

Занятие семинарского типа № 4

ТЕМА ЗАНЯТИЯ: Структура биотехнологического производства

УЧЕБНЫЙ МАТЕРИАЛ

1. Современные концепции обеспечения качества биотехнологической продукции

Многолетний опыт показал, что гарантировать качество лекарственных средств можно с помощью строгого регламентирования всех этапов: доклинических исследований, клинических испытаний, производства и реализации.

На этапе доклинических исследований, когда проводится изучение фармакологической активности, токсичности и других характеристик лекарственных средств на животных, одной из основных задач является обеспечение объективности получаемых данных. Для достижения данной цели необходимо строго соблюдать правила лабораторной практики (GLP), которые впервые были разработаны и внедрены в США.

Правила GLP – правильно или надлежащим образом организованные лабораторные испытания (более точный перевод – не лабораторные, а доклинические или предклинические испытания нового лекарственного препарата) – требуют не только точного соблюдения набора тестов, но и максимально возможной стандартизации условий при тестировании лекарственных средств. Достоверность результатов при работе с лабораторными данными определяют методологию, уровень организации и проведения доклинических исследований биотехнологических продуктов и лекарственных средств. Этими правилами регламентируются требования к административной структуре испытательного центра, квалификации и обязанностям специалистов, организации рабочих мест, документированию проводимых исследований, испытываемым веществам, эталонным препаратам, биомоделям и т.п.

На систему GLP опираются в случаях испытания веществ на: микробную обсемененность, пирогенность, токсичность (острую, подострую, хроническую), специфическую токсичность (концерогенность, антигенность, лекарственную зависимость и т.п.), безопасность при введении *in vivo* (абсорбция, распределение, скорость выведения, метаболизм), фармакологические испытания с оценкой фармакокинетики и фармакодинамики.

Новые, целенаправленно или случайно открытые вещества по спектру биологической активности могут изучаться в любых направлениях. Однако для проведения предклинических испытаний этих веществ необходимо обязательное соблюдение правил GLP, позволяющих обеспечить максимальную гарантию безопасности нового вещества при его последующем применении.

Новые лекарственные средства могут обладать видоспецифичностью и, несмотря на положительные результаты испытаний на животных, при клинических испытаниях на добровольцах могут привести к летальному исходу. В настоящее время предпринимаются попытки замены экспериментов на животных разными биохимическими и биофизическими тестами с использованием ферментных систем, тканей и органов беспозвоночных. Подобные попытки в основном направлены на гуманизацию экспериментов.

Использование стандартов GLP при доклинических испытаниях и инспектировании лабораторий позволяют гарантировать безопасность последующих клинических испытаний, что способствует обеспечению качества биотехнологических продуктов. Клинические испытания биотехнологических продуктов начинаются после экспертизы данных, полученных в ходе доклинических исследований. Основной целью клинических испытаний является установление эффективности и безопасности биотехнологических

препаратов, выявление побочных эффектов, определение диапазона терапевтических доз и т.п.

Все лекарственные средства должны производиться в соответствии с принципами и правилами производственной практики (GMP). Впервые правила GMP были разработаны в США в 1963 г. В дальнейшем, с 1975 г., данный документ неоднократно совершенствовался. GMP – единственная система требований по контролю качества лекарственных средств с начала переработки сырья до производства готовых лекарственных препаратов, включая общие требования к помещениям, оборудованию и персоналу. Правилами GMP установлены требования к организационной структуре предприятия, обязанностям отдела контроля качества, квалификации персонала, зданиям, помещениям, оборудованию, проведению контроля за укупорочными средствами, организации технологического процесса, упаковке и этикетированию, хранению и отгрузке, лабораторному контролю, регистрации и отчетности. Важное значение в правилах GMP отводится валидации биотехнологического производства.

Правила GMP – требования к регламенту производства лекарственных средств, обеспечивающему высокую культуру работы на предприятии в отношении всех выпускаемых лекарственных препаратов, – носят официальный характер. Они обязательны для всех предприятий, выпускающих, как готовые лекарственные средства, так и субстанции – БАВ, предназначенные для изготовления готовых лекарственных средств. Их несоблюдение ведет к налагаемым на предприятие санкциям, вплоть до закрытия.

Принятие такого документа означало, что фармакопеи в качестве единственного барьера, гарантирующего эффективность и безопасность лекарственных средств, стало недостаточна. В этой связи потребовалось усиление контроля за выпускаемой фармацевтической продукцией.

Правила GMP в их современном виде имеют сходную рубрикацию независимо от того, являются ли они национальными, региональными или международными. Они состоят из 8 разделов.

В первом разделе «Терминология» приводится определение ключевых понятий, используемых в документе.

Во втором разделе «Обеспечение качества» указаны обязательные мероприятия, включающие укомплектованность персоналом и наличие сотрудников, ответственных за качество продукции, регистрацию этапов производства; определяется порядок возврата серий продукции при нарушении ее качества, выяснение причин нарушений качества, т.д.

Третий раздел (с несколькими подразделами) касается персонала предприятия. В нем подчеркивается обязательность профильного образования для руководителя фармацевтического предприятия (но не владельца) и четкого разграничения функций руководящих работников. Специально оговаривается порядок подготовки персонала, личная гигиена и поведение персонала особенно в «чистых» помещениях. Перечисляются правила пользования и поддержания в функциональном состоянии технологической одежды. Кроме того, перечисляются инструкции для персонала, порядок доведения их до сведения работников и т.п.

Четвертый раздел правил GMP касается соответствия фармацевтическому производству зданий и помещений. В нем содержится свыше 40 требований, хотя такое требование, как обязательное расположение фармацевтического предприятия вне жилых зон и на большом расстоянии от других производств, отрицательно влияющих на качество продукции, выполнить очень трудно.

Правила GMP применительно к особенностям биотехнологического производства заключаются в следующем. При работе с продуцентами-рекомбинантами принимаются меры предосторожности, предусмотренные специальными инструкциями. Это касается, в частности, систем вентиляции помещений, их изоляции и т.д. Особые требования к биотехнологическому производству должны соблюдаться в производстве антибиотиков.

Учитывая аллергенность β -лактамов структур, рекомендуется производственные процессы, связанные с производством пенициллина и его производных, вести в отдельных помещениях. Пенициллин по сравнению с другими антибиотиками, выпускаемыми промышленностью, малотоксичен. Однако аллергенность, как известно, проявляется при исключительно малых концентрациях вещества, поэтому микроколичества пенициллина при попадании в лекарственные препараты других антибиотиков и вообще в другую продукцию могут вызывать нежелательные последствия. Для работы с пенициллином рекомендуется использовать отдельные емкости, трубопроводы и т.п.

Пятый раздел правил GMP относится к технологическому оборудованию, начиная с цеха ферментации, и заканчивая цехом химической очистки готового продукта. Оборудование должно быть адекватно процессам, контрольно-измерительные приборы в соответствии с графиком должны подвергаться проверке. Ряд рекомендаций касается конструкций оборудования, его размещения и эксплуатации. Так, обращается внимание на то, чтобы поверхность оборудования, соприкасающаяся с сырьем, полупродуктами и конечным продуктом, с ними не реагировала, не корродировала, выдерживала контакт с дезинфицирующими растворами и т.п.

Шестой раздел правил GMP касается производства в целом. Большое внимание уделяется исходному сырью (документация, условия хранения, контроль и т.д.). Для биотехнологического производства особое значение имеют такие виды сырья, как компоненты комплексных питательных сред (кукурузный экстракт, хлопковая, гороховая мука и др.). Согласно требованиям GMP такое сырье подвергается проверке на микробную контаминацию и хранится в отдельных помещениях (непроизводственных и неподвальных). Выдача серий (образцов) сырья для использования в производственном процессе регистрируется. Все это особенно важно для биотехнологического производства, учитывая трудность в стандартизации комплексных питательных сред. В этот раздел также входит важнейший пункт, в котором указано, что на предприятии обязателен постадийный контроль процесса, проводимый совместно работниками цехов и отдела технического контроля (ОТК). При этом проверяются соответствие сырья, вспомогательных материалов и полупродуктов требованиям нормативно-технической документации, санитарное состояние цехов и рабочих мест, выполнение регламентированных технологических операций. Расчеты постадийного контроля фиксируются. Записи результатов проверки хранятся не менее года по истечении срока годности лекарственного средства, при изготовлении которого производилась проверка. Таким образом, работа предприятия, если она ведется в соответствии с правилами GMP, позволяет иметь все необходимые документы для выявления причин чрезвычайных происшествий, даже если они произошли давно.

Седьмой раздел правил GMP посвящен ОТК. Указывается, что данный отдел обязателен для предприятия. Он контролирует не только готовый продукт, но также сырье и полупродукты при передаче из цеха в цех. Именно ОТК контролирует стабильность готового продукта (не менее 3 лет).

Восьмой раздел правил GMP называется «Валидация» (англ. *validation* – ратификация, подтверждение). Развернутая смысловая расшифровка названия данного раздела такова: «Оценка и документированное подтверждение соответствия производственного процесса и качества продукта установленным требованиям».

Валидация позволяет получить данные о соответствии технологического процесса регламенту, о соответствии качества готового продукта нормативно-технической документации. Оцениваются процесс, оборудование (его адекватность поставленной задаче), конечный продукт и пределы возможных отклонений в ведении процесса. Валидация завершается составлением отчета, на основании которого технологический процесс аттестуется или бракуется. Валидация проводится для каждого нового технологического процесса перед его внедрением в производство, как для стерильных, так и для нестерильных лекарственных средств. Повторная валидация проводится по графику,

ревалидация – при частичном изменении технологии уже существующего процесса (замене сырья, оборудования и др.). В этом отношении биотехнологическое производство имеет свою специфику, отличающую его от химико-технологического производства. Так, на биотехнологическом предприятии может происходить замена штамма продуцента. Нередко это «дочерний» штамм, полученный генетиками из штамма, уже используемого на предприятии, но образующий больше целевого продукта, т.е. более рентабельный. Более высокая активность нового продуцента означает наличие изменений в его метаболизме, которые могут приводить не только к большей продуктивности, но и к сдвигам у него в наборе и концентрации ряда метаболитов. Схема выделения и очистки целевого продукта, принятая согласно регламенту на предприятии, может в новых условиях оказаться неудовлетворительной, поэтому и процесс, и конечный продукт требуют валидации. Аналогично поступают в случаях, когда на предприятии заменяют ферментационную среду более продуктивной (или с менее дефицитными компонентами). Возможное изменение метаболизма продуцента требует валидации.

Перспективная валидация проводится перед внедрением технологического процесса в производство. Ретроспективная валидация представляет собой анализ данных, полученных за определенное время с соответствующими выводами.

При валидации допускается эксперимент – моделирование условий, в которых проводится технологический процесс, в сторону приближения к экстремальным условиям (повышение температуры в помещениях и т.п.), позволяющий выяснить границы отклонений, в пределах которых данный процесс не будет влиять на качество выпускаемой продукции. Иногда такие эксперименты сочетаются с более частым отбором проб для анализа по сравнению с предприятиями в регламенте. ВОЗ издано руководство по проведению валидации.

Правила GMP постепенно распространяются практически на все стороны фармацевтического предприятия и продолжают постоянно совершенствоваться. С недавнего времени, помимо вышеуказанных разделов, появились новые: «Отходы», «Работа по контракту», «Рекламация и отзыв продукта», «Повышение культуры работы предприятия», «Конкурентоспособность».

В настоящее время правила GMP приняты в 140 странах мира (в нашей стране в качестве примера соответствия правилам GMP производственных участков можно привести технологические линии по производству таблеток на предприятии «Акрихин», инъекционных препаратов «Ферейн», технологические линии фармацевтического предприятия при Институте кардиологии).

После завершения предклинических испытаний нового БАВ с положительным результатом соответствующие официальные инстанции выдают разрешение на его испытание в клинике.

В отношении правил GCP (правильная или надлежащая организация клинических испытаний) необходимо отметить 2 основных аспекта: соблюдение максимальной безопасности для испытуемых и достижение максимальной достоверности результатов, получаемых на пациентах-добровольцах. Обязательно, чтобы те люди, кому вводится новый лекарственный препарат, были об этом проинформированы и дали свое согласие на апробацию. Кроме того, они могут получить дополнительную информацию, в том числе и о праве на возмещение ущерба их здоровью в чрезвычайных случаях. За исключением специально оговоренных ситуаций испытания новых лекарственных препаратов на детях запрещены.

В последние годы в России и за рубежом внедряется новая форма защиты прав пациентов – организуются этические (общественные) комитеты, не подчиненные администрации лечебных учреждений, в которых проводятся испытания. В состав таких комитетов входят: медицинские работники, юристы, священнослужители, представители власти и т.д. Их функции ограничиваются контролем за соблюдением прав пациентов-добровольцев, на которых испытываются новые лекарственные препараты (в соответствии

с правилами GCP). Рекомендаций относительно назначаемых схем и режимов лечения этические комитеты не дают.

Вопрос о достоверности результатов клинических испытаний является довольно сложным. Одна из проблем – исключение влияния личной заинтересованности тех, кто испытывает лекарственный препарат. Причины такой заинтересованности могут быть различны: «давление» со стороны разработчиков лекарственных препаратов, фирм-владельцев данных лекарственных препаратов и др. Одним из путей повышения достоверности результатов клинических испытаний является объединение материалов, получаемых коллективами независимых исследователей. Так, данные, полученные в 5 клиниках (по 100 случаев применения в каждой), позволяют сделать более достоверные выводы об эффективности и безопасности лекарственного препарата, чем материалы, полученные на том же количестве больных, но в одном учреждении. Это один из примеров проведения клинических испытаний в соответствии с правилами GCP.

