

## Занятие семинарского типа № 1

**ТЕМА ЗАНЯТИЯ:** Структура биотехнологического производства белковых препаратов

### УЧЕБНЫЙ МАТЕРИАЛ

#### **1. Технологические особенности биосинтеза биологически активных веществ**

В основе технологии биосинтеза биологически активных веществ (БАВ) главными компонентами являются биологические объекты (продуценты): вирусы, грибы, растительные или животные клетки, биологические молекулы, обладающие разнообразными биологическими и фармакологическими свойствами.

Основная задача технологии биосинтеза биологически активных веществ состоит в преобразовании природного сырья или отходов различного происхождения с помощью биологического объекта (микроорганизмов, изолированных клеток, ферментов, клеточных органелл и т.п.), поддержание и активизация путей обмена клеток, ведущих к накоплению биологически активных веществ в целевом продукте при заметном подавлении других реакций обмена у культивируемого организма, а также получение клеток или их составных частей (преимущественно ферментов) для направленного изменения сложных молекул.

#### **1.1. Принципы биосинтеза биологически активных веществ**

Принципы биосинтеза БАВ с помощью микробных культур базируются на:

- ✓ принадлежности биологических объектов к надцарствам живых существ (акариот, прокариот, эукариот);
- ✓ функциональной активности биологического объекта (биосинтез, биотрансформация, биodeградация);
- ✓ возможности вычленения отдельных этапов из биотехнологических схем производства в виде самостоятельных процессов (подготовка питательных сред и оборудования, ферментация, стерилизация сред и оборудования и т.п.).

К основным преимуществам микробиотехнологии относятся:

- ✓ простота организации генома;
- ✓ легкая приспособляемость (лабильность) к среде обитания в естественных и искусственных условиях;
- ✓ относительно высокие скорости ферментативных реакций при низких температурах (20–60 °С) и наращивания клеточной массы;

- ✓ возможность использования недефицитного, доступного и экономичного сырья (отходы производства, сточные воды и т.п.).

К недостаткам технологии микробного синтеза БАВ относятся:

- ✓ многокомпонентность питательных сред;
- ✓ необходимость стерилизации питательных сред, оборудования и коммуникаций для удаления или разрушения контаминантов при сохранении качества питательной среды;
- ✓ трудности в управлении процессом биосинтеза и автоматизации.

Все это связано с процессами саморегуляции биологических объектов (включая способность к мутации), которые могут привести к непредвиденному изменению биотехнологического процесса.

В процессе размножения и развития происходит постоянное изменение отдельных параметров, и в каждый момент времени клетки функционируют в новых условиях. В этой связи, при управлении технологическим процессом биосинтеза БАВ следует учитывать индивидуальные особенности «поведенческих реакций» биологического объекта в конкретных условиях его культивирования: его чувствительность к воздействию физико-механических факторов при перемешивании, а также знание химической природы синтезируемого БАВ, характера биохимических процессов, осуществляемых биологическими объектами, специфику наследственных свойств данного вида.

## **1.2. Основные технологические показатели биосинтеза биологически активных веществ**

Для нормального роста, размножения биологического объекта в процессе биосинтеза биологически активного вещества необходимо поддерживать оптимальные условия его культивирования. При нарушении оптимальных условий процесса нарушается обмен веществ, прекращается или ограничивается рост и размножение культуры продуцента, снижается выход и качество целевого продукта.

К параметрам контроля процесса культивирования биологических объектов, представляющим собой основные технологические показатели биосинтеза БАВ, относятся:

- ✓ температура;
- ✓ значение рН среды;
- ✓ количество биомассы клеток;
- ✓ скорость потребления источников питания;
- ✓ количество растворенного кислорода (в случае аэробных биообъектов);
- ✓ количество образующегося метаболита.

### **1.3. Технологические стадии биотехнологического производства биологически активных веществ**

К основным технологическим стадиям биосинтеза биологически активных веществ относятся:

- ✓ предферментационная стадия (подготовительная стадия);
- ✓ ферментация (основная стадия – биосинтез целевого продукта);
- ✓ постферментационная стадия (выделение и химическая очистка целевого продукта).

#### **Предферментационная стадия**

Предферментационная стадия включает в себя подготовительные операции вплоть до биосинтеза БАВ (целевого продукта процесса):

- 1) приготовление и стерилизация питательной среды;
- 2) подготовка посевного материала;
- 3) выбор и подготовка основного и вспомогательного технологического оборудования.

Одним из основных элементов в подготовке питательных сред и технологического оборудования является их стерилизация. В частности, стерилизации подлежат пеногасители, жидкие добавки, коммуникации и датчики. При этом обязательность стерилизации обусловлена тем, что микроорганизмы-контаминанты не только могут подавить функциональное развитие биологического объекта в силу конкуренции и антибиоза, но и дезорганизовать отдельные ткани или среду выращивания. Кроме того, некоторые из них способны продуцировать токсичные вещества, которые могут попасть в целевой продукт.

В производственных условиях источниками микроорганизмов-контаминантов могут быть почва, вода, окружающий воздух и персонал.

Наличие в воздухе частиц пыли или капелек влаги создает благоприятные условия для жизнедеятельности микроорганизмов, в том числе и патогенных.

