

Министерство сельского хозяйства Российской Федерации

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Саратовский государственный аграрный университет
имени Н.И. Вавилова»

НАУЧНЫЕ ОСНОВЫ ИНЖЕНЕРНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ BIOTEХНОЛОГИИ

краткий курс лекций

для аспирантов

Направление подготовки
06.06.01 Биологические науки

Профиль подготовки
Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Саратов 2014

УДК 575
ББК 30
Ф76

Научные основы инженерного обеспечения биотехнологии: краткий курс лекций для аспирантов направления подготовки 06.06.01 Биологические науки (профиль подготовки – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)) / Сост.: Л.А. Фоменко // ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ». – Саратов, 2014. – 97 с.

Краткий курс лекций по дисциплине «Научные основы инженерного обеспечения биотехнологии» составлен в соответствии с рабочей программой дисциплины и предназначен для аспирантов направления подготовки 06.06.01 Биологические науки (профиль подготовки – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)). Краткий курс лекций содержит теоретический материал, направленный на формирование у аспирантов знаний научных основ инженерного обеспечения биотехнологии.

УДК 575
ББК 30

© Фоменко Л.А., 2014
© ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ», 2014

Введение

Биотехнология – это наука об использовании биологических процессов в технике и промышленном производстве. К числу биологических относят процессы, в которых применяют биологические объекты различной природы (микробной, растительной или животной), например, производство ряда продуктов медицинского, пищевого и другого назначения – антибиотики, вакцины, ферменты, кормовой и пищевой белки, полисахариды, гормоны, гликозиды, аминокислоты, алкалоиды, биогаз, удобрения и пр.

Изучение биотехнологии невозможно без знания основ химии, прежде всего, органической, биологической и коллоидной, без знаний биологических дисциплин (общей биологии, микробиологии, ботаники, генетики, иммунологии, экологии), а также процессов и аппаратов химической и биологической технологии и ряда других общеинженерных дисциплин.

Биотехнологию относят к числу приоритетных дисциплин, где можно прогнозировать более быстрые и важнейшие достижения для социально-экономического прогресса общества.

Ведущее положение в области внедрения биотехнологических разработок занимают в настоящее время США, а в нашей стране - институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН (ИБФМ), сотрудники которого совместно с учеными научно-исследовательского вычислительного центра (НИИВЦ) в 1985 г. создали автоматизированный комплекс «Ферментер-ЭВМ», что обеспечивает возрастание эффективности управления процессом биосинтеза. Существенный вклад в решение биотехнологических проблем в России внесли также коллективы ВНИИ «Синтез-белок», ВНИИ биотехнологии, ВНИИА, Сибирское отделение РАН, институт молекулярной биологии РАН.

В соответствии с определением Европейской Федерации Биотехнологии (ЕФБ) биотехнология базируется на интегральном использовании биохимии, микробиологии, инженерных наук в целях промышленной реализации способностей микроорганизмов, культур клеток тканей и их частей. Уже в самом определении предмета отражено его местоположение как пограничного, благодаря чему результаты фундаментальных исследований в области биологических, химических и технических дисциплин приобретают выраженное прикладное значение. Биотехнология непосредственно связана с общей биологией, микробиологией, ботаникой, зоологией, анатомией и физиологией, биологической, органической, физической и коллоидной химией, иммунологией, биоинженерией, электроникой, технологией лекарств, генетикой и другими научными дисциплинами.

Предлагая самые сложные и необычные среды для выращивания биообъектов, необходимо решать задачи стерилизации, которые основываются на необходимости уничтожения посторонней микрофлоры. Здесь возникает проблема инженерного обеспечения биотехнологии, которая может быть реализована только при комплексном подходе для создания безотходных экологически безопасных биотехнологических процессов.

Лекция 1

КЛАССИФИКАЦИЯ ПРОИЗВОДСТВ БИОСИНТЕЗА ПО ОТНОШЕНИЮ К КОНТАМИНАЦИИ

1.1. Классификация биотехнологических процессов

Биотехнологические процессы условно можно подразделить на биологические, биохимические, и биоаналитические. К первым относятся те, которые основываются на использовании акариот, прокариот и эукариот, вторые – на использовании ферментов; третьи (биоаналитические) на химическом синтезе или полусинтезе веществ, функционально близких или эквивалентных первичным или вторичным метаболитам живых организмов (получение производных пенициллина и цефалоспорины, тетрациклина, нуклеиновых оснований и др.).

По условиям проведения биотехнологического процесса различают нестерильные (например, крупнотоннажное производство кормовых дрожжей) и стерильные производства (например, получение антибиотиков, витаминов, моноклональных тел и др.); аэробные, или с подачей воздуха, и анаэробные (без подачи воздуха) – соответственно производства лимонной кислоты и полисахарида декстрана.

При реализации процессов их стремятся вести в одном из двух режимов: периодическом (полунепрерывном) и непрерывном. В первом случае процесс проводят согласно регламенту и, после завершения всех операций, его повторяют. Во втором случае осуществляют так называемый отливно-доливной процесс, когда, например, на «пике» биосинтеза какого-либо антибиотика отбирают 25-75% культуральной жидкости и однократно добавляют столько же свежей питательной среды.

Процессы биохимической технологии подразделяют по стадиям реализации и технологической схемы производства: подготовка оборудования и питательных сред, их стерилизация, посев биообъекта и ферментация, выделение, очистка, сушка, упаковка. В зависимости от целевого продукта число стадий процесса может быть то больше, то меньше. Для сравнения можно назвать производство кормовых дрожжей и антибиотика стрептомицина. В первом случае целевым продуктом являются дрожжевые клетки, во втором – вторичный метаболит, предназначенный для парентерального введения больным людям и животным. При получении антибиотика стадий процесса больше, чем в случае производства кормовых дрожжей.

Целевыми продуктами могут быть и первичные метаболиты – ферментные белки. Очевидно, что, например, экзогидролазы технологически получать легче, нежели какие-нибудь эндоферменты, локализующиеся внутри клеток, и число стадий в этом последнем случае может возрасти.

Очевидно, что подготовка оборудования, питательных сред, и все другие этапы регламентированной схемы производства какого-либо целевого продукта различны по многим показателям, если это будут, например, процессы получения экзотоксинов и органических кислот. С биотехнологических позиций работа с токсигенными культурами должна проводиться на таком уровне, чтобы исключить возможность попадания ее за пределы биореактора в живом состоянии. Строгий контроль осуществляется также за внутрипроизводственной обработкой и транспортировкой культуральной жидкости, содержащей экзотоксин. Эксплуатация возможностей, например, *aspergillus niger* продуцировать лимонную кислоту не сопряжена с подобной опасностью. Тем не менее,

во избежание рассеивания грибных спор во внешней среде желательна и в этом случае ферментацию осуществлять в герметизованных биореакторах.

1.2. Специальные биотехнологические процессы

Специальные биотехнологические процессы связаны в большей степени с особенностями биообъектов. Достаточно сравнить культивирование вирусов гриппа на куриных эмбрионах для приготовления вакцин и выращивание пеницилла – продуцента антибиотика бензилпенициллина в биореакторах емкостью до 100 м³ и более; другой пример с гибридными клетками млекопитающих, продуцирующих моноклональные антитела, и с лейконостомом – продуцентом полисахарида декстрана.

В каждом из этих процессов имеются свои специфические особенности, благодаря которым выделяют биотехнологический процесс в самостоятельный. С учетом вышесказанного, все специальные биотехнологические процессы подразделяются на микробиологические, фито- и зообиотехнологические.

1.3. Значение асептики в биотехнологических процессах

Как правило, биотехнологические процессы проводят в асептических условиях, хотя имеются из этого правила исключения. Так, при культивировании отдельных эукариот (дрожжи) в негерметизованных ферментаторах (нестерильный процесс), происходит заметное снижение рН среды, где доминирующее положение дрожжей не изменяется при попадании контаминирующих бактерий (от лат. *contaminatio* – загрязнение, заражение, смешение) – они не могут составить конкуренции основному виду.

Асептика (от греч. *a* – не, *sepsis* – гниение) – это комплекс мероприятий, направленных на предотвращение попадания в среду (объект) посторонних микроорганизмов, включая болезнетворные. Следовательно, асептика в биологической технологии и, например, в хирургии – это не одно и то же понятие. В первом случае предполагают использование какого-либо биообъекта (в том числе – микроба) и полное исключение попадания других микроорганизмов, являющимися загрязнителями. Во втором случае стремятся исключить любую возможность попадания патогенных микробов и микробов – контаминантов на операционное поле или в рану.

Каждый из материальных потоков в биотехнологических процессах – потенциальный источник микробов – контаминантов.

Асептика может включать влажную уборку помещений, обработку их ультрафиолетовыми лучами, антисептическими средствами, использование стерильных инструментов, сред, технологической одежды, подачу стерильного воздуха (столы с ламинарным потоком стерильного воздуха в боксированных помещениях, поступление в ферментатор стерильного воздуха через барботер – от франц. *varbotage* - перемешивание) и пр. Следовательно, комплекс мер, обеспечивающих асептику биотехнологических процессов, включает: механическую, физическую и химическую защиту биообъекта и среды его обитания, а при необходимости – и конечный продукт. К механической защите относятся: удаление механических примесей, например, из воздуха, культиваторов, герметизация оборудования, изоляция узлов и соединений; к физической – обработка воздуха и поверхностей приборов и аппаратов ультрафиолетовым светом, кипячение, стерилизация паром под давлением, обработка ультразауком; к химической – обработка поверхностей химическими антисептиками.

1.4. Источники микробов-контаминантов в производственных помещениях

В производственных условиях источниками микробов-контаминантов могут быть почва, вода, окружающий воздух, люди.

Из почвы в сферу биотехнологических процессов попадают спорообразующие палочки-бациллы, конидии грибов, актиномицеты; эти же микроорганизмы с пылью могут попасть в воздух, через посредство которого они способны проникнуть в среду выращивания биообъекта или в конечный продукт производства.

Качественный состав и размеры частиц в воздушной пыли колеблются в широких пределах. В производственных помещениях это зависит от конструктивных особенностей здания, розы ветров, географической зоны расположения города и предприятия, наличия или отсутствия потоков автомобильного транспорта, количества непосредственно занятых в технологическом производстве людей, характера и локализации складских помещений и т.д.

Образующиеся пыль или/и капельки влаги в воздухе, как правило, содержат на своей поверхности слой адсорбированного воздуха и большее или меньшее количество микроорганизмов. Газовая оболочка предохраняет частицы от смачивания. Такие частицы представляют собой дисперсную фазу аэрозоля, устойчивость которой зависит от размеров частиц, их электрического заряда и поверхностной энергии. В случае нахождения на частицах аэрозоля микробных клеток, то их отрицательный электрический заряд будет привносить свою долю в общий заряд частицы. В аэрозоле, содержащем микроорганизмы, можно выделить три фазы: крупноядерную с размером частиц более 100 мкм; мелкоядерную, с размером частиц менее 100, и фазу бактериальной пыли (диаметр частиц от 1 до 100 мкм).

Бактериальная пыль может формироваться из первых двух после их высыхания и повторного попадания в воздух. В разряд частиц с диаметром от 0,001 мкм до 1 мкм подпадают вирусы и некоторые бактерии.

С водой в сферу биотехнологического процесса могут попасть граммотрицательные бактерии из групп энтеробактерий, псевдомонасов и некоторых других. В открытых природных водоемах обнаруживаются целлюлозоразрушающие, нитрифицирующие и денитрифицирующие бактерии, цианобактерии, аммонификаторы, железобактерии и многие другие. Лишь вода артезианских колодцев, глубоких скважин и родников отличается высокой чистотой.

По степени загрязненности открытых водоемов различают 3 зоны сапрофобности (от лат *saprotetes* – гниль, гниение): *полисапробная* – сильно загрязненная, содержащая до нескольких миллионов микробных клеток, включая гнилостные, кишечные бактерии, в 1 мл; *мезосапробная* – умеренно загрязненная, с содержанием в 1 мл 10^6 микробных клеток, с преобладанием аэробных видов; *олигосапробная* – зона чистой воды, содержащей в 1 мл не более 1000 микробных клеток с преобладанием представителей железо-серобактерий и некоторых других видов.

Полисапробные зоны характерны для рек, протекающим по населенным пунктам или вблизи них, где в воду попадают жидкие отходы из крупных свиноводческих предприятий и ферм, канализационные стоки и стоки промышленных предприятий. В такой воде могут быть санитарно-показательные (*E.coli*, *Streptococcus faecalis*), условно патогенные псевдомонасы, протей и другие виды, а также болезнетворные микроорганизмы из группы энтеробактерий.

Таким образом, для использования воды в биотехнологических процессах, необходимо осуществлять ее подготовку.

Источником контаминирующей микрофлоры (граморицательных бактерий, кокков, микоплазм, вирусов и др.) могут быть люди, занятые в биотехнологическом производстве. Только на поверхности кожи может сосредоточиться до 10^{10} микробных клеток. Наиболее загрязненными являются кисти рук, ступни, локти, шея, грудь, промежность, паховые области. Разнообразна и многочисленна микрофлора ротовой области: бактериальные и кокковые формы, вибрионы, спириллы и спирохеты, нокардии, дифтероиды, протозойные организмы, аспорогенные дрожжи рода *Candida*, микоплазмы, вирусы и др. При разговоре, кашле, чихании только здоровый человек выделяет до 20000 микробных клеток, способных распространяться по горизонтали до 1,5 м.

Источником контаминирующей микрофлоры могут быть и некоторые компоненты питательных сред, например, кукурузный экстракт (фаги, дрожжи и др.).

1.5. Асептическое культивирование

Под асептическим культивированием понимается возможность проведения биотехнологического процесса без посторонней микрофлоры. Требование надежной защиты среды, в которой культивируется производственный штамм микроорганизма-продуцента, от посторонней микрофлоры является одним из основных в технологии микробиологического синтеза. Особенно важное значение имеет асептика для производств тонкого микробиологического синтеза. Обеспечение асептических условий в масштабах крупного промышленного производства - весьма сложная инженерная проблема. В целом она решается двумя, путями.

Первый путь заключается в обеспечении технологической гигиены производства. Сюда относится комплекс приемов и средств, обеспечивающих снижение загрязненности посторонней микрофлорой производственной среды и препятствующих распространению производственных продуцентов по производственным помещениям.

Второй путь объединяет комплекс технических решений и методов, имеющих непосредственное отношение к технологии, и заключается в использовании специального технологического оборудования (фильтры, стерилизаторы) или реализации специфических требований асептики при создании основного технологического оборудования (культиваторы), контрольно-измерительных приборов, обвязок аппаратов и разводки трубопроводов. Конечной целью процессов, которые осуществляются с помощью этого оборудования, является стерилизация, т.е. полное освобождение от посторонней микрофлоры всех видов материальных потоков, вводимых в культиватор (аэрирующий воздух, питательная среда, пеногасители и др.), и его внутренних полостей. Чтобы процесс культивирования проходил в асептических условиях, необходимо обеспечить стерилизуемость и герметичность аппаратов и трубопроводов; стерильность аэрирующего воздуха, питательной среды и пеногасящего вещества и других добавок, вводимых в культиватор.

Вопросы для самоконтроля

1. Как классифицируются биотехнологические процессы по отношению к контаминации?
2. Что является целевым продуктом в биосинтезе?
3. Какие биотехнологические процессы относят к специальным и как их классифицируют?
4. Что понимается под термином «асептика»?

5. Потенциальные источники микробов-контаминантов в биотехнологических процессах.
6. Меры, способные обеспечить асептику биотехнологического процесса и (при необходимости) конечного продукта.
7. Источники микробов-контаминантов в производственных помещениях. Что такое биологическая пыль?
8. Что следует понимать под асептическим культивированием?

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная литература

1. Биотехнология: теория и практика / Н.В. Загоскина и др. ; под ред. Н.В. Загоскиной, Л.В. Назаренко. – М.: «Оникс», 2009. – 496 с. – ISBN 978-5-488-02173
2. Клунова, С.М. Биотехнология: учебник / С.М. Клунова, Т.А. Егорова, Е.А. Живухина. – М.: Академия, 2010. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-6697-4
3. Сазыкин, Ю.О. Биотехнология / Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева; под ред. А.В. Катлинского. - М.: Академия, 2008. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-5506-0

Дополнительная литература

1. Биотехнология. Биобезопасность. Биоэтика / А.П. Ермишин и др.; под ред. А.П. Ермишина. – Минск: «Тэхнолoгія», 2005. – 430 с.
2. Биотехнология: учебное пособие для вузов, в 8 кн., под ред. Егорова Н.С., Самуилова В.Д. – М., 1987.
3. Бирюков, В.В. Основы промышленной биотехнологии / В.В. Бирюков. – М.: КолосС, 2004. – 296 с. – ISBN 5-9532-0231-8 («КолосС»); ISBN 5-98109-008-1 (АНО «Химия»)
4. Блинов, В.А. Общая биотехнология: курс лекций. В 2-х частях. Ч. 1 / В.А. Блинов. – Саратов, 2003.

Лекция 2

СТЕРИЛИЗАЦИЯ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПОТОКОВ В БИОТЕХНОЛОГИИ

2.1. Методы отделения и деструкции контаминантов, их сравнительный анализ

Защита биотехнологических процессов от микробов-контаминантов эффективно осуществляется с помощью различных фильтров, причем наибольшее распространение приобрел метод мембранной фильтрации, позволяющий получать стерильные воздух и различные жидкости (разновидность холодной стерилизации). Мембраны применяют для отделения микробов контаминантов от субстратов и в рДНК-биотехнологии. Многие термолabile вещества стерилизуют с помощью различных фильтров.

В биотехнологии, независимо от условий проведения процессов (поверхностно и глубинно, в периодическом, полунепрерывном и непрерывном режимах, в виде твердофазных или газофазных процессах, одно-, двух- и полиступенчато), широко используют стерильный воздух, подаваемый в ферментаторы для аэробных организмов (клеток, клеточных систем); в специальные помещения в виде ламинарных потоков для асептического приготовления лекарственных средств, в боксы и операционные виварии, в распылительные сушилки для высушивания некоторых веществ, в шлюзы между (перед) асептическими блоками. Стерилизующая мембранная фильтрация здесь оказывается наиболее приемлемой.

Наиболее распространенными процессами фильтрации являются обычная фильтрация (макрофильтрацией), микрофильтрация, ультрафильтрация, диализ, (и обратный осмос). Для макрофильтрации используются обычно бумажные или стеклянные фильтры. При этом отделяют частицы размером от 1 до 1000 мкм. Для других видов фильтрации используют нитроцеллюлозные, ацетилцеллюлозные, поливинильные, полиамидные, фтороуглеродные мембраны толщиной менее 0,1 мкм с высокой степенью пористости и с диаметром пор в пределах от 10^{-4} до 10 мкм. В случаях микрофильтрации размеры отделяющихся при этом макромолекул находятся в примерных пределах от 0,001 до 0,02 мкм, а их молекулярные массы соответствуют 1 – 1000 кДа. При диализе через мембраны отделяют небольшие молекулы сопоставимые с размерами молекул растворителя (10^{-3} мкм и менее, или до 1 нм). В этом случае разделение происходит вследствие различных скоростей диффузии через мембрану.

Осмоз относится к молекулярно-диффузионным процессам, когда через мембрану переносится не вещество, а растворитель. Если заставить молекулы растворителя двигаться в обратном направлении, то это будет обратный осмос. Превысить осмотическое давление в таких случаях удастся с помощью повышения внешнего давления. Обратный осмос эффективен для понижения концентрации молекул или ионов в водных растворах.

Области применения мембранной фильтрации приведены в таблице 2.1.

2.2. Сущность стерилизации

Стерилизация - совокупность физических и химических способов полного освобождения объектов внешней среды от вегетативных и покоящихся (споровых) форм патогенных, условно-патогенных и непатогенных микроорганизмов.

Цель стерилизации: предупреждение заноса микроорганизмов в организм человека при медицинских вмешательствах; создание и поддержание асептической и безмикроб-

ной (гнотобиотической) среды; исключение микробного обсеменения питательных сред, культур клеток, реагентов при микробиологических исследованиях; предупреждение микробиологической биодеградации (разрушения) лекарственных, диагностических, продовольственных и других материалов.

Таблица 2.1

Некоторые области практического применения мембранной фильтрации

Процесс Рабочее давление, МПа	Проходящие через мембрану вещества	Задерживаемые мембраной частицы и вещества	Области использования
Микрофильтрация, 0,05	Вода, растворенные вещества	Коллоидные частицы, бактерии и микробы, с размерами более 0,1 мкм	Стерилизация растворов в биотехнологических, химико-фармацевтических производствах, в бактериологических анализах, при разделении веществ
Ультрафильтрация, 0,5	Вода, растворенные неорганические вещества	Бактерии, коллоидные частицы размером более 10^{-3} мкм, растворенные органические полимеры с ММ 1 кДа	Очистка растворов биополимеров, концентрирование, фракционирование, освобождение от пирогенов
Обратный осмос, 5	Вода, растворенные высокополярные низкомолекулярные вещества	Бактерии, вирусы, коллоидные частицы, растворенные неорганические вещества с ММ 0,2 кДа	Концентрирование растворов в биотехнологии, глубокое обессоливание воды и т.д.

Стерилизации подвергают медицинский инструментарий и аппаратуру, лекарственные и диагностические препараты, перевязочный и шовный материал, белье, предметы ухода за больными, питательные среды, лабораторную посуду.

Процесс стерилизации объектов состоит из следующих этапов: дезинфекция; очистка; сборка, группировка и размещение в стерилизаторе; собственно стерилизация; сушка; контроль за стерилизацией; хранение стерилизованных материалов.

Стерилизация - совокупность физических и химических способов полного освобождения объектов внешней среды от вегетативных и покоящихся (споровых) форм патогенных, условно-патогенных и непатогенных микроорганизмов.

2.3. Стерилизация растворов фильтрованием

Для стерилизации растворов используется фильтрование, при этом должно соблюдаться правило: перед розливом растворы должны содержаться в асептических условиях, а время от начала приготовления раствора до его розлива должно быть минимальным.

В случаях, когда целевой продукт в виде раствора или жидкости нельзя стерилизовать упакованным в контейнеры, то его фильтруют через стерильный фильтр с диамет-

ром пор не более 0,22 мкм. При обнаружении вирусов и/или микоплазм в растворе (жидкости), стерилизуем стерилизуемом(-ой) фильтрованием необходимо предусмотреть возможность использования дополнительного метода стерилизации (физического или химического).

Кроме того, любой фильтр, используемый для стерилизующей фильтрации, не должен качественно и количественно изменять конечный продукт (в том числе и антибиотическую активность культуральных жидкостей после стерилизующей фильтрации через батареи фарфоровых свечей).

Качество мембран проверяют обычно биологическим методом, используя для этого виды из родов *Pseudomonas* и *Serratia*.

Из недостатков стерилизующей фильтрации следует указать на адгезию частиц к мембранам, неоднородность пор мембраны по диаметру, удержание части стерилизуемой дорогостоящей жидкости на мембране при фильтрации малых объемов растворов, а также возможная селективная адсорбция ионов (чаще катионов) из небольших объемов растворов, недостаточная или плохая смачиваемость водой мембран и др. И по-прежнему актуальной остается проблема вирусного загрязнения биологически активных веществ (БАВ) и очистки БАВ от вирусов. Ситуация, связанная с очисткой БАВ от вирусов обострилась еще и потому, что появились сообщения о контаминации гормона роста человека, получаемого из гипофиза, «медленным» вирусом болезни Крейтцфельда-Якоба, и это на фоне возрастающей роли ретровирусов (включая ВИЧ). Как следствие – усилилась настороженность к препаратам из крови, гормонам, экстрагированным из тканей млекопитающих; рекомбинантным белкам, образуемыми культивируемыми клетками животных. Кроме того, ряд вирусов животных являются патогенными для человека.

Потенциальная контаминация перечисленных выше продуктов возможна из различных источников: от лиц, чьи клетки используются в биотехнологических процессах; от миеломных клеток, применяемых для получения гибридов; из питательных сред для культивирования клеток млекопитающих, из регентов, используемых для очистки белковых продуктов, например, моноклональные антитела; наконец, несоблюдение требований GMP.

Принятая проверка инактивации вирусов-контаминантов заключается в их температурной или химической обработке. Однако эти методы не универсальны. Поэтому разработана технология так называемой наноселективной фильтрации, с помощью которой задерживаются вирусы размерами от 23 нм и выше. Но за этими пределами остаются тогавирусы (18 нм) и вириды (15 нм).

2.4. Стерилизация воздуха

Воздух, подаваемый в ферментаторы, должен быть чистым и стерильным. Для этого используют другие фильтрующие материалы, которыми заполняются общие и индивидуальные (для каждого ферментатора) фильтры, например, из перхлорвинила (в фильтрах Петрянова - ФП), стекловаты и др. Профильтрованный воздух сжимается в компрессорах, охлаждается в теплообменнике, поступает затем в ресивер (от англ. *receiver* - емкость), устраняющий пульсации воздуха, из которого через брызгоулавливатель проходит общий и индивидуальный фильтры, и только после этого поступает через барботер в культуральную жидкость.

2.5. Стерилизация питательных сред

Питательная среда перед засевом каким-либо биообъектом должна быть стерильной. В таких случаях прибегают к тепловой стерилизации, заботясь о сохранении стабильности ингредиентов среды. В микробной биотехнологии обычно используют методы периодической и непрерывной стерилизации. Первую осуществляют в аппаратах малой емкости непосредственно в ферментаторах «глухим» или «острым» паром под давлением в течение 30-40 минут при температуре порядка 134⁰С (2,02650·10⁵ Па) после удаления воздуха из аппарата при нагреве до 100⁰С. Затем среду охлаждают водой через змеевик или рубашку аппарата и засевают тем или иным биообъектом.

Метод непрерывной стерилизации основан на том, что концентрат питательной среды подают насосом через систему конструкций, включающей нагреватель, выдерживатель (собственно стерилизатор) и теплообменник (охладитель, в котором охлаждение среды происходит до температуры, оптимальной для культивирования клеток).

2.6. Термическая стерилизация

Самый надежный способ стерилизации - автоклавирование. Стерилизующее действие автоклава обусловлено контактом насыщенного пара под давлением с более холодными объектами, что приводит к конденсации пара в воду и сопровождается выделением тепла, повышающего температуру стерилизуемого объекта. Но обезвоживания при этом не происходит.

В зависимости от стерилизуемых материалов температура насыщенного пара устанавливается от 110° до 138°С, давление от 0,4 до 2,5 атмосфер, экспозиция от 30 до 60 минут. Простые питательные среды, физиологический раствор, дистиллированную воду, текстильные изделия в свертках стерилизуют при режиме 1 атмосфера (121°С) 15-30 минут. Чувствительные к температуре материалы стерилизуют при более низком давлении (0,4-0,5 атм.). Различные материалы по-разному влияют на рост и развитие биообъектов, к тому же не все из них можно подвергать автоклавированию (таблица 2.2).

Таблица 2.2.

Влияние некоторых материалов на рост клеток в культурах и возможность их стерилизации паром под давлением

Материал	Рост клеток, % к контролю					возможность автоклавирования
	бактерий		микророслей	в культуре тканей		
	метано-окисляющихся	других разных		растительных	животных	
Стекло (контроль)	100	100	100	100	100	Да
Дюралюминий	-	-	89,5	-	-	Да
Д1АТ	100	-	85	97	60-80	Нет
Оргстекло 40ПБ	105	133,8	91,4	43	25-30	Нет
Полиэтиленовая трубка	102	-	184	100	100	Да
Резина белая пищевая	5,7	-	-	0	0	Да
Резина красная						
Резина черная						

(вакуумная)	6,2	-	-	0	0	Да
Сталь Х18Н10Т	110	-	76,4	92	50	Да
Фторопласт-4	102	-	112,1	93	60-70	Да
Хлорвиниловая трубка	132	-	175	0	0	Нет
Эпоксидная смола (полимеризованная)	120	-	-	100	-	да

Сухой жар в 170°C и экспозиции в 60 минут высокоэффективен как стерилизующий агент, но обладает разрушающим действием на объект. Этим способом стерилизуют предметы, плохо проницаемые для пара и не изменяющие свойств под действием высокой температуры (стекло, смазки, гидрофобные вещества). При температуре 180° происходит возгонка жирных кислот и смолистых веществ из ваты и обугливание бумаги, поэтому более 180° температуру повышать нельзя.

Термолабильные материалы (главным образом жидкие) стерилизуют 3-4 кратным (дробным) прогреванием «текучим» паром при 100°C по 1 часу с перерывом 1 сутки, в течение которых материал находится в термостате (37°C) для прорастания спор.

Дробная стерилизация (тиндализация) при 56-70°C по 1 часу в течение 5 дней используется для сред или лекарственных форм с белками, витаминами. При невозможности температурной стерилизации используют фильтрование через антибактериальные фильтры. Для стерилизации воздуха в операционных, боксах и т.д. используют УФ-лучи.

Крупногабаритные изделия, предметы из термолабильных разнородных материалов стерилизуют в герметических контейнерах парами формальдегида или этиленоксида, а также растворами формалинопропана при экспозиции 6-24 часа (химическая стерилизация).

В заводских условиях медицинские изделия (в основном одноразовые) часто стерилизуют γ -лучами 0,2-4,5 Мрад (лучевая стерилизация). Необходимо отметить, что микробицидные дозы γ -излучения очень высоки, что приводит к быстрому разрушению объекта и требует создания сложных систем защиты персонала от радиации. Эффективность стерилизации проверяют бактериологическим посевом.

Стерилизация прокаливанием. Бактериологические петли, сделанные из платиновой или нихромной проволоки, стерилизуют в пламени спиртовой или газовой горелки. Такой способ получил название прокалывания или фламбирования.

Кипячение является наиболее простым и легкодоступным методом стерилизации, пригодным для устранения вегетативной формы микробов. Для уничтожения спорной микрофлоры оно не件годно. Однако, несмотря на многообразие способов стерилизации, универсального метода не существует. Особую сложность представляет стерилизация термолабильных материалов.

2.7. Стерилизация термолабильных материалов и объектов

Для стерилизации термолабильных материалов и биообъектов используют «холодную» или «газовую» стерилизацию этиленоксидом при температуре его кипения (+12,5°C). Дело в том, что этиленоксид (окись этилена) относится к веществам, которые неспецифически действуют на различные микроорганизмы – вегетативные клетки бактерий и грибов, бактериальные споры и грибные конидии, вирусы. Эффект наблюдает-

ся при условии, стерилизуемые объекты не должны вступать во взаимодействие с этиленоксидом, должны быть нейтральными, хорошо очищенными и упакованными.

После воздействия этиленоксидом упаковки выдерживают для испарения газа при температуре не ниже 20⁰С в течение 4-5 суток. Поскольку этиленоксид токсичен, то стерилизованные с его помощью биообъекты надлежащим образом проветренные, хранят в специальных помещениях.

В некоторых случаях для стерилизации используют β-пропиолактон, отличающийся высокой реакционной способностью. Он, например, легко взаимодействует с аминами, в малых концентрациях губительно действует на вирусы, бактерии и грибы, особенно при повышении температуры; однако его водные растворы очень быстро инактивируются даже при комнатной температуре. β-Пропиолактон токсичен для кожи, агрессивен в отношении некоторых металлов и многих пластмасс, в повышенных концентрациях проявляет свойства мутагена. Поэтому в биотехнологии его не следует применять в качестве стерилизующего агента.

В лабораторных и производственных условиях иногда применяют ультразвуковые установки (УЗ), например, для мойки посуды (частота УЗ выше 20000 Гц). Однако для людей УЗ с такой частотой очень вреден и от такого УЗ следует экранировать занятых в соответствующих производствах операторов (особенно при длительном воздействии). Хотя при помощи УЗ выделяют некоторые алкалоиды из растений, антигены из некоторых бактерий, стимулировать рост клеток, гасить пенообразование в биореакторах при ферментациях, УЗ-генераторы не нашли широкого распространения в биотехнологии.

Вопросы для самоконтроля

1. Области применения и ограничения мембранной фильтрации.
2. Применение мембранной фильтрации для очистки воздуха от микробов-контаминантов, подаваемого в ферментаторы.
3. Виды мембранной фильтрации.
4. Сущность, достигаемые цели и недостатки мембранной фильтрации.
Сущность, цели и недостатки стерилизации фильтрованием.
5. Способы стерилизации воздуха.
6. Способы стерилизации питательных сред.
7. Термическая стерилизация биообъектов автоклавированием, сухим жаром.
8. Стерилизация биообъектов и оборудования «текучим» паром, парами формальдегида, окиси этилена, рентгеновским излучением, прокаливанием и кипячением.
9. Способы стерилизации термолабильных биообъектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная литература

1. Биотехнология: теория и практика / Н.В. Загоскина и др. ; под ред. Н.В. Загоскиной, Л.В. Назаренко. – М.: «Оникс», 2009. – 496 с. – ISBN 978-5-488-02173
2. Клунова, С.М. Биотехнология: учебник / С.М. Клунова, Т.А. Егорова, Е.А. Живухина. – М.: Академия, 2010. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-6697-4
3. Сазыкин, Ю.О. Биотехнология / Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева; под ред. А.В. Катлинского. - М.: Академия, 2008. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-5506-0

4. Тарантул, В.З. Толковый биотехнологический словарь русско-английский: справочное издание [Электронный ресурс] / В.З. Тарантул. – М.: Языки славянских культур, 2009. – 936 с. – ISBN: 978-5-95-51-0342-6 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks.

