при выращивании на 1 тонну питательной смеси синтезировать 25 кг витамина В<sub>2</sub>.

В 1983 г. во ВНИИ генетики микроорганизмов сконструирован рекомбинантный штамм *B. subtilis*, способный синтезировать втрое больше витамина всего за 40 часов ферментации.

Витамин В<sub>12</sub>, первоначально также получаемый из природного сырья (из 1 т печени возможно получение 15 мг витамина), в настоящее время получают микробиологическим синтезом. Продуцентами витамина при его промышленном синтезе служат актиномицеты, метанобразующие и фотосинтезирующие бактерии, одноклеточные водоросли. В начале 60-х годов XX в. разработана система промышленного получения β-каротина. Каротин синтезируют многие микроорганизмы: фототрофные бактерии, актиномицеты, мицелиальные грибы.

Витамины необходимы в малых количествах любому организму, они выполняют в нем каталитические функции, ускоряя различные процессы обмена веществ. Первоначально витамины получали из овощей и фруктов, рыбы. Например, для выделения 1 г рибофлавина (В<sub>2</sub>) требовалась 1 т моркови или 160 кг печени трески. В 1935 году был обнаружен активный продуцент рибофлавина – гриб *Eremothecium ashbyii*, способный при выращивании на 1 т питательной среды синтезировать 25 кг витамина В<sub>2</sub>.

Большое количество витаминов группы В содержится в биомассе пивных дрожжей. Витамины являются относительно простыми соединениями, поэтому многие из них сейчас синтезируют химическим путем. Но самые сложные по строению витамины В<sub>2</sub>, В<sub>12</sub>, бета-каротин (предшественник витамина А) и эргокальциферол (предшественник витамина D) целесообразнее получать с помощью микроорганизмов.

Следующий класс веществ, производимых биотехнологическим путем, составляют гормоны. К традиционным микробиологическим продуктам относятся стероидные гормоны – кортизон, преднизолон, которые широко применяют при лечении различных аллергических

заболеваний, бронхиальной астмы, ревматоидного артрита и др. С помощью микроорганизмов производится также гормон роста – соматотропин.

Среди лекарственных средств особое место занимают *ферменты*. Протеолитические (расщепляющие белок) ферменты используются при лечении заболеваний пищеварительных органов, ожоговых поражений и различных ран, для удаления некротических тканей. При лечении патологий обмена веществ применяют липазы, урокиназу и стрептокиназу, также для удаления тромбов коронарных сосудов сердца, легких, конечностей.

Разработаны биотехнологии производства иммуномодуляторов, кровезаменителей, инсулина, интерферона, биоразлагаемых полимеров для хирургических швов, различных диагностических средств. Число новых препаратов постоянно увеличивается. Среди примерно 50 новых видов лекарств, вакцин и диагностикумов, появляющихся на рынке ежегодно, 10–15 получены с помощью биотехнологических методов.

Использование микроорганизмов позволяет получать высококачественные медицинские препараты быстро и в необходимых количествах.

*Инсулин* – это гормон поджелудочной железы, регулирующий углеводный обмен и поддерживающий нормальный уровень сахара в крови. При недостатке его развивается сахарный диабет. Больным необходимо ежедневное введение инсулина. Раньше инсулин получали на основе использования поджелудочной железы крупного рогатого скота и свиней. В 1978 г. впервые были синтезированы отдельные цепи человеческого инсулина посредством введения человеческих генов в клетки кишечной палочки (*Escherichia coli*). В настоящее время в медицине используется инсулин микробного происхождения, что позволило значительно снизить затраты на его производство.

*Соматотропин* (гормон роста человека) секретируется передней долей гипофиза. Его недостаток приводит к развитию заболевания – карликовости. Обычное получение гормона из трупного материала – процесс трудоемкий и малоэффективный. В настоящее время его синтезируют методами генной инженерии в специально сконструированных клетках бактерий.

*Интерферон* – вещество, выделяемое клетками животных в ответ на воздействие вируса. Интерферон способен придавать незараженным клеткам устойчивость к вирусной инфекции, подавляя размножение вирусов в клетке. В связи с этим интерфероны широко

используются для лечения различных тяжелых заболеваний: вирусного гепатита, остеосаркомы, миеломы, ряда опухолей гортани, легких и мозга. Традиционно интерферон извлекают из крови человека (из 1 л крови можно выделить всего 1 мкг интерферона). На современном этапе наиболее перспективным методом является биосинтез интерферонов с помощью генетически сконструированных микроорганизмов.

### **Контрольные вопросы и задания для самоконтроля**

1. Какие субстраты используют в промышленном производстве? Охарактеризуйте существующие и перспективные.
2. Какие питательные среды применяют для культивирования?
3. Как осуществляется контроль производства? Его виды и этапы.
4. Рассмотрите молоко как субстрат, его химический состав и подготовку.
5. Опишите закваски, приведите их характеристику.
6. Перечислите виды технологий для кисломолочных продуктов.
7. Охарактеризуйте продукты молочнокислого брожения. В чем их отличия и особенности?
8. Как осуществляется квашение и соление продуктов как биотехнологический процесс?
9. Опишите производство пищевого уксуса, субстраты и продуценты.
10. Как получают натуральный пищевой уксус? Рассмотрите технологию производства.
11. Как осуществляется микробиологический контроль в производстве?
12. Дайте общую характеристику антибиотиков, продуцентов.
13. Опишите производство антибиотиков, двухфазность процесса.
14. Как получают вакцины и сыворотки? Приведите схему приготовления.
15. Охарактеризуйте другие группы препаратов для медицины биотехнологического происхождения.

### 3. ПРОМЫШЛЕННОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЖИВЫХ ОРГАНИЗМОВ

#### 3.1. БИОТЕХНОЛОГИИ В ЭНЕРГЕТИКЕ И ПРОМЫШЛЕННОСТИ

*Биоэнергетика, получение биогаза. – Производство этилового спирта. – Производство органических кислот.*

Растительный покров Земли составляет более 1 800 млрд т сухого вещества, что энергетически эквивалентно известным запасам энергии полезных ископаемых. Леса составляют около 68 % биомассы суши, травяные экосистемы – примерно 16 %, а возделываемые земли – только 8 %.

Для сухого вещества простейший способ превращения биомассы в энергию заключается в сгорании: оно обеспечивает тепло, которое в свою очередь превращается в механическую или электрическую энергию. Что же касается сырого вещества, то в этом случае древнейшим и наиболее эффективным методом превращения биомассы в энергию является получение биогаза (метана).

Метановое «брожение», или биометаногенез, – давно известный процесс превращения биомассы в энергию. Он был открыт в 1776 г. Вольтой, который установил наличие метана в болотном газе. Биогаз, получающийся в ходе этого процесса, представляет собой смесь из 65 % метана, 30 % углекислого газа, 1 % сероводорода ( $H_2S$ ) и незначительных количеств азота, кислорода, водорода и закиси углерода. Болотный газ дает пламя синего цвета и не имеет запаха. Его бездымное горение причиняет гораздо меньше неудобств людям по сравнению со сгоранием дров, навоза животных или кухонных отбросов. Энергия, заключенная в 28 м<sup>3</sup> биогаза, эквивалентна энергии 16,8 м<sup>3</sup> природного газа, 20,8 л нефти или 18,4 л дизельного топлива. Биометаногенез осуществляется в три этапа: растворение и гидролиз органических соединений, ацидогенез (кислотообразование) и метаногенез.

В энергоконверсию вовлекается только половина органического материала – 1 800 ккал/кг сухого вещества по сравнению с 4 000 ккал при термохимических процессах, но остатки, или шлаки, метанового «брожения» используются в сельском хозяйстве как удобрения. В процессе биометаногенеза участвуют три группы бактерий. Первые превращают сложные органические субстраты в масляную, пропио-

новую и молочную кислоты; вторые превращают эти органические кислоты в уксусную кислоту, водород и углекислый газ, а затем метанообразующие бактерии восстанавливают углекислый газ в метан с поглощением водорода, который в противном случае может ингибировать уксуснокислые бактерии.

Для всех метанобактерий характерна способность к росту в присутствии водорода и углекислого газа, а также высокая чувствительность к кислороду и ингибиторам производства метана.

Метановое «брожение» происходит в водонепроницаемых цилиндрических цистернах (дайджестерах) с боковым отверстием, через которое вводится ферментируемый материал. Над дайджестером находится стальной цилиндрический контейнер, который используется для сбора газа; нависая над бродящей смесью в виде купола, контейнер препятствует проникновению внутрь воздуха, так как весь процесс должен происходить в строго анаэробных условиях. В газовом куполе имеется трубка для отвода биогаза. Дайджестеры изготавливают из глиняных кирпичей, пластического материала, бетона или стали. Купол для сбора газа изготовлен из нейлона; в этом случае его легко прикреплять к дайджестеру. Газ надувает нейлоновый мешок, который соединен с компрессором для повышения давления газа.

В тех случаях, когда используются отходы домашнего хозяйства или жидкий навоз (прил. 7), соотношение между твердыми компонентами и водой должно составлять 1:1, что соответствует общей концентрации твердых веществ, составляющей 8...11 % по весу. Смесью сбраживаемых материалов обычно засевают ацетогенными и метаногенными бактериями или отстоем из другого дайджестера. Низкий pH подавляет рост метаногенных бактерий и снижает выход биогаза; такой же эффект вызывает перегрузка дайджестера. Против закисления используют известь. Оптимальное «переваривание» происходит в условиях, близких к нейтральным (pH 6,0...8,0). Максимальная температура процесса зависит от мезофильности или термофильности микроорганизмов (30...40 или 50...60 °C); резкие изменения температуры нежелательны.

Обычно дайджестеры погружают в землю, чтобы использовать изоляционные свойства почвы. В странах с холодным климатом их нагревают при помощи устройств, которые применяют при компостировании сельскохозяйственных отходов. С точки зрения питательных потребностей бактерий избыток азота (в случае жидкого навоза) способствует накоплению аммиака, который подавляет рост бактерий. Для оптимальной переработки соотношение C/N должно быть

порядка 30 : 1 (по весу). Это соотношение можно изменять, смешивая субстраты, богатые азотом, с субстратами, богатыми углеродом. Так, C/N навоза можно изменить добавлением соломы или жома сахарного тростника.