Очистку технологического воздуха от микроорганизмов-контаминантов осуществляют с помощью системы фильтров (грубой и тонкой очистки).

Стерилизацию питательных сред осуществляют в автоклавах насыщенным паром при температуре  $120 \pm 2$  °С под давлением не менее 0,3 МПа или холодным способом (фильтрование).

Датчики измерительных приборов и регуляторов, как правило, не выдерживают воздействия высоких температур при стерилизации, поэтому к ним применяют холодные или химические способы стерилизации. С этой целью используют бактерицидные газы (этилен), растворы антисептиков (формалин и др.).

Сахаросодержащие ингредиенты стерилизуют отдельно от других компонентов питательной среды в мягких (щадящих) условиях во избежание ре-

акций меланоидирования, гумификации, карамелизации, реверсии, кислотного разложения и т.п.

Для контроля эффективности стерилизации вводится критерий стерильности, т.е. время выдержки или длительностью экспозиции. Под данным термином понимают интервал, в пределах которого погибают микроорганизмы.

Гибель последних спор в питательной среде является случайным процессом, поэтому введено понятие «критерий стерильности» ( $N$ ), т.е. отношение числа операций стерилизации, в результате которых выжили по одной термостойкой споре к общему числу проведенных операций.

Для стерилизации питательных сред принимают критерий стерильности, равный  $0,01 \pm 0,001$ . В случае, если исходное количество спор в питательной среде принять за  $N_0$ , то получим соотношение  $N/N_0$  – уровень стерильности или коэффициент выживания, означающий, что для достижения заданного критерия стерильности (например, 0,01) среда должна выдерживаться при температуре стерилизации строго определенное время для того, чтобы популяция спор уменьшилась от исходного значения  $N_0$  до  $N/N_0$  (например, до 10–16).

### **Технология приготовления питательных сред**

Понятие "питательная среда" или "среда культивирования" включает качественный и количественный состав исходных компонентов, необходимых для реализации процессов энергетического обмена в живой клетке.

Процесс приготовления питательных сред включает выбор компонентов питания, необходимых продуцентам БАВ для их воспроизводства и биотрансформации.

Подбор состава питательной среды осуществляется эмпирическим путем, продолжителен по времени и требует определенных практических навыков.

В составе питательной среды, как правило, представлены: углерод, водород, кислород, азот, фосфор, сера, калий, кальций, магний, железо, микроэлементы. Кроме того, для развития некоторых продуцентов БАВ необходимы витамины и регуляторы роста.

Состав питательных сред подбирают, исходя из данных материального баланса с учетом трансформации разных элементов питания, а также расходуемой (выделяемой) энергии.

При этом следует соблюдать основное правило разработки оптимального состава питательных сред: для получения заданного количества биомассы компоненты питательной среды берутся в соотношениях, пропорциональных потребностям в них культуры продуцента (1):

$$C_i/A_i = \dots C_2/A_2 = C_1/A_1 = S_0, \quad (1)$$

где  $C_i$  – концентрация  $i$ -го компонента в сбалансированной питательной среде;

$A_i$  – коэффициент метаболизма культуры по  $i$ -му компоненту;

$S_0$  – заданный запас субстрата в среде, выраженный в единицах концентрации биомассы.

По своему назначению питательные среды классифицируют на диагностические и производственные.

Диагностические питательные среды предназначены для обнаружения, выделения и идентификации патогенных микроорганизмов по морфологическим и физиологическим признакам. Данные питательные среды классифицируются на селективные среды, среды для консервирования, среды обогащения и дифференциально-диагностические среды.

*Селективные среды* служат для посева тест-штамма с целью выделения чистой культуры.

*Среды обогащения* предназначены для преимущественного накопления одной группы микроорганизмов при одновременной задержке роста сопутствующих видов.

*Дифференциально-диагностические среды* предназначены для идентификации отдельных видов микроорганизмов.

Производственные среды по составу классифицируют на две группы: натуральные (неопределенного состава) и синтетические среды (определенного состава).

*Натуральные среды* состоят из природных соединений, продуктов животного или растительного происхождения. Они содержат все необходимые компоненты для роста и развития микроорганизмов. Однако, вследствие сложности и неопределенности их химического состава трудно оценить влияние отдельных компонентов на механизм биосинтеза БАВ. В производстве натуральные среды используют для поддержания развития микроорганизмов, накопления биомассы, а также для диагностических целей.

Среди натуральных сред широкое применение нашли: меласса (отход свеклосахарного производства), кукурузный экстракт, отруби и др. в качестве источника углерода.

*Синтетические среды* удобны для изучения обмена веществ.

Благодаря сложной ферментативной организации микроорганизмов из простых составляющих сред культивирования осуществляется биосинтез сложных БАВ.

Жидкие питательные среды изготавливают в аппаратах, снабженных мешалкой, в которые загружают компоненты в определенной последовательности (согласно технологическому регламенту).

При биотехнологическом производстве белковых препаратов для каждого продуцента разрабатывается оптимальная по составу питательная среда. При этом питательная среда должна отвечать определенным требованиям:

- а) обеспечивать максимальный выход целевого продукта;
- б) состоять из доступных и экономичных компонентов;
- в) иметь хорошую фильтрующую способность;
- г) обеспечивать применение наиболее экономичных приемов выделения и очистки целевого продукта.

