

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ**

**РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН**

**ИННОВАЦИОННЫЙ ЕВРАЗИЙСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ**

Научно-образовательный комплекс

по кредитной технологии обучения

**Методические указания**

**к практическим работам**

по дисциплине **Основы биотехнологического производства**

для студентов 3 курса специальности

050701 «Биотехнология»

**ПАВЛОДАР 2009 год**

##### УТВЕРЖДЕНО

Директор Инженерной Академии

Док. вет. наук, проф. \_\_\_\_\_\_\_\_\_ Е.Б. Никитин

«\_\_\_» \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ 2009 г.

Автор: ст.преподаватель \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ В.Ш. Ахметова

**Кафедра «Прикладная биотехнология»**

##### МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ К ПРАКТИЧЕСКИМ РАБОТАМ

по дисциплине **Основы биотехнологического производства**

для студентов специальности

050701 «Биотехнология»

для очной формы обучения

на базе среднего образования

Разработана на основании Государственного общеобязательного стандарта высшего образования РК специальности 050701 – «Биотехнология», ГОСО РК 3.08.327-2006, «Образование высшее профессиональное. Бакалавриат», г. Астана, 2006 г. и на основании рабочей учебной программы дисциплины.

Рассмотрена на заседании кафедры «Прикладная биотехнология»

Протокол № \_\_\_\_ от \_\_\_\_\_\_\_\_\_200 г.

Зам. зав. кафедрой «Прикладная биотехнология» \_\_\_\_\_\_\_\_ М.С. Омаров

Утверждена на заседании научно-методического совета Инженерной Академии и рекомендована к изданию

Протокол № \_\_\_\_ от \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_200 г.

Председатель НМС Инженерной Академии

Канд. техн. наук, проф. \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ Е.К. Ордабаев

Согласовано:

Начальник ИМО

к.п.н., проф. \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ Н.М. Ушакова

сдано в \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ Стр.

Практическая работа № 1 5

Практическая работа № 2 7

Практическая работа № 3 10

Практическая работа № 4 12

Практическая работа № 5 15

Практическаяработа № 619

Практическая работа № 7 21

Рекомендуемая литература 25

**ВВЕДЕНИЕ**

Учебный курс «Основы биотехнологических производств» является дисциплиной которая возникла на стыке технических (физика, теплотехника) и естественных (химия, биология, физиология) дисциплин, теоретические исследования и практические результаты которой широко применяются в различных областях деятельности человека.

В результате изучения курса « основы биотехнологических производств» основанного на жизнедеятельности микроорганизмов и биохимических процессах, осуществляемых ферментативными системами; основы процессов биокатализа и биотрансформации; особенности выделения продукта в биотехнологических производствах.

Рассмотрено использование биотехнологии в различных отраслях народного хозяйства, подробно приведены типовые схемы биотехнологических процессов.

Курс «Основы биотехнологических производств» состоит из теоретического и фактического материала.

Фактический материал систематизирован по функциональному признаку.

В основе общетеоретических вопросов лежат знания с основами технической микробиологии, а также с процессами и аппаратами химической технологии. Она включает совершенно не связанные между собой разделы научных знаний: микробиологию, анатомию растений и животных, биохимию, иммунологию, клеточную биологию, физиологию растений и животных, различные систематики, экологию, генетику, биофизику, математику и много других областей естествознания.

**ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА № 1.**

**Тема: МИКРООРГАНИЗМЫ - ОСНОВА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДСТВ. МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ВОЗМОЖНОСТИ МИКРОБНЫХ КЛЕТОК. ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ, ОСУЩЕСТВЛЯЮЩИХ СПИРТОВОЕ, МОЛОЧНОКИСЛОЕ, ПРОПИОНОВОКИСЛОЕ, МАСЛЯНОКИСЛОЕ БРОЖЕНИЕ.**

**Цель**: Классификация питательных субстратов, биообъектов; состав питательных субстратов, биообъектов.

**Методическое обеспечение:** Методические указания по выполнению практических работ.

В качестве таких объектов биотехнологии могут выступать клетки микроорганизмов, животных и растений, трансгенные животные и растения, а также многокомпонентные ферментные системы клеток и отдельные ферменты. Основой большинства современных биотехнологических производств до сих пор все еще является микробный синтез, т. е. синтез разнообразных биологически активных веществ с помощью микроорганизмов. К сожалению, объекты растительного и животного происхождения в силу ряда причин еще не нашли столь широкого применения. Независимо от природы объекта, первичным этапом разработки любого биотехнологического процесса является получение чистых культур организмов (если это микробы), клеток или тканей (если это более сложные организмы – растения или животные). Многие этапы дальнейших манипуляций с последними (т.е. с клетками растений или животных), по сути дела, являются принципами и методами, используемыми в микробиологических производствах. И культуры микробных клеток, и культуры тканей растений и животных с методической точки зрения практически не отличаются от культур микроорганизмов.