Дополнительная литература

1. Биотехнология. Биобезопасность. Биоэтика / А.П. Ермашин и др.; под ред. А.П. Ермашина. – Минск: «Тэхнолoгія», 2005. – 430 с.

2. Биотехнология: учебное пособие для вузов, в 8 кн., под ред. Егорова Н.С., Самуилова В.Д. – М., 1987.

3. Бирюков, В.В. Основы промышленной биотехнологии / В.В. Бирюков. – М.: КолосС, 2004. – 296 с. – ISBN 5-9532-0231-8 («КолосС»); ISBN 5-98109-008-1 (АНО «Химия»)

5. Блинов, В.А. Общая биотехнология: курс лекций. В 2-х частях. Ч. 1 / В.А. Блинов. – Саратов, 2003.

6. Блинов, В.А. Общая биотехнология: Курс лекций. В 2-х частях. Ч. 2. – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский СГАУ», 2004. – 144 с. – ISBN 5-7011-0436-2

ЛЕКЦИЯ 3

Критерии и аппаратное оформление стерилизации

3.1. Стерилизация сухим жаром

Стерилизация (от лат. *sterilis* – бесплодный) – полное освобождение различных **веществ**, предметов от живых **микроорганизмов**. Среди физических факторов, влияющих на рост и размножение микроорганизмов, наибольшее значение имеет температура. Простейшим способом стерилизации является обжигание металлических и стеклянных предметов в пламени **горелки**. Стерилизация сухим жаром производится в сушильных шкафах при 160–165 °С в течение двух часов. Таким методом стерилизуют лабораторную посуду, металлические предметы, некоторые порошкообразные, не портящиеся при нагревании вещества. Стерилизация водяным паром под **давлением** производят в **автоклавах**. Насыщенный пар под давлением убивает микроорганизмы и споры быстрее, чем перегретый пар. Сухой воздух (жар) убивает микроорганизмы при более высокой температуре, чем водяной пар. Гибель клеток бактерий, грибов, дрожжей и вирусных частиц при стерилизации высокой температурой происходит либо в результате сгорания клеток, либо в результате коагуляции белковых структур микроорганизмов.

Основным недостатком термической стерилизации, несмотря на ее широкое практическое использование, следует считать неизбежные потери питательных свойств среды, поскольку при температурах, необходимых для стерилизации (120–150 °С), большинство субстратов, особенно углеводы, оказываются термически нестабильными.

3.2. Влияние осмотического давления на биохимическую активность микроорганизмов

Осмотическое давление отрицательно влияет на биохимическую активность микроорганизмов. Повышение концентрации солей задерживает развитие многих бактерий, однако есть виды, способные развиваться в присутствии концентрированных растворов солей, такие бактерии называют осмофильными (галофильными). Осмотическое давление в клетке регулирует цитоплазматическая мембрана. При высоком осмотическом давлении окружающей среды происходит плазмолиз. Плазмолиз явление обратимое, и если понизить осмотическое давление окружающего микроорганизмы раствора, вода поступает внутрь клетки и возникает явление, противоположное плазмолизу.

3.3. Стерилизация УФ облучением

Ультрафиолетовая компонента солнечного света является главной причиной гибели микробов в наружном воздухе. Смертность микроорганизмов на открытом воздухе достигает 90–99 %, но зависит от вида микроорганизма и может варьировать от нескольких секунд до пары минут. Споры и некоторые виды бактерий окружающей среды имеют стойкость к воздействию солнечного света и могут переносить длительное облучение светом без особого вреда своему организму. Энергия ультрафиолетовой компоненты солнечного света вызывает повреждения микроорганизмов на клеточном и генетическом уровнях, тот же самый ущерб наносится людям, но он ограничен кожей и глазами. Искусственные источники ультрафиолетового излучения (УФИ) используют гораздо более сконцентрированные лучи, оказывая на микроорганизмы как летальное,

так и мутагенное воздействие. Бактерицидными свойствами обладают только те лучи, которые адсорбируются протоплазмой микробной клетки.

Биофизическое действие УФ на генетический или функциональный аппарат бактерий выглядит следующим образом: излучение вызывает деструктивно-модифицирующее повреждение ДНК, нарушает клеточное дыхание и синтез ДНК, что приводит к прекращению размножения и лизису микробных клеток. В нарушении синтеза ДНК основным является окисление сульфгидрильных групп, что вызывает инактивацию нуклеотидазы и гибель микробной клетки в первом или последующих поколениях. Сила проникновения ультрафиолетовых лучей невелика. Тонкий слой стекла достаточен для того, чтобы не пропустить их. Действие лучей ограничивается поверхностью облучаемого предмета, его чистота имеет большое значение. УФ высокоактивно, если микроорганизмы и частицы пыли расположены в один слой, при многослойном расположении верхние защищают нижележащие. Защитная оболочка вокруг бактериальной клетки препятствует достижению антимикробного действия. В любой живой клетке существуют биохимические механизмы, способные полностью или частично восстанавливать исходную структуру поврежденной молекулы ДНК. Благодаря радиационному мутагенезу, уцелевшие микроорганизмы способны образовывать новые колонии с меньшей восприимчивостью к облучению.

Вероятностный характер стерилизации УФ изучен в достаточной степени, существуют различные уравнения, характеризующие процесс отмирания бактерий. Эффективность биоцидного действия УФ зависит от длины волны, интенсивности облучения, времени воздействия, видовой принадлежности обрабатываемых микроорганизмов, расстояния от источника, а также от состояния воздушной среды помещения: температуры; влажности; уровня запыленности; скорости потоков воздуха. Метод заслуженно считается эффективным для обеззараживания поверхностей, при этом доказаны микробиологическое и экономическое преимущество УФ или его эквивалентная эффективность химическим методам. При использовании ультрафиолетовых облучателей лимитирующим фактором является предельно допустимая доза облучения людей, а не доза, требуемая для уничтожения микроорганизмов в воздухе помещения.

3.4. Стерилизация ультразвуком

Влияние ультразвуковых волн. Ультразвуком (УЗ) называются механические колебания с частотой, превышающей 18 кГц (18 000 колебаний в секунду). УЗ получают с помощью высокочастотного генератора, который превращает частоту электросети в электрический ток высокой частоты. Колебания электрического тока высокой частоты посредством пьезоэлектрического преобразователя превращаются в механические колебания, которые передаются в резервуар с жидкостью. При частоте колебания 1,0–1,3 мГц в течение 10 мин оказывает бактерицидный эффект. Ультразвук способствует разрыву клеточных стенок и мембран, повреждению флагеллина у подвижных форм микроорганизмов. Влияние ультразвука основано на механическом разрушении микроорганизмов в результате возникновения высокого давления внутри клетки. Это позволяет использовать его в качестве стерилизующего агента, а также применять для инактивации и дезинтеграции вирусов с целью получения антигенов и вирусных вакцин.

3.5. Стерилизация ИК-лучами

Стерилизация инфракрасными лучами. Инфракрасные, или тепловые, лучи составляют часть спектра световой радиации, простирающуюся от красного конца видимого спектра в область длинных волн. Источником инфракрасных лучей являются любые нагретые тела. Практически для этой цели тли могут быть использованы специальные зеркальные тепловые лампы накаливания, выпускаемые отечественной промышленностью. Особенность передачи лучистой энергии заключается в том, что промежуточный слой воздуха между термоизлучателем и облучаемым материалом не нагревается и потери тепла в окружающую среду невелики. Различные типы бактерий в разной степени стойки к ультрафиолетовым излучениям. Так, особостойкими являются споры, многие из которых не теряют своих вегетативных свойств. Высокая влажность воздуха повышает сопротивляемость бактерий, а в тонком слое воды на стерилизацию требуется примерно в десять раз больше энергии по сравнению с той, которая нужна для гибели тех же микроорганизмов в воздухе. С увеличением толщины слоя воды бактерицидные свойства ультрафиолетовых лучей приближаются к нулю.

3.6. Стерилизация озоном

Стерилизация озоном. Механизм инактивации воздушной микрофлоры озоном очень похож на действие озона в воде. Сначала озон воздействует на оболочку микроорганизмов путем реакции с двойными связями липоидов. Затем, благодаря способности разрушать дегидрогеназы клетки, озон воздействует на ее дыхание. В результате нарушения проницаемости оболочки и изменения растворимости белков клетка лизируется. Обнаружено проникновение озона внутрь микробной клетки, вступление его в реакцию с веществами цитоплазмы и превращение замкнутого плазмиды ДНК в открытую ДНК, что снижает пролиферацию бактерий. Противовирусное действие озона связывается с разрушением вирусных частиц, инактивацией обратной транскриптазы и влиянием на способность вируса связываться с клеточными рецепторами. Капсулированные вирусы более чувствительны к действию озона. Это объясняется тем, что капсула содержит много липидов, которые легко взаимодействуют с озоном. Наблюдается известное различие между разными видами микроорганизмов по их сопротивляемости действию озона. Довольно быстро погибают возбудители ангины, дифтерии, различные плесени. Как правило, наиболее устойчивы микробы, покрытые оболочкой, как например туберкулезная палочка и микробные споры. Эффективность стерилизующего действия озона зависит от его концентрации, экспозиции, температуры, влажности, вида микроорганизма, рН и исходной обсемененности обеззараживаемого воздуха. Озон в низких концентрациях (около 0,2 мг/м³) не очень эффективен для уничтожения бактерий, так как они восстанавливаются спустя некоторое время после обработки. В этих случаях озон оказывает лишь поверхностное действие (контактируя с внешней оболочкой клетки) и незначительно проникает вглубь. Для полной инактивации микрофлоры помещения необходима высокая концентрация озона и длительное время для контакта с микроорганизмами. Оксиды азота усиливают бактерицидные свойства озона, которые в значительной степени зависят от влажности воздуха. При относительной влажности воздуха ниже 45 % озон почти не оказывает бактерицидного действия, а оптимум его активности лежит между 60–80 % влажности.

В профессиональных целях для стерилизации воздуха помещения в присутствии людей генератор озона служить не может, поскольку концентрация озона в несколько

раз превышает ПДК для человека. Высокая концентрация выделяющегося озона приводит к деструкции. Таким образом, озонирование высокоэффективно для стерилизации поверхностей и воздушной среды помещения. Невозможность использования метода в присутствии людей и необходимость проводить обеззараживание в герметичном помещении серьезно ограничивает сферу его профессионального применения.

3.7. Воздействие химического агента

По химическому составу противомикробные антисептические вещества можно разделить на несколько групп. Например, галогены – препараты йода и хлора, они нарушают ферментативные структуры бактериальной клетки, угнетают гидролитическую и дегидрогеназную активность бактерий, инактивируют такие ферменты, как амилазы и протеазы. Перекись водорода, перманганат калия, как и галогены, обладают окислительным действием. Кислоты и их соли, щелочи, спирты и альдегиды повреждают поверхностные структуры бактериальной клетки, клеточную стенку и мембраны, нарушая их избирательную проницаемость и другие функции. Соединения тяжелых металлов обладают антиферментным механизмом действия на бактериальную клетку, при этом изменяется структура дыхательных ферментов, и разобщаются процессы окисления и фосфорилирования в митохондриях. Красители обладают денатурирующим эффектом.

К антисептическим химическим веществам относятся группы производных 8-оксихинолина и нитрофурана, которые также нарушают биосинтетические и ферментативные процессы в бактериальной клетке. К наиболее распространенным дезинфицирующим средствам относятся хлорсодержащие, фенольные, перекисные и аммониевые соединения.

Стерилизация твердых предметов, портящихся при нагревании (некоторые пластмассы, электронная аппаратура и др.), может быть осуществлена обработкой газами (например, окисью этилена в смеси с CO_2 или бромистым метилом), спиртом, растворами сулемы.

Стерилизация растворов проводится также путем их пропускания через мелкопористые материалы, которые адсорбируют клетки микроорганизмов: каолин, асбест, фарфор и др.

Широкое применение нашли мембранные фильтры их изготавливают из специально обработанной нитроцеллюлозы. Бактерии задерживаются пористыми перегородками не потому, что диаметр капиллярных ходов фильтра меньше, чем поперечник бактерий, а вследствие молекулярного притяжения и прилипания взвешенных тел к внутренним стенкам пор. В принципе метод стерилизующей фильтрации является идеальным средством стерилизации лабильных, в том числе термически неустойчивых жидких и газовых сред, поскольку он может быть проведен при низкой температуре и требует лишь градиента давления по разные стороны мембраны.

3.8. Промышленная очистка и стерилизация воздуха

Как известно, в воздухе содержится взвешенных частиц до 10^9 , в том числе микроорганизмов $0,8 \cdot 10^3 - 10^4$ на 1 м^3 . Среди микроорганизмов обнаружены бактерии и их споры, актиномицеты и аспоргенные дрожжи, вирусы и др. Наименьшие размеры, за исключением вирусов, имеют бактерии, диаметр которых $0,5 - 2,1 \text{ мкм}$ и длина до 26 мкм . Это требует при подготовке воздуха его стерилизации. Отечественный и зарубежный опыт показывает, что технологически и экономически оправданным является мно-

гоступенчатый способ продувания воздуха через волокнистые, зернистые или пористые материалы. Для больших расходов воздуха широко распространена технологическая схема, представленная на рис. 1.

Воздух на аэрацию в посевные и производственные ферментеры подается с помощью компрессора. Перед сжатием воздух проходит через масляный или сухой фильтры, где осуществляется его очистка от механических примесей. Нагретый в процессе компрессирования сжатый давлением 0,3 МПа воздух охлаждается в теплообменнике. После ресивера воздух охлаждается в теплообменнике для конденсации влаги. Выходящий из ресивера воздух нагревается в кожухотрубном аппарате. Далее воздух проходит частичную очистку от микроорганизмов в фильтре грубой бактериальной очистки и полностью очищается от микроорганизмов в фильтре тонкой бактериальной очистки. Воздух, выходящий из ферментатора и инокулятора высушивается от влаги на фильтре, достигая расчетной допустимой концентрации микроорганизмов.

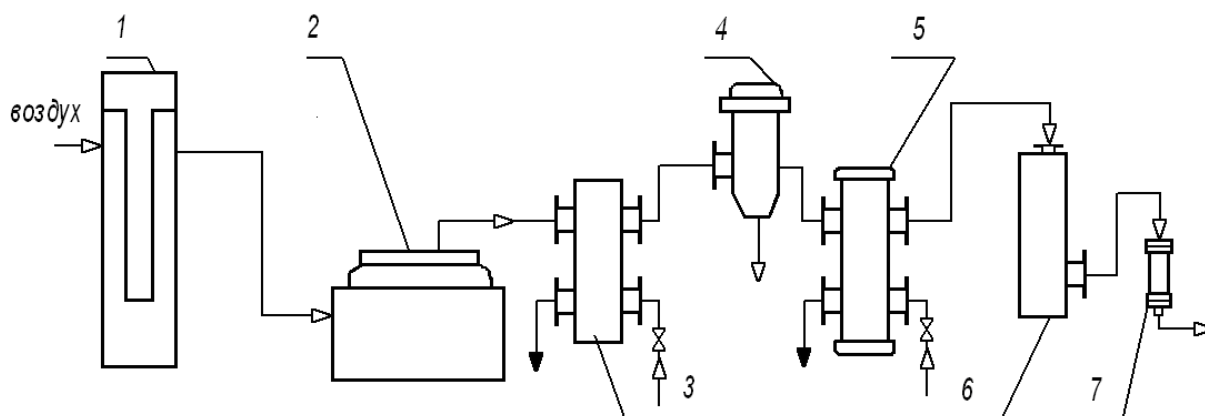


Рис. 1. Промышленная схема очистки воздуха: 1 – фильтр; 2 – компрессор; 3 – теплообменник; 4 – влагоотделитель; 5 – ресивер; 6 – теплообменник; 7 – головной фильтр (схема Н.А. Войнова)

Некоторые конструкции фильтров для биологической очистки воздуха представлены на рис.2.. Глубинный фильтр (рис.2. а) представляет собой емкость, снабженную рубашкой с перфорированными решетками внутри. Между решетками укладывается волокнистый фильтрующий материал.

В зависимости от напора сжатого воздуха плотность укладки стекловолокнистого фильтрующего материала составляет 100–500 кг/м³. Фильтр с тканью Петрянова (рис.2 б) представляет собой стальной цилиндр с разъемной крышкой и коническим днищем. Внутри фильтра в трубной решетке на резьбе закреплены перфорированные цилиндры, обтянутые слоями ткани через которые проходит воздух и очищается. Фильтр стерилизуется паром с примесью формалина. Необходимая степень биологической очистки воздуха достигается при использовании в качестве фильтрующего материала пористых фильтрующих материалов. Фильтр такой конструкции представлен на рис.2 в.

Известны эффективные металлокерамические фильтрующие элементы для очистки микробных частиц диаметром 0,3 мкм. Особенностью фильтрования с помощью этих элементов является тесная взаимосвязь между формой каналов фильтра с периодически изменяющимся диаметром сечения и скоростью движения воздушного потока в этих каналах. При движении воздуха через материал фильтра в нем возникают ультразвуковые колебания, приводящие к осаждению микроорганизмов на стенки фильтра. На ос-

новые фильтрующие металлокерамические элементы разработаны парные автоматические фильтрующие комплексы для грубой и тонкой биологической очистки воздуха.

Отличительной особенностью таких комплексов является гарантированная микробиологическая надежность очистки и полная автоматизация их работы.

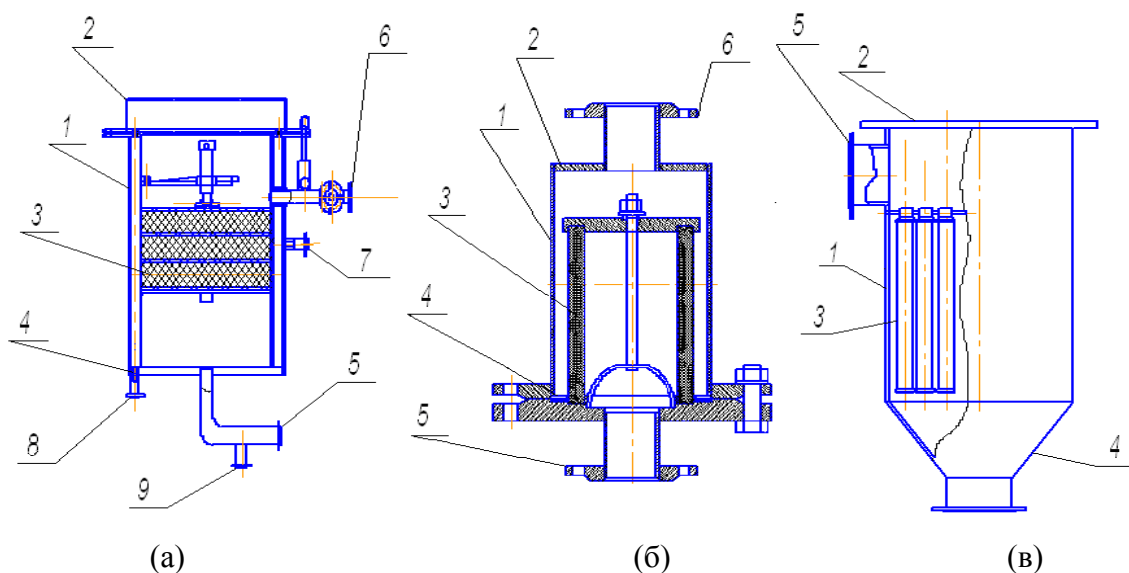


Рис. 2. Схемы фильтров – а: 1 – корпус; 2 – крышка; 3 – решетки со слоем фильтрующего материала; 4 – днище; 5 – вход воздуха; 6 – выход воздуха; 7 – вход острого пара; 8, 9 – выход; б: 1 – корпус; 2 – фланец; 3 – фильтрующий фторопластовый элемент; 4 – прокладка; 5, 6 – вход и выход воздуха; в: 1 – корпус; 2 – крышка; 3 – фильтр; 4, 5 – выход и вход воздуха

Вопросы для самоконтроля

1. Механизм влияния осмотического давления на биохимическую активность микробов.
2. Биофизический механизм стерилизации ультрафиолетовым облучением.
3. Механизм действия ультразвуковых колебаний при стерилизации объектов биосинтеза.
4. Стерилизация озоном: недостатки и преимущества.
5. Как осуществляется промышленная очистка и стерилизация воздуха в биотехнологических производствах?
6. Материалы для изготовления фильтров очистки воздуха.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная литература

1. Биотехнология: теория и практика / Н.В. Загоскина и др. ; под ред. Н.В. Загоскиной, Л.В. Назаренко. – М.: «Оникс», 2009. – 496 с. – ISBN 978-5-488-02173
2. Клунова, С.М. Биотехнология: учебник / С.М. Клунова, Т.А. Егорова, Е.А. Живухина. – М.: Академия, 2010. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-6697-4
3. Сазыкин, Ю.О. Биотехнология / Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева; под ред. А.В. Катлинского. - М.: Академия, 2008. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-5506-0
4. Тарантул, В.З. Толковый биотехнологический словарь русско-английский: справочное издание [Электронный ресурс] / В.З. Тарантул. – М.: Языки славянских культур, 2009. – 936 с. – ISBN: 978-5-95-51-0342-6 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks.

Дополнительная литература

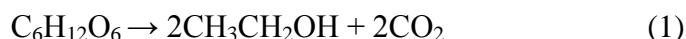
1. Биотехнология. Биобезопасность. Биоэтика / А.П. Ермишин и др.; под ред. А.П. Ермишина. – Минск: «Тэхнолoгiя», 2005. – 430 с.
2. Биотехнология: учебное пособие для вузов, в 8 кн., под ред. Егорова Н.С., Самуилова В.Д. – М., 1987.
3. Бирюков, В.В. Основы промышленной биотехнологии / В.В. Бирюков. – М.: КолосС, 2004. – 296 с. – ISBN 5-9532-0231-8 («КолосС»); ISBN 5-98109-008-1 (АНО «Химия»)
7. Блинов, В.А. Общая биотехнология: курс лекций. В 2-х частях. Ч. 1 / В.А. Блинов. – Саратов, 2003.
8. Блинов, В.А. Общая биотехнология: Курс лекций. В 2-х частях. Ч. 2. – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский СГАУ», 2004. – 144 с. – ISBN 5-7011-0436-2

ЛЕКЦИЯ 4

Материальный и энергетический баланс процесса биосинтеза

4.1. Стехиометрия микробиологического синтеза

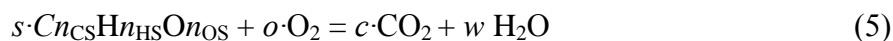
Первые работы по составлению материального баланса роста популяций клеток основаны на применении закона сохранения вещества по каждому химическому элементу к метаболизму. Получаемые уравнения аналогичны уравнениям элементного баланса химических реакций. Например, уравнение для алкогольной ферментации глюкозы записывалось в виде:



Последующее развитие этого подхода привело к выводу ряда уравнений для ассимиляции субстрата клетками, где внутриклеточный продукт первичной ассимиляции в большинстве случаев считался углеводами и обозначался как CH_2O , например:



Ощутимый шаг в развитии теории материального баланса сделал Тамия в 1932 г. Он использовал вместо CH_2O точный элементный состав клеток ($C_{86}H_{160}O_{45}N_7$) – другие элементы отбрасывались ввиду их малого содержания в биомассе. Состав биомассы и субстрата был выражен им в общем виде. Он сформулировал уравнения материального баланса для образования биомассы клеток из вещества субстрата в процессе клеточного дыхания. Эти уравнения написаны по отдельности для случаев, когда субстрат имеет более высокую или меньшую восстановленность, чем биомасса, а также для случаев, когда источником азота служит аммиак или нитрат. Вместо восстановленности использован параметр, названный коэффициентом сгорания. Например, для субстратов, имеющих меньшую, чем биомасса восстановленность, образование биомассы и окисление субстрата в процессе дыхания записаны в виде:



здесь n – числа атомов элементов, помеченные индексами соответствующих элементов, а также буквами S или B для субстрата и биомассы; $CQ = c/o$ – коэффициент сгорания, который был получен из и представлен в виде $CQ = nc / (4nc + nH - 2nO)$. Или для азотсодержащих субстратов состава $Cn_{CS}Hn_{HS}On_{OS}Nn_{NS}$, где продуктом биологического окисления является аммиак, из получено выражение в виде:

$$CQ = nc / (4nc + nH - 2nO - 3nN) \quad (6)$$

4.2. Методы расчета стехиометрических коэффициентов и составления материального баланса

В ранних работах отсутствовал анализ роста как единого процесса, где совмещены дыхание и образование биомассы. Дальнейшие исследования в этой области привели к уравнениям элементного баланса роста микробных культур как единого процесса, включающего и образование биомассы и генерацию энергии для этого. Состав биомассы и стехиометрические коэффициенты стали определять экспериментально. Например, для роста на этаноле получено уравнение:



Работы по элементному балансу микробного роста показали, что законы сохранения вещества определяют связи между потреблением веществ в метаболизме и продуктами роста. Однако в них не была раскрыта связь между элементным составом и биологически доступной энергией веществ – участников процесса роста. Эта связь вытекает из самого определения величины выхода как отношения удельной скорости роста к удельной скорости потребления субстрата.

Другой важный аспект такой зависимости, отражающей глубокие физиологические и биоэнергетические свойства метаболизма клеток, заключается в распределении потребленного субстрата на две части (используемые на рост их биомассы и поддержание существующей биомассы). Общая масса потребленного субстрата как источника энергии для роста, разделяется на два слагаемых:

$$\Delta S = \Delta S_g + \Delta S_m, \quad (8)$$

где индексы g и m означают, соответственно, рост и поддержание. Деление обеих частей на прирост биомассы ΔX с учетом, что:

$$\Delta X = \mu X \Delta t \quad (9)$$

позволило получить:

$$1/Y_{X/S} = 1/Y_{X/S}^G + m_S/\mu, \quad (10)$$

где $Y_{X/S}^G = \Delta X/\Delta S_g$ – выход роста биомассы из субстрата; $m_S = \Delta S_m/\Delta t$ – удельная скорость затрат субстрата на поддержание клеток, г субстрата на г существующей биомассы в час, т.е. ч^{-1} . Умножение на удельную скорость роста μ дает:

$$q_S = \mu/Y_{X/S}^G + m_S. \quad (11)$$

Аналогично, для кислорода как субстрата:

$$q_S = \mu/Y_{X/O}^G + m_O, \quad 1/Y_{X/O} = 1/Y_{X/O}^G + m_O/\mu.$$

и выхода биомассы из образованной АТР:

$$1/Y_{X/ATP} = 1/Y_{X/ATP}^G + m_{ATP}/\mu.$$

Величина $m_{\text{АТР}}$ более близка к клеточной биоэнергетике, чем m_S и m_O , поскольку характеризует скорость затрат переносчика энергии (АТР) на поддержание клеток.

Существующие затраты на поддержание клеток пропорциональны удельной скорости роста:

$$m_S = m_{S0} + m_{S1}\mu.$$

Это говорит о природе и о регуляции процессов круговорота вещества в живой клетке. Подстановка (11) в (7) и (8) дает следующий вид этих соотношений:

$$1/Y_{X/S} = 1/Y_{X/S}^m + m_{S0}/\mu; \quad q_S = \mu / Y_{X/S}^m + m_{S0}; \quad 1/Y_{X/S}^G = 1/Y_{X/S}^G + m_{S1}, \quad (12)$$

где $Y_m^{X/S}$ – «максимальный» выход биомассы, достигаемый при удельной скорости роста много большей, чем m_{S0} .

Параметры $Y_{X/S}^m$ и m_{S0} определяются по результатам экспериментов. Проводят серию стационарных режимов непрерывного роста культуры при разных значениях μ . Получаемая линейная зависимость $1/Y_{X/S}(1/\mu)$ или $q_S(\mu)$ обрабатывается с использованием (12), что позволяет найти $Y_{X/S}^m$ и m_{S0} .

Выделение затрат того или иного субстрата на поддержание клеток, расчет μ – зависимой компоненты этих затрат и разработка вышеприведенных выражений, описывающих влияние скорости роста на выход биомассы и скорость потребления этого же субстрата, явились важным продвижением в области баланса и кинетики роста клеточных популяций. Однако представленные выражения не описывают полный материальный баланс роста популяции. Связь величин m_S и m_O с энергией количественно не подтверждена (затраты энергии субстрата на поддержание клеток), но не выражена явно. Таковую связь отражает величина $m_{\text{АТР}}$. Но ни одна из величин $Y_{X/S}^m$, $Y_{X/S}^G$, $Y_{X/\text{АТР}}^G$ не выражена через энергосодержание субстрата. Рост популяций микроорганизмов имеет два количественных аспекта, тесно связанных между собой – стехиометрический и кинетический. Кинетика есть совокупность закономерностей, определяющих зависимость скоростей метаболических процессов от свойств самого объекта и факторов внешней среды, влияющих на него. Стехиометрические закономерности определяют соотношение между этими скоростями. Входящие в метаболизм клеток потоки перераспределяются, вещество органического субстрата попадает не только в биомассу, но и в продукты метаболизма, энергия субстрата не только включается в биомассу, но и рассеивается в виде тепла. В случае двух химических реакций, использующих один и тот же субстрат, отношение расходящихся потоков не представляет интереса, так как легко находится, если известны зависимости обеих скоростей от условий среды. В метаболизме имеет место иная картина. Чисто линейные участки в нем практически не встречаются, он представляет собой большую сеть из переплетающихся реакций, связанных стехиометрическими и регуляторными кинетическими связями.

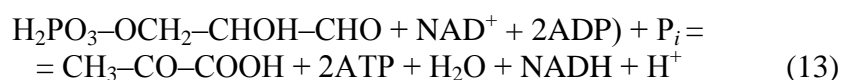
Эксперименты по культивированию микроорганизмов указывают на то, что какой-то из больших метаболических потоков, например от органического субстрата в биомассу, может быть ведущим, а остальные привязаны к нему и через него зависят от внешней среды. Важным фактором, определяющим соотношение скоростей входящих и выходящих потоков, являются связи и ограничения, определяемые законом сохранения вещества и законами термодинамики. Они образуют жесткие физико-химические рамки, внутри которых действует кинетика и которые в значительной степени ответственны за определенность свойств биологического объекта. Задача заключается в выявлении физико-химических основ стехиометрии роста микробных популяций и макси-

мальном использовании этих закономерностей в исследованиях эффективности и скорости роста микроорганизмов на различных источниках вещества и энергии в различных условиях.

4.3. Баланс вещества и энергии при росте популяций микроорганизмов

Исследование баланса вещества и энергии, при росте популяций микроорганизмов, включает в себя следующие аспекты: количественные соотношения между различными стехиометрическими коэффициентами, описывающими распределение потоков вещества в метаболизме; взаимосвязь балансов вещества и энергии при росте микробных популяций; механизмы влияния среды и характеристик клеточного метаболизма на эффективность и скорость роста; максимальная достижимая эффективность роста популяций на различных субстратах; использование найденных закономерностей в исследовательской и технологической практике.

Распространенная форма записи стехиометрии химической реакции и их множества такова, что субстраты (расходуемые вещества) стоят в левой части уравнения, а продукты (образуемые вещества) в правой. Например, реакция превращения 3-фосфоглицеринового альдегида в пировиноградную кислоту, состоящая из ряда стадий, имеет вид:



В общем виде стехиометрическое уравнение можно записать как:

$$\sum_{i=1}^I v_i S_i = \sum_{j=1}^J v_j^p P_j \quad (14)$$

Здесь $1 < i < I$ и $1 < j < J$ – отдельная нумерация для субстратов S_i и продуктов P_j , а соответствующие стехиометрические коэффициенты v_i s (для субстратов) и v_j^p (для продуктов) все положительны.