Стерилизация питательных сред в условиях промышленного биотехнологического производства в основном осуществляется двумя методами: периодическим и непрерывным.

Периодический метод стерилизации применяется в случае небольших объемов питательной среды и состоит в том, что среда нагревается до температуры 120–130 °С непосредственно в ферментерах или в специальных котлах-стерилизаторах, выдерживается при данной температуре в течение 30–60 мин (в зависимости от объема и состава питательной среды), затем охлаждается до температуры 27–30 °С.

За период времени, затрачиваемый на нагрев питательной среды до температуры, необходимой для стерилизации, и ее охлаждение, в ней происходит уничтожение микроорганизмов.

Известно, что для нагревания больших объемов питательной среды до температуры стерилизации и затем ее охлаждения требуется больше времени, чем для небольших объемов, поэтому время, затрачиваемое на поддержание наиболее высокой стерилизующей температуры в больших объемах, может быть меньшим, чем для небольших объемов с тем же эффектом стерилизации.

Высокая эффективность стерилизации и сохранение термолабильных веществ в питательной среде достигаются в том случае, если стерилизацию проводят при более высокой температуре в течение непродолжительного времени.

Непрерывный метод стерилизации целесообразно применять в случае больших объемов питательной среды. Приготовленная питательная среда из специального реактора с помощью насоса направляется в стерилизационную колонку, через которую пропускают острый пар под давлением (505 Па). Пар подают сверху по внутренней трубе, имеющей щелевидные прорези, благодаря чему он поступает в среду, быстро ее нагревая. Среда в колонку поступает снизу и движется по спирали вокруг внутренней трубы.

Среда, нагретая в колонке до необходимой для стерилизации температуры (около 130 °С), поступает в специальный аппарат, в котором она выдерживается в течение определенного времени при температуре 125–130 °С. При этом время выдерживания зависит от состава питательной среды и составляет около 5–10 минут. Затем стерильная среда подается в змеевиковый холодильник, охлаждается до температуры 30–35 °С (на выходе) и поступает в ферментер.

Непрерывный метод стерилизации отличается рядом преимуществ:

- ✓ возможностью автоматического регулирования процесса;
- ✓ быстрым и равномерным нагревом питательной среды;
- ✓ обеспечением более полной стерильности среды и др.

При применении в качестве отдельных компонентов питательного субстрата термолабильных веществ, как правило, их стерилизуют отдельно в условиях более мягкого режима.

### **Технология подготовки посевного материала**

Подготовка посевного материала состоит из лабораторного и производственного этапов.

Лабораторный этап заключается в приготовлении рабочего посевного материала. С этой целью исходный штамм микроорганизма, сохраняемый в состоянии анабиоза (путем высушивания на стерильных почве, песке или пшене, лиофилизации или сублимационной сушки) оживляют добавлением стерильной жидкой питательной среды, а затем высевают на уплотненную питательную среду и проверяют чистоту культуры. После оживления, т.е. перевода консервированной культуры на косяк, осуществляют пересев штамма на питательную среду возрастающих объемов, постепенно переходя от пробирок к колбам (емкостью 1 л) и бутылкам (емкостью 20 л). При этом следует соблюдать соотношение посевного и рабочего объемов – 1:10. Коэффициент заполнения емкостей не должен превышать 0,5–0,6.

Ллиофилизация культур продуцентов осуществляется путем быстрого замораживания (от -40 до -60 °С) суспензии клеток или спор микроорганизма, приготовленной на питательной среде, богатой белками (например, содержащую сыворотку крови), с последующим высушиванием под вакуумом до остаточной влажности (0,5–0,7%). После такой обработки ампулы со спорами и клетками лиофилизированного микроорганизма запаивают. Данный метод пригоден, как для спорообразующих, так и для бесспорных культур микроорганизмов. Ллиофилизированные формы бактерий могут сохраняться в течение 16-18 лет, а споры грибов – в течение 10 лет, не теряя основных свойств.

Производственный этап. Дальнейшую подготовку посевного материала осуществляют в инокуляторах, в которых наращивают посевной материал. При этом одноклеточные культуры доводят до середины логарифмической фазы роста (в которой клетки делятся синхронно).

Рабочую культуру продуцента БАВ подают в инокулятор, заполненный стерильной питательной средой, из расчета 8–10% к объему питательной среды.

Во избежание утечки посевного материала в инокуляторах и биореакторах следует поддерживать избыточное давление.

Инокуляторы должны отвечать следующим основным требованиям:

- ✓ конструктивная простота;

- ✓ удобство;
- ✓ надежность эксплуатации.

Посевные аппараты отечественного производства имеют объем 10, 5, 2 и 0,63 м<sup>3</sup>, диаметр от 0,9 до 2 м и частоту вращения мешалки от 180 до 270 об./мин.

Общий объем ферментатора заполняют инокулированной питательной средой на 70–80%, а 20–30% объема заполняют газами (инертным – для анаэробов, воздухом – для аэробов).

Микроорганизмы в виде суспензии определенной плотности подают из инокулятора(-ов) в промышленный биореактор (ферментер), в котором содержится стерильная жидкая питательная среда. При этом должно быть исключено попадание посторонней микрофлоры в питательную среду вместе с продуцентом. В этой связи, все соединения системы должны быть герметично закрыты.