Отходы пищевой промышленности и сельскохозяйственного производства характеризуются высоким содержанием углерода, поэтому они лучше всего подходят для метанового брожения. Твердый материал необходимо раздробить и перемешивать суспензию сбраживаемых веществ, чтобы воспрепятствовать расслаиванию. Обычно длительность переработки навоза крупного рогатого скота составляет две-четыре недели. Двухнедельной переработки при температуре 35 °С достаточно, чтобы убить все патогенные микроорганизмы.

Биогаз состоит из 62 % метана и 38 % углекислого газа; последний можно использовать в теплицах для ускорения фотосинтеза культивируемых растений. Производство биогаза путем метанового «брожения» отходов – одно из возможных решений энергетической проблемы в большинстве сельских районов развивающихся стран. И хотя при использовании коровьего навоза только четверть органического материала превращается в биогаз, последний выделяет тепла на 20 % больше, чем его можно получить при полном сгорании навоза.

Получение биогаза в метантенках имеет следующие *достоинства*: это источник возобновляемой чистой энергии; отходы служат высококачественными удобрениями, и сам процесс способствует поддержанию чистоты окружающей среды.

Источником углеводов также могут служить *водоросли*. У широко распространенной зеленой водоросли *Botryococcus braunii* (обитающей в пресной и солоноватой воде умеренных и тропических зон) содержание углеводов в зависимости от условий роста и разновидностей может составлять до 75 % сухой массы. Они накапливаются внутри клеток, и водоросли, в которых их много, плавают на поверхности. После сбора водорослей эти углеводы легко отделить экстракцией каким-нибудь растворителем или методом деструктивной отгонки. Таким путем может быть получено вещество, аналогичное дизельному топливу и керосину.

**Производство этилового спирта.** Биотехнология в состоянии внести крупный вклад в решение проблем энергетики посредством производства достаточно дешевого биосинтетического этанола, который, кроме того, является и важным сырьем для микробиологической промышленности при получении пищевых и кормовых белков, а также белково-липидных кормовых препаратов.

Для производства пищевого спирта используют любое крахмалсодержащее сырье (все виды зерновых культур, картофель). Используют и сахаросодержащее сырье: свеклосахарную, тростниковую, сырцовую мелассу, сахар-сырец и др. Технический спирт получают из гидролизатов древесины, содержащих сахара и ряд токсических примесей, путем кислотного гидролиза при повышенном давлении.

Технология производства этилового спирта состоит из ряда последовательных стадий: подготовка крахмалсодержащего сырья, разваривание крахмалсодержащего сырья, осахаривание разваренной массы, приготовление дрожжей, сбраживание осахаренного сусла, выделение спирта из бражки и его ректификация.

Технологическая блок-схема производства спирта из зерна и картофеля приведена на рис. 2.



Рис. 2. Технологическая схема производства этилового спирта из зерна и картофеля

Подготовка включает очистку от примесей, измельчение зерна на молотковых или вальцовых дробилках до частиц размером менее 3 мм. Очистка картофеля происходит на гидравлическом транспорте, затем его моют в картофелемоечных машинах и измельчают на молотковых дробилках или картофелетерках.

Измельченное сырье смешивается с теплой водой в соотношении 1: 2,5...3,5. После перемешивания зерновой замес (или картофельная каша) поступает в аппарат для разваривания, цель которого заключается в разрушении клеточной структуры сырья и растворении крахмала. Разваривание проводят в цилиндроконических аппаратах при нагревании острым паром под давлением не менее 0,4...0,6 МПа.

Процесс разваривания может проводиться периодическим, полунепрерывным или непрерывным способами. Разваренную массу охлаждают до температуры +57...61 °С (в зависимости от вида осаживаемого материала и способа осаживания).

Осаживание охлажденной разваренной массы осаживающими материалами (солодовым молоком или ферментными препаратами) проводят периодическим или непрерывным способом.

В результате получают продукт – **сусло** спиртового производства. Оно имеет массовую долю сухого вещества 16...18 %, в том числе 13...15 % сбраживаемых сахаров. Осаженное сусло (затор) охлаждают до температуры +18...22 °С в теплообменниках или с помощью вакуума.

Для **сбраживания** сусла музейную культуру продуцента – дрожжи вида *Saccharomyces cerevisiae* – **аэробно** размножают в лаборатории, используя колбы нарастающим объемом. При этом получают засевные дрожжи. Производственные дрожжи готовят периодическим или полунепрерывным способом на основе засевных дрожжей в отделении чистой культуры, постепенно увеличивая количество клеток в жидкой сахарной среде, используя пастеризованное сусло.

С момента введения производственных дрожжей (6...8 % от объема сусла) в охлажденное сусло начинается процесс брожения. Брожение проводят в закрытых бродильных чанах в течение 2–3 суток с поддержанием температуры +25...30 °С.

Брожение проводят периодическим, циклическим или непрерывно-проточным способами. Периодическое брожение осуществляют в одном аппарате в небольших объемах. Циклический и непрерывно-проточный способы используют в больших предприятиях с применением дополнительного оборудования (например, батареи бродильных аппаратов, соединенных переточными трубами, и др.).

В период брожения дрожжи ферментативно превращают мальтозу в декстрозу (виноградный сахар) и действием зимазы сбраживают ее. Дрожжи от бражки отделяют фильтрованием. По окончании процесса брожения получают зрелую бражку с объемной долей спирта 8...8,5 %.

Бражка представляет собой многокомпонентную смесь, включающую летучие и нелетучие соединения. Летучая фракция (альдегиды, эфиры, спирты) нагретой бражки переходит в паровую фазу, а после конденсации превращается в жидкость.

Трудноотделимая фракция остается в перегонном кубе. В процессе разделения бражки получают спирт-сырец (концентрация спирта 88 %) с примесями и барду. Спирт-сырец используется для получения ректификованного (очищенного перегонкой) спирта на ректификационных аппаратах спиртовых или ликероводочных заводов. Дрожжи и барда после отгонки спирта могут быть использованы на корм скоту, как добавка в кормосмеси.

Все спирты, получаемые из зерна, картофеля и сахарной свеклы, содержат сивушные масла. Основным компонентом сивушных масел – изоамиловый спирт. Всего при брожении образуется до 240 различных веществ, некоторые из них очень ядовиты. По степени летучести различают четыре группы примесей: головные, хвостовые, промежуточные и концевые. Головные примеси имеют температуру кипения ниже температуры кипения спирта и испаряются в первую очередь. К ним относят уксусный и масляный альдегиды, уксусно-метиловый эфир и др. Хвостовые примеси – уксусная кислота, фурфурол – менее летучи в сравнении со спиртом.

Промежуточные примеси более летучи при низких концентрациях спирта. Основными их представителями являются этиловый спирт, высшие спирты (изоамиловый, изобутиловый, пропиловый) и др. Концевые примеси (метиловый спирт) имеют большую летучесть при высоких концентрациях спирта

Спирт из бражки извлекают ректификацией, а его очистку от примесей осуществляют многоступенчатой ректификацией и химическими методами. Ректификация (от лат. *rectus* – прямой и *facio* – делаю) – это процесс разделения двойных или многокомпонентных смесей за счёт противоточного массообмена между паром и жидкостью. Используется для разделения жидких смесей на практически чистые компоненты, различающиеся температурами кипения, путём многократного испарения жидкости и конденсации паров.

Спирт-ректификат получают непосредственно из бражки на брагоректификационных установках непрерывного действия без выделения спирта-сырца. Брагоректификационная установка состоит из бражной и нескольких ректификационных колонн. Число ректификационных колонн в установке на одну меньше, чем число компонентов (одинаковой летучести) в смеси. В каждой колонне от исходной смеси отделяется одна из групп составных частей исходной смеси, которая в последующих ректификационных колоннах разделяется на составляющие компоненты.

Кроме спирта-сырца и ректифицированного этилового спирта спиртовая промышленность вырабатывает небольшое количество абсолютного спирта (содержание воды до 0,2 объемных %). Также вырабатываются другие виды спирта. Ароматный этиловый спирт представляет собой ректифицированный этиловый спирт крепостью 75...80 объемных %, получаемый перегонкой настоев водно-спиртовой жидкости с эфиромасличным или плодово-ягодным сырьем. Питьевой этиловый спирт представляет собой ректифицированный этиловый спирт, разведенный умягченной водой до крепости 95 объемных %.

Меласса – отход сахаропаточного или свеклосахарного производства с содержанием сухих веществ 75...80 %. Она представляет собой вязкую темно-коричневую массу с неприятным запахом и вкусом.

**Получение органических кислот.** Органические кислоты и их соли широко используются в пищевой, фармацевтической, текстильной, кожевенной, химической, металлургической и других отраслях промышленности, поэтому их получение является важным направлением крупнотоннажного микробиологического синтеза.

Многие кислоты можно производить как химическим, так и микробиологическим путем, причем первый путь более предпочтителен, когда кислоты предполагается использовать для технических нужд, второй путь – для целей пищевой промышленности и медицины.

Источником углерода для микроорганизмов – продуцентов органических кислот являются углеводы, органические кислоты, спирты, алканы. Кислоты часто секретируются клетками, когда рост культуры в силу определенных причин тормозится и переходит в стационарную фазу.

Фактором, вызывающим прекращение роста микробных культур, может быть недостаток минеральных компонентов или витаминов. В случае получения органических кислот рост культуры лимити-

руют источником азота, используя при этом избыточное количество источника углерода (и энергии). Интенсивный синтез кислот в стационарной фазе роста после истощения дефицитного компонента продолжается до тех пор, пока в среде присутствует источник углерода и пока клетки продуцента жизнеспособны.

На практике для получения кислот используют специально отобранные или мутантные высокопродуктивные штаммы, не синтезирующие побочных продуктов. В этих случаях выходы органических кислот – по существу, монопродуктов процесса – являются высокими: для молочной кислоты 90 %, глюконовой – 90...95 % , уксусной – 90...98 % , лимонной – 85 %.

В настоящее время семь органических кислот производятся в промышленных масштабах, причем лимонную, глюконовую, кетоглюконовую, итаконовую и яблочную кислоты получают только микробиологическим путем, а молочную и уксусную – как химическим, так и микробиологическим методами, используя иммобилизованные клетки продуцентов.

Важнейшей для промышленности органической кислотой является уксусная. Она используется при производстве волокон, фармацевтических препаратов, инсектицидов, в пищевой промышленности, как субстрат для получения аминокислот. Техническую уксусную кислоту получают химическим синтезом (карбонилирование метанола).

В зависимости от способа иммобилизации (адсорбция на бумажных стружках,  $TiO_2$ ,  $ZrO_2$ , керамике, хлопке, ионообменных смолах, включение в гели каррагинана, коллагена) продуктивность процесса варьирует в пределах 60 раз, концентрация уксусной кислоты изменяется от 20 до 110 г/л, операционная стабильность иммобилизованного биокатализатора достигает 270 суток.