Такая форма записи обладает громоздкостью, которая видна при исследовании множеств химических реакций. Одно и то же вещество может тогда быть субстратом в части реакций и продуктом в других. Чтобы избежать излишней сложности, все участники реакции переносятся в левую часть уравнения, нумеруются одной общей нумерацией, а коэффициенты считаются отрицательными для субстратов (это символизирует их убыль) и положительными для продуктов. Тогда обобщенное стехиометрическое уравнение химической реакции имеет вид:

$$v_1 S_1 + v_2 S_2 + \dots + v_k S_k = 0 \quad (15)$$

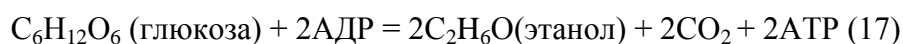
или, в более компактной форме:

$$\sum_k^K v_k S_k = 0 \quad (16)$$

где k – номер реагента (субстрата или продукта); S_k – символическое обозначение k -го реагента; v_k – стехиометрические коэффициенты; K – общее число реагентов.

Стехиометрические коэффициенты любой реакции связаны между собой законом сохранения вещества, который соблюдается для каждого химического элемента, входящего в состав реагентов. Еще одну связь добавляет закон сохранения электрического заряда, если в реакции участвуют ионы.

Стехиометрические уравнения могут относиться и к совокупности реакций. Превращение глюкозы в фруктозо-1,6-дифосфат происходит без изменения числа атомов углерода в молекуле. Затем происходит расщепление на два трехуглеродных фрагмента, и поэтому число молекул, превращающихся из 3-фосфоглицеральдегида в пируват, а затем в этанол, вдвое больше, чем число прореагировавших молекул глюкозы. Учитывая последнее обстоятельство, сложение стехиометрических уравнений всех реакций дает итоговое уравнение так называемой брутто-реакции:



При этом предполагается, что движение вещества по всему пути происходит жестко – сколько молекул, например, фруктозо-1,6-дифосфата образовалось, столько же и употребилось в следующей реакции, и не происходит ни накопления, ни истощения пула каждого интермедиата (промежуточного метаболита). В действительности же в любом метаболическом пути все пулы «дышат», концентрации интермедиатов испытывают колебания, либо периодические, либо случайные, либо то и другое одновременно. Поэтому стехиометрия, описываемая брутто-уравнением типа (7.17), справедлива, если рассматриваются количества вещества, прошедшие по данному пути за достаточно большое время, например, значительно превышающее период колебаний интермедиатов. Тогда, поскольку концентрации интермедиатов ограничены, количество вещества, прошедшее через весь метаболический путь, значительно превышает количество вещества, остающееся в промежуточных соединениях.

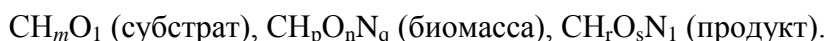
Вышесказанное позволяет рассматривать рост биомассы и образование продуктов метаболизма как большую брутто-реакцию. Ее балансирование по химическим элементам и, если нужно, по электрическому заряду, дает возможность найти связи между различными стехиометрическими коэффициентами при росте клеточных популяций. Этот подход явился стартовой позицией для разработки новых принципов и расчетных методов материально-энергетического баланса роста клеточных популяций. Задача баланса сводилась к следующему. Имеется несколько величин, характеризующих эффективность роста микроорганизмов. В простейшем случае аэробного роста, когда образование органических продуктов незначительно или вообще отсутствует, это два коэффициента – $Y_{X/S}$ – выход биомассы из органического субстрата, водорода и т.д. и $Y_{X/O}$ – выход биомассы из потребленного кислорода.

4.4. Массопередача кислорода от воздуха к клеткам

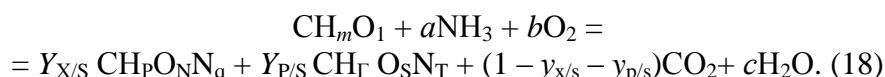
Субстрат является источником вещества и энергии для роста, а кислород связан с процессом извлечения клетками энергии из субстрата для использования в метаболизме при преобразовании субстрата в биомассу. Поэтому каждый из двух выходов представляет интерес. Возникает вопрос о взаимосвязи этих величин. При наличии такой связи можно ограничиться изучением одной из них, а именно, той, которую легче измерять, а другую при необходимости вычислять из первой.

В связи с этим интересен элементный баланс для весьма распространенного в природе и биотехнологии процесса – гетеротрофного аэробного роста микроорганизмов, когда в качестве источника азота используется аммиак. Этот случай интересен также потому, что азот в NH_3 находится в том же электронном состоянии, в котором находится почти весь азот биомассы.

Элементный состав сухого вещества биомассы, состав органического субстрата и возможного органического продукта в общем виде записывается следующим образом:



Углерод органического субстрата расходуется в трех направлениях – в биомассу, в органический продукт (если он образуется) и в CO_2 . Выходы (по углероду) биомассы и продукта – $y_{x/s}$ и $y_{p/s}$. Каждая из этих величин есть доля углерода субстрата, включенная в вещество биомассы и продукта. Тогда процесс преобразования вещества субстратов при росте культуры с позиции перераспределения атомов химических элементов записывается в следующем виде:



Значения $y_{x/s}$ и $y_{p/s}$ не фиксированы. В зависимости от микроорганизма и условий культивирования они могут меняться в пределах от нуля до некоторого максимума.

В уравнении (18) присутствуют пять коэффициентов: $a, b, c, y_{x/s}, y_{p/s}$.

Имеются четыре условия сохранения числа атомов химических элементов С, Н, О, N, из которых условие для углерода уже учтено. Остальные условия дают выражение a, b, c через S и $y_{p/s}$:

$$a = Y_{P/S} q + Y_{P/S} t; \quad (19)$$

$$b = 1/4 (\gamma_S - Y_{P/S} \gamma_B - Y_{P/S} \gamma_P); \quad (20)$$

$$c = m/2 + \gamma_{X/S} (3q - p)/2 + \gamma_{P/S}(3t - r)/2; \quad (21)$$

$$\gamma_S = 4 + m - 21; \quad (22)$$

$$\gamma_B = 4 + p - 2n - 3q; \quad (23)$$

$$\gamma_P = 4 + r - 2s - 3t. \quad (24)$$

Величины $\gamma_s, \gamma_b, \gamma_p$ играют важную роль в материально-энергетическом балансе микроорганизмов и живой материи. Они являются мерой восстановленности углерода, соответственно, органического субстрата, биомассы и органического продукта. Это можно видеть из правых частей уравнений (22)–(24), учитывают число атомов С, Н, О, N в составе каждого вещества: 4 – число электронов внешней оболочки атома углерода, каждый атом водорода добавляет по одному электрону, а кислород и азот (выступающий как окислитель в NH_3) отнимают от этих электронов, соответственно, по 2 и 3.

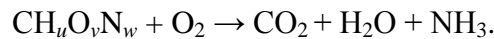
Эти величины послужили отправным пунктом дальнейшего развития исследований, приведших к разработке метода материально-энергетического баланса. Величины a, b и c описывают расход аммиака и кислорода и образование метаболической воды при росте культуры. Чтобы найти их численные значения, необходимо задать выходы биомассы и продукта по углероду $y_{x/s}$ и $y_{p/s}$, а также $\gamma_s, \gamma_b, \gamma_p$. Значения $y_{x/s}$ и $y_{p/s}$ зависят от вида клеток и от условий культивирования.

Для часто встречающегося случая, когда образование органических продуктов отсутствует или незначительно, $y_{p/s} = 0$. Поскольку молекулярная масса кислорода равна 32, а сухая масса клеток в правой части (18) равна $12y_{x/s}/\sigma_B$ (σ_B – доля углерода в сухом веществе клеток), то расход кислорода на единицу образованной биомассы равен:

$$1/Y_{X/O} = 2\sigma_B/3 ((\gamma_s / y_{x/s}) - \gamma_B) \quad (25)$$

Из анализа уравнения (25) для каждого значения γ_s имеется $y_{x/s}$ такое, при котором расход кислорода становится равным нулю, а при более высоких $y_{x/s}$ делается отрицательным. Однако это означало бы, что при каких-то режимах гетеротрофного роста кислород мог бы выделяться, как при фотосинтезе. Поскольку такие процессы неизвестны, это предположение выглядит неправдоподобным. Очевидно, что строгое решение вопроса о максимально допустимом значении выхода по углероду требует совместного рассмотрения баланса вещества и баланса энергии.

В связи с этим степень восстановленности является величиной, которая несет в себе связь балансов вещества и энергии. Чтобы понять ее смысл, рассматривается уравнение окисления органического вещества кислородом:



Здесь $CH_uO_vN_w$ может быть индивидуальным органическим соединением либо их смесью, в том числе биомассой клеток. После сбалансирования это уравнение имеет вид:

$$CH_uO_vN_w + \gamma \cdot O_2 = CO_2 + (u - 3w)H_2O + wNH_3, \quad (26)$$

$$\gamma = 4 + u - 2v - 3w,$$

где γ – выражение, идентичное γ_s , γ_B , γ_p . Если окисление происходит чисто химическим путем, то весь запас энергии органического вещества превращается в тепло. При биохимическом окислении с участием электронтранспортных путей часть энергии сохраняется в промежуточных носителях, а затем используется клеткой. Таким образом, процесс (26) является способом оценки общего количества биологически доступной энергии, заключенной в органических веществах.

Поскольку, согласно (26), количество потребленного кислорода пропорционально γ , а выделившаяся энергия пропорциональна кислороду (с приблизительно постоянным коэффициентом), то γ оценивает запас энергии вещества $CH_uO_vN_w$ в расчете на один грамм-атом его углерода.

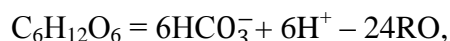
Наиболее полное использование энергии субстрата имеет место при участии электронтранспортной цепи с кислородом как терминальным акцептором. Каждая молекула O_2 имеет 4 вакантных места для присоединения электронов других атомов и образования CO_2 и H_2O . Тогда $1/4O_2$ есть количество свободного кислорода, пересчитанное на одно такое вакантное место, т.е. на один электрон, присоединяемый свободным кислородом. Схема (26) не рассматривает детали процесса преобразования энергии в электронтранспортных цепях, она предназначена лишь для оценки энергетического запаса субстрата окисления и отражает формальный подход.

В связи с этим введена система отсчета термодинамических потенциалов. Нулевые значения энтальпии и свободной энергии образования прописаны в ней следующим базисным веществам: H^+ , HCO_3^- , H_2O , NH_4^+ , $H_2PO_4^-$, H_2S , Fe^{3+} и другие ионы металлов и

галогенов. Все эти вещества взяты в водном стандартном состоянии. Таким образом, вышеперечисленные вещества являются естественным энергетическим нулем клеточного метаболизма, который достигается при биологическом окислении органических веществ. Для того, чтобы физиологический базис был полным, в него введен свободный кислород. Тогда реакция образования любого соединения выглядит как сложение вышеупомянутых базисных веществ со стехиометрическими коэффициентами, а затем вычитание из полученного результата соответствующего количества O_2 . Например, глюкоза:



С позиции векторного формализма знак «-» перед членом линейной комбинации означает присутствие отрицательного слагаемого. С физико-химической точки зрения вычитание кислорода означает восстановление базисных веществ, т.е. придание нового свойства. Поэтому для придания этому подходу логической завершенности заменено вычитание кислорода вложением специфического базисного вещества – $1/4O_2$, названного «редоксон». Указанный коэффициент служит для пересчета количества кислорода на один электрон, акцептируемый O_2 в процессе, обратном реакции образования химического соединения в физиологическом базисе (при окислении его свободным кислородом до веществ физиологического базиса – HCO_3^- , H_2O , NH_4^+ , $H_2PO_4^-$ – и т.д.). Тогда реакция образования, например, глюкозы в физиологическом базисе имеет вид:



где понятие физиологический базис – это альтернативная система отсчета для элементного состава химических соединений.

Задание числа редоксонов определяет с абсолютной точностью количество вещества в виде $M = Mmol\ NRO/\alpha RO$; $M = (12/\sigma\gamma)\ NRO$, где M – масса данного количества вещества; NRO – число редоксонов; αRO и γ – восстановленность вещества (число RO на молекулу и на один атом углерода).

Вопросы для самоконтроля

1. На чем основаны работы по составлению материального баланса роста популяций клеток?
2. Можно ли экспериментальным путем определять состав биомассы и стехиометрические коэффициенты?
3. Каким законом химии связаны стехиометрические коэффициенты любой реакции?
4. Каким образом осуществляется массопередача кислорода воздуха клеткам?

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная литература

1. Биотехнология: теория и практика / Н.В. Загоскина и др. ; под ред. Н.В. Загоскиной, Л.В. Назаренко. – М.: «Оникс», 2009. – 496 с. – ISBN 978-5-488-02173
2. Клунова, С.М. Биотехнология: учебник / С.М. Клунова, Т.А. Егорова, Е.А. Живухина. – М.: Академия, 2010. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-6697-4

3. Сазыкин, Ю.О. Биотехнология / Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева; под ред. А.В. Катлинского. - М.: Академия, 2008. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-5506-0
4. Тарантул, В.З. Толковый биотехнологический словарь русско-английский: справочное издание [Электронный ресурс] / В.З. Тарантул. – М.: Языки славянских культур, 2009. – 936 с. – ISBN: 978-5-95-51-0342-6 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks.

Дополнительная литература

1. Биотехнология. Биобезопасность. Биоэтика / А.П. Ермишин и др.; под ред. А.П. Ермишина. – Минск: «Тэхнолoгія», 2005. – 430 с.
2. Биотехнология: учебное пособие для вузов, в 8 кн., под ред. Егорова Н.С., Самуилова В.Д. – М., 1987.
3. Бирюков, В.В. Основы промышленной биотехнологии / В.В. Бирюков. – М.: КолосС, 2004. – 296 с. – ISBN 5-9532-0231-8 («КолосС»); ISBN 5-98109-008-1 (АНО «Химия»)
9. Блинов, В.А. Общая биотехнология: курс лекций. В 2-х частях. Ч. 1 / В.А. Блинов. – Саратов, 2003.
10. Блинов, В.А. Общая биотехнология: Курс лекций. В 2-х частях. Ч. 2. – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский СГАУ», 2004. – 144 с. – ISBN 5-7011-0436-2

ЛЕКЦИЯ 5

Массообменные характеристики ферментационного оборудования

5.1. Экспериментальные данные тепломассообмена при культивировании микроорганизмов

Одним из значимых параметров процесса ферментации является тепловыделение, которое образуется в результате биологического окисления субстрата (*термогенеза*) и функционирования перемешивающих устройств биореактора. Тепловыделение в расчете на один RO потребленного кислорода составляет 103,7 кДж/экв. RO. Удельное количество теплоты, выделяющееся при жизнедеятельности микроорганизмов изменяется от 1,1 до 8,3 кВт/м³ при культивировании продуцентов ферментов, а при культивировании продуцентов антибиотиков достигает 15 кВт/м³. Тепловой эффект при выращивании кормовых дрожжей составляет (10–13)·103 кДж/кг.

При периодическом культивировании в ходе стадийного развития культуры наблюдается существенное изменение величины тепловыделения микроорганизмами. Так, при концентрации бактерий *Ralstonia eutropha* количество выделяемого тепла составило 2 000–24 000 кДж/(кг·ч).

5.2. Потребление микробной культуры газового субстрата

Потребности культуры микроорганизмов в кислороде при росте на углеродосодержащем субстрате представляют в виде эмпирической зависимости $G_{O_2} = A/Y - B$, где G_{O_2} – количество потребляемого кислорода, кг O₂/кг АСД; А – количество кислорода, необходимое на окисление 1 кг субстрата до CO₂ и H₂O (и NH₃, если в субстрате содержится азот); В – количество кислорода, идущее на окисление 1 кг сухой биомассы до CO₂, H₂O и NH₃; Y – экономический коэффициент.

При использовании в качестве субстрата глюкозы (А = 1,067 кг O₂/кг глюкозы, В = 1,334 кг O₂/кг АСД, Y = 0,5).

Максимальное значение экономического коэффициента для дрожжей по кислороду, когда в качестве источника углерода используется глюкоза, составляет 3,39 г сухой биомассы на 1 г кислорода, т.е. минимальная величина $G_{O_2} = 0,3$ кгO₂/кг биомассы. В промышленной практике выращивания дрожжей рода *Candida* на гидролизатах древесины потребность в кислороде лежит в пределах от 0,6 до 0,8 кг O₂/кг АСД при значениях экономического коэффициента 0,45–0,55.

Расходный коэффициент по кислороду зависит, как указывалось выше, от ряда других факторов, в том числе от физиологической активности популяции микроорганизмов. Например, экономический коэффициент культуры у бактерий *Ralstonia eutropha*, растущих на водороде в качестве энергетического субстрата и на полной питательной среде, составляет: по H₂ – 1,5 кг АСБ/кг; O₂ – 0,34; CO₂ – 0,48. При лимитировании роста бактерий каким-либо элементом субстрата этот показатель существенно снижается, соответственно, до 0,9; 0,2; 0,4. Удельная скорость дыхания дрожжевых организмов при их выращивании на растительных гидролизатах составляет $q = 0,11–0,33$ кг O₂/(кг·ч), удельная скорость потребления компонентов газовой смеси, лимитированной, например по азоту, культуры *Ralstonia eutropha* составляет на начальных этапах развития для водорода 0,036–0,04 кг/(кг·ч), кислорода – 0,17–0,18, диоксида углерода – 0,11–0,14; по мере старения культуры и перехода в стационарную фазу роста скорость

потребления компонентов газа газового субстрата существенно снижается. Скорость потребления газового субстрата культурой может быть постоянна только в условиях непрерывного выращивания, когда процесс является установившимся, и микроорганизмы находятся в определенной фазе роста.

Зависимости потребления кислорода от экономического коэффициента и скорости дыхания дрожжей от концентрации O_2 представлены на рис. При низких концентрациях кислорода в среде и его недостатке для культуры нарушаются энергетические процессы в клетке, происходит переключение путей обмена веществ, и это явление сопровождается увеличением количества кислорода, необходимого для построения единицы биомассы. Последнее происходит в том случае, если концентрация кислорода оказывается ниже определенного порогового значения.

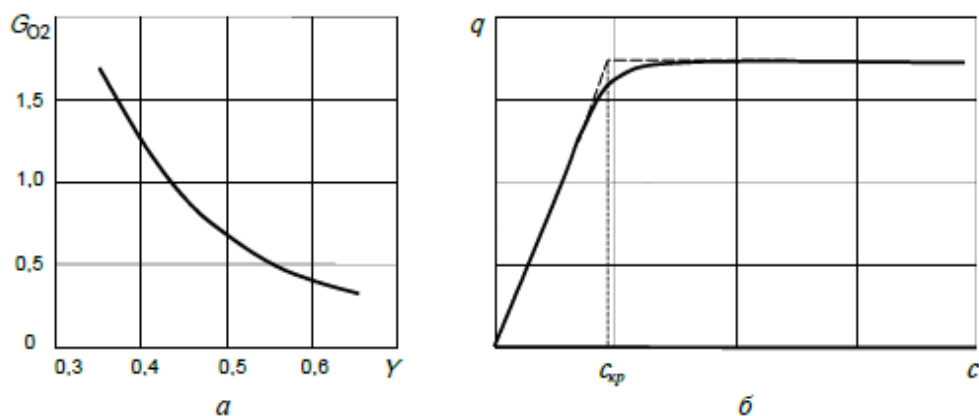


Рис. 7.6. Потребность в кислороде от экономического коэффициента при выращивании дрожжей на глюкозе (а) и влияние концентрации растворенного кислорода на скорость дыхания микроорганизмов (б) (материал Н.А. Войнова)

Критическая концентрация растворенного кислорода при росте дрожжей находится в диапазоне $(2-4) \cdot 10^{-4}$ кг/м³. При окислении глюкозы дрожжами *Candida tropicalis* и *Candida lipolytica* при аэрации среды атмосферным воздухом заметное уменьшение интенсивности дыхания клеток начинается при снижении концентрации растворенного кислорода до 4–6 % от концентрации насыщения. Граница физиологического действия парциального давления кислорода для бактериальной культуры *Ralstonia eutropha* также лежит в узком диапазоне 2–5 мг/л.

5.3. Растворимость газов

Влияние компонентов питательной среды на растворимость газов различно. При концентрации сахара в растворе 2,5 % растворимость кислорода понижается на 5 %. В сложной питательной среде добавление небольшого количества подсолнечного масла, используемого в качестве пеногасителя, приводит к значительному увеличению растворимости кислорода, что обуславливается возникновением зон повышенной концентрации кислорода вокруг частиц масла. Внесение в водную среду спиртов, кетонов, эфира может существенно повышать скорость растворения кислорода. Кроме того, растворимость газа уменьшается с увеличением вязкости среды. Основными факторами, влияющими на растворимость газа, являются его парциальное давление в газовой фазе и температура в соответствии с законом Генри: $x_m = P/E$, где x_m – мольная доля газовой-

го компонента в жидкости; P – парциальное давление, мм рт. ст.; E – константа Генри, мм рт. ст.

Транспорт кислорода к поверхности клетки разделяют на несколько стадий: массопередача из газовой фазы в жидкую, перемещение растворенного кислорода в жидкой фазе (конвективная и молекулярная диффузия), массопередача кислорода из жидкой фазы к поверхности клетки. Каждая стадия характеризуется сопротивлением массопередаче. В процессе выращивания, когда клеточные агломераты не образуются, микроорганизмы, как правило, находятся в жидкости в виде отдельных взвешенных особей. В этом случае ввиду низкой растворимости кислорода в жидкости наибольшее практическое значение имеет межфазный переход «газ – жидкость». При этом общий коэффициент массопередачи обычно определяется массоотдачей газа в жидкой фазе.

Изменение концентрации растворенного газа в среде определяется уравнением баланса скоростей потребления газа клетками и поступления его из газовой фазы:

$$dc/d\tau = \beta a(c^* - c) - qx,$$

где a – удельная межфазная поверхность, m^2/m^3 ; q – удельная скорость потребления газа биомассой, $kg\ O_2/(kg \cdot ч)$; x – концентрация биомассы, kg/m^3 ; β – коэффициент массоотдачи, $m/ч$. В стационарном состоянии $dc/d\tau = 0$, и тогда $\beta a(c^* - c) = qx$.

При равенстве количества газа, поступающего из газовой фазы в жидкость и потребляемого микроорганизмами, $c = c^* - qx/(\beta a)$, что позволяет оценить изменение концентрации растворенного кислорода по численности популяции при постоянных условиях аэрации.

Потребление газового компонента клетками увеличивает движущую силу процесса ($c^* - c$), а следовательно, и скорость переноса кислорода в жидкость.

5.4. Способы определения коэффициента массоотдачи

Используют четыре наиболее приемлемых метода определения скорости поглощения газового субстрата (например, кислорода): динамический; сульфитный; прямое измерение и теоретический расчет, учитывающий рост биомассы.

Динамический метод осуществляется в периодической ферментации путем измерения скорости снижения концентрации газа в жидкости после прекращения аэрации и построения линейной зависимости величины концентрации от времени. Угол наклона построенной зависимости и определяет обратную величину объемного коэффициента массоотдачи – $1/\beta V$.

Сульфитный метод заключается в том, что в присутствии 10^{-3} молей Co^{2+} или Cu^{2+} сульфит натрия окисляет растворенный кислород. Сульфит определяется путем добавки раствора йода. Однако метод не дает представления о динамике обеспечения жидкости кислородом, а характеризует только условия аэрации.

Прямое определение скорости переноса газа дает наиболее точные результаты, но требует точных аналитических приборов. Расчет объемных значений коэффициента массоотдачи при физической абсорбции обычно определяется по опытным данным, полученным при насыщении дистиллированной воды кислородом из воздуха по уравнению:

$$\beta V = \ln [(1 - c/c^*)/A]/\tau,$$

где c – концентрация растворенного кислорода в жидкости, кг/м^3 ; c^* – равновесная концентрация кислорода в жидкости, кг/м^3 ; A – коэффициент, определяемый из начальных условий; τ – время насыщения, с; βV – объемный коэффициент массоотдачи, с^{-1} .

Величина коэффициента A определяется из начальных условий ($c = c_n$):

$$A = 1 - c_n/c^*/(e^{-\beta\tau}),$$

где c_n – начальная концентрация растворенного кислорода в жидкости, кг/м^3 .

При приготовлении рабочей смеси жидкость обескислороживается путем пропускания через нее азота либо за счет создания в аппарате вакуума с последующей дегазацией.

5.5. Характеристика газожидкостных биореакторов

Несмотря на многообразие конструкций биореакторов, все они должны удовлетворять основным требованиям для поддержания эффективного процесса культивирования клеток, обеспечивая:

- подвод к каждой клетке в достаточном количестве всех питательных веществ;
- отвод от каждой клетки продуктов метаболизма; термостатирование микробной суспензии в каждой точке;
- поддержание оптимальных рабочих параметров; требуемый уровень аэрирования, перемешивания;
- высокий уровень автоматизации процесса культивирования, техники безопасности и условий труда операторов.

Для выполнения этих требований каждый ферментер должен быть снабжен следующими системами: подачи жидкостных (или сыпучих) потоков в аппарат; ввода и вывода газовых потоков; аэрирования ферментационной среды; перемешивания ферментационной среды; пеногашения; термостатирования; стерилизации ферментера и ферментационной среды; вывода потоков из аппарата; контроля и регулирования заданных параметров процесса.

Вопросы для самоконтроля

1. Что представляет собой тепловыделение при ферментации?
2. От каких факторов зависит величина расходного коэффициента по кислороду?
3. Влияние компонентов питательной среды на растворимость газов в ферментере?
4. Способы определения коэффициента массоотдачи.
5. Основные требования, предъявляемые к современным ферментаторам.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная литература

1. Биотехнология: теория и практика / Н.В. Загоскина и др. ; под ред. Н.В. Загоскиной, Л.В. Назаренко. – М.: «Оникс», 2009. – 496 с. – ISBN 978-5-488-02173
2. Клунова, С.М. Биотехнология: учебник / С.М. Клунова, Т.А. Егорова, Е.А. Живухина. – М.: Академия, 2010. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-6697-4
3. Сазыкин, Ю.О. Биотехнология / Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева; под ред. А.В. Катлинского. - М.: Академия, 2008. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-5506-0

4. Тарантул, В.З. Толковый биотехнологический словарь русско-английский: справочное издание [Электронный ресурс] / В.З. Тарантул. – М.: Языки славянских культур, 2009. – 936 с. – ISBN: 978-5-95-51-0342-6 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks.

Дополнительная литература

1. Биотехнология. Биобезопасность. Биоэтика / А.П. Ермишин и др.; под ред. А.П. Ермишина. – Минск: «Тэхнолoгiя», 2005. – 430 с.

2. Биотехнология: учебное пособие для вузов, в 8 кн., под ред. Егорова Н.С., Самуилова В.Д. – М., 1987.

3. Бирюков, В.В. Основы промышленной биотехнологии / В.В. Бирюков. – М.: КолосС, 2004. – 296 с. – ISBN 5-9532-0231-8 («КолосС»); ISBN 5-98109-008-1 (АНО «Химия»)

4. Блинов, В.А. Общая биотехнология: курс лекций. В 2-х частях. Ч. 1 / В.А. Блинов. – Саратов, 2003.

5. Блинов, В.А. Общая биотехнология: Курс лекций. В 2-х частях. Ч. 2. – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский СГАУ», 2004. – 144 с. – ISBN 5-7011-0436-2

ЛЕКЦИЯ 6

Типы биореакторов

6.1. Классификация биореакторов в зависимости от способа перемешивания

В зависимости от способа перемешивания биореакторы подразделяют на три основные группы:

- 1) реакторы с механическим перемешиванием;
- 2) барботажные колонны, через которые для перемешивания содержимого пропускают воздух;
- 3) эрлифтные реакторы с внутренней или внешней циркуляцией; Перемешивание и циркуляция культуральной среды в них обеспечивается потоком воздуха, за счет которого между верхним и нижним слоями культуральной среды возникает градиент плотности.

Биореакторы первого типа используют чаще всего, так как они позволяют легко изменять технологические условия и эффективно доставлять к растущим клеткам воздух, определяющий характер развития микроорганизмов и их биосинтетическую активность. В таких реакторах воздух подают в культуральную среду под давлением через разбрызгиватель - кольцо с множеством маленьких отверстий. При этом образуются мелкие пузырьки воздуха и, за счет механического перемешивания, обеспечивается их равномерное распределение. Для этой же цели используют мешалки — одну или несколько.

Мешалки, разбивая крупные пузырьки воздуха, разносят их по всему реактору и увеличивают время пребывания в культуральной среде. Эффективность распределения воздуха зависит от типа мешалки, числа оборотов, физико-химических свойств среды.

При интенсивном перемешивании культуральной среды происходит ее вспенивание, поэтому рабочий объем биореактора не превышает 70% общего объема. Свободное пространство над поверхностью раствора используется как буферное, где накапливается пена, и таким образом предотвращается потеря культуральной жидкости. В пенящейся жидкости условия аэрации лучше, чем в плотных растворах (при условии непрерывного перемешивания и циркуляции слоя пены, т.е. при исключении нахождения микроорганизмов вне культуральной жидкости). Вместе с тем вспенивание может привести к переувлажнению фильтров в отверстиях, через которые воздух выходит из биореактора, уменьшению потока воздуха и к попаданию в ферментер посторонних микроорганизмов.

Конструктивные особенности барботажных колонн и эрлифтных биореакторов дают этим типам ферментеров некоторые преимущества перед реакторами с механическим перемешиванием. Барботажные колонны более экономичны, так как перемешивание в них происходит восходящими потоками воздуха равномерно по всему объему. Отсутствие механической мешалки исключает один из путей проникновения в биореактор посторонних микроорганизмов. В барботажных биореакторах не возникает сильных гидродинамических возмущений (сдвигов слоев жидкости культуральной среды относительно друг друга).

В барботажных колоннах воздух подают под высоким давлением в нижнюю часть биореактора; по мере подъема мелкие пузырьки воздуха объединяются, что влечет неравномерное его распределение. Кроме того, подача воздуха под высоким давлением приводит к сильному пенообразованию.

В эрлифтных биореакторах воздух подают в нижнюю часть вертикального канала. Поднимаясь, воздух увлекает за собой жидкость к верхней части канала, где расположен газожидкостный сепаратор (здесь частично выходит воздух). Более плотная деаэрированная жидкость опускается по другому вертикальному каналу ко дну реактора и процесс повторяется. Таким образом, в эрлифтном биореакторе культуральная среда вместе с клетками непрерывно циркулирует в биореакторе.

Эрлифтные биореакторы более эффективны, чем барботажные колонны, особенно в суспензиях микроорганизмов с большей плотностью или вязкостью. Перемешивание в эрлифтных ферментерах более интенсивно и вероятность слипания пузырьков минимальна.

6.2. Классификация биореакторов в зависимости от способа подачи воздуха и периодичности действия

Все конструкции ферментаторов (ферментеров) подразделяют на две большие группы: без подводки стерильного воздуха (для энаэробов) и с подводкой его (для аэробов). Аэрируемые реакторы могут быть оснащены мешалками, но могут быть и без них. Кроме того, различают ферментаторы периодические и непрерывно действующие.

Ферментаторы периодического действия применяют с 1944 года в промышленности для получения антибиотиков, витаминов и других биологически активных веществ. Конструкция таких ферментаторов обеспечивает стерильность ферментации в течение длительного времени (в течении нескольких суток) при оптимальных условиях для роста и жизнедеятельности продуцента.

Ферментаторы непрерывно действующие в установленном режиме способны работать длительное время без остановки.

Общая продуктивность процесса (P_{ap}) в биореакторе определяется количеством целевого продукта в ЕД активности или кг, получаемого с 1 м^3 ферментационной емкости в час. Расчет ведут по формулам, отдельно – для периодического и непрерывного:

Периодический процесс	Непрерывный процесс
$P_{ap} = \frac{V_{cf} A_{cf} 10^6}{V_f \tau} \left[\frac{\text{ЕД}}{\text{м}^3 \cdot \text{час}} \right]$	$P_{ap} = \frac{W_{cf} A_{cf} 10^6}{V_f} \left[\frac{\text{ЕД}}{\text{м}^3 \cdot \text{час}} \right]$
$P_{ap} = \frac{V_{cf} C}{V_f \tau} \left[\frac{\text{ЕД}}{\text{м}^3 \cdot \text{час}} \right]$	$P_{ap} = \frac{W_{cf} A}{V_f} \left[\frac{\text{ЕД}}{\text{м}^3 \cdot \text{час}} \right]$

где V_{cf} – объем культуральной жидкости за весь период ферментации; A_{cf} (АД/мл) – активность культуральной жидкости; C (кг/м³) – концентрация целевого продукта в культуральной жидкости; W_{cf} (м³/час) – скорость слива культуральной жидкости из реактора; V_f (м³) – вместимость ферментера, τ – время цикла работы ферментера.

Общую продуктивность для непрерывных процессов определяют в установившемся режиме, а для периодических процессов и полунепрерывных – с учетом времени на подготовку ферментатора к работе.

