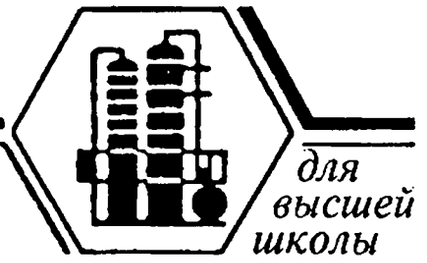


В. В. БИРЮКОВ

ОСНОВЫ ПРОМЫШЛЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

Допущено Учебно-методическим объединением по образованию в области химической технологии и биотехнологии в качестве учебного пособия для студентов высших учебных заведений, обучающихся по специальностям «Охрана окружающей среды и рациональное использование природных ресурсов» и «Машины и аппараты химических производств»

МОСКВА
«КолосС» «Химия»
2004

УДК 663.18
ББК 30.16
Б64

Редактор *Л. И. Галицкая*

Р е ц е н з е н т ы: д-р техн. наук проф. *В. М. Кантере*, Московский государственный университет пищевых производств; д-р техн. наук проф. *А. И. Жаринов*, Московский государственный университет прикладной биотехнологии

Бирюков В.В.

Б64 Основы промышленной биотехнологии. — М.: КолосС, 2004. — 296 с.: ил. — (Учебники и учеб. пособия для студентов высш. учеб. заведений).

ISBN 5—9532—0231—8 («КолосС»).
ISBN 5—98109—008—1 (АНО «Химия»).

Рассмотрено использование биотехнологии в различных отраслях народного хозяйства, приведены типовые схемы биотехнологических производств. Детально описаны процессы ферментации. Даны основы процессов биокатализа и биотрансформации. Показаны особенности выделения продукта в биотехнологических производствах.

Учебное пособие предназначено для студентов высших учебных заведений, обучающихся по специальностям «Охрана окружающей среды и рациональное использование природных ресурсов», «Машины и аппараты химических производств». Может быть использовано также научно-техническими сотрудниками и инженерно-техническими работниками агропромышленного комплекса, фармацевтической и химической промышленности и охраны окружающей среды в различных отраслях промышленности.

УДК 663.18
ББК 30.16

Biryukov V.V.

Fundamentals of industrial biotechnology: Textbook. — Moscow: KolosS, 2004. — 296 p.

The application of biotechnology in different branches of national economy is considered. The typical process flow sheet of biotechnological productions are presented.

Fermentation processes are described with full detail. The fundamentals of biocatalisis and biotransformation processes are also presented. Features of product isolation in biotechnological productions are demonstrated in detail.

The book can be used as a training and for students specialized in fields of biotechnology, biochemical engineering aid environment protection.

ISBN 5—9532—0231—8 («КолосС»)
ISBN 5—98109—008—1 (АНО «Химия»)

© Издательство «КолосС», 2004
© Бирюков В. В., 2004

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список условных обозначений 11
Предисловие 15
Глава 1. ПРЕДМЕТ ПРОМЫШЛЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ 17
1.1. Виды технологий 17
1.2. Что такое биотехнология 18
1.3. Преимущества биотехнологических процессов 22
Вопросы для повторения 22
Глава 2. ЗНАЧЕНИЕ БИОТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ РАЗЛИЧНЫХ ОТРАСЛЕЙ НАРОДНОГО ХОЗЯЙСТВА 23
2.1. Биотехнология в медицине 23
2.2. Биотехнология в пищевой промышленности 28
2.3. Биотехнология в сельском хозяйстве 31
2.4. Экологическая биотехнология 35
2.5. Биотехнология и энергетика 39
2.6. Другие приложения биотехнологии 41
2.7. История развития биотехнологии 43
Вопросы для повторения 44
Глава 3. ТИПОВАЯ СХЕМА И ОСНОВНЫЕ СТАДИИ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДСТВ 46
3.1. Биотехнологическая стадия 46
3.2. Подготовительные стадии 48
3.3. Разделение жидкости и биомассы 49
3.4. Выделение продуктов биосинтеза 49
3.5. Очистка продукта 50
3.6. Концентрирование продукта 51
3.7. Получение готовой формы продукта 52
3.8. Очистка стоков и выбросов 52
3.9. Виды продуктов по их месту в типовой технологической схеме 52
3.10. Примеры блок-схем биотехнологических производств 54
Вопросы для повторения 64
Глава 4. ПРОЦЕСС ФЕРМЕНТАЦИИ: ОСНОВНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ 65
4.1. Классификация процессов ферментации 65
4.2. Основные параметры периодической ферментации 69
4.3. Кинетические характеристики процесса 70
4.4. Макростехиометрические характеристики процесса 74
Вопросы для повторения 76
Глава 5. СТЕХИОМЕТРИЯ ПРОЦЕССОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ 77
5.1. Основные принципы стехиометрии 77
5.2. Вывод «формулы» биомассы микроорганизмов 78
5.3. Расчет выхода биомассы на углеродный субстрат 81
5.4. Определение стехиометрических соотношений в реальных процессах ферментации 84

5.5. Расчет тепла, выделяемого в биохимическом процессе
Вопросы для повторения
Глава 6. СЫРЬЕ ДЛЯ ПРОЦЕССОВ ФЕРМЕНТАЦИИ
6.1. Основные понятия
6.2. Источники углеродного питания
6.3. Источники азотного питания
6.4. Другие виды сырья
6.5. Выбор сырья для конкретных процессов ферментации
Вопросы для повторения
Глава 7. ОПТИМИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТАЦИОННЫХ СРЕД
7.1. Основные понятия
7.2. Традиционные методы изучения многофакторных зависимостей
7.3. Метод Бокса—Уилсона
7.4. Математические процедуры в методе Бокса—Уилсона
7.5. Статистическая оценка результатов
7.6. Заключительные этапы оптимизации среды
7.7. Многоуровневые планы эксперимента
Вопросы для повторения
Глава 8. МАТЕМАТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ КИНЕТИКИ ПРОЦЕССОВ ФЕРМЕНТАЦИИ
8.1. Зависимость скорости роста микроорганизмов от концентрации субстрата
8.2. Зависимость скорости роста микроорганизмов от концентрации продукта метаболизма
8.3. Многофакторные кинетические уравнения
8.4. Отмирание (диссимиляция) биомассы
8.5. Зависимость скорости роста микроорганизмов от температуры
8.6. Зависимость кинетики роста микроорганизмов от величины pH
8.7. Математические модели кинетики биосинтеза продуктов метаболизма как функции удельной скорости роста микроорганизмов
8.8. Субстрат-зависимые модели кинетики биосинтеза продуктов метаболизма
8.9. Модели, основанные на концепции возраста культуры микроорганизмов
8.10. Кинетика деградации (инактивации) продуктов метаболизма
8.11. Кинетика потребления субстрата
8.12. Зависимость «кажущегося» экономического коэффициента от удельной скорости роста микроорганизмов
8.13. Блочный подход к моделированию процессов ферментации
Вопросы для повторения
Глава 9. НЕПРЕРЫВНОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ
9.1. Тубулярный процесс
9.2. Хемостатный процесс непрерывного культивирования
9.3. Сравнение производительности периодического и непрерывного процессов
9.4. Отклонения от теории хемостата при лимитировании процесса различными субстратами
9.5. Хемостатный процесс культивирования, лимитированный кислородом
9.6. Автоселекция в непрерывном процессе
9.7. Хемостат с рециркуляцией биомассы клеток
9.8. Двухстадийный хемостат
9.9. Метод импульсных добавок для подбора оптимальной среды в хемостате
9.10. Непрерывное культивирование с внешним регулированием параметров

9.11. Преимущества и недостатки непрерывного способа культивирования микроорганизмов ... 186
Вопросы для повторения ... 188

Глава 10. УПРАВЛЕНИЕ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИМИ РЕЖИМАМИ ПЕРИОДИЧЕСКИХ И ПОЛУПЕРИОДИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ ФЕРМЕНТАЦИИ ... 190
10.1. Основные технологические параметры и управляющие воздействия в процессе ферментации ... 190
10.2. Формулирование задачи оптимизации профилей изменения режимных параметров во времени ... 191
10.3. Ступенчатые профили изменения режимных параметров периодической ферментации ... 194
10.4. Особенности регулирования концентрации субстрата в периодических и полупериодических процессах ферментации ... 196
10.5. Оптимизация времени завершения периодического процесса ферментации ... 199
10.6. Преимущества и недостатки периодических и полупериодических процессов ферментации ... 200
Вопросы для повторения ... 201

Глава 11. МАСШТАБИРОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ ФЕРМЕНТАЦИИ ... 202
11.1. Постановка задачи масштабирования ... 202
11.2. Подход к масштабированию на основе концентрации растворенного кислорода ... 203
11.3. Другие критерии масштабного перехода ... 208
Вопросы для повторения ... 212

Глава 12. БИОКАТАЛИЗ И БИОТРАНСФОРМАЦИЯ ... 214
12.1. Основные понятия ... 214
12.2. Вывод уравнения Михаэлиса—Ментен ... 216
12.3. Другие уравнения ферментативной кинетики ... 219
12.4. Преимущества и недостатки биокаталитических процессов ... 221
12.5. Основные понятия иммобилизации ферментов ... 222
12.6. Методы иммобилизации ферментов ... 223
12.7. От иммобилизованных ферментов к иммобилизованным клеткам ... 226
12.8. Диффузионные ограничения в гранулах иммобилизованных ферментов и клеток ... 227
12.9. Технологические схемы реализации процессов биотрансформации ... 230
12.10. Общая оценка процессов биотрансформации ... 234
12.11. Примеры использования ферментов ... 235
Вопросы для повторения ... 235

Глава 13. ОТДЕЛЕНИЕ БИОМАССЫ ОТ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ ... 237
13.1. Основные понятия ... 237
13.2. Отстаивание и осаждение ... 238
13.3. Центрифугирование и сепарация ... 239
13.4. Фильтрация ... 241
13.5. Флотация ... 245
Вопросы для повторения ... 247

Глава 14. ДЕЗИНТЕГРАЦИЯ КЛЕТОК МИКРООРГАНИЗМОВ ... 248
14.1. Основные понятия ... 248
14.2. Механические методы ... 250
14.3. Немеханические методы ... 252
Вопросы для повторения ... 255

Глава 15. ЭКСТРАКЦИОННЫЕ МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ПРОДУКТОВ МЕТАБОЛИЗМА ... 256
15.1. Традиционные методы экстрагирования продуктов из биомассы ... 256

15.2. Экстрагирование «суперкритическими» жидкостями 261
15.3. Жидкофазная центробежная экстракция 263
Вопросы для повторения 266

Глава 16. СОРБЦИОННЫЕ МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ПРОДУКТОВ БИОСИНТЕЗА 267
16.1. Основные понятия 267
16.2. Ионный обмен 267
16.3. Адсорбция микропористыми сорбентами 274
16.4. Хроматография 275
16.5. Биосорбция 277
16.6. Иммуносорбция 278
Вопросы для повторения 278

Глава 17. МЕМБРАННЫЕ МЕТОДЫ В БИОТЕХНОЛОГИИ 279
17.1. Микрофильтрация 279
17.2. Диализ 281
17.3. Ультрафильтрация 282
17.4. Обратный осмос 287
Вопросы для повторения 288

Глава 18. НОРМАТИВНЫЕ ДОКУМЕНТЫ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДСТВ 289
18.1. Технические условия на продукт 289
18.2. Технологический регламент производства 290
18.3. Этапы разработки технологии 294
Вопросы для повторения 295