В целом проведение клинических испытаний фармацевтических препаратов регламентируется большим количеством взаимосвязанных документов. Изучение, испытание и производство фармацевтических препаратов жестко регламентируется, и новые лекарственные препараты проходят все указанные стадии, находясь непосредственно под контролем вначале правил GLP, затем – GCP и, наконец, – GMP.

2. Отличительные особенности биотехнологического производства

К характерным особенностям биотехнологического производства относятся:

1. процесс, как правило, реализуется в условиях строгой чистоты культуры, что достигается стерилизацией применяемого оборудования, а также всех компонентов, поступающих в биореактор;
2. культивирование проводится в гетерогенных многофазных системах, реологические свойства которых в ходе процесса часто изменяются;
3. многокомпонентность питательных сред;
4. сложность биохимических процессов регуляции роста биомассы и синтеза целевых продуктов (метаболитов);
5. автокаталитичность процесса, т.е. влияние продукта реакции на скорость протекания процесса;
6. более высокая переменчивость биотехнологических процессов по сравнению с химико-технологическими процессами;
7. относительно низкие скорости реакций, концентрации субстратов, получаемых продуктов, которые, как правило, еще не являются готовой продукцией;
8. обычно умеренная температура в пределах 20–40 °С и близкие к нейтральным значения рН;
9. различие условий, оптимальных для роста микроорганизмов и биосинтеза целевых продуктов метаболизма;
10. культивирование микроорганизмов – сложный технологический процесс, требующий для своего осуществления довольно сложной аппаратуры.

3. Общая структура биотехнологического производства

Современное промышленное производство продуктов биосинтеза представляют собой единую биотехнологическую систему, которая складывается из последовательных стадий и операций (рис. 1), количество и особенности которых зависят от вида производимой продукции и ее товарной формы. Совершенствование биотехнологического процесса может привести к созданию новых структурных единиц и к ликвидации устаревших. Определяющими факторами в данном случае являются:

- ✓ используемый биологический агент;
- ✓ субстрат и его биохимические и биофизические характеристики;
- ✓ аппаратное оформление, включая системы контроля и управления;

✓ соответствие технологических процессов, оборудования, помещений, качества продукции и ее упаковки международным требованиям GMP.

Процесс биотехнологического производства фармацевтических препаратов состоит из определенного количества составляющих и характеризуется разной степенью сложности. Его сложность обусловлена слагаемыми конкретного биотехнологического процесса, которые варьируют в зависимости от продуцента (микроорганизм, растение, млекопитающее и др.), и зависит от целевого конечного продукта. Если целевым продуктом является биомасса (живые клетки молочнокислых бактерий), то технологическая линия короче; если это субстрат для производства высокоочищенных инъекционных препаратов, то схема производства сложнее. Если источником целевого продукта является микроорганизм (при производстве антибиотиков), то для его культивирования обязательны асептические условия, соответствующее оборудование и специальная подготовка к проведению процесса.



Рис. 1. Общая структура биотехнологического производства

Свои особенности имеет биотехнологическое производство, основанное на использовании микроорганизмов-рекомбинантов, требующее усиленного контроля за стабильностью продуцента, а также тщательного соблюдения мер, предотвращающих возможность его попадания в окружающую среду. Такие меры предусматривают использование специального оборудования и соблюдение определенных правил, относящихся непосредственно к технологическому режиму.

4. Технология приготовления питательной среды для биосинтеза

Всем организмам присущ постоянный обмен веществ с окружающей их внешней средой. Для осуществления процессов питания и размножения необходимы определенные условия и, в первую очередь, наличие питательных веществ, из которых микроорганизмы

синтезируют составные части своего тела и получают необходимую энергию путем окисления различных веществ.

По типам питания бактерии подразделяют на: автотрофные (прототрофные) и гетеротрофные.

При подборе питательных сред для культивирования микроорганизмов следует учитывать множество факторов. Один из них связан со стехиометрией роста микроорганизмов и количеством биомассы, которое необходимо получить при культивировании. Основой для таких расчетов служит материальный баланс, связанный с превращением в процессе клеточного роста низкомолекулярных органических и неорганических соединений в биомассу. Для синтеза заданного количества биомассы в систему культивирования необходимо ввести достаточное количество питательных веществ (реагентов), взятых в определенном соотношении.

Для удовлетворения потребностей микроорганизмов, культивируемых в промышленных масштабах, конструируют производственные питательные среды. При этом соблюдают определенные принципы (рис. 2).

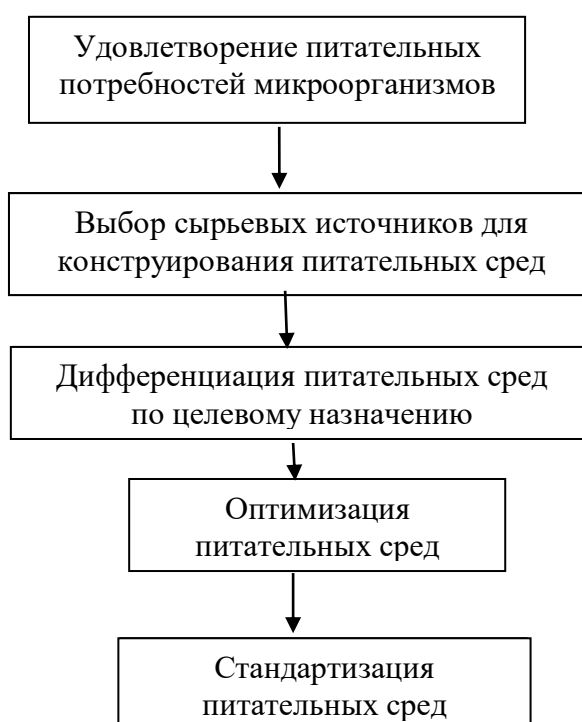


Рис. 2. Принципы конструирования производственных питательных сред

Характеристика питательных сред

В зависимости от состава и назначения питательные среды подразделяют на ряд групп.

По происхождению питательные среды классифицируют на:

✓ естественные (натуральные) среды, имеющие неопределенный химический состав, т.к. в них входят компоненты растительного или животного происхождения, а также отходы различных производств (молоко, картофель и др.). На таких средах хорошо развиваются многие биообъекты, т.к. в них, как правило, содержатся все компоненты, необходимые для роста и развития;

✓ искусственные (синтетические) среды – среды, в состав которых входят только определенные химические соединения, взятые в точно указанных концентрациях (мясопептонный бульон, мясопептонный желатин, мясопептонный агар и др.).

По физическому состоянию среды подразделяются на:

✓ жидкие среды используются для накопления биомассы или продуктов метаболизма;

✓ сыпучие среды (разваренное пшено, перловая крупа, отруби, пропитанные питательным раствором) используют для получения некоторых БАВ (ферменты и др.);

✓ плотные среды готовят из жидких сред, добавляя агар-агар, желатин или силикагель. Взятые в определенной концентрации агар-агар (1,5–2 %) и желатин (10 %), застывают в виде студня. Если к ним прибавить питательные вещества, то на их поверхности хорошо растут бактерии. Таким питательным веществом является мясной бульон, приготавливаемый из мяса, в котором осаждены белковые вещества и добавлены пептон и поваренная соль. Агар-агар не является питательным веществом, а желатин имеет определенную питательную ценность для бактерий, многие из которых способны его разжижать. При изготовлении сред из мясопептонного агар-агара и желатина их нагревают до растворения, фильтруют, разливают по пробиркам и стерилизуют. Необходимо иметь в виду, что агар-агар плавится при температуре, близкой к 100 °С, а желатин – в зависимости от его процентного состава в среде (чем выше его содержание в среде, тем выше температура плавления). Агар-агар застывает при температуре 40 °С. Агар-агар и желатин как питательные среды характеризуются рядом преимуществ и недостатков. Так, желатин плавится при температуре чуть выше 20 °С, что не позволяет культивировать на нем микроорганизмы при оптимальной для них температуре 25–30 °С, а для ряда болезнетворных – 37 °С. Желатин отличается прозрачностью и разжижается рядом бактерий. Последнее свойство служит в качестве одного из диагностических признаков при определении вида бактерий. Агар-агар отличается меньшей прозрачностью, не разжижается бактериями, за исключением нескольких видов, и позволяет культивировать на нем микроорганизмы при подходящей для них температуре.

Внастоящее время биотехнология все больше ориентируется на разнообразные виды недорогого, доступного и возобновляемого сырья, наиболее важным видом, которого является растительная масса. При конверсии субстрата в биотехнологических процессах стремятся наладить безотходное производство, когда отходы одного процесса служат сырьем для следующего.

Составные компоненты питательной среды

Вода. Неотъемлемой частью питательной среды служит вода, т.к. все процессы жизнедеятельности протекают только в водной среде. В большинстве случаев при приготовлении питательных сред используют воду очищенную, полученную методом дистилляции. Вода очищенная считается качественной, если не содержит аммиака, органических кислот и т.п. Значение рН воды допускается в пределах 5,0–6,8. В некоторых случаях, когда в среды добавляют перекристаллизованные реактивы в микроконцентрациях (тысячные доли процента и менее), применяют трижды очищенную воду. Если из воды необходимо удалить хлориды, соли тяжелых металлов или растворенные газы, можно использовать обессоленную воду (т.е. деионизированную или апирогенную). Питательные вещества образуют в воде истинные и коллоидные растворы, а также растворы ВМС. Отдельные компоненты питательной среды могут находиться в твердом состоянии и при этом они могут всплывать на поверхность (частицы угля или серы), равномерно распределяться по всему объему в виде взвеси или образовывать придонный осадок. Жидкие углеводороды при внесении в воду формируют особую несмешивающуюся фазу. При твердофазном культивировании вода только увлажняет плотную поверхность субстрата. Вещества, необходимые для культивирования, могут представлять собой газы, растворимые в воде: хорошо (аммиак, сероводород), умеренно (углекислый газ) или ограниченно (азот, кислород, водород, метан).

Углеродное питание. Наибольшее биогенное значение для любого живого организма имеет углерод, входящий в состав всех органических молекул, образующихся в клетке. На его долю приходится в среднем 50 % клеточного вещества. По этой причине источники

углерода занимают основное место среди компонентов питательных сред. Продуценты БАВ по отношению к источникам углерода являются, как правило, гетеротрофами, использующими в качестве углеродного питания углеводы, служащие источником пластического материала и источником энергии. В промышленности микробного синтеза широко используют чистые углеводы, а также природные и технические продукты, богатые углеводами, к которым относятся глюкоза, сахароза, лактоза, крахмал, кукурузная мука, меласса, зеленая патока.

Техническая глюкоза: содержит не менее 99,5 % редуцирующих веществ и практически представляет собой чистый углевод.

Сахароза (свекловичный или тростниковый сахар). Техническая сахароза содержит не менее 99,75 % сахарозы.

Лактоза (молочный сахар) содержится только в молоке. Ее получают из молочной сыворотки, образующейся при производстве сыров, творога и т.п.

Крахмал на 96–97 % состоит из полисахаридов двух типов – амилазы (10–20 %) и амилопектина (80–90 %). Цепи амилазы состоят из остатков D-глюкозы, связанных α -гликозидными связями между 1 и 4 углеродными атомами. Амилопектин представляет собой полимер глюкозы, но его молекула разветвлена, из-за наличия связей между 1–6 углеродными атомами. Крахмал получают из картофеля или кукурузы. Под действием амилотических ферментов крахмал расщепляется до глюкозы, которая утилизируется продуцентом по гликолитическому или пентозофосфатному пути.

Кукурузную муку получают при размалывании зерен кукурузы (часто в промышленности ею заменяют крахмал), является доступным и экономичным сырьем. Она содержит: крахмал (67–70 %), углеводы (клетчатка, пентозаны и др.) (10 %), белки (12 %), золу (0,9 %). Среди зольных элементов в кукурузной муке в наибольшем количестве присутствуют ионы фосфора, калия и магния.

Меласса – отход сахарного производства, представляющий собой маточный раствор, образующийся при отделении кристаллов сахарозы на центрифуге после третьей кристаллизации. Меласса – густая вязкая жидкость темно-коричневого цвета, состав которой непостоянен и может варьироваться в зависимости от почвенных и климатических условий выращивания свеклы, технологии переработки, условий транспортировки и хранения. Меласса содержит: сухие вещества (75–82 %), сахарозу (45–50 %), общий азот (1,2–2,2 %), золу (6–10 %). В мелассной золе присутствует много калия, магния, кальция, железа, но сравнительно мало фосфора. В мелассе содержится ряд аминокислот, витаминов группы В и органических кислот.

Зеленая патока – отход производства глюкозы из крахмала, содержащий не менее 76 % редуцирующих веществ, не более 3,5 % золы, не менее 50 % сухих веществ, 3,5 % углеводов. Основная часть ее зольных элементов – натрий хлорид, образующийся при нейтрализации соляной кислоты содой.

Азотное питание микроорганизмов по своему значению приближается к углеродному, хотя уступает последнему по объему. Азот входит в состав клеточных компонентов, обеспечивающих жизнеспособность организмов. Источниками азотного питания для продуцентов БАВ служат разные азотсодержащие вещества неорганического и органического происхождения. Источниками минерального азота являются соли аммония и азотной кислоты. В качестве органических источников азота применяются кукурузный экстракт и соевая мука.

Кукурузный экстракт – отход производства крахмала из кукуруз, представляющий собой густую жидкость темно-коричневого цвета с хлопьевидной взвесью или почти однородную. В его состав входят: азот общий (6–8 %), азот аммиачный (1–3 %), азот белковый (0,8–2 %), углеводы (0,1–10 %), органические кислоты (15–20 %), зола (не более 24 %). Основными элементами золы являются фосфор, калий, магний. Кукурузный экстракт содержит витамины группы В, некоторые ростовые вещества, биостимуляторы.