6.3. Некоторые особенности культивирования биообъектов

При периодическом культивировании целесообразно создать искусственно такое установившееся состояние, при котором концентрация клеток, удельная скорость роста и окружающая клетки среда не изменялись бы со временем. Такие условия возможны

при непрерывном культивировании, когда клетки продуцента размножаются со скоростью, зависящей от притока питательных веществ и некоторых других условий. Часть объема культуральной жидкости постоянно вытекает с такой же скоростью, с какой подается среда в аппарат. Метод проточного культивирования может быть организован как процесс *полного вытеснения* и как процесс *полного смешивания*. Осуществление первого возможно для культивирования анаэробных микроорганизмов в ферментаторе, представляющем собой трубу, в которую с одного конца непрерывно подают питательную среду и посевной материал, а из другого конца отбирают культуральную жидкость. Процесс происходит без перемешивания и аэрации. Когда среда и посевной материал попадают в ферментатор, популяция находится в *лаг-фазе*, а на выходе из ферментатора культура может находиться в любой фазе в зависимости от скорости подачи среды. В ферментаторе воспроизводится полная кривая размножения, но не во времени, а в пространстве.

В процессе полного смешения размножение культуры происходит в ферментаторе при интенсивном перемешивании и аэрации. Во всем объеме культуральной жидкости условия должны быть одинаковыми. При этом в ферментаторе могут быть созданы условия, соответствующие любой точке кривой размножения культуры, выращиваемой периодическим способом. Процесс полного смешения может быть организован по типу системы «турбидостат» и «хемотрат».

В системе «турбидостат» в ферментаторе поддерживают плотность популяции постоянной, и при быстром протоке среды создаются условия, которые соответствуют логарифмической фазе, при медленном – приближаются к условиям, соответствующим стационарной фазе. В установившемся режиме работы ферментатора удельная скорость протока среды равна удельной скорости размножения культуры. Повышение скорости протока или воздействие, замедляющее рост, приводят к тому, что скорость размножения оказывается меньше скорости протока и клетки культуры будут «вымыты» из ферментатора.

В системе «хемотрат» величину клеточной популяции контролируют с помощью отдельных компонентов питательной среды. Среда составляют так, чтобы один из компонентов, необходимый для роста биомассы клеток, был в недостатке или лимитировал рост, поддерживая тем самым культуру в нужном состоянии. Используя батарею ферментаторов, можно в каждом аппарате постоянно поддерживать продуцент в определенной фазе размножения.

В настоящее время непрерывное культивирование применяют для получения белково-витаминных концентратов (БВК), кормовых дрожжей, лимонной кислоты, лизина.

В производстве антибиотиков, наряду с периодическим культивированием, используют методы, занимающие промежуточное положение между периодическим и непрерывным культивированием, то есть полунепрерывный *отъемно-доливной* метод. Таким образом удается в 2-3 раза увеличить время пребывания продуцента в активной фазе. Недостаток состоит в том, что доливы осуществляют питательной средой полного состава. Этому недостатку лишен метод полунепрерывной регулируемой ферментации. Суть метода состоит в том, что в определенное время, начиная с логарифмической фазы размножения, по специально разработанной программе, в культуральную жидкость добавляют отдельные компоненты питательной среды (раствор сахаров, аммония сульфат, жир и т.д.), поддерживая их концентрацию на постоянном, благоприятном уровне – вначале для роста биомассы клеток, а затем - для синтеза целевого продукта.

Периодически из ферментатора отбирают определенные объемы культуральной жидкости со все возрастающей концентрацией целевого продукта. Ферментацию пре-

кращают после того, как активность продукта достигла максимума. Этим способом удается не только продлить активную фазу, в которой находится продуцент, но и повысить степень использования им субстрата, а в конечном итоге – продуктивность процесса, то есть увеличить выход конечного продукта в расчете на потребленный субстрат.

6.4. Асептически регулируемые ферментационные процессы

Из всего разнообразия способов проведения процессов биотехнологии наиболее сложными являются регулируемые ферментации с соблюдением условий асептики. Реализация таких процессов рассчитана на использование ЭВМ при соответствующем программном обеспечении. Кроме того, для проведения процесса в асептических условиях необходимо введение дополнительных стадий, обеспечивающих стерилизацию питательных сред и подаваемого в ферментатор воздуха.

Стерильную питательную среду в инокуляторе – посевном аппарате первой ступени засевают с соблюдением правил асептики через специальное устройство посевным материалом, который предварительно был выращен в колбах (в лаборатории).

Технологи создают и поддерживают необходимые режимы в аппарате для размножения клеток продуцента (температуру, аэрацию, перемешивание), а микробиологи контролируют и оценивают развитие культуры. При достижении требуемых стадий развития и количества биомассы посевной материал передавливает стерильным сжатым воздухом по посевному коллектору в посевной аппарат большей вместимости. На этой второй ступени выращивания посевного материала стремятся получить больше биомассы клеток, чтобы в ферментаторе можно было создать необходимую для данного штамма продуцента исходную плотность популяции. Если это требование выполнимо без второй ступени, то ферментационную среду засевают непосредственно из инокулятора.

Биосинтез целевого продукта в ферментаторе происходит при заданных температурном режиме, аэрации, перемешивании и рН культуральной жидкости; контролируют значение рН обычно периодической подачей аммиачной воды через барботер ферментатора. В случае сильного пенообразования – подают стерильный пеногаситель из специального аппарата по сигналу датчика уровня пены.

Для поддержания концентраций отдельных компонентов питательной среды их подают в виде стерильных растворов по команде ЭВМ с определенной скоростью и ипериодичностью в ферментатор из специальных аппаратов.

6.5. Нестерильные процессы

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

Вопросы для самоконтроля

1. Классификация биореакторов: ферментаторы периодические и непрерывного действия. Чем они отличаются?
2. Условия культивирования биообъектов при периодическом процессе.
3. Что такое процесс полного вытеснения и полного смешения в методе проточного культивирования?

4. Организация процесса полного смешения по типу системы «турбидостат» и «хемотат»?
5. Какие продукты получают при непрерывном культивировании?
6. Какие процессы относят к асептическим регулируемым процессам?
7. Как регулируется pH среды культуральных жидкостей?

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная литература

1. Биотехнология: теория и практика / Н.В. Загоскина и др. ; под ред. Н.В. Загоскиной, Л.В. Назаренко. – М.: «Оникс», 2009. – 496 с. – ISBN 978-5-488-02173
2. Клунова, С.М. Биотехнология: учебник / С.М. Клунова, Т.А. Егорова, Е.А. Живухина. – М.: Академия, 2010. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-6697-4
3. Сазыкин, Ю.О. Биотехнология / Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева; под ред. А.В. Катлинского. - М.: Академия, 2008. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-5506-0
4. Тарантул, В.З. Толковый биотехнологический словарь русско-английский: справочное издание [Электронный ресурс] / В.З. Тарантул. – М.: Языки славянских культур, 2009. – 936 с. – ISBN: 978-5-95-51-0342-6 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks.

Дополнительная литература

1. Биотехнология. Биобезопасность. Биоэтика / А.П. Ермишин и др.; под ред. А.П. Ермишина. – Минск: «Тэхнолoгiя», 2005. – 430 с.
2. Биотехнология: учебное пособие для вузов, в 8 кн., под ред. Егорова Н.С., Самуилова В.Д. – М., 1987.
3. Бирюков, В.В. Основы промышленной биотехнологии / В.В. Бирюков. – М.: КолосС, 2004. – 296 с. – ISBN 5-9532-0231-8 («КолосС»); ISBN 5-98109-008-1 (АНО «Химия»)
4. Блинов, В.А. Общая биотехнология: курс лекций. В 2-х частях. Ч. 1 / В.А. Блинов. – Саратов, 2003.
5. Блинов, В.А. Общая биотехнология: Курс лекций. В 2-х частях. Ч. 2. – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский СГАУ», 2004. – 144 с. – ISBN 5-7011-0436-2

ЛЕКЦИЯ 7

Классификация биореакторов

7.1. Барботажные биореакторы

Наибольшее использование в предшествующие годы получили барботажные биореакторы с принудительным диспергированием газа (рис. 7). Они представляют собой вертикальную емкость, в основном цилиндрической формы, снабженную теплообменником, барботером и технологическими штуцерами. Характерным признаком работы барботажного реактора является неорганизованная и слабая циркуляция жидкости.

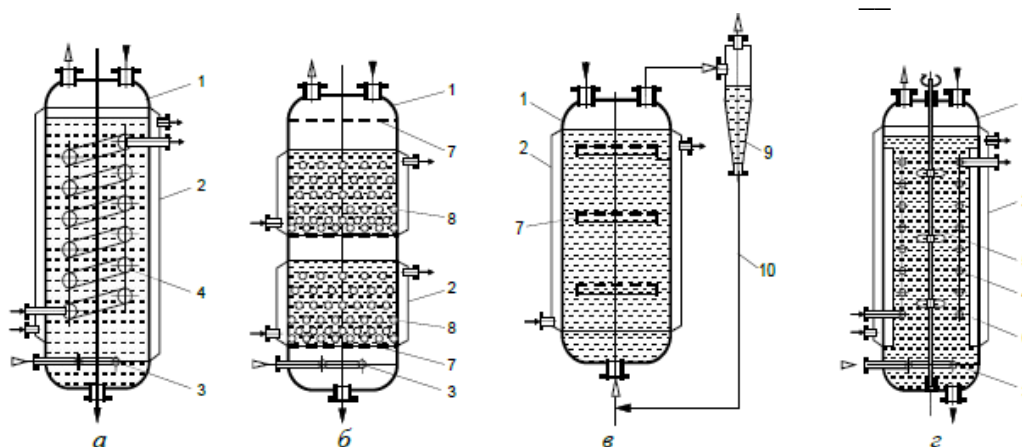


Рис. 7.7. Барботажные биореакторы [5]: 1 – корпус; 2 – рубашка; 3 – барботер; 4 – теплообменник; 5 – механическое перемешивающее устройство; 6 – ребра; 7 – решетка; 8 – подвижная насадка (гранулы); 9 – сепаратор; 10 – циркуляционный контур (рис. Н.А. Войнова [5])

В аппаратах рассматриваемого типа количество кислорода, доставляемого в жидкую фазу, определяется величиной межфазной поверхности, развиваемой в результате массового прохождения пузырьков газа сквозь слой жидкости. Однако скорость переноса кислорода в жидкой фазе так же, как и скорость отвода продуктов метаболизма, оказывается весьма низкой и не превышает $0,7 \text{ кг O}_2 / (\text{м}^3 \cdot \text{ч})$, а расход воздуха в связи с этим достигает $50 \text{ м}^3 / (\text{м}^3 \cdot \text{ч})$. Применение реакторов с принудительным диспергированием газа большой высоты (10–25) м для увеличения степени насыщения культуральной жидкости газом (рис. 7.7, в), а также аппаратов с подвижной насадкой (рис. 7.7, б) требует больших энергозатрат на компримирование газа.

Увеличить скорость переноса газового субстрата в аппаратах барботажного типа можно путем применения перемешивающих устройств (рис. 7.7, г). Для этой цели используются различные типы мешалок, что не только увеличивает межфазную поверхность, но и обеспечивает дополнительную турбулизацию жидкой фазы. Эксплуатация аппаратов барботажного типа с мешалками показывает, что увеличение энергетических затрат не сопровождается адекватным повышением эффективности процесса. Лишь при подводимой удельной мощности, не превышающей $2\text{--}11 \text{ кВт/м}^3$, рост эффективности массопереноса в жидкой фазе имеет приблизительно линейный характер. Дальнейшее увеличение мощности не приводит к уменьшению диаметра пузырьков газа и росту межфазной поверхности.

Одним из важнейших требований, предъявляемых к условиям проведения ферментации, является поддержание температуры в реакционной зоне на оптимальном уровне. Однако непрерывный отвод тепла из зоны реакции аппаратов барботажного типа с мешалками затруднен. Это обуславливает необходимость оснащения реакторов этого типа выносными теплообменниками, что приводит к еще большему увеличению энергозатрат.

7.2. Газлифтные реакторы

Газлифтные биореакторы. Некоторое повышение тепло- и массообменных характеристик, по сравнению с барботажными аппаратами, достигается использованием газлифтных биореакторов (рис. 7.8), которые нашли наибольшее распространение в промышленной практике. Отличительной особенностью газлифтных аппаратов является наличие в аппарате циркуляционного контура в виде одного (рис. 7.8, а) или нескольких стаканов (рис. 7.8, б) или газлифтных труб (рис. 7.8, в, г), в полости которых поддерживается повышенное газосодержание (0,5 – 0,6), что позволяет обеспечить циркуляцию газожидкостной смеси со скоростью 0,1–0,6 м/с. Для таких аппаратов характерны интенсивное пенообразование и высокий удельный расход воздуха.

В газлифтных биореакторах объемный коэффициент массоотдачи составляет 200–400 ч⁻¹, коэффициент теплоотдачи дрожжевой суспензии – $(2-3) \cdot 10^3$ Вт/(м²·К). В промышленной практике выращивания кормовых дрожжей объем применяемых газлифтных аппаратов составляет 320–1 300 м³, при диаметре 5,7–11,0 м и высоте 13,4–14,5 м. Во время работы воздух проходит в аппарат по центральной трубе в кювету, где из подаваемого суслу и жидкости, содержащейся в нижней части аппарата, образуется газожидкостная смесь, которая движется по внутреннему циркуляционному контуру.

На рис. 7, 8. Представлены схемы газлифтных биореакторов системы Лефрансуа – Марийе.

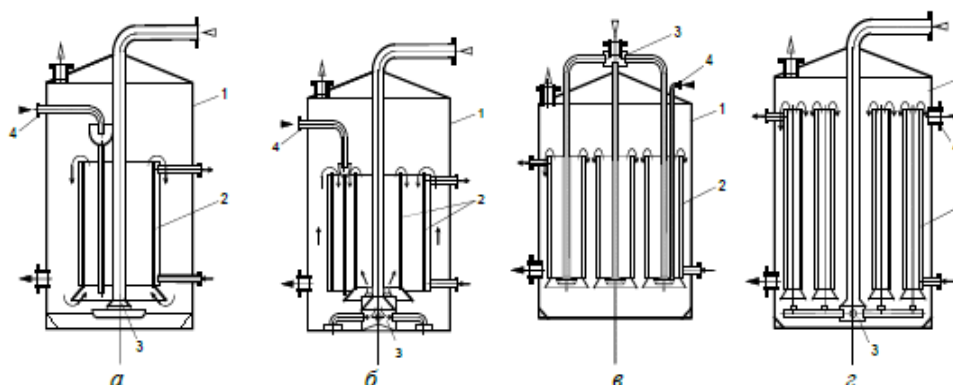


Рис. 7.8. Газлифтные биореакторы системы Лефрансуа – Марийе [5]: 1 – корпус; 2 – циркуляционный стакан с рубашкой; 3 – система воздухораспределения; 4 – патрубок для подачи ферментативной среды (рис. Н.А. Войнова [5])

Попытка увеличения скорости транспорта кислорода за счет установки перемешивающего устройства в циркуляционном контуре приводит к резкому увеличению энергетических затрат (рис. 7.9, б). Устойчивая работа мешалки определяется газосодержанием системы, предельная величина которого составляет $\phi = 0,4$. Поэтому биореакторы с мешалкой в циркуляционном контуре применяются только для ферментативных сред, не образующих устойчивой пены с высоким газосодержанием. Расход энергии на еди-

ницу полученной биомассы в биореакторах с механическим перемешиванием составляет 2–3 кВт·ч/кг АСД, что значительно больше, чем в аппаратах других типов. Увеличение энергозатрат объясняется тем, что хотя интенсивное перемешивание жидкости мешалками и способствует некоторому увеличению межфазной поверхности за счет дробления газовых пузырьков, течение жидкости между пузырьками газа остается преимущественно ламинарным и затраченная энергия не ведет к соответствующему повышению скорости транспорта кислорода в жидкой фазе.

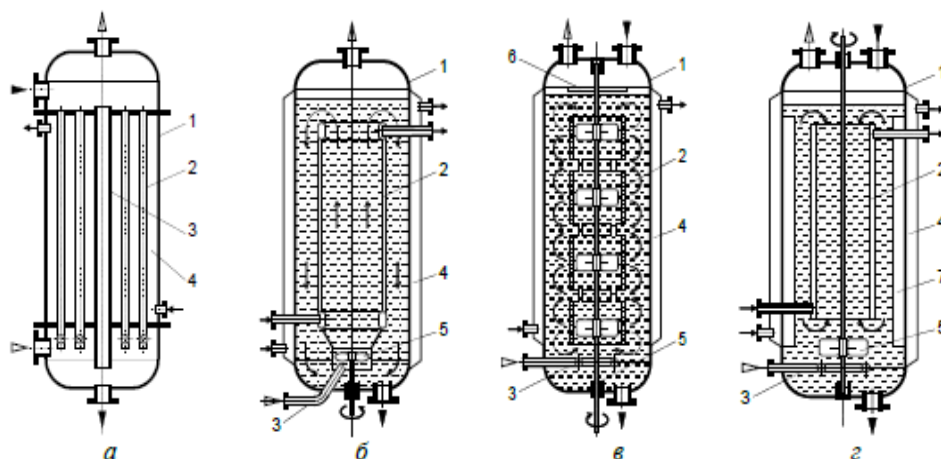


Рис. 7.9. Газлифтные биореакторы с пневматическим и механическим перемешиванием [5]: 1 – корпус; 2 – циркуляционный стакан; 3 – барботер; 4 – рубашка; 5 – механическое перемешивающее устройство; 6 – механический пеногаситель; 7 – ребро

7.3. Струйные биореакторы

В струйных биореакторах используется эффект инжекции воздуха струей культуральной жидкости, вытекающей из насадки (сопла) со скоростью 6–8 м/с (рис. 7.10). Проникая вместе со струей жидкости на глубину до одного метра, газ дробится на мелкие пузыри, образуя газожидкостную систему с развитой межфазной поверхностью. Разработано около десятка конструкций струйных биореакторов со сплошной или кольцевой струей жидкости (сплошная струя образуется при истечении жидкости из цилиндрического патрубка, кольцевая – из кольцевого зазора, образованного патрубком и цилиндрической вставкой). При внедрении струи в жидкость происходит захват газа ее поверхностью и образование аэрируемой (барботажной) зоны. Поверхностный коэффициент массоотдачи в струйных насадках составляет $(0,5-0,7) \cdot 10^{-4}$ м/с, высота зоны аэрации 0,2–0,4 м, диаметр газовых пузырьков в жидкости 1,8–5,0 мм.

Величина объемного коэффициента массоотдачи в биореакторе со струйной насадкой не превышает 210 ч^{-1} . Эксплуатация струйных биореакторов требует меньших (по сравнению с барботажными) удельных энергозатрат, однако небольшая скорость переноса кислорода в жидкой фазе не позволяет перерабатывать в них концентрированные среды (допустимая концентрация редуцирующих веществ в субстрате, как правило, не превышает 8 кг/м³), что приводит к увеличению габаритов и повышению эксплуатационных расходов. В струйных аппаратах, как и в аппаратах барботажного типа, ярко выражен эффект флотации биомассы, значительно снижающий интенсивность микробиологического синтеза. Конструктивные особенности струйных биореакторов не дают возможности отводить тепло непосредственно из зоны реакции, что обуславливает необходимость использования выносного теплообменника для обеспечения оптимального

температурного режима процесса. Одним из наиболее существенных недостатков струйных аппаратов является неравномерное распределение газа в объеме жидкости. Кроме того, для обеспечения оптимальной скорости течения струи необходима высота слоя жидкости, равная трем и более метров, что не позволяет обеспечить требуемое газосодержание.

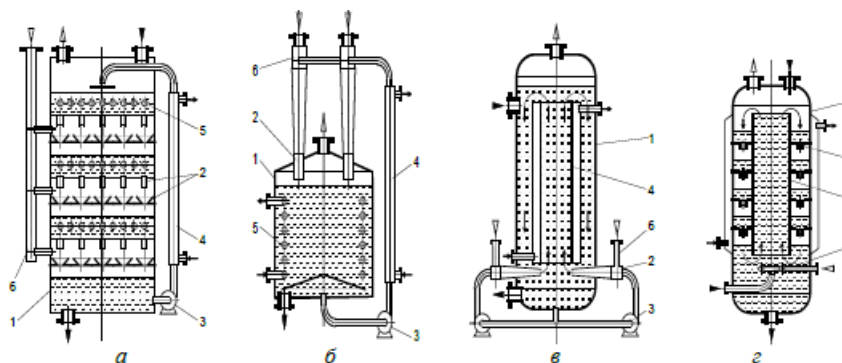


Рис. 7.10. Струйные биореакторы [5]: 1 – корпус; 2 – струйная насадка (эжектор); 3 – насос; 4 – циркуляционный стакан (труба); 5 – теплообменник; 6 – воздуховод

Вопросы для самоконтроля

1. Конструктивные особенности барботажных биореакторов.
2. Каким образом можно увеличить скорость переноса газового субстрата в аппаратах барботажного типа?
3. Отличительные особенности газлифтных биореакторов.
4. Особенности работы струйных биореакторов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная литература

1. Биотехнология: теория и практика / Н.В. Загоскина и др. ; под ред. Н.В. Загоскиной, Л.В. Назаренко. – М.: «Оникс», 2009. – 496 с. – ISBN 978-5-488-02173
2. Клунова, С.М. Биотехнология: учебник / С.М. Клунова, Т.А. Егорова, Е.А. Живухина. – М.: Академия, 2010. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-6697-4
3. Сазыкин, Ю.О. Биотехнология / Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева; под ред. А.В. Катлинского. - М.: Академия, 2008. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-5506-0
4. Тарантул, В.З. Толковый биотехнологический словарь русско-английский: справочное издание [Электронный ресурс] / В.З. Тарантул. – М.: Языки славянских культур, 2009. – 936 с. – ISBN: 978-5-95-51-0342-6 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks.

Дополнительная литература

1. Биотехнология. Биобезопасность. Биоэтика / А.П. Ермишин и др.; под ред. А.П. Ермишина. – Минск: «Тэхнолoгiя», 2005. – 430 с.
2. Биотехнология: учебное пособие для вузов, в 8 кн., под ред. Егорова Н.С., Самуилова В.Д. – М., 1987.
3. Бирюков, В.В. Основы промышленной биотехнологии / В.В. Бирюков. – М.: КолосС, 2004. – 296 с. – ISBN 5-9532-0231-8 («КолосС»); ISBN 5-98109-008-1 (АНО «Химия»)
4. Блинов, В.А. Общая биотехнология: курс лекций. В 2-х частях. Ч. 1 / В.А. Блинов. – Саратов, 2003.

5. Блинов, В.А. Общая биотехнология: Курс лекций. В 2-х частях. Ч. 2. – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский СГАУ», 2004. – 144 с. – ISBN 5-7011-0436-2

ЛЕКЦИЯ 8

Моделирование биореакторов

8.1. Основы аппаратурного оформления различных производств

Биореакторы (ферментаторы) составляют основу биотехнологического производства. Масса аппаратов, используемых, например, в микробной биотехнологии, различна, и требования здесь определяются большей частью экономическими соображениями. Применительно к ферментаторам различают следующие типы их: лабораторные емкостью 0,5—100 л, пилотные емкостью 100л—10 м³, промышленные емкостью 10—100 м³ и более.

При масштабировании добиваются соответствия важнейших характеристик процесса, а не сохранения принципа конструкции.

В случае замены каких-либо частей или деталей в аппарате, смазки и чистки узлов при текущем ремонте, и т. д., загрязнения не должны попадать внутрь биореакторов, в материальные поточные коммуникационные линии, в конечные продукты.

Техническую вооруженность биотехнологических процессов целесообразно условно ограничить аппаратурным оформлением производств, базирующихся на культивировании: 1) бактерий и грибов, 2) клеток и тканей растений, 3) клеток и тканей животных организмов и человека. Такое подразделение обусловлено тем, что бактерии и грибы в большинстве своем выращивают в однотипных биореакторах, имеющих почти однотипную обвязку, в которую входят: ферментатор, многокорпусный вентиль стерильный (для подачи питательной среды, посевного материала, подпитки и пр.), системы регулирования рН, 1°, подачи иеногасителя, система контроля расхода воздуха, пробоотборник, электродвигатель.

Растительные клетки, имеющие клеточную стенку (также как бактерии и грибы) растут, размножаются и развиваются значительно дольше, чем большинство бактерий и грибов, а это вносит определенные коррективы в аппаратурное оформление соответствующих биотехнологических процессов.

Культуры клеток животных и человека, не имеющие клеточных стенок, являются более ранимыми и требовательными к условиям своего существования, чем клетки других эукариот и прокариот. Поэтому оборудование для них можно отнести к разряду "тихоходного", обеспечивающего нежное обращение с биообъектами.

Несомненно, в отдельных случаях допустимы исключения, например, когда возможно культивирование в глубинных условиях некоторых растительных клеток (супензионная культура женьшеня), используя ферментационное оборудование, рассчитанное на выращивание, например, бактерий или грибов.

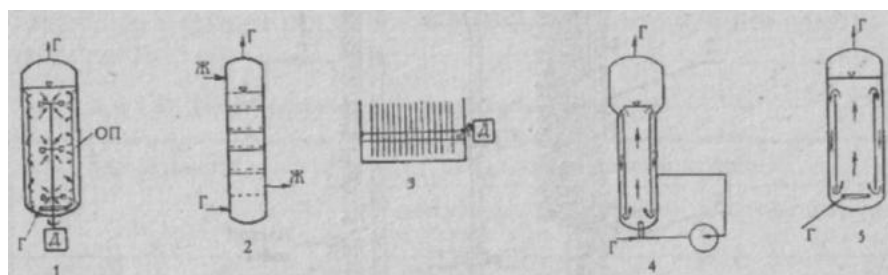
8.2. Типы биореакторов в зависимости от способа потребления энергии

К. Шюгерль в 1982 г. предложил подразделить биореакторы на 3 основные группы согласно способу потребления энергии для перемешивания и диспергирования стерильного воздуха (газа):

- в биореакторах I типа энергия расходуется на механическое движение внутренних устройств;

- в биореакторах II типа энергия и/или газа;

- в биореакторах III типа энергия расходуется на сжатие и подачу газа в культуральную жидкость.



Биореакторы для аэробных процессов: с расходом энергии на механическое движение внутренних устройств а — 1, 2, 3; с расходом энергии на работу насоса, обеспечивающего рециркуляцию культуральной жидкости б — 4; с расходом энергии на сжатие и подачу газовой фазы в — 5 (г — газ, ж — жидкая фаза, д — двигатель).

8.3. Моделирование биореакторов

Человек с древнейших времен эмпирически применял дрожжевые организмы в примитивных по аппаратурному оформлению биотехнологических процессах (хлебопечение, виноделие и пр.). Развитие промышленности антибиотиков продвинуло далеко вперед проблему создания специальной аппаратуры для культивирования микробов — продуцентов БАВ (аминокислот, антибиотиков, полисахаридов, витаминов, ферментов и других соединений). Были предложены различного типа биореакторы для выращивания микроорганизмов, однако все конструкции ферментаторов (ферментеров) оставались в основном сходными по большинству параметров и, усредненно, их можно подразделить на 2 типа: без подводки стерильного воздуха (для анаэробов) и с подводкой его (для аэробов). Аэрируемые биореакторы могут быть с мешалками и без них.

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

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

Некоторые технические характеристики промышленного биореактора в сравнении с пилотным и лабораторным приведены в таблице 1:

Таблица 1.

Некоторые технические характеристики промышленных биореакторов в сравнении с пилотными и лабораторными

Характеристика	Показатели для аппаратов		
	промышленного на 100 м ³	пилотного на 150 л	лабораторного на 10 л
Внутренний диаметр, мм	3600	420	
Высота, мм	15715	1140	
Рабочий объем, л	1	100	2-6

Диаметр турбин, мм	900	140	
Число турбин	1-2 (диаметр рабочего колеса 960 мм)	3	2
Число отбойников	4	4	±
Частота вращения вала мешалки, об/мин	173	125-990	200-1500
Мощность электродвигателя мешалки, кВт	160	2,2	Не более 2
Мощность электродвигателя пеногасителя, кВт	4	0,73	
Частота вращения вала пеногасителя, об/мин	725	3000	

Размеры ферментаторов определяются соотношением внешнего диаметра к высоте, который варьирует обычно в пределах от 1:2 до 1:6. Почти универсальными и чаще используемыми являются ферментаторы для анаэробных и аэробных процессов. Эти ферментаторы в свою очередь классифицируют по способу ввода в аппарат энергии для перемешивания газовой фазой (ФГ), жидкой фазой (ФЖ), газовой и жидкой фазами (ФЖГ).

Таблица 7.2.

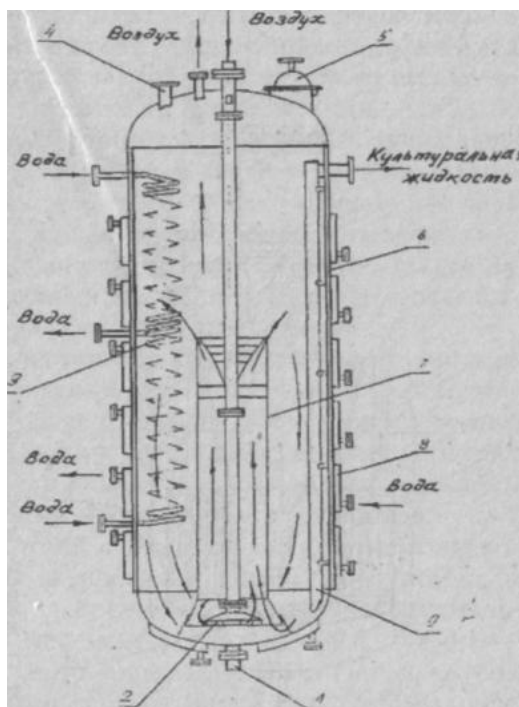
Технические характеристики биореакторов (ферментеров)

Ферментаторы	Характеристика конструкции аппарата	Тип аппарата
ФГ с подводом энергии газовой фазой	Простота конструктивного оформления и высокая надежность в связи с отсутствием движущихся узлов и деталей	Барботажный. барботажно-эрлифтный. колоночный (колонный), форсуночный
ФЖ с подводом энергии жидкой фазой	Обычно энергия передается жидкой фазе самовсасывающей мешалкой или насосом	Эжекционный с циркуляционным контуром, с всасывающей мешалкой
ФЖГ (комбинированные)	Основным конструктивным элементом является перемешивающее устройство, обеспечивающее высокую интенсивность растворения кислорода и высокую степень диспергирования газа. В то же время энергия газовой фазой выводится обычным способом	Барботажный с механическим перемешиванием

8.4. Методы инженерных расчетов биореакторов

С использованием указанных выше классификаций удастся разработать единые методы инженерных расчетов основных конструктивных элементов и режимов работы ферментаторов. Ферментаторы указанных трех групп имеют большое количество общих элементов. Различие же состоит в конструкциях аэрирующих и перемешивающих устройств. Примером конструктивного оформления ферментатора группы ФГ может быть аппарат с эрлифтом вместимостью 63 м³ (рис.).

Ферментатор с эрлифтом: 1 — штуцер для слива, 2 — аэратор, 3 — змеевик, 4 — штуцер для загрузки. 5 — люк, 6 — корпус аппарата, 7 — диффузор, 8 — рубашка, 9 — труба передавливания.



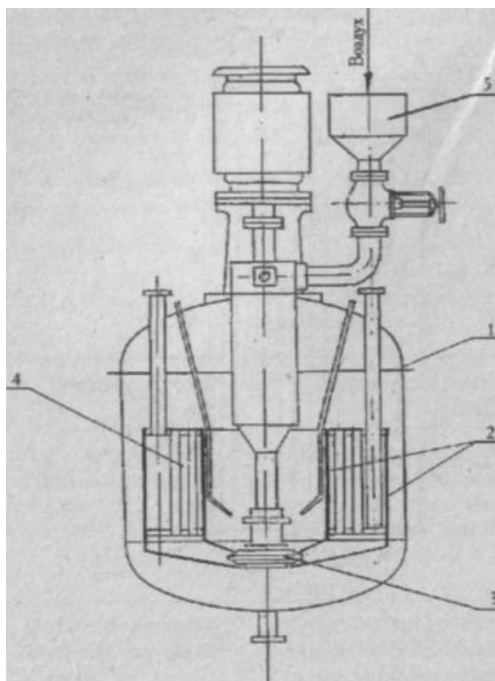
В аппарате отсутствует механическое перемешивание, поэтому проще поддерживать асептические условия. Воздух для аэрации среды подается по трубе, расположенной вертикально в ферментаторе. Аэратор, конструкция которого обеспечивает вихревое движение выходящего воздуха, расположен в нижней части диффузора и насыщает питательную среду воздухом. Газожидкостная смесь поднимается по диффузору и перемешивается через его верхние края. В этой же зоне часть воздуха уходит из аппарата, и более плотная среда опускается вниз в кольцевом пространстве между корпусом ферментатора и диффузором. Так происходит многократная циркуляция среды в ферментаторе. Для отвода биологического тепла внутри ферментатора установлен змеевик, а также аппарат снабжен секционной рубашкой. Недостатком этих аппаратов является низкая интенсивность массообмена по кислороду.