Мир микроорганизмов крайне разнообразен. В настоящее время относительно хорошо охарактеризовано (или известно) более 100 тысяч различных их видов. Это в первую очередь прокариоты (бактерии, актиномицеты, риккетсии, цианобактерии) и часть эукариот (дрожжи, нитчатые грибы, некоторые простейшие и водоросли). При столь большом разнообразии микроорганизмов весьма важной, а зачастую и сложной, проблемой является правильный выбор именно того организма, который способен обеспечить получение требуемого продукта, т. е. служить промышленным целям. Разделение микроорганизмов на промышленные и непромышленные для лиц, далеких от микробиологии, молекулярной биологии и молекулярной генетики, кажется достаточно определенным: те микроорганизмы, которые используются в промышленном производстве – промышленные, а те, которые не используются, – непромышленные. Однако для тех, кто близко соприкасается с вышеперечисленными отраслями биологических знаний, граница проходит между немногочисленной, но глубоко изученной группой микроорганизмов, служащих модельными объектами при исследованиях фундаментальных жизненных процессов, и всеми остальными микроорганизмами, которые, как правило, генетиками, молекулярными биологами и генными инженерами не изучались совсем или изучались в очень ограниченной степени. К числу первых относятся кишечная палочка (*E. coli*), сенная палочка (*Bac. subtilis*) и пекарские дрожжи (*S. cerevisiae*). Во многих биотехнологических процессах используется ограниченное число микроорганизмов, которые классифицируются как GRAS («generally recognized as safe» обычно считаются безопасными). К таким микроорганизмам относят бактерии *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, другие виды бацилл и лактобацилл, виды *Streptomyces*. Сюда также относят виды грибов *Aspergillus, Penicillium, Mucor, Rhizopus* и дрожжей *Saccharomyces* и др. GRAS-микроорганизмы непатогенные, нетоксичные и в основном не образуют антибиотики, поэтому при разработке нового биотехнологического процесса следует ориентироваться на данные микроорганизмы, как базовые объекты биотехнологии.

Микробиологическая промышленность сегодня использует тысячи штаммов из сотен видов микроорганизмов, которые первично были выделены из природных источников на основании их полезных свойств, а затем (в большинстве своем) улучшены с помощью различных методов. В связи с расширением производства и ассортимента выпускаемой продукции в микробиологическую промышленность вовлекаются все новые и новые представители мира микробов. Следует отдавать себе отчет, что в обозримом будущем ни один из них не будет изучен в той же степени, как E.coli и Bac.subtilis. И причина этого очень простая – колоссальная трудоемкость и высокая стоимость подобного рода исследований. Следовательно, возникает проблема разработки стратегии и тактики исследований, которые обусловили бы с разумной затратой труда извлечь из потенциала новых микроорганизмов все наиболее ценное при создании промышленно важных штаммов-продуцентов, пригодных использованию в биотехнологических процессах.

Следующим этапом является выделение чистой культуры с дальнейшим дифференциально-диагностическим изучением изолированного микроорганизма и, в случае необходимости, ориентировочным определением его продукционной способности. Существует и другой путь подбора микроорганизмов-продуцентов – это выбор нужного вида из имеющихся коллекций хорошо изученных и досконально охарактеризованных микроорганизмов. При этом, естественно, устраняется необходимость выполнения ряда трудоемких операций.

Главным критерием при выборе биотехнологического объекта является способность синтезировать целевой продукт. Однако помимо этого, в технологии самого процесса могут закладываться дополнительные требования, которые порой бывают очень и очень важными, чтобы не сказать решающими.

Микроорганизмы должны:

• обладать высокой скоростью роста;

• утилизировать необходимые для их жизнедеятельности дешевые субстраты;

• быть резистентными к посторонней микрофлоре, т. е. обладать

высокой конкурентоспособностью.

Все вышеперечисленное обеспечивает значительное снижение затрат на производство целевого продукта. Конечно, в каждом конкретном случае ведущим является какой-то один из этих критериев, поскольку в природе устроено так, что во всем получить выигрыш не удается никогда.

1.Одноклеточные организмы, как правило, характеризуются более высокими скоростями роста и синтетических процессов, чем высшие организмы. Тем не менее это присуще не всем микроорганизмам. Существуют такие из них (например, олиготрофные), которые растут крайне медленно, однако они представляют известный интерес, поскольку способны продуцировать различные очень ценные вещества.

2. Особое внимание как объекты биотехнологических разработок представляют фотосинтезирующие микроорганизмы, использующие в своей жизнедеятельности энергию солнечного света. Часть из них (цианобактерии и фотосинтезирующие эукариоты) в качестве источника углерода утилизируют СО2, а некоторые представители цианобактерий, ко всему сказанному, обладают способностью усваивать атмосферный азот (т. е. являются крайне неприхотливыми к питательным веществам). Фотосинтезирующие микроорганизмы перспективны как продуценты аммиака, водорода, белка и ряда органических соединений. Однако пpoгpecca в их использовании вследствие ограниченности фундаментальных знаний об их генетической организации и молекулярно-биологических механизмах жизнедеятельности.

3. Определенное внимание уделяется таким объектам биотехнологии, как термофильные микроорганизмы, растущие при 60–80° С. Это их свойство является практически непреодолимым препятствием для развития посторонней микрофлоры при относительно не стерильном культивировании, т. е. является надежной защитой от загрязнений. Среди термофилов обнаружены продуценты спиртов, аминокислот, ферментов, молекулярного водорода. Кроме того, скорость их роста и метаболическая активность в 1,5–2 раза выше, чем у мезофилов.

Ферменты, синтезируемые термофилами, характеризуются повышенной устойчивостью к нагреванию, некоторым окислителям, детергентам, органическим растворителям и другим неблагоприятным факторам. В то же время они малоактивны при обычных температурах. Так, протеазы одного из представителей термофильных микроорганизмов при 200 С в 100 раз менее активны, чем при 750 С. Последнее является очень важным свойством для некоторых промышленных производств.

