

Министерство сельского хозяйства Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
Саратовский государственный аграрный университет
имени Н.И.Вавилова

Методы получения промышленных штаммов микроорганизмов

Методические указания по выполнению лабораторных работ

направление подготовки
240700.62 Биотехнология

Профиль подготовки
«Биотехнология»

Саратов 2016

Методы получения промышленных штаммов микроорганизмов:
метод. указания по выполнению лабораторных работ для направления
подготовки 240700.62 Биотехнология / сост.: О.И. Гулий // ФГБОУ ВПО
«Саратовский ГАУ». – Саратов, 2016. – 35 с.

Методические указания по выполнению лабораторных работ составлены в соответствии с программой дисциплины и предназначены для студентов направления подготовки 240700.62 Биотехнология; содержат методику выполнения лабораторных работ, целью которых является ознакомление студентов с промышленными процессами, требованиями к штаммам-продуцентам, а также список рекомендуемой литературы.

Занятие 1. СПОСОБЫ И ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ ПРОМЫШЛЕННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Цель занятия: изучить суть промышленного культивирования микроорганизмов.

Краткие теоретические сведения.

Для осуществления любого биотехнологического процесса необходимы:

- культура микроорганизмов;
- питательная среда;
- аппаратура для выращивания и проведения вспомогательных операций;
- средства контроля и управления.

Культивирование является основной стадией технологического процесса и во многом определяет количественные и качественные характеристики производства биопрепаратов. На стадии культивирования осуществляется накопление, как самой биомассы, так и продуктов метаболизма (жизнедеятельности) микроорганизмов.

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

В том случае, когда культура растет на поверхности жидкой или плотной питательной среды, потребляя содержащиеся в ней субстраты и выделяя в эту среду продукты метаболизма, такой способ культивирования называют поверхностным,

При твердофазном культивировании клетки растут на поверхности твердой (плотной) среды, содержащей достаточное количество влаги и питательных веществ (чаще всего основу такой среды составляют пшеничные отруби).

При жидкофазном (глубинном) культивировании, микроорганизмы распределяются по всему объекту жидкой питательной среды, а кислород поступает к клеткам в результате интенсивной операции перемешивания.

Последний способ наиболее широко применяется в настоящее время в производстве большинства препаратов по следующим причинам.

1. Позволяет получить большое количество бактериальной массы за короткое время. Так, при культивировании микроорганизмов группы кишечной палочки в условиях состояния покоя количество микробов не превышает 1-2 млрд. см³, а с применением принудительной аэрации урожайность, в зависимости от состава питательной среды, достигает 50 - 60 млрд. см³. Это объясняется тем, что при аэрации практически отсутствует начальная стационарная фаза, и бактерии сразу начинают интенсивно размножаться, переходя в логарифмическую фазу.

2. Процесс легко управляем. При глубинном выращивании имеются существенные различия в степени потребления углеродных и азотистых веществ. Они интенсивно потребляются при аэрации культуральной жидкости, поэтому, чтобы процесс роста и размножения не прекращался быстро, нужно в процессе культивирования дополнительно вводить углеродные и азотистые соединения, а при необходимости и другие стимуляторы роста микроорганизмов. Добавление питательных веществ, особенно углеводов (глюкоза) и биологических стимуляторов усиливает интенсивность размножения, что и приводит к увеличению концентрации микроорганизмов в момент съема их биомассы. Данный способ также позволяет легко корректировать рН среды в процессе культивирования, что очень важно для достижения максимальной интенсивности размножения.

3. Максимальная технологичность. Так, поверхностный метод менее технологичен и в промышленных условиях применяется в исключительных случаях, когда нельзя воспользоваться глубинным методом.

Технологический процесс глубинного выращивания микроорганизмов в биореакторах (ферменторах) так же как и при использовании плотных питательных сред, складывается из следующих этапов:

1. Отбор штаммов микроорганизмов и работа с ними.
2. Приготовление посевной микробной культуры.
3. Приготовление и стерилизация питательных сред.
4. Подготовка биореактора к посеву.
5. Выращивание микроорганизмов в реакторе и контроль над процессом культивирования.

Кроме того, он включает ряд вспомогательных операций:

- стерилизацию оборудования и коммуникаций;
- приготовление и стерилизацию пеногасителей, растворов и др.

Остановимся на каждом из этапов культивирования.

1.1. ОТБОР ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ.

Эталонные, или референтные, штаммы хранятся и поддерживаются на заданном уровне во ВГНКИ ветеринарных препаратов. Эти штаммы, в свою очередь, являются производственными, поскольку на их основе готовятся вакцины. При этом инактивированные вакцины, как правило, готовятся из высоковирулентных штаммов, а живые вакцины - из аттенуированных (ослабленных), авирулентных штаммов.

Наряду с производственными и эталонными штаммами во ВГНКИ хранятся контрольные штаммы, которые используют для оценки качества вакцинных препаратов. Эти штаммы должны быть генетически однородными популяциями микроорганизмов со стабильными морфологическими, специфическими и биологическими свойствами. Основными требованиями к этим штаммам являются их высокие антигенные и иммуногенные свойства.

Антигенные свойства штаммов оцениваются по титру антител в сыворотке крови чувствительных животных через определенные сроки после введения им микроорганизмов.

Иммуногенные свойства штаммов определяются по устойчивости привитых животных к заражению возбудителем болезни определенной дозой контрольного (вирулентного) штамма и выражают 50%-ной дозой иммуногенности или по нарастанию титра антител в сыворотке крови. При этом 80% привитых животных должны быть невосприимчивы к инфекции, против которой их вакцинировали.

Безвредность (реактогенность) эталонного, производственного штамма проверяют по выраженности реакции у лабораторных и естественно-восприимчивых животных на 5-10-кратное увеличение прививочной дозы.

Производственные, эталонные штаммы, должны сохранять генетическую стабильность антигенных, иммуногенных и других присущих им биологических свойств на протяжении 10-20 последовательных пересевов как *in vivo*, так и *in vitro*.

1.2. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПОСЕВНОЙ МИКРОБНОЙ КУЛЬТУРЫ.

Обычно производственное культивирование микроорганизмов при изготовлении вакцин осуществляют в больших объемах. Поэтому вначале из имеющегося эталонного штамма микроорганизма, находящегося, как правило, в лиофильно высушенном состоянии в ампуле, делают посевы в небольшие емкости, например во флаконы емкостью 100-200 см³, заполненные по 50-150 мл производственной средой. Затем из флаконов делают высевы в большие емкости - бутылки объемом 18-20 литров.

При хорошем накоплении микроорганизмов такую культуру вносят в реактор и называют посевной (матрацной, матровой, маточной). При этом нужно предварительно рассчитать необходимое количество посевной культуры для производственного культивирования микроорганизмов, исходя из посевной дозы, которая обычно составляет от 1 до 101% по объему. Посевные микробные культуры также контролируются на сохранение ими типичных морфологических, культурально-биохимических, антигенных и иммуногенных свойств и отсутствие в них посторонней микрофлоры (ПМФ).

1.3. ПРИГОТОВЛЕНИЕ, СТЕРИЛИЗАЦИЯ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД.

Одним из этапов получения биопрепаратов является культивирование микроорганизмов, которое невозможно без достаточного количества разнообразных стандартных, эффективных и недорогих питательных сред (ПС).

В этой связи представляется целесообразным рассмотреть основные принципы, лежащие в основе конструирования ПС, к которым относятся:

- удовлетворение питательных потребностей микроорганизмов;
- выбор сырьевых источников для конструирования ПС;
- дифференциация ПС по целевому назначению;
- оптимизация ПС;
- стандартизация ПС.

Удовлетворение питательных потребностей микроорганизмов.

Основопологающим принципом конструирования ПС является полноценность, т.е. состав среды должен удовлетворять питательным потребностям культивируемых микроорганизмов.

В процессе роста микроорганизмы потребляют из окружающей их питательной среды целый ряд разнообразных химических веществ, составляющих основу энергетического и конструктивного обмена в клетках.

Поступление питательных веществ в цитоплазму может осуществляться через всю поверхность клетки, и связано с их диффузией, а также с действием специальных транспортных систем. Причем необходимые для роста и жизнедеятельности клетки элементы должны находиться в определенной, легкоусваиваемой форме.

К основным компонентам, формирующим клеточное вещество, относятся: углерод, азот, кислород и водород. Содержание этих элементов в различных микроорганизмах практически постоянно.

Синтетические возможности микроорганизмов и способы получения ими энергии разнообразны, следовательно, и очень индивидуальны их потребности в источниках питания.

Отсюда ясно, что универсальных сред, одинаково пригодных для роста всех без исключения микроорганизмов и клеток не существует.

Разнообразие микроорганизмов проявляется, прежде всего, в отношении к источникам углерода и азота. Эти элементы представлены в средах различными веществами, и именно они определяют специфичность сред.

В зависимости от формы, в которой микроорганизмы используют необходимые им питательные вещества, их подразделяют на две большие группы:

1. Автотрофы — микроорганизмы, которые могут синтезировать вещества своей протоплазмы из простых неорганических соединений. Например, они ассимилируют углерод из углекислоты воздуха, азот из аммиака.

2. Гетеротрофы - микроорганизмы, для которых источником углерода и азота служат органические вещества. Они усваивают органические углеродсодержащие соединения: углеводы, органические кислоты, спирты и углеводороды. Наиболее доступные из источников углеродного питания - углеводы, такие как глюкоза, сахароза или мальтоза.

В зависимости от типов используемых азотистых соединений микроорганизмы разделяют на две группы:

1. Протеолитические, расщепляющие высокомолекулярные белковые вещества и пептиды;

2. Дезаминирующие, требующие присутствия в среде готовых аминокислот, расщепление которых сопровождается выделением аммиака.

Очень часто микроорганизмы и клетки нуждаются во многих природных аминокислотах, которые являются универсальными компонентами питания. Они целиком включаются в структуру клетки.

Из всех незаменимых аминокислот ключевая роль принадлежит глутамину, а также аргинину, который имеет принципиальное значение для обезвреживания токсичных метаболитов незаменимых аминокислот и аммиака.

Неорганические соли, входящие в состав ПС, удовлетворяют потребности микроорганизмов в ионах K , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} или Fe^{3+} , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} . Они же определяют необходимое осмотическое давление среды, величину pH и буферную емкость.

В ПС необходимо также наличие некоторых других ионов, в частности, Zn , Cu , Ca и др. Обычно они присутствуют в достаточном количестве в виде примесей в питательных основах, минеральных компонентах среды или содержатся в водопроводной воде, используемой для приготовления ПС.

Функция необходимых микроорганизмам и клеткам ионов металлов заключается в том, что они служат активаторами и кофакторами многих ферментов, кроме того, участвуют в регуляции синтеза белка, являются компонентами белковых комплексов.

Считается также, что в ПС должны присутствовать факторы роста, различные по химической природе соединения, главным образом, органические вещества (витамины, аминокислоты, жирные кислоты, пуриновые и пиримидиновые основания), добавление которых в очень незначительных количествах стимулирует рост и размножение микроорганизмов.

К факторам роста относят витамины группы В, гемин (фактор X), путресцин, олеиновую кислоту, козимазу (фактор Y) и ее ферменты, пуриновые основания (аденин, гуанин, ксантин, гипоксантин) и пиримидиновые (цитозин, тиамин, урацил), гормоны и др.

Функции факторов роста разнообразны. Они участвуют в процессах обмена веществ. Отсутствие или недостаток их в среде приводит к бактериостатическому эффекту.

Выбор сырьевых источников для конструирования ПС.

Качество ПС во многом определяется полноценностью состава питательных субстратов и исходного сырья, используемого для их приготовления. Большое разнообразие видов сырьевых источников ставит сложную задачу выбора наиболее перспективных, пригодных для конструирования ПС требуемого качества. Определяющую роль в данном вопросе играют, прежде всего, биохимические показатели состава сырья, от которых зависит выбор способа и режимов его переработки с целью наиболее полного и эффективного использования содержащихся в нем питательных веществ.

Для получения ПС с особо ценными свойствами применяют, прежде всего, традиционные источники белка животного происхождения, а именно мясо крупного рогатого скота (КРС), казеин, рыбу и продукты ее переработки. Наиболее полно разработаны и широко применяются ПС на основе мяса КРС.