Соевую муку получают при размалывании соевых бобов, соевого жмыха и шрота, образующихся после извлечения соевого масла. Соевая мука бывает необезжиренная, полуобезжиренная и обезжиренная. Кроме того, соевая мука бывает дезодорированная (обработанная паром) и недозодорированная. Обработка паром позволяет увеличить срок хранения муки. Так, дезодорированная мука может храниться в течение 1 года, а недозодорированная – 1,5–2 мес. Из основных компонентов соевой муки особое значение для ферментации имеют азотсодержащие вещества. Азот соевой муки находится в составе белков, на долю которых приходится 40,5 %. Кроме белков в соевой муке содержатся углеводы (до 25 %), органические кислоты (1,5 %), зола (4,5–6,5 %). В необезжиренной муке присутствует 19,5 % жира. В состав золы входят ионы калия, магния, кальция, а также микроэлементы.

Минеральное питание играет важную роль в жизнедеятельности микроорганизмов. Содержание минеральных компонентов в клетке невелико, но функции очень важны. Они необходимы для регулирования осмотического давления, окислительно-восстановительных условий и величины рН; изменяют гидрофильность протоплазмы, а также играют пластическую роль, входя в состав конструктивного материала клеток. Минеральные элементы участвуют в формировании пространственной структуры биополимеров. Одна из основных функций минеральных элементов – участие в ферментативном катализе. Минеральный состав питательной среды формирует распределение электрических зарядов на поверхности клетки. Обычно клетки микроорганизмов имеют отрицательный заряд. При добавлении в среду электролитов он снижается и тем сильнее, чем выше валентность добавляемого противоиона. Изменение электрического потенциала клеток может изменить их физиологическую деятельность, воздействовать на селективность клеточной мембраны, вызывать флокуляцию и флотацию клеток.

Факторы роста необходимы микроорганизмам в малых дозах, они используются для синтеза физиологически активных веществ, регулирующих внутриклеточный метаболизм. К ним относятся помимо аминокислот, пуриновые и пиримидиновые основания, входящие в состав нуклеиновых кислот, витамины. В относительно больших количествах (10^{-5} – 10^{-4} М) необходимы углерод, кислород, азот, водород, фосфор, сера, калий, кальций, железо и магний. Содержание минеральных веществ в бактериальных клетках составляет 2–14 % к их сухой массе. Для роста биомассы необходимы и микроэлементы (10^{-8} – 10^{-5} М): медь, цинк, кобальт, никель, хлор, натрий, кремний, молибден, марганец и др. Действие факторов роста многогранно. Они могут участвовать процессах обмена веществ. В большинстве случаев потребность микроорганизмов в факторах роста зависит от состава среды и способности микроорганизма синтезировать витамины. Если биосистема их не синтезирует, то фактор роста обычно должен присутствовать в среде в готовом виде.

Технология питательных сред

Приготовление питательных сред осуществляется в специальных реакторах, оборудованных мешалками. В зависимости от растворимости и совместимости компонентов сред могут быть применены отдельные реакторы. Технология приготовления сред значительно усложняется, если в их состав входят нерастворимые компоненты. В различных биотехнологических процессах применяют разные по происхождению и количеству субстраты, поэтому процесс их приготовления варьируют.

Дозирование питательных компонентов осуществляется индивидуально на каждом производстве в соответствии с технологическим регламентом конкретного процесса. При этом в качестве дозирующего оборудования применяются весовые и объемные устройства, используемые в фармацевтической, химической и пищевой промышленности.

Транспорт веществ осуществляется насосами, ленточными и шнековыми транспортерами. Сыпучие компоненты подают в ферментеры с помощью вакуумных

насосов. Часто применяют принцип предварительных смесей, т.е. соли предварительно растворяют, а затем транспортируют по трубопроводам, дозируя их подачу по объему.

Стерилизация питательных сред

Используемые в промышленности среды стерилизуются термическим методом. Устойчивость микроорганизмов к термическому воздействию определяется рядом факторов, в частности их видовой принадлежностью. Учитывается, что споры гораздо устойчивее к нагреванию, чем вегетативные клетки. На эффективность термической стерилизации влияет и количество клеток в среде: чем их меньше, тем легче достигается стерилизующий эффект. Из этого следует, что перед стерилизацией необходимо понижать количество микробных клеток в среде.

Определяющее значение при термической стерилизации имеют температура и время ее поддержания: чем выше температура, тем быстрее достигается стерилизующий эффект. Для оценки эффективности стерилизации используют физические (по температуре и давлению пара), химические (по температуре плавления или изменению цвета), микробиологические (с высевом на стандартные среды), биоиндикаторные (с использованием *Bacillus stearotherophilus*) методы.

При термической стерилизации помимо гибели контаминирующих микроорганизмов могут разрушаться термолабильные вещества среды: витамины, ферменты, некоторые аминокислоты. С этим явлением, ухудшающим качество питательных сред, борются, повышая температуру и уменьшая время стерилизации.

Термическая стерилизация жидкостей осуществляется 2 способами: периодическим и непрерывным. При периодическом способе стерилизация происходит в самом ферментере. Одновременно нагревается весь объем среды до температуры стерилизации, которая выдерживается определенное время, а после понижается до заданной. Данный способ прост и, как правило, применяется в случае небольших аппаратов. К его недостаткам относятся: значительный градиент температуры по объему и «недостерилизация» в «тупиках». При непрерывном способе (более прогрессивном и производительном) стерилизация осуществляется в специальных установках. В результате температуру можно увеличить до 130–150 °С, при этом время стерилизации уменьшается до 3–10 мин., что положительно сказывается на качестве среды. Недостатком данного способа является увеличение протяженности трубопроводов, что повышает вероятность вторичной контаминации.

Одной из главных проблем получения стерильных питательных сред является сохранение их биологической полноценности – сохранение термолабильных компонентов, исключение процессов образования ингибиторов (продуктов разложения углеводов).

Холодная стерилизация (фльтрация) применяется для термолабильных объектов, в том числе для питательных сред. В последние годы наиболее широкое применение нашли безасбестовые целлюлозные и мембранные фильтрующие элементы. Данные фильтры изготавливаются размером пор от 12 до 0,01 мкм, толщиной около 80–150 мкм, хотя могут выпускать и с размером пор 5 нм. Холодная стерилизация включает в себя ультрафльтрацию, фльтрацию через мембранные фильтры фирмы «Millipore», «Владипор» и т.п. Мембраны изготавливаются из полипропилена, целлюлозы, пористой нержавеющей стали, спеченной ткани и проволочной сетки, микроволокна, нейлона, импрегнированной эпоксидной смолой целлюлозы и др.

Действие всех стерилизующих агентов основано на инактивации важнейших внутриклеточных веществ, необходимых для роста и репродукции клеток. Многие белки, особенно ферменты, которые весьма сложными путями включаются во все фазы клеточного развития и пролиферации, денатурируются под воздействием тепла. Они чувствительны и к молекулярным изменениям, вызываемым ионизирующей радиацией или токсическими химическими веществами, воздействующими на генетический материал клеток (хромосомы).

5. Технология приготовления посевного материала

Каждая производственная культура, используемая в качестве продуцента целевого продукта, должна иметь свой паспорт, в котором указаны: ее название, род (вид), коллекционный номер, средний уровень активности, серия, дата выпуска, срок годности, характеристика среды для выращивания и хранения.

Процесс подготовки посевного материала является многоступенчатым. Сначала исходная культура выращивается на агаризованной среде в пробирке. На этом этапе при высевании исходной культуры на агаризованную среду можно исследовать ее морфологию с целью определения чистоты культуры. Далее выращивание ведется в колбах в жидкой среде на качалке. На этой стадии включается процесс аэрации и происходит перемешивание исходной культуры с жидкой питательной средой при определенной температуре. Затем исходную культуру, перемешанную с жидкой средой, переносят в посевной аппарат (инокулятор) в количестве 10–25 % объема инокулятора, в котором также осуществляются перемешивание и аэрация. Иногда посевной аппарат называют маленьким ферментером, а производственный аппарат – большим, функциональные различия между ними отсутствуют.

При подготовке посевного материала происходит ступенчатое увеличение биомассы. В этой связи могут использоваться один или несколько посевных аппаратов, возрастающие по объему (выращивание посевного материала осуществляется примерно до уровня 5–10 % объема основного ферментера). У инокулятора есть устройство подачи и фильтрации воздуха. Этот ферментер, как и основной, снабжен технологическими окнами, датчиками, отбойниками и т.д. В посевном аппарате питательная среда стабильна. В ферментере по мере накопления целевого продукта с течением времени состав питательной среды изменяется, поэтому микроорганизмы начинают испытывать дефицит питания, и их ответом на такое воздействие является выработка, например, антибиотика.

6. Ферментация

Стадия ферментации является основной стадией в биотехнологическом процессе, т.к. в ходе ее происходит взаимодействие продуцента с субстратом и образование целевых продуктов. Эта стадия осуществляется в биотехнологическом реакторе (ферментере) и может быть организована различными способами в зависимости от особенностей используемого продуцента и требований к типу и качеству конечного продукта.

Промышленная ферментация – особый специализированный процесс получения различных веществ в химической и родственных отраслях промышленности с помощью микроорганизмов, включая процесс их размножения. С помощью данного процесса можно получить клеточный белок, дрожжи, ферменты, алкогольные напитки, органические кислоты, антибиотики, витамины и др.

В качестве микроорганизмов-продуцентов используют штаммы бактерий, в том числе актиномицеты, дрожжи, нитевидные грибы. В качестве субстратов используют углеводороды, такие, как тростниковый или свекловичный сахар, мелассу, глюкозу или крахмал. Кроме того, ферментацию можно проводить на жидких углеводородных фракциях, метане, метаноле и уксусной кислоте. Для проведения ферментации необходим азот, источником которого является химическое соединение, животное или растительное сырье, а также фосфор, калий и др.

Как отмечалось выше, ферментация осуществляется в биореакторе (ферментере). Ферментер – реакционная емкость, в которой обеспечивается питательное и физиологическое окружение культуры, необходимое для ее роста или получения нужных продуктов метаболизма.

Принципы оснащения биопроизводств:

1. конструкционное совершенство и относительная универсальность биореакторов;

2. инертность и коррозионная стойкость материалов биореакторов, другого технологического оборудования, влияющих на биообъект или контактирующих с ним или продуктами его метаболизма;

3. эксплуатационная надежность технологического оборудования;

4. доступность, эстетичность и легкость обслуживания, замены, очистки, обработки антисептиками и дезинфектантами узлов и соответствующих частей оборудования.

Согласно первому принципу, необходимо конструировать биореакторы, которые можно использовать для реализации биотехнологических процессов, основанных на использовании разных биообъектов (бактерий, грибов, клеток растений и животных).

Учитывая инертность материалов биореакторов, при выборе конструкционных материалов используют нержавеющую сталь, стекло, керамику, титан, чугун и т.п. Хром, никель, молибден как лигирующие элементы повышают жаростойкость и химическую стойкость чугуна. Полиэтилен и другие полимерные материалы также используют в биотехнологическом процессе.

Эксплуатационная надежность технологического оборудования обеспечивается соответствием аппаратов, приборов и другого оборудования целевому назначению, в частности по конструкционному совершенству, полностью обеспечивающему оптимальные условия для протекания технологического процесса и контроля за ним с учетом требований по технике безопасности.

Интенсивность работы оборудования может быть повышена за счет автоматизации и замены периодических процессов непрерывными, снижения энергоемкости аппарата, благодаря уменьшению расхода энергии на единицу сырья и конечного продукта.

Любой аппарат, легко доступный для сборки и разборки, загрузки материалами, питательными средами и выгрузки для чистки, мойки, смазки, ремонта и пр., оценивается выше, чем оборудование с усложненным доступом к его частям.

Техническую вооруженность биотехнологического производства целесообразно условно ограничить аппаратурным оформлением производств, базирующихся на культивировании: бактерий и грибов, клеток и тканей растений, клеток и тканей животных и человека. Такое подразделение обусловлено тем, что бактерии и грибы в большинстве своем выращивают в однотипных биореакторах, имеющих почти однотипную обвязку, в которую входят: ферментер, многокорпусный вентиль стерильный (для подачи питательной среды, посевного материала и пр.), система регулирования pH, температуры, подачи пеногасителя, система контроля расхода воздуха, пробоотборник и электродвигатель. Растительные клетки, имеющие клеточные стенки, растут, размножаются и развиваются значительно дольше, чем большинство бактерий и грибов, что вносит определенные коррективы в аппаратурное оформление соответствующих биотехнологических процессов. Культуры клеток животных и человека, не имеющие клеточных стенок, являются более требовательными к условиям своего существования, чем другие, поэтому оборудование для них можно отнести к разряду «тихоходного», обеспечивающего нежное обращение с биообъектами.

В связи с этим биореакторы подразделяются на:

- ✓ аппараты для выращивания посевного материала – инокуляторы;
- ✓ аппараты для культивирования микроорганизмов – культиваторы, ферментаторы, ферментеры больших объемов;
- ✓ аппарат для выращивания растительных клеток – фитатрей (мембранный контейнер для выращивания растительных клеточных культур);
- ✓ биореакторы для выращивания животных клеток относительно небольшого объема (до 10 л) с вибромешалками или медленными (щадящими) пропеллерными мешалками.

В зависимости от конструктивных особенностей биореакторов, их классифицируют следующим образом:

1) По способу потребления энергии для диспергирования и перемешивания стерильного воздуха:

а) энергия расходуется на механическое движение внутренних устройств;

б) энергия расходуется на работу внешнего насоса, обеспечивающего рециркуляцию жидкости и/или газа;

в) энергия расходуется на сжатие и подачу газа в культуральную жидкость.