Контрольные вопросы:

1. В качестве объектов биотехнологии могут выступать?
2. К числу первых исследуемых микроорганизмов относятся ?

3. Главным критерием при выборе биотехнологического объекта является?

4. Микроорганизмы должны быть?

Задание для СРСП:

1. Биологические объекты как специфические компоненты биотехнологического производства.

2. Питательные субстраты, применяемые в биотехнологии.

Задание для СРС: оформить результаты практической работы № 1. Ответить на вопросы для самопроверки. Подготовиться к опросу. Составить 10 тестовых заданий по темам лекции и СРСП.

**ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА № 2**

**Тема: ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ, ОСУЩЕСТВЛЯЮЩИХ СИНТЕЗ ВИТАМИНОВ, ФЕРМЕНТОВ, АМИНОКИСЛОТ. ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ, ОСУЩЕСТВЛЯЮЩИХ БИОСИНТЕЗ АНТИБИОТИКОВ. ПОЛУЧЕНИЕ ПОЛУСИНТЕТИЧЕСКИХ АНТИБИОТИКОВ. РАЗВИТИЕ АНТИБИОТИЧЕСКОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ**.

**Цель**: Рассмотреть применение микроорганизмов осуществляющих синтез витаминов, ферментов, аминокислот, антибиотиков.

**Методическое обеспечение** Методические указания по выполнению практических работ.

Антибиотики - самый большой класс фармацевтических соединений, синтез которых осуществляется микробными клетками. К этому же классу относятся противогрибковые агенты, противоопухолевые лекарства и алкалоиды. В 1980 г. мировое производство антибиотиков составляло примерно 25000 т, из них 17000 т — пенициллины, 5000 т —  тетрациклины, 1200 т — цефалоспорины и 800 т —эритромицины. В 1945 г. Бротзу из Института гигиены в Кальари (Сардиния) выделил из пробы морской воды плесень *Cephalosporium acremonium*, синтезирующую несколько антибиотиков; один из них, цефалоспорин С, оказался особенно эффективен против устойчивых к пенициллину грамположительных бактерий.

Из нескольких тысяч открытых антибиотиков львиная доля принадлежит актиномицетам. Среди актиномицетов наибольший вклад вносит род *Streptomyces*, включая тетрациклины (один только вид *Streptomyces griseus* синтезирует более пятидесяти антибиотиков). Наиболее распространенными с коммерческой точки зрения оказались пенициллины, цефалоспорины и тетрациклины.

Начиная с середины 1960-х гг. в связи с возросшей сложностью выделения эффективных антибиотиков и распространением устойчивости к наиболее широко применяемым соединениям у большого числа патогенных бактерий исследователи перешли от поиска новых антибиотиков к модификации структуры уже имеющихся. Они стремились повысить эффективность антибиотиков, найти защиту от инактивации ферментами устойчивых бактерий и улучшить фармакологические свойства препаратов. Большинство исследований было сосредоточено на пенициллинах и цефалоспоринах, структура которых включает четырехчленное -лактамное кольцо. Добавление к -лактамному кольцу метоксильной (СН3О)-группы привело к появлению цефамицинов, близких к цефалоспоринам и эффективных как против грамотрицательных, так и против пенициллиноустойчивых микробов. Полусинтез состоит в замене химическим путем одной боковой цепи -лактамного кольца на другую в полученной ферментацией молекуле.

Устойчивость к пенициллинам и цефалоспоринам связана с наличием ферментов, так называемых -лактамаз, которые широко распространены среди бактерий, актиномицетов, цианобактерий и дрожжей. Так как гены, кодирующие эти ферменты, находятся в составе плазмид, устойчивость может передаваться при переносе плазмид от одного бактериального штамма к другому. Исследователи фирмы «Мерк, Шарп и Доум» открыли новый класс -лактамных антибиотиков, тиенамицины, продуцируемых *Streptomyces cattleya*. Тиенамицины чрезвычайно эффективны против грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также способны ингибировать -лактамазы, что значительно повышает возможности этих антибиотиков. К ингибиторам -лактамаз относятся также клавулановая и оливановая кислоты, идентифицированные исследователями английской фармацевтической компании «Бичем». Компания выпустила новый антибиотик, аугментин, который представляет собой комбинацию -лактамного антибиотика амоксициллина и клавулановой кислоты.

Антибиотики вырабатываются в результате совместного действия продуктов 10—30 генов, поэтому практически невозможно обнаружить отдельные спонтанные мутации, которые могли бы повысить выход антибиотика с нескольких миллиграммов на литр в штамме дикого типа до 20 г/л и более пенициллина или тетрациклина в промышленных штаммах *Penicillium chrysogenum* или *Streptomyces auerofaclens*. Эти высокопродуктивные штаммы были получены в результате последовательных циклов мутагенеза и селекции. В результате мутаций появились новые вторичные метаболиты, в том числе 6-деметилхлортетрациклин и 6-деметилтетрациклин. Определенные мутанты, так называемые идиотрофы, способны синтезировать только половину молекулы антибиотика, а среда должна быть обогащена другой ее половиной. Такая форма мутационного биосинтеза привела к открытию новых производных антибиотиков, среди них принадлежащие к аминоциклитольной группе.