Учитывая дефицит кильки каспийской, широко применяемой в недалеком прошлом, для получения рыбных питательных основ стала использоваться более дешевая и доступная непищевая продукция рыбной промышленности - сухой криль, отходы переработки мяса криля, филетированный минтай и его перезрелую икру. Наибольшее же распространение получила рыбная кормовая мука (РКМ), удовлетворяющая требованиям биологической ценности, доступности и относительной стандартности.

Довольно широкое распространение получили ПС на основе казеина, который содержит все компоненты, имеющиеся в молоке: жир, лактозу, витамины, ферменты и соли. Однако необходимо отметить, что в связи с удорожанием продуктов переработки молока, а также повышением спроса на казеин на мировом рынке, применение его носит несколько ограниченный характер.

Из непищевых источников белка животного происхождения в качестве сырья для конструирования полноценных ПС необходимо выделить кровь убойных животных, которая богата биологически активными веществами и микроэлементами и, кроме того, содержит продукты клеточного и тканевого обмена. Гидролизаты крови сельскохозяйственных животных используются в качестве заменителей пептона в дифференциально-диагностических питательных средах.

К другим видам белоксодержащего сырья животного происхождения, которые могут быть использованы для конструирования ПС, относятся: плацента и селезенка КРС, сухой белковый концентрат - продукт переработки мясных отходов, спилковая обрезь, получаемая при обработке кожи, эмбрионы домашних птиц - отход вакцинного производства, кровезаменители с истекшим сроком годности, творожная сыворотка, мягкие ткани моллюсков и ластоногих.

Перспективно использование тушек пушных зверей из зверохозяйств, крови КРС, получаемой на мясокомбинате, обезжиренного молока и молочной сыворотки (отходы маслозаводов).

В целом же ПС, приготовленные из сырья животного происхождения, имеют высокое содержание основных питательных компонентов, являются полноценными и сбалансированными по аминокислотному составу и достаточно хорошо изучены.

Из продуктов растительного происхождения в качестве белкового субстрата для ПС возможно использование кукурузы, сои, гороха, картофеля, люпина и др. Однако, растительное сельскохозяйственное сырье содержит белок, несбалансированный состав которого зависит от условий выращивания культур, а также липиды в больших количествах, чем продукты животного происхождения.

Обширную группу составляют ПС, изготавливаемые из белкового сырья микробного происхождения (дрожжи, бактерии и т.д.). Аминокислотный состав микроорганизмов, служащих субстратом для приготовления ПС, хорошо изучен, а биомасса используемых микроорганизмов является полноценной по составу питательных веществ и характеризуется повышенным содержанием лизина и треонина.

Разработан целый ряд ПС комбинированного состава из белковых субстратов различного происхождения. К ним относятся дрожжевая казеиновая питательная среда, дрожжевая мясная и т.д.

Основой большинства известных ПС являются гидролизаты казеина, мяса КРС и рыбы (до 80%). Удельный же вес непищевого сырья в технологии конструирования ПС составляет всего 15% и в дальнейшем требует увеличения.

Используемое для получения питательной основы (ПС) непищевое сырье должно удовлетворять определенным требованиям, а именно быть:

- полноценным (количественный и качественный состав сырья должен, в основном, удовлетворять питательным потребностям микроорганизмов и клеток, для которых разрабатываются ПС);
- доступным (иметь достаточно обширную сырьевую базу);
- технологичным (затраты на внедрение в производство должны осуществляться с использованием имеющегося оборудования или существующей технологии);
- экономичным (затраты на внедрение технологии при переходе на новое сырье и его переработку не должны превосходить нормы затрат для получения целевого продукта);
- стандартным (иметь длительные сроки хранения без изменения физико-химических свойств и питательной ценности).

Дифференциация питательных сред по целевому назначению.

Прежде чем приступить к разработке ПС, необходимо решить вопрос о предназначении будущей среды. Следовательно, дифференциация ПС по целевому назначению также является одним из основных принципов их конструирования.

В соответствии с этим принципом среды подразделяют:

- на микробиологические (предназначенные для культивирования бактерий, дрожжей, грибов);

- среды для культур клеток, часть из которых относят также к вирусологическим средам.

По масштабам использования ПС подразделяются на:

- производственные (технологические);
- среды для научных исследований с ограниченным по объему применением.

Производственные ПС должны быть доступными, экономичными, удобными в

приготовлении и использовании для крупномасштабного культивирования. Среды для научных исследований, как правило, бывают синтетическими и богатыми по набору питательных веществ.

Оптимизация многокомпонентного состава питательной среды.

Процессы культивирования микроорганизмов можно оптимизировать методами, которые разделяются на две группы.

К первой группе относятся методы оптимизации по экспериментальным данным. Они не требуют привлечения сложных математических расчетов, но связаны со значительными затратами времени, возникающими из-за необходимости проведения большого количества экспериментальных исследований.

Ко второй группе относятся методы с применением математических моделей.

В свою очередь последние подразделяются на две отличающиеся по сложности исполнения и точности описания реального процесса подгруппы.

К первой следует отнести методы, основанные на построении математической зависимости (уравнения регрессии) протекания ограниченных процессов с использованием традиционного метода планирования эксперимента Бокса-Уилсона. Он позволяет строить поисковые модели, когда исследователь, не располагая сведениями о механизме наблюдаемого явления, имеет лишь информацию о реакции системы на возмущение.

Ко второй подгруппе относятся методы, основанные на построении моделей, базисом которых являются законы, описывающие протекание фундаментальных процессов микробиологии (например, процесс размножения и отмирания микроорганизмов). В этом случае принимается за основу положение, что комплекс всех изменений, происходящих в культуральной жидкости (изменение содержания компонентов ПС, образование и расходование промежуточных продуктов биосинтеза, выделение метаболитов и катаболитов, трансформация органических соединений) - это следствие процессов самовоспроизведения, а также результат реакций, связанных с адаптацией и саморегуляцией микробной популяции.

Задача оптимизации управляемого периодического процесса культивирования по максимизации бактериальной массы или целевого продукта в общем, виде выглядит следующим образом: определяется наиболее рациональный состав исходной ПС, а затем профили изменения основных технологических параметров, обеспечивающих значение выбранного критерия эффективности при заданных ограничениях.

Обычно оптимизация процесса культивирования начинается с выбора ПС, обеспечивающей питательные потребности популяции микробов или синтез максимального количества продуктов метаболизма. Количество компонентов, входящих в ПС для выращивания микроорганизмов, может превышать десяток элементов. Биологической роли каждого элемента, влияющего в целом ряде случаев в микродозах на активность метаболических превращений в клетке, посвящено большое число исследований.

Сложность выбора определяется еще и тем, что на рост микроорганизмов влияет также взаимное соотношение компонентов.

Большое количество и взаимосвязь составляющих ПС ингредиентов обуславливает выбор методов экспериментального исследования. Обычно используемые методы однофакторного планирования в этих условиях малоэффективны. Использование же математических методов многофакторного планирования экспериментов позволяет установить необходимые концентрации компонентов питания с учетом их совместного влияния на скорость роста, качество биомассы и количество целевого продукта.

Высоко объективным является и метод балансировки состава ПС, в основу которого заложено использование уравнения ассимиляции микробной популяции, где учитываются такие показатели:

- концентрация потребляемого субстрата;
- время потребления;

- концентрация биомассы;
- коэффициент метаболизма;
- константы скорости образования и отмирания микроорганизмов;
- концентрация субстрата в начальный момент культивирования.

Обычно при периодическом процессе культивирования большинство важных параметров, в том числе и концентрация питательных веществ в культуральной жидкости, изменяется в течение времени. Вместе с тем, профили их изменения не всегда близки к оптимальным. Поэтому при подборе ПС для периодического культивирования возникает противоречие между необходимостью внесения в нее достаточно большого количества субстратов и ингибирующим влиянием высоких концентраций одного или нескольких элементов питания на рост микробной клетки и(или) биосинтез целевого продукта. Снижение концентрации таких субстратов в исходной ПС с последующим их добавлением в ферментор, по определенной программе, позволяет исключить ингибирование процесса в начальной фазе роста и в то же время не допустить его лимитирования в последующий период размножения микробов.

Стандартизация питательных сред.

Кроме оптимизированного состава, питательные среды, используемые в микробиологической практике для выполнения различных экспериментальных работ, а также для выпуска стабильных по своим свойствам биопрепаратов, должны быть стандартны.

Под стандартностью ПС принято понимать постоянство их состава по биохимическим показателям: аминокислотному, минеральному, жирнокислотному, углеводному составам, а также содержанию витаминов, углеводов, антибиотиков и др. компонентов.

Большое значение для получения более стандартных ПС имеют разработки на использование в их производстве сухих питательных основ, готовых сухих ПС промышленного изготовления и сухих витаминсодержащих добавок.

Примером может служить технология изготовления сухого ферментативного гидролизата казеина неглубокой степени расщепления, который широко используется при конструировании многих ПС, а также сухой экстракт кормовых дрожжей.

Работы, направленные на повышение стандартности ПС, могут приводить к их удорожанию, но это считается оправданным, т.к. применение разнокачественных сред может приводить к срыву еще более дорогостоящего эксперимента, к появлению брака и к получению несопоставимых результатов.

1.4. ПОДГОТОВКА БИОРЕАКТОРА К ПОСЕВУ.

Для создания оптимальной биореакторной системы необходимо точно придерживаться следующей генеральной линии:

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

К материалам, используемым при конструировании сложных, прецизионно работающих ферменторов, предъявляются определенные требования (порой весьма строгие):

- а) все материалы, вступающие в контакт с растворами, подающимися в биореактор, соприкасающиеся с культурой микроорганизма, должны быть устойчивыми к коррозии, чтобы предотвратить загрязнения металлами даже в следовых количествах;

б) материалы должны быть нетоксичными и, чтобы даже при самой малой растворимости они не могли бы ингибировать рост культуры;

в) компоненты и материалы биореактора должны выдерживать повторную стерилизацию паром под давлением;

г) перемешивающая система биореактора и места поступления и выхода материалов и продуктов должны быть легко доступными и достаточно прочными, чтобы не деформироваться или ломаться при механических воздействиях;

д) необходимо обеспечить визуальное наблюдение за средой и культурой, так что материалы, используемые в процессе, по возможности должны быть прозрачными.

1.5. ВЫРАЩИВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ В РЕАКТОРЕ И КОНТРОЛЬ ЗА ПРОЦЕССОМ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ.

Рассмотрим примеры особенностей культивирования некоторых микроорганизмов с применением:

1. Активной аэрации микробных культур.

2. В покоем состоянии без применения механических мешалок (без аэрации).

3. В состоянии анаэробноз.

Промышленное культивирование микроорганизмов с применением активной аэрации.

Процесс осуществляют в реакторах объёмом от 0,01 до 100 м³, как правило, в асептических условиях. Пустой аппарат тщательно моют, проверяют герметичность, стерильность и стерилизуют острым паром. Одновременно стерилизуют все коммуникации. Затем в реактор подают простерилизованную в УНС и охлажденную до 25-35°C питательную среду, вносят посевной материал в количестве 5-10% объёма питательной среды (0,2-0,4 млрд. живых микробных клеток в 1 мл по оптической концентрации), включают систему аэрации и перемешивающее устройство. Так, например, для листерий и сальмонелл скорость вращения механической мешалки составляет 150-180 об/мин, а культура микробов аэрируется подогретым до 37°C очищенным, стерильным воздухом с коэффициентом подачи 1,5 л воздуха на 1 л среды в одну минуту. Коэффициент заполнения реактора обычно 0,5-0,8.

Превышение этой величины может привести к значительному уносу пены с отходящим воздухом и нарушению асептических условий.

Температуру культивирования поддерживают путём подачи охлаждающей воды в рубашку и другие теплообменные устройства аппарата.

Оптимальная температура для разных микроорганизмов различна, обычно от 25 до 37°C.

Для регулирования рН культуральной жидкости в ходе культивирования добавляют соответствующие титрующие агенты (щёлочи, кислоты, раствор аммиака и др.). Продолжительность выращивания микроорганизмов в культиваторе 18-24 ч, спорообразующих - 40-48 ч и 200-250 ч - для актиномицетов и микроскопических грибов.

Процесс культивирования контролируют по показателям приборов - изменение температуры, рН, расход воздуха, частота вращения мешалки, рО₂, а также путём периодического отбора проб (через 1-12 ч в зависимости от длительности процесса).

В отобранных пробах определяют содержание углеводов, общего и аммонийного азота, фосфора, биомассы, целевого продукта метаболизма, морфологию микробных клеток, наличие посторонней микрофлоры.