Библиографический список 295

CONTENTS

List of designations 11

Preface 15

Chapter 1. SUBJECT OF INDUSTRIAL BIOTECHNOLOGY 17
1.1. Classification of technologies 17
1.2. What is biotechnology 18
1.3. Advantages of biotechnological processes 22
Questions for rehearsal 22

Chapter 2. SIGNIFICANCE OF BIOTECHNOLOGY FOR DIFFERENT BRANCHES OF NATIONAL ECONOMY 23
2.1. Biotechnology in pharmaceutics 23
2.2. Biotechnology in food industry 28
2.3. Biotechnology in agriculture 31
2.4. Ecological biotechnology 35
2.5. Biotechnology and energetics 39
2.6. Other applications of biotechnology 41
2.7. History of progress of biotechnology 43
Questions for rehearsal 44

Chapter 3. TYPICAL FLOW SHEET AND MAIN STAGES OF BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTIONS 46
3.1. Biotechnological stage 46
3.2. Preliminary preparing stages 48
3.3. Separation of liquid and biomass 49
3.4. Isolation of biosynthesis products 49
3.5. Purification of product 50
3.6. Product concentrating 51
3.7. Manufacturing of final form of product 52
3.8. Treatment of sewages and waste gases 52
3.9. Classification of products according to their position in typical technology flow sheet 52
3.10. Examples of process flow diagrams of biotechnological productions 54
Questions for rehearsal 64

Chapter 4. FERMENTATION PROCESS: BASIC CHARACTERISTICS 65
4.1. Classification of fermentation processes 65
4.2. Main parameters of batch fermentation 69
4.3. Kinetic characteristics of process 70
4.4. Macrostoichiometric characteristics of process 74
Questions for rehearsal 76

Chapter 5. STOICHIOMETRY OF PROCESSES OF CULTIVATION OF MICROORGANISMS 77
5.1. Basic principles of stoichiometry 77
5.2. Deduction of «formula» of microbial biomass 78

5.3. Estimation of yield of biomass on carbonic substrate
5.4. Determination of stoichiometric relationships in real fermentation processes
5.5. Calculation of heat evolution in biochemical processes
Questions for rehearsal

Chapter 6. RAW MATERIALS FOR FERMENTATION PROCESSES
6.1. Basic concepts
6.2. Carbonic nutrition sources
6.3. Nitrogen nutrition sources
6.4. Other forms of raw materials
6.5. Choice of raw materials for particular fermentation processes
Questions for rehearsal

Chapter 7. OPTIMIZATION OF FERMENTATION MEDIA
7.1. Basic concepts
7.2. Conventional methods of research stugy of many factor relationships
7.3. Box–Wilson method
7.4. Mathematical procedures in Box–Wilson method
7.5. Statistical assessment of results
7.6. Final stages of media optimization
7.7. Many level designs of experiment
Questions for rehearsal

Chapter 8. MATHEMATICAL MODELS OF FERMENTATION PROCESS KINETICS
8.1. Dependence of microbial growth rate on substrate concentration
8.2. Dependence of microbial growth rate on metabolite product concentration
8.3. Many factor kinetic equations
8.4. Biomass dissimilation or biomass dying off
8.5. Dependence of microbial growth rate on temperature
8.6. Dependence of microbial growth rate on pH value
8.7. Mathematical models of metabolite products kinetics versus specific growth rate of microorganisms
8.8. Substrate subordinated models of metabolite product biosynthesis kinetics
8.9. Models based on microbial culture age conception
8.10. Kinetics of degradation (inactivation) of metabolite products
8.11. Kinetics of substrate consumption
8.12. Dependence of «apparent» economic coefficient on specific growth rate of microorganisms
8.13. Block approach to process modeling
Questions for rehearsal

Chapter 9. CONTINUOUS CULTIVATION OF MICROORGANISMS
9.1. Tubular process
9.2. Basic conception of chemostat continuous cultivation
9.3. Comparison of productivity of batch and continuous processes
9.4. Deviations of chemostat theory under limitation by different substrates
9.5. Chemostat cultivation process limited by oxygen
9.6. Autoselection in continuous process
9.7. Chemostat with biomass recirculation
9.8. Two-stage chemostat
9.9. Pulse-like addition method for adjusting optimal medium in chemostat
9.10. Continuous cultivation with external loop of control
9.11. Advantages and defects of continuous method of microorganisms cultivation
Questions for rehearsal

Chapter 10. CONTROL OF TECHNOLOGICAL OPERATIONS OF BATCH AND SEMI-BATCH FERMENTATION PROCESSES 190
10.1. Basic technological parameters and control actions in fermentation process 190
10.2. Formulating problem of optimization of control time profiles 191
10.3. Step-like control profiles of batch fermentation 194
10.4. Peculiarities of substrate concentration control in batch and semi-batch fermentation processes 196
10.5. Optimization of finalizing time of batch fermentation process 199
10.6. Advantages and defects of batch and semi-batch fermentation processes 200
Questions for rehearsal 201

Chapter 11. SCALE-UP OF FERMENTATION PROCESSES 202
11.1. Setting up the problem of scale-up 202
11.2. Scale-up approach based on dissolved oxygen concentration 203
11.3. Other criteria of scale-up 208
Questions for rehearsal 212

Chapter 12. BIOCATALYSIS AND BIOTRANSFORMATION 214
12.1. Basic concepts 214
12.2. Deduction of Michaelis–Menten equation 216
12.3. Other equation of enzymatic kinetics 219
12.4. Advantages and defects of biocatalitic processes 221
12.5. Basic concepts of enzymes immobilization 222
12.6. Methods of enzymes immobilization 223
12.7. From immobilized enzymes to immobilized cells 226
12.8. Diffusionic restrictions in granules of immobilized enzymes and cells 227
12.9. Technological methods of realization of biotransformation processes 230
12.10. General assessment of biotransformation processes 234
12.11. Examples of enzyme application 235
Questions for rehearsal 235

Chapter 13. BIOMASS SEPARATION FROM CULTURAL LIQUID 237
13.1. Basic concepts 237
13.2. Clarification and precipitation 238
13.3. Centrifuging and separation 239
13.4. Filtration 241
13.5. Flotation 245
Questions for rehearsal 247

Chapter 14. DISINTEGRATION OF MICROBIAL CELLS 248
14.1. Basic concepts 248
14.2. Mechanical methods 250
14.3. Non-mechanical methods 252
Questions for rehearsal 255

Chapter 15. EXTRACTION METHODS OF METABOLITE PRODUCTS ISOLATION 256
15.1. Tradition methods of extraction of products from biomass 256
15.2. Extraction by supercritical liquids 261
15.3. Liquid-phase centrifugal extraction 263
Questions for rehearsal 266

Chapter 16. SORPTION METHODS OF ISOLATION OF BIOSYNTHESIS PRODUCTS 267
16.1. Basic concepts 267
16.2. Ion exchange 267
16.3. Adsorption by micro-porous sorbents 274
16.4. Chromatography 275
16.5. Biosorption 277
16.6. Immuno-sorption 278
Questions for rehearsal 278

Chapter 17. MEMBRANE METHODS IN BIOTECHNOLOGY 279
17.1. Microfiltration 279
17.2. Dialysis 281
17.3. Ultra-filtration 282
17.4. Reverse osmosis 287
Questions for rehearsal 288
Chapter 18. STANDARTAZING DOCUMENTS OF BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTIONS 289
18.1. Standard specification for product 289
18.2. Technology regulation of production 290
18.3. Stages of technology development 294
Questions for rehearsal 295
References 295

СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

●

A — реагент химических или биохимических превращений; площадь сечения потока в тубулярном биореакторе

a — коэффициент кинетического уравнения; коэффициент рециркуляции биомассы из сепаратора в ферментер; параметр изотермы Ленгмюра

B — реагент химических или биохимических превращений

b — коэффициент сгущения в сепараторе

b_0, b_i, b_n — коэффициенты уравнений регрессии

C — реагент химических или биохимических превращений; концентрация растворенного кислорода

C^* — концентрация растворенного в жидкости кислорода при ее насыщении воздухом

$C_{кр}$ — критическая концентрация растворенного кислорода

$C_ж$ и $C_ж^р$ — соответственно текущая и равновесная концентрации извлекаемого из биомасы вещества в жидкости

$C_т$, $C_{т0}$ и $C_{тр}$ — концентрация растворенного вещества в твердой фазе, соответственно текущая, начальная и равновесная

$C_{ор}$ и $C_{вр}$ — концентрации растворенного вещества в равновесном состоянии соответственно в органической и водной фазах

$C_о$ и $C_в$ — текущие концентрации растворенного вещества соответственно в органической и водной фазах

$C_к$ и $C_п$ — концентрации растворенного вещества при мембранном разделении соответственно в концентрате и пермеате

D — продукт химического или биохимического превращения; коэффициент диффузии; скорость разбавления в хемостате

$D_{кр}$ — критическая скорость разбавления в хемостате

$D_{опт}$ — скорость разбавления, обеспечивающая максимальную производительность культуры в хемостате

$D_о$ — скорость разбавления, при которой происходит переключение на лимитирование кислородом

$D_{хем}$ и $D_{компл}$ — соответственно скорости разбавления хемостата и комплекса «непрерывный ферментер—сепаратор»

D_1 и D_2 — скорости разбавления в первом и втором биореакторах двухстадийного хемостата, отнесенные к объему жидкости

D_{12} и D_{22} — скорости разбавления в первом и втором биореакторах двухстадийного хемостата, отнесенные к объему жидкости во втором биореакторе

Da — критерий Дамкелера

D_{O_2} — коэффициент диффузии кислорода внутри гранулы

D_S — коэффициент диффузии субстрата внутри гранулы

$d_м$ — диаметр мешалки

E — фермент; концентрация свободного фермента; энергия активации

$E_о$ — общая концентрация фермента во всех формах в ферментативной реакции

ES — фермент-субстратный комплекс

ES_1S_2 — комплекс фермента с двумя субстратами

e — основание натурального логарифма

R — универсальная газовая постоянная; радиус гранулы микроколонии или биокатализатора; коэффициент удержания в мембранных процессах; коэффициент эффективности дезинтеграции клеток

r — текущее значение радиуса в грануле биокатализатора

$r_{ос}$ — коэффициент сопротивления осадка при фильтровании

$r_{фп}$ — коэффициент сопротивления фильтровальной перегородки

S — субстрат; концентрация субстрата

ΔS — приращение субстрата

$\Delta S_б$, ΔS_i — шаг приращения соответственно базового и i-го факторов при расчете программы крутого восхождения

S_0 — начальная концентрация субстрата или концентрация субстрата во входном потоке при непрерывном культивировании

$S_{i\,min}$, $S_{i\,max}$ — минимальное и максимальное значения концентрации i-го субстрата при подборе сред методом планирования эксперимента

$S_ж$ — концентрация субстрата в основной массе жидкости и на поверхности гранулы биокатализатора

T — температура; время ферментации

T_X и T_P — температура, оптимальная для роста микроорганизмов и для биосинтеза продукта соответственно

$T_{кр}$ — критическая температура для сверхкритических жидкостей-экстрагентов

t — время; критерий Стьюдента

t_0 — время подготовки аппарата

$t_к$ — время завершения периодического процесса ферментации

$t_н$ — время начала подпитки в периодическом процессе с подпиткой субстрата

$t_п$ — время переключения в ступенчатых программах управления режима, оптимального для роста биомассы, на режим, оптимальный для биосинтеза продукта

V — объем жидкости в аппарате; скорость ферментативной реакции

V_1 и V_2 — объемы культуральной жидкости соответственно в первом и втором ферментерах двухстадийного хемостата