Число противоопухолевых веществ микробного происхождения довольно ограниченно. Блеомицин, выделенный Умезавой с сотр. в Токийском институте микробной химии из культур *Streptomyces verticilliis*, представляет собой гликопептид, который действует, разрывая ДНК опухолевых клеток и нарушая репликацию ДНК и РНК. Другая группа противоопухолевых агентов создана на основе комбинации аминогликозпдной единицы и молекулы антрациклина. Недостатком обоих соединений является их потенциальная опасность для сердца.

В медицине применяют также аминокислоты, например, аргинин. В сочетании с аспартатом или глутаматом он помогает при заболевании печени. K-Na-аспартат снимает усталость и облегчает боли в сердце, его рекомендуют при заболевании печени и диабете. Цистеин защищает SH-ферменты в печени и других тканях от окисления и оказывает детоксицирующее действие. Он проявляет также защитное действие от повреждения, вызываемых облучением. Дигидроксифенилаланин и D-фенилаланин эффективны при болезни Паркинсона. Из полиаминокислот получают хороший материал для хирургии. В медицине также используют зеленую водоросль *Scenedesmus*. Ее культивируют в жидкой питательной среде (установки дают до 80 тонн водорослей в год), извлекают и проводят экстракцию этиловым спиртом. Биомассу отделяют и подвергают ферментативному гидролизу щелочной протеазой. Около 50% белков при этом распадается до пептидов. Гидролизат содержит почти все незаменимые аминокислоты, представляет собой порошок желтовато-зеленого цвета с приятным запахом и вкусом. Используется этот продукт для быстрого восстановления организма, а также как компонент косметических средств. Если вместо обработки этанолом провести двукратную экстракцию дистиллированной водой, а затем высушить, то получается порошок светло-желтого цвета. Его используют как биостимулятор и готовят из него препараты для лечения плохо заживающих ран.

Вещества, вырабатываемые бактериальными штаммами включаются в систему биохимических процессов организма. В случае нарушения нормального биохимического статуса организма они корректируют его, а при патологическом процессе – задерживают его или способствуют прекращению. Такое введение получило название «микробиологическая подсадка». Для лечения широкого спектра заболеваний (бактериальные инфекции кишечника, дыхательных путей, гнойных инфекций, аллергий) успешно применяются штаммы *Bacillus subtilis* (препарат «Бактисубтил», например, используют при лечении диареи). Штаммами *E. coli* лечат ряд кишечных заболеваний. БАВ, секретируемые сапротрофами, могут регулировать ферментативные процессы в организме и вступать во взаимодействие с поступающими в организм ксенобиотиками. Штаммы можно получать непосредственно от человека, тогда они будут представлять его естественную микрофлору. Можно целенаправленно выводить лабораторные мутантные штаммы, в том числе методами генной инженерии и вводить их в организм. Способы введения могут быть различны: капсулы, растворимые в кишечном соке, культуры штаммов-продуцентов на пленочной основе, в виде свечей, а при легочных заболеваниях – в виде аэрозолей.

Новым направлением в медицине является использование ферментных препаратов типа «контейнер», изготовление которых стало возможным появлению и совершенствованию методов иммобилизации веществ. Эти препараты представляют собой микросферы с более или менее твердой и проницаемой оболочкой. Назначение этих лекарственных препаратов различное. Первым типом «искусственных клеток» следует назвать микрокапсулы. Фермент, находящийся внутри оболочки, не контактирует с жидкостями и тканями организма, не разрушается протеиназами, не ингибируется, не вызывает иммунного ответа организма.

Основное достоинство микрокапсул заключается в том, что их можно имплантировать в нужное место, например в непосредственной близости от опухоли. При этом микрокапсула с соответствующим содержанием будет перерабатывать метаболиты, необходимые для роста опухолевой ткани, и эта ткань не будет развиваться. Капсулы могут содержать микроскопические участки тканей. Например, имеются экспериментальные данные по созданию депо инсулина путем имплантации микрокапсул, содержащих островки Лангерганса, синтезирующие в поджелудочной железе инсулин. Известно, что терапии диабетических заболеваний уделяется много внимания. Имплантация лекарственного начала избавила бы пациентов от ежедневных инъекций инсулина.

Контрольные вопросы:

1. Какие микроорганизмы осуществляют синтез антибиотиков?
2. Какие микроорганизмы осуществляют синтез ферментных препаратов?
3. Аминокислоты используемые в медицине?

4. Назовите новые виды антибиотиков?

Задание для СРСП:

1. Типовая схема биотехнологического производства.

2. Принцип масштабного культивирования.

Задание для СРС: оформить результаты практической работы № 2. Ответить на вопросы для самопроверки. Подготовиться к опросу по темам лекции и СРСП.

**ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА № 3**

**Тема: СЫРЬЕВАЯ БАЗА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА.**

**ЗАДАЧИ И ПЕРСПЕКТИВЫ.**

**Цель**: Классификация питательных сред. Сырьевые материалы биотехнологического производства.

**Методическое обеспечение.** Методические указания по выполнению практических работ.

Питательные среды для выращивания объектов биотехнологии, т. е. продуцентов тех или иных соединений, могут быть неопределенного состава и включать различные биогенные добавки (растительные, животные или микробные) – мясной экстракт, кукурузную муку, морские водоросли и т. п. Применяются также среды из чистых химических соединений определенного состава, так называемые синтетические. Компонентный состав сред определяется питательными потребностями продуцента. Во многих процессах используют в качестве объектов организмы, ранее называвшиеся гетеротрофами, которые в настоящее время подразделяются на: органоавтотрофы (употребляющие органические вещества как источники энергии), литогетеротрофы (использующие органические вещества как источники углерода) и органогетеротрофы (для которых органические вещества служат и источниками энергии, и источниками углерода).