Технология культивирования микроорганизмов в покоем состоянии без аэрации.

Некоторые микроорганизмы относятся к группе микроаэрофильных (возбудители бруцеллёза, лептоспироза, кампилобактериоза и др.), которые не требуют принудительной аэрации питательной среды, в которой они выращиваются.

Применяют баллонный и реакторный способы культивирования.

Баллонный способ, в частности для культивирования лептоспир, заключается в том, что микробные культуры лептоспир каждого серологического варианта выращиваются в 16-

литровых стеклянных баллонах с 10-12 л сывороточной или альбуминно-сывороточной (производственной) средами при температуре 27-28°C в течение 5-7 суток.

При реакторном способе культивирование проводят в ферменторах, которые могут быть объединены в единую технологическую цепочку. Так, на Ставропольской биофабрике при культивировании лептоспир было смонтировано 54 реактора объёмом от 250 до 5000 л.

Технология промышленного культивирования анаэробных микроорганизмов.

К анаэробным микроорганизмам относятся такие, которые способны жить и размножаться при отсутствии атмосферного кислорода.

В силу биологических особенностей анаэробов методы культивирования их в промышленности имеют свои особенности.

1. При культивировании анаэробных микроорганизмов нужно в реакторах создать условия полного вытеснения из питательной среды свободного кислорода. Это достигается путём заполнения анаэробостатов газовой смесью водорода и двуокиси углерода, а остаточный кислород может быть удалён путём каталитического связывания с воздухом.

Анаэробные условия могут быть достигнуты также добавлением в среду восстанавливающих агентов, таких как цистина и сульфида натрия, аскорбиновой кислоты.

2. Степень анаэробноза определяется окислительно-восстановительным потенциалом (Eh). Для этих целей в среду вводят окислительно-восстановительные индикаторы, чаще всего используют резазурин (диазорезоурин), меняющий цвет от сине-розового до бесцветного. Бесцветное состояние достигается при Eh около 100 мВ и указывает на наличие анаэробных условий.

3. При культивировании анаэробов необходимо постоянно корректировать pH среды, поддерживая её в пределах 7,2-7,8. В процессе роста анаэробов pH среды очень быстро снижается в кислую сторону, что приводит к ингибированию их роста.

Вопросы для контроля знаний и самопроверки.

1. Способы и особенности культивирования микроорганизмов.
2. Принцип отбора штаммов микроорганизмов.
3. Приготовление посевной микробной культуры.
4. Принципы конструирования питательных сред.
5. Дифференциация питательных сред.
6. Оптимизация и стандартизация питательных сред.

Занятие 3. БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ.

Цель занятия: изучить суть культивирования микроорганизмов в данных процессах.

Биотехнологические процессы принципиально отличаются от процессов химического синтеза и могут быть двух типов: периодическими и непрерывными. Специфика биотехнологических процессов состоит в том, что в них участвуют живые клетки, субклеточные структуры или выделенные из клеток ферменты и их комплексы. Это оказывает довольно существенное влияние на процессы массопередачи (обмена веществ между различными фазами - перенос кислорода из газообразной фазы в жидкую) и теплообмена (перераспределение тепловой энергии между взаимодействующими фазами). Поэтому одним из важнейших компонентов биореакторов является система перемешивания, обеспечивающая однородность условий в аппарате, оптимальность массопередачи между фазами реактора, между культуральной жидкостью и клетками и т. д.

Другим существенным различием между биотехнологическими и химическими процессами является необходимость создания аэробных или анаэробных условий, требуемых для культивирования соответствующего организма. Поэтому в определенных случаях необходимо подавать кислород и удалять образующиеся газообразные продукты иного рода, в первую очередь двуокись углерода (CO₂).

Системы **аэрации** зачастую бывают очень сложной конструкции, поскольку они должны обеспечить баланс между расходом O₂ и его поступлением в нужных количествах, учитывая тот факт, что потребность в кислороде не одинакова на различных стадиях культивирования.

Крайне важным является обеспечение должного уровня **теплообмена** в биореакторах, поскольку жизнедеятельность и метаболическая активность объектов зависит в значительной степени от колебаний температуры. Поддержание температуры в определенном узком диапазоне диктуется: 1) резким снижением активности ферментов по мере падения температуры и 2) необратимой инактивацией (денатурацией) макромолекул (в первую очередь белков) при ее повышении до критических значений. Температурный оптимум у каждого организма лежит в определенных пределах. Большинство биотехнологических процессов осуществляется в мезофильных условиях (30-50⁰С). С одной стороны, это имеет преимущество, потому что лишь в редких случаях приходится обеспечивать повышенный подогрев реакторов. Однако, с другой стороны, возникает проблема удаления избыточного тепла, выделяющегося при интенсивном росте культивируемых клеток, поэтому биореактор должен быть оснащен эффективной системой охлаждения.

Еще одной серьезной проблемой при культивировании в биореакторах является **пенообразование**, связанное с необходимостью аэрирования содержимого, в котором постоянно присутствуют поверхностно-активные вещества (ПАВ) продукты распада жиров (мыла) и белки (составные компоненты субстрата, например, белки соевой и кукурузной муки и т. п.). Образующийся слой пены опять же, с одной стороны, способствует росту аэробных микроорганизмов, а с другой - сокращает полезный объем реактора и способствует заражению культуры посторонней микрофлорой. Это заставляет интенсивно разрабатывать эффективные системы пеногашения.

Специфическим элементом биореактора является система, обеспечивающая **стерильность** процесса. Стерилизация осуществляется на разных этапах процесса, как до его начала, так и при осуществлении и после окончания.

Биотехнологически ценные продукты синтезируются как в экспоненциальной фазе (нуклеотиды, многие ферменты, витамины - так называемые первичные метаболиты), так и в стационарной фазе роста (антибиотики, пигменты и т. п. так называемые вторичные метаболиты).

Довольно широко в биотехнологии используется периодическое культивирование с *подпиткой*, при котором, помимо первичного внесения питательного субстрата до засева культуры, в процессе культивирования в аппарат через определенные интервалы добавляют питательные вещества либо порциями, либо непрерывно "по каплям".

Существует также *отъемно-доливочное* культивирование, когда часть содержимого биореактора периодически изымается и добавляется равное количество питательной среды. Такой прием обеспечивает регулярное "омолаживание" (обновление) культуры и задерживает (отдаляет) ее переход в фазу отмирания. Этот прием иногда называется *полунепрерывным* культивированием.

Модификацией периодического культивирования является культивирование с *диализом*, при котором питательный субстрат постоянно поступает в реактор через специальную мембрану. Диализ ведет к снижению концентрации продуктов жизнедеятельности клеток, неблагоприятно влияющих на их жизнеспособность. Помимо этого, диализ удаляет из культуры часть жидкости, что позволяет получать в конце процесса концентрированную биомассу.

В непрерывных процессах культивирования клетки постоянно поддерживаются в экспоненциальной фазе роста. С этой целью в биореактор непрерывно подается свежая питательная среда и обеспечивается отток из него культуральной жидкости, содержащей клетки и продукты их жизнедеятельности. Основным принципом непрерывных процессов (как уже отмечалось выше) является точное соблюдение равновесия между приростом

биомассы вследствие деления клеток и их убылью в результате разбавления содержимого свежей средой. Различают хемостатный и турбидостатный режимы непрерывного культивирования.

При *хемостатном режиме* культивирования саморегулируемая система возникает в силу следующих причин: если первоначальное поступление свежей питательной среды и вымывание биомассы превышает скорость деления клеток, то в результате разбавления культуры снижается концентрация веществ, ограничивающих ростовые процессы и скорость роста культуры повышается; увеличивающаяся популяция начинает активнее "выедать" субстрат, что в свою очередь приводит к торможению роста культуры. Конечным итогом этих процессов является (после серии затухающих колебаний) установление равновесия между скоростью роста культуры и ее разбавлением.

Биореактор, работающий в хемостатном режиме культивирования, называют хемостатом. Его конструкция предусматривает наличие:

- 1) приспособления для подачи питательной среды;
- 2) устройства, обеспечивающего отток культуральной жидкости вместе с клетками, и 3) системы, контролирующей концентрацию элементов питательной среды и управляющей скоростью подачи питательной среды.

Последнее является наиболее важным и наиболее сложно осуществимым устройством.

Турбидостатный режим культивирования базируется на прямом контроле концентрации биомассы. Наиболее распространенным методом ее определения является измерение светорассеивания с помощью фотоэлементов. Повышение концентрации клеток и соответственно оптической плотности автоматически ускоряет проток жидкости и наоборот. По своей конструкции турбидостаты отличаются от хемостатов лишь системами контроля скорости протока.

Хемостаты применяются в процессах, характеризующихся малым протоком, когда концентрация клеток изменяется незначительно с изменением скорости протока, что облегчает саморегулировку системы.

Область использования турбидостатов - высокие скорости разбавления, обуславливающие быстрое и резкое изменение концентрации биомассы. С технической точки зрения турбидостат может применяться только для культивирования одноклеточных микроорганизмов. При длительном культивировании в турбидостате возникает довольно серьезная проблема, связанная с прилипанием клеток к фотоэлементу. Однако имеются и определенные преимущества. Так, например, если засеивается смешанная культура, то в турбидостате автоматически отбирается более быстро растущий вид, что может использоваться для предохранения от массивного заражения посторонней микрофлорой (если, конечно, она растет медленнее) и селекции определенных форм. Непрерывное культивирование в одном биореакторе называется одностадийным. Многостадийное выращивание предусматривает последовательное или каскадное расположение биореакторов, позволяющее обеспечивать внедрение принципа дифференцированных режимов в непрерывные биотехнологические процессы, основанные на создании системы биореакторов.

При разработке новых биотехнологических процессов сначала прибегают к периодическому культивированию. На непрерывный режим пока еще переведено небольшое число процессов, однако перспективность его не вызывает сомнений, несмотря на более сложные конструкции аппаратов и систем контроля (иными словами, на более солидные капиталовложения).

Конечно, и периодическое культивирование еще не исчерпало своих возможностей. Пока что выбор режима подчиняется соображениям экономической целесообразности.

В последнее время в биотехнологию внедряется принцип дифференцирования режимов культивирования: разные этапы одного и того же процесса осуществляются при различных условиях - температура, рН, аэрация и т. п. Естественно, это создает новые (дополнительные) требования при конструировании реакторов. Таким образом, в

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

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

Открытые и замкнутые ферментационные системы.

В практике современной индустриальной биотехнологии существует три главных типа биореакторов и две формы биокатализаторов.

Биореакторы могут функционировать на основе *разовой* (однократной), *восполняемой* (не полностью) и *непрерывной* (продолженной) загрузки. А в самих реакторах культуры могут быть статическими и перемешивающимися, находиться в присутствии кислорода (аэробы) или без него (анаэробы), а также в водной фазе или условиях низкого увлажнения.

Биокатализаторы (цельные клетки или ферменты) могут быть свободными или иммобилизованными путем прикрепления к поверхности биореактора или к специальным устройствам. Обычно реакции, протекающие в ферментаторах, осуществляются при умеренных значениях pH (около нейтрального) и температуры (20-60⁰C). При многих биотехнологических процессах конечные продукты метаболизма (так называемые целевые продукты) накапливаются в низких концентрациях в растворимой фазе (в водной среде) и требуют сепарации, прежде чем будут направлены на реализацию. Биореакторные системы для выращивания микроорганизмов могут быть классифицированы как "замкнутые" и "открытые". Система рассматривается в качестве замкнутой, когда многие компоненты данной системы не могут быть из нее удалены или добавлены. Так, например, в традиционных однократных (т. е. замкнутых) ферментационных системах все питательные компоненты добавляются в начале ферментации и, как результат этого, скорость роста, находящегося в таких условиях организма, в конечном счете, будет снижена до нуля вследствие уменьшения количества питательных веществ или накопления токсических продуктов отхода метаболизма. Системы, функционирующие в таких условиях, называются как *batch-системы* (замкнутые системы).

Большинство современных биотехнологических систем функционируют как *batch-процессы*, при которых однажды оптимизированные условия обеспечивают максимальное накопление целевого (требуемого) продукта, например, приготовление пива, производство антибиотиков и ферментов и т. п.

Модификацией процесса с разовой загрузкой является возобновляемая ферментация (*feed batch* - от *feed*-насыщающий), при которой количество питательного вещества может быть добавлено в ходе ферментации с целью восполнения частично израсходованного субстрата или для активации процесса. Однако в своей принципиальной основе подобные системы остаются замкнутыми, поскольку у них нет постоянного оттока содержимого.