$V_т$ и $V_ж$ — объем твердой и жидкой фаз при экстрагировании

$V_о$ и $V_в$ — объемы органической и водной фаз при жидкостной экстракции

V_{max} — кинетическая константа максимальной скорости ферментативной реакции

v — скорость движения частицы относительно жидкости при осаждении в центробежном поле

v_0 — скорость свободного осаждения частицы

Y — коэффициент выхода

Y_{XS}, Y_{PS} — экономические коэффициенты по биомассе и продукту метаболизма соответственно

Y_{SX}, Y_{SP} — трофические коэффициенты для биомассы и продукта метаболизма соответственно

Y^*_{XS} — кажущаяся величина экономического коэффициента

Y_{XO}, Y_{PO} — макростехиометрические коэффициенты выхода биомассы и продукта по кислороду

$y_{жт}$ — коэффициент распределения растворенного вещества между жидкой и твердой фазами

X — концентрация биомассы микроорганизмов

ΔX — приращение концентрации биомассы

X_0 — концентрация биомассы в начале ферментации; на входе в тубулярный биореактор

X_m — максимально достигаемая в данном биореакторе концентрация биомассы микроорганизмов

$X_с$ — концентрация сгущенной биомассы на выходе из сепаратора

$X_к$ — концентрация биомассы в конце ферментации

γ — число повторений опыта; степень восстановленности органического соединения

γ_S, γ_X, γ_P — степень восстановленности соответственно субстрата, биомассы, продукта метаболизма

F — поверхность фильтрации; расход жидкости через ферментер при непрерывном культивировании; критерий Фишера при статистическом анализе

F_0 — расход циркулирующего потока в тубулярном биореакторе

F_c — общий расход сгущенной биомассы на выходе из сепаратора; сила сопротивления среды осаждению

F_p — расход рециркулирующей в ферментер сгущенной биомассы из сепаратора

$F_{вых}$ — расход сгущенной биомассы, отбираемой в качестве товарного продукта

$F_ц$ — центробежная сила

f — число степеней свободы при статистическом анализе

f_a — число степеней свободы при определении дисперсии адекватности

G_S, G_X, G_P, G_{O_2}, G_{CO_2} — общее количество субстрата, биомассы, продукта метаболизма, кислорода, диоксида углерода соответственно

g — ускорение свободного падения; время генерации культуры

H — тепловыделение; высота слоя жидкости в аппарате

K, K_S, K_1, K_2, K_i, K_P — константы кинетических уравнений

K_V — объемный коэффициент массопередачи

K_La — объемный коэффициент массопередачи по кислороду

K_1, K_{-1} — константы скорости образования и распада фермент-субстратного комплекса

K_M — субстратная константа Михаэлиса

K_{S_1} — субстратная константа Моно

K_S' — кажущаяся константа Моно при наличии диффузионных ограничений

K_{O_2} — «истинная» константа Михаэлиса для кислорода

K_p — коэффициент распределения растворенного в жидкости вещества при экстракции жидкость—жидкость

L — общая длина тубулярного биореактора

l — текущая длина в тубулярном биореакторе от места ввода среды в аппарат

m — показатель числа атомов углерода в стехиометрической формуле; число шагов крутого восхождения; коэффициент поддержания жизнедеятельности культуры

m_S, m_O — коэффициенты поддержания жизнедеятельности культуры по субстрату, по кислороду

m_{oc} — удельная масса осадка в 1 м^3 суспензии (в уравнении фильтрации)

N — мощность; число пропусканий суспензии через дезинтегратор; число опытов в матрице планирования эксперимента

$N_{уд}$ — удельная мощность перемешивания

n — показатель числа атомов водорода в стехиометрической формуле; число варьируемых факторов при подборе сред

P — продукт метаболизма; концентрация продукта метаболизма; давление

ΔP — перепад давления; приращение продукта метаболизма

$\bar{P}$, $\hat{P}$ — среднее и расчетное значение концентрации продукта метаболизма

$P_{кр}$ — критическое давление для сверхкритических жидкостей-экстрагентов

Q — общая скорость потребления или выделения вещества на единицу объема в единицу времени

Q_X — общая скорость роста биомассы микроорганизмов; продуктивность культуры по биомассе в непрерывном процессе

$\bar{Q}_X$ — общая скорость деградации биомассы микроорганизмов

Q_P — общая скорость биосинтеза продукта метаболизма

$\bar{Q}_P$ — общая скорость деградации (инактивации) продукта метаболизма

Q_S — общая скорость потребления субстрата на единицу объема в единицу времени

$\bar{Q}_S$ — среднее потребление субстрата гранулой биокатализатора

Q_{O_2} — общая скорость потребления кислорода

Q_{CO_2} — общая скорость выделения диоксида углерода (интенсивность дыхания)

Q_H^+, Q_H^- — соответственно скорость выделения и отвода тепла в ферментере

q_P, q_S, q_{O_2}, q_{CO_2} — удельные скорости потребления (q_S и q_{O_2}) и выделения (q_P и q_{CO_2}) для продукта, субстрата, кислорода и диоксида углерода на единицу биомассы микроорганизмов в единицу времени

Δ_i — запас изменения концентрации i-го субстрата от центра планирования до максимального или минимального значения

ε — доверительный интервал коэффициента регрессии

λ_i — интервал варьирования i-го субстрата в натуральных величинах при подборе сред методами планирования эксперимента

μ — удельная скорость роста

μ_m — максимальная удельная скорость роста

$\bar{\mu}$ — удельная скорость диссимиляции биомассы

μ_X и μ_P — удельная скорость роста при условиях культивирования, оптимальных для роста микроорганизмов и для биосинтеза продукта метаболизма соответственно

η — энергетический выход биомассы; динамическая вязкость; степень извлечения растворенного вещества из твердой или жидкой фазы

ν_A, ν_B, ν_C, ν_D, ν_H, ν_S, ν_N, ν_Φ, ν_{O_2}, ν_X, ν_P, ν_{CO_2}, ν_{H_2O} — стехиометрические коэффициенты

ρ — плотность

$\rho_ч$ и $\rho_ж$ — плотность частицы и жидкости соответственно

ω — угловая скорость барабана сепаратора

σ^2 — дисперсия воспроизводимости единичного измерения

$\sigma^2_{\bar{P}}$ — дисперсия воспроизводимости среднего значения

σ^2_a — дисперсия адекватности

θ — возраст клеток микроорганизмов

$\bar{\theta}$ — средний возраст культуры

θ^* — возраст зрелости микробной клетки

ПРЕДИСЛОВИЕ

●

Биотехнология является в настоящее время одним из приоритетных направлений науки, с которым связывают благосостояние всего человечества в обозримом будущем. Слово «биотехнология» является, вероятно, одним из наиболее широко употребляемых терминов в последние 20 лет. При этом содержание, которое вкладывается в этот термин, зачастую существенно различается. Например, многие под биотехнологией понимают использование растениеводства и животноводства для народного хозяйства — то, что обычно называют сельскохозяйственным производством. Другое направление, также определяемое термином «биотехнология», — применение различных генетических манипуляций для получения трансформированных геномов любых живых объектов — от вирусов до человека. От этого направления ожидают революционных изменений в качестве жизни человечества, и эти надежды вполне обоснованны.

Однако достижения биотехнологии становятся реальной помощью народному хозяйству и отдельным людям лишь тогда, когда на их основе создаются промышленные производства, функционирование которых направлено на разработку практически ценных продуктов в заметных, а не микроскопических количествах.

Именно эта сторона деятельности человека охватывается дисциплиной «Промышленная биотехнология». Знания по этой дисциплине нужны не только непосредственно инженерам-биотехнологам, но также и инженерам-механикам, имеющим дело с оборудованием биотехнологических производств, и инженерам-экологам при работе с этими производствами.

При подготовке настоящего пособия ставилась задача создать компактный курс, в котором без излишней детализации были бы изложены основы промышленной биотехнологии.

Предполагается, что студенты, приступающие к изучению промышленной биотехнологии, должны быть знакомы с основами технической микробиологии, а также с процессами и аппаратами химической технологии, которые должны быть освещены в соответствующих дисциплинах учебного плана. В настоящее пособие не включены разделы по технике и технологии реализации асептики в биотехнологических производствах, а также по методам

оценки массообмена в процессах ферментации. Это объясняется наличием в учебном плане отдельной дисциплины «Биореакторы и асептика».

Практические примеры, рассматриваемые в книге, взяты из производств антибиотиков, вакцин, кормового белка и аминокислот, экологической и пищевой биотехнологии, с которыми автор сталкивался при работе в прикладных научно-исследовательских институтах. В целом пособие обобщает курс лекций, опробованный автором при подготовке студентов по специализации 170504 «Биотехника» в течение 10 лет в Московском государственном университете инженерной экологии. В настоящее время подобный курс читается для студентов по специализации «Биотехнологическая защита окружающей среды».

Пособие можно использовать также для курса «Основы микробиологии и биотехнологии», который предусмотрен учебным планом для всех специализаций специальности 3207 «Охрана окружающей среды и рациональное использование природных ресурсов».

В качестве дополнительной литературы пособие может быть полезным также при изучении некоторых дисциплин учебного плана специальности 0701 «Биотехнология». Библиографический список, использованный автором при подготовке настоящего пособия, значительно шире приведенного в конце текста, являющегося скорее указателем доступной литературы для студентов, чем строгим цитированием литературных источников. Надеюсь, что авторы этих источников не будут ко мне в претензии, поскольку такова общепринятая практика при написании учебников и учебных пособий.

В заключение хотелось бы выразить благодарность профессорам А.И. Жаринову и В.М. Кантере, взявшим на себя труд рецензирования пособия, а также Т. А. Новожиловой и О. А. Недоспасову, оказавшим большую помощь при подготовке рукописи к изданию.

Автор сознает, что пособие не свободно от недостатков, и с благодарностью примет любые замечания и конструктивную критику, которые могут быть полезными при переиздании книги.

В.В. Бирюков

денных примеров можно указать на технологию переработки древесины для производства деревянной мебели или различные методы получения металлических изделий, например гвоздей или деталей машин.

Химические технологии. В процессе получения продукта в химических технологиях сырье претерпевает изменения химического состава. Можно привести множество примеров: получение полиэтилена из природного газа, удобрения аммиачной селитры из воздуха и природного газа, спирта из природного газа или древесины, синтетического каучука из природного газа, красителей и многих лекарств из простых химических соединений (кислоты, щелочи, бензола и других простых веществ).

Ассортимент продуктов, получаемых с помощью химических технологий, весьма велик.

Более подробно рассмотрим биотехнологии.

1.2. ЧТО ТАКОЕ БИОТЕХНОЛОГИЯ

Биотехнология — это целенаправленное получение ценных для народного хозяйства и различных областей человеческой деятельности продуктов, в процессе которого используется биохимическая деятельность микроорганизмов, изолированных клеток или их компонентов.

В этом определении скрыты некоторые «подводные камни», поэтому рассмотрим его более подробно на примерах.

Наиболее часто биотехнологию путают с растениеводством или животноводством.

Например, получение пшеницы из воды и удобрений на первый взгляд — биотехнология. Однако здесь используется биохимическая деятельность *не изолированных клеток*, а целого растения, макроорганизма, относящегося к высшим, многоклеточным организмам. Это — не биотехнология, а растениеводство.

Точно так же получение лекарства из корня женьшеня — не биотехнология. А вот когда из этого корня берут отдельные клетки, отделяя их с помощью ферментов от многоклеточной растительной ткани, и разводят эти отдельные, *изолированные клетки* на специальном питательном растворе, как дрожжи, получая биомассу изолированных клеток женьшеня, из которой путем настаивания можно получить столь же ценное лекарство, как из целого корня, — это уже биотехнология.