Питательные среды призваны обеспечивать жизнеспособность, рост и развитие соответствующих продуцентов, а также синтез целевого продукта с максимальной эффективностью. Требования к питательным средам, используемым в биотехнологии, ничем не отличаются от требований, предъявляемым к питательным средам, применяемым в микробиологии для культивирования тех или иных микроорганизмов. Для приготовления питательных сред в биотехнологии используются разнообразные субстраты, которые должны удовлетворять определенным критериям.

Субстрат представляет собой сырье для получения целевого продукта и должен быть недефицитным, дешевым, по возможности легко доступным.

Растительная биомасса и (в меньшей степени) биомасса животных организмов представляют собой достаточно хорошо утилизируемые источники углерода для биотехнологических целей. На основе этих источников основано давно существующее производство алкоголя из зерна и сыра из молока.

Растительные источники могут рассматриваться как практически неистощимые. Первичная продукция фотосинтеза (рост растений за счет использования солнечной энергии) на земле обеспечивает 2×1011 т вещества (биомассы) в год в пересчете на сухой вес!

Наибольшая доля биомассы (около 44 %) образуется в виде древесины. Вызывает удивление факт, что продукция сельского хозяйства составляет лишь 6 % первичной продукции за счет фотосинтеза, хотя именно из этого количества получается основная часть пищи для людей и животных, а также многие необходимые материалы (например, для текстильной и бумажной промышленности). В будущем значительная часть традиционных сельскохозяйственных продуктов сможет производиться с использованием современной биотехнологии. В частности, новые биотехнологические подходы позволят обеспечить утилизацию большого количества отходов сельского хозяйства, которые в настоящее время не находят применения, и использовать их для приготовления питательных продуктов. Биомасса сельского и лесного хозяйства в настоящее время является значительным экономическим потенциалом во многих национальных экономиках, в первую очередь в тропических и субтропических регионах.

*Природные сырьевые материалы*

Источником природного сырья являются сельское хозяйство и отрасли лесоводства. Получаемые в этих отраслях материалы представляют собой соединения различной химической сложности и включают сахара, крахмал, целлюлозу, гемицеллюлозу и лигнин. Из

первичных сырьевых материалов в процессе производства тех или иных продуктов традиционными методами получается огромное число разнообразных побочных продуктов, которые в силу достаточно высокой питательной ценности могут использоваться в биотехнологических процессах.

Наиболее подходящим и доступным, чтобы служить питательным субстратом для биотехнологических процессов, является сырье, используемое в производстве сахара – сахарная свекла и сахарный тростник. Однако в настоящее время в мире традиционное использование сахара постепенно снижается, и он заменяется более эффективными

подсластителями.

Существенную значимость представляют крахмалосодержащие сельскохозяйственные продукты, включающие различные злаки, такие, как кукуруза, рис, пшеница, картофель, различные корнеплоды, сладкий картофель и маниока. Некоторым недостатком крахмала является то, что до использования в качестве питательного субстрата он обычно должен быть разрушен до моносахаридов или олигосахаридов путем ферментативного переваривания или гидролиза. Тем не менее в настоящее время с определенным успехом разрабатываются перспективные биотехнологические процессы, основанные на использовании данного полисахарида. Половину высушенной растительной массы как необходимым условием подготовки данного материала к использованию в качестве биотехнологического сырья является ее гидролиз до простых водорастворимых сахаров (глюкозы, целлобиозы).

Наибольшие сложности встречаются при попытках утилизации древесины, в которой целлюлоза находится в комплексе с гемицеллюлозой и лигнином. Лигноцеллюлозные комплексы характеризуются очень высокой степенью устойчивости к природным силам биодеградации. Именно это свойство и обусловливает долговечность деревьев и, естественно, построек из дерева, поскольку деревья состоят главным образом из лигноцеллюлозы. Лигноцеллюлоза является наиболее распространенным и возобновляемым природным сырьем, доступным человеку практически во всех странах мира. Однако должны быть преодолены огромнейшие технологические трудности, прежде чем окажется экономически выгодным использование этого энергетически богатого соединения. В данный момент для того, чтобы сделать ее доступной для микробиологической деградации, необходимы весьма дорогие и энергоемкие процессы предварительной обработки. Чистая целлюлоза может быть довольно легко разрушена путем химического или ферментативного гидролиза до растворимых сахаров, которые затем легко подвергаются ферментации (сбраживанию) микроорганизмами с образованием этанола, бутанола, ацетона, одноклеточного белка (SCP), метана и многих других продуктов.

Довольно точно подсчитано, что на Земле в год фиксируется Распространенным источником углерода и энергии являются компоненты нефти и газа. Наилучшим субстратом из компонентов нефти являются н-алканы (особенно жидкие) с числом углеродных атомов от 10 до 20. Их могут утилизировать большинство бактерий и дрожжи. Однако и нефть, и газ также истощаются. Поэтому биотехнологии ориентируются на возобновляемые источники сырья.

Большое внимание уделяется различным видам растительной массы: плоды, соки, клубни, травяная масса и упоминавшаяся выше древесина. Используются также отходы сельского хозяйства, деревообрабатывающей и бумажной промышленности, а также многих отраслей пищевой промышленности.

Возможность использования перечисленных сырьевых материалов является основой создания безотходных производств.