Для реализации технологического процесса в асептических условиях необходимо введение дополнительных стадий, обеспечивающих стерилизацию питательных сред и воздуха, подаваемого в ферментер.

Стерильную среду засевают с соблюдением правил асептики через специальное устройство посевным материалом, выращенным в лаборатории, поддерживая оптимальный для развития культуры продуцента режим (температуру, аэрацию, перемешивание и т.п.).

После достижения нужной стадии развития и количества биомассы посевной материал перемещают с помощью стерильного сжатого воздуха по посевному коллектору в инокулятор большей вместимости.

На второй ступени выращивания посевного материала стремятся получить большее количество биомассы клеток для того, чтобы в ферментере можно было создать необходимую для данного штамма продуцента исходную плотность популяции. В случае, когда данное требование выполнимо без второй ступени, то ферментационную среду засевают непосредственно из инокулятора.

Все ферментаторы цеха соединены между собой несколькими коллекторами:

- посевным коллектором, благодаря которому можно засевать питательную среду в любом ферментере из любого посевного аппарата;
- коллектором подачи стерильной питательной среды;
- коллектором подвода стерильного сжатого воздуха к индивидуальным фильтрам;
- коллектором отработанного воздуха, выходящего из ферментера;
- коллектором перекачивания культуральной жидкости из ферментера.

В случае проведения ферментации в нестерильных условиях питательную среду и технологический воздух для аэрации не стерилизуют, но посевной материал всегда выращивают на стерильных питательных средах в асептических условиях.



Требования к производственным штаммам продуцентам БАВ:

- ✓ стабильность структурно-морфологических признаков и физиологической активности при длительном хранении и эксплуатации в условиях биотехнологического производства;
- ✓ повышенные скорости роста биомассы продуцента и биосинтеза целевых продуктов в лабораторных и производственных условиях;
- ✓ широкий диапазон устойчивости к воздействию неблагоприятных внешних факторов – изменению температуры, значения рН среды, уровня аэрации, перемешиванию, вязкости среды;
- ✓ умеренная требовательность к ограниченному числу источников питания.

### **Ферментация**

Стадия ферментации реализуется в производственных биореакторах.

В процессе ферментации необходимо использование стерильных питательных сред, технологического воздуха и ферментеров (биореакторов), выбор которых обусловлен общими требованиями биологических объектов.

Ферментацию следует осуществлять в герметизированных биореакторах во избежание рассеивания биологического объекта во внешнюю среду.

К основным принципам технического оснащения биотехнологических производств относятся:

- ✓ конструкционное совершенство и универсальность биореакторов;
- ✓ инертность или коррозионная стойкость материалов биореакторов и другого технологического оборудования, вмещающих биологический объект или продукты его метаболизма;
- ✓ эксплуатационная надежность технологического оборудования;
- ✓ доступность, эстетичность, легкость обслуживания, замены, смазки, чистки, обработки антисептиками.

### **Аппаратурное оформление биотехнологических производств**

В связи с тем, что в технологии биосинтеза БАВ много общего, то знание данных общих закономерностей облегчает выбор биореактора, сепарирующего оборудования, сушилок и другого основного и вспомогательного оборудования биотехнологических производств.

К общим показателям биологических объектов в процессе биосинтеза БАВ относятся:

- ✓ уровень структурной организации;
- ✓ способность к размножению или репродукции;
- ✓ наличие или отсутствие собственного метаболизма при культивировании.

Бактерии и микроскопические грибы выращивают в однотипных биореакторах, имеющих однотипную обвязку, включающую: ферментер, стерильный многокорпусный вентиль для подачи питательной среды, посевного материала, подпитки и пр., системы регулирования значения рН, температуры, подачи пеногасителя, системы контроля расхода воздуха, пробоотборник, электродвигатель.

Конструкции ферментеров для культивирования микроорганизмов – продуцентов БАВ можно разделить на два типа: без подводки стерильного воздуха (для анаэробов) и с подводкой стерильного воздуха (для анаэробов).

Размеры ферментеров определяются соотношением внешнего диаметра к высоте 1:2 до 1:6.

Ферментеры классифицируют по способу ввода в аппарат энергии для перемешивания:

- ✓ газовой фазой (ГФ);
- ✓ жидкой фазой (ФЖ);
- ✓ газовой и жидкой фазами (ФЖГ).

Ферментеры периодического действия из групп ФЖГ применяют с 1944 г. в промышленном биотехнологическом производстве витаминов, антибиотиков, белков и других ценных БАВ.

Конструкция таких биореакторов обеспечивает стерильность ферментации в течение длительного времени (до нескольких суток) при оптимальных условиях для роста и жизнедеятельности культуры продуцента.

Ферментеры такой конструкции изготавливают на 1,25; 2,0; 2,5; 3,2; 4,0; 5,0; 6,3; 10,0; 16,0; 20,0; 32,0; 50,0; 63,0; 100,0 и 160,0 м<sup>3</sup>.

Данный тип ферментера представляет собой цилиндрический вертикальный аппарат со сферическим днищем, снабженный аэрирующим, перемешивающим и теплопередающим устройствами. Воздух для аэрации в такой ферментер поступает через барботер, установленный под нижним ярусом мешалки.