Молочная кислота – первая из органических кислот, которую начали производить путем брожения; в конце XIX века было налажено промышленное производство молочной кислоты при участии молочнокислых бактерий (*Lactobacillus debrueckii*, *L. Leichmanii* и *L. bulgaricus*). Молочную кислоту используют в качестве добавки к пищевым продуктам, сокам, эссенциям и напиткам, как окислитель в пищевой промышленности, в гальваностегии, а также при производстве пластмасс, когда L(+)-форму кислоты полимеризуют в полилактамы.

Лимонную кислоту получают из мелассы с помощью микроскопических грибов *Aspergillus niger*. В 1980 г. ее мировое производство составило 175 000 т. Лимонная кислота применяется как ароматизи-

рующее средство и консервант пищевых продуктов, для очистки и шлифовки металлов (хелатирующий агент), в качестве пластификатора лакокрасочных материалов. Лимонную и изолимонную кислоты получают с помощью дрожжей *Candida sp.* и *Penicillium janthinellum*.

Эфиры лимонной кислоты применяются при производстве пластмасс. Применение иммобилизованных клеток приводит к увеличению скорости образования лимонной кислоты в несколько раз, операционная стабильность иммобилизованного биокатализатора достигает 30 сут.

Глюконовая кислота и ее лактон являются продуктами окисления глюкозы. Промышленное производство глюконовой кислоты с помощью *A. niger* было налажено еще в начале 1920-х годов. Выход процессов ферментации (свободные клетки) с получением глюконовой кислоты равен 95 %, концентрация глюкозы – 150...200 г/л.

Глюконовая кислота находит применение как моющее средство, ее соли используются в медицине, а лактон – как подкислитель в пищевой промышленности. Производные глюконовой кислоты – 2-кетоглюконовую и 5-кетоглюконовую кислоты – получают с помощью микроорганизмов *Pseudomonas sp.*, *Glucanobacter sp.*, *Acetobacter sp.*, причем процесс получения 2-кетоглюконовой кислоты на основе свободных клеток нашел промышленное применение.

### 3.2. БИОТЕХНОЛОГИЯ ДЛЯ СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА

*Бактериальные, грибные и вирусные энтомопатогенные препараты. – Биологические удобрения: нитрагин, азотобактерин, фосфобактерин. – Продуценты, технология и применение биоудобрений*

Убытки сельского и лесного хозяйства от насекомых-вредителей ежегодно исчисляются в мире суммой около 100 млрд долларов. Долгое время для борьбы с вредителями использовались ядохимикаты, но, во-первых, они зачастую токсичны для животных и человека, а во-вторых, ко многим ядохимикатам у насекомых развивается устойчивость. Все это привело к необходимости поиска новых эффективных средств борьбы.

Наиболее перспективным оказалось использование природных патогенов – микроорганизмов, чьи токсины являются причиной гибели насекомых-вредителей в их природных условиях.

В настоящее время в различных странах мира производят более 30 микробиологических энтомопатогенных препаратов. Они характеризуются высокой специфичностью поражения определенных видов насекомых и практически полной безвредностью для человека, теплокровных животных, птиц и полезных насекомых.

Энтомопатогенные препараты, получаемые на основе микроорганизмов, выделенных из естественных условий и внесенных вновь в те же условия в виде патогенных препаратов, не вызывают нежелательных изменений в биоценозах и не нарушают экологического состояния в регионах.

Российская микробиологическая промышленность производит три группы энтомопатогенных препаратов:

1) бактериальные препараты на основе *Bacillus thuringiensis*: энтобактерин, дендробациллин, инсектин, токсобактерин;

2) грибной препарат боверин на основе гриба *Beauveria bassiana*;

3) препараты на основе вирусов ядерного полиэдроза: вирин-ЭНШ и вирин-ЭКС.

Все микробные патогены выпускают в виде смачивающихся порошков или паст, реже гранул, эмульсии и кристаллов. При непосредственном применении чаще всего предполагают различные добавки в виде растворителей, эмульгаторов, способствующих повышению эффективности препаратов.

**Бактериальные энтомопатогенные препараты.** Из всех энтомопатогенных бактерий наиболее широко применяется грамположительная бактерия *Bac. thuringiensis*, которая помимо образования спор, вызывающих септицимию насекомого при попадании внутрь его тела, в ходе культивирования продуцирует ряд токсических соединений, повышающих эффективность приготовленных на ее основе препаратов.

Известно, что бактерии группы *Bac. thuringiensis* антагонистичны к 130 видам насекомых, среди которых вредители полевых, овощных, плодовых культур, виноградников и леса. Наибольший эффект достигается при применении данной группы препаратов по отношению к листогрызущим вредителям.

Способность *Bac. thuringiensis* образовывать различные токсичные продукты, споры, кристаллы используется в промышленности при производстве на основе этого микроорганизма широкого круга различных энтомопатогенных препаратов.

Все бактериальные энтомопатогенные препараты на основе *Bac. thuringiensis* производят по одной и той же технологической схеме. Технология производства включает все стадии, типичные для любого микробиологического производства, основанного на глубинном способе получения микроорганизмов: выращивание посевного материала в лаборатории и в посевном аппарате; промышленное культивирование в ферментаторе; концентрирование культуральной жидкости; сушку; стандартизацию и фасовку готового препарата.

Перед началом культивирования рН среды не регулируют: при добавлении всех компонентов она устанавливается обычно около 6,3. К концу ферментации рН повышается до 8...8,5. Процесс культивирования заканчивают при степени спорулизации 90...95 % и титре спор не менее  $10^9$  в 1 мл. Готовую культуральную жидкость перекачивают в отдельный простерилизованный сборник, подкисляют до рН 6...6,2 и передают на стадию сепарации.

В результате сепарации получают пасту влажностью 85 % с выходом около 100 кг в 1 м культуральной жидкости. Конечным продуктом производства может быть либо смачивающийся порошок, либо стабилизированная паста. Первый получают путем высушивания пасты на распылительной сушилке до остаточной влажности 10 % и смешения с каолином. Вторую – внесением в пасту карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ). В этом варианте готовый продукт представляет собой вязкую жидкость светло-серого цвета, однородную по составу, не замерзающую при хранении, без запаха, не подвергающуюся гниению или брожению.

Энтомопатогенные препараты на основе микроскопических грибов способны поражать большое количество насекомых-вредителей, вызывая у них заболевание микоз.

По сравнению с бактериями и вирусами грибы обладают рядом особенностей: а) поражение происходит не через пищеварительный тракт, а непосредственно через поверхностные ткани; б) насекомые поражаются в фазе развития куколки, что не наблюдается при воздействии на них микробных препаратов; в) грибы характеризуются относительно большой скоростью роста и огромной репродуктивной способностью; в виде спор могут длительное время находиться в природных условиях без заметного снижения энтомопатогенной активности.

Воздействие грибного препарата на насекомое начинается с проникновения споры гриба в полость тела насекомого через кож-

ные покровы. Попад внутрь, грибная спора прорастает в гифу, затем разрастается в мицелий, от которого отчленяются гифальные тельца – конидии, составляющие инфекционную единицу энтомопатогенных грибов. Как правило, гибель наступает от большого количества токсинов, выделяющихся грибами. Если же токсинов недостаточно либо насекомое нечувствительно к ним, гибель наступает после того, как нитевидный мицелий заполняет все тело насекомого, поражая, прежде всего, мышечную ткань. В зависимости от размеров насекомого гибель наступает в период от двух до восьми дней.

В России производится грибной препарат боверин на основе гриба рода *Beauveria*. Этот препарат применяют для уничтожения около 60 видов насекомых-вредителей, преимущественно жуков. Он безвреден для теплокровных животных и человека, не вызывает ожогов у растений.

Получают боверин с помощью как глубинного, так и поверхностного культивирования промышленного штамма гриба.

Получение боверина глубинным методом осуществляют в строго асептических условиях. В состав питательной среды входят следующие компоненты (в %): дрожжи кормовые – 2; крахмал – 1; хлорид натрия – 0,2; хлорид марганца – 0,01; хлорид кальция – 0,05. Продолжительность культивирования составляет трое-четверо суток при температуре 25...28 °С.

Выращивание гриба проводят в условиях постоянного перемешивания и принудительной аэрации. В ходе глубинного культивирования гриба в течение первых суток-полутора кормовые дрожжи полностью лизируются, а гриб за это время проходит все фазы своего роста.

К концу полного созревания гриба выделяется максимальное количество ферментов, что ведет к лизису мицелия и способствует накоплению конидий. Готовую культуральную жидкость подвергают сепарации или фильтрации. После фильтрования получают пасту влажностью 70...80 %, которую направляют на распылительную сушилку. Высушенные споры представляют собой мелкодисперсный порошок влажностью 10 %. Полученный порошок стандартизуют необходимым количеством каолина, иногда в качестве добавок в готовый препарат вводят смачиватель и прилипатель.

Поверхностное культивирование гриба проводят как в жидкой питательной среде, так и на полутвердых средах, на них гриб обладает хорошей скоростью роста. Его микробиологическое производство завершается на стадии получения спороносной пленки, которую впо-

следствии снимают, высушивают, измельчают и при необходимости стандартизуют соответствующим количеством наполнителя. Среди возможных приемов, используемых в производстве боверина поверхностным культивированием, различают: а) культивирование гриба на жидких средах без автоклавирования, перемешивания и аэрации; б) культивирование на твердых автоклавированных средах без перемешивания и аэрации. Эти приемы основаны на том, что гриб хорошо растет на различных растительных субстратах – отходах сельскохозяйственной продукции. Культивирование гриба на жидких средах без автоклавирования, перемешивания и аэрации проводят без предварительной стерилизации среды, ее просто нагревают до кипения, разливают в деревянные каркасы, покрытые изнутри полиэтиленовой пленкой. Среду, охлажденную до 30...40 °С, засевают сухими спорами. Сверху каркасы накрывают полиэтиленовой пленкой, которую после образования спороносной пленки гриба снимают. В качестве сред используют всевозможные отвары, например, из сахарной свеклы, картофеля, тыквы, зерна, муки.