2) По способу смешения газожидкостных фаз: барботажные, эрлифтные, барботажно-эрлифтные, перемещающе-барботажные, барботажные с циркуляционным перемешиванием, с роторным перемешиванием и аэрацией и т.п.

3) По способу ввода энергии для перемешивания:

а) с подводом энергии газовой фазой (барботажный, эрлифтный, форсуночный);

б) с подводом энергии жидкой фазой (эжекционный, с всасывающей мешалкой);

в) комбинированные (барботажный с механическим перемешиванием).

По типу целевого продукта в биосинтезе выделяют биомассу, высокомолекулярное индивидуальное вещество (ферменты и т.п.), низкомолекулярные первичные и вторичные метаболиты.

Ферментация может проходить, как в строго асептических условиях, так и без соблюдения условий асептики (незащищенная ферментация), может осуществляться в аэробных или анаэробных условиях, может происходить на поверхности питательной среды (поверхностное культивирование) или в ее глубине (глубинное культивирование). Кроме того, ферментация может быть периодической и непрерывной.

При поверхностной ферментации биообъект растет только на поверхности жидкой питательной среды. Хотя целевой продукт (если он водорастворим) распределяется по всему объему среды, биомасса его продуцента располагается лишь в виде поверхностной пленки в любого рода емкостях, включая микробиологические матрасы, колбы, бутылки и даже ферментер при условии, что не работают мешалка и барботажное устройство, т.е. массообмен и аэрация отсутствуют. В данном случае биомассы оказывается очень мало и, соответственно, образуется небольшое количество целевого продукта.

При глубинной ферментации, несмотря на различия конструкций ферментеров, клетки продуцента распределяются во всем объеме питательной среды вследствие работы мешалки или турбинного перемешивания, а также в результате пропускания воздуха под давлением через всю толщу среды. Все это делает процесс высокоэкономичным. В ферментере создаются условия для накопления большого количества активно функционирующей биомассы продуцента и, соответственно, целевого продукта.

В ходе периодической ферментации выращиваемая культура проходит ряд последовательных стадий: лаг-фазу, экспоненциальную фазу, фазу замедления роста, стационарную фазу и фазу отмирания. При этом происходят существенные изменения физиологического состояния биообъекта, а также ряда параметров среды. Целевые продукты образуются в экспоненциальной (первичные метаболиты – аминокислоты, витамины и др.) и стационарной (вторичные метаболиты – антибиотики и др.) фазах, поэтому в зависимости от целей биотехнологического процесса в современных промышленных процессах применяют принцип дифференцированных режимов культивирования. В результате этого создаются условия для максимального получения того или иного целевого продукта. Периодический способ прост и широко применяется на практике, хотя его нельзя считать оптимальным. При периодическом процессе в ферментер одновременно загружают все компоненты питательной среды и посевной материал, после включаются все элементы его обвязки и осуществляется полный цикл ферментации. После его завершения культуральная жидкость (вместе с мицелием) сливается и направляется в цех очистки для выделения и очистки целевого продукта.

Таким образом, какой-либо коррекции условий биосинтеза во время ферментационного цикла не выполняется: нет ни постоянного поддержания оптимального соотношения источников углерода, азота, фосфора, ни добавления в нужный момент предшественников целевого продукта, ни сохранения оптимального значения pH и т.п. Все это сказывается на продуктивности ферментации. Выход целевого продукта, как правило, снижается.

Полупериодический (регулируемый) процесс по сравнению с периодическим более прогрессивен. В данном случае улучшаются рост продуцента и биосинтез целевого продукта, появляется возможность коррекции процесса при его отклонениях от оптимальных условий.

Непрерывная ферментация заключается в том, что из ферментера непрерывно отбирают небольшие порции культуральной жидкости и одновременно в него вносят такой же объем свежей питательной среды. При этом система оказывается проточной. Использование непрерывного процесса целесообразно в том случае, если целевым продуктом является непосредственно сама биомасса выращиваемого микроорганизма. Непрерывная ферментация осуществляется в условиях установившегося режима, когда микробная популяция и ее продукты наиболее однородны. Применение непрерывного способа создает условия для эффективного регулирования и управления процессами биосинтеза. Системы непрерывной ферментации могут быть организованы по принципу полного вытеснения или полного смешения. Первый пример – так называемая тубулярная культура. При этом ферментация осуществляется в длинной трубе, в которую с одного конца непрерывно поступают питательные компоненты и инокулят, а с другой – с той же скоростью вытекает культуральная жидкость. Данная система проточной ферментации является гетерогенной и реализуется, как правило, без перемешивания. При непрерывной ферментации в ферментерах полного смешения (гомогенно-проточный метод) во всей массе ферментационного аппарата создаются одинаковые условия. Применение таких систем позволяет эффективно управлять отдельными стадиями, а также всем биотехнологическим процессом в целом и стабилизировать продуцент в практически любом требуемом биотехнологу состоянии. При непрерывном культивировании рост продуцентов поддерживается в экспоненциальной фазе. Различают 2 способа непрерывного культивирования: хемостатный и турбидостатный.

При хемостатном способе в биореактор с постоянной контролируемой скоростью подается питательная среда, один из компонентов которой поступает в количестве недостаточном для обеспечения максимальной скорости роста культуры, поэтому такой аппарат приобретает свойства саморегулируемой системы. Составными частями хемостата являются: устройство для подачи питательной среды, выпускное приспособление для оттока культуральной жидкости и система контроля скорости потока.

Турбидостатный режим культивирования основан на прямом контроле концентрации биомассы и полученного метаболита.

Достоинства и недостатки периодического и непрерывного методов культивирования: непрерывный способ позволяет получать большее количество биомассы, а при периодическом способе концентрация целевого продукта выше. Кроме того, при непрерывном способе требуется более сложное и дорогостоящее оборудование, чем при периодическом. Еще одним недостатком непрерывного способа является обрастание труб и стенок ферментера при работе в таком режиме, и как следствие, потеря штаммами продуцентов своих полезных свойств. При периодическом культивировании необходимы дополнительные затраты рабочей силы.

Отъемно-доливная ферментация представляет собой промежуточный процесс между периодическим и непрерывным культивированием. В данном случае культуральная жидкость отбирается более большими порциями, чем в непрерывном процессе.

Многоциклический процесс является еще одним вариантом периодической ферментации. После завершения ферментационного цикла при сливе культуральной жидкости, в аппарате ее оставляют примерно 10 %, затем вносят 90 % (объемн.) свежей

питательной среды, и реализуют новый ферментационный цикл. Таким образом, для осуществления данного процесса не требуются ни выращивание нового посевного материала, ни подготовка и стерилизация ферментера и трубопроводов, и одновременно экономятся время и средства.

В любом биореакторе или ферментере присутствуют следующие основные системы:

- 1) перемешивания и аэрации;
- 2) теплообмена;
- 3) пеногашения;
- 4) стерилизации.

Система перемешивания и аэрации. По способу перемешивания и аэрации ферментеры классифицируют на аппараты с механическим, пневматическим и циркуляционным перемешиванием.

Аппараты с механическим перемешиванием имеют механическую мешалку, состоящую из центрального вала и 6–8 лопастей разной формы (прямых или изогнутых). Эффективное перемешивание жидкости в больших объемах обеспечивается только в том случае, если мешалки многоярусны (лопасти расположены в несколько этажей). В систему перемешивания также входят отражательные перегородки (узкие металлические пластины, прикрепленные к внутренним стенкам биореактора), предотвращающие возникновение водоворота вокруг вращающейся мешалки, переводя круговое движение жидкости в вихревое, равномерно распределенное по всему объему. В таких аппаратах аэрация может осуществляться путем барботажа (подача воздуха в ферментер снизу вверх с помощью барботёра). Разбрызгиванию воздуха в виде мелких пузырьков способствует механический вибратор, установленный в непосредственной близости от барботера. Существуют аппараты, в которых вибратор, совершающий вертикальные колебания с амплитудой 0,1–3 мм частотой 50 Гц, служит единственным устройством для перемешивания жидкости. Такая система обеспечивает высокий уровень асептики, низкие энергозатраты и сравнительно низкий уровень травмируемости культивируемых клеток. В некоторых аппаратах используется полая мешалка. В данном случае воздух поступает в среду культивирования через нижний конец ее вала и полые лопасти. Вращение мешалки способствует диспергированию воздуха в жидкости. В таких аппаратах часто непосредственно над лопастями аэрирующей мешалки устанавливают диффузор (открытый сверху и снизу цилиндр, который делит объем биореактора на два отсека – внутренний и внешний по отношению к его стенкам), усиливающий разрежение, создаваемое при вращении мешалки в верхней части аппарата, в которой поверхность жидкости приобретает вид глубоко вогнутого мениска, и тем самым, способствует дополнительному подосу воздуха сверху и циркуляции жидкости в вертикальной плоскости аппарата. Аппараты с механическим перемешиванием – наиболее распространенная конструкция в современном биотехнологическом производстве. Перспективы их дальнейшего применения связаны с высокой скоростью массопередачи кислорода и значительной экономии мощности.

Аппараты с пневматическим перемешиванием. В таких аппаратах мешалка отсутствует, а перемешивание жидкости осуществляется пузырьками газа. Простейший аппарат данного типа представляет собой барботажную камеру, в которой воздух, распыленный барботером, поднимаясь снизу вверх, перемешивает культивационную среду. Скорость массопередачи между газом и жидкостью в таком аппарате намного ниже, чем в аппаратах с механическим перемешиванием. Для устранения этого недостатка вводятся разные модификации. Перемешивание и аэрация усиливаются с помощью вращающихся дисков с отверстиями, установленных вблизи барботёра или с помощью придонных пропеллеров.

На пневматическом перемешивании основан принцип действия многих биореакторов колонного типа, разделенных перфорированными горизонтальными

перегородками на секции. Основное назначение перегородок – интенсификация процессов аэрации и перемешивания, а также позволяют бороться с укрупнением газовых пузырей по мере их продвижения вверх, поэтому перегородки приобретают особое значение для аппаратов большой высоты. Таким путем уменьшается угроза избыточного пенообразования в биореакторе. Пневматические биореакторы, характеризующиеся плавным (щадящим) перемешиванием жидкости, хорошо зарекомендовали себя при культивировании клеток животных и растений. Так, в условиях таких «тихоходных» установок в культурах растительных клеток пробуждается биосинтетические способности, свойственные целым растениям. Пневматические аппараты привлекают также простотой конструкции и малыми энергозатратами. Хотя в то же время их «тихоходность» становится серьезным недостатком при реализации биотехнологических процессов, требующих интенсивного перемешивания или в биореакторах с вязкими средами. Преодоление «тихоходности» возможно в соплоконусных биореакторах, в которых мощная струя воздуха врывается в культуральную среду через отверстия (сопла, форсунки) в центре дна аппарата, имеющего форму конуса. В этом случае биосинтез целевого продукта происходит преимущественно в пенном слое.

Аппараты с циркуляционным перемешиванием содержат устройства (насосы, эжекторы), создающие направленный ток жидкости по замкнутому контуру. Жидкость увлекает за собой пузырьки газа. Насос для циркуляции культуральной жидкости может соседствовать с барботёром. В аппаратах типа «падающей струи» культуральная жидкость по трубе, соединяющей дно биореактора с его верхней частью, подается с помощью насоса в сопла на крышке аппарата. Пузырьки воздуха захватываются жидкостью струящейся сверху вниз в полости биореактора. В аппаратах типа «погружной струи» насос перекачивает культуральную жидкость сверху вниз по внешней трубе, она врывается внутрь биореактора через сопло в дне аппарата. Воздух подсасывается через эжекторы в стенках внешней трубы. Многие циркуляционные биореакторы, подобно пневматическим, разделены перфорированными перегородками на горизонтальные секции. Такая конструкция предпочтительна и для анаэробных процессов. Перспективность аппаратов данного типа связана с их высокой надежностью и простотой. Поскольку жидкость и воздух часто подаются независимо в каждую из секций аппарата, он по существу эквивалентен целой системе биореакторов, поставленных друг на друга, что позволяет экономить производственные площади и обеспечивает возможность проведения многоэтапного процесса. Аппараты циркуляционного типа часто заполняют твердыми частицами (насадкой) с целью улучшения перемешивания в биореакторе, а при длительном непрерывном культивировании они препятствуют обрастанию его стенок и способствуют диспергированию воздуха в жидкости.

Аэрация. В настоящее время разрабатываются новые способы аэрации. Так, предложен способ, при котором воздух подается через специальные полипропиленовые мембраны. Такой способ позволяет избежать пенообразования и хорошо себя зарекомендовал в биореакторах для культивирования клеток эукариот (при промышленном получении β -интерферона).

Эффективность аэрации может быть повышена с помощью переносчиков кислорода, добавляемых в среду культивирования. Механизм действия переносчиков кислорода различен:

- а) переносчик принимает кислород при контакте с газовой фазой и отдает его в жидкую фазу;
- б) переносчик принимает кислород из газовой фазы и отдает его непосредственно клетке;
- в) переносчик принимает кислород в жидкой фазе и отдает его при контакте с клеткой.

Система теплообмена. Микроорганизмы могут эффективно расти в определенных температурных условиях, поэтому необходимо создать во всем объеме биореактора оптимальную температуру с помощью специальных устройств (специальных труб, по которым подается охлаждающий или нагревающий агент, оплетающих ферментер в виде рубашки или устанавливаемых внутри ферментеров в виде змеевика). Для охлаждения используют артезианскую воду или воду, пропущенную через охлаждающие агенты (фреоны и т.п.). В качестве нагревательных агентов используют пар и горячую воду.