Другой пример — производство молока. Молоко получают от коровы, овцы или другого млекопитающего животного, т. е. это — работа *макроорганизма*. Значит, это не биотехнология. А вот получение из молока кефира, йогурта или другого кисло-молочного продукта основано на биохимической деятельности молочно-кислых *бактерий* — это вполне легитимная биотехнология.

Глава 1

ПРЕДМЕТ ПРОМЫШЛЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

●

1.1. ВИДЫ ТЕХНОЛОГИЙ

Технология — это совокупность способов, приемов для получения из исходного материала (*сырья*) некоторого практически ценного *продукта*, например:

- стула или стола (продукты) из березы (сырье);
- электрической энергии (продукт) из каменного угля (сырье);
- полиэтиленовых пакетов (продукт) из природного газа (сырье);
- удобрения — аммиачной селитры (продукт) из воздуха и природного газа (сырье);
- молока (продукт) из травы (сырье);
- спирта (продукт) из сахара (сырье);
- дрожжей (продукт) из сахара (сырье);
- кефира (продукт) из молока (сырье).

Очень часто для получения одного продукта требуется не один, а несколько источников сырья, не один способ или прием, а последовательность нескольких способов, приемов.

Обычно название той или иной технологии состоит из двух частей: первая — слово «технология», вторая — наименование продукта. Например: технология аммиачной селитры, технология молока, технология дрожжей и т. д. Иногда пишут «технология получения продукта», что также правомерно, особенно в тех случаях, когда существует еще и определенная технология применения продукта, например различных видов топлива.

Основные классы технологий. Хотя технологий существует по крайней мере столько же, сколько и разных видов созданных человеком продуктов (а многие продукты имеют и по множеству разных технологий), все это многообразие технологий можно подразделить на 3 основных класса:

физико-механические технологии;

химические технологии;

биотехнологии.

Физико-механические технологии. Как следует из названия, в таких технологиях исходный материал (сырье) в процессе получения продукта меняет форму или агрегатное состояние, но не изменяет своего химического состава. Из приве-

В производстве глюкозы из крахмала есть процесс гидролиза: раствор крахмала подкисляют, нагревают до определенной температуры и выдерживают некоторое время. В результате крахмал распадается на глюкозу, получается гидролизат — грязноватый раствор глюкозы с примесями. Это — типичный химический процесс. Есть другой процесс — процесс ферментативного гидролиза крахмала. В этом случае к суспензии крахмала добавляют фермент, и под его действием также происходит расщепление крахмала до глюкозы, но в гораздо более мягких условиях и без образования нежелательных примесей, с меньшими потерями. Ферменты — это выделенные из клетки белковые вещества, *компоненты клетки.* Следовательно, по определению, этот процесс — биотехнология.

Во всех приведенных примерах в качестве основания для отнесения процесса к биотехнологии или к химической технологии мы рассматривали то, посредством *каких воздействий* осуществляется обработка продукта.

Иногда обращают внимание на другое: *какое сырье* обрабатывается — химическое или биологическое.

Например, очень часто производство мясных продуктов относят к биотехнологии, обосновывая это тем, что исходное сырье — туши забитых животных, сырое мясо и так далее — являются продуктами биологического происхождения.

С этой точки зрения, например, приготовление котлет — это биотехнология, хотя рабочий процесс заключается в измельчении мяса и затем в его тепловой обработке, т. е. нет биохимической деятельности микроорганизмов или клеток, а значит, это не биотехнология. А вот обработка мясного фарша определенными заквасками и последующий режим созревания, используемый при приготовлении дорогих сортов колбас, — это, конечно, биотехнология.

На практике часто не делают столь строгих различий, и многие процессы переработки сырья биологического происхождения называют процессами биотехнологическими.

В дальнейшем мы увидим, что и строго биотехнологические производства, например микробиологическое получение спирта или антибиотиков, имеют в своем составе кроме биотехнологических также химико-технологические и физико-механические процессы.

Поскольку сырьем для каждого из этих процессов служит полупродукт биотехнологического происхождения, эти процессы вполне законно также называют биотехнологическими — как часть многостадийной технологии производства.

Обратим внимание еще на одно важное слово в определении биотехнологии — «целенаправленно». Действительно, с точки зрения человека микроорганизмы работают в природе не всегда целенаправленно. Например, многие болезни вызываются действием

микроорганизмов, и наоборот, многие микроорганизмы, населяющие человеческое тело (их масса достигает 2—3 кг), полезны. Вспомните, что после лечения антибиотиками, когда эти полезные микроорганизмы уничтожаются наряду с вредными, возникает такое заболевание, как дисбактериоз, которое приходится лечить введением в организм бактерий (например, бифидобактерий или молочно-кислых бактерий). Это не биотехнология, а медицина.

Биотехнология — это организованная человеком деятельность микроорганизмов, направленная на получение определенного продукта.

Существует биогеохимическая деятельность бактерий, в результате чего происходит переработка растительности и деревьев в торф, уголь, нефть, выщелачивание металлов и многие другие глобальные процессы. Эти процессы нельзя называть биотехнологическими, потому что они нецеленаправленные. Или, например, можно заметить, как после загрязнения почвы нефтью происходит естественное (не организованное человеком, т. е. не целенаправленное) биовосстановление — через 5—10 лет под воздействием микроорганизмов почва самоочищается. А вот когда мы специально организовываем технологию очищения почвы, вводя в нее дополнительные микроорганизмы или усиливая питание естественных почвенных микроорганизмов, — это уже биотехнология, биотехнология очистки почвы от загрязнений.

Какие виды биохимической деятельности микрообъектов используют в биотехнологии, иначе говоря, какие цели преследуются при применении микроорганизмов?

Перечислим их, не вдаваясь в подробности.

1. **Наращивание клеточной массы**, которая и представляет собой продукт. К такому классу технологий относится получение пекарских дрожжей, кормовых дрожжей, многих вакцин.

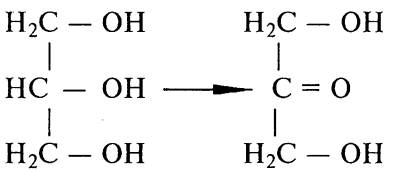
2. **Образование (биосинтез) в процессе роста и развития клеток ценных биохимических продуктов** — некоторые из них выделяются в среду (внеклеточные продукты), некоторые накапливаются в биомассе (внутриклеточные продукты). В этих случаях производство существует ради получения таких продуктов, а не самой биомассы, которая часто является балластом.

3. **Биотрансформация** — процесс, в результате которого под воздействием биохимической деятельности микроорганизмов или ферментов происходит изменение химического состава исходного химического вещества. Отличие от рассмотренного процесса биосинтеза состоит в том, что при этом обычно происходят относительно небольшие изменения в химической структуре вещества, оно не синтезируется заново из относительно более простых веществ. Кроме того, в процессе биотрансформации используют обычно уже готовый биологический агент — клетки микроорганизмов или ферменты, в ходе самого процесса биотрансформации они не образуются.

Пример процесса биотрансформации — превращение глюкозы во фруктозу под воздействием фермента глюкозоизомеразы. Оба сахара имеют одну формулу $C_6H_{12}O_6$, но различную пространственную структуру молекулы.

Интересно, что подобный процесс в природе осуществляют пчелы (если кормить их глюкозой). Но поскольку здесь в операции принимает участие макроорганизм — пчела, мы не можем данный процесс назвать биотехнологическим.

Или другой пример. Глицерин, представляющий собой трехатомный спирт, под воздействием клеток глюконобактерий превращается в диоксиацетон:



Как следует из схемы реакции, небольшое изменение в структуре молекулы (уходят два атома водорода, т.е. происходит дегидрирование) приводит к образованию нового вещества, по своим свойствам заметно отличающегося от исходного — глицерина.

4. **Потребление микроорганизмами из жидких сред различных веществ**, которые являются нежелательными примесями (загрязнениями). Здесь биомасса микроорганизмов служит промежуточным агентом, по окончании процесса она становится ненужной. Такие процессы применяют при биологической очистке сточных вод. Продуктом здесь является очищенная вода, а биомасса активного ила, которая потребляет загрязнения, все время отводится от системы и затем обезвреживается или перерабатывается для получения из нее других полезных продуктов.

5. **Выщелачивание с помощью микроорганизмов,** т.е. перевод в растворенное состояние некоторых веществ, находящихся в твердых телах. Примером является микробиологическое выщелачивание ценных металлов из руд — меди, цинка, урана и др.

6. Особым случаем является **использование биохимической деятельности микроорганизмов с целью образования газов** и за счет этого создания, например, пористых материалов. Так, для этого используют дрожжи при приготовлении хлеба. Одно из назначений дрожжей при получении пива или шампанского — также создать в среде высокую концентрацию растворенного диоксида углерода, чтобы вино или пиво хорошо пенилось.

Рассмотренные шесть основных направлений биохимической деятельности микроорганизмов являются основой для получения широкого класса продуктов биотехнологии.

1.3. ПРЕИМУЩЕСТВА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

По сравнению с химической технологией биотехнология имеет следующие основные преимущества:

возможность получения специфичных и уникальных природных веществ, часть из которых (например, белки, ДНК) еще не удается получать путем химического синтеза;

проведение биотехнологических процессов при относительно невысоких температурах и давлениях;

микроорганизмы имеют значительно более высокие скорости роста и накопления клеточной массы, чем другие организмы. Например, с помощью микроорганизмов в ферментере объемом 300 $м^3$ за сутки можно выработать 1 т белка (365 т/год). Чтобы такое же количество белка в год выработать с помощью крупного рогатого скота, нужно иметь стадо 30 000 голов. Если же использовать для получения такой скорости производства белка бобовые растения, например горох, то потребуется иметь поле гороха площадью 5400 га;

в качестве сырья в процессах биотехнологии можно использовать дешевые отходы сельского хозяйства и промышленности;

биотехнологические процессы по сравнению с химическими обычно более экологичны, имеют меньше вредных отходов, близки к протекающим в природе естественным процессам;

как правило, технология и аппаратура в биотехнологических производствах более просты и дешевы.

Вопросы для повторения

1. Дайте определение понятия «технология».
2. Какие существуют классы технологий?
3. Дайте определение понятия «биотехнология».
4. Является ли получение лекарств из корней женьшеня биотехнологией?
5. Является ли биотехнологией производство молока, меда, колбасы?
6. Какие виды биохимической деятельности используют в биотехнологии?
7. Каковы преимущества биотехнологических процессов в сравнении с химико-технологическими?
8. Проведите сравнение эффективности производства белка с помощью животных (крупного рогатого скота), растений (горох) и микроорганизмов (кормовых дрожжей).

Глава 2

ЗНАЧЕНИЕ БИОТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ РАЗЛИЧНЫХ ОТРАСЛЕЙ НАРОДНОГО ХОЗЯЙСТВА

●

Продукты биотехнологии или биотехнологические процессы используют в следующих отраслях:

медицина;
пищевая промышленность;
сельское хозяйство;
экология;
энергетика;
химическая промышленность;
нефтедобыча;
получение металлов;
биоэлектроника;
прочие приложения.

Далее дан краткий обзор применения биотехнологии в различных отраслях народного хозяйства более детально. Упомянуты конкретные продукты, их назначение, но без подробного разбора технологии производства.

2.1. БИОТЕХНОЛОГИЯ В МЕДИЦИНЕ

Вакцины — специально выращенные болезнетворные микроорганизмы, вирусы и их компоненты, которые после специальной обработки вводят в виде ослабленной или убитой культуры в организм человека и обеспечивают за счет этого создание у него иммунитета к данному заболеванию. С этого началась эпоха Луи Пастера, и по сей день вакцины — наиболее эффективное средство борьбы с инфекционными заболеваниями.