В процессе культивирования гриба на твердых автоклавированных средах без перемешивания и аэрации предусматривается стерилизация размещенных по отдельным емкостям питательных сред (сусло-агар, картофель, морковь, кукуруза, корки арбуза) в течение 40 минут при 110 °С. В стерильный субстрат вносят сухие споры, емкости с субстратом встряхивают до однородного распределения посевного материала и оставляют стоять при температуре окружающего воздуха 18...23 °С. Образование конидиоспор завершается к концу 12–15 суток. Культуру гриба с остатками субстрата извлекают из емкостей и высушивают на стеллажах при 25...28 °С. Получение готового препарата завершают размолотом материала до мелкодисперсного порошка.

Вирусные энтомопатогенные препараты обладают наиболее высокой специфичностью по отношению к насекомому-хозяину: обычно они поражают только один вид, поэтому они практически полностью безвредны для флоры, фауны и человека.

Вирусы отличает высокая устойчивость к неблагоприятным воздействиям окружающей среды (температуры, влажности), они способны сохранять свою активность в течение 10–15 лет, находясь вне насекомого. Заражение насекомого вирусом происходит при питании вредителя. Попавшие в кишечник вирионы проникают в клетки организма, и в ядрах этих клеток происходит репликация вирусов. Высвободившиеся вирусы поражают другие клетки до тех пор, пока насекомое не погибнет.

Отличительной особенностью жизнедеятельности вирусов является то, что они размножаются только в живой ткани. Поэтому производство любого вирусного препарата отличается от рассмотренных бактериальных препаратов.

Технология любого из вирусных препаратов начинается с разведения насекомого-хозяина на искусственных питательных средах, обеспечивающих их физиологически здоровое состояние. На определенной стадии развития (обычно на стадии гусеницы) насекомых заражают, добавляя вирусную суспензию к корму. При этом инокулят предварительно получают от нескольких больных личинок. После выдержки для максимального накопления вирусов в тканях насекомого (7–9 суток) собирают отмершие личинки, подсушивают их при 30...35 °С, измельчают механическим способом для вывода телец-включений из тканей. К полученной массе добавляют физиологический раствор или дистиллированную воду из расчета 1 мл на гусеницу, перемешивают и фильтруют (центрифугируют).

Готовые препараты изготавливают в виде водных растворов, масляных растворов, сухих порошков, паст и т. п.

**Биологические удобрения.** Присутствующая в почве микрофлора оказывает непосредственное влияние на ее плодородие, а следовательно, и на повышение урожайности. Почвенные микроорганизмы в процессе роста и развития улучшают структуру почв, накапливают в них питательные вещества, превращая органические и неорганические соединения в легкоусвояемые растениями компоненты питания.

С целью стимулирования деятельности почвенной микрофлоры разработаны различные бактериальные удобрения. В практике сельского хозяйства нашли применение такие бактериальные удобрения, как нитрагин, азотобактерин и фосфоробактерин.

*Симбиотическая азотфиксация.* На протяжении многих веков культуры семейства бобовых (горох, бобы, клевер, люцерна) использовались в системах севооборота, поскольку их корни обогащают почву азотом. В XIX веке было установлено, что наросты на корнях этих растений содержат симбиотические бактерии рода *Rhizobium*, которые могут усваивать азот из воздуха и превращать его в нитрат. В настоящее время штаммы этого микроорганизма выращивают промышленным способом, а затем добавляют в почву при посеве семян. Благодаря этому можно выращивать бобовые культуры в различных почвах, в том числе не содержащих симбиотических азотфиксаторов.

Нитрагин – бактериальное удобрение, приготовленное на основе жизнеспособных клубеньковых бактерий из рода *Rhizobium* и предна-

значенное для повышения урожая бобовых растений: гороха, фасоли, сои, люцерны, люпина и др. Бактерии способны фиксировать свободный азот атмосферы, превращая его в легкоусвояемые растениями соединения, поскольку в их организмах есть фермент нитрогеназа.

Процесс возможен только в симбиозе с бобовыми растениями: растение обеспечивает бактерии необходимыми питательными веществами и создает для них оптимальные условия существования, а бактерии, находясь в клубеньках, проросших в корни растения, снабжают его азотистым питанием. Ни растения, ни бактерии сами по себе не могут фиксировать азот.

Задачей конкретного производства бактериальных удобрений является максимально возможное накопление жизнеспособных клеток, сохранение их жизнеспособности на всех стадиях технологического процесса и приготовление на их основе готовых форм препаратов с сохранением их активности в течение гарантийного срока.

Сухой нитрагин представляет собой порошок светло-серого или коричневого цвета, который содержит в 1 г препарата не менее 9 млрд жизнеспособных клеток в смеси с наполнителем (бентонитом, каолином, мелом и пр.).

Промышленное производство нитрагина построено по типичной схеме асептического микробиологического процесса. «Узким» местом является стадия высушивания, поскольку именно на этой стадии бактерии могут потерять жизнеспособность из-за температурных воздействий. Поэтому сушку осуществляют под вакуумом при 30...35 °С. Нитрагин способствует увеличению урожайности бобовых на 15...25 %, а в районах, где бобовые засеваются впервые, – на 100 %. Вносят препараты путем опудривания семян непосредственно перед посевом.

Азотобактерин – бактериальное удобрение, приготовленное на основе культуры свободноживущего почвенного микроорганизма *Azotobacter chroococcum*, способного фиксировать до 20 мг атмосферного азота на 1 г использованного сахара. Кроме того, эти бактерии выделяют в почву биологически активные вещества: никотиновую кислоту (витамин РР), пантотеновую кислоту, пиридоксин, биотин (витамин Н) и некоторые фунгицидные вещества, угнетающие развитие нежелательных микроскопических грибов.

Все виды азотобактера – строгие аэробы. Бактерии этого вида очень чувствительны к наличию фосфора и развиваются при высоком содержании его в питательной среде. Технология получения азотобактерина имеет много общего с технологией производства нитраги-

на, поэтому будут рассмотрены наиболее существенные отличия в его технологии.

Культуру микроорганизмов выращивают методом глубинного культивирования на среде, содержащей те же компоненты, что и при культивировании *Rhizobium*. Процесс ферментации проводят до начала стационарной фазы роста культуры, так как в этой стационарной фазе биологически активные вещества выделяются из клетки и остаются в культуральной жидкости.

Биологически активные вещества полностью или частично могут теряться и в процессе высушивания клеток, однако оставшиеся жизнеспособными клетки после выведения азотобактера из анабиоза восстанавливают способность продуцировать биологически активные вещества.

Использовать препараты азотобактерина рекомендуется лишь в плодородных почвах, содержащих фосфор и микроэлементы. Отсутствие последних отрицательно сказывается на жизнедеятельности вносимых бактерий. Применяют азотобактерин для бактеризации семян, рассады, компостов. При этом улучшается корневое питание растений и на 10...15 % повышается урожайность зерновых, технических и овощных культур.

Фосфоробактерин – бактериальное удобрение, содержащее споры микроорганизма *Bacillus phosphaticum*. Бактерии обладают способностью превращать сложные фосфорорганические соединения (нуклеиновые кислоты, нуклеопротеины и др.) и трудноусвояемые минеральные фосфаты (пирофосфаты, полифосфаты) в доступную для растений форму. Кроме того, они также вырабатывают различные биологически активные вещества, в том числе витамины, стимулирующие рост растений, особенно на ранних стадиях их развития.

Культуру *Bacillus phosphaticum* выращивают глубинным способом. Полученную в ходе культивирования биомассу клеток отделяют центрифугированием и высушивают в распылительной сушилке при 65...75 °С до остаточной влажности 2...3 %. Высушенные споры смешивают с наполнителем (каолином).

Следует отметить, что фосфоробактерин не заменяет фосфорные удобрения, а резко увеличивает их эффективность, поэтому его вносят вместе с фосфорными удобрениями. Фосфоробактерин рекомендуют применять на черноземных почвах. Он необходим для повышения урожайности зерновых, картофеля, сахарной свеклы и других сельскохозяйственных растений.

### 3.3. ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

*Использование микроорганизмов для биодegradации. – Экологические проблемы биотехнологических производств. – Утилизация стоков, отходов, выбросов. – Биорекультивация нефтезагрязненных территорий.*

Впервые термин «экология» был введен в научную литературу еще в XIX в. известным биологом Э. Геккелем. Экология (по Геккелю) – это «общая наука об отношениях организмов к окружающей среде».

Антропогенное воздействие на биосферу неотъемлемо от развития цивилизации. Распашка земель, вырубка лесов, развитие интенсификация промышленности: стоки, отходы, выбросы, образование химических загрязнителей – актуальность проблемы влияния промышленности на биосферу сохраняется на всей планете.

Для биодegradации ксенобиотиков лучше использовать смешанные культуры (ассоциации) микроорганизмов, так как они более эффективны, чем отдельно взятые виды. При этом один вид микроорганизмов может непосредственно участвовать в разложении ксенобиотиков, а другой – поставлять недостающие питательные вещества, что в комплексе обеспечивает целевой процесс: уничтожение загрязнителя экологически безопасным путем.

Особенно трудно разлагаются такие биоциды, как детергенты, пластики и углеводороды. Самыми способными к борьбе с загрязнителями различного типа являются представители рода *Pseudomonas* – они практически «всеядны».

**Биологическая очистка стоков.** Существуют микроорганизмы, для которых загрязнения, содержащиеся в сточных водах, являются питательными веществами. Разработан метод аэробной биологической очистки сточных вод с помощью активного ила – сложной смеси микроорганизмов. В больших резервуарах с перемешиванием и постоянной аэрацией жидкости перерабатываются большие объемы хозяйственно-бытовых и промышленных стоков. Обычная очистка удаляет в основном органические загрязнения.

Имеются определенные виды микроорганизмов, которые способны осаждают на себя (сорбировать) металлы, растворенные в жидкости. Концентрация металлов при этом возрастает настолько, что после тепловой обработки биосорбент можно рассматривать как сырье для получения цветных металлов.

В случае биотехнологического производства жидкими отходами являются стоки и сточная жидкость, в основном это культуральная жидкость после отделения от нее мицелия и извлечения целевого продукта. Степень очистки, контролируемой разными методами, должна быть такой, чтобы очищенную жидкость можно было сливать в открытые водоемы.

Существуют разные схемы очистки. Почти во всех из них ключевую роль играют микроорганизмы (биологическая очистка). Первым компонентом системы очистки является железобетонный отстойник, куда попадает отработанная культуральная жидкость. На дне отстойника проложены трубы, через которые происходит отсасывание осадка. На этой стадии из культуральной жидкости удаляется примерно 40 % загрязнений.