Широкое распространение в производстве кормового белка получили ферментаторы с самовсасывающими мешалками (рис. 91). Это ферментаторы из группы ФЖ. Для выращивания чистой культуры дрожжей созданы ферментаторы вместимостью 0.32, 3.2 и 50 м³. Ферментатор представляет собой вертикальный цилиндрический аппарат, снабженный циркуляционными, теплообменными и аэрирующими устройствами. В качестве циркуляционных устройств использованы системы направляющих диффузоров, разграничивающих восходящие и нисходящие потоки. Теплообменные устройства выполнены в виде трубок, установленных в трубных решетках диффузоров.

На предприятиях микробиологической промышленности при выращивании дрожжей в средах с жидкими парафинами также применяют ферментаторы с самовсасывающими мешалками непрерывного действия. Емкость его 800 м³ (рабочий объем 320 м³) разделена на 12 секций. Ферментационная среда последовательно проходит все секции, и из последней выходит культуральная жидкость с минимальным содержанием н-парафинов и максимальной концентрацией биомассы. В каждой секции установлено перемешивающее и аэрирующее устройство и змеевики для отвода тепла.

Эффективность работы ферментатора определяется прежде всего необходимой интенсивностью перемешивания. Перемешивающие устройства служат для сохранения равномерного температурного поля по всему объему аппарата, своевременного подвода продуктов питания к клеткам и отвода от них продуктов метаболизма, а также интенсификации массопередачи кислорода. Для создания в ферментаторе условий "полного отражения", во избежание образования вращательного контура, который резко снижает интенсивность перемешивания, в аппарате устанавливают отражательные перегородки (отбойники). Ширина их составляет (0,1—0,12) dM. Обычно рекомендуют устанавливать 4 отражательных перегородки, несколько отступая от стенок ферментатора.

Ферментатор с самовсасывающей мешалкой непрерывного действия: 1 — корпус, 2 — диффузор, 3 — самовсасывающая мешалка. 4 — теплообменник, 5 — фильтр.



Важным элементом в конструкции ферментатора являются теплообменные устройства. Применение высокопродуктивных штаммов биообъектов, концентрированных питательных сред, высокий удельный расход мощности на перемешивание — все эти факторы сказываются на существенном возрастании тепловыделений, и для отвода тепла в ферментаторе устанавливают наружные и внутренние теплообменные устройства. Промышленные ферментаторы, как правило, имеют секционные рубашки, а внутри аппарата — четыре змеевика.

Разработчики аппаратуры в нашей стране и за рубежом постоянно совершенствуют конструкции биореакторов. Так, например, фирма New Brunswick Scientific Co., Inc. (США) предложила следующие типы ферментаторов: Био-Фло III — для периодического и непрерывного культивирования микробных, животных и растительных клеток, совмещенный с микропроцессором и персональным компьютером; Микрос I — для культивирования микроорганизмов (совмещен с микропроцессором) и промышленные ферментаторы емкостью от 40 до 4000 литров и более (совмещены с микропроцессорами). В Датской мультинациональной компании Gist-Brocades в 1987 г. сконструирован и изготовлен самый большой промышленный ферментатор для производства пенициллина.

Вопросы для самоконтроля

1. Классификация биореакторов в зависимости от способа потребления энергии.
2. Классификация биореакторов для выращивания микроорганизмов.
3. Чем регламентируются размеры ферментаторов?
4. Ферментаторы для аэробных и анаэробных процессов.
5. Каким образом осуществляется аэрация среды в реакторах с эрлифтом?
6. Какими критериями определяется эффективность работы ферментатора?

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная литература

1. Биотехнология: теория и практика / Н.В. Загоскина и др. ; под ред. Н.В. Загоскиной, Л.В. Назаренко. – М.: «Оникс», 2009. – 496 с. – ISBN 978-5-488-02173
2. Клунова, С.М. Биотехнология: учебник / С.М. Клунова, Т.А. Егорова, Е.А. Живухина. – М.: Академия, 2010. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-6697-4
3. Сазыкин, Ю.О. Биотехнология / Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева; под ред. А.В. Катлинского. - М.: Академия, 2008. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-5506-0
4. Тарантул, В.З. Толковый биотехнологический словарь русско-английский: справочное издание [Электронный ресурс] / В.З. Тарантул. – М.: Языки славянских культур, 2009. – 936 с. – ISBN: 978-5-95-51-0342-6 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks.

Дополнительная литература

1. Биотехнология. Биобезопасность. Биоэтика / А.П. Ермишин и др.; под ред. А.П. Ермишина. – Минск: «Тэхнолoгія», 2005. – 430 с.
2. Биотехнология: учебное пособие для вузов, в 8 кн., под ред. Егорова Н.С., Самуилова В.Д. – М., 1987.
3. Бирюков, В.В. Основы промышленной биотехнологии / В.В. Бирюков. – М.: КолосС, 2004. – 296 с. – ISBN 5-9532-0231-8 («КолосС»); ISBN 5-98109-008-1 (АНО «Химия»)
4. Блинов, В.А. Общая биотехнология: курс лекций. В 2-х частях. Ч. 1 / В.А. Блинов. – Саратов, 2003.
5. Блинов, В.А. Общая биотехнология: Курс лекций. В 2-х частях. Ч. 2. – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский СГАУ», 2004. – 144 с. – ISBN 5-7011-0436-2

ЛЕКЦИЯ 9

Оборудование для разделения

9.1. Центрифугирование. Типы центрифуг

Для разделения микробных суспензий, жидкой и твердой фазы широко используется центрифугирование и сепарирование, в основе которых центробежное фильтрование и центробежное осаждение. Для реализации этого способа разделения используются центрифуги и сепараторы.

В микробиологической промышленности используют различные типы центрифуг и сепараторов для отделения балластных частиц из растворов биологически активных веществ; биомассы от культуральной жидкости, выделения биологически активного комплекса при его выделении из растворов, а также для разделения смесей жидкостей или суспензий.

В промышленных установках центробежное разделение применяют для отделения частиц размером от 25 мм до 0,5 мкм. При разделении биологических жидкостей к центрифугам и сепараторам предъявляются особые требования по разделяющей способности и обеспечению стерильности процесса для предотвращения попадания аэрозолей в окружающую среду.

Под *центрифугированием* понимают процесс разделения неоднородных систем, суспензий и эмульсий, в поле центробежных сил с использованием сплошных или проницаемых для жидкости перегородок. В аппаратах со сплошными стенками производят разделение суспензий и эмульсий по принципу отстаивания, причем действие силы тяжести заменяется действием центробежной силы. В аппаратах с проницаемыми стенками осуществляется процесс разделения суспензий по принципу фильтрования, причем вместо разности давлений используется действие центробежной силы. Разделение неоднородных систем центрифугированием, с физической точки зрения, можно рассматривать как процесс свободного или стесненного осаждения взвешенных частиц в жидкости под действием центробежного силового поля.

В практике центрифугирования, как уже было сказано выше, используются два основных способа разделения суспензий: центробежное фильтрование и центробежное осаждение. Соответственно, по физической сущности реализуемого процесса центрифуги подразделяют на *фильтрующие* и *осадительные* (отстойные). Рабочим органом центрифуги является ротор (барабан), закрепленный на вращающемся валу, во внутреннюю полость которого подается суспензия. По расположению вала ротора центрифуги делятся на *вертикальные* и *горизонтальные*. А по режиму работы выделяют центрифуги *периодического* и *непрерывного* действия. Ниже приведены схемы фильтрующей маятниковой центрифуги (рис.5) и осадительной центрифуги (рис. 6).

Наиболее используемые типы центрифуг периодического действия – маятниковые и горизонтальные с ножевой выгрузкой осадка. *Маятниковые* центрифуги (рис. 5) получили название из-за колебательного движения корпуса во время работы. Конструктивная особенность этих машин – вертикальное расположение вала ротора и наличие трех колонок, в которых размещены тяги упругой подвески с шаровыми шарнирами и пружинами. Такая подвеска позволяет уменьшить динамическую нагрузку на подшипники.

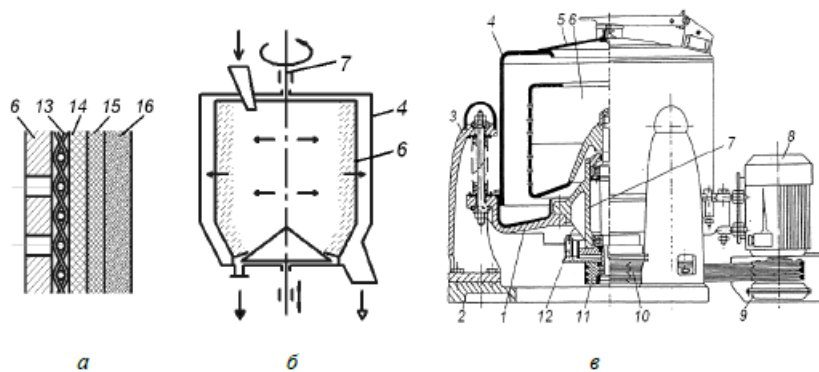


Рис. 7.25. Схема фильтрующей маятниковой центрифуги (а, б) и ее сборочный чертеж (в): 1, 2 – станина; 3 – подвеска; 4 – кожух; 5 – крышка; 6 – ротор; 7 – подшипниковый узел; 8 – электродвигатель; 9, 10, 11 – клиноременная передача; 12 – основание; 13 – сетка; 14 – фильтрующая ткань; 15 – осадок; 16 – суспензия (рис. Н.А. Войнова)

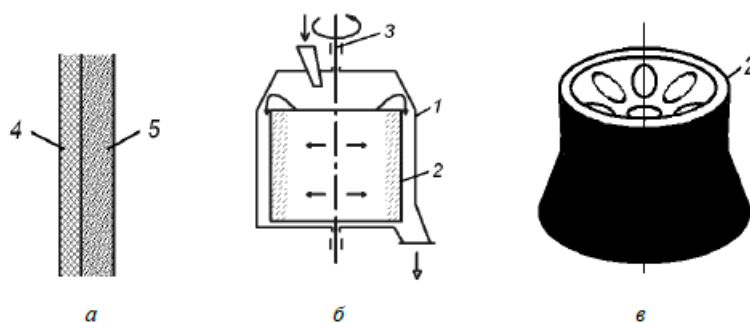


Рис. 7.26. Схема осадительной центрифуги (а, б) и фотография ротора (в): 1 – кожух; 2 – ротор (барaban); 3 – привод; 4 – стенка ротора; 5 – слой осадка (рис. Н.А. Войнова)

В горизонтальных центрифугах с ножевой выгрузкой осадка все операции рабочего цикла выполняются при одинаковой частоте вращения ротора, как правило, в автоматическом режиме. Ниже приведена схема горизонтальной центрифуги (рис.9).

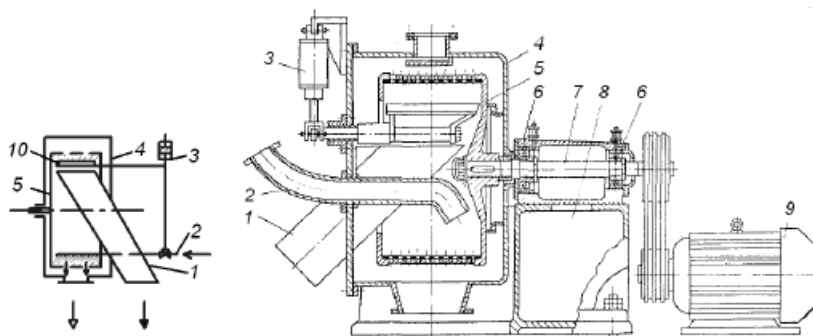


Рис. 7.27. Схема горизонтальной центрифуги с ножевой выгрузкой осадка: 1, 2 – выход и вход продуктов; 3 – пневмоцилиндр; 4 – кожух; 5 – ротор; 6, 7, 8 – подшипниковый узел; 9 – электродвигатель; 10 – нож для съема осадка (рис. Н.А. Войнова)

В случаях, когда необходима тщательная промывка и осушка осадка, применяют двух-, четырех- и шестикаскадные центрифуги, где внутренние сита ротора, вращаясь, совершают возвратно-поступательное движение, проталкивая слой осадка своими бортами по внешним ситам. При этом операции фильтрования, промывки и осушки осадка осуществляются на разных ситах.

10.2. Сепараторы

Сепарирование нашло широкое применение при концентрировании кормовых и хлебопекарных дрожжей, при разделении эмульсий и осветлении растворов биологически активных веществ перед концентрированием в выпарных аппаратах и ультрафильтрационных установках. Использование сепараторов позволяет обрабатывать большие объемы трудно фильтрующих суспензий, интенсифицировать выделение и концентрирование микроорганизмов размером более 0,5 мкм. По конструкции сепараторы разделяют на тарельчатые (рис.9) и камерные (рис.10).

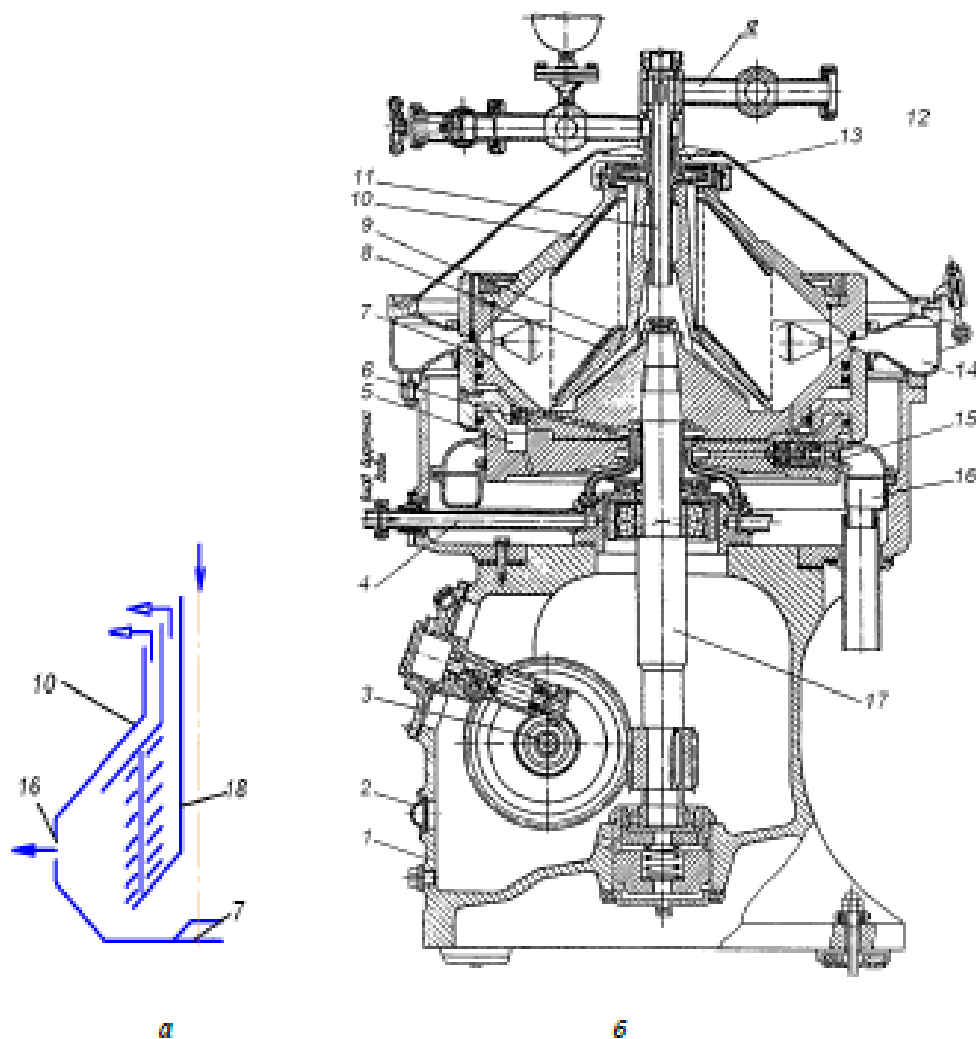


Рис. 7.32. Тарельчатый сепаратор - *а*: 7 - вал; 10 - барабан; 16 - сопла; 18 - тарелкодержатель; *б*: 1, 6 - пробки; 2 - станция; 3 - указатель уровня масла; 4 - вал горизонтальный; 5 - тахометр; 7 - гидроузел; 8 - чаша; 9 - приемник; 10 - клапаны; 11 - корпус барабана; 12 - основание барабана; 13 - поршень; 14 - тарелкодержатель; 15 - тарелки; 16 - крышка барабана; 17 - напорный диск; 18 - выводное устройство; 19 - труба центральная; 20, 21 - кольца затяжные; 22 - приемник шлама; 23 - шламное пространство; 24 - подшипник верхней опоры; 25 - пружина верхней опоры; 26 - вал вертикальный; 27 - опоры (рис. Н.А. Войнова)

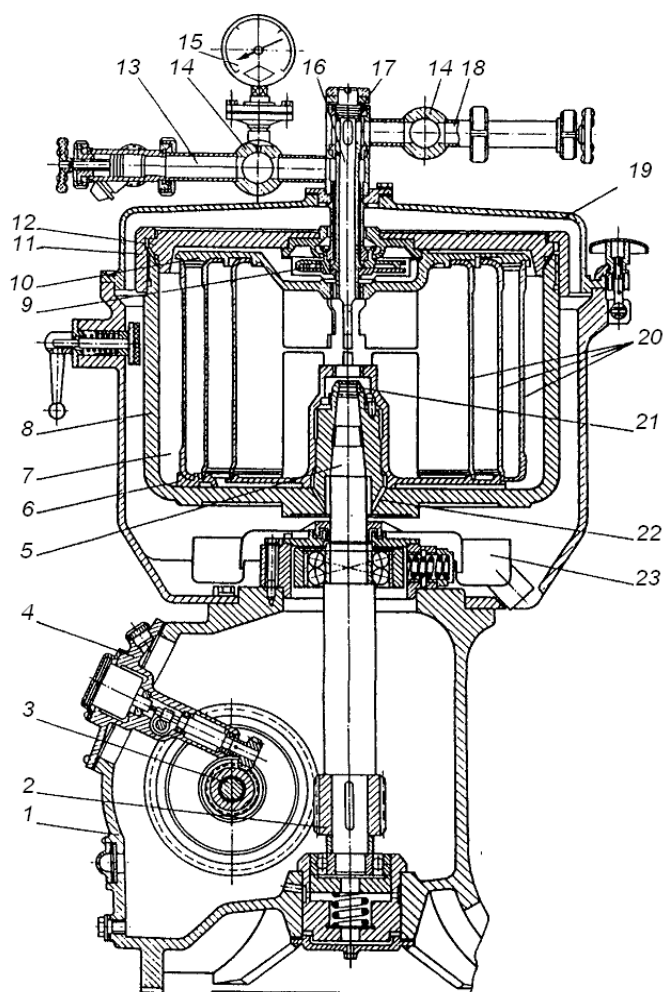


Рис. 10. Схеа камерного сепаратора: 1 – корпус; 2 – червячная пара; 3 – тахометр; 4 – бо-
бышка; 5 – вал; 6, 7, 8 – ротор в сборе; 9 – напорный диск; 10 – крышка; 11 – гайка; 12 – уплот-
нение; 13 – штуцер; 14 – кран; 15 – манометр; 16 – шток; 17 – подача суспензии; 18 – сгон; 19 –
корпус барабана; 20 – барабан; 21 – опора; 22 – нижняя опора; 23 – приемник осадка; (в): 1 –
статор; 20 – барабан

По технологическому назначению сепараторы делятся на три основных класса: сепараторы-разделители для разделения смеси жидкостей, не растворимых одна в другой, и для концентрирования суспензий и эмульсий; сепараторы-осветлители для выделения твердых частиц из жидкости; комбинированные сепараторы для выполнения двух или более операций переработки жидких смесей. Комбинированные сепараторы называют универсальными. К ним относятся сепараторы, в которых процесс разделения совмещается с каким-либо другим процессом (сепараторы-экстракторы, сепараторы-реакторы).

Вопросы для самоконтроля

1. Что понимают под центрифугированием? В каких случаях применяют этот метод для разделения?
2. В чем различие между фильтрующей маятниковой и осадительной центрифугами?

3. Какие центрифуги применяют в случаях, когда необходимы особенно тщательная промывка и сушка?
4. Области применения сепарирования. В каких случаях этот метод разделения эффективен?

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная литература

1. Биотехнология: теория и практика / Н.В. Загоскина и др. ; под ред. Н.В. Загоскиной, Л.В. Назаренко. – М.: «Оникс», 2009. – 496 с. – ISBN 978-5-488-02173
2. Клунова, С.М. Биотехнология: учебник / С.М. Клунова, Т.А. Егорова, Е.А. Живухина. – М.: Академия, 2010. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-6697-4
3. Сазыкин, Ю.О. Биотехнология / Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева; под ред. А.В. Катлинского. - М.: Академия, 2008. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-5506-0
4. Тарантул, В.З. Толковый биотехнологический словарь русско-английский: справочное издание [Электронный ресурс] / В.З. Тарантул. – М.: Языки славянских культур, 2009. – 936 с. – ISBN: 978-5-95-51-0342-6 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks.

Дополнительная литература

1. Биотехнология. Биобезопасность. Биоэтика / А.П. Ермишин и др.; под ред. А.П. Ермишина. – Минск: «Тэхнолoгiя», 2005. – 430 с.
2. Биотехнология: учебное пособие для вузов, в 8 кн., под ред. Егорова Н.С., Самуилова В.Д. – М., 1987.
3. Бирюков, В.В. Основы промышленной биотехнологии / В.В. Бирюков. – М.: КолосС, 2004. – 296 с. – ISBN 5-9532-0231-8 («КолосС»); ISBN 5-98109-008-1 (АНО «Химия»)
4. Блинов, В.А. Общая биотехнология: курс лекций. В 2-х частях. Ч. 1 / В.А. Блинов. – Саратов, 2003.
5. Блинов, В.А. Общая биотехнология: Курс лекций. В 2-х частях. Ч. 2. – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский СГАУ», 2004. – 144 с. – ISBN 5-7011-0436-2

ЛЕКЦИЯ 10

Оборудование для концентрирования

10.1. Концентрирование биомассы обезвоживанием

Характерной особенностью биотехнологических сред является сравнительно низкое содержание целевых продуктов в них. Например, концентрация биомассы при производстве дрожжей составляет 5–10 %, а при производстве бактериальных препаратов не превышает 1–2 %, что требует различного оборудования для концентрирования. Поэтому концентрирование биомассы сводится к обезвоживанию – удалению воды, содержащейся в веществе в свободном несвязанном состоянии. В зависимости от степени влажности, плотности вещества, размера твердых частиц, требований технологического характера в микробиологической промышленности применяют различные методы обезвоживания.

По энергетическому признаку выделяют два основных принципа обезвоживания: удаление из материала влаги без изменения агрегатного состояния в виде жидкости; удаление влаги с изменением агрегатного состояния, т.е. при фазовом превращении жидкости в пар. Первый принцип положен в основу механических способов обезвоживания (центрифугирование, сепарирование, и т.п.). Второй принцип обезвоживания (тепловая сушка) связан с затратами теплоты на фазовое превращение влаги. Выбор методов предварительного обезвоживания биомассы основан на комплексном анализе технологических свойств объекта. Так, для концентрирования суспензии микроорганизмов применяют сепарацию или осаждение; для отделения мицелия предпочтительно использовать коагуляцию с последующей фильтрацией жидкости; концентрирование растворов антибиотиков и аминокислот производят путем выпаривания с многократным использованием теплоты в многокорпусных выпарных аппаратах.

10.2. Центробежные выпарные пленочные аппараты

В микробиологической промышленности выпаривание применяют для концентрирования растворов, антибиотиков, ферментов, витаминов и т.п. Процесс выпаривания проводят при разрежении, при повышенном и атмосферном давлении. Выбор давления связан со свойствами выпариваемого раствора и возможностью использования тепла вторичного пара. Основное преимущество выпаривания под вакуумом заключается в том, что процесс можно проводить при более низких температурах по сравнению с другими вариантами. Это особенно важно при концентрировании термолабильных материалов микробиологической природы, склонных к термической инаktivации. Выпаривание нельзя рассматривать как чисто физический процесс, так как оно сопровождается нежелательными химическими превращениями вещества. Чем ниже температура нагрева и короче время нагрева, тем меньше происходит нежелательных побочных явлений. Первое условие обычно достигается применением вакуума и быстрым охлаждением при конденсации, второе значительно труднее, так как требует выпарных аппаратов, обеспечивающих быстрое испарение влаги из концентрируемого продукта. Этому требованию наиболее соответствует пленочные выпарные аппараты. Аппараты, в которых испарение растворителя происходит из тонкой

пленки жидкости, движущейся под действием центробежной силы по быстро вращающейся поверхности теплообмена, получили название *центробежных испарителей*

(рис.1). Из всех известных пленочных выпарных аппаратов центробежные испарители являются наиболее скоростными. Так, например, время контакта раствора с поверхностью теплообмена, необходимое для уменьшения его первоначального объема в пять раз, у испарителей с падающей пленкой составляет 300–600 с, роторных пленочных аппаратов – 20–30 с, центробежных испарителей – 1–3 с.

Испарители с вращающейся поверхностью теплообмена применяются в основном для концентрирования термолабильных и пенящихся растворов. В микробиологической промышленности они используются при упаривании ферментных растворов, чрезвычайно чувствительных к температурным воздействиям.

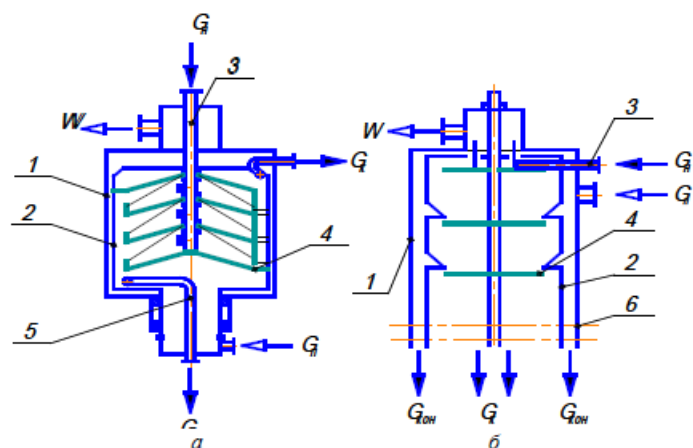


Рис. 7.17. Центробежный испаритель с вращающейся поверхностью теплообмена: 1 – неподвижный кожух; 2 – ротор; 3 – патрубок подачи раствора; 4 – вращающаяся пластина (конус); 5 – отводная трубка. Здесь и далее G_n , G_k – начальный и конечный расход суспензии; G_p , G_v – первичный и вторичный расход пара (рис. Н.А. Войнова)

10.3. Роторно-пленочные выпарные аппараты

При переработке вязких, термолабильных, кристаллизующихся сред весьма эффективны вертикальные *роторно-пленочные выпарные аппараты*, конструкции которых испарителей представлена на рис. 2. Исходный раствор подается на внутреннюю поверхность корпуса аппарата и при помощи лопастей вращающегося ротора транспортируется в виде пленки по нагреваемой поверхности. При этом происходит его кипение и испарение влаги.

Несмотря на сложность конструкции и относительно небольшую площадь поверхности теплообмена роторные пленочные аппараты по сравнению с испарителями других типов имеют ряд преимуществ. К ним относятся малое время пребывания жидкости в аппарате; пониженное пенообразование при выпаривании сильно пенящихся веществ; большое отношение начального расхода раствора к выходу конечного продукта; возможность упаривания вязких жидкостей и получения готового продукта в виде сухого порошка.

Основное преимущество роторно-пленочных испарителей заключается в возможности достижения более высоких значений степени выпаривания, которая представляет собой отношение массы испарившегося растворителя к исходной массе упариваемого раствора. Известны пленочные трубчатые испарители работающие при сравнительно низкой полезной разности температуры (3–6) °С по сравнению с традиционными аппаратами циркуляционного типа (10–20) °С. Они обеспечивают высокие коэффициенты теплоотдачи до 20 000 Вт/(м²·К), большую производительность по вторичному пару

200 кг/(ч·м²) и более, низкую температурную депрессию 1 °С, малое время обработки продукта (3–10 с).

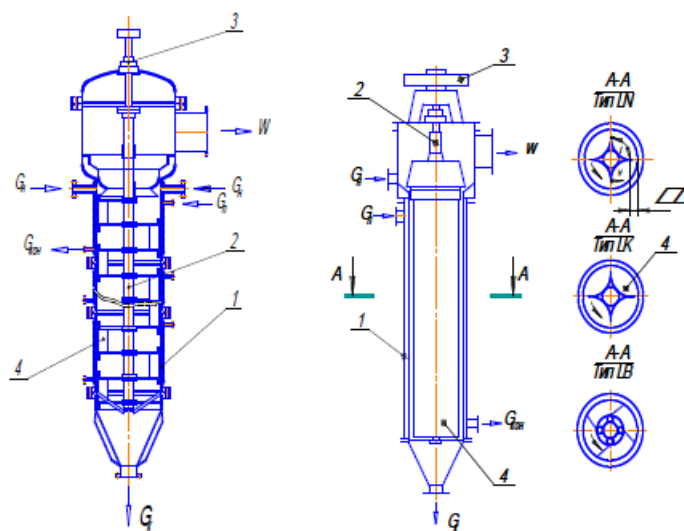


Рис. 7.18. Вертикальные роторно-плёночные испарители: 1 – корпус; 2 – вращающийся ротор; 3 – привод; 4 – лопасти (рис. Н.А. Войнова)

Пленочные аппараты наиболее перспективны при работе под вакуумом, так как их низкое гидравлическое сопротивление позволяет обеспечить высокую величину вакуума по высоте аппарата. А отсутствие гидростатического напора позволяет вести процесс кипения при постоянной низкой температуре.

10.4. Выпарные аппараты с восходящей пленкой

Для выпаривания маловязких растворов, в том числе пенящихся и не чувствительных к высоким температурам эффективнее всего установки с восходящей пленкой (рис. 3), в которых раствор транспортируется потоком вторичного пара в виде пленки по внутренней поверхности контактных труб.

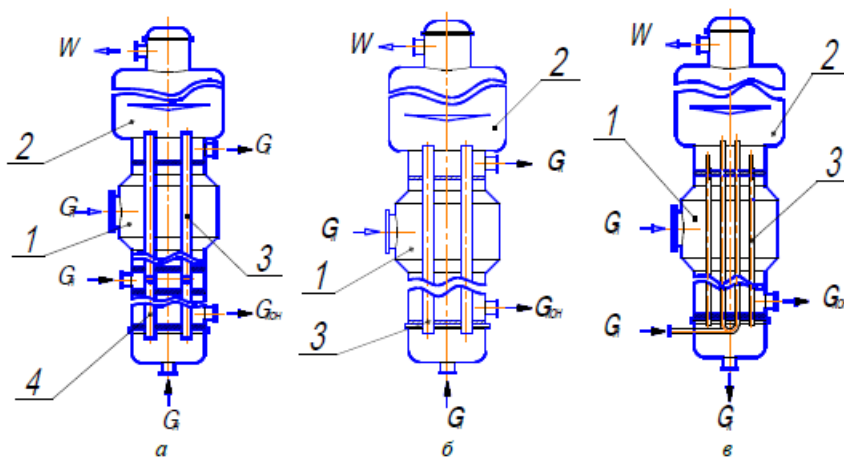


Рис. 7.19. Схемы пленочных испарителей с восходящей пленкой [5]: 1 – греющая камера; 2 – сепаратор; 3, 4 – контактные трубы (рис. Н.А. Войнова)

Достоинством аппаратов с поднимающейся пленкой является сравнительно небольшое время пребывания раствора в зоне высокой температуры. Основным их недостатком является наличие большой полезной разности температур (11–17) °С, чувстви-

тельность к изменению режима работы, застывание верхней части труб накипью и отложениями, сравнительно невысокая зона кипения, которая различна в каждой трубе и зависит от местной скорости нагревания. Для устранения накипи на поверхности труб предложена конструкция (рис. 3, б), в которой предусмотрены устройства для ввода дополнительного раствора во внутрь труб греющей камеры, где он распределяется потоком вторичного пара на поверхности, препятствуя тем самым оголению.

Известны *выпарные аппараты комбинированного типа* (рис. 3, в), где реализуется восходящее и нисходящее пленочное течение раствора, что позволяет получить в одном аппарате более концентрированный раствор. Однако при этом усложняется конструкция аппарата и увеличиваются его габариты. Поэтому наиболее предпочтительны выпарные аппараты со стекающей пленкой, которые можно разделить на прямоточные и противоточные.