При использовании ферментера группы ФГ с эрлифтом проще поддерживать асептические условия без механического перемешивания.

К недостаткам ферментеров данной группы относится низкая интенсивность массообмена по кислороду.

Воздух для аэрации культуральной среды подается по трубе, расположенной вертикально в ферментере. Аэратор, конструкция которого обеспечивает вихревое движение выходящего воздуха, расположен в нижней части диффузора и насыщает питательную среду воздухом. При этом газожидкостная смесь поднимается по диффузору и перемешивается через его верхние края. В этой же зоне часть воздуха уходит из аппарата, а более плотная среда опускается вниз в кольцевом пространстве между корпусом ферментера и диффузором. Таким путем происходит многократная циркуляция культуральной среды в ферментере.

Для отвода биологического тепла внутри ферментера установлен змеевик, кроме того, аппарат снабжен секционной рубашкой.

Широкое распространение на биотехнологических предприятиях получили ферментеры с самовсасывающими мешалками группы ФЖ. В частности, для выращивания чистой культуры дрожжей созданы ферментеры вместимостью 0,32; 3,2 и 50 м<sup>3</sup>. Такой ферментер представляет собой вертикальный цилиндрический аппарат, снабженный циркуляционными, теплообменными и аэрирующими устройствами. В качестве циркуляционных устройств использованы системы направляющих диффузоров, разграничивающих восходящие и нисходящие потоки. Теплообменные устройства выполнены в виде трубок, установленных в трубных решетках диффузоров.

Вместимость такого ферментера составляет 800 м<sup>3</sup> (рабочий объем 320 м<sup>3</sup>). Данный аппарат разделен на 12 секций. При этом ферментационная среда последовательно проходит все секции, а из последней выходит культуральная жидкость с максимальной концентрацией биомассы.

В каждой секции установлены перемешивающие и аэрирующие устройства и змеевики для отвода тепла.

В последние годы апробированы мембранные биореакторы, биореакторы с полыми волокнами и некоторые другие перспективные конструкции аппаратов.

При расчете и конструировании биореакторов следует учитывать время протекания разных биологических процессов у представителей различных групп живых организмов.

### **Управление технологическими процессами биосинтеза БАВ**

Биосинтез целевого продукта в ферментере происходит при заданных значениях температурного режима, аэрации, перемешивании и рН культуральной жидкости. При этом величину рН обычно регулируют периодической подачей аммиачной воды через барботер ферментера.

Аэрация жидкости способствует пенообразованию, снижающему качество ферментации, поэтому используют пеногашение механическое (установка в верхней части ферментера специальной дополнительной мешалки) или физико-химическое (использование ПАВ для снижения поверхностного натяжения на границе раздела фаз газ – жидкость).

Длительность ферментации зависит от природы используемых биологических объектов, особенностей их развития и строения.

Для поддержания постоянства концентраций отдельных компонентов питательной среды их подают в виде стерильных растворов по команде автоматизированной системы управления с определенной скоростью и периодичностью в ферментер из специальных аппаратов.

### **Постферментационная стадия**

После завершения стадии ферментации отделяют клетки (клеточную массу) или культуральную жидкость, в которой содержится целевой продукт

– БАВ. В первом случае отходом является культуральная жидкость, во втором – плотная часть (биомасса).

Культуральная жидкость, образующаяся в процессе ферментации, представляет собой сложную многокомпонентную систему. Так, в ее водной фазе содержатся клетки продуцента, продукты их жизнедеятельности, непотребленные компоненты питательной среды, мельчайшие капельки жира, пузырьки воздуха, мел. Помимо этого, водная фаза культуральной жидкости (нативный раствор) включает большое количество органических и неорганических веществ, коллоидных фракций белков. При этом сухой остаток культуральной жидкости составляет до 17% и более.

Содержание биомассы в культуральной жидкости достигает 8–10%.

Концентрация целевого продукта чаще всего не превышает 1,5%, что составляет менее 10% сухого остатка.

#### **1.4. Отходы биотехнологических производств, их обезвреживание и утилизация**

Отходы биотехнологических производств относятся к типу разлагающихся в естественных условиях под действием биологических, химических и физико-химических факторов.

К плотным отходам относятся: микробная биомасса, шламы, растительная биомасса после экстракции, тканевые культуры животных, осадок сточных вод (ил) и т.п.

Все отходы промышленных биотехнологических производств подлежат обязательному контролю на содержание патогенной микрофлоры.

При этом нетоксичные сухие остатки используются в качестве кормовых добавок для сельскохозяйственных животных, для приготовления компоста, получения биогаза при метановом брожении.

При метановом брожении почти все органические вещества (кроме лигнина) с помощью микроорганизмов трансформируются до метана и углекислоты. Метан используют в виде топлива, углекислоту – в виде сухого льда. Плотный осадок, оставшийся после метанового брожения, представляет собой органическую субстанцию, содержащую гумусовые вещества, которые используют в качестве органического удобрения.

Жидкие отходы биотехнологических предприятий могут содержать как неорганические, так и органические примеси вследствие неполного использования продуцентами питательной среды.