В настоящее время выпускают *живые вакцины*, содержащие ослабленные живые клетки возбудителей инфекционных болезней, к тому же генетически измененные. Другая группа вакцин — *убитые, или инактивированные, клетки* (гретые, формалиновые, ацетоновые или спиртовые). Третья группа — *«химические» вакцины*, представляющие собой антигены, тем или иным способом извлеченные из микробных клеток. Четвертая группа — это специальным образом обезвреженные *токсины*, выделяемые некоторыми возбудителями заболеваний в культураль-

ную жидкость (например, дифтерийный, столбнячный, ботулиновый и другие токсины).

Антибиотики — это не просто вещества, которые действуют против болезнетворных микроорганизмов (например, йод не антибиотик), но это еще и вещества, получаемые с помощью микроорганизмов-продуцентов. В 1929 г. английский ученый Александр Флеминг обратил внимание на то, что вблизи плесени не растут многие болезнетворные микроорганизмы. Позднее было выделено вещество, синтезируемое плесенью, и названо оно *пенициллином*. Во время Второй мировой войны было начато его производство и применение для лечения раненых. Эффект превзошел все ожидания; по некоторым данным, только в 1940-е и 1950-е годы с помощью пенициллина было спасено от смерти более 15 миллионов человек.

Действительно, часто раненый погибает не от самой раны, а от гнойного воспаления. Например, известно, что рана, полученная Пушкиным на дуэли, сама по себе была не опасна. Но развилось воспаление — перитонит, что и привело к смертельному исходу. При нынешнем состоянии медицины с помощью антибиотиков Пушкина можно было бы вылечить.

Сразу же после открытия пенициллина начались поиски и других антибиотиков. Обычно антибиотик не действует на все подряд микроорганизмы, да это и нежелательно: ведь наряду с болезнетворными будут уничтожаться полезные микробы, которые всегда есть в человеческом организме. Поэтому должен быть набор различных антибиотиков, пригодных для разных болезней. Но есть и другая сторона: болезнетворные микроорганизмы постепенно «привыкают» к действию антибиотиков; возникают микробы, которые вызывают заболевание, но нечувствительны к «старому» антибиотику. Конечно, такое привыкание происходит не быстро — в течение 10—15 лет. Но раз это все-таки происходит, ученым необходимо искать все новые и новые антибиотики и продуцирующие их микроорганизмы.

Многие ученые в разных странах мира работают над этим. Сейчас существует уже более 3000 различных антибиотиков, все время ищут более продуктивные микроорганизмы для их биосинтеза и при этом достигают поразительных успехов.

Например, плесень Флеминга в военные годы давала активность по пенициллину не более 10 ед/мл. А современные штаммы микроорганизмов дают 50000 ед/мл того же пенициллина.

Интересно, что в США в послевоенные годы поисками микроорганизмов занимались не только ученые. Институты давали объявления в газеты с просьбой за вознаграждение приносить им разные образцы плесеней. Рассказывают, что в одном из городов этим занималась некая пожилая женщина по имени Мэри. Она по всему городу искала плесень в гнилых фруктах, овощах, испорченном хлебе. Ей даже дали прозвище «Заплесне-

велая Мэри». Так вот, именно она нашла родоначальника современных высокоактивных штаммов биосинтеза пенициллина в заплесневевшей гнилой дыне. Этот микроорганизм был назван *Penicillium chrysogenum*.

Витамины. Известно, что витамины сначала были открыты во фруктах и овощах, откуда их и получали. Потом были найдены микроорганизмы, синтезирующие витамины гораздо быстрее, чем растения. Однако поскольку молекулы витаминов относительно просты, химики научились их синтезировать. Сейчас за биотехнологией осталось производство витаминов B_2 и B_{12} и один из процессов в преимущественно химическом производстве витамина С.

Инсулин. Около 2% населения земного шара страдает диабетом, и число больных все время возрастает. Диабетики практически не могут жить без ежедневных инъекций раствора специфического белка, который получают из поджелудочных желез свиней.

Мало того, что этих желез не хватает. У части больных к тому же возникает аллергия к чужеродному свиному белку. С помощью новой биотехнологии удалось «сконструировать» микроорганизмы, способные с большой скоростью синтезировать инсулин, да не свиной, а человеческий. Лекарство уже продается в США под торговой маркой «Хьюмулин».

Гормон роста. С давних времен среди людей нормального телосложения рождаются и лиллипуты (примерно 10 человек на 1 млн населения). Доказано, что в период, когда тело растет, у лилипутов отсутствует специальный гормон — «соматотропный», или гормон роста.

Такое нарушение физиологии имеется в генотипе у этих людей. Но если в это время в организм вводить гормон роста извне, то человек, казалось бы обреченный стать лилипутом, будет расти и станет нормальным человеком.

Соматотропный гормон можно добывать дорогим и неприятным способом — из гипофиза мозга умерших людей.

Новая биотехнология помогла «сконструировать» микроорганизм, способный синтезировать соматотропный гормон, и организовать его производство, которое может удовлетворить все потребности человечества.

Иммуномодуляторы. Физическое здоровье человека во многом определяется состоянием его иммунной системы (а не только, например, отсутствием болезнетворных микробов или наличием витаминов). Найдены средства (интерфероны и интерлейкины), которые стимулируют иммунную систему безотносительно к типу заболевания. Их получают из крови человека, на которую во все годы был большой дефицит, а теперь, в связи с угрозой СПИДа, в особенности. К счастью, биотехнологи создали микроорганизмы, синтезирующие интерфероны с высокой скоростью, так что эта проблема во всяком случае может быть решена, если вложить средства.

Иммунодепрессанты. Бывают случаи, когда требуется не стимулировать иммунную систему, а, наоборот, подавлять ее. Классический пример — пересадка органов: сердца, почек и других. Первые операции такого рода, несмотря на мастерство хирургов, заканчивались неудачно, так как чужеродный орган отторгался организмом. Сейчас после операций используют специальные вещества — иммунодепрессанты, многие из которых получают биотехнологическим путем. Пример — *циклоспорин А.* В результате больным удается «освоить» чужой орган и жить с ним полноценной жизнью.

Кровезаменители. Во многих случаях при операциях человеку неоходимо переливание крови. Как уже упоминалось, кровь — большой дефицит. В связи с этим созданы различные кровезаменители, например *полиглюкин*, которые синтезируют с помощью специальных микроорганизмов.

Стероидные гормоны. В детстве многие страдают диатезом, иногда возникает и более тяжелое заболевание — экзема. Для лечения этих болезней используют мази, основанные на стероидных гормонах, при получении которых применяют процесс биотрансформации.

Медицинские ферменты. С помощью биотехнологии получают ферменты, применяемые в медицине. Один из них — *стрептокиназа* — помогает растворять тромбы в кровеносных сосудах и тем самым спасает людей от преждевременной смерти. Другой фермент — *бета-галактозидаза* — помогает усваивать молочный сахар (лактозу) тем людям, у которых по генетическим причинам такой фермент в организме не вырабатывается.

Фермент *протеазу* используют для очистки гнойных очагов, а также для лечения ожогов. L-*аспарагиназу* применяют для лечения рака: она лишает раковые клетки аминокислоты аспарагина; здоровым клеткам это не страшно — они сами синтезируют аспарагин.

Коферменты — это вещества, которые усиливают деятельность многих собственных ферментов в организме человека. Собственно говоря, многие витамины являются коферментами. Но есть и другие коферменты, также получаемые с помощью биотехнологии, которые используют для лечения сердечных и других заболеваний, например *инозин*, *рибоксин*, *убихинон* и др.

Медицинские аминокислоты. Известно, что белки состоят из аминокислот. Иногда заболевшего человека приходится «кормить» при помощи уколов. В этом случае вместо белкового питания дают смесь аминокислот, которую получают биотехнологическим путем — ферментативным расщеплением белка, или смесь аминокислот, каждую из которых получают специальным биосинтезом, когда аминокислота синтезируется особым штаммом микроорганизмов.

Используют аминокислотные смеси и для питания физкультурников, наращивающих мышечную массу. Это не допинг, так как

аминокислоты образуются и естественным путем при ферментативном расщеплении белка в желудке человека.

Подсластители. Биотехнология позволяет получать препараты на основе аминокислот, которые в 200 раз слаще сахара (*аспартам*) и при этом сахаром не являются. Они очень подходят больным диабетом и людям, склонным к полноте, — это как бы безопасная сладость.

Женьшень. С давних времен были известны целебные свойства корня редкого растения женьшень, настойка из которого повышает тонус человека, снижает утомляемость, помогает преодолевать болезни. Мы уже упоминали, как биотехнология позволяет организовать производство этого лекарства путем культивирования изолированных клеток.

Биоразлагаемые полимеры. В хирургии применяют нити, которые позволяют сшить разрушенную ткань внутри организма человека и животного во время операции. Но необходимо, чтобы после того как шов заживет, сама эта нить разложилась и исчезла. Для этих целей использовали «кетгут», представляющий собой кишку ягненка длиной около 30 м. Эта вымытая, скрученная и высушенная кишка и есть хирургическая нить. Она не совсем хороша, так как представляет собой чужеродный белок и вызывает иммунное отторжение — в виде воспаления.

Биотехнология позволила создать биоразлагаемые полимеры в виде материала, напоминающего по свойствам полипропилен и способного к формированию нитей, штифтов для соединения костей, пленок и других необходимых компонентов. Такой материал называется *полигидроксибутират* и получают его путем выращивания специальных бактерий, больше половины объема которых занимают как бы комочки пластмассы (это видно под электронным микроскопом). Этот прекрасный материал можно использовать и для создания лекарств более длительного действия (они выделяются из гранул с полигидроксибутиратом по мере их растворения), а также для аппликаций на раны или ожоги.

Моноклональные антитела. Мы уже упоминали о новой ветви диагностирования различных заболеваний — моноклональных антителах. Обычные, поликлональные антитела содержатся в сыворотке крови иммунизированных животных. Но там кроме целевых антител есть и другие, что часто мешает диагностированию. По новому методу можно получать специфические антитела к клеткам разных органов одного человека, например антитела к клеткам раковых опухолей, и появилась надежда на возможность лечения с помощью таких антител (они не действуют на здоровые клетки). Основанные на моноклональных антителах диагностикумы позволяют определять беременность, выявлять предрасположенность к диабету, ревматоидному артриту, устанавливать наследственные заболевания, сопровождающиеся утратой каких-то ферментов или белков.

Препараты против комаров. Наряду с различными химическими препаратами созданы биопрепараты, представляющие собой микроорганизмы, патогенные для личинок комаров и безвредные для человека и других животных. Этим препаратом обрабатывают места, где происходит размножение комаров (в частности, подвалы домов), что позволяет снизить их количество или полностью ликвидировать.

Нейропептиды. Ведут разработку биотехнологических методов получения естественных нейропептидов, которые ответственны в мозгу человека за сон, боль, память, удовольствие и т. д. Схема та же — с помощью генной инженерии «конструируют» микроорганизм, способный синтезировать соответствующий пептид.

Косметические токсины. В последнее время научились делать косметические средства, разглаживающие морщины и омолаживающие лицо, из *ботулинов* — сильнодействующих ядов паралитического действия, продуцируемых микроорганизмами. (Интересная трансформация яда в лекарство!)

Приведенные примеры, конечно, не исчерпывают всех перспектив биотехнологии в медицине, но они демонстрируют первостепенную важность биотехнологии для этого вида человеческой деятельности.