Следующий участок системы очистки состоит из одного или нескольких расположенных один за другим аэротенков – баков с проходящими по дну трубами, из которых выходит в виде пузырьков воздух, проходящий через всю толщу жидкости, в результате она насыщается кислородом. Воздух способствует интенсивному протеканию окислительных процессов. Ключевая особенность аэротенка – наличие в нем так называемого «активного ила» (искусственного биоценоза – сообщества микроорганизмов, окисляющих растворенные в жидкости органические вещества до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ ), постепенно формирующегося в процессе работы предприятия.

Видовой состав биоценоза активного ила на разных предприятиях может незначительно варьировать, поскольку последний зависит от окисляемых субстратов. Как правило, в нем доминируют представители рода *Pseudomonas* (70 %). Далее следуют микроорганизмы, объединенные в род *Bacterium* (20 %). Остальные 10 % составляют представители родов *Bacillus*, *Sarcina* и другие микроорганизмы.

Характеризуя активный ил как биоценоз или как надорганизменное межвидовое сообщество применительно к очистке сточной жидкости биотехнологического производства, следует отметить три важных обстоятельства.

Во-первых, принципиальную роль здесь играют штаммы рода *Pseudomonas*. Для этих микроорганизмов характерен широкий набор окислительных ферментов. Препараты, состоящие из клеток *Pseudomonas*, используются при ликвидации загрязнений, вызванных утечкой нефти.

Во-вторых, превращение некоторых субстратов в  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$  осуществляется за счет последовательного воздействия на них фер-

ментов разных микроорганизмов. Иными словами, одна ферментная система превращает конкретное соединение в промежуточные продукты, а другая катализирует дальнейшую деградацию этих промежуточных продуктов. Этим подчеркивается, что активный ил функционирует как комплекс микроорганизмов.

В-третьих, следует иметь в виду, что в сточных водах некоторых производств (в частности, предприятий антибиотической промышленности) могут содержаться остаточные количества антимикробных веществ. Это означает, что микроорганизмы в аэротенках постоянно контактируют с ними, т. е. создаются условия для селекции резистентных форм. Но не исключены случаи, когда концентрация антимикробных веществ в очищаемых жидких отходах может оказаться необычно высокой и вызвать гибель клеток активного ила.

Это требует контроля за состоянием активного ила. После участка с аэротенком или несколькими последовательно расположенными аэротенками и вторичным отстойником принципиально важным для системы жидких отходов является «блок доочистки».

В нем культуральная жидкость, в которой остается примерно 10 % первоначального содержания органических веществ (как правило, это трудноокисляемые вещества), пропускается через биофильтры – пленки с иммобилизованными клетками микроорганизмов с наиболее высокой окислительной активностью.

Нередко эти клетки принадлежат к сконструированным методами генной инженерии штаммам, содержащим плазмиды, несущие гены окислительных ферментов (ферментов деструкции). Такие целенаправленно полученные «штаммы-деструкторы» способны окислять трудноокисляемые вещества и уничтожить оставшиеся 10 % загрязнений в очищаемой жидкости.

Иммобилизация клеток таких штаммов в биопленках рациональна ввиду того, что при свободном размножении этих клеток искусственно повышенная окислительная активность может быть утрачена за счет обратных мутаций или потери плазмид. В этом случае в «блоке доочистки» как бы «сочетаются» генная инженерия и инженерная энзимология. Прошедшая «блок доочистки» жидкость, соответствующая официальным критериям питьевой воды (одним из принятых методов контроля токсичности в данном случае является подавление жизнеспособности микроскопического ракообразного *Daphnia magna*), хлорируется и затем поступает в открытые водоемы.

Помимо аэробной очистки в схему могут быть включены: этап анаэробной очистки, этапы с использованием сорбентов (активиро-

ванного угля, цеолитов и др.), этапы с применением электрохимических методов (например, электрокоагуляции).

**Биокомпостирование твердых отходов.** Аналогом аэробной очистки стоков является аэробное биокомпостирование твердых отходов. Твердые отходы смешиваются с микроорганизмами, разлагающими вредные загрязнения, и балластным материалом типа торфа, который обеспечивает доступ кислорода к микроорганизмам. Это позволяет превратить отходы в удобрение или просто использовать их в качестве подсыпки для дорог, в строительстве и других случаях. Анаэробный способ переработки отходов основан на свойстве некоторых микроорганизмов в отсутствие кислорода разлагать органические вещества с образованием биогаза, состоящего на 65 % из метана и на 30 % из диоксида углерода.

Твердые отходы биотехнологического производства – это мицелий (биомасса) продуцента после его отделения от культуральной жидкости и целевого продукта. При этом объем слива промышленного ферментера – это 50...100 м<sup>3</sup> густой, вязкой (из-за наличия мицелия) жидкости. С учетом того, что на предприятии имеется ряд ферментеров, а ферментационный цикл длится около недели, можно сделать вывод, что этот вид твердых отходов на одном (крупном) предприятии составляет сотни тонн в год.

В настоящее время твердые отходы ликвидируют путем переработки мицелия. Его перемешивают с почвой и помещают в ямы с бетонными подложками. Каждую такую яму оставляют закрытой на несколько лет. За это время почвенные микроорганизмы подвергают органические вещества мицелия ферментативному расщеплению, используя их для построения «своей» биомассы. Фактически образуется компост, органическая часть мицелия при этом разлагается. Бетонная подложка в такого рода «компостных ямах» необходима, чтобы предотвратить попадание еще неразложившихся растворимых органических веществ мицелия в грунтовые воды и водоемы с дождевой водой. Обычно для компостных ям выделяют специальные участки на территории предприятия. Отметим, что вывоз подсушенного мицелия (его масса по сравнению с первоначальной уменьшается в 10...100 раз) на общегородские свалки запрещен.

**Газообразные отходы.** К ним применяют физические методы: абсорбция примесей на активированном угле и других поглотителях, жидкостями; химические методы – озонирование, прокаливание, каталитическое дожигание, хлорирование.

*Биологическая очистка газовых выбросов.* Многие выбросы промышленных предприятий в атмосферу содержат вредные или дурно пахнущие примеси. Для их очистки применяют биофильтры, заполненные насадкой, на которой закреплены специальные микроорганизмы. Вредные примеси сорбируются на насадке и затем потребляются и обезвреживаются микроорганизмами.

Биологические методы очистки воздуха базируются на способности микроорганизмов разрушать в аэробных условиях широкий спектр веществ и соединений до конечных продуктов,  $H_2O$  и  $CO_2$ . Микроорганизмы утилизируют аммиак, окисляют сернистый газ, сероводород и диметилсульфоксил. Представители рода *Nocardia* эффективно разрушают стерины и ксилол; *Hyphomicrobium* – дихлорэтан; *Xanthobacterium* – этан и дихлорэтан; *Mycobacterium* – винилхлорид. Представители рода *Pseudomonas* способны использовать в качестве единственного источника углерода, серы или азота свыше 100 соединений – загрязнителей биосферы.

Подавляющее число токсичных загрязнителей атмосферы может быть разрушено монокультурами микроорганизмов, но более эффективно применение смешанных культур, имеющих больший каталитический потенциал и, следовательно, деструктирующую способность. Для разрушения трудноутилизуемых соединений в ряде случаев микроорганизмы целесообразно адаптировать к таким субстратам и только после этого вводить их в действующие установки.

**Биодеградация нефтяных загрязнений на почве и воде.** Растущая индустриализация, продолжающийся рост населения, высокий спрос и зависимость от продуктов нефтехимии привели к беспрецедентному экономическому росту и развитию промышленности, но в последние десятилетия эти процессы сопровождались возникновением серьезных экологических проблем. Экотоксичность и потенциальные последствия для здоровья, которые нефтяные углеводороды представляют как для окружающей среды, так и для здоровья человека, привели к повышению интереса к разработкам, основанным на биотехнологии экологических методологий для детоксикации окружающей среды.

Основой восстановительных процессов нарушенных разливом нефти территорий является ферментативная активность углеводород-окисляющей микрофлоры, которая всегда присутствует в почве, но при массивном загрязнении находится в угнетенном состоянии. Утечки нефти в больших количествах усугубляют проблему и делают процесс самовосстановления невозможным.

Угнетение микробиоценоза в целом возникает не столько из-за токсичности компонентов нефти, но и по причине резкого изменения физико-химических характеристик почвы: отсутствия воды и кислорода, образования битумной пленки после испарения легких фракций, высокой концентрации углеводных компонентов при недостатке источников азота и фосфора.

Нефть – жидкий природный раствор, состоящий из большого числа углеводородов разнообразного строения и высокомолекулярных смолисто-асфальтеновых веществ, в котором растворено некоторое количество воды, солей и микроэлементов.

Общая токсичность нефти, как правило, невысока. В то же время отдельные компоненты нефти и продуктов ее биоразложения, преимущественно полиароматические и полициклические соединения, отличаются мутагенностью и канцерогенными свойствами, последствия их воздействия на живые организмы, в том числе и на человека, могут проявляться через многие годы и в последующих поколениях.

Экологические проблемы вызваны загрязнением территорий и акваторий нефтью, неизбежно происходящим из-за технических нарушений, несоблюдения регламентов, бесхозяйственности и применения стандартных приемов освоения территорий, без учета природно-климатической обстановки региона.

Плодородный слой почвы представляет собой сложную саморегулирующуюся систему, органоминеральный комплекс, требующий для поддержания своего существования конкретных условий. При загрязнении происходит изменение морфологических, физико-химических, биологических свойств биоценоза, что имеет последствия, приводящие к угнетению, деградации или полной гибели растительности. Степень повреждения прямо пропорциональна количеству вылитой нефти и зависит от видового разнообразия живых организмов.

Происходит резкое падение биомассы мезофауны, уменьшается мощность обитаемого слоя почвы, затрудняется и даже прекращается обогащение почвы кислородом, что существенно ограничивает существование аэробной микрофлоры, а в связи с этим прекращается и образование в почве необходимых для растений питательных веществ.

Специфическое воздействие нефти на живые системы может классифицироваться как прямая летальная токсичность на уровне клеточных и мембранных процессов, сублетальные нарушения физиологической активности, приводящие к нарушениям функций питания и размножения, прямое обволакивающее воздействие, включение

вредных веществ в ткани, концентрирование и передача полициклических ароматических углеводородов по пищевым цепям, изменение среды обитания, что приводит к сужению видового состава биоценоза.