*Сырьевые материалы и перспективы биотехнологии*

Наиболее важным критерием, определяющим выбор сырья для биотехнологических процессов, являются: стоимость, наличие в достаточных количествах, химический состав, форма и степень окисленности источника углерода и т. п. В настоящее время наиболее широко используемыми и коммерчески выгодными материалами являются крахмал (преимущественно кукурузный), метанол, меласса и сырой сахар. Практически нет сомнения в том, что зерновые (в частности, кукуруза, рис и пшеница) будут основными краткосрочными сырьевыми материалами для биотехнологических процессов именно в тех странах, где развиты интенсивные биотехнологические процессы.

Следует отметить, что биотехнология на современном этапе своего развития преимущественно ориентируется на различные виды недорогого, легкодоступного и возобновляемого сырья, наиболее значимым из которого является растительная масса.

Контрольные вопросы

1. Основные источники сырья ?
2. Чем определяется компонентный состав сред ?
3. Природные источники сырья?
4. Наиболее важным критерием, определяющим выбор сырья для биотехнологических процессов, являются?

Задание для СРСП:

1. Характеристика микроорганизмов-продуцентов полезных веществ.

2. Закономерности роста и развития микроорганизмов-продуцентов полезных веществ.

Задание для СРС: оформить результаты практической работы № 3. Ответить на вопросы для самопроверки. Подготовиться к опросу по темам лекции и СРСП и составит 10 тестовых вопросов.

**ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА № 4**

**Тема: ОСОБЕННОСТИ РОСТА МИКРООРГАНИЗМОВ В УСЛОВИЯХ ПЕРИОДИЧЕСКОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ. ХАРАКТЕРИСТИКА КРИВЫХ РОСТА, ПРИМЕНЕНИЕ.**

**Цель**: Изучить особенности роста микроорганизмов в условиях периодического культивирования.

**Методическое обеспечение.** Методические указания по выполнению практических работ.

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 ферментора;

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.

*Конструкция биореакторов*

Все формы и виды ферментационных систем создаются, имея основной целью обеспечение одинаковых условий для всех компонентов содержимого реактора. В ферментерах биокатализаторы суспендированы в жидкой среде, содержащей необходимые субстраты для обеспечения роста организмов и образования нужного целевого продукта. 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 культивирумой 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 нетоксичным 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.

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.

Самым главным направлением биотехнологии (основной задачей) является всемерная интенсификация производственных процессов, что достигается, с одной стороны, внедрением новых высокопродуктивных биологических объектов (продуцентов), а также широким применением эффективных технологических приемов (технологических режимов). Указанная цель достигается подбором подходящего сырья (субстрата для выращивания продуцента), разработкой наилучшей конструкции биореактора (ферментора), оптимизацией условий культивирования продуцента, обеспечением эффективного контроля за самим технологическим процессом, а также усовершенствованием способов выделения и очистки целевого продукта.

Питательная среда и посевной материал непрерывно поступают в *аппарат,* в котором нет обратного смещения. Аппарат выполнен в виде длинной трубы большого диаметра. Жидкость на входе в аппарат смешивается с посевным материалом. По мере их продвижения в аппарате одновременно осуществляются рост биомассы и процесс ферментации, движение не обязательно должно быть горизонтальным. В аппарате башенного типа жидкость движется снизу вверх. Такой способ часто выбираю для анаэробных процессов. Например, есть башенный способ производства пива.   
 Массовое культивирование организмов для биотехнологических целей достаточно хорошо разработано применительно к бактериям, дрожжам и мицелиальным грибам, и лишь сравнительно недавно начались интенсивные исследования в области выращивания культур клеток животных и растений. С помощью техники культивирования растительных клеток во многих странах с успехом готовится посевной материал для размножения определенных растений.

Для совершенствования методов культивирования растительных клеток явились работы по изучению органогенеза и амплификация проростков с последующим высевом их в грунт. Однако крупномасштабное выращивание суспендированных культур клеток многих видов растений уже разработано и используется для получения продуктов, типичных продуктам цельных растений: например, производство никотина, алкалоидов и женьшеня.

Получение конечного продукта метаболизма в производственном ферментаторе состоит основную и самую длительную стадию во всём технологическом цикле выращивания. Одно из основных требований, которые предъявляются к аппарату производственного культивирования сохранение стерильности при интенсивной аэрации питательной среды во время всего периода культивирования.

Стадия производственного культивирования для большинства микроорганизмов длится 48-72 часа (предельно от 24 часов до 12 суток).

Для успешного выращивания производственных культур большое значение имеет предотвращение пенообразования. Для этого используют химические (различные масла, силиконы) и механические средства пеногашения.

В процессе культивирования ведётся постоянный контроль за состоянием культуры и накоплением продуктов биосинтеза, фиксируется потребление основных компонентов среды, контролируется рН культуральной жидкости.

В микробиологической промышленности применяют поверхностный и глубинный методы выращивания микроорганизмов.

*Поверхностный метод*применим только для аэробных культур, причём их можно вырастить на твёрдой, сыпучей питательной среде или на поверхности тонкого слоя жидкой среды.

*Глубинный метод*выращивания может быть *периодическим и непрерывным*(проточным***).*** При периодическом культивировании микробные клетки претерпевают значительные изменения в течение всего периода роста, обусловленные непрерывными изменениями окружающей среды и быстрой реакцией на них клеток.