Система пеногашения – специфическая аппаратная система, характерная для биотехнологических процессов, т.к. их реализация сопровождается вспениванием культуральной жидкости в результате перемешивания. В некоторых случаях пенный слой благоприятен для культивирования, т.к. в данном случае он играет роль кислородного коктейля. Неблагоприятное явление – избыточное пенообразование, т.к. в данном случае возможна микробная контаминация среды. В этой связи пеногашение является средством борьбы с избыточным пенообразованием. Различают химический, механический, акустический и другие виды пеногасителей.

Химические пеногасители – чаще всего ПАВ, которые, внедряясь в стенки пузырей воздуха, становятся центрами их неустойчивости. Пеногасящие вещества различаются по своей эффективности, которую можно оценивать по уменьшению слоя пены при заданной концентрации пеногасителя. Остатки пенного слоя устраняются с большим трудом и требуют значительного расхода пеногасителя, а это экономически невыгодно, тем более что до известного предела пенообразование стимулирует рост культур. Пеногасители используют в небольшом количестве для обеспечения частичного гашения пены (т.е. для гашения избыточного количества пены). В качестве химических пеногасителей используют: растительные масла (соевое, подсолнечное, горчичное), животные жиры (рыбий жир), минеральные жиры, но «коварство» пеногасителей данной группы заключается в том, что продукты их утилизации микробной культурой сами способствуют пенообразованию. Преимущество жиров – в совмещении ими двух функций: гашение пены и одновременно они являются ценными субстратами. Данные пеногасители довольно дорогие, поэтому на практике чаще используют синтетические пеногасители, такие, например, как силиконовые масла, полимерные многоатомные спирты, полиэфир.

Механические пеногасители – механические устройства разного типа (лопасти, диски и т.п.), сбивающие пену, которые обычно располагают по периметру в верхней части ферментера. К более сложным приспособлениям относятся сепараторы пены, используемые также при сборе биомассы, содержащейся в пенном слое. Применение таких устройств связано с дополнительными энергозатратами. В интересах их минимизации часто прибегают к совместному использованию механических и химических пеногасителей.

Система стерилизации – специфическая система, характерная для биотехнологических процессов. Различают следующие основные виды стерилизации: термический, химический, фильтрационный, радиационный.

Наибольшее значение имеют термический метод для стерилизации оборудования и сред и фильтрационный – для удаления микроорганизмов из поступающего в биореактор воздуха или другого газа. Для стерилизации сред и оборудования, как правило, используют влажную термическую обработку, осуществляемую с применением воды и пара, обеспечивающую больший эффект по сравнению с нагреванием сухого биореактора. Чаще всего используют стерилизацию перегретым паром, вводимым под давлением непосредственно в аппарат или генерируемым непосредственно в биореакторе. Однако если в состав питательной среды входят белоксодержащие компоненты, то она может пригорать к электронагревателю, размещенному в биореакторе, поэтому в этом случае биореактор необходимо стерилизовать с нагретой водой очищенной, а среду – отдельно.

Эффективность и быстрота уничтожения микрофлоры возрастают по мере повышения температуры. Высокая температура нагревающего агента обеспечивает быструю гибель термоустойчивых бактериальных спор. В то же время по мере повышения температуры ощутимо возрастают энергозатраты на стерилизацию, усиливается отрицательное влияние нагревания на качество питательных сред. В этой связи необходимо найти оптимальную температуру, при которой достигается высокая надежность стерилизации, и сводятся до минимума энергозатраты и порча стерилизуемого материала. Применение пара, подаваемого через змеевики без прямого контакта со средой, ограничивает эффективность стерилизации. Этот метод, как правило, используется при стерилизации неводных сред.

Нагревание вызывает химические превращения компонентов питательных сред. При 100 °С и выше карбонильные группы углеводов вступают во взаимодействие с ионами аммония или с аминогруппами аминокислот и белков. При этом образуются не утилизируемые клетками продукты. Данный пример свидетельствует о необходимости в некоторых случаях отдельной стерилизации компонентов питательной среды. Разложение ряда БАВ (витаминов и т.п.) вынуждает ограничивать время и температуру термической стерилизации соответствующих питательных сред, а иногда и вовсе от нее отказаться. В этом случае применяют химические дезинфицирующие средства или фильтрационный метод. Хотя, следует учитывать, что фильтры быстро забиваются клетками микроорганизмов и другими взвешенными частицами. Иногда химические изменения субстратов в процессе термической стерилизации положительно влияют на качество питательных сред.

Фильтрация воздуха или другого газа обычно обходится без частой смены фильтров, поскольку в них содержание взвешенных частиц меньше, чем в жидких средах. Из фильтров разных типов наиболее перспективны мембранные фильтры из тефлона с диаметром пор около 0,2 мкм. Такие фильтры эффективно задерживают частицы с размерами в 100 раз меньшими указанного диаметра пор, что связано в основном с броуновским движением частиц в воздухе, отклоняющим их от прямолинейной траектории, а это обуславливает высокую вероятность столкновения частиц со стенками пор и их адсорбцию на них. Вследствие этого фильтрация приводит к освобождению воздуха не только от бактерий и их спор, но и от бактериофагов и других вирусов.

Способы стерилизации питательных сред

Стерилизация (от лат. *sterilis* – бесплодный) – процесс умерщвления на изделиях и в изделиях или удаления из объекта микроорганизмов всех видов, находящихся на разных стадиях развития, включая споры.

Стерилизация в автоклаве – один из наиболее распространенных методов стерилизации. Колбы или пробирки с питательными средами помещают в автоклав и нагревают до появления пара из крана, когда водяной пар вытеснит из него воздух. Затем кран закрывают и доводят давление до 2 атм., при котором температура в автоклаве достигает 121 °С. Стерилизуемый материал достаточно выдержать при данной температуре в течение 45 мин, для того чтобы убить все живое, даже самые устойчивые споры бактерий. Простерилизованный в автоклаве органический материал (бульон, яйца, мясо) может находиться десятки лет без каких либо изменений, но стоит у подобной простерилизованной колбы на минуту открыть ватную пробку, как на другой день начнется помутнение бульона и его разложение от попавших в среду из воздуха гнилостных бактерий.

Дробная стерилизация. Можно простерилизовать среду с таким же успехом, как и в автоклаве, используя обычное кипячение при температуре 100 °С. С этой целью поступают следующим образом: стерилизуют материал с применением кипятыльника Коха в течение 30 мин. в парах воды при температуре 100 °С. Затем оставляют субстрат на

сутки в термостате и через сутки вторично стерилизуют его при той же температуре в течение 30 мин. На третьи сутки операцию еще раз повторяют. Смысл дробной стерилизации заключается в том, что при температуре 100 °С погибают все бактерии и часть спор, менее устойчивых к нагреванию. В оставленном на сутки питательном субстрате споры прорастут и погибнут при втором кипячении. Для полной гарантии стерилизацию повторяют в третий раз. При подобном методе стерилизации достигается, как и при использовании автоклава, полная стерильность. Дробная стерилизация имеет преимущества перед стерилизацией в автоклаве. Так, некоторые питательные среды (желатин, среды, содержащие сахар) нельзя стерилизовать под давлением (желатин при этом не застывает, а сахар подвергается карамелизации).

Стерилизация сухим жаром. Оба вышеописанных метода применяются для стерилизации питательных сред. Пустая посуда (колбы, чашки Петри и др.) стерилизуются не влажным жаром, а сухим – в сушильном шкафу при температуре 150–160 °С в течение 1,5–2 ч. Сухой жар менее ядовит для бактерий, следовательно, требуется значительно больше времени для того, чтобы убить споры бактерий.

Платиновые иглы, пинцеты и другие металлические предметы стерилизуют нагреванием в пламени спиртовой или газовой горелки непосредственно перед употреблением.

Химический способ стерилизации основан на избирательной чувствительности микроорганизмов к разным химическим соединениям. К разновидностям химической стерилизации относятся:

✓ Стерилизация газами – стерилизация с использованием газов (оксида этилена, пропилена, β-пропиолактона), газовых смесей (оксид этилена с диоксидом углеродом или бромистым метилом) или аэрозолей. Данный метод применяют для стерилизации термолabile веществ, изделий из полимерных материалов, резины и стекла и т.д.

✓ Стерилизация растворами – стерилизация 6 % раствором пероксида водорода или 1 % раствором дезоксона-1 (по надуксусной кислоте); применяется для стерилизации изделий из полимерных и устойчивых к коррозии материалов, резины и стекла.

Радиационный способ используется только в заводских условиях при стерилизации ампулированных растворов. В данном случае источниками ионизирующего излучения служат долгоживущие изотопы $^{60}\text{Co}_{27}$, $^{137}\text{Cs}_{55}$, ускорители электронов. Для снижения разрушительного воздействия радиации на лекарственные вещества процесс проводят в присутствии стабилизирующих добавок или стерилизации подвергают предварительно замороженные растворы, или проводят двукратную стерилизацию с уменьшением на порядок дозы облучения с интервалом 0,5–3 месяца. На практике данный метод стерилизации применяется редко, что обусловливается сложностью конструкции и высокой стоимостью оборудования.

Фильтрационный метод стерилизации. Если необходимо простерилизовать какую-либо органическую жидкость, не выносящую нагревания, можно прибегнуть к холодной стерилизации при помощи фильтрации через бактериальный фильтр, выполненный из пористого фарфора, глины или мелко раздробленного стекла. Фильтр и посуда, служащая приемником, предварительно стерилизуются. Фильтрация ведется через бактериальный фильтр при разряжении воздуха с помощью водоструйного насоса. Данный метод стерилизации является очень перспективным, что обусловлено рядом таких его достоинств, как простота оборудования, удобство эксплуатации, щадящий режим работы.

7. Постферментационная стадия

Завершающей стадией любого биотехнологического процесса является выделение и очистка целевого продукта. Эта стадия существенно различается в зависимости от места накопления целевого продукта: в микроорганизме, на его поверхности или в культуральной жидкости.

В культуральной жидкости после окончания процесса культивирования содержатся микроорганизмы, продукты их жизнедеятельности, остатки питательной среды, пеногаситель, растворимые и нерастворимые вещества.

Целевым продуктом биосинтеза могут быть непосредственно сами микроорганизмы, их метаболиты, растворенные в культуральной жидкости или находящиеся внутри клеток.

Во всех случаях для получения целевого продукта необходимо отделить взвешенную фазу (массу микроорганизмов) от культуральной жидкости. Содержание микроорганизмов в культуральной жидкости, как правило, очень низкое. В 1 л содержится обычно 5–10 г сухой биомассы. Отделение такого количества взвешенной фазы – трудная технологическая задача, которую приходится решать путем концентрирования биомассы разными способами. При выборе схемы концентрирования и извлечения биомассы проводят предварительную экономическую оценку товарной формы биопрепаратов, концентрации микроорганизмов в культуральной жидкости и др. Часто выделить целевой продукт с помощью одного метода практически невозможно, поэтому, как правило, применяют комбинацию нескольких методов.

Операции выделения и очистки целевого продукта по технологическим признакам:

- ✓ отделение нерастворимых веществ;
- ✓ дезинтеграция микроорганизмов;
- ✓ выделение продуктов метаболического синтеза;
- ✓ первичная очистка;
- ✓ вторичная очистка и концентрирование;
- ✓ кристаллизация и стабилизация.

В большинстве случаев культуральная жидкость не может быть использована без дальнейшей обработки. Накопленный в ней ценный продукт микробиологического синтеза (антибиотики, ферменты, витамины и т.п.), а также биомассу микроорганизмов необходимо сконцентрировать и выделить.

Количество ценных продуктов биосинтеза нестабильно и подвержено влиянию различных факторов. Так, ферменты чувствительны к нагреванию, изменениям величины рН, а также к другим физическим и химическим воздействиям. При получении биомассы (при производстве вакцин) одним из важнейших требований является максимально возможное сохранение числа клеток. В этой связи при выборе метода выделения и очистки микроорганизмов и целевого продукта микробного синтеза необходимо учитывать следующие факторы:

- ✓ свойства культуральной жидкости (вязкость, рН, температура и др.);
- ✓ свойства выделяемого продукта (термолабильность, стабильность к различным химическим реагентам и др.);
- ✓ требования к конечной форме продукта (общая и биологическая концентрация, лекарственная форма, степень чистоты, степень концентрирования);
- ✓ технологические и технико-экономические показатели (выход продукта, производительность оборудования, необходимость дальнейшей обработки продукта, др.).

Все методы выделения и очистки микроорганизмов и продуктов микробного синтеза подразделяют на 2 группы (в зависимости от того, находится выделяемое вещество в растворе или в виде твердой фазы).

I. Для целевого продукта в виде твердой фазы используют: осаждение, флотацию, фильтрацию (микрофильтрацию, ультрафильтрацию), центрифугирование, сепарирование.

II. Для целевого продукта в растворенном виде используют: экстракцию, адсорбцию, кристаллизацию, диализ (обратный осмос), упаривание.

Часто невозможно выделить целевой продукт с помощью одного метода. В этом случае применяют комбинацию нескольких методов и в процессе выделения переводят продукт из растворимой формы в нерастворимую (или наоборот), иногда несколько раз (рис. 3).

Первый вариант выделения целевого продукта наиболее простой. На данной схеме базируется производство биотина (добавка к корму скота), основанное на использовании стрептомицетов (продуценты антибиотика хлортетрациклина). Кальциевый комплекс хлортетрациклина осаждают из культуральной жидкости при $pH > 7,0$, образующийся при этом осадок увлекает с собой и клетки продуцента. В данном случае в осадке вместе с биомассой оказываются внеклеточный антибиотик и внутриклеточный витамин B_{12} . Осадок отфильтровывают, сушат, измельчают. К нему добавляют отруби (в качестве носителя) и фасуют.