Кроме того, данный вид отходов может накапливаться на стадии подготовки сырья (мойка), и попадать в воду.

Органические вещества жидких отходов обезвреживают с помощью микроорганизмов. Так, например, нитраты обезвреживают с помощью бактерий-нитрификаторов, а соли фосфора осаждают с помощью химических реактивов.

Жидкие отходы подлежат очистке для сохранения равновесия в водоемах, так как они могут содержать масла и жиры, используемые для пеногашения, снижающие поступление кислорода в водоем. В свою очередь, нарушение кислородного баланса в природных водоемах приводит к конкуренции среди видов (подавление одного вида другими).

Газообразные отходы биотехнологических производств включают отработанный воздух, в котором могут присутствовать болезнетворные микроорганизмы, а также углекислый газ, образующийся при сбраживании углеводов и дыхании биологических объектов.

При этом углекислый газ улавливается и утилизируется в хладагент, который используется в пищевом производстве.

Отработанный воздух подвергается обязательной очистке.

## **2. Структура биотехнологического производства белковых препаратов**

Преимущества микробиологического синтеза белка заключаются в следующем: микроорганизмы обладают очень большой скоростью накопления биомассы (до 5000 раз выше, чем у животных или растений); микробные клетки способны накапливать очень большое количество белка; в биотехнологических процессах получения белка отсутствует многостадийность за счет высокой специфичности; процесс биосинтеза белка протекает в мягких условиях; данный способ получения белка менее трудоемок по сравнению с процессом органического синтеза.

В настоящее время в биотехнологии процесс производства белка является самым крупномасштабным производством. Так, в 2001 г. на 15 биотехнологических предприятиях было произведено свыше 90 тыс. т. кормового микробиологического белка.

Белки являются обязательными компонентами клеток любого живого организма, выполняющими жизненно важные функции: каталитические, регуляторные, транспортные, биоэнергетические, защиту от инфекции и действия стрессовых факторов, структурные, запасные и др. Для образования клеток и тканей организма, а также поддержания его жизненных функций должен осуществляться постоянный синтез структурных и других форм белков. В состав белков входят 20 аминокислот и два амида (аспарагин и глутамин).

Растения и большинство микроорганизмов способны синтезировать все входящие в их состав аминокислоты из простых веществ – углекислоты, воды и минеральных солей, тогда как в организме человека и животных некоторые аминокислоты не могут синтезироваться и должны поступать в готовом виде как компоненты пищи. Такие аминокислоты принято называть *незаменимыми*, к ним относятся *валин, лейцин, изолейцин, лизин, метионин, треонин, триптофан, фенилаланин*. Отсутствие в пище хотя бы одной неза-

менимой аминокислоты приводит к тяжелым заболеваниям человека, а недостаток их в кормах снижает продуктивность сельскохозяйственных животных. Главным источником незаменимых аминокислот для человека являются белки животного или растительного происхождения, входящие в состав пищи, а для сельскохозяйственных животных – главным образом растительные белки.

Поступающие с пищей или кормом белковые вещества под действием ферментов желудочного сока гидролизуются до аминокислот, которые затем используются для образования белковых молекул человеческого или животного организма.

Все незаменимые аминокислоты должны содержаться в белках пищи в определенных соотношениях, отвечающих потребностям данного организма. В соответствии с нормами питания человек должен ежедневно получать с пищей от 60 до 120 г полноценного белка.

Высокой интенсивностью синтеза белков отличаются многие микроорганизмы, причем белки микробных клеток имеют повышенное содержание незаменимых аминокислот.

Микроорганизмы в качестве источника кормового белка имеют ряд преимуществ по сравнению с растительными и даже животными организмами. Они отличаются высоким (до 60% сухой массы) и устойчивым содержанием белков, тогда как в растениях концентрация белковых веществ значительно изменяется в зависимости от условий выращивания, климата, погоды, типа почвы, агротехники и др. Наряду с белками в микробных клетках накапливаются и другие ценные в питательном отношении вещества: легкоусвояемые углеводы, липиды с повышенным содержанием ненасыщенных кислот, витамины, макро- и микроэлементы.

При использовании микроорганизмов на ограниченной площади можно организовать промышленное производство и получать большое количество продукта в любое время года, причем микробные клетки способны синтезировать белки из отходов сельского хозяйства и промышленности и, таким образом, позволяют одновременно решать другую важную проблему – утилизацию этих отходов в целях охраны окружающей среды. В качестве источников кормового белка наиболее часто используют различные виды дрожжей и бактерий, микроскопические грибы, одноклеточные водоросли и т.д.

Дрожжи впервые стали использовать как источник белка для человека и животных в Германии во время первой мировой войны. Была разработана промышленная технология культивирования пивных дрожжей (*Saccharomyces*), предназначенных для добавления в продукты питания. Дрожжи выращивали на гидролизатах из отходов древесины и другого целлюлозосодержащего растительного сырья, которые при гидролизе образуют легкоусвояемые для микроорганизмов формы углеводов. В настоящее время на основе гидролиза растительного сырья производится более 600 тыс. т. сухой массы кормовых дрожжей.