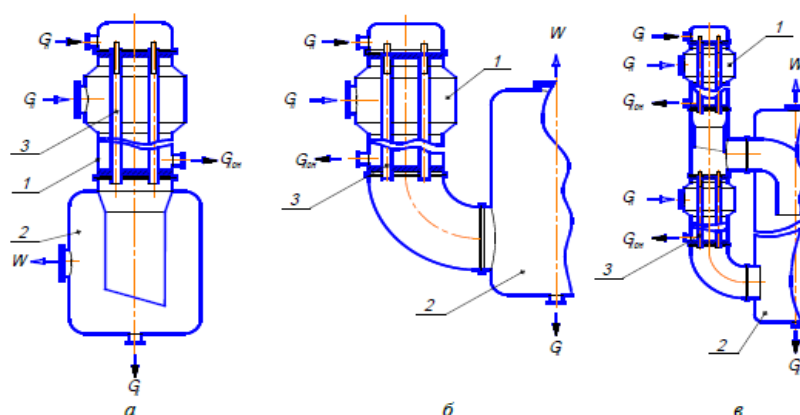


Рис. 7.20. Пленочные испарители с нисходящей пленкой [5]: 1 – греющая камера; 2 – сепаратор; 3 – контактные трубы (рис. Н.А. Войнова)

Наименьшим гидравлическим сопротивлением и наибольшей производительностью обладают *аппараты с нисходящей пленкой и прямоточным движением пара*, схемы конструкций, которых представлены на рис. 3. Работа испарителей со стекающей пленкой не зависит от местных скоростей кипения, и расходы в каждой трубке практически одинаковы, вне зависимости от скорости кипения и они работают в широком диапазоне производительности при малой разности температур. Общие эксплуатационные расходы, включающие пар, электроэнергию, охлаждающую воду и вторичный пар, у испарителей с нисходящей пленкой значительно ниже, по сравнению с испарителями с восходящей пленкой. С целью повышения производительности за счет увеличения длины цилиндрических труб греющей камеры разработаны испарители с выносным сепаратором (рис. 3, б). С целью снижения скорости пара в трубах разработан аппарат (рис. 3, в) с запасным отводом вторичного пара. Это позволяет частично снизить гидравлическое сопротивление аппарата, уменьшить температурную депрессию, увеличит производительность.

10.4. Пленочные трубчатые испарители со стекающей пленкой

Для достижения высокой производительности, особенно при работе под вакуумом, наиболее перспективны *пленочные трубчатые аппараты с нисходящим прямотоком и конденсацией вторичного пара* на поверхности центральных труб (рис. 4), в которых вследствие конденсации вторичного пара на поверхности центральных труб или змее-

виков увеличивается движущая сила процесса, снижается скорость вторичного пара по длине трубы. Это позволяет увеличить удельную тепловую нагрузку и расход рабочей жидкости, снизить гидравлическое сопротивление и тем самым обеспечить глубокий вакуум, высокую производительность по испаряемой влаге и низкую температурную депрессию.

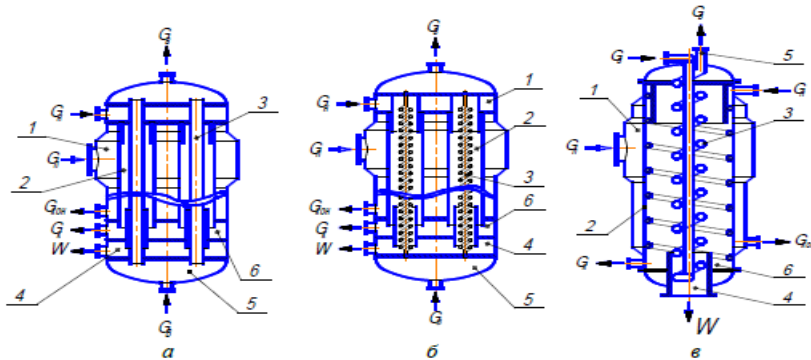


Рис. 7.21. Пленочные испарители со стекающей пленкой при конденсации вторичного пара на поверхности центральных труб [5]: 1 – корпус; 2 – контактные трубы; 3 – центральные трубы; 4 – патрубки для отвода конденсата вторичного пара; 5 – отвод хладагента; 6 – камера для вывода раствора (рис. Н.А. Войнова)

Вопросы для самоконтроля

1. Что подразумевается под «концентрированием» биомассы?
2. Основные принципы обезвоживания целевых продуктов микробиологических производств.
3. В каких случаях для обезвоживания используют выпаривание?
4. Основные типы выпарочных машин и принцип их действия.
5. Преимущества роторно-пленочных испарителей перед центробежными.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная литература

1. Биотехнология: теория и практика / Н.В. Загоскина и др. ; под ред. Н.В. Загоскиной, Л.В. Назаренко. – М.: «Оникс», 2009. – 496 с. – ISBN 978-5-488-02173
2. Клунова, С.М. Биотехнология: учебник / С.М. Клунова, Т.А. Егорова, Е.А. Живухина. – М.: Академия, 2010. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-6697-4
3. Сазыкин, Ю.О. Биотехнология / Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева; под ред. А.В. Катлинского. - М.: Академия, 2008. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-5506-0
4. Тарантул, В.З. Толковый биотехнологический словарь русско-английский: справочное издание [Электронный ресурс] / В.З. Тарантул. – М.: Языки славянских культур, 2009. – 936 с. – ISBN: 978-5-95-51-0342-6 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks.

Дополнительная литература

1. Биотехнология. Биобезопасность. Биоэтика / А.П. Ермишин и др.; под ред. А.П. Ермишина. – Минск: «Тэхнолoгiя», 2005. – 430 с.
2. Биотехнология: учебное пособие для вузов, в 8 кн., под ред. Егорова Н.С., Самуилова В.Д. – М., 1987.

3. Бирюков, В.В. Основы промышленной биотехнологии / В.В. Бирюков. – М.: КолосС, 2004. – 296 с. – ISBN 5-9532-0231-8 («КолосС»); ISBN 5-98109-008-1 (АНО «Химия»)
4. Блинов, В.А. Общая биотехнология: курс лекций. В 2-х частях. Ч. 1 / В.А. Блинов. – Саратов, 2003.
5. Блинов, В.А. Общая биотехнология: Курс лекций. В 2-х частях. Ч. 2. – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский СГАУ», 2004. – 144 с. – ISBN 5-7011-0436-2

ЛЕКЦИЯ 11

Оборудование для экстракции

11.1. Теоретические основы экстракционного метода

Экстракция – процесс избирательного извлечения одного или нескольких растворимых компонентов из твердых тел и растворов с помощью жидкого растворителя – экстрагента. Различают твердо-жидкостную и жидко-жидкостную типы экстракции. При твердо-жидкофазной экстракции вещество из твердой фазы переходит в жидкую, при жидко-жидкофазной – из одной жидкости в другую (например, хлорофилл из спиртовой вытяжки переходит в бензин). Жидко-жидкостную экстракцию органическими растворителями часто применяют для извлечения из культуральной среды антибиотиков, витаминов, каротиноидов, липидов. Витамин В₁₂ экстрагируют фенолом. Высокоспецифичным экстрагентом является бензиловый спирт. Такие фосфолипиды как фосфатидилэтанол и фосфатидилхолин извлекаются хлороформом.

Экстракционный метод выделения целевого продукта из нативного раствора основан на различной растворимости разных химических форм этого вещества в воде и органическом растворителе, не смешивающемся с водой. Основной закон экстракции – закон распределения Нернста:

$$K = \frac{C_0'}{C_0''}$$

где K – коэффициент распределения, C_0' – концентрация компонента в экстрагируемой жидкости; C_0'' – концентрация компонента в экстракте. Коэффициент распределения – это величина, определяемая опытным путем, показывает, во сколько раз равновесная концентрации вещества в экстракте больше, чем в обработанном растворе. Например, при экстракции пенициллина из нативного раствора бутилацетатом при температуре 0° С и рН 2,5 коэффициент распределения $K = 35$. Это означает, что при остаточном содержании пенициллина в нативном растворе 200 ЕД/мл, равновесная активность бутилацетатного экстракта составляла 7000 ЕД/мл. Это позволяет одновременно и концентрировать целевой продукт и очищать его от сопутствующих примесей.

11.2. Способы повышения эффективности экстракции

Эффективность экстракции может быть повышена за счет повторной экстракции свежим экстрагентом, выбором оптимального растворителя, нагреванием экстрагирующего агента или экстрагируемой жидкости, понижением давления в аппарате для экстракции.

Экстракция хлороформом используется при выделении из бактериальной биомассы полигидроксиалканоатов (ПГА). Существует несколько подходов для извлечения ПГА из клеток. Сырую биомассу, собранную центрифугированием, заливают 20 объемами хлороформа и оставляют на 15–20 ч в ёмкости при комнатной температуре при периодическом перемешивании. Далее разделяют биомассу и хлороформ с полимером в делительной воронке, нижний слой хлороформа собирают, а остаток биомассы еще трижды экстрагируют хлороформом для усиления полноты экстракции. Второй подход, используемый в лабораторных условиях: предварительно лиофилизированная биомасса закладывается в патрон аппарата «Сокслет» и полимер экстрагируется хлороформом в течение нескольких часов. В колбу заливается экстрагент, обычно органический раствори-

тель. При нагревании колбы растворитель испаряется, его пары поднимаются вверх, конденсируются на холодильнике, и растворитель попадает в патрон с пробой. После заполнения патрона до определенного объема растворитель с экстрагируемым веществом сливается в колбу, и процесс многократно повторяется.

Во многих случаях процесс нагревания может быть губительным для целевого продукта. Для предотвращения этого используется криоэкстракция, которая осуществляется растворителями, кипящими при низких температурах и находящимися при комнатной температуре в газообразном состоянии.

Для экстракции неполярных соединений используют жидкий пропан или бутан. При последующем осторожном нагревании до 0 °С растворитель улетучивается, и остается продукт в чистом виде.

Адсорбция – частный случай экстракции, когда экстрагируемый агент – твердое тело. Адсорбция применяется для веществ, имеющих функциональные группы, заряжены положительно или отрицательно. В качестве адсорбента используют иониты на основе целлюлозы: катионит – карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ); анионит – диэтиламиноэтилцеллюлоза (ДЭАЭ), а также сефадексы на основе декстрана и т.д. Адсорбция идет по ионообменному механизму.

11.3. Оборудование для экстракции

Классическим примером применения экстракционного метода в системе жидкость-жидкость для выделения и очистки продуктов микробного синтеза является схема получения пенициллина, в которой наряду с ферментаторами предусмотрены и экстракторы в виде экстракторов-сепараторов. Как правило в процессе ферментации в производстве пенициллина их несколько.

Нативный раствор, содержащий бензилпенициллин из сборника поступает на первую экстракцию бутилацетатом. Экстракция – это массообменный процесс, и он протекает тем быстрее, чем интенсивнее входят в соприкосновение друг с другом несмешивающиеся жидкости. Поэтому предварительно проводят эмульгирование, при этом образующаяся эмульсия хорошо разделяется в сепараторе. В связи с тем, что нативный раствор содержит большое количество поверхностно-активных веществ белковой природы, в процессе экстракции образуются весьма стойкие, трудноразделяемые эмульсии. Это требует применения специальных веществ – дезэмульгаторов, действие которых основано на том, что они вытесняют белковые вещества из межфазной поверхности, образуя пленки на границе раздела фаз (между водой и бутилацетатом).

Экстракцию проводят при pH 2,8-3,0 и температуре 10⁰ С, при предварительном подкислении нативного раствора серной кислотой для подавления диссоциации пенициллина по карбоксильной группе.

Вторую (двухступенчатую) экстракцию проводят раствором бикарбоната натрия при pH 7,3-7,8. В этих условиях оставшийся после первой экстракции бутилацетатом в нативном растворе пенициллин находится в диссоциированном состоянии и поэтому хорошо растворяется в воде, но не растворяется в органической фазе.

В лабораторных условиях для осуществления экстракции используются аппараты Сокслета.

Вопросы для самоконтроля

1. Определение экстракции и ее виды. Основной закон экстракции.

2. Какой вид экстракции используют для извлечения из культуральной жидкости антибиотиков, витаминов?
3. Физический смысл закона распределения Нернста.
4. Способы повышения эффективности экстракции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная литература

1. Биотехнология: теория и практика / Н.В. Загоскина и др. ; под ред. Н.В. Загоскиной, Л.В. Назаренко. – М.: «Оникс», 2009. – 496 с. – ISBN 978-5-488-02173
2. Клунова, С.М. Биотехнология: учебник / С.М. Клунова, Т.А. Егорова, Е.А. Живухина. – М.: Академия, 2010. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-6697-4
3. Сазыкин, Ю.О. Биотехнология / Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева; под ред. А.В. Катлинского. - М.: Академия, 2008. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-5506-0
4. Тарантул, В.З. Толковый биотехнологический словарь русско-английский: справочное издание [Электронный ресурс] / В.З. Тарантул. – М.: Языки славянских культур, 2009. – 936 с. – ISBN: 978-5-95-51-0342-6 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks.

Дополнительная литература

1. Биотехнология. Биобезопасность. Биоэтика / А.П. Ермишин и др.; под ред. А.П. Ермишина. – Минск: «Тэхнолoгiя», 2005. – 430 с.
2. Биотехнология: учебное пособие для вузов, в 8 кн., под ред. Егорова Н.С., Самуилова В.Д. – М., 1987.
3. Бирюков, В.В. Основы промышленной биотехнологии / В.В. Бирюков. – М.: КолосС, 2004. – 296 с. – ISBN 5-9532-0231-8 («КолосС»); ISBN 5-98109-008-1 (АНО «Химия»)
4. Блинов, В.А. Общая биотехнология: курс лекций. В 2-х частях. Ч. 1 / В.А. Блинов. – Саратов, 2003.
5. Блинов, В.А. Общая биотехнология: Курс лекций. В 2-х частях. Ч. 2. – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский СГАУ», 2004. – 144 с. – ISBN 5-7011-0436-2

ЛЕКЦИЯ 12

Баромембранное разделение и очистка

12.1. Технологические особенности мембранного разделения неоднородных систем

Мембранная технология - новый принцип организации и осуществления процесса разделения веществ через полупроницаемую перегородку, отличающийся отсутствием поглощения разделяемых компонентов и низкими энергетическими затратами на процесс разделения.

Мембранные технологии интенсивно используются во многих отраслях. В химической промышленности - для разделения эмульсий и концентрирования растворов, отделения высокомолекулярных продуктов от низкомолекулярных, разделение смесей газов и т.д. В медицинской промышленности мембраны позволяют выделять и очищать вакцины, используются в аппаратах типа “искусственное лёгкое”. В пищевой промышленности мембранные технологии применяются для концентрирования соков, приготовления высококачественного сахара, получения высококачественных белков из отходов молочного производства и т.д.

По сравнению с традиционными процессами разделения неоднородных систем мембранная технология выгодно отличается высокой энерго- и ресурсоэкономичностью, простотой аппаратного оформления, экологической чистотой.

В наиболее общем виде мембрану определяют как область, разграничивающую две фазы. Слово “мембрана” имеет латинское происхождение (*membrana*) и означает кожа, перепонка. В технологии под словом “мембрана” мы будем понимать перегородку, обладающую различной проницаемостью по отношению к отдельным компонентам жидких и газовых неоднородных смесей.

12.2. Основы мембранных технологий

При внешнем сходстве процессов фильтрования и мембранного разделения (рис. 7.1) между этими процессами есть принципиальное отличие. В ходе фильтрования хотя бы один из компонентов газовой или жидкой смеси задерживается и фиксируется внутри фильтрующей перегородки. Это приводит к тому, что перегородка постепенно забивается и осуществление процесса фильтрования на ней без очистки делается практически невозможным. В отличие от фильтра мембрана не фиксирует в себе ни один из компонентов разделяемой жидкой или газовой смеси, а только делит первоначальный поток на два, один из которых обогащён по сравнению с исходным каким-то компонентом. Такой принцип действия мембраны делает её способной к практически неограниченному сроку службы, без заметного изменения в эффективности разделения смесей.

12.3. Классификация мембранных материалов и механизм действия.

Области применения

В качестве основных признаков классификации мембран рассматривают: материал, из которого они изготовлены; структуру; механизм мембранного действия и области применения мембран.

В зависимости от материала, из которого изготавливают мембраны, их делят на полимерные, металлические, стеклянные, керамические или композиционные.

По структуре мембраны делят на пористые и сплошные. Примерами пористых могут служить прессованные порошки металлов, керамики, стекла и полимеров, подвергнутые специальной обработке. К сплошным мембранам относят металлические, стеклянные и полимерные плёнки, трубки, полые структуры и т.д.

По механизму мембранного действия различают диффузионные, адсорбционные и ионообменные мембраны.

В зависимости от области применения выделяют мембраны для обессоливания воды, для получения питьевой воды и воды высокой степени чистоты, для очистки сточных вод, для фармацевтической и микробиологической промышленности, для медицины, пищевой промышленности, для замкнутых систем жизнеобеспечения, для разделения органических смесей и т.д.

Приведённая классификация мембран, не претендуя на полноту, даёт представление о многообразии мембранных процессов и сложности выбора подходящей мембраны для решения конкретной задачи.

12.4. Обратный осмос, ультрафильтрация, микро- и нанофильтрация

К баромембранным процессам водоподготовки, осуществляемым под действием перепада давления через разделительную полупроницаемую мембранную перегородку в интервале температур 5–30 °С, относятся обратный осмос, ультрафильтрация, микрофильтрация и нанофильтрация. Принцип их действия основан на том, что под влиянием внешнего давления молекулы растворителя (вода) и ионы некоторых растворенных веществ (солей) проходят через полупроницаемую мембрану, тогда как другие молекулы или заряженные ионы в различной мере задерживаются мембраной или не проходят сквозь нее.

Разделение вещества и растворителя (вода) с помощью полупроницаемых мембран является результатом конкурирующих взаимодействий компонентов смеси (водных растворов) с поверхностью мембраны и обусловлено градиентом давления, разностью химических потенциалов и концентрации. Эффективность разделения определяется следующими основными показателями:

– селективностью $s = 1 - c_2/c_1$, где c_1 и c_2 – концентрации компонентов исходной смеси (растворенных в воде солей) и пермеата (чистой воды на выходе);

- коэффициентом разделения $K_p = (c_{A,1}/c_{A,2})/(c_{B,1}/c_{B,2})$, где $c_{A,1}$, $c_{B,1}$ и $c_{A,2}$, $c_{B,2}$ – концентрации компонентов А и В в исходном растворе и пермеате;

-проницаемостью (удельной производительностью) мембран $G = V/Ft$, где V – количество смеси, прошедшей за время t через мембрану, определяемое по уравнению $V^2 + 2VC = Kt$, где C и K – эмпирические константы, а F – площадь поверхности мембраны.

Рабочее давление для различных баромембранных процессов принимается в пределах 0,1–20 МПа. При слишком низком давлении процесс замедляется. При слишком высоком давлении мембрана может разорваться, засориться присутствующими в воде примесями или пропускать слишком большое количество растворенных солей. Для предотвращения этого вдоль мембраны создается принудительный поток воды, смывающий концентрат в дренаж.

Наряду с давлением концентрация растворенных солей в воде является важным фактором, определяющим возможность осуществления всех баромембранных процессов, которые эффективно используют при концентрациях электролитов в воде от 5 до

20 масс.%. Для водных растворов органических соединений интервал концентраций шире и определяется молекулярной массой, формой и размерами молекул вещества, их строением и степенью взаимодействия с материалом мембраны. От концентрации растворенных солей зависит также способность многих из них, например катионов двух- и трех- валентных металлов и перхлоратов, к сольватации (в случае водных растворов к гидратации), которая нарушает структуру мембран вследствие их обезвоживания и приводит к снижению основных рабочих характеристик. Из-за различных скоростей прохождения компонентов смеси через мембрану происходит концентрационная "поляризация", при которой в пограничном слое около поверхности мембраны накапливается вещество, имеющее наименьшую скорость проникновения через мембрану, а молекулы растворителя (вода) и некоторые одновалентные ионы свободно проникают через мембрану.

12.5. Химическая стойкость мембран

Баромембранные процессы определяются и другими факторами, например, химической стойкостью мембраны к агрессивным средам, термоустойчивостью и воздействию микроорганизмов. Химическая стойкость мембран, например, к гидролизу обеспечивается тщательным подбором материала, характеристик рабочей водной среды и условий проведения процесса. Для предотвращения биологического обрастания и разрушения мембраны некоторыми видами микроорганизмов и микроводорослей, обрабатываемую воду предварительно хлорируют хлором или гипохлоритами, а также подвергают озонированию и УФ облучению.

Баромембранные процессы используются во многих отраслях промышленности: для опреснения соленых и очистки сточных вод, разделения азеотропных водных смесей, концентрирования водных растворов (обратный осмос); для очистки сточных вод от тяжелых металлов и высокомолекулярных органических соединений, концентрирования водных суспензий, латексов, выделения и очистки биологически активных соединений, вакцин, вирусов, очистки крови (нанофильтрация), концентрирования молока, фруктовых и овощных соков и др. (ультрафильтрация); для очистки технологических растворов и воды от тонкодисперсных веществ, разделения эмульсий, предварительной водоподготовки и умягчения, например морской и солоноватых вод перед опреснением (микрофильтрация), и др.

Интерес к баромембранным методам разделения способствует совершенствованию и разработке новых технологических схем водообработки, а также созданию новых мембран и установок, рассмотренных ниже.

12.6. Мембраны для баромембранных процессов

Мембраны по своей структуре подразделяются на монолитные (сплошные), пористые, асимметричные (двухслойные), составные (композиционные), диффузионные, а также ионообменные мембраны. Пористые мембраны применяются в процессах обратного осмоса, микрофильтрации и ультрафильтрации. Они имеют как изотропную (однородную), так и анизотропную (неоднородную) структуру. Мембраны с анизотропной структурой имеют поверхностный тонкопористый слой толщиной 0,25–0,5 мкм (т. н. активный или селективный слой), представляющий собой селективный фильтр. Крупнопористый слой толщиной около 100–200 мкм, находящийся под активным слоем, служит подложкой, повышающей механическую прочность мембраны. Мембраны с

анизотропной структурой характеризуются высокой удельной производительностью, отсутствием закупорки пор в процессе их эксплуатации. Срок службы этих мембран определяется химической устойчивостью материала мембраны. В отличие от мембран с анизотропной структурой, для мембран с изотропной структурой характерно быстрое снижение проницаемости вследствие закупорки пор коллоидными или взвешенными частицами в составе разделяемых водных растворов.

Диффузионные мембраны по структуре являются не пористыми. Они представляют собой квазигомогенные гели, через которые растворитель и растворенные вещества проникают под действием градиента концентраций (молекулярная диффузия). Скорость прохождения молекул через диффундирующую мембрану прямо пропорциональна коэффициенту диффузии, который определяется размерами молекул и их формой. Скорость зависит и от энергии активации при взаимодействии переносимых частиц, молекул и заряженных ионов с материалом мембраны, а также от подвижности отдельных составляющих мембранной матрицы и от свойств диффундирующих компонентов раствора. При этом скорость диффузии тем выше, чем слабее связаны между собой отдельные составляющие полимерного материала в гелевом слое, т. е. чем сильнее набухает в воде материал мембраны. Поэтому диффузионные мембраны наиболее эффективны для разделения компонентов, имеющих практически одинаковые свойства, но различающихся размерами и формой молекул. Диффузионные мембраны имеют большое гидродинамическое сопротивление, поэтому их применяют для разделения газов и жидких смесей методом испарения через мембрану в виде ультратонких пленок толщиной 0,02–0,04 мкм, закрепленных на пористых подложках. Процесс используют для разделения азеотропных смесей, водных растворов карбоновых кислот, кетонов и аминов, для смещения равновесия в химических реакциях за счет удаления одного из продуктов из системы (например, воды при этерификации), очистки сточных вод и др.

В зависимости от типа баромембранных процессов применяются как пористые, так и диффузионные мембраны, которые изготавливаются листовыми, трубчатыми либо в виде полых волокон внутренним диаметром 20–100 мкм при толщине стенки 10–50 мкм. Мембраны также изготавливаются на пористых носителях (подложка) различной конфигурации (так называемые композитные, или комбинированные мембраны).

При изготовлении мембран применяют различные материалы: керамику, полимерные пленки, стекло, металлическую фольгу и др. В зависимости от механической прочности используемых материалов, мембраны подразделяют на уплотняющиеся (полимерные) и с жесткой структурой (керамика).

12.7. Факторы, влияющие на селективность и проницаемость мембран

Селективность и проницаемость мембран определяются рабочей температурой, давлением, рН, концентрацией растворенных в воде солей. С повышением температуры вследствие снижения вязкости раствора проницаемость мембраны возрастает, а селективность изменяется в зависимости от природы растворенных компонентов: соответственно увеличивается или уменьшается при разделении водных растворов неполярных и полярных соединений. Помимо этого, при высокой температуре происходит постепенное уплотнение (усадка) мембран, что снижает их ресурс. С повышением давления проницаемость (удельная производительность) мембраны проходит через максимум, а селективность, как правило, возрастает. Под действием рабочего давления мембраны также уплотняются, что способствует уменьшению проницаемости, но практически не вызывает изменения селективности разделения. Скорость уплотнения мембраны не-

сколько снижается, если процесс осуществляется при небольших температуре и давлении или при использовании композитных мембран.

Мембраны, используемые в баромембранных процессах водоподготовки должны удовлетворять следующим техническим требованиям:

- иметь анизотропное строение и тонкое распределение пор по размерам;
- высокую проницаемость (удельную производительность) и механическую прочность;
- химическую стойкость к воздействию среды, регенерирующим и стерилизующим реагентам;
- стабильность рабочих характеристик во времени;
- отсутствие выноса материала мембраны в фильтрат;
- низкую стоимость.

В процессе эксплуатации поверхность мембран загрязняется, что приводит к резкому ухудшению показателей баромембранных процессов. Для снижения степени загрязнения мембран применяются специальные методы очистки, которые подразделяются на механические, гидромеханические, физические и химические. Механические методы заключаются в обработке поверхности перегородок эластичной губкой с применением моющих средств, полиуретановыми гранулами и др. Гидродинамическая очистка заключается в воздействии на загрязненную поверхность мембраны пульсаций промывной жидкости (обычно воды), турбулизацией потока, промывкой газожидкостной эмульсией (смесью воды и воздуха), обратной продувки мембраны сжатым воздухом, резким снижением (пульсацией) давления в системе (загрязнения отслаиваются от перегородки и вымываются потоком воды). К физическим методам относятся воздействие на перегородки электрическими, магнитными и ультразвуковыми полями. Химическая очистка заключается в промывке рабочей поверхности мембран разбавленными растворами кислот или щелочей, раствором йода и др.

12.8. Мембранные процессы

В зависимости от агрегатного состояния разделяемой смеси, движущей силы процесса разделения, размеров частиц компонентов и механизма разделения различают несколько разновидностей мембранных процессов:

- диффузионное разделение газов;
- разделение жидкостей методом испарения через мембрану;
- баромембранные процессы разделения жидких смесей;
- электродиализ.

Диффузионное разделение газов основано на различной проницаемости мембран для отдельных газовых смесей. В качестве мембран для осуществления диффузионного разделения газовых смесей используются как сплошные, так и пористые мембраны с размерами пор меньшими, чем длина свободного пробега молекул газов при заданном давлении. Движущей силой процессов диффузии компонентов является разность их концентраций на противоположных поверхностях мембраны.

Диффузионное разделение газов сегодня является наиболее крупномасштабным и экономичным методом и широко используется для получения урана-235, являющегося ядерным топливом, широко используется для создания аппаратов “искусственное лёгкое”, при производстве водорода, выделении гелия из состава природных и нефтяных газов, является перспективным для выделения кислорода из воздуха, удаления диоксида углерода, воды и других компонентов из газоздушных смесей в системах жизнеобеспечения людей в замкнутых пространствах, для создания контролируемой атмо-

сферы, обогащённой диоксидом углерода, при хранении овощей и фруктов. Весьма перспективным является применение мембранных процессов для очистки газовых выбросов от диоксида серы. Решение этой задачи позволило бы внести существенный вклад в защиту окружающей среды и получать продукты, необходимые для народного хозяйства.

Разделение жидкостей методом испарения через мембрану основано на различной диффузионной проницаемости мембран для паров веществ. Движущей силой процесса является разность концентраций или давлений. Смесь жидкостей, находящихся в контакте с мембраной, нагревают, а пары, проникающие через мембрану, отводят с помощью вакуумирования или потоком инертного газа. Наиболее широко этот метод применяется при разделении азеотропных смесей, а также смесей веществ, имеющих невысокую термическую стабильность. Так, в полупромышленном масштабе осуществлено разделение водных растворов изопропилового, н-пропилового и н-бутилового спиртов, разделение смесей пиридин-вода, водных растворов капролактама, смеси изопропанола, этанола и воды.

Баромембранные процессы разделения жидких смесей на практике осуществляются под избыточным давлением и поэтому объединены в группу баромембранных.

Установки, работающие на принципе баромембранного разделения, уже сегодня широко используются для обессоливания морской и солёной вод, очистки сточных вод, извлечения ценных компонентов из разбавленных растворов, в пищевой промышленности для концентрирования сахарных сиропов, фруктовых и овощных соков, растворимого кофе, для получения ультрачистой воды для электронной промышленности, медицины и фармацевтики.

12.9. Мембранная фильтрация

Если мембранный процесс применяют для отделения от идеального раствора крупных коллоидных или взвешенных микрочастиц размером $0,1 \dots 10$ мкм, то его называют микрофильтрацией или мембранной фильтрацией.

Микрофильтрация нашла широкое применение в микробиологической промышленности при концентрации водных растворов ферментов, белков, нуклеиновых кислот, полисахаридов и других веществ в химической, пищевой и целлюлозно-бумажной промышленности для очистки сточных вод.

Микрофильтрация используется для концентрирования тонких суспензий, осветления растворов, очистки сточных и природных вод при проведении обессоливания морской воды.

12.10. Электродиализ

Электролиз можно определить как перенос ионов через мембрану под действием электрического тока. При наличии мембран, избирательно пропускающих одни ионы и задерживающих другие, можно решать многочисленные задачи выделения ценных компонентов из растворов, обессоливания воды, снижения жёсткости, электролиза растворов. Среди наиболее перспективных областей применения электродиализа, наряду с отмеченными перечислим концентрирование сбросных карбонат-сульфатных растворов и возврат их в технологический цикл; регенерацию растворов в гальванических производствах; очистку хлор- и медьсодержащих сточных вод, очистку сточных вод в производстве аммиачной селитры; деминерализацию глицерина на предприятиях, вы-

рабатывающих туалетное мыло из нейтральных жиров; получение лимонной кислоты и многих химических реактивов.

Вопросы для самоконтроля

1. Сформулируйте основной принцип мембранного разделения.
2. Классификация мембранных материалов и механизм действия.
3. Области применения мембранных технологий.
4. Какой процесс называется микрофильтрацией и каковы области ее применения?
5. Что такое электродиализ и где применяется?
6. Что такое адсорбция? В каких случаях она используется?

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная литература

1. Биотехнология: теория и практика / Н.В. Загоскина и др. ; под ред. Н.В. Загоскиной, Л.В. Назаренко. – М.: «Оникс», 2009. – 496 с. – ISBN 978-5-488-02173
2. Клунова, С.М. Биотехнология: учебник / С.М. Клунова, Т.А. Егорова, Е.А. Живухина. – М.: Академия, 2010. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-6697-4
3. Сазыкин, Ю.О. Биотехнология / Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева; под ред. А.В. Катлинского. - М.: Академия, 2008. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-5506-0
4. Тарантул, В.З. Толковый биотехнологический словарь русско-английский: справочное издание [Электронный ресурс] / В.З. Тарантул. – М.: Языки славянских культур, 2009. – 936 с. – ISBN: 978-5-95-51-0342-6 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks.

Дополнительная литература

1. Биотехнология. Биобезопасность. Биозтика / А.П. Ермишин и др.; под ред. А.П. Ермишина. – Минск: «Тэхнолoгiя», 2005. – 430 с.
2. Биотехнология: учебное пособие для вузов, в 8 кн., под ред. Егорова Н.С., Самуилова В.Д. – М., 1987.
3. Бирюков, В.В. Основы промышленной биотехнологии / В.В. Бирюков. – М.: КолосС, 2004. – 296 с. – ISBN 5-9532-0231-8 («КолосС»); ISBN 5-98109-008-1 (АНО «Химия»)
4. Блинов, В.А. Общая биотехнология: курс лекций. В 2-х частях. Ч. 1 / В.А. Блинов. – Саратов, 2003.
5. Блинов, В.А. Общая биотехнология: Курс лекций. В 2-х частях. Ч. 2. – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский СГАУ», 2004. – 144 с. – ISBN 5-7011-0436-2

ЛЕКЦИЯ 13

Хроматографические методы разделения и концентрирования

13.1. Физический смысл и методы хроматографии

Хроматография (от греч. *chroma*, родительный падеж *chromatos* – цвет, краска и -*графия*) – физико-химический метод разделения и анализа смесей, основанный на распределении их компонентов между двумя фазами – неподвижной и подвижной (элюент), протекающей через неподвижную. По технике выполнения хроматографию подразделяют на колоночную, когда разделение веществ проводится в специальных колонках, и плоскостную: тонкослойную (ТСХ) и бумажную.