В противоположность этому, ферментационная система, рассматривается как открытая, если ее компоненты (микроорганизмы и питательные субстраты) могут постоянно добавляться и удаляться из биореактора. Такие ферментеры оснащены приспособлениями, постоянно подающими свежую питательную среду и удаляющими биомассу и другие продукты. В таких системах скорость конверсии субстрата в биомассу или в целевой продукт должна быть точно сбалансирована со скоростью поступления вышеуказанных компонентов, что обеспечивает устойчивое состояние метаболических процессов в реакторе.

Хотя непрерывные процессы приобрели широкое практическое применение в лабораторных условиях (масштабах), лишь немногие из них используются в

промышленности. Однако непрерывные процессы довольно широко практикуются в производстве одноклеточного белка; например, продукция ICI Prutin на метаноле и производство микопротеина компанией Rank Hovis McDougall.

Процесс периодического культивирования.

Периодическое культивирование включает:

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

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

При этом типе культивирования рост клеточной популяции подразделяется на несколько фаз:

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

Процесс непрерывного (хемостатного) культивирования.

Хемостатная, или непрерывная, культура представляет собой прочную культуру тех или иных микроорганизмов. В таком случае возможность продления жизни микробной популяции поддерживается с помощью непрерывной подачи свежей среды и постоянного отбора микробной биомассы или образовавшихся продуктов метаболизма, т.е. можно культуру микроорганизма как бы зафиксировать в одной, например стационарной, фазе роста и получать нужные продукты обмена или биомассу во времени столько, сколько требуется.

Таким образом, максимальная производительность в хемостатной культуре всегда выше, чем максимальная производительность в периодической культуре.

Для оптимизации биотехнологических процессов требуется постоянный и тщательный контроль за изменяющейся картиной ферментации, что обеспечивается наличием в биореакторах соответствующих датчиков, позволяющих осуществлять избирательный анализ определенных параметров ферментационного процесса. Неотъемлемой частью большинства ферментаций является та или иная степень компьютеризации. Системы перемешивания являются важным классификационным принципом биореакторов различного типа. Правда, поскольку биореакторы являются многопараметровыми аппаратами, они могут классифицироваться и по другим критериям: размерам, целевым назначениям (лабораторные, опытно-промышленные или пилотные, промышленные), режиму работы (периодического и непрерывного действия), условиям культивирования (аэробные и анаэробные, мезофильные и термофильные, для поверхностного и глубинного выращивания, для жидких и твердых питательных сред, газо-фазные).

И все же система перемешивания имеет не последнее значение в классификации. По способу перемешивания и аэрации биореакторы подразделяются на аппараты с механическим, пневматическим и циркуляционным перемешиванием.

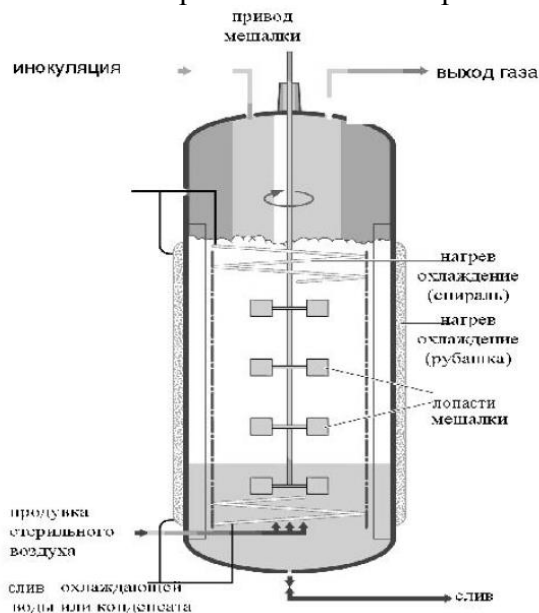
Аппараты с механическим перемешиванием.

Эти реакторы имеют механическую мешалку с центральным валом и лопастями (лопатками), число которых обычно равно 6, реже 8.

Лопастки могут быть прямыми или изогнутыми, часто их располагают в несколько ярусов, что обеспечивает более эффективное перемешивание больших объемов жидкости. В систему входят также отражательные перегородки - узкие металлические пластинки, прикрепленные к внутренним стенкам биореактора. Они предотвращают возникновение водоворотов и обеспечивают вихревое движение жидкости, равномерно распределяемое, но всему объему реактора.

В некоторых ферменторах используют полые мешалки, в которых воздух поступает в среду культивирования через отверстия в нижнем конце их валов и полые лопатки.

Аппараты с механическим перемешиванием - наиболее распространенные конструкции в современной микробиологической промышленности.

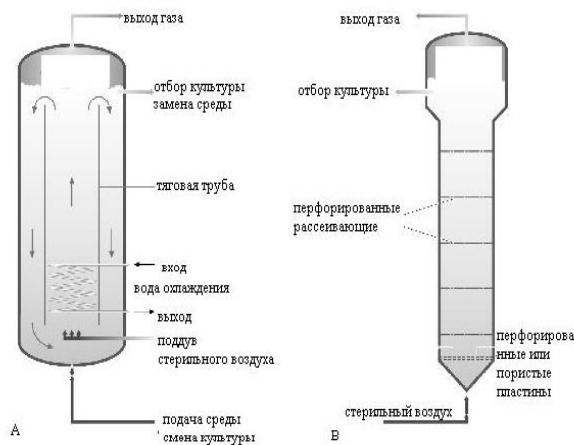


Ферментер с механическим перемешиванием.

Аппараты с пневматическим перемешиванием.

В такого типа аппаратах мешалка отсутствует и перемешивание жидкости осуществляется пузырьками газа. Естественно, что скорость массообмена в них намного ниже, чем в ферменторах с механическим перемешиванием (с мешалками).

Классическим аппаратом такого типа является эрлифтный реактор (air lift - подъем воздуха). Биореакторы с пневматическим перемешиванием характеризуются более мягким (плавным) перемешиванием содержимого и получили распространение при выращивании клеток животных и растений. Пневматические аппараты привлекают также простотой конструкции и малыми энергозатратами.



Ферментеры с пневматическим перемешиванием:

- а) эрлифтный;
- б) пузырькового типа

Основной их недостаток - "тихоходность" Однако и это не всегда является недостатком, поскольку, например, в условиях "тихоходных" установок культуры клеток растений характеризуются биосинтетическими способностями, присущими целому растению. Так, клетки *Digitalis lanata* в эрлифтном ферменторе продуцируют ценный кардиологический препарат - р - метилдигоксин.

Аппараты с циркуляционным перемешиванием.

Биореакторы циркуляционного или гидродинамического типа оснащены насосами и эжекторами, создающими направленный ток жидкости по замкнутому контуру (кругу). Жидкость увлекает за собой пузырьки газа и тем самым культуральная среда одновременно с перемешиванием может насыщаться либо атмосферным кислородом, либо (с использованием специальных устройств и эжекторов) газом иного типа. Эти аппараты (биореакторы) отличаются простотой конструкции и надежностью в эксплуатации.

Ферментеры циркуляционного типа часто заполняются твердыми частицами (насадкой), которые способствуют лучшему перемешиванию содержимого реактора, препятствуют обрастанию стенок при длительном культивировании, а также обеспечивают диспергирование воздуха в жидкости. Некоторые микроорганизмы, прикрепляясь к таким насадкам (в частности, грибы и актиномицеты), развиваются намного лучше. От биореакторов с насадками - один шаг к ферментерам для иммобилизованных клеток или к аппаратам для иммобилизованных ферментов.

В последнее время разрабатываются новые способы аэрации. Например, воздух может подаваться через специальные полипропиленовые мембраны. Это позволяет избежать пенообразования и очень хорошо зарекомендовало себя при выращивании клеток эукариотических организмов, в частности при промышленном получении интерферона.

Система теплообмена.

Теплообмен осуществляется с помощью труб с охлаждающим или нагревающим агентом, которые оплетают аппарат и образуют так называемую рубашку реактора. Иногда эта система труб располагается непосредственно в полости ферментера. Нагревающими агентами в промышленных биореакторах служат горячая вода или пар. Естественно, в лабораторных ферментерах чаще используется электрический подогрев. В качестве охлаждающих агентов применяют воду с низкой температурой (артезианскую или пропущенную через холодильную установку); более глубокое охлаждение достигается использованием этиленгликоля или фреонов. Проблема охлаждения ферментеров становится очень значительной в промышленных масштабах.

Система пеногашения.

Пеногашение - средство борьбы с избыточным пенообразованием. Существуют химические, механические, акустические и другие виды пеногашения. Наиболее часто применяют химические и механические способы пеногашения. К химическим средствам относятся поверхностно-активные вещества, которые, внедряясь в стенки пузырей, становятся центрами их неустойчивости. Эффективными пеногасителями служат растительные (соевое, рапсовое, кокосовое, подсолнечное, горчичное) масла, животные (сало, рыбий жир) и минеральные жиры. Недостатком этих пеногасителей является то, что при их утилизации микробными клетками сами по себе способствуют пенообразованию.

Механические пеногасители представляют собой различные устройства, сбивающие пену: диски, лопасти, барабаны, располагающиеся в верхней части реактора. Более сложными приспособлениями являются сепараторы пены, которые одновременно служат для сбора биомассы, содержащейся в пенном слое. Все эти устройства, конечно же, приводят к дополнительным затратам и удорожают производство.

Система стерилизации.

Устройства и режим стерилизации определяется конструкцией биореактора, вспомогательного оборудования, используемых питательных сред и т. п. Наибольшее значение имеют термический метод стерилизации оборудования и сред и фильтрационный способ, применяемый для удаления микроорганизмов из подаваемого в ферменторы воздуха или другого газа.

Режимы термальных способов стерилизации определяются химическим составом питательных сред. При этом определяющим является состояние компонентов среды после стерилизации; главное сохранность ее питательных качеств.

Специализированные ферментационные процессы.

Большинство ферментационных технологий связано с жидкими аэрируемыми системами, однако в настоящее время достаточно широко используются ферментационные технологии, основанные на утилизации плотных субстратов, при отсутствии воды или малом ее количестве, а также в безкислородных условиях.

Анаэробные процессы.

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

Твердофазные процессы.

Многие биотехнологические процессы основаны на взаимодействии трех фаз: твердой, жидкой и газообразной. Существуют процессы, в которых роль жидкой фазы сведена до минимума: она лишь используется для увлажнения твердой поверхности или воздуха (газа). В зависимости от преобладающей фазы процессы и соответствующие им аппараты подразделяются на твердофазные и газо-фазные. Твердофазные осуществляются, как правило, на основе растительного сырья и используют чаще всего мицелиальные грибы и дрожжи или их комбинации. Различают три типа твердофазных процессов:

- Поверхностные, когда слой субстрата не превышает 3-7 см ("тонкий слой"). В качестве "биореакторов" используются большие (до нескольких квадратных метров) подносы или культуральные камеры.

- Глубинные процессы, идущие в не перемешиваемом слое ("высокий слой"). Биореакторы представляют собой глубокие открытые сосуды. Для аэробных твердофазных процессов разработаны приспособления, обеспечивающие диффузионный и конвекционный газообмен.

- Перемешиваемые процессы, протекающие в перемешиваемой и аэрируемой массе субстрата, который может быть гомогенным (полужидкой консистенции) или состоять из частиц твердого вещества, взвешенных в жидкости (переходный вариант от твердофазного

процесса к процессу в жидкой фазе). Для этого обычно используют биореакторы с низкоскоростным перемешиванием.

Интерес к твердофазным процессам обусловлен их некоторыми преимуществами по сравнению с процессами, осуществляющимися в жидкой фазе:

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

Однако и здесь существуют свои проблемы. Вследствие отсутствия хорошего перемешивания продуцент часто растет в виде колоний и лишь постепенно может распространяться по субстрату; при этом возникает локальная нехватка питательных веществ, тогда как часть субстрата вообще не используется (не колонизируется) продуцентом; недостаточно эффективный контроль за аэрацией и др.

Газо-фазные процессы.

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

Особенности биотехнологии культивирования вирусов.

Вирусы являются облигатными внутриклеточными микроорганизмами, поэтому на искусственных питательных средах они не растут. Для культивирования вирусов используют 3 живые системы:

1. Восприимчивые животные.
2. Куриные эмбрионы.
3. Культуры клеток.