## **Получение микробного белка на основе растительного сырья**

В качестве исходного сырья при такой технологии получения кормового белка обычно используются отходы целлюлозной и деревообрабатывающей промышленности, солома, хлопковая шелуха, корзинки подсолнечника, стержни кукурузных початков, свекловичная меласса, картофельная мезга, виноградные выжимки, верховой малоразложившийся торф, барда спиртовых производств, отходы кондитерской и молочной промышленности.

Измельченное растительное сырье, содержащее большое количество клетчатки, гемицеллюлоз, пентазонов, подвергают *кислотному гидролизу* при повышенном давлении и температуре. В результате 60 – 65 % содержащихся в них полисахаридов гидролизуются до моносахаридов. Полученный гидролизат отделяют от лигнина; избыток кислоты, применяемой для гидролиза, нейтрализуют известковым молоком или аммиачной водой. После охлаждения и отстаивания в гидролизат добавляют минеральные соли, витамины и другие вещества, необходимые для жизнедеятельности микроорганизмов.

*Типовая технологическая схема кислотного гидролиза растительного сырья.*

В гидролиз аппарате производится кислотный гидролиз растительного сырья, при этом полученный гидролизат поступает на трехступенчатую испарительную установку, где производится его охлаждение, после чего он поступает на конденсацию в теплообменник. Охлажденный гидролизат подвергается инверсии, которая происходит в инвенторе при температуре 100 °С и атмосферном давлении. Данный процесс осуществляется в течение 6 - 8 ч. После чего гидролизат поступает на нейтрализацию с целью освобождения его от серной кислоты. Процесс нейтрализации идет непрерывно в 2-х или 3-х последовательно соединенных нейтрализаторах и осуществляется известковым молоком или аммиачной водой. Затем полученный нейтрализат поступает на осветление, которое производится в отстойниках (при этом температура снижается до 40 - 25 °С). Окончательное охлаждение нейтрализата осуществляют в вакуум-охладительных установках и теплообменниках и в результате получают охлажденное нейтрализованное сусло. Таким образом, основными стадиями приготовления питательной среды с целью получения белков являются: гидролиз, инверсия, нейтрализация, отстаивание, охлаждение. Иногда нейтрализованный гидролизат подвергают продувки воздухом и при этом достигается отделение от него летучих примесей.

## **Технология производства кормовых дрожжей с применением гидролизатов растительного сырья**

Полученную таким образом питательную среду подают в ферментерный цех, где выращивают дрожжи.

Для культивирования на гидролизатах растительных отходов наиболее эффективны дрожжи родов *Candida*, *Torulopsis*, *Saccharomyces* (отличаются быстротой роста с использованием широкого спектра субстратов), которые

используются в качестве источника углерода гексозы, пентозы и органические кислоты.

Особенности выращивания данных дрожжей заключаются в том, что их культивирование осуществляют в нестерильных условиях.

Для получения кормовых дрожжей применяют технологию их *глубинного выращивания в ферментерах*, в которых обеспечивается режим постоянного перемешивания суспензии микробных клеток в жидкой питательной среде и оптимальные условия аэрации.

Параметры культивирования: концентрация источников углерода – 7 %, температура культивирования – 33 – 35 °С, рН среды 4 - 4,2, конечная концентрация биомассы на этой стадии 43 - 54 г/л абсолютно сухого вещества.

В целях поддержания заданного температурного режима в конструкции ферментера предусматривается система отвода избыточного тепла. Рабочий цикл выращивания культуры дрожжей длится около 20 ч. По окончании рабочего цикла культуральная жидкость вместе с суспендированными в ней клетками дрожжей выводится из ферментера, а в него вновь подается питательный субстрат и культура дрожжевых клеток для выращивания.

Выведенную из ферментера суспензию микробных клеток подают на флотационную установку, с помощью которой отделяют биомассу дрожжей от культуральной жидкости. В процессе флотация суспензия вспенивается, при этом микробные клетки всплывают на поверхность вместе с пеной, которая отделяется от жидкой фазы. После отстаивания дрожжевую массу концентрируют в сепараторе. Для достижения лучшей переваримости дрожжей в организме животных проводят специальную обработку микробных клеток (механическая, ультразвуковая, термическая, ферментативная), которая обеспечивает разрушение их клеточных оболочек. Затем дрожжевую массу упаривают до необходимой концентрации и высушивают.

Посредством обработки дрожжей ультрафиолетовым светом проводится их обогащение витамином D<sub>2</sub>, который образуется из содержащегося в них эргостерина. Для улучшения физических свойств готового продукта кормовые дрожжи выпускают в гранулированном виде.

Очень часто на основе ферментации гидролизатов растительного сырья наряду с производством *кормовых дрожжей* получают *этиловый спирт*. В этом случае особенность технологии заключается в том, что вначале проводится спиртовое брожение, в результате которого происходит утилизация содержащихся в гидролизате гексоз. После отгонки спирта остается неиспользованный субстрат – *барда*, содержащая в основном пентозы. Эту послеспиртовую барду используют как питательную среду для выращивания кормовых дрожжей.