Вторая схема применяется, если целевым продуктом является биомасса клеток (кормовые и пекарские дрожжи). В этом случае вначале необходимо провести их концентрирование. Чаще всего для этих целей используют флотацию, с помощью которой увеличивают концентрацию дрожжей в 4–6 раз, а также центрифугирование.

В третьей схеме приведены методы извлечения целевых продуктов из биомассы. Так, полиеновые антибиотики экстрагируют органическими растворителями из нативных клеток, тогда как эндоферменты получают из разрушенных (дезинтегрированных) клеток.

Выделение большей части продуктов микробного синтеза из культуральной жидкости, согласно четвертой схеме, начинают при их содержании около 1,5 %. Однако для того, чтобы можно было эффективно выделить вещества из культуральной жидкости с помощью осаждения, кристаллизации, высушивания и др., ее необходимо подготовить к. Для этого проводят ее обработку с целью коагуляции коллоидных примесей и получения хорошо отделяемых осадков. Применяют несколько видов коагуляции: неорганическими солевыми электролитами, органическими и неорганическими кислотами, термической обработкой. Другими эффективными методами коагуляции дисперсных систем являются обработка их высокомолекулярными полиэлектролитами (флокулянтами), образовавшийся при этом осадок отфильтровывают, а из нативного раствора выделяют целевой продукт, используя экстракцию, ионный обмен, осаждение, кристаллизацию и др.

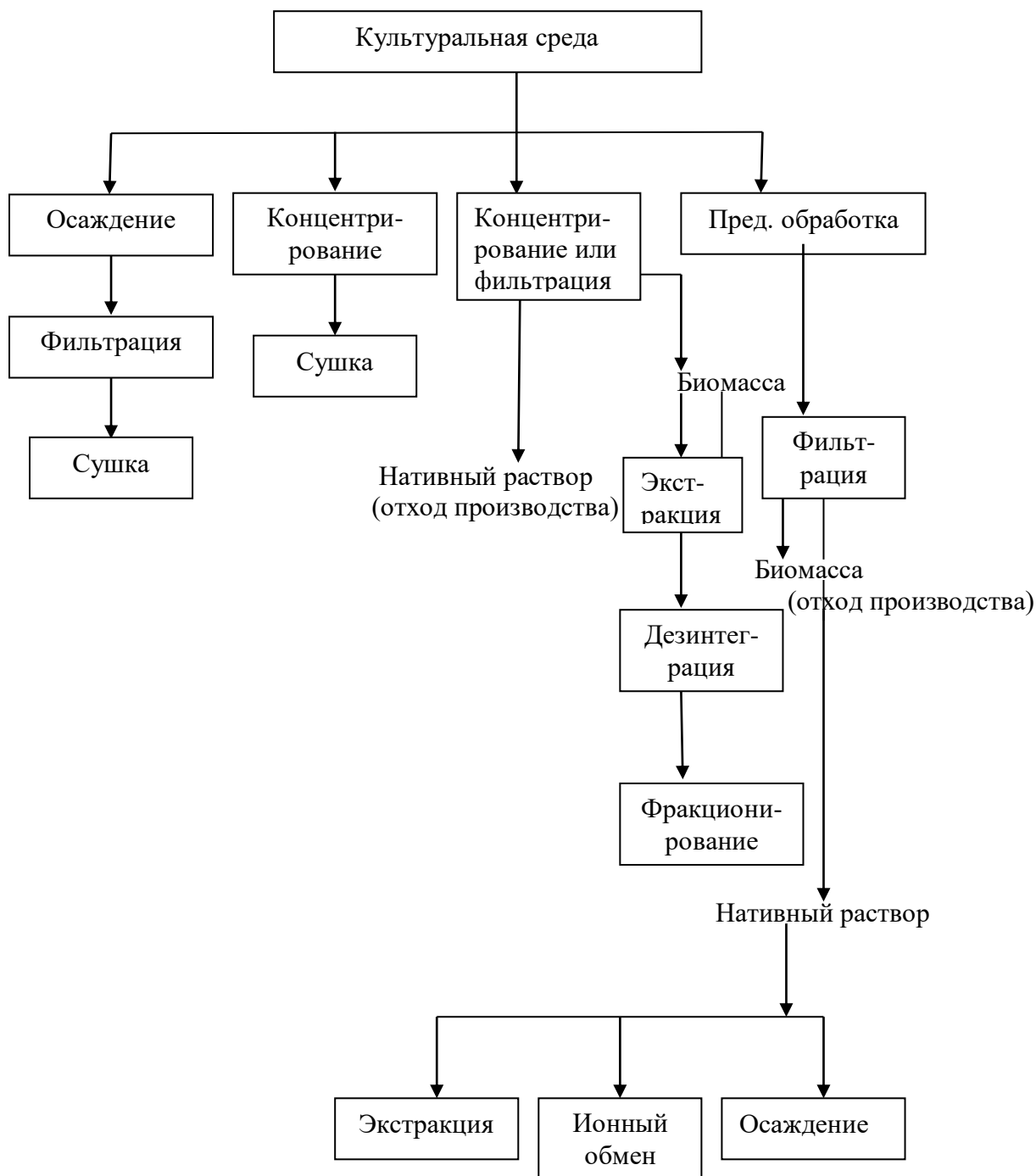


Рис. 3. Схема выделения и очистки биотехнологических продуктов

Рассмотрим основные элементы постферментационной стадии выделения и очистки внутриклеточного продукта биотехнологического производства:

1. Отделение биомассы от культуральной жидкости (сепарация). Различают несколько способов сепарации: флотация (применяется в том случае, если клетки продуцента накапливаются в верхних слоях биореактора), фильтрование с помощью фильтров разных конструкций (барабанные, дисковые, ленточные, тарельчатые, вакуумные, мембранные) и центрифугирование.

2. Дезинтеграция. Разрушение клеток можно проводить следующими методами: физическим, химическим и физико-химическим. К физическим методам относятся: разрушение УЗ, вращающимися лопастями или вибраторами, встряхиванием со стеклянными бусами, продавливанием через узкое отверстие с помощью высокого давления, размораживанием замороженной биомассы, растиранием в ступке, осмотическим шоком, попеременным замораживанием и оттаиванием, сжатием клеточной

суспензии с резким уменьшением давлением (компрессия – декомпрессия). Для физических методов дезинтеграции характерна высокая экономичность. Химическая дезинтеграция связана с разрушением клетки под действием таких веществ, как ферменты, ПАВ (ЭДТА), бутанол, толуол. При этом следует отметить, что по сравнению со спиртами более эффективное дезинтегрирующее воздействие оказывают ферменты. Кроме того, клеточная стенка может быть разрушена за счет ее обработки антибиотиками.

3. Отделение клеточной стенки от гомогената производится путем центрифугирования или фильтрации.

4. Отделение и очистка целевого продукта проводится после отделения клеточной стенки. Культуральная жидкость или гомогенат (в зависимости от места локализации целевого продукта) направляют на очистку с целью получения целевого продукта. Очистка осуществляется следующими способами: осаждением (перевод целевого продукта в малорастворимое или нерастворимое состояние), экстракцией (могут применяться 2 разновидности: твердо-жидкофазная и жидко-жидкофазная), адсорбцией (имеет 3 разновидности: электрофорез, электрофокусировка, хроматография).

5. Концентрирование целевого продукта. Необходимость проведения данной стадии обусловлена тем, что целевой продукт после стадии очистки находится в сильно разбавленном состоянии. Основными способами концентрирования являются: обратный осмос (связан с продвижением вещества против градиента концентрации через мембрану, т.е. основан на том, что внешнее прилагаемое давление должно быть больше осмотического); ультрафильтрация (основана на отделении целевого продукта с помощью полупроницаемой перегородки); выпаривание (наиболее простой и старый метод концентрирования веществ, существенным недостатком которого является то, что он осуществляется при повышенных температурах, обуславливающих ограниченность его практического применения; для реализации данного метода применяют вакуум-выпарные установки).

6. Обезвоживание (сушка) целевого продукта. В связи со значительным разнообразием методов сушки, выбор наиболее оптимального (в каждом конкретном случае) зависит физико-химических свойств целевого продукта: вязкость, термическая устойчивость и др. К наиболее часто применяемым способам сушки относятся: сушка на подносах, сушка с помощью сушилок (ленточных, барабанных и др.) и т.п.

7. Хранение целевого продукта. Высушенному целевому продукту придают необходимые товарные качества (в том числе при необходимости производят его химическую модификацию) и направляют на хранение.

8. Стабилизация целевого продукта направлена на сохранение его ценных свойств в период хранения или при использовании. Выделяют разные способы стабилизации: лиофильную сушку, высушивание на воздухе (на активированном угле, агар-агаре, шерстяных нитках и др.), сохранение в виде спор (применяют для спорообразующих микроорганизмов; метод заключается в том, что выращивают бактерии, создают условия для протекания спорообразования и осуществляют сохранение в виде спор), криоконсервация (замораживание осуществляют жидким азотом; хранение – в криобанках при температуре $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$, при этом за счет резкого охлаждения затормаживаются все биохимические процессы, т.е. наступает состояние близкое к анабиозу) и комбинированные методы хранения.

8. Контроль биотехнологических процессов

Важной составляющей любого биотехнологического производства является осуществление строгого контроля за реализацией каждого этапа получения целевого продукта. В этой связи контроль осуществляется, начиная с этапа приготовления и стерилизации питательной среды и подготовки культуры продуцента, и заканчивая стабилизацией и хранением готового продукта. При этом проводится постоянный контроль свойств штамма продуцента, его роста и развития на соответствующей питательной среде, а также контроль за условиями хранения целевого продукта. Для

Продолжение таблицы 2

Технологическая линия, стадия, этап	Параметры контроля и регулирования																				
	t °С	P	Gг	Gж	Gt	pH	eH	H	n	pO ₂	pCO ₂	O ₂	CO ₂	Pe	Гл	C	*M	ц	*П	с	
эмульгирование, осаждение, инактивация																					
Культивирование клеток и вирусов	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				+
Производство адьюванта (ГОА)	+	+	+	+	+	+	+	+	+											+	
Производство сывороток	+	+		+					+												
Производство глобулинов	+	+		+		+		+													
Консервирование биопрепаратов	+	+																			
Условные обозначения: * - разрабатываемые технические средства автоматизации; + - необходимость контроля и регулирования																					

Для того, чтобы процесс ферментации сделать управляемым, оператор должен постоянно получать информацию о развитии биообъекта и динамике среды культивирования. Важнейшими показателями процесса ферментации являются содержание биомассы, субстрата, продукта и отсутствие посторонней микрофлоры. Физическое состояние продуцента характеризуют: удельная скорость роста, его морфологическое состояние и ряд биохимических показателей. Большинство химических показателей определяют в периодически отобранной пробе, физические показатели – непрерывно при помощи вмонтированных в ферментер датчиков. Для определения величины рН и растворенного кислорода применяют стерилизуемые электроды, вмонтированные в ферментер. Для определения растворенного кислорода чаще всего применяют амперметрические серебряно-свинцовые или серебряно-золотые электроды.

Современный биотехнологический процесс немислим без применения ЭВМ для управления процессом ферментации: поддержание оптимальной величины рН, температуры, степени пенообразования, частоты вращения мешалки, количества растворимого кислорода, скорости подачи субстрата и т.п.

9. Обеспечение безопасности окружающей среды

С момента возникновения цивилизованного общества перед человечеством все время стояла проблема охраны окружающей среды. Из-за промышленной деятельности человека постоянно происходили изменения физических, химических и биологических свойств окружающей среды, причем большая часть из этих изменений была очень неблагоприятна.

Биотехнологическое производство наиболее приемлемо в современных условиях с экологической точки зрения, однако и оно имеет специфические экологические проблемы и, соответственно, совершенствуется в следующих направлениях:

- ✓ создания и использования более активных биообъектов-продуцентов (в результате на единицу продукции будет меньше отходов);
- ✓ замены сред и реагентов не менее дефицитные;
- ✓ иммобилизация биообъектов (клеток и ферментов), многократное их использование для уменьшения отходов;
- ✓ внедрения мембранной технологии на стадии выделения и очистки целевого продукта (уменьшение количества применяемых органических растворителей во избежание агрессивных условий на некоторых стадиях производственного процесса);
- ✓ соблюдение правил GMP.

Отходы биотехнологического производства

Отходы биотехнологических производств относятся к типу разлагающихся в природных условиях под действием разных факторов (биологических – минерализация с участием микроорганизмов, химических – окисление, физико-химических, благодаря комплексному воздействию).

Твердые (плотные) отходы в биотехнологических производствах – микробная масса, отделяемая от культуральной жидкости, поступающей на последующие стадии обработки с целью выделения и очистки целевого продукта, шламы, растительная биомасса после экстракции из нее действующих веществ (в случае суспензионной культуры, продуцирующей метаболит в питательную среду, отходом являются клетки); остатки куриных эмбрионов при культивировании вирусов, некоторые тканевые культуры млекопитающих, осадки из сточных вод и отработанный активный ил.

К плотным отходам относится и мицелий (биомасса) продуцента после его отделения от культуральной жидкости и целевого продукта. О количестве мицелия, с которым приходится иметь дело, можно получить наглядное представление исходя из того, что объем слива промышленного ферментера – 50–100 м³ густой, вязкой (из-за наличия мицелия) жидкости. Учитывая, что на предприятии имеется ряд ферментеров, а ферментационный цикл длится около недели, можно сделать вывод, что этот вид твердых отходов на одном предприятии составляет сотни тонн в год. При этом необходимо учитывать, что мицелий содержит остаточные количества целевого продукта.