Нефть, содержащая много легких фракций, окисляется на поверхности почв, особенно тяжелого механического состава, за счет фотохимических реакций. Проникновение нефти по профилю почв медленное и сопровождается резким фракционированием ее состава: в верхних горизонтах сорбируются высокомолекулярные фракции, особенно смолы и асфальтены. Твердый парафин не токсичен для живых организмов, но он надолго может запечатать все поры почвенного покрова, лишая почву свободного влагообмена и дыхания. В нижние горизонты и грунтовые воды по трещинам и ходам корней проникают низкомолекулярные соединения, растворимые в воде, и там в анаэробных условиях могут сохраняться длительное время, что неизбежно ведет к снижению или полной утрате почвенного плодородия или нативного биоценоза.

Оценивая последствия, трудно предусмотреть, сможет ли система самовосстановиться, но при разработке мер по ликвидации последствий необходимо исходить из главного принципа: не нанести природе еще больший ущерб, чем тот, что уже нанесен. Суть этого принципа – максимальная мобилизация внутренних ресурсов экосистемы с помощью рекультивации и применения комплекса мер естественно-биологической направленности.

Механизм самовосстановления биоценоза после нефтяного загрязнения достаточно сложен и занимает много времени (более 10–25 лет). Решающая роль в этом процессе принадлежит микроорганизмам, способным в многоступенчатом ферментативном процессе использовать загрязняющие вещества в качестве источника углерода и энергии. Но природные процессы происходят в нерегулируемых условиях среды, при влиянии ингибирующих и лимитирующих факторов, ограничивающих рост и размножение биомассы клеток.

Сокращение этого периода восстановления достигается применением системы биологической рекультивации, связанной с созданием благоприятных условий среды: достаточной влажности, обеспечения доступа кислорода структурированием и рыхлением почвы, выравнивания соотношения биогенных элементов внесением удобрений, нейтрализации.

Методы, применяемые для рекультивации, весьма разнообразны, накоплен определенный опыт применения технологий с разными вариантами обработки. Но в любом случае завершающим этапом ней-

трализации разлива углеводородов выступает деятельность специализированной углеводородоокисляющей микрофлоры.

После локализации разлива и сбора избыточной нефти специальными устройствами используются два пути обработки территории: активация собственной аборигенной микрофлоры почвы либо внесение специализированных биопрепаратов в жидкой или сухой форме.

Необходимость применения биопрепаратов в условиях современных темпов освоения природных ресурсов и нефтедобычи очевидна, поэтому их распространение увеличивается не только за рубежом, но и в нашей стране. Применение методов биотехнологии позволяет обеспечить экологическую безопасность этих процессов и одновременно снизить материальные и трудовые затраты на восстановление биоценозов. По сравнению с другими методами биоремедиация *in situ* является более автономной и дешевой, но чувствительной к условиям среды. При рассеянном загрязнении с низкими концентрациями углеводородов она незаменима, и большинство существующих биопрепаратов эффективны только при невысоких концентрациях загрязнителя.

Биологические методы ликвидации углеродных загрязнений основаны на метаболическом потенциале нефтеокисляющих микроорганизмов. Только деятельность микробиоценоза позволяет полностью ликвидировать загрязнение.

Но использование специализированной биомассы требует адаптации смешанных культур к конкретным объектам и задачам биоремедиации.

Специфическим методом изменения свойств клеток является адсорбция, которая вызывает интенсификацию метаболической активности и устойчивости к факторам внешней среды.

Использование иммобилизованных клеток биомассы нефтеокислителей *in vitro* – перспективная альтернатива традиционным методам, основанным на внесении свободных клеток.

Нефтезагрязненная почва есть естественная иммобилизованная система с особым распределением клеток по поверхностям минеральных частиц, компонентов органического происхождения, а также по поверхности абсорбированного загрязнителя.

Несомненными преимуществами здесь обладают биосорбенты, обладающие комбинированным действием: сорбция нефти с последующей микробиологической деструкцией углеводородов, без затрат на сбор и утилизацию после применения, способные работать в значительных концентрациях загрязнителя. В почве происходит восста-

новление количества и расширение многообразия микробного сообщества гетеротрофов, так как окисление углеводов заканчивается обычным гетеротрофным метаболизмом и приводит к нарастанию массы клеток и обогащению органическими веществами биогенного происхождения.

Существующие в настоящее время бактериальные биопрепараты эффективны при низких концентрациях нефти, поэтому существует потребность в создании консорциумов, работающих в условиях сильных загрязнений.

Известно, что монокультуры более специфичны по отношению к индивидуальным углеводородам, концентрациям, интервалам активности по pH, солености и температуре. Полибактериальные препараты имеют более широкие адаптационные экологические свойства и возможности расширения спектра окисляемых углеводов. Но в любом случае для каждого биопрепарата, учитывая его состав, требуется подбор условий получения, установления формы и сроков хранения, особенностей активации и внесения.

Для увеличения скорости биовосстановления применяют биомассу специально выделенных и адаптированных к высоким концентрациям загрязнителя штаммов, ферментативно активных к углеводородам и выращенных в глубинном аэробном жидкофазном процессе.

Одним из направлений использования может быть применение иммобилизации суспензии на полимерном пористом сорбенте.

Применение адсорбированных микроорганизмов имеет преимущества, связанные с фиксацией клеток в нефтезагрязненном слое почвы. Тем самым решается проблема вымывания клеток биодеструкторов из зоны биоремедиации током влаги, что увеличивает эффективность биодеструкции.

Определенные преимущества в этом случае имеют биосорбенты комбинированного действия. Благодаря высокопористой структуре, полученной из отвержденной пены на основе смеси органических и неорганических веществ, сорбент обладает высокой нефтеемкостью и достаточной прочностью. В то же время он может быть механическим носителем для микроорганизмов, с одной стороны, а с другой, его компоненты создают благоприятное соотношение биогенов в системе углерод : азот : фосфор и используются клетками в процессе метаболизма, ускоряя окисление компонентов загрязнителя.

Применение биосорбента позволяет осуществлять одновременно сбор и удержание нефти, локализацию разлива и биоокисление углеводов *in situ*, на месте, с использованием ферментативных

возможностей микроорганизмов. Для конкретных случаев следует принимать свое решение о выборе культур и концентраций для достижения планируемого эффекта с учетом почвенных, климатических условий, а также состава нефти и возраста разлива

При аварийных разливах нефти загрязненные территории обрабатывают специально выращенными нефтеокисляющими микроорганизмами, обеспечивают влажность и аэрацию, внося биосорбенты, различные добавки для их азотистого и фосфорного питания. Это позволяет утилизировать углеводороды нефти, превращая их в биомассу микроорганизмов и диоксид углерода. Преимущество бактериальной очистки по сравнению с химической заключается в том, что она не вызывает появления нового загрязняющего агента в окружающей среде.

### **Контрольные вопросы и задания для самоконтроля**

1. Какой общий вклад вносят биотехнологии в решение современных экологических проблем?
2. Что представляют собой биотехнологические отходы?
3. Какие основные виды микроорганизмов присутствуют в «активном иле»?
4. Какие существуют схемы по очистке твердых, жидких и газообразных отходов?
5. Какую роль играет генная инженерия в экологии?
6. Обоснуйте преимущества смешанных культур в процессах биорекультивации
7. Охарактеризуйте аэробную очистку стоков.
8. Как производится анаэробная очистка стоков?
9. Как осуществляется рекультивация загрязненных земель? Опишите ее методы и перспективы.
10. Какие факторы определяют скорость микробиологической очистки почв от загрязнений?
11. Какие биопрепараты применяют для рекультивации? Охарактеризуйте их преимущества и технологии использования.
12. Какие предварительные оценки необходимы перед внесением биопрепаратов в экосистему?
13. Назовите условия, необходимые для «работы» биопрепарата *in situ*.
14. Раскройте содержание понятий «микробиоценоз», «сукцессия», «чистая» и «смешанная культура».

15. Какие биопрепараты используют для очистки нефтезагрязнений?
16. В чем преимущества и эффективность биоудобрений?
17. Приведите блок-схему технологии производства биоудобрений.
18. Перечислите основные проблемы биотехнологических предприятий.
19. Охарактеризуйте понятие «замкнутый производственный цикл».
20. Оцените стоки, выбросы и отходы биотехнологического предприятия.
21. Охарактеризуйте методы биорекультивации нефтезагрязненных почв.
22. Приведите основные преимущества иммобилизованных биопрепаратов.
23. Охарактеризуйте сорбенты, их типы и применение в защите экосистем.

## ПОСЛЕСЛОВИЕ

Перспективность и эффективность применения биотехнологических процессов в различных сферах человеческой деятельности, от получения пищи и напитков до воспроизводства экологически чистых энергоносителей и новых материалов, обусловлены их компактностью и одновременно крупномасштабностью, высоким уровнем механизации и производительности труда.

Эти процессы поддаются контролю, регулированию и автоматизации. Биотехнологические процессы, в отличие от химических, реализуются в «мягких» условиях, при нормальном давлении, активной реакции и невысоких температурах среды; они в меньшей степени загрязняют окружающую среду отходами и побочными продуктами, мало зависят от климатических и погодных условий, не требуют больших земельных площадей, не нуждаются в применении пестицидов, гербицидов и других чужеродных для окружающей среды агентов.

Поэтому биотехнология в целом и ее отдельные разделы находятся в ряду наиболее приоритетных направлений научно-технического прогресса и являются ярким примером «высоких технологий», с которыми связывают перспективы развития многих производств.

Одним из основных инструментов биотехнологии стала геновая, или генетическая, инженерия, являющаяся разделом молекулярной генетики и разрабатывающая методики создания новых молекул ДНК с заданными свойствами. Другим направлением развития биотехнологии можно считать клеточную инженерию, исследующую возможности культивации отдельных клеток в заданных условиях искусственной питательной среды.

В глобальном смысле биотехнология служит задаче адаптации живой природы к человеческому воздействию, одновременно расширяя возможности этого воздействия, выступая, таким образом, в качестве фактора антропогенной адаптивной эволюции.

Биологические технологии находятся в настоящее время в фазе бурного развития, но уровень их развития во многом определяется научно-техническим потенциалом страны. Все высокоразвитые страны мира относят биотехнологию к одной из важнейших современных отраслей, считая ее ключевым методом реконструкции промышленности в соответствии с потребностями времени, и принимают меры по стимулированию ее развития.

Современное биотехнологическое производство возможно только с замкнутым циклом, когда все стоки, твердые отходы и газовые выбросы подвергаются тщательной очистке и возвращаются в производство либо на их основе получают побочные продукты, используемые в других отраслях.