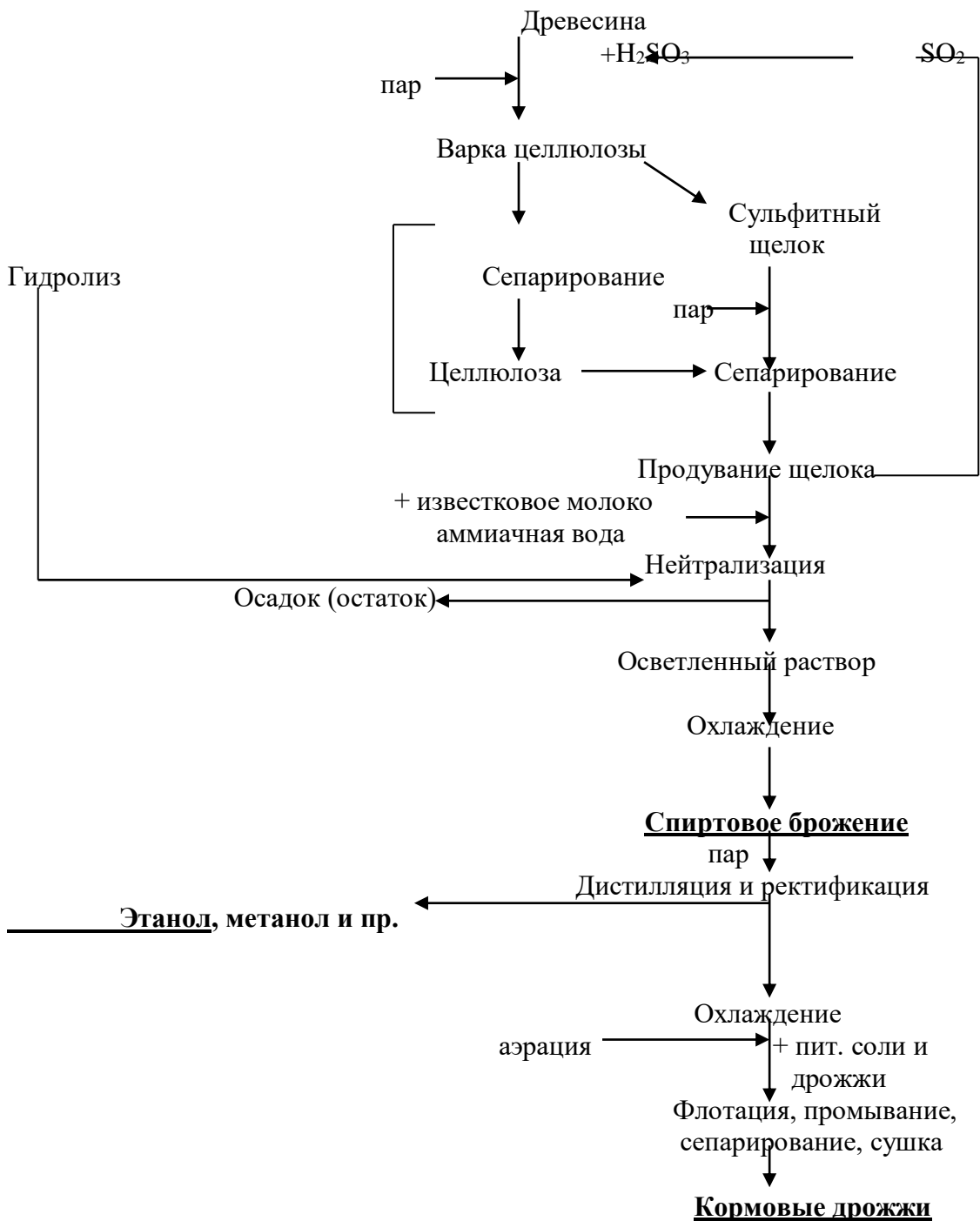
Схема комбинированной переработки целлюлозы с целью получения этилового спирта и кормовых дрожжей.

Технология получения кормовых дрожжей на основе спиртовой барды была усовершенствована в ФГУП Госниисинтезбелок. В основу разработанной биотехнологии переработки спиртовой барды положен способ непрерывной аэробной ферментации с добавлением в культуральную жидкость уг-



леродсодержащего источника – зерносырья, что позволяет увеличить выход белковой биомассы и сделать производство рентабельным. В качестве продуцента белка используется устойчивая ассоциация подобранных микроорганизмов: *Saccharomycopsis fibuligera* и *Rhodococcus erythropolis*.

Оптимизированный режим ферментации со скоростью протока  $0,12 \text{ ч}^{-1}$  и уровнем аэрации среды  $0,7 \text{ м}^3/\text{м}^3 \cdot \text{мин}$ . обеспечивает получение готового продукта – кормовой белковой добавки, содержащей не менее 50 – 52 % протеина, с выходом от исходного сырья (в пересчете на сухие вещества) – 85 – 90 %.



Экологически безопасная биотехнологическая установка для промышленной реализации технологии включает в качестве основных стадий: ферментацию, концентрирование и сушку готового продукта и обеспечивает:

- круглогодичную переработку до 100 тыс. т. в год спиртовой барды;
- получение белковой кормовой добавки (порошок или гранулы), для обогащения протеином рационов сельскохозяйственных животных и птиц, содержащей полный набор необходимых аминокислот, витамины группы В, микроэлементы;
- рентабельность производства при удельных энергетических затратах на технологию 0,45 – 0,5 тыс. кВт-ч/т и сроке окупаемости установки 1,7 – 2 года.