2.2. БИОТЕХНОЛОГИЯ В ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

Когда-то Марк Твен сказал: «Думаю, что любая пища, данная нам Богом, полезна, за исключением микробов». Великий писатель ошибался. Именно микробы (но, конечно, не болезнетворные) являются основой многих пищевых продуктов, и биотехнология играет важную роль в производстве таких продуктов.

Вино, пиво, квас известны с незапамятных времен, хотя роль микроорганизмов в их технологии стала ясна лишь в прошлом веке.

Хлеб. Уже в Библии упоминается «квасной» хлеб, основанный на дрожжевой закваске. Сейчас в мире производят пекарских дрожжей около 2 млн т/год!

Кисло-молочные продукты. Эти продукты биотехнологии также известны с древности, причем разные народы в качестве молочных заквасок использовали различные микроорганизмы. Отличались и технологии приготовления напитков.

Уксус также известен довольно давно, так как под действием уксусно-кислых бактерий вино превращалось в винный уксус. Сейчас уксус делают из спирта.

Лимонная кислота. Этот важный в кондитерской промышленности и в приготовлении соков продукт раньше действительно получали из лимонов — до тех пор, пока не был найден способ биосинтеза ее из сахара или даже отходов его производства — мелассы, а так-

белка, чем от него в конце концов получим в виде мяса. Поэтому давняя мечта биотехнологов — получить пищевой белок прямо из микроорганизмов, минуя пищевую цепь животных.

Этому мешает довольно высокое содержание нуклеиновых кислот в богатых белком бактериальных клетках (должно быть не выше 2—3%). Известны попытки использования биомассы мицелиальных грибов рода *Fusarium*, на основе которой производят пищевой продукт *микопротеин*. Для вкуса и цвета в него вводят специальные пищевые добавки. В последнее время научились культивировать мицелий высших съедобных грибов (вешенки, опят, маслят и др.) глубинным способом, т.е. в ферментере. Так что в этом направлении у биотехнологии есть определенные перспективы.

Колбасы. Для получения хороших сортов колбас в фарш вводят специальные закваски определенных видов микроорганизмов, которые способствуют созреванию и приданию массе специфического приятного вкуса.

Ферменты. Мы уже упоминали об используемых в пищевой промышленности ферментах для получения глюкозо-фруктозных сиропов. Есть и другие применения ферментов.

Путем обработки молока ферментом *бета-галактиозидазой* получают «безлактозное» молоко, предназначенное для людей, которые не переносят содержащийся в молоке молочный сахар — лактозу.

На молочных заводах в качестве отхода часто выступает молочная сыворотка, содержащая до 5% лактозы, которая сама по себе не имеет широкой сферы применения. Обработка ее ферментом позволяет получить раствор глюкозы, на котором можно выращивать дрожжи, изготавливать спирт и многое другое.

Фермент *пектиназа* используется в производстве сидра из яблок, соков — при этом происходит осветление этих напитков за счет ферментативного растворения мути, состоящей в основном из пектинов. При растворении получаются сахароподобные вещества.

Фермент *целлюлаза* применяется при приготовлении растворимого кофе, а также для улучшения консистенции грибов и овощей.

Глюкозооксидаза используется для удаления кислорода из сухого молока, кофе, пива, майонезов, соков. *Протеаза* — для размягчения мяса.

Пищевые красители. Микроорганизмы или изолированные клетки высших грибов используют также для продуцирования пищевых красителей ярко-желтого, красного, синего цвета. Ведутся исследования по расширению палитры цветов таких красителей биотехнологического происхождения. Поскольку это не химия, такие красители действительно безопасны в использовании для пищевых целей.

Антибиотики. Часто медицинские антибиотики действуют и как ветеринарные препараты. Но государственные органы стараются не использовать медицинские антибиотики для животных. Во-первых, применение медицинских антибиотиков для лечения животных создает риск действия остаточных концентраций их в мясе на «привыкание» (точнее — резистентность) болезнетворных микроорганизмов к этим антибиотикам у человека и в дальнейшем — неэффективность их действия при заболеваниях человека. Поэтому только антибиотики-ветераны, в прошлом бывшие медицинскими (такие, как хлортетрациклин или биомицин), входят в ассортимент кормовых антибиотиков.

Кормовые витамины используют для некоторых видов животных. Здесь аналогия с медициной полная.

Ростовые гормоны в животноводстве играют гораздо большую роль, чем в медицине. Если в применении к человеку они направлены на немногочисленную популяцию лилипутов, то у животных они ускоряют нарастание мышечной массы при откорме. Это не стероидные гормоны, которые сейчас ограничены в применении, а природные белковые, биосинтез которых налажен с помощью генно-инженерных микроорганизмов-продуцентов.

Примерно 50 лет тому назад вещества, ускоряющие рост животных, относились к области фантастики. Например, в книге «Патент АВ» рассказывается об ученом, который ввел подобный препарат новорожденному котенку. Этот котенок рос так быстро, что съел сначала своих братьев и сестер, потом маму, потом охотился за собаками и, превратившись по размерам почти в тигра, стал опасным и для всего населения города.

Современные ростовые гормоны ускоряют рост до размеров нормальной взрослой особи, не более.

Кормовой белок. При откорме животных, особенно свиней и кур, наряду с обычным углеводным питанием (которое поставляется в основном зерном), важно иметь белковое питание (обычно это рыбная мука, мясо-костная мука, бобы или шрот сои, гороха, рапса). Всего этого в стране не хватает. Поэтому наша страна выступила пионером в использовании в качестве кормовых белков микробной биомассы, содержащей от 40 до 80 % белка и выращиваемой обычно на разных отходах.

Белок, применяемый для кормовых целей, не имеет ограничений по содержанию нуклеиновых кислот (как пищевой). Эти кислоты благополучно усваиваются животными и не вызывают проблем.

Наиболее известен кормовой белок из дрожжей *Candida maltosa*, выращиваемый на отходах переработки нефти — жидких парафинах. В СССР до 1990 г. ежегодно производилось 1,4 млн т в год такого продукта под названием БВК (белково-витаминный концентрат).

Разработана и реализована вблизи Волгограда в промышлен-

же из содержащих сахар гидролизатов древесины или зерна. Мировое производство лимонной кислоты — около 200 тыс. т/год.

Другие подкислители. Молочную кислоту получают путем брожения из глюкозы и используют как подкислитель в пищевой промышленности. Годовой объем — около 50 тыс.т/год. Кроме упомянутых кислот для этих же целей применяют получаемые биотехнологическим путем яблочную кислоту, а также итаконовую, глюконовую и фумаровую кислоты.

Сыр и восточные блюда из сои также получают с использованием микробиологических заквасок.

Глутаминовая кислота (глутамат). Синтезируется микроорганизмами и в виде белого порошка добавляется в пищу для усиления аромата мясных, рыбных, грибных изделий. Непременный компонент сухих супов и консервированных продуктов. Пионером использования усилителей вкуса является Япония.

Витамины. Применяют не только в медицине, но и в пищевой промышленности. Кроме уже упомянутых витаминов B_2 и B_{12} в последнее время растет интерес к использованию в пище бета-каротина (провитамина А), также получаемого биотехнологическим путем.

Спирт. Развитие технологии позволило наряду с алкогольными напитками получать и чистый спирт путем брожения на различных сахарах или углеводах (в том числе и из переработанной древесины). Любопытно, что при изготовлении спирта получают пищевой диоксид углерода, используемый в производстве газированных безалкогольных напитков. Когда в 1985 г. в СССР в связи с антиалкогольной кампанией многие спиртовые заводы были закрыты, оказалось, что сократилось производство безалкогольных напитков из-за возникшего дефицита диоксида углерода.

Глюкозо-фруктозные сиропы. Углеводы из растений, содержащих сахара (сахарного тростника, сахарной свеклы, винограда), обычно обходятся дороже, чем из содержащих крахмал (пшеницы, ржи, кукурузы). Между тем крахмал — это полисахарид, который можно превращать в мальтозу или глюкозу, воздействуя на него (или просто на муку, крупку зерна) ферментами, которые называют амилазами. Глюкоза (виноградный сахар), однако, не очень сладкая, хотя питательность ее не ниже чем у сахарозы. Но если обработать раствор глюкозы другим ферментом — глюкозоизомеразой, то глюкоза превращается в изомер — фруктозу, которая, наоборот, слаще сахарозы. В итоге получается глюкозо-фруктозный сироп, в котором сахара стоят примерно на 30% дешевле, чем обычный свекловичный сахар. В кондитерской промышленности такой сироп используют весьма успешно.

Пищевой белок. Люди употребляют в пищу мясо ради получения белка, хотя содержание белка в мясе не так уж велико (в бактериях, например, в 2—3 раза больше) и обходится «мясной» белок довольно дорого: животное должно съесть примерно в 20—40 раз больше

Пищевые загустители. В качестве загустителей — желеобразных пищевых продуктов — биотехнология предлагает полисахариды микробного происхождения, например *декстран* (стабилизатор в производстве мороженого).

Пищевые консерванты. Консерванты — это вещества, добавляемые в пищевые продукты для увеличения срока их хранения. В народе распространено предубеждение против консервантов («это вредная химия!»). Не надо забывать, однако, что без применения консервантов в консервах часто развиваются опасные микробы, продуцирующие токсины, способные вызвать смертельное отравление.

Но есть весьма эффективные и безвредные консерванты биотехнологического происхождения, например *низин*, выделяемый специальными штаммами молочно-кислых бактерий. Микроскопическое добавление его в пастеризуемый продукт (молоко, зеленый горошек, вареный картофель, соки, супы) позволяет получить эффект, подобный эффекту жесткой тепловой стерилизации, с уничтожением спор и одновременно сохранением вкусовых качеств и целостности продукта в течение длительного времени.

Другой пример — консервант *дальвацин*, который действует на плесневые грибы, но не влияет на развитие бактерий.

«Отрицательная биотехнология». Вообще в пищевой промышленности посторонняя микрофлора обычно способствует порче продуктов. Поэтому многие усилия направлены на борьбу с посторонней микрофлорой. Консерванты — это лишь один из аспектов такой борьбы. Сегодня для описания мероприятий такого рода применяют термин «*отрицательная биотехнология*» (предохранение приготовленной пищи от проникновения и воздействия нежелательных микроорганизмов).

2.3. БИОТЕХНОЛОГИЯ В СЕЛЬСКОМ ХОЗЯЙСТВЕ

Сельское хозяйство — довольно широкая отрасль. Ее можно подразделить на две основных подотрасли — растениеводство и животноводство. Биотехнология имеет достижения, помогающие обеим этим отраслям. Начнем с животноводства. Животных, как и человека, надо лечить (ветеринария) и кормить. Есть поэтому много аналогий с биотехнологией для нужд человека.

Вакцины. Возбудители заболеваний у животных иные, чем у людей, особенно с учетом разнообразия видов и пород животных. Требования к вакцинам не такие жесткие, как в медицине, но это не исключает необходимости разрабатывать и выпускать большой ассортимент вакцин для животноводства и птицеводства. Под Москвой расположен биокомбинат, занимающийся таким производством.

В связи с этим существует довольно большое производство кормовой аминокислоты лизина, которая продуцируется в больших количествах специальными штаммами микроорганизмов. Производство лизина в США, Японии и других странах достигает 300 тыс. т.

Имеется, в меньшей степени, потребность в аминокислотах *триптофан* (для кормов на основе зерна кукурузы) и *треонин* (для кормов на основе пшеницы).

Силосные закваски. Для сохранения скошенной травы и увеличения ее питательной ценности в силосные ямы наряду с травой вводят специальные закваски — смесь микроорганизмов, создающую возможность в зимнее время кормить животных даже более ценным, чем исходный, растительным кормом.