При лабораторном культивировании вирусов используют культуры клеток, растущие на поверхности стенок тех или других емкостей (матрасах). В крупномасштабном производстве используют метод выращивания суспензионных клеточных культур. Этот метод впервые описал в 1953 г. Оуенс. Он показал способность клеток размножаться в жидкой среде в свободном суспензионном состоянии. Клетки перевиваемых линий могут длительно культивироваться во взвешенном состоянии. В таких условиях клетки размножаются, не прикрепляясь к стенкам культурального сосуда, благодаря постоянному перемешиванию среды. Перемешивание суспензионных культур проводят лопастными и магнитными мешалками, а также круговыми качалками.

В настоящее время указанная клеточная система широко используется в вирусологических исследованиях для накопления больших количеств вирусосодержащего материала при изготовлении вакцин, т.к. при оптимальном режиме выращивания клетки в суспензиях быстро размножаются и дают более высокий «урожай», чем в стационарных культурах.

Суспензионные культуры готовят из однослойных клеточных культур. Клетки снимают со стекла с помощью растворов Версена и трипсина. Осадок клеток после центрифугирования ресуспендируют в свежей ростовой питательной среде. Приготовленную суспензию помещают в культуральные сосуды, реакторы, ферментеры и выращивают при постоянном и интенсивном перемешивании. Это делается для того, чтобы поддерживать клетки во взвешенном состоянии, препятствовать их осаждению и прикреплению к стенкам сосуда и в то же время не вызывать их механического

повреждения. Способ суспензионного выращивания клеток в биологической промышленности стал применяться сравнительно недавно.

Даже за короткий срок получены впечатляющие результаты. Большие успехи достигнуты при получении суспензионных постоянных культур клеток ВНК-21 для выращивания вируса ящура, вируса бешенства клеток почки поросят JBRS-2 для размножения вируса ящура, вируса везикулярной болезни свиней и др.

Выращивание клеточных культур осуществляют в специальных реакторах емкостью 1000 и более литров при температуре 36-37°C, рН 7,4 и непрерывном перемешивании суспензии клеток при 300-350 об/мин.

Несмотря на достижения по выращиванию суспензионных клеточных культур, на многих предприятиях биологической промышленности чаще используются методы получения клеточных линий в состоянии покоя или роллерным (динамичным) способом.

Вопросы для контроля знаний и самопроверки:

1. Биотехнологические и химические процессы синтеза, их отличия.
2. Классификация процессов биосинтеза.
3. Устройство биореакторов (ферментеров).
4. Системы теплообмена, пеногашения, стерилизации биореакторов.
5. Специализированные ферментационные процессы.
6. Особенности биотехнологии культивирования вирусов.

Занятие 7. ОТДЕЛЕНИЕ, ОЧИСТКА, КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ И МОДИФИКАЦИЯ ПРОДУКТОВ МИКРОБНОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ.

Цель занятия: изучить методы получения готовых продуктов биотехнологического синтеза.

Краткие теоретические сведения.

Завершающие стадии биотехнологических процессов - выделение целевого продукта - существенно различаются в зависимости от того, накапливается продукт в клетке или он выделяется в культуральную жидкость, или же продуктом является клеточная биомасса. Наиболее сложным является выделение внутриклеточного продукта. При этом клетки необходимо отделить от среды культивирования, подвергнуть их разрушению, а затем целевой продукт очистить от остатков разрушенных клеток.

Выделение продукта существенно облегчается, если он экскретируется продуцентом в культуральную жидкость. Поэтому одной из насущных задач биотехнологии является создание промышленных штаммов микроорганизмов, секретирующих возможно большее число ценных продуктов в значительных количествах. Технология выделения и очистки в значительной степени определяется природой целевого продукта. В ряде случаев существует возможность не использовать тщательную очистку продукта, если он обладает требуемыми активностями в неочищенном состоянии и если примесь посторонних веществ не оказывает каких-либо нежелательных влияний при его использовании. Некоторые традиционные биотехнологические процессы вообще исключают этап отделения продукта.

Отделение биомассы.

Первым этапом в процессе очистки целевого продукта является разделение культуральной жидкости и клеточной биомассы - **сепарация**. В некоторых случаях сепарации предшествует специальная обработка реакционной смеси, способствующая более эффективному отделению биомассы и стабилизации выделяемого продукта.

Применяются различные методы сепарации:

1. *Флотация*. Метод используется в том случае, если клетки продуцента в силу низкой смачиваемости накапливаются в поверхностных слоях содержимого биореактора. Особые устройства (флотаторы) различной конструкции удаляют образующуюся при культивировании пену вместе с прилипшими к пузырькам газа клетками. Повышение эффективности отбора биомассы достигается вспениванием жидкости с последующим отделением ее верхнего слоя механическим путем. Достоинствами метода является его экономичность, высокая производительность и возможность использования в непрерывных процессах.

2. *Фильтрация*. Различны применяемые в настоящее время фильтрующие системы (барабанные, ленточные, тарельчатые фильтры, карусельные вакуум-фильтры, фильтр-прессы, мембранные фильтры) основаны на одинаковом принципе - задержке биомассы на пористой фильтрующей перегородке. Недостатком способа является налипание клеток на фильтре, слой которых снижает скорость потока жидкости в процессе фильтрования. Для фильтров непрерывного действия предусматриваются системы автоматической очистки от биомассы, забивающей поры. Она может сдуваться с поверхности фильтров сжатым воздухом или удаляться специальными "ножами". Существуют также фильтры для многократного или однократного периодического использования. Например, мембранные (в частности, тефлоновые) фильтры, позволяющие фильтровать очень разбавленные клеточные взвеси. Однако проблемой их использования является быстрая закупорка пор клетками, белками и другими коллоидными частицами. Приемы механического удаления материала, забивающего фильтры, при данном способе фильтрации не пригодны, так как повреждают мембраны. Приемлемым путем преодоления затруднений такого рода является покрытие мембранных фильтров гидрофильным слоем, препятствующим контакту белков (коллоидов) с поверхностью фильтра, либо обработкой фильтров гидролитическими ферментами.

4. *Центрифугирование.* Данный способ требует более дорогостоящего оборудования, чем фильтрация, поэтому он применяется, если:

- а) суспензия фильтруется слишком медленно;
- б) возникает необходимость максимального освобождения культуральной жидкости от содержащихся в ней частиц;
- в) требуется обеспечить непрерывный процесс сепарации, когда фильтры рассчитаны на периодическое действие.

Центрифугирование и фильтрация в некоторых биотехнологических процессах осуществляется в комбинации, т. е. применяются фильтрационные центрифуги, в которых разделение жидкой и твердой фазы основано на двух процессах фильтрации и центрифугировании.

Довольно широко используются приемы, где разделение обеспечивается лишь центробежной силой. Наиболее перспективными в этом отношении являются центрифуги-сепараторы, в которых отделяемая биомасса оседает на стенках вращающегося цилиндра или специальных тарельчатых вставках.

Методы разрушения клеток.

Разрушение клеток проводится физическими, химическими и ферментативными методами.

Наибольшее промышленное значение имеют физические способы дезинтеграции:

- 1) ультразвуком;
- 2) лопаточными или вибрационными дезинтеграторами - метод, обычно используемый в пилотных и промышленных установках;
- 3) встряхиванием со стеклянными бусами;
- 4) продавливанием через узкие отверстия под высоким давлением;
- 5) раздавливанием замороженной массы;
- 6) растиранием в специальных ступках;
- 7) с помощью осмотического шока;
- 8) многократным замораживанием и оттаиванием;
- 9) сжатием клеточной взвеси с последующим резким снижением давления (декомпрессией).

Физические способы дезинтеграции отличаются большей экономичностью в сравнении с другими методами, однако они характеризуются отсутствием выраженной специфичности, вследствие чего обработка может отрицательно влиять на качество получаемого целевого продукта.

Мягкое и избирательное разрушение клеточной стенки обеспечивается применением химических и ферментативных методов. Так, бактериальные клетки разрушаются лизоцимом в присутствии ЭДТА (этилендиаминтетрауксусной кислоты), а клеточные стенки дрожжей зимолизой улитки или ферментами грибного либо актиномицетного происхождения. Клеточные стенки микроорганизмов могут быть разрушены путем обработки толуолом или бутанолом. Элективный лизис клеток вызывается воздействием ряда антибиотиков: полимиксин, новобиоцин, нистатин и др. Кроме того, к аналогичным результатам приводит обработка клеток некоторыми поверхностно-активными веществами.

После дезинтеграции клеток необходимо избавляться от их "обломков", для чего используют те же методы, что и при сепарации, т.е. центрифугирование или фильтрацию. Однако в связи со структурой обрабатываемого материала в данном случае приходится применять более скоростные центрифуги и фильтры с меньшим диаметром пор (в большинстве случаев используются мембранные фильтры). Обычно в большинстве биотехнологических процессов "обломки" клеток выбрасывают как отходы, но возможно и их специальное получение в виде целевого продукта.

Отделение и очистка продуктов.

Выделение целевого продукта из культуральной жидкости или получаемого в результате процессов дезинтеграции гомогената разрушенных клеток осуществляется путем осаждения, экстракции или различных методов адсорбции.

Осаждение растворенных веществ осуществляется физическими (нагревание, разведение или концентрирование, охлаждение раствора) или химическими воздействиями, переводящими растворенное вещество в малорастворимое состояние. Естественно, что в зависимости от целей и свойств выделяемого продукта подбирается тот или иной метод и то или иное воздействие, т. е. подбирается реагент и т. п.

Экстракция подразделяется на твердо-жидкофазную (при которой продукт из твердой фазы переходит в жидкую) и жидко-жидкофазную (когда обеспечивается перевод продукта из одной жидкой фазы в другую, также жидкую фазу).

Твердо-жидкофазная экстракция сводится порой к простой обработке твердого образца водой или органическим растворителем с целью извлечения из него растворимых соединений. Достаточно широко применяются различные органические растворители, в частности экстрагирование ацетоном, который эффективно переводит в раствор ряд липидных и белковых компонентов клеток.

При *жидко-жидкофазной экстракции* используются различные органические растворители - алкилфенолы, эфиры, галогениды, гексан, хлороформ и др.

Эффективность экстракции может быть существенно повышена:

- многократной обработкой экстрагирующим агентом;
- подбором оптимального растворителя;
- подогревом экстрагирующего агента или экстрагируемой жидкости, содержащей продукт;
- понижением давления в аппарате для экстракции, что обеспечивает довольно эффективную экстракцию при относительно низкой температуре.

Последнее снижает затраты и уменьшает риск инактивации извлекаемого продукта.

Почти полностью избежать инактивации позволяют методы экстрагирования на холоде, т. е. путем использования методов криоэкстракции. При этом уравниваются различия между твердым субстратом и культуральной жидкостью, поскольку и то и другое находится в замороженном состоянии (в одной фазе). Криоэкстракция проводится с применением растворителей, температура кипения которых низка и при обычной комнатной температуре находящихся в газообразном состоянии.

Криоэкстракция может применяться в сочетании с криоконсервацией клеток. Клеточная биомасса может длительное время сохранять свои свойства в условиях глубокого замораживания, а затем из нее может быть экстрагирован целевой продукт.

В некоторых случаях экстрагирующий агент может быть не в жидком, а в газообразном состоянии (при жидко-газофазной или твердо-газофазной экстракции).

Адсорбция является достаточно распространенным методом отделения продукта и рассматривается в качестве частного случая экстракции, при котором экстрагирующим агентом служит твердое тело. Механизм ее сводится к связыванию выделяемого из жидкой или газообразной фазы вещества поверхностью твердого тела. Традиционными адсорбентами являются древесный уголь, пористые глины и т. п.

Более современные методы разделения веществ включают: хроматографию, электрофорез, изотахофорез, электрофокусировку, которые основаны на принципах экстракции и адсорбции.

Разделение веществ путем *хроматографии* основано на их неодинаковом распределении между двумя несмешивающимися фазами. Различают хроматографию на бумаге, пластинках и колонках. При хроматографии на бумаге или на пластинках одной из несмешивающихся фаз является движущийся растворитель, а другой (неподвижной фазой) служат волокна бумаги или частицы покрывающего пластинку какого-то материала (например, силикагеля). При колоночной хроматографии подвижной фазой является протекающий через колонку растворитель, а неподвижную фазу представляет

заполняющий колонку адсорбент (чаще всего это гранулированный гель). Колоночная хроматография допускает масштабирование процесса, в результате чего она довольно широко применяется в промышленных условиях и включает несколько разновидностей:

- *Ионообменная хроматография*, колонка наполняется гранулами адсорбента, которые несут заряженные катионные (NH_4) или анионные (SO_4) группы, способные захватывать ионы противоположного заряда. Данный метод используется для выделения ионизированных веществ из жидкости, а также для очистки нейтральных соединений от примесей ионной природы.