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

### *Основной*

1. Биотехнология: теория и практика : учеб. пособие для вузов / Н. В. Загоскина, Л. В. Назаренко, Е. А. Калашникова и др. – М. : Оникс, 2009. – 496 с.
2. Биотехнология : учебник и практикум для академического бакалавриата : в 2 ч. / под общ. ред. Н. В. Загоскиной, Л. В. Назаренко. – 2-е изд., испр. и доп. – М. : Юрайт, 2019. – 189 с.
3. Егорова, Т. А. Основы биотехнологии : учеб. пособие / Т. А. Егорова, С. М. Клунова, Е. А. Живухина. – 3-е изд, стереотип. – М. : Академия, 2006. – 208 с.
4. Елинов, Н. П. Основы биотехнологии / Н. П. Елинов. – СПб. : Наука. Ленингр. отд-ние, 1995. – 189 с.
5. Егоров, Н. С. Основы биотехнологии / Н. С. Егоров. – М. : Высш. шк., 2003. – 223 с.
6. Сазыкин, Ю. О. Биотехнология : учеб. пособие для вузов / Ю. О. Сазыкин, С. Н. Орехов, И. И. Чикалева ; под ред. А. В. Катлинского. – М., 2006. – 254 с.
7. Рабинович, Г. Ю. Санитарно-микробиологический контроль объектов окружающей среды и пищевых продуктов с основами общей микробиологии : учеб. пособие / Г. Ю. Рабинович, Э. М. Сульман. – Тверь : ТГТУ, 2005. – 220 с.
8. Динамика микробиоценоза гетеротрофов в модельных опытах с применением биосорбента на основе смешанной бактериальной культуры / О. С. Федорова, Т. В. Рязанова // Системы. Методы. Технологии. – 2017. – № 1(3). – С. 127–164.

### *Интернет-ресурсы, электронные ресурсы*

1. [www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed) – свободный доступ в крупнейшую базу научных данных в области биомедицинских наук MedLine, включая биохимию.
2. [www.molbiol.ru](http://www.molbiol.ru) – учебники, научные монографии, обзоры, лабораторные практикумы в свободном доступе на сайте практической молекулярной биологии, на сайте [www.nature.ru](http://www.nature.ru).

## ПРИЛОЖЕНИЯ

### Приложение 1

#### Ключевые слова

Биотехнологическая лаборатория	Метаболиты первичные и вторичные
Направления биотехнологии	Биомасса
Фундаментальные исследования	Культуральная жидкость
Многоэтапность производства	Постферментационная стадия
Gras («generally recognized as safe»)	Центрифугирование
Фототрофы	Экстракция
Гетеротрофы	Коагуляция
Селекция	Выпаривание
Мутация	Целевой продукт
Вид и штамм продуцента	Биопрепараты
Бактерии	Генная инженерия
Вирусы	Клеточная инженерия
Мицелиальные грибы	Продуценты
Дрожжи	Редуценты
Клетки растительные и животные	Факторы среды
Суспензия клеток	Ферменты
Чистые культуры	Титр КОЕ
Биогенные элементы	<i>In vitro</i>
Наследственность	<i>In vivo</i>
Физиологические признаки	<i>In situ</i>
Морфологические признаки	Вакцины
Жидкофазное культивирование	Сыворотки
Твердофазное культивирование	Антибиотики
Пастеризация	Закваски
Стерилизация	Микробиологический контроль
Подготовительная стадия	Штамм
Питательные среды	Биогаз
Ферментер	Биодеградация
Культивирование	Сорбенты

## Важнейшие открытия в области биотехнологий

- **Основные открытия первого этапа:**
- 1879 г. – Л. Пастер, первая вакцинация, природа брожения
- 1917 г. – К. Эреки ввел термин "биотехнология"
- 1929 г. – А. Флеминг, пенициллин (НП)
- 1943 г. - произведен пенициллин в промышленном масштабе
- 1944 г. – Освальд Эвери, Коллин Маклеод, Маклин Маккарти доказали, что ДНК представляет собой генетический материал
- 1953 г. – Джеймс Уотсон, Фрэнсис Крик с Морисом Уилкинсом определили структуру молекулы ДНК, а Фредерик Сенгер - белка инсулина (НП)
- 1963 г. – Маршалл Ниренберг расшифровал генетический код (НП)
  
- **Основные события 2-го и 3-го этапов:**
- 1970 г. – В. Арбер, Х. Смит, Д. Натан выделили первую рестрицирующую эндонуклеазу (НП)
- 1972 г. – Хар Гобинд Корана с соавторами синтезировали полноразмерный ген тРНК
- 1973 г. – Герберт Бойер, Стэнли Коэн, начало технологии рекомбинантных ДНК (НП)
- 1975 г.- Георг Кёлер, Сезар Мильштейн, получение моноклональных антител (НП)
- 1976 г. – Волтер Гилберт и Алан Максам, Фредерик Сенгер разработали методы определения нуклеотидных последовательностей нуклеиновых кислот (НП)
- 1978 г. - первый выпуск человеческого инсулина, полученного с помощью *E. coli*
- 1988 г. - создан метод ПЦР, Кэри Мюллис (НП)
- 1990 г. - официально начат проект "Геном человека"
- 1994-95 гг. - опубликованы подробные генетические и физические карты хромосом человека
- 1996 г. - определена нуклеотидная последовательность всех хромосом эукариотического микроорганизма *Saccharomyces cerevisiae*
- 1997 г. - клонировано млекопитающее из дифференцированной соматической клетки

**Применение достижений биотехнологий в различных отраслях**

<p><b>Клеточная инженерия</b> – получение растительных клеток нового типа методами гибридизации, реконструкции и культивирования, с применением селекции</p>	<p><b>Генная инженерия</b> Получение продуцентов с новыми свойствами на основе рекомбинантной ДНК. Методы мутагенеза, конструирования и отбора</p>	<p><b>Фундаментальные исследования</b> по свойствам клеток и тканей, разработка методов культивирования и интенсификации биологических процессов</p>
<p><b>Совершенствование оборудования, устройства ферментеров, аппаратов тонкого разделения сложных смесей и др.</b></p>	<p><b>Биотопиво</b> – биогаз и биоэтанол, биобутанол <b>Вещества:</b> спирт, ацетон, полимеры, аминокислоты, органические кислоты</p>	<p><b>Разработка недр</b> – получение металлов методами биовыщелачивания с применением хемолитотрофных микроорганизмов</p>
<p><b>Пищевые продукты</b> Белок одноклеточных Переработка молока Продукты брожения – квас, пиво, сидр Хлебопекарные дрожжи Пищевые красители и ароматизаторы</p>	<p><b>БИОТЕХНОЛОГИЯ</b></p>	<p><b>Ферментные технологии</b> Моющие средства с ферментными добавками Биосенсоры Ферменты технического назначения: гидролазы, пектиназы Медицинские и пищевые ферменты</p>
<p><b>Переработка отходов (экологическая)</b> Рекультивация загрязнений Нефтяные разливы и продукты Отходы ЦБП, лесопереработки Муниципальные отходы Отходы предприятий промышленности и сельского хозяйства Очистка сточных вод и выбросов</p>	<p><b>Сельское хозяйство</b> Получение устойчивых к заболеваниям, гербицидам, пестицидам сортов растений Трансгенные животные и растения с высокой продуктивностью Средства защиты растений Биоудобрения, силос, кормовые дрожжи Получение безвирусного посевного материала Микроклональное размножение ценных растений</p>	<p><b>Медицинская биотехнология</b> Получение гормонов (инсулин, соматотропин) Антибиотики Моноклональные антитела Вакцины и сыворотки</p>

Внешнее строение бактерий

ТОНКОСТЕННЫЕ, ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫЕ БАКТЕРИИ		ТОЛСТОСТЕННЫЕ, ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНЫЕ БАКТЕРИИ	
Менингококки		Пневмококки	
Гонококки		Стрептококки	
Вейлонеллы		Стафилококки	
Палочки		Палочки	
Вибрионы		Бациллы*	
Кампилобактерии, Хеликобактерии		Клостридии*	
Спириллы		Коринебактерии	
Спирохеты		Микобактерии	
Риккетсии		Бифидобактерии	
Хламидии		Актиномицеты	

\*Расположение спор: 1 – центральное, 2 – субтерминальное, 3 – терминальное.