Пробиотики. Это полезные микроорганизмы пищеварительного тракта животных, которые в некоторых случаях (для молодняка) добавляют в виде живого биопрепарата в корм. Имеются также попытки в качестве микроорганизмов-пробиотиков добавлять в корм курам, свиньям микрофлору, выделенную из желудка грызунов, лосей, бобров, умеющих перерабатывать древесину как питательный субстрат. Это позволяет повысить усвояемость грубых кормов животным с односегментным желудком.

Теперь назовем основные виды продуктов, получаемых в процессах биотехнологий для нужд растениеводства.

Антибиотики для растений. Выпускают специальные антибиотики, позволяющие «лечить» различные виды заболеваний растений (таких, как головня, спорынья и т. д.).

Ростовые вещества для растений. Подобно ростовым гормонам для животных, биотехнологические методы позволяют получать аналогичные по действию вещества и для растений (гиббереллины).

Энтомопатогенные препараты. Вакцин для растений не существует. Зато есть оригинальные способы борьбы с насекомыми — вредителями растений. Для этой цели биотехнологическим путем выращивают специальные микроорганизмы, которые заражают и убивают насекомых, но не вредят человеку, животным и самому растению. Это гораздо полезнее, чем химические инсектициды, которые загрязняют окружающую среду и часто остаются на сельскохозяйственных продуктах, воздействуя, таким образом, на человека.

Феромоны. Еще один способ борьбы с насекомыми — обработка участков поля феромонами (половыми аттрактантами насекомых). Такие феромоны получают микробиологическим путем с использованием также химических стадий. Привлеченных феромонами насекомых собирают на обработанных участках и уничтожают.

Бактериальные удобрения. Имеются некоторые виды микроорганизмов, способных потреблять азот из воздуха и переводить его в аммонийную и органическую форму. Особенно эффективно об-

ных условиях технология кормового белка на основе метаноокисляющих микроорганизмов, использующих в качестве сырья природный газ и имеющих высокое содержание белка в биомассе (до 75 %). Аналогичным образом создана технология кормового белка на основе водородных бактерий.

Существует несколько заводов по производству кормовых гидролизных дрожжей, где в качестве сырья применяют получаемый после высокотемпературной кислотной обработки гидролизат древесины. Имеются также технологии получения белка на основе технических метанола и этанола.

Все эти виды сырья оказались после повышения цен на нефть, газ и электроэнергию экономически невыгодными. Поэтому разработана и реализована технология получения кормового белка на основе отходов производства зерна (под названиями «Биокорн», «Белотин», «Биотрин»), которая пока еще может конкурировать с дешевой соей из-за рубежа. В других странах для изготовления кормовых дрожжей используют отходы сахарной свеклы и тростника, фруктов, отходы спиртового производства, сельскохозяйственные крахмалосодержащие отходы.

Кормовые аминокислоты. Из 20 аминокислот незаменимыми для человека являются 8: изолейцин, лейцин, лизин, метионин, треонин, триптофан, валин, фенилаланин. Для сельскохозяйственных животных к незаменимым относятся также гистидин и аргинин, а для молодняка птицы — пролин.

Эти незаменимые аминокислоты не синтезируются организмом, а вносятся с кормом. При этом соотношение разных аминокислот должно примерно соответствовать соотношению их в белке мяса, яиц, молока животных (в зависимости от направления животноводства), а для человека — в белке женского молока. Если какая-то аминокислота имеет концентрацию гораздо большую, чем нужно по соотношению, прирост массы животного не изменится при кормлении такой смесью. Избыток оказывается «лишним». И наоборот, если концентрация какой-то одной аминокислоты будет меньше нужной по соотношению, то рост животного будет определяться именно этой аминокислотой. В биологии это называют «принципом Либиха» по имени немецкого ученого, сформулировавшего этот принцип.

Вернемся к кормам. В белке зерна пшеницы (глютене) много различных аминокислот, но одна из них имеет концентрацию, на 30—40% меньше нужной по соотношению Либиха. Эта аминокислота — *лизин*. Если ее добавить к корму, состоящему из зерна пшеницы, в относительно небольшом количестве, то белок станет почти в полтора раза более полноценным, и на таком *сбалансированном* корме соответственно будет в полтора раза больший рост животного без изменения количества самой пшеницы. Чтобы получить тот же эффект без добавок лизина, нужно впустую израсходовать в полтора раза больше зерна.

было, разработаны биопрепараты из специфических микроорганизмов или ферментов, позволяющих ускорить деградацию пестицидов.

Борьба с накоплением метана в шахтах. Мы часто слышим о взрывах в шахтах, вызванных нарушением условий эксплуатации. От метана в шахтах трудно освободиться: нужна очень сильная вентиляция, чтобы снизить концентрацию ниже взрывоопасного предела. Биотехнологи предложили вносить в шахты — в отработанные штреки — суспензию микроорганизмов, способных потреблять метан. Это позволяет снижать концентрацию метана. Рассматривались также проекты использования метана, отсасываемого вентиляцией из шахт, для непрерывного выращивания этих микроорганизмов, а их избыток использовать для получения кормового белка.

Обессеривание нефти и каменного угля. Имеются микроорганизмы, способные переводить серу из сульфидов и меркаптанов в элементную серу. На основе использования таких микроорганизмов разрабатывают технологии обессеривания угля и нефти. В результате и топливо электростанций, и моторное топливо автомобилей становится более экологичным — дает меньше выбросов диоксида серы в атмосферу.

Обогащение воздуха кислородом. Хотя диоксид углерода — продукт дыхания многих живых существ — считается безвредным, все же в повышенных концентрациях он оказывает неблагоприятное воздействие на животный мир и человека. Работа многих промышленных предприятий, тепловых электростанций приводит к постепенному повышению его концентрации в атмосфере. Следствием этого может стать глобальное потепление на Земле, связанное с так называемым «парниковым эффектом». Это влечет за собой многие весьма неприятные последствия для обитателей Земли.

Сейчас роль очистителя атмосферы от диоксида углерода играют травянистые растения и деревья, но уменьшение зеленого покрова в связи с урбанизацией подрывает сами основы существования человечества.

В компактной форме эти проблемы возникают при организации систем жизнеобеспечения на космических кораблях, подводных лодках и вообще в замкнутых пространствах обитания людей. Для поглощения выдыхаемого диоксида углерода и восполнения убыли кислорода на таких объектах уже давно предлагалось культивирование микроводорослей (или цианобактерий) *хлорелла*, которые под действием солнечного света позволяют решать эту задачу. Может быть, этот прием в дальнейшем будут использовать и в более крупных масштабах, например для улавливания углекислоты в выбросах тепловых электростанций.

Биоразлагаемые полимеры. Мы уже говорили об использовании биоразлагаемых полимеров применительно к медицине. Однако эта проблема гораздо более остро стоит в экологии. Без

дов. Твердые отходы смешиваются с микроорганизмами, разлагающими вредные загрязнения, и балластным материалом типа торфа, который обеспечивает доступ кислорода к микроорганизмам. Это позволяет превратить отходы в удобрение или просто использовать их в качестве подсыпки для дорог, в строительстве и в других случаях.

Метановое сбраживание твердых отходов. Еще в 1776 г. Вольта обнаружил, что в болотном газе содержится метан. Но только значительно позже была определена роль анаэробных микроорганизмов в этом процессе. С 1901 г. успешно применяют анаэробное сбраживание осадка избыточного активного ила, образующегося при работе установок биологической очистки сточных вод. В результате сбраживания получают газ, содержащий 65 % метана и 30 % диоксида углерода, который вполне может быть использован для отопления. Процесс протекает в специальных аппаратах — метан-тенках, где накапливающийся газ находится под некоторым давлением.

Сброженный осадок, если только он не содержит повышенных концентраций тяжелых металлов, успешно используют как удобрение. Он лучше исходного осадка по составу, и в нем почти полностью отсутствуют болезнетворные микроорганизмы.

Метановое брожение применяют также и для переработки концентрированных жидких отходов, хотя скорость его протекания меньше, чем в случае аэробной биологической очистки активным илом. С середины XX века процесс анаэробного сбраживания с получением *биогаза* стал очень популярен применительно к отходам животноводческих ферм, особенно в теплых странах, таких, как Китай и Индия.

Биологическая очистка газовых выбросов. Многие выбросы в атмосферу содержат вредные или дурно пахнущие примеси. Для их очистки применяют биофильтры, заполненные насадкой, на которой закреплены специальные микроорганизмы. Вредные примеси сорбируются на насадке и затем потребляются и обезвреживаются микроорганизмами.

Биодеградация нефтяных загрязнений на почве и воде. При аварийных разливах нефти используют биотехнологические способы восстановления загрязненных территорий, которые обрабатывают специально выращенными нефтеокисляющими микроорганизмами, внося различные добавки для их азотистого и фосфорного питания, что позволяет утилизировать углеводороды нефти, превращая их в биомассу микроорганизмов и диоксид углерода.

Биодеградация химических пестицидов и инсектицидов. Для борьбы с сорняками и вредителями растений часто используют химические пестициды и инсектициды. Они действуют жестко и в короткое время ликвидируют сорняки и вредителей на обработанном участке. Однако в дальнейшем возникают проблемы: пестициды создают химическую опасность, сохраняясь на растениях или попадая в поверхностные природные воды. Чтобы этого не

рабатывать этими микроорганизмами семена, которые при прорастании в симбиозе обеспечивают накопление азотного питания.

Безвирусная рассада. Сельские жители знают, как трудно получить урожай картофеля, не зараженного вирусом. Биотехнология предлагает для этой цели метод культивирования изолированных клеток клубней картофеля. Клетки при этом размножаются в суспензии, как дрожжи. Затем выращенные клетки «пересаживают» в искусственный грунт и из каждой клетки вырастает «клубенек» размером не более горошины. Эти горошины высевают в поле как рассаду, из которой нормальным путем вырастает растение картофеля с множеством клубней. Мешком такой рассады можно засеять целое поле. Действительно, получается растение «из пробирки».

Корм для рыб. Кроме обычных белковых кормов микробиологического типа, хорошо показавших себя при разведении рыб, можно упомянуть специальный корм из оранжево-красных микроорганизмов рода *Phaffia*, который позволяет получать оранжевый или розовый цвет мяса лосося и форели при их искусственном разведении (без таких добавок мясо лосося получается водянистое, бело-серое). Это связано с тем, что *Phaffia* синтезирует каротиноид *астаксантин*.

2.4. ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

Биологическая очистка стоков. Существуют микроорганизмы, для которых загрязнения, содержащиеся в сточных водах, являются питательными веществами. В начале XX века произошла революция в городском хозяйстве, когда был предложен метод аэробной биологической очистки сточных вод с помощью активного ила — сложной смеси микроорганизмов. Хотя при этом требуется перемешивать жидкость и непрерывно аэрировать ее воздухом, такой способ позволяет перерабатывать большие объемы стоков с самыми разнообразными загрязнениями — от хозяйственно-бытовых до промышленных.

Биосорбция тяжелых металлов из стоков. Обычная очистка стоков удаляет из них в основном органические загрязнения. Если же в стоках содержатся тяжелые металлы, такие, как медь, никель, хром, свинец и другие, то требуются дополнительные методы очистки, например биотехнологические. Имеются определенные виды микроорганизмов, которые способны осаждать на себе (сорбировать) металлы, растворенные в жидкости. Концентрация металлов при этом возрастает настолько, что после тепловой обработки биосорбент можно рассматривать как сырье для получения цветных металлов.