- *Метод "молекулярных сит"*, гель-хроматография, гель-фильтрация. Виды хроматографии, основанные на разделении веществ с различной молекулярной массой и диаметром частиц. Адсорбент захватывает и удерживает, например, только низкомолекулярные соединения, пропуская соединения с более высокой молекулярной массой.

- *Аффинная хроматография*. Метод базируется на задерживании комплекса, образующегося из компонента разделяемой смеси и лиганда, который фиксирован на частицах носителя (наполнителя колонки). При данном методе используются агенты, способные специфически связывать какое-нибудь одно конкретное вещество. Например, фермент очищают на колонке, заполненной его субстратом или специфическим ингибитором.

Весьма эффективный метод разделения и очистки белковых и небелковых веществ основан на взаимодействии антигенов и антител. Разработанный на основании таких взаимодействий способ получил название *имунно-аффинной* хроматографии, который существенно повысил разрешающую способность при введении в практику использования моноклональных антител. Блестящей иллюстрацией его эффективности является высокая степень одноэтапной очистки человеческого интерферона, (чистота повышается примерно в 500 раз).

В аффинной хроматографии могут использоваться групповые лиганды, связывающие, например, группу сходных по структуре ферментов. Такими лигандами являются кофакторы ферментов или их аналоги. Могут применяться и еще менее специфичные лиганды, связывающие довольно обширные классы веществ; например, алкильные и арильные группы или лиганды, представляющие собой текстильные красители.

Преимущество аффинной хроматографии состоит в том, что с ее помощью можно в одну стадию осуществить полную очистку продукта из сложной многокомпонентной смеси (культуральной жидкости, цельных клеточных экстрактов и т. п.), тогда как другие способы требуют многоэтапной очистки и сопряжены с большими затратами труда и времени. Однако метод имеет и ряд недостатков, в частности высокая цена материалов, используемых в аффинной хроматографии (например, веществ, применяемых в качестве лигандов), а также быстрое забивание колонки пропускаемыми веществами. Последнее заставляет использовать их в периодическом, а не в непрерывном режиме. После каждого выделения продукта колонки промывают, и частицы заполняющего геля также подвергаются очистке.

Помимо аффинной хроматографии (которая иногда называется еще аффинной адсорбцией в геле) в крупномасштабных биотехнологических процессах для очистки продуктов все шире применяют аффинную *преципитацию* и аффинное *разделение*. При аффинной преципитации лиганд соединяется с растворимым носителем и, после взаимодействия с соответствующим выделяемым соединением, образующийся комплекс по мере его формирования выпадает в осадок. Иногда ускорение выпадения преципитата достигается путем добавления электролитов.

Наряду с хроматографией перспективными методами разделения веществ при биотехнологических процессах являются *электрофорез* и его модификации. В этих методах разделяемая смесь помещается в мощное электрическое поле, обеспечивающее движение

ионизированных компонентов смеси. Различие в электрофоретической подвижности позволяет пространственно разделить входящие в ее состав компоненты.

Современные варианты электрофореза используют (как и хроматография) пластинки или колонки с образующими гель наполнителями (агароза, полиакриламид, сефароза, оксиапатит и др.).

Модификацией метода электрофореза является *изоэлектрическая* фокусировка или *электрофокусировка*. В этом методе раствор, насыщающий гель, содержит соединение с кислотно-основными группами. Под влиянием электрического поля кислотно-основные группы буферного соединения меняют степень ионизации, создавая тем самым градиент рН в направлении электрического поля. Электрически заряженные компоненты разделяемой смеси, нанесенной на гель, мигрируют по направлению к электроду противоположного знака. Поскольку эти компоненты передвигаются по градиенту рН, то они постепенно теряют свои заряды и в зоне, где рН соответствует изоэлектрической точке (точке электронейтральности), их движение прекращается. Каждый компонент концентрируется (фокусируется) в определенной области геля.

Концентрирование продукта.

За отделением продукта следует этап его концентрирования с помощью основных методов - обратного осмоса, ультрафильтрации и выпаривания. При методе обратного осмоса концентрируемый раствор помещается в мешок из полупроницаемой мембраны, снаружи создается осмотическое давление, превышающее осмотическое давление раствора, в результате чего растворитель начинает вытекать через мембрану против градиента концентрации растворенного вещества, обуславливая дальнейшее концентрирование раствора. Ультрафильтрация представляет собой способ разделения вещества (вернее его концентрирование) с помощью мембранных фильтров.

Технология ультрафильтрации привлекает своей простотой, относительной экономичностью и щадящим обращением с продуктом, поскольку осуществляется при умеренно низком внешнем давлении. Кроме того, в данном методе не требуется изменение рН, ионной силы раствора или перевода продукта в другую фазу. Поэтому метод перспективен при концентрировании малостабильных продуктов (некоторые аминокислоты, антибиотики и ферменты).

Метод *выпаривания* наиболее древний и обладает существенным недостатком: для удаления растворителя концентрируемый раствор следует нагревать, но, тем не менее, данный способ достаточно широко используется, особенно в лабораториях. В производственных условиях чаще применяются вакуумные испарители, обеспечивающие более щадящий режим концентрирования. Нагревающим агентом обычно служит водяной пар, хотя используется также обогрев жидким теплоносителем или электрическими нагревателями.

Выпаривающие аппараты бывают периодического и непрерывного действия с однократной и многократной циркуляцией кипящего раствора. С целью достижения равномерного обогрева разрабатываются различного рода конструктивные усовершенствования систем выпаривания. Концентрирование методом выпаривания может ограничиваться стадией получения сиропобразного раствора целевого продукта; такая процедура называется упариванием и получаемый продукт относится к категории жидких. Дальнейшее освобождение от влаги, остающейся в продуктах после обратного осмоса, ультрафильтрации или выпаривания, достигается путем особой стадии - сушки.

Обезвоживание продукта (сушка).

В биотехнологии применяются различные методы сушки, выбор которых определяется физико-химическими и биологическими свойствами обезвоживаемого продукта, в частности от вязкости раствора или степени сохранности жизнеспособности, если дело имеют с живыми объектами.

Существует несколько методов сушки:

Лиофильный (сублимационный). Он позволяет сохранить практически без изменения первоначальные свойства живых и реже инактивированных вакцин, диагностических и лечебных сывороток, антигенов и других биологически активных препаратов, используемых для профилактики, диагностики и лечения.

Лиофильное высушивание состоит из двух приемов консервирования - замораживания и высушивания. Влагу из замороженных препаратов удаляют с использованием глубокого вакуума, минуя жидкую фазу. В процессе сушки влага перемещается в препарате не в виде жидкости, а в виде пара. В результате удается максимально сохранить специфические свойства белков, свести к минимуму их денатурацию, обеспечить живым клеткам и вирусам состояние длительного анабиоза, что позволяет получить стандартизированные по активности биопрепараты.

Консервирование биопрепаратов методом лиофильного высушивания имеет ряд преимуществ перед другими методами:

- снижается масса биопрепарата.
- длительное время сохраняется исходная активность: вакцин-до 12-18 мес., сывороток - до 2-3 лет.
- прекращается рост микробных контаминантов.
- высушенные препараты можно хранить при температуре 4-8°C, допускается кратковременное повышение температуры до 10-15°C (на период транспортировки до 7 дней).

Для лиофилизации биопрепаратов используют промышленные и лабораторные аппараты. Из промышленных установок получили распространение MAC-50, KS-30 (Чехословакия) и TG-50 (Германия), из лабораторных TG-2, TG-10, TG-3 (Германия), OE-960, OE-950 (Венгрия), LZ-45, LZ-90, LZ-92 (Чехословакия) и некоторые др. Эти установки комплектуются холодильными и вакуумными агрегатами.

Перспективным методом является обезвоживание в газообразных нагревающих агентах (пар, воздух, углекислый газ, дымовые газы и т. д.), которые с высокой скоростью подаются в сушильный аппарат снизу, а частицы обезвоживаемого продукта парят в этом газовом потоке. Схема такого сушильного аппарата напоминает газо-фазный реактор. Преимущество данного способа состоит в возможности регулировать интенсивность массо-тепло-обмена за счет изменения продолжительности пребывания препарата в воздушном потоке, а также возможность организации непрерывного процесса. Недостатком метода является прилипание продукта к стенкам сушильной камеры.

Для обезвоживания микробных взвесей применяются так называемые барабанные сушилки, в которых подогреваемые барабаны вращаются в сосудах с микробной взвесью. Соприкасаясь со стенками барабана, взвесь обезвоживается и биомасса присыхает к поверхности барабана. Засохшую биомассу удаляют специальными ножами.

Особо лабильные материалы сушат в вакуумных сушильных шкафах при пониженных давлениях и температурах. Довольно широкое распространение в биотехнологических производствах получили распылительные сушильные аппараты, в которых обезвоживающиеся растворы или суспензии превращаются путем пропускания через форсунки (или вращающиеся диски) в аэрозоль, который подается в сушильную камеру с нагретым газом (до примерно 110-150°C). В таких сушилках выживаемость бактериальных культур достигает лишь 20-30%, что явно не удовлетворяет требуемому качеству препаратов.

Модификация продуктов.

Различного рода модификации необходимы в тех случаях, когда в результате процесса получается лишь "заготовка" целевого продукта. Так, например, пенициллин модифицируется до полусинтетических препаратов, поступающих для практического использования как коммерческие препараты. В некоторых случаях при биотехнологическом процессе продуцент образует какую-то определенную структуру, к которой уже химическим путем добавляется необходимый компонент. Иногда

биологический объект участвует на каком-либо одном этапе химических процессов, обеспечивающих синтез целевого продукта.

Модификация является необходимым этапом при получении многих ферментов, гормонов и препаратов медицинского назначения. Соединения животного или растительного, а также микробного происхождения зачастую необходимо изменять таким образом, чтобы придать им требуемые для тех или иных целей качества. Например, у бычьего инсулина удаляются аминокислотные остатки, после чего он становится идентичным человеческому гормону.

Стабилизация продукта.

Для сохранения требуемых свойств получаемых продуктов в процессе их хранения, реализации и использования потребителями применяют различного рода физико-химические воздействия с целью повышения его стабильности.

Показано, что определенная степень обезвоживания существенно повышает стабильность активностей ферментов, включая и устойчивость к нагреваниям.

Стабилизация ферментов также достигается добавлением к препаратам глицерина или углеводов, которые формируют многочисленные водородные связи с аминокислотными остатками, препятствуя тем самым их денатурированию при нагревании или спонтанной инактивации. В некоторых случаях стабилизация продукта представляет собой задачу особого биотехнологического процесса, а не только простой физико-химической модификации. В качестве примера можно привести стабилизацию пищевого продукта, получаемого из яичных желтков - меланжа, свойства которого при хранении существенно изменяются, что делает его непригодным к использованию. Однако порчу меланжа можно предотвратить, если удалить из него углеводы посредством выращивания на меланже пропионовокислых бактерий. Бактерии "выедают" углеводы, повышают питательную ценность продукта за счет обогащения органическими кислотами и витаминами В, а также значительно удлиняют сроки хранения меланжа.

Вопросы для контроля знаний и самопроверки.

1. Методы отделение биомассы.
2. Методы разрушения клеток.
3. Отделение и очистка продуктов.
4. Концентрирование продукта.
5. Обезвоживание продукта (сушка).
6. Модификация продуктов.
7. Стабилизация продукта.

Занятие 8. ПРОИЗВОДСТВО МИКРОБНОГО БЕЛКА.

Цель занятия: изучить аспекты производства одноклеточного белка.

Краткие теоретические сведения.

Главной проблемой, стоящей перед человечеством (и, в частности, перед развивающимися странами), является взрывоподобный рост населения. В 1988 г. требовалось накормить 4 млрд. "ртов", а в 2000 г. - 6 млрд. Естественно, что традиционное сельское хозяйство не сможет удовлетворить пищевые потребности растущей численности населения, особенно белковым питанием. Уже в настоящее время Международная Организация питания и сельского хозяйства (FAO) предсказывает резкое увеличение пропасти в обеспечении белком между развитыми и развивающимися странами. По меньшей мере, 25% мирового населения в настоящее время страдает от голода или недостатка питания и несоразмерно большая часть этого населения живет в развивающихся странах, где засушливый климат и мало плодородные почвы затрудняют ведение продуктивного сельского хозяйства.