*Непрерывное культивирование*подразделяют на открытое и замкнутое***.*** В открытых системах клетки постоянно вымываются вытекающей жидкостью со скоростью образования в системе новых клеток; в этих условиях легко достигается их устойчивая концентрация.

В замкнутыхсистемах клетки в какой-то мере задерживаются в системе и их количество постоянно возрастает.

Непрерывный процесс может быть гомогенно- и гетерогенно-непрерывным***.*** При гомогенно-непрерывномпроцессе в ферментаторе все параметры (концентрация питательных веществ, скорость роста микроорганизмов) постоянны во времени. При гетерогенно-непрерывномпроцессе несколько ферментаторов объединяют в батарею. При этом в отдельных ферментаторах условия постоянные, но они могут быть отличными от условий в другом ферментаторе.

Известны методы культивирования, занимающие промежуточное положение между непрерывным и периодическим:

Объёмно-доливной ***–*** среда порциями подаётся в аппарат и также порциями отбирается из него;

Добавление питательной среды к культуре без её отбора***.*** Этот метод удлиняет время культивирования, но приводит к более полному использованию всех имеющихся в среде элементов питания.

Контрольные вопросы

1. Что включает периодическое культивирование?
2. На какие фазы делится периодическое культивирование?
3. Основные требования к биореакторам.
4. Основные требования к материалам ферментеров.

Задание для СРСП:

1. Биотехнологическое получение ферментных препаратов.
2. Биотехнологическое получение органических кислот и аминокислот.

Задание для СРС: оформить результаты практической работы № 4. Ответить на вопросы для самопроверки. Подготовиться к опросу по темам лекции и СРСП.

**ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА № 5**

**Тема: ОСОБЕННОСТИ РОСТА МИКРООРГАНИЗМОВ В УСЛОВИЯХ НЕПРЕРЫВНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ. ХЕМОСТАТ, ТУРБИДОСТАТ, ОКСИСТАТ. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА, ПРИМЕНЕНИЕ.**

**Цель**: Изучить наиболее важные условия непрерывного культивирования. Сравнительная характеристика и применение.

**Методическое обеспечение.** Методические указания по выполнению практических работ.

Непрерывное культивированиеподразделяют на открытое и закрытое***.*** В открытых системах клетки постоянно вымываются вытекающей жидкостью со скоростью образования в системе новых клеток; в этих условиях легко достигается их устойчивая концентрация.

В закрытыхсистемах клетки в какой-то мере задерживаются в системе и их количество постоянно возрастает.

Непрерывный процесс может быть гомогенно- и гетерогенно-непрерывным***.*** При гомогенно-непрерывномпроцессе в ферментаторе все параметры (концентрация питательных веществ, скорость роста микроорганизмов) постоянны во времени. При гетерогенно-непрерывномпроцессе несколько ферментаторов объединяют в батарею. При этом в отдельных ферментаторах условия постоянные, но они могут быть отличными от условий в другом ферментаторе.

Известны методы культивирования, занимающие промежуточное положение между непрерывным и периодическим:

Объёмно-доливной ***–*** среда порциями подаётся в аппарат и также порциями отбирается из него;

Добавление питательной среды к культуре без её отбора***.*** Этот метод удлиняет время культивирования, но приводит к более полному использованию всех имеющихся в среде элементов питания.

В практике современной индустриальной биотехнологии существует три главных типа биореакторов и две формы биокатализаторов. Биореакторы могут функционировать на основе разовой (однократной), восполняемой (неполностью) и непрерывной (продолженной) загрузки. А в самих реакторах культуры могут быть статическими и перемешивающимися, находиться в присутствии кислорода (аэробы) или без него (анаэробы), а также в водной фазе или условиях низкого увлажнения.

Модификацией процесса с разовой загрузкой является возобновляемая ферментация (feеd batch – от feеd-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;

За последние десятилетия форма биореакторов существенно изменилась. Первые (исходные) ферментационные системы представляли собой неглубокие емкости, перемешивание в которых осуществлялось либо путем их встряхивания, либо посредством перемешивания.

*Аппараты с механическим перемешиванием*

Эти реакторы имеют механическую мешалку с центральным валом и лопастями (лопатками), число которых обычно равно 6, реже 8. Лопасти 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. Однако в ряде случаев они не могут быть применены (культивирование мицелиальных грибов), так как обрастают микроорганизмами (мицелием). Нежное и медленное перемешивание создается в биореакторах, предназначаемых для выращивания клеток животных и (в меньшей степени) растений.

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.



Рис 1. Ферментер с механическим перемешиванием.

*Аппараты с пневматическим перемешиванием*

В такого типа аппаратах мешалка отсутствует и перемешивание жидкости осуществляется пузырьками газа (рис.2). 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. 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.



*Рис.2.* Ферментеры с пневматическим перемешиванием: а) эрлифтный; б) пузырькового типа

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° С, рН 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.

Контрольные вопросы:

1. Непрерывное культивированиеподразделяют?
2. Три главных типа биореакторов?
3. Аппараты с механическим перемешиванием.
4. Аппараты с пневматическим перемешиванием.
5. Преимущества микроорганизмов как продуцентов белка состоит?

Задание для СРСП:

1. Биотехнологические аспекты получения первичных и вторичных метаболитов

Задание для СРС:

Оформить результаты практической работы № 5. Ответить на вопросы для самопроверки. Подготовиться к опросу по темам лекции и СРСП. Составить 20 тестовых заданий по темам лекции и практической работы № 5.

**ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА № 6**

**Тема: ХАРАКТЕРИСТИКА ОСНОВНЫХ ЭТАПОВ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДСТВ. СХЕМА.**

**Цель**: изучить основные характеристики этапов биотехнологических производств. Биотехнологическая схема.

**Методическое обеспечение.** Методические указания по выполнению практических работ.

Основные этапы биотехнологического процесса.

Существует 5 стадий биотехнологического производства.

Две начальные стадии включают подготовку сырья и биологически действующего начала. В процессах инженерной энзимологии они обычно состоят из приготовления раствора субстрата с заданными свойствами (рН, температура, концентрация) и подготовки партии ферментного препарата данного типа, ферментного или иммобилизованного. При осуществлении микробиологического синтеза необходимы стадии приготовления питательной среды и поддержания чистой культуры, которая могла бы постоянно или по мере необходимости использоваться в процессе. Поддержание чистой культуры штамма-продуцента - главная задача любого микробиологического производства, поскольку высокоактивный, не претерпевший нежелательных изменений штамм может служить гарантией получения целевого продукта с заданными свойствами.

Третья стадия - *стадия ферментации*, на которой происходит образование целевого продукта. На этой стадии идет микробиологическое превращение компонентов питательной среды сначала в биомассу, затем, если это необходимо, в целевой метаболит.

На четвертом этапе из культуральной жидкости выделяют и очищают целевые продукты. Для промышленных микробиологических процессов характерно, как правило, образование очень разбавленных растворов и суспензий, содержащих, помимо целевого, большое количество других веществ. При этом приходится разделять смеси веществ очень близкой природы, находящихся в растворе в сравнимых концентрациях, весьма лабильных, легко подвергающихся термической деструкции.

Заключительная стадия биотехнологического производства - приготовление товарных форм продуктов. Общим свойством большинства продуктов микробиологического синтеза является их недостаточная стойкость к хранению, поскольку они склонны к разложению и в таком виде представляют прекрасную среду для развития посторонней микрофлоры. Это заставляет технологов принимать специальные меры для повышения сохранности препаратов промышленной биотехнологии. Кроме того, препараты для медицинских целей требуют специальных решений на стадии расфасовки и укупорки, так должны быть стерильными. Далее приводится характеристики каждой из стадий промышленного микробиологического синтеза.

Контрольные вопросы:

1. Цель подготовительной стадии?
2. Что представляет собой основная стадия- стадия ферментации?
3. Что такое отделение жидкости и биомассы?
4. Особенности стадии получения готовой формы продукта?

Задания для СРСП:

1. Характеристика различных типов брожений.

Задание для СРС:

Оформить результаты практической работы № 6. Ответить на вопросы для самопроверки. Подготовиться к опросу по темам лекции и СРСП. Составить 30 тестовых заданий по темам лекции и практической работы № 6.

**ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА № 7**

**Тема: МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ КОНЕЧНЫХ ПРОДУКТОВ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДСТВ.**

**Цель**: Изучить методы выделения и очистки конечных продуктов биотехнологического производства.

**Методическое обеспечение.** Методические указания по выполнению практических работ.

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.

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.

*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.

*Фильтрация*. Различны применяемые в настоящее время фильтрующие системы (барабанные, ленточные, тарельчатые фильтры, карусельные вакуум-фильтры, фильтры-прессы, мембранные фильтры) основаны на одинаковом принципе – задержке биомассы на пористой фильтрующей перегородке. Недостатком способа является налипание клеток на фильтре, слой которых снижает скорость протока жидкости в процессе фильтрования.

*Центрифугирование.* Данный способ требует более дорогостоящего оборудования, чем фильтрование, 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 фильтровании и центрифугировании.

*Методы разрушения клеток*

Разрушение клеток проводится физическими, химическими и ферментативными етодами. 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.

*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.

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 (NH4) или анионные (SO4) 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.

Контрольные вопросы

1. По какому принципу различается стадия выделение целевого продукта?
2. Что такоесепарация ?
3. Что такое флотация?
4. Что такое фильтрация?
5. Что такое центрифугирование ?
6. Основные процессы отделение и очистка продуктов?

Задания для СРСП:

1. Дезинтеграция клеток микроорганизмов.
2. Методы выделения продуктов.

Задание для СРС:

Оформить результаты практической работы № 7. Ответить на вопросы для самопроверки. Подготовиться к опросу по темам лекции и СРСП. 30 тестовых заданий по темам лекции и практической работы № 7.

## литература.

Основная.

1. Основы промышленной биотехнологии: Учебник для вузов/под ред. В.В.Бирюкова. – М: «Колос» 2004.
2. Введение в биотехнологию: /под ред. М.Е. Беккер. – М.: Пищевая промышленность 1978.
3. Биотехнология: /под ред. М.Д.Егоров и др. – М.: Высшая школа 1987.

Дополнительная.

1. Биотехнология. Теория и практика. – Алматы. – периодический журнал Национального центра по биотехнологии РК 1996 – 2001.
2. Антибиотики: /под ред. В.Смирнова. – Киев.: Высшая школа 1989.
3. Биотехнология. Свершения и надежды: /под ред. А. Сассон. – М.: Мир 1987.
4. Антибиотики. / под ред. Д. Панчини, Ф. Пареин- М. Мир 1987.
5. Ферментация и технология ферментов./ под ред. Д.И. Вонч и др.-М. Легкая и пищевая промышленность 1983.