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 таких компостных ямах необходима для того, чтобы предотвратить попадание еще неразложившихся растворимых органических веществ мицелия в грунтовые воды и водоемы с дождевой водой. Обычно для таких ям выделяют специальные участки на территории предприятия. Вывоз подсушенного мицелия (его масса по сравнению с первоначальной уменьшается в 10–100 раз) на общегородские свалки запрещен.

Попытки применения мицелия для тех или иных целей в целом пока не увенчались успехом, однако в лабораторных условиях уже разработана соответствующая малоотходная технология. Из мицелия актиномицета (продуцента тетрациклина) извлекалась суммарная липидная фракция и использовалась в качестве пенгасителя в следующем производственном цикле получения тетрациклина, образуемого продуцентом, принадлежащем к тому же штамму. В некоторых случаях (при ограниченности пастбищ) простерилизованную и перемолотую биомассу некоторых микроорганизмов используют в качестве добавки в корм сельскохозяйственных животных. Мицелий грибов и актиномицетов (отходы при производстве антибиотиков) повышает качество некоторых строительных материалов (красочные плиты, кирпич и др.), увеличивая их прочность. Хотя по экономическим соображениям производить эти материалы нецелесообразно.

Качество твердых отходов определяет выбор метода их обезвреживания: патогенные микроорганизмы (продуценты токсинов) должны быть обезврежены полностью, наиболее эффективный способ – сжигание. Если отходом является биомасса стрептомицетов, то ее достаточно утилизировать нагреванием с последующим вывозом на фермы, где она может применяться в качестве кормовой добавки в животноводстве или как удобрение, а также можно передавать на городские очистные сооружения для метанового сбраживания.

Если по технологической схеме твердые и жидкие отходы подаются в виде смешанного стока, то вначале осуществляют их грубое разделение, а затем производят удаление влаги с последующей передачей уплотненной биомассы клеток на обезвреживание.

Аналогичным образом поступают с твердыми отходами растительного или животного происхождения: токсичные – сжигают, а нетоксичные – отправляют на утилизацию.

При обезвреживании твердых отходов в биотехнологических производствах путем уничтожения, необходимо учитывать антигенные особенности такой микробной биомассы (способность вызывать образование антител *in vivo*), необходимо исключить сенсibiliзирующее действие ее на организм для исключения возникновения аллергических заболеваний.

В аэротенках очистных сооружений, в которых происходит обезвреживание отходов, лимитирующими факторами являются: природа и площадь биологической пленки, состоящей из микро- и макрофлоры, микро- и макрофауны, поэтому необходимо учитывать, чтобы плотные осадки, богатые органическими веществами, не приведут к ухудшению работы аэротенка.

При анаэробном метановом брожении практически любые органические вещества (за исключением лигнина) могут выступать субстратами, трансформирующимися до метана и углерода диоксида. Метан применяют в качестве топлива, а уголекислоту – в пищевой промышленности в качестве «сухого льда». Остающийся после метанового брожения плотный осадок – гумус, применяющийся в качестве удобрения при возделывании сельскохозяйственных культур растений.

Жидкие отходы. 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. Суммарный годовой объем культуральной жидкости, которая должна подвергаться очистке, составляет для одного предприятия десятки тысяч м³. Степень очистки, контролируемая разными методами, должна быть такой, чтобы очищенная жидкость могла сливаться в открытые водоемы.

Сточные воды бродильных производств неравноценны: одни из них могут быть названы условно чистыми (практически не отличаются от потребляемой в производстве природной воды – конденсаты, вода из теплообменников) и воды, загрязненные неорганическими и органическими примесями, попадающими от сырья (загрязнения при транспортировке, мойке картофеля, свеклы) и от оборудования (мойка технологической аппаратуры). Чистые воды могут быть повторно использованы в технологических процессах или направлены в чистые водоемы, а загрязненные воды освобождают от механических примесей и направляют на обезвреживание.

Отличительной особенностью биотехнологических процессов, основанных на выделении метаболитов из культуральной жидкости, является неравновесное соотношение целевого продукта и жидкой среды, в которой он содержится (1:100, 1:200, т.е. 1,05 % и менее). В подобных производствах количество жидких отходов значительно больше, чем плотных. Если последние содержатся в ощутимых количествах в сточной воде, то их отделяют, отжимают и обезвреживают. В зависимости от качества сточных вод также возможна их очистка до целесообразного уровня (получение оборотной воды, применяемой повторно в биотехнологическом производстве).

Растворенные органические вещества можно отделять с помощью активного ила в аэротенках или при аэробной обработке, на биологических капельных фильтрах; нитраты обезвреживают с помощью микробов-денитрификаторов (*Pseudomonas*, *Bac. licheniformis*, *Thiobacillus denitrificans* и др.), соли фосфорной кислоты коагулируют и осаждают. Образующиеся плотные осадки концентрируют, обезвоживают (фильтрованием, центрифугированием, отстаиванием на песчаном слое), затем сжигают или используют в качестве удобрения.

При обработке сточных вод до уровня чистой воды можно выделить следующие фазы:

✓ отделение крупных, легко осаждающихся частиц и масляных пленок (грубая очистка);

- ✓ отделение суспендированных частиц и растворенных органических веществ (умеренно тонкая очистка);
- ✓ отделение всех других примесей (тонкая очистка).

При грубой очистке отделяются частицы размером 100 мкм и более, при умеренно тонкой – от 1 мкм до 100 мкм; при тонкой – от 0,1 мкм до 1 мкм. Тонкой очистки сточных вод последовательно достигают: с помощью фильтрации через песчаные слои, хлорирования, фильтрации через активированный уголь, выпаривания, ионного обмена и др. Если в эту фазу образуются осадки, то их присоединяют к другим осадкам и обезвреживают.

Во всех случаях организации биотехнологических производств необходимо предусматривать отдельные системы стоков – технологических и коммунальных.

Загрязненные воды и промышленные стоки должны проходить обработку на предмет обезвреживания и очистки перед их поступлением в природные водные резервуары. Наличие в стоках ингибиторов или токсических веществ для микроорганизмов отрицательно сказывается на правильности измерения биологического потребления кислорода (БПК), а в случае попадания таких стоков в аэротенки или природные накопители, содержащие микрофлору и микрофауну, происходит нарушение их обезвреживания. Из различных токсических веществ и ингибиторов следует выделить соли тяжелых металлов, ПАВ, фенольные соединения и др. Тяжелые металлы необратимо ингибируют ферменты, вследствие блокады тиольных групп. В порядке снижения активности в отношении, например, микромицетов металлы можно расположить в следующем порядке: Ag, Hg, Cu, Cd, Cr, Ni, Pb, Co, Zn, Fe.

ПАВ по заряду подразделяют на катионные, анионные, амфотерные и неионогенные. Катионные ПАВ содержат гидрофильный радикал типа алифатической цепочки предельных углеводов, бензольного или нафталинового кольца с алкильным остатком, а также положительно заряженную гидрофильную группу, например, четвертичного аммония, сульфония, фосфония, арсония, йодония. Из них широко известны хлоргесидин, биглюконат, цетавлон и др. Катионными ПАВ являются циклопептидные антибиотики (грамицидин С, полимиксин В, циклоспорин А и др.).

К анионным ПАВ относятся структурные, сходные с катионными ПАВ в гидрофильной части, но имеющие отрицательно заряженную группу (карбоксильную, сульфатную, фосфатную). По объему производства они занимают ведущее место среди всех ПАВ. Хорошо известны изомерные смеси алкилбензолсульфонатов. Доступность таких структур для деградации микроорганизмами определяется природой алкила и α -углеродным атомом. Если алифатическая (гидрофобная) часть будет в виде неразветвленной цепи, то такое анионное ПАВ подвержено более глубокой деградации, чем такое же ПАВ, но с разветвленной цепью. В зависимости от характера гидрофильной группы в замещенных бензолах микроорганизмы активного ила по-разному разрушают данные структуры. «Биологическую податливость» веществ можно расположить в следующем порядке: $C_6H_5OH > C_6H_5COOH > C_6H_5NH_2 > C_6H_5SO_3H$. Из приведенных структур алкилбензолсульфонатов 2 последние легче подвергаются биологическому окислению.

К числу амфотерных ПАВ относятся такие структуры, у которых гидрофильная часть представлена катионной и анионной группами одновременно (амфолан). Они реже применяются на практике, поэтому не возникает особых проблем с их обезвреживанием.

Неионогенные ПАВ типа спанов (сложные эфиры жирных кислот и спирта сорбита) и твинов (сложные эфиры ангидросорбита и жирных кислот, алкилированные окисью этилена) изменяют поверхностное натяжение на границе раздела фаз «жидкость – твердое тело», не обладают выраженным губительным действием в отношении различных организмов, но сильно изменяют водные среды по качеству (пенообразование) и по БПК. Фенольные соединения типа карболовой кислоты и ее аналогов являются токсическими

структурами и в концентрации 1–2 % коагулируют белки, а в более высоких концентрациях проявляют гидролитический эффект.

Таким образом, токсичные вещества и ПАВ в сточных водах должны быть исключены или многократно уменьшены по своему количественному содержанию за счет внедрения новых технологий или совершенствования существующих, благодаря которым отходы производства не будут поступать в общегородские и другие стоки и пагубно влиять на природные экосистемы.

Обработка отходов может быть условно подразделена на 4 стадии:

- 1) разрушение сложных белковых комплексов (конъюгатов) до простых растворимых веществ и их отделение от нерастворимых субстанций;
- 2) разжижение и анаэробная обработка нерастворимого остатка с помощью соответствующих микроорганизмов;
- 3) трансформация органического азота до NH_4^+ (аммонификация) с последующим окислением аммония до нитратов;
- 4) превращения органического углерода до CO_2 .

В этих стадиях (преимущественно – в первой, третьей, четвертой) подчеркнута биохимическая сущность происходящих явлений.

Различают разные схемы очистки. Почти во всех из них ключевую роль играют микроорганизмы (биологическая очистка). Первым компонентом системы очистки является железобетонный отстойник, в который 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 аэротенков (баков с проходящими по дну трубами), расположенных один за другим, 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 активного ила (искусственного биоценоза – сообщества микроорганизмов, окисляющих органические вещества, растворенные в жидкости, до CO_2 и H_2O), постепенно формирующегося в процессе работы предприятия.

Видовой состав биоценоза активного ила на разных предприятиях может незначительно варьировать, поскольку последний зависит от окисляемых субстратов. В нем, как правило, доминируют представители рода *Pseudomonas* (70 %), далее следуют микроорганизмы, объединенные в род *Bacterium* (20 %). Остальные 10 % составляют представители родов *Bacillus*, *Sarcina* и др. Характеризуя активный ил, как биоценоз или как надорганизменное межвидовое сообщество, применительно к очистке сточной вод биотехнологического производства. При этом следует отметить 3 важных обстоятельства.

Во-первых, принципиальную роль здесь играют штаммы рода *Pseudomonas*. Однако не следует сводить этот род только к виду *Pseudomonas aeruginosa* – известному возбудителю опасных раневых инфекций. В природных условиях род *Pseudomonas* представлен большим количеством видов, не опасных для человека. Именно непатогенные штаммы входят в состав активного ила. Для этих микроорганизмов характерен широкий набор окислительных ферментов. Препараты, состоящие из клеток *Pseudomonas*, используются при ликвидации загрязнений, вызванных утечкой нефти, окислению подвергаются экзотические субстраты (кольчатые углеводороды). Кроме того, оболочка сапрофитных видов *Pseudomonas*, входящих в активный ил, имеет свои особенности на уровне пориновых каналов, облегчающих доступ субстратов к окислительным ферментам.

Во-вторых, превращение некоторых субстратов в CO_2 и H_2O осуществляется за счет последовательного воздействия на них ферментов разных микроорганизмов, т.е. 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. Хотя не исключены случаи, когда концентрация антимикробных веществ в очищаемых жидких отходах может оказаться необычно высокой и вызывать гибель клеток активного ила.

Все 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 % от первоначального содержания органических веществ (как правило, трудноокисляемых), пропускается через биофильтры – пленки с иммобилизованными клетками микроорганизмов с 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 уничтожать оставшиеся 10 % загрязнений в очищаемой жидкости. Иммобилизация клеток таких штаммов в биопленках рациональна ввиду того, что при их свободном размножении искусственно повышенная окислительная активность может быть утрачена за счет обратных мутаций или потери плазмид. В данном случае в блоке доочистки сочетаются генная инженерия и инженерная энзимология. Жидкость, прошедшая блок доочистки, соответствующая официальным критериям питьевой воды (в данном случае одним из принятых методов контроля токсичности является подавление жизнеспособности микроскопического ракообразного *Daphnia magna*), хлорируется и поступает в открытые водоемы.

Касаясь работы систем биологической очистки сточных вод в разных режимах, следует отметить, что при максимальных (шоковых) нагрузках могут возникнуть разные трудности. В такие рабочие периоды в аэротенки вносят высокоактивные штаммы-деструкторы (бактериальные закваски), что позволяет значительно усилить пропускную способность системы очистки жидких отходов. С этой целью для биотехнологических предприятий разного профиля рекомендованы специальные препараты: «*Phenobac*» – для утилизации углеводов, «*Thermobac*» – для окисления полисахаридов, «*Polibac*» – для освобождения от синтетических детергентов и т.п. Ориентировочная доза бактериальной закваски из живых клеток составляет около 100 мг на 1 м² сточной жидкости.

Кроме того, следует отметить разнообразие схем биологической утилизации жидких отходов. Так, помимо аэробной очистки в схему могут быть включены: этап анаэробной очистки, этапы с использованием сорбентов (активированного угля, цеолитов и др.), этапы с применением электрохимических методов (\ электрокоагуляция и др.).