И, тем не менее, продуктивность сельского хозяйства во всех его отраслях постоянно повышается практически по всему миру. В этом процессе, конечно, определенную помощь окажут и различные биотехнологические новшества, призванные усовершенствовать традиционные сельскохозяйственные приемы. Даже сейчас во многих регионах Земли постоянно появляются пищевые излишки, особенно велико их количество в Северной Америке и Европе, где практически постоянна популяция людей. Кроме того, ряд стран, ранее являвшихся чистыми импортерами большинства пищевых продуктов (такие, как Индия и Индонезия), в настоящее время сумели наладить самообеспечение. И все же в мире имеет место несбалансированность в снабжении населения хлебом, и этот недостаток постоянно усугубляется в связи с изменениями в неблагоприятную сторону глобальной погоды (в частности, сильные ливни, засухи), а также национальными и межнациональными войнами, сопровождаются разрушением сельского хозяйства и колоссальными перебоями в распределении питания.

По данным ряда специалистов, мировой дефицит белка оценивается в 30-35 млн. т. Причем степень дефицита варьирует в зависимости от страны и должна рассматриваться в рамках каждой национальной экономики. Сдвиг от злаковой к мясной диете в различных странах приобретает разительные масштабы и ведет к увеличению расхода зерна в пересчете на человека, поскольку требуется от 3 до 10 кг зерна, чтобы произвести 1 кг мяса путем повышения эффективности животноводства и совершенствования кормовых программ.

Поиски дополнительных источников белка предпринимаются постоянно и повсеместно. Широко внедряются новые сельскохозяйственные приемы; получают новые сорта злаков, характеризующиеся повышенным содержанием белка; там, где это позволяют климатические и другие природные условия, интенсивно внедряется выращивание сои и земляного ореха; белки начинают экстрагироваться путем ультрафильтрации из определенных жидких отходов; и, наконец, разрабатываются новые нетрадиционные способы производства белковых соединений.

Определенные успехи достигнуты в получении белка с помощью микробного синтеза. Это направление получило название *производства одноклеточного белка (SCP)*, поскольку большинство микроорганизмов, используемых для этих целей, растут в виде одноклеточных или мицелиальных (нитевидных) особей, а не как сложные многоклеточные организмы (растения или животные). Понятие "съедобные микробы" звучит несколько странно, однако люди давно распознали питательную и вкусовую ценность некоторых микроорганизмов, а именно грибов. Но даже и в этом случае скептицизм и предвзятость оказывают существенное влияние на отношение людей к этому великолепному пищевому продукту. И в то время как во многих странах грибы достаточно широко употребляются в пищу, население других стран их игнорирует и избегает использовать. Хотя грибы в настоящее время во многих странах выращиваются в довольно больших количествах и

широко употребляются в пищу и рассматриваются как весьма перспективный и удобный способ производства пищевых продуктов, использование других микробов пока что менее приемлемо, так как существуют многие проблемы, не являющиеся по своей природе технологическими.

И все же на протяжении последних двух-трех десятилетий отмечается явный растущий интерес к использованию различных микроорганизмов для производства пищевых продуктов, в частности для скармливания домашним животным. Полагают, что применение одноклеточного белка, получаемого на дешевых субстратах, для корма животных окажет большое влияние на улучшение питания людей в результате снижения их конкуренции с животными за растительную пищу, богатую белком.

Преимущества микроорганизмов как продуцентов белка состоят в следующем: микроорганизмы обладают высокой скоростью накопления биомассы, которая в 500-5000 раз выше, чем у растений и животных; микробные клетки способны накапливать очень большие количества белка (дрожжи - до 60%, бактерии - до 75% по массе); в микробиологическом производстве вследствие высокой специфичности микроорганизмов отсутствует многостадийность процесса; а сам процесс биосинтеза осуществляется в мягких условиях при температурах 30-45°C, pH 3-6 и давлении около 0,1 МПа. Помимо всего прочего, микробиологический путь получения богатой белком биомассы менее трудоемкий по сравнению с получением сельскохозяйственной продукции и органическим синтезом белка.

Все эти преимущества и определили быстрое развитие технологии производства микробного белка, которое в настоящее время является самой крупнотоннажной отраслью биотехнологии и открывает возможность промышленной продукции различных кормовых добавок для животноводства и птицеводства с помощью микроорганизмов. Причем получаемые продукты характеризуются высокой кормовой ценностью и в достаточных количествах. Большое число компаний во всем мире участвует в этих процессах и уже производится значительное количество достаточно ценных продуктов такого рода.

Основной целью продукции одноклеточного белка является его содержание в препарате. Однако следует иметь в виду, что помимо белка микроорганизмы содержат также и другие вещества: углеводы, витамины, нуклеиновые кислоты и различные минеральные соединения, часть из которых может оказывать и неблагоприятное действие на организм, при использовании в пищу человека или животных. Так, вследствие ограниченной способности человека деградировать нуклеиновые кислоты, прежде чем использовать одноклеточный протеин в качестве пищевого продукта, он должен подвергаться специальной обработке. Тем не менее, высокое содержание белка, слабый запах и мягкий вкус одноклеточного протеина в сочетании с легкостью хранения придают существенную ценность этому продукту питания. Кроме того, он с успехом может применяться в так называемых водных культурах: например на фермах для разведения креветок, форели, семги и т. п. Преимущества микробного белка перед животным (в отношении быстроты получения) демонстрируются следующими цифрами: продукционная способность коровы весом в 250 кг и 250 г дрожжей практически одинакова. В то время как корова будет прибавлять в день по 200 г веса, микробы за этот же период времени способны произвести (теоретически, в идеальных условиях культивирования) до 25 т биомассы.

Однако корова обладает уникальной особенностью превращать (конвертировать) траву в богатое белком и другими ценными веществами молоко! Несмотря на многолетние попытки разработки конкурентоспособного способа подобного типа конверсии, все они остались пока безрезультатными. Поэтому коровы в настоящее время рассматриваются как "живые, самовоспроизводящиеся и съедобные "ферменторы"! Поэтому вопрос о замене коров микроорганизмами в пределах обозримого будущего остается открытым.

Применимость и токсикология одноклеточного белка.

Помимо чисто технологических и экономических сложностей, существенное влияние на развитие производства одноклеточного белка оказывают географические, политические,

социологические и психологические факторы, которые порой оказываются в значительной степени определяющими. В частности, большое внимание уделяется проблемам безопасности, питательной ценности и применимости данного продукта. Природа сырьевого материала, используемого в производстве одноклеточного белка, представляет известную опасность: например, потенциальная канцерогенность углеводородов нефти и н-парафинов, наличие тяжелых металлов или других загрязняющих примесей в минеральных солях, присутствие остатков растворителей после экстракции продукта, а также токсинов (в частности, микотоксинов), образуемых некоторыми микроорганизмами (например, определенными грибами), и т. д. Поскольку организм-продуцент должен быть непатогенным и нетоксигенным, а его продукты метаболизма безвредными, строгий санитарный режим и различные процедуры контроля качества должны постоянно осуществляться в течение всего биотехнологического процесса в целях предотвращения порчи продукта, а также загрязнения его патогенными или токсигенными микроорганизмами. Применимость одноклеточного белка как пищевого продукта для человека зависит не только от его безвредности и питательной ценности, но также и от ряда других факторов. Помимо обычного нежелания людей потреблять вещества, получаемые из микробов, процесс питания характеризуется многими неуловимыми психологическими, социальными и религиозными аспектами. У различных культур существует достаточное число специфических ассоциаций с едой, общественным положением, а также символической значимостью различных видов пищи. Должны также учитываться более явные особенности, связанные с применимостью продукта: запах, цвет, вкус, консистенция и внешний вид. Так, например, одноклеточный белок может использоваться в качестве пищи для человека, по-видимому, лишь при относительно малом его количественном содержании в обычных традиционных продуктах. Поэтому в настоящее время он может служить преимущественно как источник питания для различных видов домашних животных, птиц или рыб. И все же уже теперь некоторые промышленные процессы направлены на изготовление микробных продуктов для человека: например, грибной белок фирмы Ranks Novis McDougall/ICI.

Какие же факторы, помимо технологических, оказывают влияние на расширение производства одноклеточного белка? Главным образом это политические и социальные аспекты использования для его получения нефтепродуктов как субстратов для культивирования продуцентов, поскольку последние могут быть существенно загрязнены канцерогенными веществами. В силу этого обширные программы, связанные с производством одноклеточного белка, в Японии, Италии и Британии в свое время были приостановлены и усилия биотехнологов были направлены на его производство из этанола или метанола либо на основе различных органических отходов, являющихся потенциально менее опасными.

Одноклеточный белок на высокоэнергетических субстратах.

Представляющие существенное коммерческое значение как источники энергии материалы (нефтегаз, метанол, этанол, метан и н-алканы) привлекают внимание биотехнологов как субстраты ряда биотехнологических процессов, главными участниками которых являются бактерии и дрожжи. Естественно, что в разработке технологий использования подобных материалов принимают участие многие нефтяные компании, а сама проблема обсуждалась и изучается различными научно-исследовательскими учреждениями. Наиболее подробно как сырье для получения одноклеточного белка изучался метан, хотя в настоящее время в его использовании для указанной цели имеется достаточно большое количество трудностей. В противоположность этому, большое значение придается метанолу. Так, компанией ICI в Великобритании разработана крупномасштабная (75 000 л) ферментация растительного сырья для метанол утилизирующих бактерий. Компании Hoechst (Германия) и Mitsubishi (Япония) также работают над аналогичными технологиями, предназначенными для использования в качестве продуцентов биомассы дрожжевых клеток вместо бактериальных.

Продукт, выпускавшийся компанией ICI (называемый прутин), использовался исключительно для скармливания животным. Метанол как источник углерода для получения одноклеточного белка обладает многими преимуществами по сравнению с парафинами; в нем отсутствуют потенциально токсичные вещества, он легко растворим в водной фазе в любых концентрациях и при культивировании на средах с метанолом в получаемой биомассе отсутствуют какие-либо остатки углерода (хотя бы потому, что он легко испаряется). Кроме того, имеют значение и другие важные моменты технического порядка. Завод компании ICI для производства прутина является единственным в своем роде в западном мире и в настоящий момент вследствие цен на метанол не работает с надлежащим экономическим эффектом, поскольку стоимость метанола составляет примерно 50% от стоимости продукта. В США стоимость одноклеточного белка, полученного на метаноле в 2-5 раз дороже, чем при его производстве из рыбной муки. На Среднем Востоке низкая стоимость метанола и относительно высокие цены на рыбную муку в сочетании с необходимостью производства большого количества животных продуктов делают одноклеточный белок типа ICI-прутина весьма привлекательным. Относительно благоприятная ситуация для производства одноклеточного белка на парафинах нефти сложилась в 70-е годы в бывшем Советском Союзе, что было связано с низкими внутренними ценами на нефть. Были построены три крупных завода по культивированию дрожжей рода *Candida* (в том числе один в Новополюцке). В лучшие годы продукция дрожжевого белка достигала 1 млн. т сухой биомассы и обеспечивала потребности сельского хозяйства (добавка в корм животных) и промышленности. Но в середине 80-х все эти заводы остановились в связи с высокой себестоимостью микробного белка, (она была в 2 раза выше, чем кормовой соевый белок).

Широкий спектр исследований, выполненных в 1960-е и 1970-е годы по использованию метанола и сходных соединений в качестве субстратов для получения одноклеточного белка, дали существенный стимул совершенствованию ферментационных технологий, направленных на его производство в крупномасштабных количествах. Упомянутое выше аэробное производство прутина является самым крупным из непрерывных процессов и, по существу, представляет собой крупнейшую в мире биотехнологическую систему, что в свою очередь, вследствие необходимости строжайшей экономии, обусловило прогресс в разработках биореакторов с восходящим воздушным потоком (эрлифтных ферментаторов).

Весьма подходящим сырьем для получения одноклеточного белка, предполагаемого к использованию в пищу человека, является этанол. В скором времени перспективы производства одноклеточного белка на этаноле будут определяться рядом локальных факторов: возможностями расщепления этилена, наличием излишков углеводов сельскохозяйственного происхождения, политическими ситуациями в региональной экономической самостоятельности, а также состоянием уровня мирового производства.