13.2. Тонкослойная хроматография (ТСХ)

В ТСХ разделение проводится в тонком слое сорбента, в бумажной – на специальной бумаге. При этом ТСХ является одним из наиболее простых и эффективных экспресс-методов разделения и анализа веществ, не требующих сложного оборудования. В то же время метод обладает высокой избирательностью и чувствительностью (низким пределом обнаружения). В зависимости от природы подвижной фазы (ПФ), тонкослойная хроматография может быть адсорбционной и распределительной. Наиболее широко применим в ТСХ первый вариант разделения. Неподвижная твердая фаза (оксид алюминия, силикагель и др.) тонким слоем наносится на стеклянную, металлическую (алюминиевая фольга) или пластмассовую пластинку, закрепляется слой с помощью крахмала или гипса (иногда используют пластинки с незакрепленным слоем). Для хроматографирования могут использоваться готовые пластинки, выпускаемые промышленностью, размером 5x15 или 20x20 см. На расстоянии 2 см от края пластинки на стартовую линию с помощью микропипетки или микрошприца наносят пробы анализируемого раствора (диаметр пятен 3–5 мм). После испарения растворителя край пластинки помещают в стеклянную камеру, на дно которой налит растворитель (ПФ) в количестве, достаточном для образования слоя глубиной 0,5 см. Камеру закрывают крышкой. Выбор растворителя (ПФ) зависит от природы сорбента и свойств анализируемых соединений. Например, разделение хлорорганических пестицидов на пластинке с силикагелем проводят в среде гексана. Часто применяют смеси растворителей из двух или трех компонентов. При хроматографировании растворитель движется снизу вверх (восходящий вариант) вдоль слоя сорбента и с разной скоростью переносит компоненты смеси, что приводит к их пространственному разделению. После окончания хроматографического процесса пластинку вынимают из камеры, отмечают линию фронта растворителя (обычно около 10 см) и высушивают. Если компоненты смеси окрашены, то они четко видны на пластине после разделения. Неокрашенные соединения обнаруживают различными способами. Если пластину поместить в камеру с парами йода, то четко проявляются коричневые пятна для органических соединений с неопредельными связями.

Хроматограмму можно проявить, опрыскивая ее каким-либо реагентом, дающим с компонентами пробы окрашенные соединения. В состав нанесенного слоя в готовые пластины часто вводят люминофор. При облучении такой пластины ультрафиолетовым (УФ) светом она флуоресцирует, а разделенные компоненты пробы видны в виде тем-

ных пятен. Вещества, имеющие собственную флуоресценцию, также обнаруживают в УФ-свете (например, пестициды).

Идентификацию веществ на хроматограмме осуществляют по характеру окраски пятен, параметру удерживания R_f и с помощью стандартных веществ (свидетелей).

Величина R_f рассчитывается из экспериментальных данных по уравнению:

$$R_f = a/b,$$

Для количественного разделения широкое распространение получил способ экстрагирования компонентов из зон подходящим растворителем. При применении этого способа на хроматограмму наносят стандартный раствор и раствор пробы. После получения хроматограммы производят ее обработку, детектируя зону стандарта, вырезают часть хроматограммы с зоной компонента пробы и производят его экстрагирование подходящим растворителем. Полученный раствор упаривают и выделяют из него нужное вещество, либо анализируют инструментальным методом, имеющим высокую чувствительность.

13.3. Хроматография на бумаге

По механизму разделения различают распределительную, адсорбционную, осадочную и другие виды бумажной хроматографии (БХ). В распределительной жидкостно-жидкостной хроматографии бумага, приготовленная из специальных сортов хлопка, выполняет роль носителя неподвижной жидкой фазы (НФ), в качестве которой часто выступает вода, адсорбированная парами бумаги. В таком случае гидрофильная бумага используется для нормально-фазовой хроматографии. Растворителями – подвижной фазой (ПФ) - являются спирты (метанол, этанол, н-пропанол, бутанол), простые эфиры (этиловый, метиловый), кетоны (ацетон, ацетил-ацетон), эфиры органических кислот (метилацетат, этилацетат), пиридин, хлороформ. Чаще используют смеси растворителей.

Для разделения некоторых органических веществ используют метод обращенных фаз. В этом методе для придания бумаге гидрофобного характера ее импрегнируют (пропитывают) нафталином, парафином, раствором каучука, силиконом и др. Такая бумага служит носителем для неполярных растворителей в качестве НФ. В качестве ПФ применяют смеси кислот с низшими спиртами. Обращенно-фазовая бумажная хроматография используется, например, для разделения и идентификации полиненасыщенных жирных кислот при изучении состава липидов, выделенных из животных и растительных тканей.

По направлению движения элюента (ПФ) различают восходящую, нисходящую и радиальную (круговую) хроматографию. Если элюент движется по бумаге вверх, метод называют восходящей бумажной хроматографией; при его движении сверху вниз – нисходящей бумажной хроматографией.

Очень быстро можно осуществить хроматографический анализ методом радиальной бумажной хроматографии, в котором используется бумажный круг с фитилем, опущенным в элюент. Иногда при сложном составе пробы не удается разделить ее компоненты с помощью одного растворителя. Тогда применяют двумерную хроматографию. В угол квадратного листа хроматографической бумаги наносят раствор пробы и хроматографируют сначала в одном элюенте, затем, повернув хроматограмму на 90 град, – в дру-

гом. Первый элюент производит предварительное разделение компонентов пробы, второй – окончательное.

Для проведения хроматографии на бумаге используют стеклянные герметизированные камеры. Внутри камеры в верхней (нисходящий вариант) или нижней ее части (восходящий вариант) помещают сосуд для подвижной фазы (лодочку). Радиальную хроматографию можно осуществить в чашке Петри. Детекцию зон, идентификацию и количественное определение в БХ проводят так же, как и в методе тонкослойной хроматографии.

13.4. Колоночная хроматография

В этом случае анализируемую смесь в виде раствора пропускают через колонку (чаще всего, стеклянную), содержащую твердый пористый матрикс. В результате взаимодействия с матриксом различные молекулы проходят через колонку с различной скоростью. После того как они достигнут в определенной последовательности дна колонки, их собирают отдельными фракциями.

В настоящее время разработано и применяется множество матриксов различных типов, используя которые, можно делить продукты согласно их заряду (ионообменная хроматография), гидрофобности (гидрофобная хроматография), размеру (хроматография гель-фильтрацией) или способности связываться различными химическими группами (аффинная хроматография).

13.5. Ионообменная хроматография

Ионообменная хроматография (ИХ) является разновидностью жидкостной хроматографии и в аппаратном оформлении ничем не отличается от других видов жидкостной колоночной хроматографии.

В основе ионообменной хроматографии лежит процесс обмена между ионами анализируемого раствора (ПФ) и подвижными ионами того же знака ионообменника (НФ) (рис. 6.).

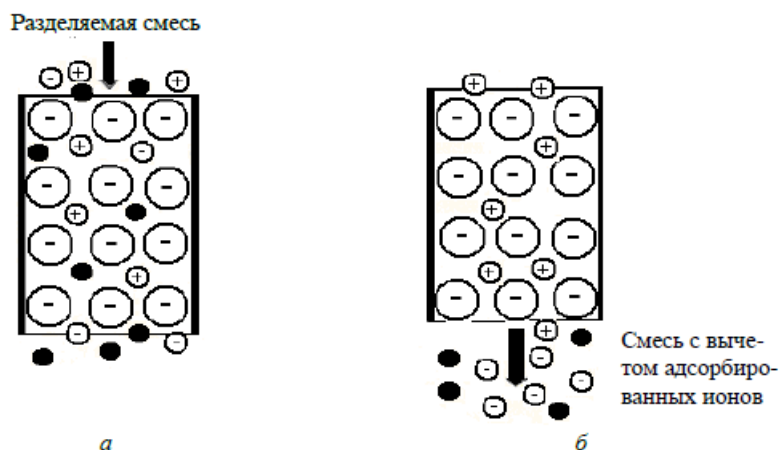


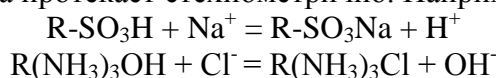
Рис.12.2. Катионообменная хроматография (схематизировано: изображено поверхностное электростатическое взаимодействие с частицами): а, б – две стадии процесса

В качестве ионообменников или ионитов обычно используют синтетические полимерные вещества, называемые ионообменными смолами. Они состоят из матрицы и

активных групп, содержащих подвижные ионы. В зависимости от знака обмениваемых ионов различают катиониты и аниониты.

Катиониты содержат кислотные группы различной силы, такие как сульфогруппы, карбоксильные, оксифенильные. **Аниониты** имеют в своем составе основные группы, например алифатические или ароматические аминогруппы различной степени замещенности (вплоть до четвертичных). Иониты могут находиться в Н-форме и ОН-форме, а также в солевой форме. В Н-форме катиониты и ОН-форме аниониты содержат способные к обмену ионы водорода и гидроксила соответственно, в солевых формах ионы водорода заменены катионами металла, анионы гидроксила – анионами кислот. В зависимости от силы кислотных и основных групп в ионитах различают сильнокислотные (R-SO₃H) и слабокислотные (R-COOH) катиониты; сильноосновные (R-N(CH₃)₃OH) и слабоосновные (R-NH₃OH) аниониты. Сильнокислотные и сильноосновные иониты способны к ионному обмену в широком диапазоне pH.

Процесс ионного обмена протекает стехиометрично. Например:



Это ионообменное равновесие характеризуется константой ионного равновесия, применимое к данному иониту, позволяющие предвидеть возможности ионообменных разделений. В зависимости от сродства к фиксированным ионам неподвижной фазы разделяемые ионы перемещаются вдоль хроматографической колонки с различными скоростями; чем выше сродство, тем больше объем удерживания компонента. При разделении органических кислот и оснований важную роль играет степень их диссоциации. Для двух веществ, имеющих разные константы обмена, рассчитывают фактор разделения или коэффициент распределения, который характеризует селективность ионита:

$$f_{a/b} = K_A/K_B,$$

где $f_{a/b}$ – фактор разделения; K_A , K_B – константы ионного обмена веществ А и В.

Чем больше фактор разделения, тем сильнее ионит удерживает вещество А. Например, константы ионного обмена солей железа (III) и кобальта (II) на сильнокислотном катионите марки КУ-2 составляют 3726 и 286 соответственно, тогда $f_{\text{Fe}^{3+}/\text{Co}^{2+}} = 13$. Таким образом, можно сделать вывод о том, что катионит КУ-2 более селективен к ионам железа (III). Важной количественной характеристикой ионитов является их обменная емкость. Полная обменная емкость определяется количеством эквивалентов ионов, обмениваемых одним граммом сухого ионита. Чем больше обменная емкость, тем большую пробу можно ввести в колонку с ионитом. При подготовке ионитов к работе их переводят в соответствующую форму. Так, для перевода катионита в Н-форму через колонку с набухшим ионитом пропускают раствор сильной кислоты, избыток которой отмывают водой. Затем медленно пропускают раствор смеси ионов. Каждый катион задерживается на ионите согласно своей сорбируемости. Далее пропускают подходящий элюент. Например, катионы щелочных металлов легко элюируются 0,1 М HCl. При этом ионы водорода обмениваются на сорбированные катионы, которые вместе с раствором выходят из колонки в соответствии с константами ионного обмена. На выходе из колонки фракции собирают в отдельные сосуды и определяют содержание любым подходящим методом.

Иониты применяются для деионизации (обессоливания) воды, очистки сахарных сиропов от минеральных солей; в препаративной химии – для концентрирования растворов; для определения ионов железа (III), меди и свинца в вине; кальция и магния в

молоке; различных металлов в биологических жидкостях. Кроме того, ионный обмен используют для перевода ионов в форму, удобную для количественного определения. Ионообменную хроматографию применяют для разделения фенолов, карбоновых кислот, аминокислот, аминсахаров, пуриновых, пиримидиновых и других оснований. Часто иониты используют для предварительного разделения сложных смесей на менее сложные. На ионном обмене основано получение ионитного молока для детского питания. Ионный обмен используют для очистки натуральных соков от ионов тяжелых металлов. Ионообменные смолы применяют для получения ионообменных мембран.

13.6. Гель-фильтрация

Гель-фильтрация обычно используется и для разделения молекул, и для определения их размеров. Колонки, предназначенные для гель-фильтрации, заполнены крошечными пористыми инертными шариками; при использовании таких колонок происходит разделение белков или других соединений по размерам. Молекулы небольшого размера по мере прохождения через колонку проникают внутрь шариков, а более крупные молекулы остаются в промежутках между шариками. В результате они быстрее проходят через колонку и выходят из нее первыми (рис. 6.3). В качестве матрикса можно использовать зерна поперечно-сшитого полисахарида (декстран или агароза). Таким образом, при помощи гель-фильтрации можно разделить смеси веществ в зависимости от размеров их молекул. Выход веществ из колонки происходит в порядке уменьшения их молекулярной массы. Гельпроникающая хроматография на колонке используется для очистки пестицидов, а также жирорастворимых витаминов перед их определением методом ВЖХ.

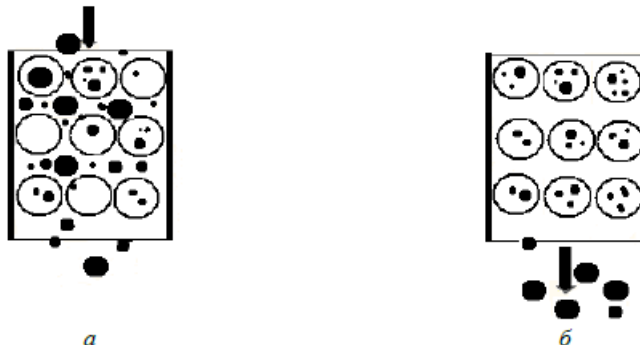


Рис. 6.3. Хроматография на основе «молекулярных сит» (компоненты, размеры которых соответствуют размерам пор или входов в поры адсорбента, задерживаются на колонке): а, б – две стадии процесса

13.7. Аффинная хроматография

Гораздо более эффективен метод **аффинной хроматографии** (хроматография по сродству). В основе этого метода лежат биологически важные взаимодействия, происходящие на поверхности белковых молекул. При аффинной хроматографии используется нерастворимый матрикс, ковалентно связанный со специфичными лигандами (антителами или субстратом ферментов), которые присоединяют определенный белок. Связываемые иммобилизованным субстратом молекулы фермента можно элюировать концентрированными растворами субстрата в свободной форме, а молекулы, связанные с иммобилизованными антителами, можно элюировать за счет диссоциации комплекса антитело–антиген концентрированными растворами соли или растворами низкого или

высокого pH. Однократная хроматография на такой колонке позволяет зачастую достигнуть очень высокой степени очистки препарата.

Аффинная хроматография может обеспечить полную очистку продукта из сложной многокомпонентной смеси – культуральной жидкости, экстракта клеток – в одну стадию, в то время как более традиционные методы осаждения и ионообменной хроматографии требуют многоэтапной очистки, сопряженной с большими затратами труда и времени. Определенные неудобства вызывает относительная дороговизна материалов для аффинной хроматографии, в частности, веществ, используемых в качестве лигандов.

Проблемой является также быстрый выход колонки из строя при пропускании через нее смесей, компоненты которых забивают промежутки между гелевыми частицами. Поэтому в производственных условиях колонки используются в периодическом, а не в непрерывном режиме.

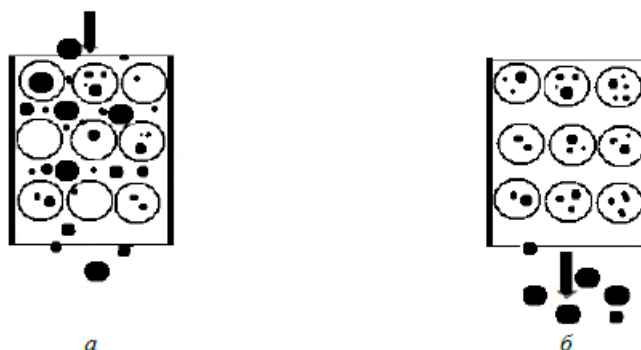


Рис. 6.3. Хроматография на основе «молекулярных сит» (компоненты, размеры которых соответствуют размерам пор или входов в поры адсорбента, задерживаются на колонке): а, б – две стадии процесса

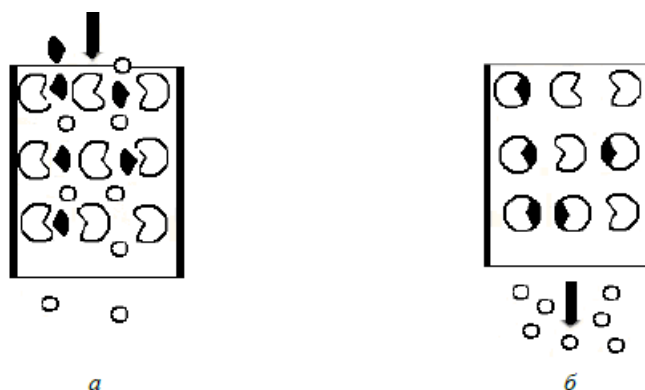


Рис. 6.4. Аффинная хроматография (в виде частиц различной формы изображены молекулы с различными химическими структурами, из которых только одна вступает в специфическое взаимодействие с частицами геля. Показано, что в выемки на частицах геля входят лишь молекулы комплементарной формы): а, б – две стадии процесса

После пропускания через колонку порции культуральной жидкости, из которой выделяют продукт, частицы геля подвергают очистке. Методы очистки основаны: а) на использовании гелевых частиц, превышающих по плотности конгломераты веществ, закупоривающих колонку (различие в плотности позволяет очистить гель путем его избирательного осаждения или проточной промывки, уносящей только загрязняющие частицы); б) на придании частицам геля магнитных свойств, что позволяет провести их

очистку в градиентном магнитном поле; в) на упаковке частиц геля в виде ленты, покрытой тонкоячеистой оболочкой (лента вращается и проходит попеременно через жидкость с неочищенным продуктом и через буферный раствор, в который переходят загрязняющие примеси).

Масштабирование процесса аффинной хроматографии ограничивается разрушением структуры геля и уносом его частиц током жидкости. Это в частности обусловлено тем, что в широких колонках для крупномасштабной очистки продуктов стенки колонки уже не служат опорой для частиц геля, увлекаемых жидкостью. Увеличение высоты колонки приводит к пропорциональному возрастанию сил, разрушающих нижние слои геля. Помимо этого, для повышения эффективности и степени разделения близких по свойствам соединений целесообразно применять мелкие частицы геля (менее 1 мкм в поперечнике), но именно такие частицы легче всего увлекаются током жидкости.

В последние годы изыскивают средства укрепления гелей для крупномасштабной аффинной хроматографии. Частицы агарозы – наиболее перспективного материала для гелей – предполагают укреплять путем сшивок.

Наряду с аффинной хроматографией, называемой также аффинной адсорбцией в геле, для крупномасштабного отделения и очистки продуктов биотехнологических процессов предполагают применять аффинную преципитацию и аффинное разделение. При *аффинной преципитации* лиганд прикрепляют к растворимому носителю. При добавлении смеси, содержащей соответствующий белок, образуется его комплекс с лигандом, который выпадает в осадок сразу после его формирования или после дополнения раствора электролитом. *Аффинное разделение* основано на применении системы, содержащей два водорастворимых полимера. Один из полимеров, например полиэтиленгликоль, несет специфические лиганды. Другой полимер, например высокомолекулярный декстран, обладает сродством к остальным, примесным компонентам. Так, содержащиеся в разделяемой смеси белки, нуклеиновые кислоты, фрагменты клеточных структур предпочитают более полярный декстран, тогда как целевой продукт, скажем, фермент, накапливается «в сетях» полиэтиленгликоля, несущего молекулы лиганда (субстрата, кофактора, ингибитора). Аффинное разделение – наиболее высокоэффективный из аффинных методов очистки.

13.8. Гидрофобная хроматография

Гидрофобная хроматография. В ходе создания носителей для аффинной хроматографии были проведены контрольные опыты, в которых изучалось поведение матриц, содержащих удлиняющие мостики, но без лиганда. Оказалось, что в некоторых случаях ферменты прочно связывались с гексаметиленовыми мостиками. Этот факт послужил основой для развития методов гидрофобной хроматографии, основанных на связывании белка в результате взаимодействия между алифатической цепью адсорбента и соответствующим гидрофобным участком на поверхности белковой глобулы. Гидрофобные взаимодействия усиливаются с повышением концентрации соли. Максимальное усиление вызывают соли, проявляющие наибольшую активность при высаливании, такие как сульфат аммония. Это объясняется тем, что в основе обоих процессов лежат одинаковые механизмы. При высаливании основной причиной агрегации является усиление гидрофобных взаимодействий между белками. Следовательно, при высоких концентрациях соли большинство белков будут адсорбироваться на гидрофобных группах, связанных с матрицей. Элюцию проводят понижающимся градиентом концен-

трации соли. Белки, которые прочно адсорбируются, обычно удаляют с колонки, добавляя в элюирующий раствор этиленгликоль.

Вопросы для самоконтроля

1. Классификация хроматографических методов по технике выполнения.
2. Сущность, возможности и ограничения метода тонкослойной хроматографии (ТСХ).
3. Применение метода ТСХ для количественного разделения смесей.
4. Бумажная хроматография и ее виды в зависимости от механизма распределения.
5. Сущность, возможности колоночной хроматографии.
6. Какой процесс лежит в основе ионообменной хроматографии?
7. Сущность и области применения метода гель-фильтрации.
8. Какие взаимодействия лежат в основе аффинной хроматографии?
9. Что такое аффинная преципитация и аффинное разделение?
10. На чем основан метод гидрофобной хроматографии?

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная литература

1. Биотехнология: теория и практика / Н.В. Загоскина и др. ; под ред. Н.В. Загоскиной, Л.В. Назаренко. – М.: «Оникс», 2009. – 496 с. – ISBN 978-5-488-02173
2. Клунова, С.М. Биотехнология: учебник / С.М. Клунова, Т.А. Егорова, Е.А. Живухина. – М.: Академия, 2010. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-6697-4
3. Сазыкин, Ю.О. Биотехнология / Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева; под ред. А.В. Катлинского. - М.: Академия, 2008. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-5506-0
4. Тарантул, В.З. Толковый биотехнологический словарь русско-английский: справочное издание [Электронный ресурс] / В.З. Тарантул. – М.: Языки славянских культур, 2009. – 936 с. – ISBN: 978-5-95-51-0342-6 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks.

Дополнительная литература

1. Биотехнология. Биобезопасность. Биозтика / А.П. Ермишин и др.; под ред. А.П. Ермишина. – Минск: «Тэхнолoгiя», 2005. – 430 с.
2. Биотехнология: учебное пособие для вузов, в 8 кн., под ред. Егорова Н.С., Самуилова В.Д. – М., 1987.
3. Бирюков, В.В. Основы промышленной биотехнологии / В.В. Бирюков. – М.: КолосС, 2004. – 296 с. – ISBN 5-9532-0231-8 («КолосС»); ISBN 5-98109-008-1 (АНО «Химия»)
4. Блинов, В.А. Общая биотехнология: курс лекций. В 2-х частях. Ч. 1 / В.А. Блинов. – Саратов, 2003.
5. Блинов, В.А. Общая биотехнология: Курс лекций. В 2-х частях. Ч. 2. – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский СГАУ», 2004. – 144 с. – ISBN 5-7011-0436-2

ЛЕКЦИЯ 14

Очистка газовоздушных смесей и сточных вод биотехнологических производств

14.1. Сточные воды

В процессе получения продуктов микробиологического синтеза потребляется большое количество воды, которая загрязняется вредными микроорганизмами, минеральными и органическими компонентами. Загрязняющие вещества находятся в растворенном и нерастворенном состояниях. С целью предотвращения вредного влияния сточных вод на состояние водоемов в нашей стране действуют «Правила охраны поверхностных вод». Очищенные сточные воды не должны содержать возбудителей заболеваний, а также запахов и привкусов, способных передаться рыбе. В сточных водах ограничивается содержание окисляемых органических веществ, содержащихся в исходных, питательных средах, в процессе производства используется 75-80%, остальное уходит с обработанными сточными водами.

14.2. Промышленные стоки

В производственных процессах получения белковых препаратов аминокислот, липидов и биотоплива промышленные стоки делятся на условно чистые и загрязненные.

К условно чистым относятся воды, прошедшие теплообменные аппараты, в них не происходит изменения состава, а изменяется только температура. Остальные производственные стоки относятся к загрязненным. Загрязненные промышленные стоки характеризуются присутствием в них органических и неорганических веществ.

Загрязненность промышленных стоков и расход кислорода на процесс бактериального окисления органических веществ характеризуются биологическим потреблением кислорода (БПК), выражаемым в миллиграммах O_2 на 1 л анализируемой жидкости: БПК₅ (при выдерживании пробы в течение пяти суток), БПК₂₀ (при выдерживании пробы в течение 20 суток; БПК₂₀ часто называют полным).

Зная количество содержащихся веществ и их характеристики по БПК, можно вычислить БПК смеси. Но когда в смеси присутствует большое количество веществ или точно не известен ее состав, определить БПК невозможно. Поэтому обычно проводят аналитическое определение БПК, дающее суммарное его значение, и тогда не требуется уточнения химического состава смеси.

В большинстве случаев на заводах по производству кормовых дрожжей, аминокислот, липидов и биотоплива количество загрязнений по БПК₅ и взвешенным веществам в 1,5-2 раза превышает нормально допустимые величины. Качественный состав и загрязненность сточных вод. Основным загрязнителем при производстве кормовых дрожжей и липидов является культуральная жидкость после отделения дрожжей. На нее приходится 30-35% общего объема стоков завода и 70-90% общего количества загрязнений. Качественный состав сточных вод изменяется в зависимости от перерабатываемого сырья, вида вырабатываемой продукции, технологических режимов работы, расхода свежей воды.

Сточные воды гидролизно-дрожжевых заводов имеют коричневый цвет, обусловленный присутствием в них гуминоволигниновых веществ. Эти стоки отличаются большим содержанием органических веществ, часть которых составляют сахара и ор-

ганические кислоты, в основном пентозы (ксилоза и арабиноза) и уксусная кислота. В стоках присутствуют и ядовитые примеси - фурфурол, оксиметилфурфурол, формальдегид, гуминово-лигнинные коллоидные вещества, терпены. Помимо них в стоках находятся в небольшом количестве азотистые и фосфорные соединения, а также продукты обмена веществ микроорганизмов - аминокислоты, янтарная, молочная и другие кислоты. Значительная загрязненность, повышенная кислотность и токсичность, высокое биохимическое потребление кислорода характерны для гидролизно-дрожжевых и дрожжевых заводов.

Сточные воды заводов по производству кормовых дрожжей на углеводородах нефти содержат остаточное количество н-парафинов (углеводородов «нормального» строения с неразветвленной углеродной цепью). При работе по технологической схеме с рециркуляцией в них содержатся также повышенные количества ароматических углеводородов, накапливаемых при возврате отработанной культуральной жидкости в ферментер.

14.3. Объем и загрязненность сточных вод

Общее количество загрязненных промышленных стоков для дрожжевых заводов производительностью 80 тыс. т дрожжей в год составляет в среднем в зависимости от времени года 45-55 тыс. м³ в сутки. Основное количество загрязненных стоков составляет отработанная культуральная жидкость - 120-140 м³ на 1 т сухой массы дрожжей, объем общих стоков - 170-220 м³ на такую же массу дрожжей. Но в сбрасываемой культуральной жидкости содержатся основные загрязнения: по взвешенным веществам - до 75%, по БПК₅ - до 93-94%.

Количество взвешенных веществ в промышленных сточных водах обычно составляет 100-125 кг на 1 т сухой биомассы, из них только 25 кг приходится на долю минеральных веществ. Основное количество минеральных веществ приходится на гипс, органических - на лигнин.

Шламодержащие стоки удаляют с территории завода на специально отведенные для этой цели площадки (шламоотвалы), горючие фракции подлежат сжиганию.

Снижения количества загрязнений можно достигнуть при внедрении новых технологических приемов и процессов, например при введении циклов повторного использования сточных вод, в частности использования отработанной культуральной жидкости на разбавление суслу перед выращиванием дрожжей с рециркуляцией на процесс гидролиза, на приготовление растворов питательных солей и известкового молока. В результате количество отработанной культуральной жидкости уменьшается вдвое.

14.4. Способы очистки сточных вод

После сброса очищенных сточных вод содержание взвешенных веществ в водоеме не должно увеличиваться более чем на 0,25-0,75 г/м³, а содержание органических веществ (по БПК₂₀) не должно превышать 3-6 г/м³ в водоемах для питьевого и культурно-бытового водопользования и 2 г/м³ в водоемах рыбохозяйственного значения, в которых, кроме того, содержание растворенного кислорода не должно падать ниже 4-6 мг/л.

Способы очистки сточных вод разделяются на механические, физико-химические, биохимические, термические (тепловые).

Механическую очистку осуществляют в песколовках, отстойниках, центрифугах, флотаторах и фильтрах.

Физико-химические методы (коагуляция, флокуляция, электрокоагуляция и сорбция) применяют для очистки сточных вод от коллоидных и растворенных соединений, количество которых в воде после сооружений механической очистки остается практически неизменным.

В качестве коагулянтов наиболее широко используются сульфат алюминия и хлорид железа. При введении коагулянтов в воду они обволакивают взвешенные частицы, полностью меняя их поверхностные свойства и нейтрализуя заряд. Коагулянты вызывают укрупнение частиц загрязнений и образуют хлопья.

В настоящее время минеральные коагулянты заменяют высокомолекулярными флокулянтами органического и неорганического происхождения. Сущность флокуляции заключается в агрегации частиц, при которой контакт частиц происходит через молекулы адсорбированного флокулянта.

Электрохимические методы очистки обладают рядом существенных преимуществ перед реагентными: не увеличивается солевой состав сточных вод, образуется меньшее количество осадка, упрощается технологическая схема очистки, обеспечивается автоматизация производственных установок, для размещения установок требуются незначительные производственные площади. Недостаток метода - высокие капитальные и эксплуатационные затраты на электродные системы и, образование отложений на них и возникновение взрывоопасных смесей газов. Электрокоагуляцию применяют для удаления из сточных вод тонко диспергированных примесей; для удаления истинно растворенных веществ этот метод не используется.

Очистка с помощью сорбентов. Сорбция - это процесс поглощения твердым телом или жидкостью какого-либо вещества из окружающей среды. В очистке сточных вод чаще используется ее разновидность - адсорбция - поглощение вещества из воды на поверхности или в объеме твердых тел (сорбентов). Сорбентами могут быть частицы углей, почвы и остатки растений. Если соледержащие сточные воды не допускается выпускать в водоем, то их подвергают термическому обезвреживанию. Но термическое обезвреживание осуществляется на установках, работающих под давлением или вакуумом. Получаемый конденсат направляют в системы производственного водоснабжения, а солевые отходы вывозят для захоронения.

Биохимическая очистка является одним из основных методов очистки сточных вод заводов микробиологической промышленности как перед сбросом их в водоем, так и перед повторным использованием в системах оборотного водоснабжения. Считается, что микроорганизмы способны окислять все органические вещества, за исключением тех искусственно синтезированных, которым нет аналогов в природе. Наименее доступными источниками углерода являются вещества, не содержащие атомов кислорода - углеводороды, но они также расщепляются микроорганизмами активного ила. В том числе - входящие в состав ила.

Токсичными для микроорганизмов активного ила могут оказаться ионы тяжелых металлов и некоторые органические вещества. В концентрациях ниже ПДК последние могут усваиваться бактериями и служить источником углерода и энергии. Биологическую очистку проводят в аэротенках или в биоокислителях с интенсивной аэрацией среды. При этом снижается ВПК, за счет окисления органических веществ и нарастает биомасса микроорганизмов. Очищенные и осветленные сточные воды поступают в водоем и на рециркуляцию в производство, а активный ил, например, производства БВК, являясь источником белка и витаминов, упаковывается в бумажные мешки и направляется к потребителю.