Газообразные отходы в биотехнологических производствах немногочисленны. Так, таким отходом в биопроизводствах, базирующихся на применении аэробных микроорганизмов, является «отработанный воздух», который не должен поступать в атмосферу без очистки и обезвреживания. Такой воздух представляет собой высокодисперсный аэрозоль, в котором дисперсной фазой оказываются капельки жидкости и/или микроорганизмы. Скорость падения аэрозольных частиц зависит от их размеров и смещения воздушных потоков. Высокодисперсные аэрозоли легко могут переноситься воздушными потоками на большие расстояния, поэтому не исключено неблагоприятное влияние на чувствительные контингенты людей, их вдыхающих. Отработанный воздух, содержащий микроорганизмы (в том числе, болезнетворные

продуценты экзотоксинов), должен быть термически обработан и только после этого подвергаться фильтрационной очистке.

Многие биотехнологические процессы протекают с выделением тепла, которое оказывается в ряду побочных продуктов биохимических реакций. Нередко такое тепло теряется и практически не используется. Лишь в отдельных производствах оно реутилизируется.

Газовые выбросы очищают от органических соединений при температуре 300 – 1000 °С в колонках с неорганическими катализаторами. В этом случае летучие органические вещества превращаются в углерода диоксид. В некоторых случаях используются биологические фильтры на основе микроорганизмов, окисляющих органические вещества до углерода диоксида.

Биологическая очистка сточных вод

Тысячелетиями отходы производства перерабатывались естественным путем при участии соответствующих микроорганизмов. В наиболее распространенных установках для очистки сточных вод осуществляются 4 основные операции.

1. При первичной обработке удаляются твердые частицы, направляющиеся в отвалы отбросов или в биореактор для последующей переработки.

2. На втором этапе происходит разрушение растворенных органических веществ при участии природных аэробных микроорганизмов. При этом образующийся активный ил удаляется в отвалы или перекачивается в биореактор для обработки. По технологии, использующей активный ил, часть его возвращается в аэротенк.

3. На третьем этапе (необязательном) производится химическое осаждение и разделение фосфора и азота.

4. Для переработки ила, образующегося на первом и втором этапах, обычно используется анаэробное разложение. При этом уменьшается объем образующегося осадка, количество патогенов, устраняется неприятный запах и образуется ценное органическое топливо – метан.

Биологическая очистка сточных вод основана на способности микроорганизмов использовать для своего развития и жизнедеятельности те органические соединения, которые не были удалены из очищаемой воды на предшествующих стадиях обработки. Таким образом, потребляя органические вещества, микроорганизмы частично их разрушают, превращая в углерода диоксид, воду, нитрат- и сульфат-ионы, частично используют для образования собственной биомассы.

Биохимическую очистку сточных вод можно проводить, как в искусственных условиях с применением биологических фильтров и аэротенков, так и в естественных условиях – на полях фильтрации, сельскохозяйственных полях орошения, биологических прудах.

Известны аэробные и анаэробные методы биохимической очистки сточных вод. Для аэробной очистки сточных вод используются аэробные микроорганизмы, для жизнедеятельности которых необходим постоянный приток кислорода и температура 20–40 °С. Анаэробная очистка сточных вод протекает без доступа кислорода и используется преимущественно для обезвреживания осадков.

Биологические фильтры представляют собой резервуары, заполненные крупнозернистыми материалами (гравием, керамзитом, шлаком, крупным песком), сквозь которые фильтруются сточные воды, поступающие сверху по всей площади фильтра. Иногда в качестве загрузки используют решетки, пакеты, кольца из различных полимерных материалов. Такие биофильтры, как правило, отличаются более высокой производительностью. Из нижней части фильтра дренажные устройства отводят очищенную воду во вторичные отстойники. Сточные воды, просачиваясь сквозь загрузку биофильтра, оставляют на ней органические вещества, не отделенные на

предшествующих стадиях водоочистки. Эти вещества образуют на поверхности зерен фильтра биопленку, в которой развиваются микроорганизмы. В результате из сточных вод удаляются органические загрязнения, а в толще биофильтра увеличивается масса активной биологической пленки. Биопленка имеет вид слизистых обрастаний толщиной 1–3 мм и более. Цвет ее изменяется с изменением состава сточных вод: от серовато-желтого до темно-коричневого. Биоценоз активной пленки включает несколько групп аэробных бактерий, грибы, дрожжи, развивающиеся представители простейших, коллатриды, черви, личинки комаров и мух, клещи поедают активный ил, способствуя его рыхлению и повышая эффективность водоочистки.

Кроме биофильтров для биохимической очистки сточных вод используют аэротенки – резервуары, в которых медленно движется смесь активного ила и сточной воды, постоянно перемешиваемая при помощи сжатого воздуха или специальных приспособлений. Активный ил включает биоценоз микроорганизмов-минерализаторов, которые сорбируют на своей поверхности и окисляют органические примеси сточных вод. Для их нормальной жизнедеятельности в аэротенк непрерывно поступает воздух, который не только обеспечивает микроорганизмы кислородом, но и поддерживает активный ил во взвешенном состоянии. Обычно аэротенки представляют собой длинные железобетонные резервуары прямоугольного сечения, состоящие из нескольких секций. Воздух нагнетается в аэротенк воздуходувками или поступает из атмосферы при сильном перемешивании содержимого аэротенка. Более эффективным сооружением для биохимической очистки сточных вод является окситенк, в котором процессы очистки интенсифицируются благодаря применению технического кислорода и высоким концентрациям активного ила.

Перспективна биохимическая очистка сточных вод в естественных условиях: на полях фильтрации и земледельческих полях орошения (ЗПО). В этих случаях для освобождения сточных вод от загрязняющих примесей используется очищающая способность самой почвы. Вода, фильтруясь сквозь слой почвы, оставляет в ней взвешенные, коллоидные и растворенные примеси. Микроорганизмы почвы окисляют органические загрязняющие вещества, превращая их в простейшие минеральные соединения – углерода диоксид, воду и соли. Наиболее интенсивно эти процессы протекают в верхних горизонтах почвы (0,2–0,4 м), в которых израсходованные запасы кислорода быстро пополняются. Регулируя водно-воздушный режим территории, орошаемой сточными водами, можно достичь высоких степеней очистки и повышения плодородия орошаемых земель, которые извлекают из сточных вод и удерживают элементы питания растений. Почвенная очистка сточных вод существенно эффективнее искусственной очистки. Почвенные способы очистки полностью исключают поступление сточных вод в поверхностные воды и защищают их от загрязнений.

Поля фильтрации используются только для биохимической очистки сточной воды. Их территории отчуждаются у сельского хозяйства. Высокие нормы нагрузки позволяют устраивать их лишь на хорошо фильтрующих почвах, многолетнее обильное орошение приводит к вымыванию из почвы питательных веществ и ее деградации. В этой связи биохимическая очистка сточной воды на полях фильтрации менее выгодна, чем на ЗПО.

На земледельческих полях орошения очистка сточных вод происходит непосредственно на производственных полях и при благоприятных условиях способствует повышению плодородия земель. Норма сточных вод, подаваемых на единицу площади ЗПО, должна соответствовать потребности произрастающих культур в удобрениях и воде. Для устройства ЗПО пригодны любые, даже бросовые земли, а объем подготовительных работ сравнительно невелик, они в основном сводятся к устранению неровностей рельефа. Подача сточных вод в почву происходит с поверхности или из труб, проложенных на небольшой глубине. Для обезвреживания яиц гельминтов, содержащихся в фекальных городских сточных водах, перед выпуском на поля их предварительно отстаивают, а образовавшийся осадок подвергают брожению при 50–60 °С. Болезнетворные бактерии,

содержащиеся в сточных водах, при попадании в почву довольно быстро погибают. Тем не менее, на ЗПО не рекомендуется выращивать культуры, используемые в питании человека. Обычно ЗПО используют под технические и кормовые культуры. Устройство ЗПО позволяет комплексно решать проблемы охраны окружающей среды, благоустройства города и развития пригородного сельского хозяйства как основы снабжения городского населения продуктами питания.

Другим методом биохимической очистки сточных вод является создание биологических прудов, в которых используется способность природных вод к самоочищению. Биологические пруды представляют собой водоемы площадью 0,5–1,0 га, в которых сточные воды могут очищаться в аэробных и анаэробных условиях. Анаэробные пруды служат для предварительной очистки высококонцентрированных сточных вод: за 30–50 сут. обеспечивается снижение БПК в воде на 50–70 %. Глубина таких прудов достигает 2,5–3 м. Аэробные пруды, как правило, располагают секциями, от 2 до 5 прудов в каждой. Сточная вода поступает последовательно из одного пруда в другой по мере ее очистки. Для более равномерного распределения сточной воды по акватории прудов впуск и выпуск воды устраивают рассредоточено. Глубина воды в первом пруду составляет 1 м, в последующих – до 1,5–2,0 м. Если аэробные пруды предназначены для полной биологической очистки, то время пребывания в них сточных вод должно быть не менее 15–20 сут.; если они используются для доочистки, то время сокращается до 2 суток. При условии разбавления отстаившихся вод речной или глубоководной сточной водой (в 3–5 раз) биологические пруды можно использовать для разведения рыб, главным образом, карпа. После биологической очистки сточных вод на искусственных сооружениях общее содержание в них бактерий уменьшается на 95 %, а при очистке на ЗПО – на 99 %.

Утилизация и обезвреживание твердых отходов

В результате биохимической очистки в первичных и вторичных отстойниках образуются осадки, которые необходимо утилизировать во избежание загрязнения окружающей среды. Между тем обработка таких крупнотоннажных отходов водоочистки сильно затрудняется из-за их высокой влажности и сложного состава. Обработка начинается с уплотнения осадка гравитационным или флотационным методом. Наибольшее распространение в практике водоочистки получил метод напорной флотации: осадок разбавляют определенным количеством воды, предварительно насыщенной воздухом. При снижении давления растворенный воздух выделяется в виде мелких пузырьков, а осадок активного ила становится более плотным. Уплотненный осадок подвергается стабилизации – разрушению его органической составляющей до углерода диоксида, воды и метана. Стабилизация осуществляется с помощью микроорганизмов в аэробных и анаэробных условиях. В анаэробных условиях осадок сбрасывается в двухъярусных отстойниках, осветлителях-перегнивателях, метантенках. Аэробная стабилизация заключается в продолжительном аэрировании осадка. В результате пневматического или механического аэрирования происходит распад разлагаемых органических веществ, а наиболее устойчивые соединения теряют способность к загниванию, т.е. стабилизируются. Аэробную стабилизацию можно проводить одновременно для смеси из осадка первичного отстойника и избыточного активного ила. Эффективность процесса определяется его продолжительностью, температурой, интенсивностью аэрации, а также зависит от состава и свойств окисляемого осадка.

Стабилизированный осадок подвергается коагуляции. В качестве коагулянтов используют железа сульфаты, алюминия и железа хлориды, а также известь. Данный процесс изменения структуры осадка и улучшения его водоотдающих свойств называется кондиционированием. Кондиционирование осадка можно проводить и безреагентным методом, в том числе тепловой обработкой, замораживанием с последующим оттаиванием

и электрокоагуляцией. Влажность кондиционированного осадка снижается с 92–94 % до 70–75 %, он хорошо уплотняется и поступает на обезвоживание.

Обезвоживание осадков производят на иловых площадках – обвалованных со всех сторон участках земли, которые располагают в виде каскада из 4–8 площадок.

Обезвоженный осадок высушивается на барабанных, ленточных, петлевых и распылительных сушилках, в которых в качестве осушителя используются дымовые газы при температуре 500–800 °С, нагретый пар или горячий воздух.

Твердые осадки сточных вод могут стать важным ресурсом органических удобрений, если они не содержат тяжелых металлов или других токсичных компонентов.

Биологическая очистка газов

Очистка отходов от вредных, токсичных и пахучих газов – это серьезная экологическая проблема. Наиболее часто к таким загрязняющим веществам относятся: восстановленные соединения серы (тиосульфат, сероводород, метил меркаптаны, диметилсульфид и др.). Большинство неорганических восстановленных соединений серы служат источником энергии для целого ряда микроорганизмов, растущих в аэробных или анаэробных условиях. Так, созданы очистные системы, принцип действия которых основан на использовании тиобацилл: в них анаэробное десульфирование сопряжено с денитрификацией. Один из методов очистки от сероводорода состоит в пропускании газа через солевой раствор, например, раствор сульфата меди. В результате происходит осаждение нерастворимого сульфида металла, который затем может быть окислен при участии микроорганизмов.

Для устранения газов с неприятным запахом из отходов удаляют, в частности, восстановленные соединения серы. Такое удаление сопровождается потерей азота или без потери (путем образования аммиака) в зависимости от того, какие микроорганизмы при этом используются. Органические сульфиды часто бывают токсичными для микроорганизмов. Так, обогащение отходов микроорганизмами, способными использовать диметилсульфид, затруднено, хотя в принципе можно выделить сообщество микроорганизмов, растущее на очень близком по структуре субстрате диметилсульфоксиде.

Для детоксикации цианида в промышленных отходах предложены различные биологические методы: от использования активного ила до применения специфических ферментов, разрушающих цианид. Так, роданаза, обнаруженная у *Bacillus stearothermophilus*, катализирует превращение цианида до формиата, катализируемое ферментом цианидгидратазой, который был обнаружен в грибах, паразитирующих на растениях-цианогенах.

Таким образом, имеется ряд микробиологических методов очистки промышленных газовых выбросов. Однако, еще предстоит определить их эффективность по степени очистки на выходе.