Одноклеточный белок на отходах.

Рециклирование отходов растений, появляющихся в различного рода производствах (таких, как солома, выжимки, отходы цитрусовых, сыворотка молока, меласса, навоз животных и бытовые сточные воды), представляет существенную проблему биотехнологии. В отдельных местах количество таких отходов достигает значительных величин, что является источником серьезного загрязнения различных водных систем и вообще окружающей среды. Поэтому использование указанных органических отходов может способствовать достижению двух целей: снижению загрязнения и созданию пищевого белкового препарата. Привлекательность растительных отходов, содержащих углеводы, состоит в их низкой стоимости, в результате чего удешевляется биотехнологический процесс, а также в том, что одноклеточный белок может быть получен при относительно небольшом количестве операций.

Обоснованием для разработки технологии производства одноклеточного белка на растительных отходах является их пригодность для микробной конверсии, наличие в достаточных количествах и в течение длительного периода, а также уровень уже

имеющихся технологий. Процессы, использующие продукты отходов в производстве одноклеточного белка, базируются на основании коммерческих соображений с применением различных дрожжевых организмов в подходящих ферменторных системах. Субстратами для организмов-продуцентов служат: меласса (*Sacharomyces cerevisiae*), молочная сыворотка в производстве сыра (*Kluveromyces fragilis*), отходы крахмального производства с использованием двух видов дрожжей (*Endomycopsis fibuligera* и *Candida utilis*). Питательная ценность дрожжей, получаемых в данном процессе, была определена в многочисленных обширных экспериментах по скормливанию этого одноклеточного белка различным видам животных (свиньям, цыплятам и телятам). В проведенных опытах регистрировался хороший рост животных и отсутствие неблагоприятных последствий. Заслуживает внимания новый продукт - Pekilo, представляющий собой грибной белок, получаемый путем ферментации углеводов мелассы, молочной сыворотки, отходов фруктов, гидролизатов древесины или сельскохозяйственного сырья. Продукт характеризуется хорошим аминокислотным составом и богат витаминами. Испытания на животных показали, что Pekilo-протеин является хорошим источником белка в питании свиней, телят, бройлеров, кур-несушек и производится при непрерывном культивировании. Используемый для его производства организм является мицелиальным грибом, а получаемый продукт обладает выраженной фиброзной структурой, что делает готовый препарат удобным для применения.

В Британии компания Ranks Novis McDougall совместно с корпорацией ICI поставляет на рынок другой грибной белок (mycoprotein), получаемый при выращивании гриба *Fusarium* на простых углеводах. Непохожий почти ни на один из других типов, одноклеточный белок микопротеин производится для употребления в пищу людей. Продукт также производится путем непрерывной ферментации. Разработка и внедрение данного микопротеина (получаемого с помощью гриба *Fusarium* фирмой Ranks Novis McDougall) оценивается по произведенным затратам более чем в 40 млн. фунтов стерлингов, а осуществление проекта заняло свыше 20 лет. Первоначально процесс осуществлялся посредством одноразовой ферментации, но затем была разработана технология непрерывного культивирования. Кульминацией проекта считается не только продукция грибной биомассы, но и получение ценных для пищевого продукта характеристик.

Целлюлоза в сельскохозяйственных и лесных материалах, а также в различных отходах должна составить в недалеком будущем основной сырьевой компонент для многих биотехнологических процессов, включая и одноклеточный белок. Целлюлоза в ее естественной ассоциации с лигнином до сих пор является наиболее распространенным органическим веществом для биологической конверсии. Различные исследовательские учреждения настойчиво ищут пути предварительной обработки биологических материалов подобного рода с целью деструкции лигнинового барьера (преимущественно физическими и химическими методами).

Удаление лигнина из лигноцеллюлозы делает последнюю потенциальным источником энергии для жвачных животных, способных использовать ее в качестве пищи. Таким путем лигноцеллюлозные материалы (солома, выжимки и даже древесина) могут стать полезными кормовыми препаратами для животных.

Многие виды грибов долгое время служили пищей для человека и выращивались на лигноцеллюлозных материалах. Данные процессы являются примерами низкоэнергетических технологических систем.

Процессы различаются по типу используемого субстрата или получаемого продукта, а также по степени изощренности (изобретательности) методологии процесса. В то время как большинство процессов получения одноклеточного белка основано на жидкостных ферментациях, многие из современных способов деградации целлюлозы базируются на ферментации с пониженным увлажнением, известной под термином "твердофазная ферментация".

Во многих странах некоторая часть соломы, получающейся в сельскохозяйственных производствах, традиционно используется для компостирования с лошадиным навозом для получения субстрата, пригодного при выращивании грибов (*Agaricus bisporus*). Ежегодно "грибная" промышленность Британии потребляет около 300 000 т соломы для приготовления компоста, на котором выращивают грибы. Технологии, основанные на использовании микроорганизмов и методов биохимической инженерии в целях производства больших количеств биомассы, напоминают сельскохозяйственное производство. Однако так называемый "грибной процессинг", рассматриваемый в качестве примера общей биотехнологии, считается какой-то пренебрежительной областью "новых" биотехнологических разработок, хотя большое число съедобных грибов в настоящее время выращивается искусственным путем в различных странах мира. Новинки в эту область стали проникать сравнительно недавно, однако "вознаграждение" в скором будущем окажется, по оценкам специалистов, огромным. Биотехнология, как ни странно, не всегда должна быть высоко технологичной. В развивающихся странах, где дорогостоящие системы могут оказаться, неприемлемы в виду стоимости процессов и отсутствия грамотных операторов, различного рода новые биотехнологические разработки целесообразно использовать для совершенствования (улучшения) уже существующих традиционных микробиологических процессов.

Основными примерами твердофазной ферментации являются многие типы обработки ряда пищевых продуктов, применяющиеся в странах Востока. В этих процессах некоторые мягкие материалы (горох, бобы, отруби и т. п.) служат объектами микробной переработки (гидролиз крахмала и белков) с целью получения продуктов улучшенного качества (например, улучшение аромата продукта, обогащение его белком и аминокислотами). Примерами традиционной пищи на Востоке являются мисо, соевый соус и др., обычно изготавливаемые в "домашних" масштабах. Однако многие из этих блюд составляют основу крупных промышленных производств, требующих существенного биотехнологического оснащения. Подобные блюда и ароматизированные соусы медленно, но верно, распространяются на Запад и, несомненно, станут в недалеком будущем составной частью нашего ежедневного меню.

Одноклеточный белок из сельскохозяйственного сырья.

Выше было показано, каким образом микроорганизмы могут использоваться для получения одноклеточного белка из органических отходов типа сахаров, крахмала и целлюлозы. Почему же в таком случае не выращиваются растения специально для применения в качестве субстрата, на котором можно было бы получать одноклеточный белок микробиологическим способом? Концепция производства растительной биомассы в качестве материала для биотехнологических процессов крайне актуальна и важна. В настоящее время такого рода программы используются в большей степени для производства этанола, но вполне обоснованно полагать, что маниока, сахарный тростник и некоторые виды пальм могут явиться перспективным сырьем, которое подвержено быстрым ферментативным обработкам с достаточно высоким экономическим эффектом. Если лигноцеллюлоза окажется способной

легко и экономически выгодно утилизироваться какими-нибудь микроорганизмами, то большинство районов мира получат готовые питательные субстраты, пригодные для различных биотехнологических процессов.

Одноклеточный белок из водорослей.

Одно время существовал повышенный интерес к проблеме использования водорослей в качестве одноклеточного белка, поскольку они хорошо растут в открытых прудах и нуждаются только в CO_2 как источнике углерода, а также в солнечном свете как источнике энергии для фотосинтеза. Такие водоросли, как *Chlorella* и *Scenedesmus*, долгое время использовались в пищу в Японии, а *Spirulina* широко применялась в Африке и Мексике. В некоторых странах мира водоросли выращивают в прудах или лагунах для удаления с их

помощью ряда органических загрязнений, а образующуюся массу собирают, высушивают и добавляют в порошкообразном виде в корм животным.

Экономические аспекты применения одноклеточного белка.

Экономическая целесообразность одноклеточного белка определяется его конкурентной способностью по сравнению с существующими продуктами. Препараты микробного белка богаты данным веществом и могут длительное время храниться и транспортироваться на дальние расстояния. Применение одноклеточного белка предполагается в будущем преимущественно в качестве кормовых добавок в пищу животным в целях замены других белковых материалов (таких, как соевая мука или рыбная мука). Несмотря на то, что производство одноклеточного белка даже в промышленных масштабах является биологическим процессом, его внедрение не должно нарушать установившиеся в природе экологические равновесия (балансы). С этой целью в биотехнологии его получения устраняется вероятность появления каких-либо синтетических соединений, и применяются (по возможности) технологии, основанные на использовании систем рециклизации, для предотвращения загрязнения окружающей среды.

Процессы получения одноклеточного белка обычно весьма объемны и энергетически очень емки и, кроме того, должны осуществляться в стерильных условиях, что требует дорогого оснащения, которое должно чиститься и подвергаться стерилизации. Обязательным условием является предотвращение попадания в конечный продукт посторонней микрофлоры, особенно патогенной для человека. Для того чтобы производство одноклеточного белка было экономически выгодным, масштабы его должны достигать по крайней мере 50 000 т в год готового продукта. А это, в свою очередь, требует наличия соответствующего обеспечения сырьевым материалом, который желательно иметь поблизости от основного производства. Довольно большие потребности в воде, которая нужна также для процессов завершающей обработки продукта и охлаждения.

Широкомасштабные процессы, разрабатываемые для производства одноклеточного белка, в значительной степени зависят от успехов современной биотехнологии. Поэтому в его производстве участвуют на разных этапах специалисты в области микробиологии, биохимии, генетики, химии и химической инженерии, пищевой технологии, сельского хозяйства, животноводства, экологии и токсикологии, медицины, ветеринарии и конечно экономики.

Заключение.

Нет никаких сомнений, что существенные импульсы развитию производства одноклеточного белка будут поступать из ужесточающегося законодательства, связанного с увеличением объема плотных и жидких отходов, загрязняющих внешнюю среду (т. е. из требований охраны окружающей среды). Кроме того, постоянно должна повышаться конкурентоспособность одноклеточного белка, будущее которого в значительной мере зависит от снижения производственных затрат и, конечно, улучшения качества. Последнее может достигаться за счет использования более дешевых сырьевых материалов, совершенствования ферментационных процессов и завершающих стадий обработки получаемого продукта, а также повышения активности продуцентов.

Вопросы для контроля знаний и самопроверки.

1. Применимость и токсикология одноклеточного белка.
2. Производство одноклеточного белка на высокоэнергетических субстратах.
3. Производство одноклеточного белка на отходах.
4. Производство одноклеточного белка из сельскохозяйственного сырья.
5. Производство одноклеточного белка из водорослей.

Литература.

1. Елинов Н. П. Основы биотехнологии. СПб: Наука, 1995.
2. Бекер М. Е., Лиепиньш Г. К., Райнулис Е. П. Биотехнология. М.: Агропромиздат, 1990.

3. Серия "биотехнология": в 8 кн. / Под ред. Н. С. Егорова и В. Д. Самуилова. М: Высш. Шк., 1987-1988.
4. Сассон А. Биотехнология: свершения и надежды. М.: Мир, 1987.
5. Сельскохозяйственная биотехнология: векторные системы молекулярного клонирования. М.: Агропромиздат, 1991.
6. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. М.: Мир, 2002.
7. Сб. "Биотехнология" / Под ред. А. А. Баева М.: Наука, 1984.
8. Овчинников Ю. А. Биоорганическая химия. М.: Просвещение, 1987.
9. Дебабов В. Г., Лившиц В. А. Современные методы создания штаммов промышленных микроорганизмов. 1987.
10. Бутенко Р. Г. и др. Клеточная инженерия. 1987.
11. Гриневич А. Г., Босенко А. М. Техническая микробиология. Мн.: Высш. шк. 1986.
12. Грачева И. М. Технология ферментных препаратов. М.: Агропромиздат, 1987.
13. Березин И. В. и др. Инженерная биотехнология. 1987.
14. Быков В. А. и др. Микробиологическое производство биологически активных веществ и препаратов. 1987.
15. Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology // Ed. In chief A.L.Demain, J.E.Davies.-ASM.Washington, DC,. 1999.