14.5. Принципиальная технологическая схема очистки сточных вод

Наиболее распространенная схема включает первичную и вторичную очистку. Первичная очистка заключается в механическом отделении загрязнений. Вторичная очистка предусматривает очистку сточных вод в системе очистных сооружений (биоокислителях), либо очистку сточных вод в естественных условиях на полях орошения.

Для повышения эффективности действия и снижения ВПК сточных вод вводится биокоагуляция (предварительная аэрация с добавлением ила из вторичных отстойников). Конструктивно предаэратор представляет собой аэротенк- резервуар прямоугольной формы, в котором временно пребывает сточная вода (10-20 минут). При их использовании снижается количество органических веществ в стоках, поступающих на аэротенки, до 15%. Первичные отстойники устанавливаются перед аэротенками, где вода пребывает 1-2 часа. В них накапливается избыточный активный ил, который потом извлекается насосами и подсушивается на иловых площадках до влажности 70-80%. Далее вода поступает в аэротенки.

Аэротенки предназначены для биологической очистки сточных вод, которые попадают в них после первичных отстойников. Работа аэротенков основана на использовании биохимического окисления органических веществ аэробными микроорганизмами, колонии которых образуют так называемый активный ил.

Аэротенк-смеситель представляет собой прямоугольный железобетонный резервуар, состоящий из одной или нескольких секций, с рабочей глубиной от 3 до 6 м. Секции разделены на коридоры, по которым проходит сточная вода. Время пребывания сточных вод в аэротенке зависит от скорости окисления и составляет 8-20 часов.

Вторичные радиальные отстойники служат для осаждения и осветления сточных вод после биологической очистки. Далее воду хлорируют.

Ершовый смеситель предназначен для интенсивного перемешивания воды, прошедшей очистку, с хлорной водой, которая поступает из хлораторной.

Для сгущения активного ила, поступающего со вторичных отстойников, используют гравитационные илоуплотнители. За 10-20 часов активный ил с влажностью 99-99,2% уплотняется до влажности около 97%. Вследствие длительного уплотнения часть ила может гнить, всплывать и уноситься в водоемы. Необходимо соблюдать режим илоуплотнения.

Сушка уплотненного ила с получением товарного продукта является конечным этапом очистки сточных вод. Для сушки активного ила могут быть использованы барабанные, вальцовые, ленточные и распылительные сушилки.

Для снижения загрязнений в стоках, оставшихся после аэротенков и вторичных отстойников, служат биологические пруды. Продолжительность пребывания в них сточных вод может превышать 10 суток. Глубина прудов составляет 2-3 м. Они занимают большие площади. В биологических прудах развиваются одноклеточные водоросли, которые выделяют метаболиты, обладающие бактерицидным действием по отношению к патогенной микрофлоре. Аналогичные метаболиты выделяются и высшей водной растительностью. Поэтому летом вода, выходящая из биопрудов, не требует хлорирования.

Степень очистки сточных вод в биологических прудах по БПК, изменяется в пределах 78,9%.

Утилизация последрожжевой бражки. 1 кг отработанных культуральных сред содержит 0,3-0,6 кг ценных кормовых дрожжей и других продуктов (в пересчете на СВ). Проводится предварительная биологическая утилизация отработанных культуральных сред до их сме-

шения с общими отходами, что увеличивает на 10% основную производительность предприятий.

14.6. Очистка газовоздушных выбросов

На отдельных предприятиях микробиологической промышленности вместе с отработанным воздухом в атмосферу могут выбрасываться большие количества микроорганизмов-продуцентов. Например, на гидролизно-дрожжевом заводе, при обследовании воздуха, выбрасываемого из ферментера, было выявлено от $16 \cdot 10^3$ до $316 \cdot 10^3$ клеток микроорганизмов на м^2 , а на заводе по производству белково-витаминных концентратов - от 200 до 436×10^3 клеток на 1 м^3 .

Большая запыленность воздуха белковыми и другими и другими продуктами микробного синтеза отмечается на стадиях сушки, упаковки и погрузки в вагоны. Значительная запыленность воздуха питательными солями и сырьем (опилки, отруби, мука и др.) имеет место в отделениях и цехах приготовления питательных сред.

Одним из важнейших мероприятий, снижающих выброс микроорганизмов в окружающую среду, является герметизация ферментеров, флотаторов и оборудования узла сепарации. На ряде предприятий дрожжевого профиля высокоэффективная очистка отработанного воздуха из ферментаторов, флотаторов, узла, сушильных установок и упаковочного отделения осуществляется с помощью скрубберов Вентури. Он состоит из трубы Вентури (турбулентный промыватель), предназначенной для коагулирования мелких твердых частиц, инерционного аппарата и центробежного скруббера для отделения газа и укрупненных частиц и капелек жидкости. Запыленный газ подается вентилиатором в трубу Вентури и смешивается с водой. Скоагулированные частицы пыли с мелкими капельками воды и газа поступают в инерционный аппарат, где газ частично отделяется от жидкости. Окончательное отделение жидкости от газа осуществляется в центробежном скруббере. Очищенный газ выбрасывается в атмосферу, а вода с твердыми частицами выводится из инерционного аппарата и скруббера в сборник. Вода из сборника многократно используется для орошения трубы Вентури и может направляться в производство с целью утилизации уловленных частиц. Представляет интерес мокрое улавливание пылевидных частиц концентрата лизина, уносимых с газом из циклонов распылительной сушилки. В этом случае потери лизина на стадии сушки сводятся к минимуму в связи с хорошей растворимостью лизина в воде и возвратом его в производство в концентрированном виде с последующей сушкой на предприятиях, со сравнительно небольшими объемами загрязненных воздушных выбросов. Очистку воздуха до чистого или стерильного состояния можно осуществлять с помощью фильтров грубой и тонкой очистки или путем сжигания. В ряде случаев снижения вредных выбросов в атмосферу можно достичь путем совершенствования технологии.

Вопросы для самоконтроля

1. Назовите основные источники загрязнения воды и качественный состав сточных вод биотехнологических производств.
2. Какие существуют способы очистки сточных вод?
3. Что представляют собой трубы Вентури и какие задачи с их помощью решаются?
4. Что такое азротенк, метантенк и их назначение?
5. Как проводится очистка газовоздушных выбросов?

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная литература

1. Биотехнология: теория и практика / Н.В. Загоскина и др. ; под ред. Н.В. Загоскиной, Л.В. Назаренко. – М.: «Оникс», 2009. – 496 с. – ISBN 978-5-488-02173
2. Клунова, С.М. Биотехнология: учебник / С.М. Клунова, Т.А. Егорова, Е.А. Живухина. – М.: Академия, 2010. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-6697-4
3. Сазыкин, Ю.О. Биотехнология / Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева; под ред. А.В. Катлинского. - М.: Академия, 2008. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-5506-0
4. Тарантул, В.З. Толковый биотехнологический словарь русско-английский: справочное издание [Электронный ресурс] / В.З. Тарантул. – М.: Языки славянских культур, 2009. – 936 с. – ISBN: 978-5-95-51-0342-6 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks.

Дополнительная литература

1. Биотехнология. Биобезопасность. Биоэтика / А.П. Ермишин и др.; под ред. А.П. Ермишина. – Минск: «Тэхноложія», 2005. – 430 с.
2. Биотехнология: учебное пособие для вузов, в 8 кн., под ред. Егорова Н.С., Самуилова В.Д. – М., 1987.
3. Бирюков, В.В. Основы промышленной биотехнологии / В.В. Бирюков. – М.: КолосС, 2004. – 296 с. – ISBN 5-9532-0231-8 («КолосС»); ISBN 5-98109-008-1 (АНО «Химия»)
4. Блинов, В.А. Общая биотехнология: курс лекций. В 2-х частях. Ч. 1 / В.А. Блинов. – Саратов, 2003.
5. Блинов, В.А. Общая биотехнология: Курс лекций. В 2-х частях. Ч. 2. – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский СГАУ», 2004. – 144 с. – ISBN 5-7011-0436-2

ЛЕКЦИЯ 15

Принцип регулирования, контроля, управления процессами биосинтеза

15.1. Общая характеристика и функции автоматизированных систем управления

Управление современными процессами культивирования микроорганизмов основывается на значительном объеме информации о технологических процессах и требует выполнения большого числа воздействий для ведения процесса в соответствии с производственными требованиями. Локальные системы управления, комплектуемые с отдельным оборудованием, не полностью решают задачи автоматизированного управления процессами. Они, как правило, не реализуют логико-программное управление потоками. В этой связи созданы автоматизированные системы, которые комплексно управляют процессами. В этих системах совмещены информационные функции по контролю технологических параметров процессов и отображению состояния оборудования с управляющими функциями по автоматическому регулированию параметров, логико-программному управлению потоками и отдельными режимами процесса.

Автоматизированные системы управления обеспечивают первичную обработку поступающей с объекта информации, централизованный контроль параметров процесса, обнаружение и сигнализацию технологических и аварийных отклонений параметров, регистрацию важнейших параметров, автоматическое регулирование заданных параметров, логико-программное управление процессом в автоматическом или операторном режимах работы.

При автоматизации процессов культивирования микроорганизмов используют приборы контроля и средства управления как общепромышленного, так и отраслевого назначения. При этом к дозирующим устройствам, датчикам контроля, запорной и регулирующей арматуре предъявляют специальные требования. Они должны легко разбираться для ручной чистки и мойки и обеспечивать возможность их промывки моющими растворами циркуляционным способом, в них должны отсутствовать застойные и недоступные зоны. Детали, контактирующие с питательной и культуральной средами, изготавливаются из специальных материалов. Дозирующие устройства, датчики и арматура должны выдерживать тепловую обработку горячей водой при 95°C, а в некоторых случаях – стерилизацию острым паром. Поверхности, контактирующие с культуральной средой, должны быть гладкими, без трещин, выбоин, в которых может развиваться нежелательная микрофлора. При монтаже датчиков на технологических объектах применяют асептические соединения, прокладки и сальники.

15.2. Датчики и измеряемые величины

Для контроля параметров процесса используют специальные датчики (сенсоры), которые должны быть стерильными, если они помещаются в стерильные области. Измеряются следующие параметры: физические (температура, давление, потребляемая мощность, вязкость и поверхностное натяжение среды, скорости потоков, мутность, вес ферментера); химические (рН среды, концентрация растворенных газов, редокс-потенциал, концентрация субстратов, концентрация продуктов); биологические (RNA, DNA, NADH₂, АТФ, белок). Биологические параметры измеряют в отобранных пробах

вне ферментера, за исключением NADH_2 , который можно измерять на биотехнологической линии флуориметрическим методом.

Контроль течения процесса осуществляют с помощью компьютера, использование которого особенно важно для ферментаций, в которых субстрат и сырье составляют главную стоимость. Другая необходимость применения компьютерного контроля заключается в возможности оптимизации процесса, которая позволяет получить максимальную продуктивность, выход продукта и увеличить степень конверсии субстрата в продукт. Преимущество компьютерного контроля состоит также в быстром и эффективном управлении параметрами процесса, хранении и воспроизведении нужных данных, большей гибкости работы производства в соответствии со спросом на продукцию, наиболее надежный контроль загрязненности и безопасности на предприятии. Первичная информация, полученная от системы различных датчиков, с помощью компьютеров превращается в любую удобную стандартную систему единиц. Определяя весь необходимый набор параметров, характеризующих данный процесс, можно с помощью ЭВМ находить оптимальные их соотношения. Для получения четкой модели, описывающей динамику процесса, важно также знать процессы, происходящие внутри клеток.

15.3. Компьютерный контроль параметров в биосинтезе

Компьютерный контроль делят на два типа: *прямой цифровой* контроль и *аппаратурный*. В первом случае компьютер получает данные с сенсоров и использует эту информацию для образования сигнала, который посылается обратно в систему управления для эффективного регулирования параметров процесса. В случае аппаратурного контроля компьютер только устанавливает показания существующих аналоговых датчиков. ЭВМ определяет скорость образования CO_2 , потребление газового субстрата, коэффициент дыхания, удельную скорость потребления субстратов, экономические коэффициенты, технологические балансы, потребление энергии на единицу объема жидкости и другие параметры. В частности, если количество биомассы непосредственно не определяется, то ее можно рассчитать из модели. Использование математической модели позволяет лучше понимать ферментационный процесс, рассчитать влияние отклонений от стандартных параметров, на результаты ферментации и оптимизировать процесс быстрее и с меньшими затратами, чем с помощью традиционных приемов.

Схема измерения параметров в ферментере при непрерывном процессе биосинтеза клеточной массы представлен на [рис. 2](#). В комплекте ЭВМ – ферментер основными элементами являются: ферментер с набором датчиков, измерительных и исполнительных устройств; ЭВМ со своими периферийными устройствами; устройства связи с объектом, осуществляющие сопряжение ЭВМ и ферментера; математическое обеспечение, включающее операционные системы и программы пользователя.

Цели, преследуемые вводом ЭВМ в контур управления, можно сформулировать следующим образом: сделать производство более экономичным за счет оптимизации технологии; увеличить надежность функционирования оперативный доступ к информации о ходе процесса; уменьшить объем трудоемких операций.

15.4. Структурная схема программы анализа информации датчиков

На [рис. 3](#) представлена структурная схема для реализации программы анализа информации датчиков, работающая как подпрограмма математического обеспечения. Эта подпрограмма позволяет пользователю контролировать работу ферментера, так как она

представляет ему следующие данные: характеристики массообмена, величину скорости роста микроорганизмов, массу клеток, количество получаемого продукта, расход энергии, общую эффективность процесса ферментации. Все эти показатели вычисляются по данным, полученным от датчиков, и представляются в численном и графическом виде на дисплее. __

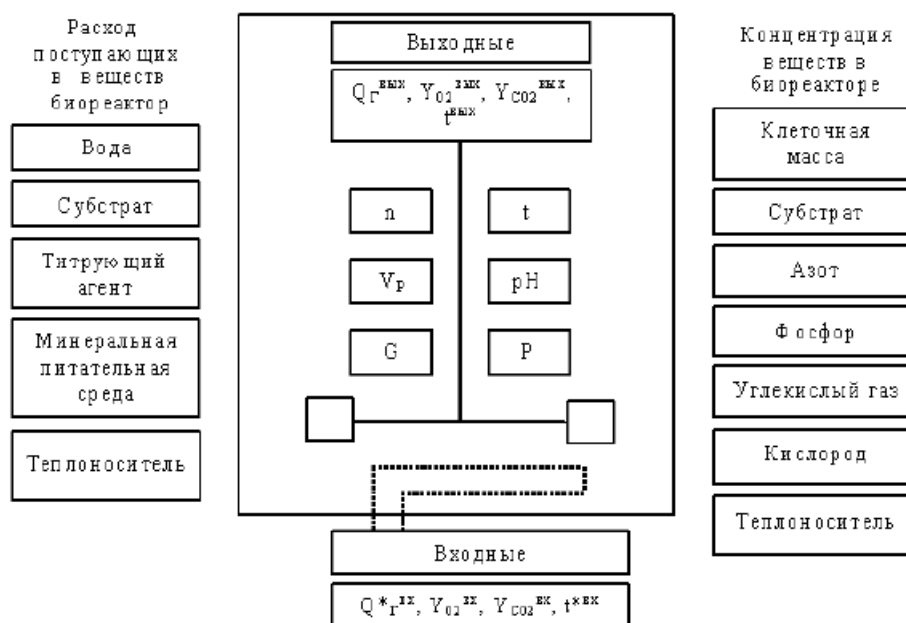


Рис.1. Схема измерений основных параметров в ферментере

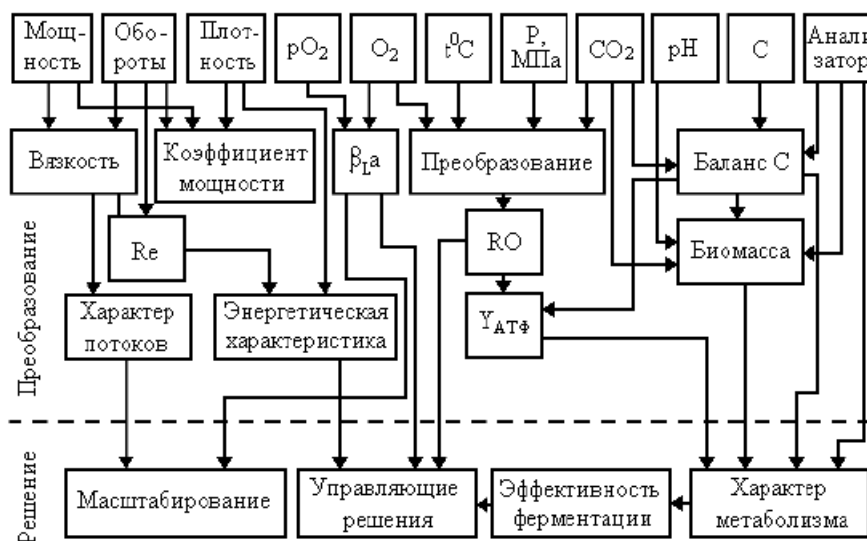


Рис.2. Структурная схема реализации программы

Управление процессом является частью программы обработки информации, в которой формируется рабочая стратегия по ведению процесса. Можно выделить три основных типа управления процессом: регулирование, программное управление и оптимизация.

15.6. Биологические датчики

Биологические датчики представляют собой сочетание разнообразных биологических материалов, способных различать молекулы биологических тел (к числу таких материалов можно отнести ферменты, микроорганизмы, антигены и антитела, лигандовые рецепторы, пробы RNA и DNA и т.д.) с физико-химическими устройствами. В настоящее время существует несколько типов биосенсоров, отличающихся прежде всего принципами детекции хода ферментативной реакции. Это ферментные электроды, ферментные микрокалориметрические датчики и биодатчики на основе хеми- и биолюминесценции.

Ферментные электроды используют электрохимический способ определения веществ, образующихся в ходе ферментативного превращения. Они представляют собой электроды с нанесенным поверхностным слоем (какимлибо природным полимером), содержащим один или несколько иммобилизованных ферментов (иногда фермент может находиться в растворимом состоянии в приэлектродном слое, окруженном мембраной).

Ферментные микрокалориметрические датчики используют тепловой эффект ферментативной реакции, состоят они из двух колонок (измерительной и контрольной), заполненных носителем с иммобилизованным ферментом и снаряженных термисторами. При пропускании через измерительную колонку анализируемого образца происходит химическая реакция, которая сопровождается регистрируемым тепловым эффектом. Данный тип датчиков интересен своей универсальностью.

Хеми- и биолюминесцентные датчики регистрируют световое излучение с различной длиной волны, испускаемое продуктами ферментативной реакции, находящимися в возбужденном состоянии. Конструкционно они включают колонку с иммобилизованными на носителе ферментами (люциферазой, пероксидазой) и светоприемное устройство. Заложенный в систему этого типа датчиков аналитический метод характеризуется прежде всего крайне высокой чувствительностью.

Большие перспективы для аналитических и диагностических целей имеют биологические микрочипы – миниатюрные устройства для проведения различных биохимических анализов. Это микропластинки с нанесенными на них с большой частотой включений реакционноспособных агентов, способных взаимодействовать с теми или иными веществами в составе анализируемых образцов.

Для *измерения технологических параметров* процессов ферментации в производственных установках, как правило, используют термопары и термометры сопротивления: платиновые (ТСП) и медные (ТСМ). Чувствительные элементы (из платиновой или медной проволоки) заключены в защитный патрон из нержавеющей стали.

Давление и разрежение измеряют датчиками с чувствительным элементом из одновитковой или многовитковой трубчатой пружины, а также сильфонными с чувствительным элементом из тонкостенных гофрированных сильфонов. Чувствительные элементы датчиков имеют застойные зоны, которые не промываются, поэтому их используют в комплекте со специальными разделительными устройствами типа РМ, предохраняющими чувствительные элементы от попадания измеряемой среды. Упругим элементом разделительного устройства типа РМ служит мембрана, прогибающаяся пропорционально измеряемому давлению и передающая через разделительную среду чувствительному элементу – датчику давления.

В условиях асептических производств лучшими дозирующими насосами являются перистальтические и мембранные.

Принцип действия индукционного расходомера основан на измерении ЭДС, индуцируемой в электропроводной жидкости. Величина ЭДС пропорциональна скорости потока жидкости.

Наличие пены, интенсивное перемешивание не позволяют применять обычные методы измерения уровня. В этой связи целесообразно применять весовой тип уровнемера, в котором датчики, фиксирующие массу аппарата, передают свой сигнал на прибор, отградуированный в единицах уровня.

Для сигнализации предельного уровня в резервуарах применяют кондуктометрические приборы.

Вопросы для самопроверки

1. Общий принцип управления современными процессами культивирования микроорганизмов в биотехнологии.
2. Какие датчики используются для измерения параметров биотехнологического процесса?
3. Что такое прямой цифровой контроль и аппаратурный?
4. Что представляют собой биологические датчики
5. Какие типы биосенсоров используют в настоящее время в ферментационных процессах и чем они отличаются?

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная литература

1. Биотехнология: теория и практика / Н.В. Загоскина и др. ; под ред. Н.В. Загоскиной, Л.В. Назаренко. – М.: «Оникс», 2009. – 496 с. – ISBN 978-5-488-02173
2. Клунова, С.М. Биотехнология: учебник / С.М. Клунова, Т.А. Егорова, Е.А. Живухина. – М.: Академия, 2010. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-6697-4
3. Сазыкин, Ю.О. Биотехнология / Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева; под ред. А.В. Катлинского. - М.: Академия, 2008. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-5506-0
4. Тарантул, В.З. Толковый биотехнологический словарь русско-английский: справочное издание [Электронный ресурс] / В.З. Тарантул. – М.: Языки славянских культур, 2009. – 936 с. – ISBN: 978-5-95-51-0342-6 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks.

Дополнительная литература

1. Биотехнология. Биобезопасность. Биоэтика / А.П. Ермишин и др.; под ред. А.П. Ермишина. – Минск: «Тэхноложія», 2005. – 430 с.
2. Биотехнология: учебное пособие для вузов, в 8 кн., под ред. Егорова Н.С., Самуилова В.Д. – М., 1987.
3. Бирюков, В.В. Основы промышленной биотехнологии / В.В. Бирюков. – М.: КолосС, 2004. – 296 с. – ISBN 5-9532-0231-8 («КолосС»); ISBN 5-98109-008-1 (АНО «Химия»)
11. Блинов, В.А. Общая биотехнология: курс лекций. В 2-х частях. Ч. 1 / В.А. Блинов. – Саратов, 2003.
12. Блинов, В.А. Общая биотехнология: Курс лекций. В 2-х частях. Ч. 2. – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский СГАУ», 2004. – 144 с. – ISBN 5-7011-0436-2

Словарь терминов

Термин	Значение
Автоселекция	Процесс постепенного вытеснения менее приспособленных форм микроорганизмов более приспособленными
Аэротенк-смеситель	Резервуар для очистки сточных вод
Барда	Отход производства спирта
Биореактор	Закрытая или открытая емкость, в которой при определенных условиях протекает на клеточном уровне контролируемая реакция, осуществляемая с помощью микроорганизмов
Вектор	Молекула ДНК, способная переносить в клетку чужеродную ДНК любого происхождения и обеспечить там ее размножение
ДНК-лигаза	Фермент «сшивающий» участки молекулы ДНК
Иммобилизация	Перевод ферментов в нерастворимое состояние
Клонирование	Размножение в бактериальной клетке рекомбинантной молекулы ДНК
Криоконсервация	Глубокое замораживание клеток
Лаг-фаза	Медленный рост культуры
Лиофильное высушивание	Обезвоживание после замораживания
Лузга	Отход при производстве масла из семян подсолнечника
Меласса	Отход производства сахара
Мезга	Отход производства крахмала, соков и т.д.
Модификация продукта	Перестройка полученных соединений животного, растительного или микробного происхождения с целью придания им специфических свойств
Папаин	Фермент получаемый из продуктов папай
Плаزمид	Добавочные кольца молекулы ДНК бактерий
Рестриктаза	Фермент разрезающий молекулу ДНК
Реципиент	Клетка, в которую переносят чужеродный ген
Скрининг	Проверка полученных клонов
Тотипотентность	Полноценность, информативность
Ультрафильтрация	Отделение веществ с помощью мембранных фильтров
Ферменты	Катализаторы белковой природы
Шелуха	Твердая оболочка семян

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Биотехнология. Биобезопасность. Биоэтика / А.П. Ермишин и др.; под ред. А.П. Ермишина. – Минск: «Тэхнолагія», 2005. – 430 с.
2. Биотехнология: теория и практика / Н.В. Загоскина и др. ; под ред. Н.В. Загоскиной, Л.В. Назаренко. – М.: «Оникс», 2009. – 496 с. – ISBN 978-5-488-02173
3. Биотехнология: учебное пособие для вузов, в 8 кн., под ред. Егорова Н.С., Самуилова В.Д. – М., 1987.
4. Клунова, С.М. Биотехнология: учебник / С.М. Клунова, Т.А. Егорова, Е.А. Живухина. – М.: Академия, 2010. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-6697-4
5. Бирюков, В.В. Основы промышленной биотехнологии / В.В. Бирюков. – М.: КолосС, 2004. – 296 с. – ISBN 5-9532-0231-8 («КолосС»); ISBN 5-98109-008-1 (АНО «Химия»)
6. 3. Сазыкин, Ю.О. Биотехнология / Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева; под ред. А.В. Катлинского. - М.: Академия, 2008. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-5506-0
7. Блинов, В.А. Общая биотехнология: курс лекций. В 2-х частях. Ч. 1 / В.А. Блинов. – Саратов, 2003.
8. Тарантул, В.З. Толковый биотехнологический словарь русско-английский: справочное издание [Электронный ресурс] / В.З. Тарантул. – М.: Языки славянских культур, 2009. – 936 с. – ISBN: 978-5-95-51-0342-6 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks.
9. Блинов, В.А. Общая биотехнология: Курс лекций. В 2-х частях. Ч. 2. – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский СГАУ», 2004. – 144 с. – ISBN 5-7011-0436-2
10. Щелкунов, С.Н. Генетическая инженерия [Электронный ресурс]: учебно-справочное пособие; доп. МО / С.Н. Щелкунов С.Н. – Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2010. – 514 с. – ISBN 978-5-379-01064-5 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
11. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение: Пер. с англ. / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М. : Мир, 2002.
12. Щербаков, В.Г. Биохимия: учебник / В.Г. Щербаков, В.Г. Лобанов, Т.Н. Прудникова. – 3-е изд., испр. и доп. – СПб.: ГИОРД, 2009. – 472 с. – ISBN 5-98879-008-9
13. Елинов, Н.П. Основы биотехнологии / Н.П. Елинов. – СПб.: Наука, 1995. – ISBN 5-02-026027-4
14. Сельскохозяйственная биотехнология / Шевелуха В.С. и др. – М.: Высшая школа, 2003. – 427 с. – ISBN: 5-06-004264-2
15. Щелкунов, С.Н. Генетическая инженерия. Учебно-справочное пособие / С.Н. Щелкунов. – Новосибирск: Наука, 2004. – 496 с. – ISBN: 5-94087-098-8
16. Журналы: Биотехнология, Вестник СГАУ, Прикладная биохимия и микробиология.

СОДЕРЖАНИЕ

Лекция 1	Классификация производств биосинтеза по отношению к контаминации	
1.1.	Классификация биотехнологических процессов по отношению к контаминации	4
1.2.	Специальные биотехнологические процессы	4-5
1.3.	Значение асептики в биотехнологических процессах	5
1.4.	Источники микробов-контаминантов в производственных помещениях	5-6
1.5.	Асептическое культивирование	6-8
Лекция 2	Стерилизация технологических потоков в биотехнологии	
2.1.	Методы отделения и деструкции контаминантов, их сравнительный анализ	8-9
2.2.	Сущность стерилизации	9
2.3.	Стерилизация фильтрованием	9-10
2.4.	Стерилизация воздухом	10
2.5.	Стерилизация питательных сред	10-11
2.6.	Термическая стерилизация	11-12
2.7.	Стерилизация термолабильных объектов	12-13
Лекция 3	Критерии и аппаратное оформление стерилизации	
3.1.	Стерилизация сухим жаром	13-14
3.2.	Влияние осмотического давления на биохимическую активность микроорганизмов	14
3.3.	Стерилизация ультрафиолетовым (УФ) излучением	14-15
3.4.	Стерилизация ультразвуком	15
3.5.	Стерилизация инфракрасным (ИК) излучением	15
3.6.	Стерилизация озоном	15-16
3.7.	Воздействие химического агента	16-17
3.8.	Промышленная очистка и стерилизация воздуха	17-19
Лекция 4	Материальный и энергетический баланс процесса биосинтеза	
4.1.	Стехиометрия микробного синтеза	19-20
4.2.	Методы расчета стехиометрических коэффициентов и составление материального баланса	20-22
4.3.	Баланс вещества и энергии при росте популяций микроорганизмов	22-23
4.4.	Массопередача кислорода от воздуха к клеткам	23-27
Лекция 5	Массообменные характеристики ферментационного оборудования	
5.1.	Экспериментальные данные теплообмена при культивировании микроорганизмов	27
5.2.	Потребление микробной культурой газового субстрата	27-28
5.3.	Растворимость газов	28-29
5.4.	Способы определения коэффициента массоотдачи	28-29
5.5.	Характеристика газожидкостных биореакторов	29-30
Лекция 6	Типы биореакторов	
6.1.	Классификация биореакторов в зависимости от способа перемешивания	31

6.2.	Классификация биореакторов в зависимости от способа подачи воздуха и периодичности действия	32
6.3.	Некоторые особенности культивирования биообъектов	32-33
6.4.	Асептически регулируемые ферментационные процессы	33
6.5.	Нестерильные процессы	33-34
Лекция 7	Классификация биореакторов	
7.1.	Барботажные биореакторы	35-36
7.2.	Газлифтные реакторы	36-37
7.3.	Струйные биореакторы	37-38
Лекция 8	Моделирование биореакторов	
8.1.	Основы аппаратурного оформления различных биотехнологических производств	38-39
8.2.	Типы биореакторов в зависимости от способа потребления энергии	39
8.3.	Моделирование биореакторов	40-41
8.4.	Методы инженерных расчетов биореакторов	41-44
Лекция 9	Оборудование для разделения	
9.1.	Центрифугирование. Типы центрифуг	44-45
9.2.	Сеператоры	45-48
Лекция 10	Оборудование для концентрирования	
10.1.	Концентрирование биомассы обезвоживанием	48
10.2.	Центрифужные выпарные пленочные аппараты	49
10.3.	Роторно-пленочные выпарные аппараты	49-50
10.4.	Выпарные аппараты с восходящей пленкой	50-52
10.5.	Пленочные трубчатые испарители со стекающей пленкой	52-53
Лекция 11	Оборудование для экстракции	
11.1.	Теоретические основы экстракционного метода	53
11.2.	Способы повышения эффективности экстракции	53-54
11.3.	Оборудование для экстракции	54-55
Лекция 12	Баромембранное разделение и очистка	
12.1.	Технологические особенности мембранного разделения неоднородных систем	55-56
12.2.	Основы мембранных технологий	56
12.3.	Классификация мембранных материалов и механизм их действия. Области применения	56
12.4.	Обратный осмос, ультрафильтрация, микро- и нанофильтрация	56-57
12.5.	Химическая стойкость мембран	57-58
12.6.	Мембраны для баромембранных процессов	58-59
12.7.	Факторы, влияющие на селективность и проницаемость мембран	59
12.8.	Мембранные процессы	59-60
12.9.	Мембранная фильтрация	60
12.10.	Электродиализ	60-61
Лекция 13	Хроматографические методы разделения и концентрирования	
13.1.	Физический смысл и методы хроматографического разделения и анализа	61-62
13.2.	Тонкослойная хроматография (ТСХ): возможности и ограничения	62-63

13.3.	Хроматография на бумаге	63
13.4.	Колоночная хроматография	63
13.5.	Ионообменная хроматография	63-65
13.5.	Гель-фильтрация	65-66
13.6.	Аффинная хроматография	66-68
13.7.	Гидрофобная хроматография	68-69
Лекция 14	Очистка газоздушных смесей и сточных вод биотехнологических производств	
14.1.	Сточные воды	69
14.2.	Промышленные стоки	69-70
14.3.	Объем и загрязненность сточных вод	70
14.4.	Способы очистки сточных вод	70-71
14.5.	Принципиальная технологическая схема очистки сточных вод	71-72
14.6.	Очистка газоздушных выбросов	72-74
Лекция 15	Принцип регулирования, контроля и управления процессами биосинтеза	
15.1.	Общая характеристика и функции автоматизированных систем управления	74
15.2.	Датчики и измеряемые величины	74-75
15.3.	Компьютерный контроль параметрами биосинтеза	75
15.4.	Структурная схема программы анализа информации датчиков	75-76
15.5.	Биологические датчики	76-78
	Словарь терминов	79-80
	Список литературы	81