Схема строения клетки микроорганизмов

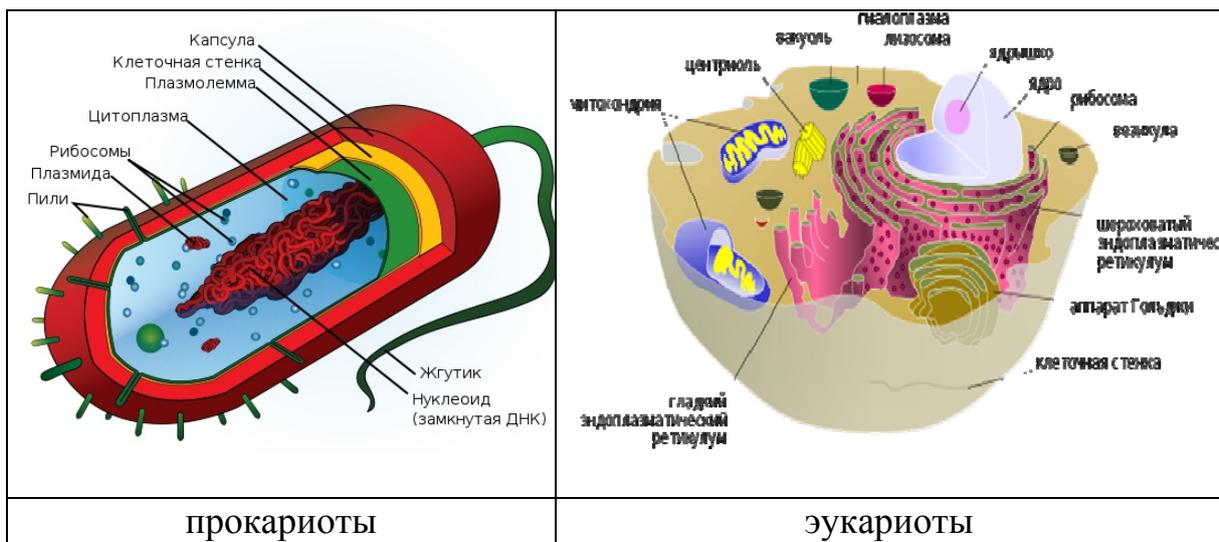
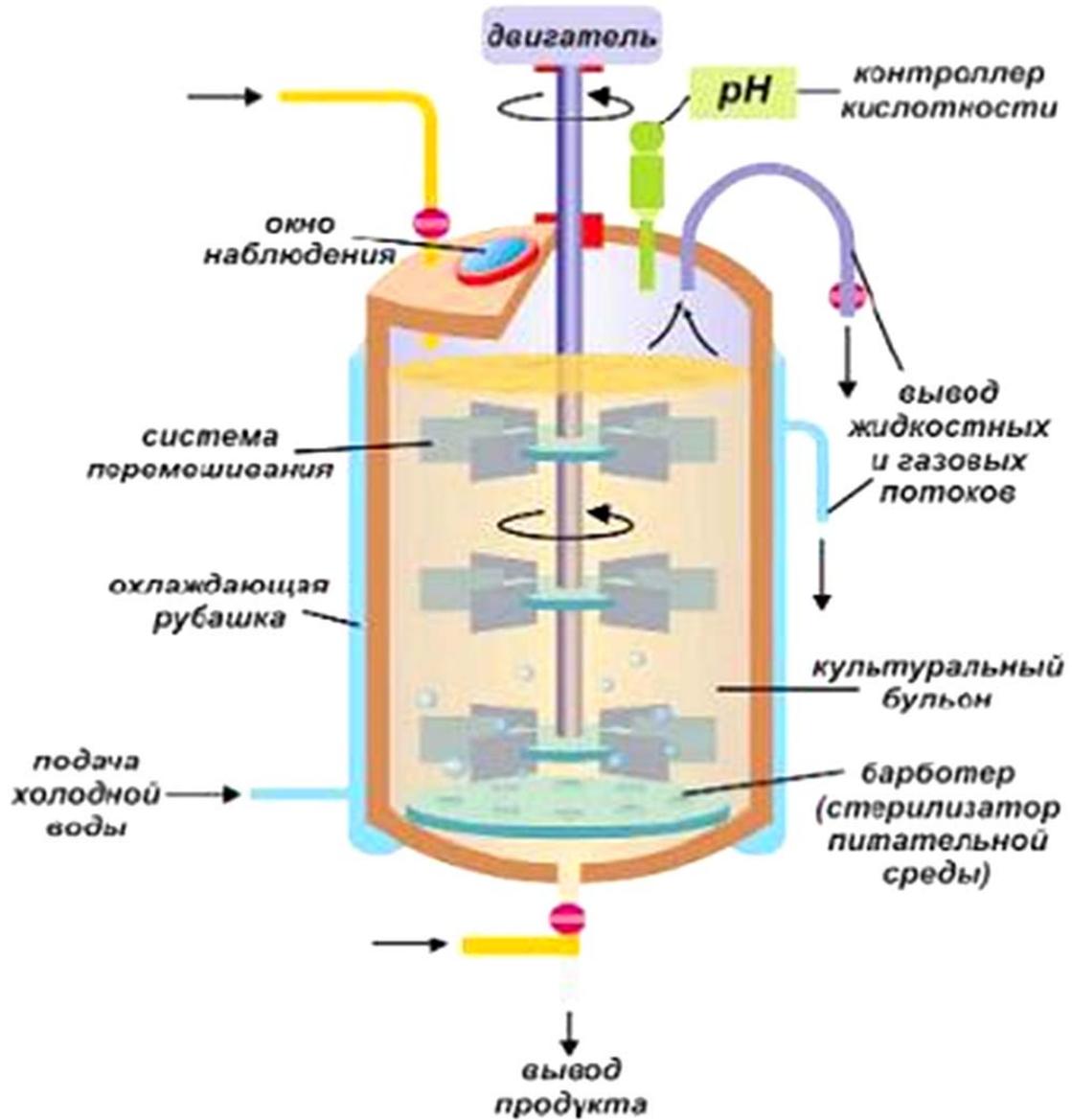


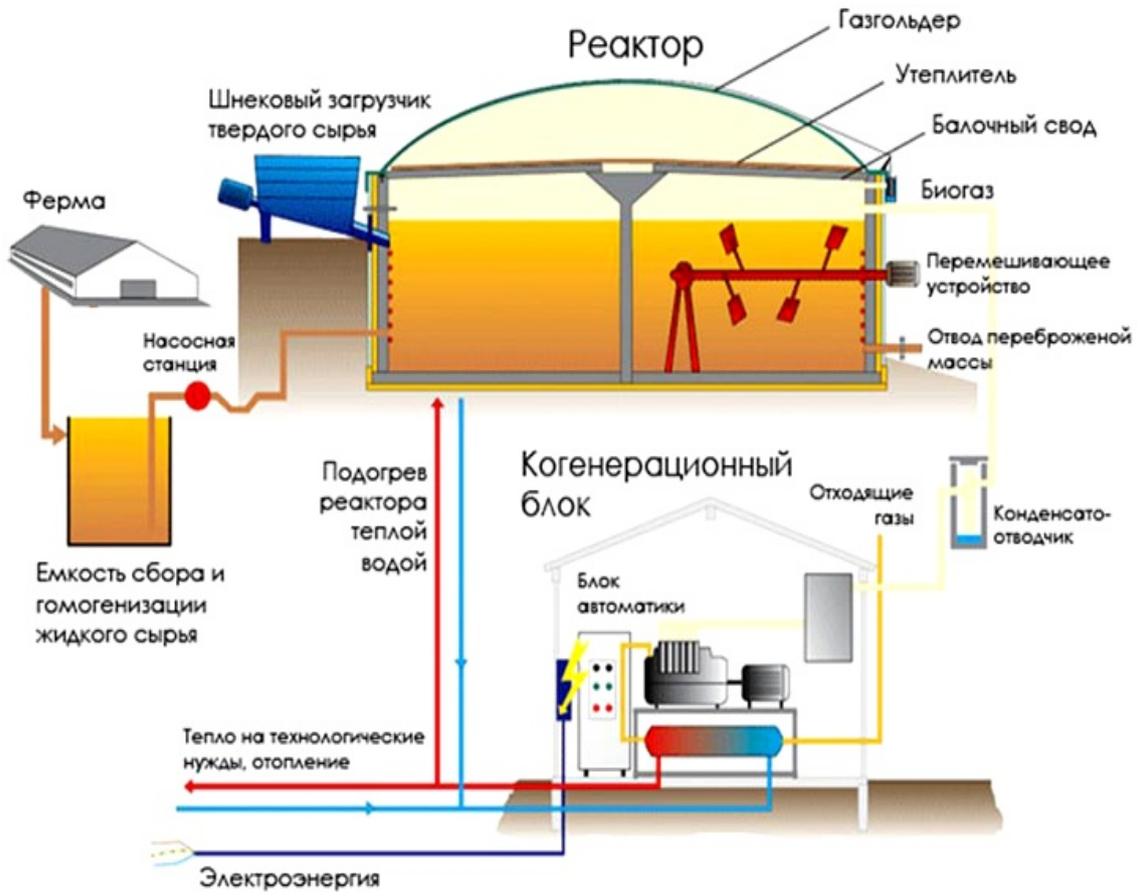
Схема ферментера для глубинного культивирования аэробов



**Основные факторы среды, определяющие рост и биосинтетическую активность продуцентов**

Фактор	Роль при культивировании	Методы управления фактором
Состав и концентрация питательных веществ	Обеспечивает метаболизм	Составление оптимальной композиции; подпитка во время ферментации; непрерывность процесса; многостадийность с учетом потребностей продуцента по фазам развития и др.
Концентрация продуктов и ингибиторов	Замедляет биохимические реакции	Осаждение продукта по мере накопления; ферментация с диализом; ферментация под разрежением с испарением летучего продукта и др.
Кислотность (рН)	Оптимизирует скорости биохимических реакций	Регулирование путем добавления кислоты или щелочи
Температура	То же	Охлаждение или подогрев культуральной жидкости при помощи теплообменников или температуры подаваемых в биореактор субстратов
Осмотическое давление или активность воды	Определяет границы жизни (составляет 0,6...0,998)	Составление сред с оптимальной концентрацией питательных веществ или влажностью твердой среды; поддержание на постоянном уровне во время ферментации путем разбавления водой или добавления отдельных компонентов
Содержание растворенного кислорода	Для аэробов обеспечивает аэробный метаболизм; является акцептором $H^+$ ; ингибирует развитие анаэробов	Для аэробных процессов регулируют интенсивностью аэрации или добавлением к газовой смеси кислорода. Анаэробные процессы реализуют в бескислородной среде
Содержание диоксида углерода	Источник углерода для автотрофов; некоторые гетеротрофы нуждаются, а некоторые замедляют метаболизм в присутствии $CO_2$	Продувание в фотосинтезирующих процессах ферментации газовой средой, обогащенной $CO_2$ ; выделению $CO_2$ из жидкой фазы способствует перемешивание
Перемешивание среды	Равномерное распределение питательных веществ и биомассы по всему пространству среды	Организуют макро- и микроперемешивание при помощи механических мешалок, барботажных, циркуляционных и других систем
Вязкость среды	Определяет диффузию питательных веществ и перемешивание клеток продуцента	Регулирование компонентами питания, характером и концентрацией биомассы, наличием некоторых полимерных продуктов. Вязкость влияет на перемешивание и аэрацию; требуются специальные технические средства

### Схема получения биотоплива



Учебно-теоретическое издание

**Федорова** Ольга Семеновна

**ВВЕДЕНИЕ В СПЕЦИАЛЬНОСТЬ.  
БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОИЗВОДСТВА**

*Учебное пособие*

Редактор *Т. Л. Патюкова*  
Оригинал-макет и верстка *М. А. Светлаковой*

Подписано в печать 16.05.2022. Формат 60×84/16. Бумага офисная.  
Печать плоская. Усл. печ. л. 5,2. Уч.-изд. л. 6,2. Тираж 50 экз.  
Заказ . С 547/22.

Санитарно-эпидемиологическое заключение  
№ 24.49.04.953.П.000032.01.03 от 29.01.2003 г.

Редакционно-издательский отдел СибГУ им. М. Ф. Решетнева.  
660037, г. Красноярск, просп. им. газ. «Красноярский рабочий», 31.  
E-mail: [rio@mail.sibsau.ru](mailto:rio@mail.sibsau.ru). Тел. (391) 291-90-96.

Отпечатано в редакционно-издательском центре  
СибГУ им. М. Ф. Решетнева.  
660049, г. Красноярск, просп. Мира, 82. Тел. (391) 222-73-28.