Биокомпостирование твердых отходов. Аналогом аэробной очистки стоков является аэробное биокомпостирование твердых отхо-

большого преувеличения можно сказать, что XX век — это век пластмасс. Вещи из полиэтилена, полипропилена и других пластмасс в буквальном смысле слова окружают нас повсюду. Особенно много пластиковой упаковки, которую после использования чаще всего просто выбрасывают. И здесь ее, в принципе ценное, свойство — устойчивость к разложению влагой, светом, холодом и теплом, почвенными микроорганизмами — играет отрицательную роль. Земной шар буквально переполнен использованной пластмассовой упаковкой!

Поэтому в некоторых странах, заботящихся об экологии (США, Германии, Англии), уже действуют ограничения на использование пластмассовой упаковки. Взамен предлагается упаковка на основе полигидроксибутирата или полилактата или специальным образом обработанного крахмала в смеси с целлюлозой. Биотехнология может помочь в создании таких материалов, хотя они и будут дороже. Выброшенные пакеты или флаконы из таких материалов при взаимодействии с почвенными микроорганизмами будут превращаться в воду, диоксид углерода и биомассу этих самых микроорганизмов, предохраняя планету от отходов.

Стиральные порошки с ферментами. Сейчас уже не новость это достижение биотехнологии, хотя появилось оно чуть больше 30 лет назад. Ферменты для таких порошков (*протеазы*) производятся биотехнологическими методами.

Вермикультивирование и копрокультивирование. Многие отходы сельскохозяйственного производства и пищевой промышленности могут перерабатываться не только с помощью микроорганизмов (биокомпостирование или метановое брожение), но и с помощью низших организмов — червей. Среди них есть очень эффективные виды — калифорнийские красные черви, которые «перемалывают» землю с разными органическими отходами в прекрасное удобрение. Нормальное состояние кладбищ также невозможно без червей. Это направление переработки отходов называют *вермикультивированием*. Кстати, если при этом поблизости иметь подсобное хозяйство для разведения птиц, то избыток червей вполне может служить пищей курам, гусям и прочей птице.

Вермикультивирование чем-то напоминает разведение личинок мух (нельзя давать им превращаться в летающих мух). Известно, что мухи откладывают огромное количество яиц, которые весьма быстро растут, превращаясь в личинки мух и при этом перерабатывая всевозможные гнилые отходы. Показано, что личинки являются превосходным кормом для птиц, а при определенной обработке — также для свиней и пушных зверей (норок, например). Это направление называют *копрокультивированием*.

Хотя эти два направления, строго говоря, не подпадают под наше определение биотехнологии, все же о них стоит вспомнить, потому что они могут применяться в сочетании с биокомпостированием.

пищи. Большинство установок (а их более 20 миллионов!) имеют относительно небольшие размеры — в пределах от 1 до 10 $м^3$.

Сельскохозяйственные отходы — не единственный источник сырья для производства биогаза. В последнее время ставятся вопросы специального выращивания сырья для получения биогаза. Таким сырьем могут быть зеленая масса быстрорастущих растений и деревьев, водоросли и даже микроводоросли, которые, как мы знаем, растут быстрее.

Существовал даже специальный проект «Биосоляр» для выращивания на поверхности моря в плавучих установках хлореллы, которая затем сразу же перерабатывается в биогаз, служащий энергетическим сырьем для снабжения прибрежных городов.

Получение водорода биофотолизом воды. Водород с точки зрения экологии — идеальное топливо, имеющее высокую теплотворную способность (12,8 кДж/$м^3$) и сгорающее без образования каких-либо вредных примесей. Однако получение водорода электролизом или химическим путем неэкономично.

Существуют фототрофные бактерии, способные выделять водород под действием света. Пока что они работают довольно медленно. Но в них заложены биохимические механизмы, содержатся ферменты, которые позволяют катализировать образование водорода из воды. Некоторые ферменты наряду с водородом образуют и кислород, т. е. происходит биофотолиз воды. Примером является система, включающая хлоропласты или хлорофилл и фермент гидрогеназу.

Хотя это направление пока еще не дало практических результатов, оно является весьма перспективным в развитии биоэнергетики.

Биосинтез углеводородов микроорганизмами. Один из углеводородов — метан мы уже рассматривали при получении биогаза. Более интересно получение жидких и твердых углеводородов с помощью микроводорослей. Например, микроводоросль *Botriococcus braunii* (имеющая разновидности зеленого и красного цвета) под действием света накапливает до 75% углеводородов от сухой массы клеток. В США даже есть ферма, где на площади водоемов 52 тыс. га выращивают микроводоросли, дающие около 4800 $м^3$ жидких углеводородов в сутки. Есть и другие виды микроорганизмов такого же типа. Например, в Израиле показана возможность культивирования микроводорослей *Dunaliela bardause* в пресных и соленых водах (вплоть до воды Мертвого моря) с получением глицерина в количестве до 85% от сухой массы клеток. Клеточные остатки после выделения глицерина могут быть использованы как корм, содержащий к тому же биологически активный провитамин бета-каротин.

Моторное топливо. Кроме получения энергии как таковой, используемой в основном для отопления, важной задачей является получение моторного топлива для автомобилей и других двигате-

2.5. БИОТЕХНОЛОГИЯ И ЭНЕРГЕТИКА

Сейчас в России меняется отношение к энергии как к чему-то всегда существующему и не вызывающему особых проблем — включить свет или нагревательный прибор в сеть, заполнить бак бензином и тому подобные простые вещи. Как-то вдруг оказалось, что энергия имеет свою ценность, вполне соизмеримую с ценностью пищи и жилища. А ведь мы все еще не платим за энергию ее настоящую стоимость, пользуясь запасами невозобновляемого энергетического сырья — нефти, газа, каменного угля. Но уже сейчас видно, что эти запасы тают и нужно думать, чем бы их восполнить. Чернобыльская авария подкрепила давние опасения экологов и сделала практически нереальными расчеты на всемерное развитие атомной энергетики. Что же взамен?

Потребности энергии в мире в год составляют цифру порядка $3 \cdot 10^{20}$ Дж. Все запасы нефти, природного газа, угля и урана оценивают как $2{,}5 \cdot 10^{22}$ Дж. Между тем с солнечной энергией каждый год на поверхность Земли поступает $3 \cdot 10^{24}$ Дж энергии. Таким образом, достаточно было бы, чтобы 0,1% поверхности Земли собирали солнечную энергию и утилизировали ее с коэффициентом полезного действия около 10%. Тогда можно было бы удовлетворить все потребности в энергии.

Однако солнечная энергия поступает неравномерно по времени и по поверхности Земли. Именно растения путем фотосинтеза запасают энергию в форме различных органических веществ, ее можно хранить и перемещать во времени и пространстве. Недостатком является малая эффективность запасания энергии растениями (1—2%), высокое содержание в них влаги и сезонный характер аккумуляции энергии.

Наряду с прямым сжиганием древесины, соломы, навоза и других отходов животноводства, биотехнология позволяет получать более удобные для использования виды энергии различными способами. Рассмотрим эти способы.

Получение биогаза из органических отходов. В разд. 2.4 мы уже рассматривали процесс метанового брожения с получением содержащего метан биогаза. Надо отметить, что при метановом брожении перерабатывается в биогаз не вся содержащаяся в навозе органика. Например, при сбраживании коровьего навоза в биогаз превращается лишь около четверти всей органики. Но если этот навоз просто сжечь, то получается энергии на 20% меньше, чем от полученного биогаза. К тому же сжигание навоза часто неприемлемо по экологическим соображениям.

Большие успехи в получении энергии путем метанового брожения отходов достигнуты в Китае. Там очень многие сельскохозяйственные фермы имеют установки для переработки отходов и навоза, и получаемый газ используют для отопления и приготовления

лей внутреннего сгорания. Здесь, конечно, идеальным был бы водород как абсолютно экологически чистое топливо. Однако на современном уровне развития техники он и дорог, и небезопасен в обращении. Поэтому продолжаются поиски альтернативы жидким углеводородам. Такой альтернативой может стать, например, этанол — продукт, более известный как пищевой или околопищевой. Однако если не ставить целью получать «кристально чистый» спирт, то оказывается, что технический спирт вполне может служить такой заменой — либо безводный спирт (почти 100%-й), либо в смеси с бензином, где спирт составляет около 10% (такая смесь называется *газохол*).

При этом, конечно, важно обеспечить экономичное производство спирта. В Бразилии для этой цели используют сахарный тростник, в США упор делался на крахмалосодержащие продукты, в основном кукурузу и маниок. В России разрабатывается технология биоконверсии древесины в этанол, предпочтительно без предварительного гидролиза древесины.

В настоящее время углеводородное моторное топливо при любых вариантах замены получается дешевле, но вполне возможно, что цены на нефть будут расти, а возобновляемое сырье для производства спирта станет относительно дешевле.

2.6. ДРУГИЕ ПРИЛОЖЕНИЯ БИОТЕХНОЛОГИИ

Кроме перечисленных областей, где биотехнология используется особенно широко, есть и другие отрасли промышленности, где возможно ее применение. Далее описаны некоторые примеры таких приложений.

Получение растворителей. С помощью анаэробного ацетонобутилового брожения можно перерабатывать крахмалосодержащее сырье. В результате брожения получается смесь растворителей, содержащая 60% бутанола, 30% ацетона и 5—10% этанола, а также газы — водород и диоксид углерода. *Бутанол* используют как сырье для производства пластмасс, а *ацетон* — как растворитель. В качестве сырья для ацетонобутилового брожения можно применять и сахаросодержащие отходы типа мелассы и молочной сыворотки.

Органические кислоты технического назначения. Техническую ***уксусную кислоту*** используют для получения каучука, пластмасс, синтетических волокон и инсектицидов. Кроме уже упоминавшегося способа получения пищевого уксуса из этанола разрабатывают биотехнологии, где в качестве исходного сырья применяют водород и диоксид углерода или целлюлозу.

Молочная кислота, которую можно получать из молочной сыворотки или из 1,2-пропандиола, используется при *обработке кож*, а также, в особенности, как сырье для биоразлагаемого полимера *полилактата*.

Лимонная кислота, кроме пищевого и косметического применения, используется в производстве пластмасс, для очистки металлов, а также в составе стиральных порошков. Техническую лимонную кислоту получают из сахаросодержащих отходов, а также из парафинов нефти.

Итаконовая кислота используется в производстве *пластмасс и красителей*. Ее получают путем ферментации на средах, содержащих сахара или парафины нефти.

Древесно-волокнистые плиты можно получать с использованием в качестве клеящего агента не вредных фенолоформальдегидных смол, а продуктов биохимической переработки древесины ферментами биомассы дереворазрушающих грибов. Такие материалы (*биопластики*) являются экологически чистыми.

Катализаторы. Получаемые из микроорганизмов ферменты являются катализаторами во многих химических реакциях.

Красители для тканей. Биологическим путем получают довольно интересные красители. Например, при культивировании клеток растений получают ярко-красный краситель *шиконин*, путем биотрансформации из глицерина — вещество *дигидроксиацетон*, которое может быть использовано и как компонент крема для загара («краситель» человеческой кожи), и как краситель различных тканей, дающий довольно широкую палитру цветов.

Биополимеры для нефтедобычи. С помощью биотехнологии можно получать полисахариды, например *ксантан*, обеспечивающие возможность создания вязких буровых растворов и растворов для закачки в пласты, повышающих нефтеотдачу.

Получение целлюлозы. Если требуется получать чистую целлюлозу без добавок лигнина, как это бывает у многих растений и деревьев, можно использовать биотехнологический процесс микробиологического синтеза ее из сахаров. Пока что эффективность его невелика, но идут работы по интенсификации процесса.

Получение микробного хитина. Хитин используется как коагулянт, адгезив, добавка при производстве бумаги и тканей. Запасы морского криля и животных, имеющих панцирь, не слишком велики, и микробиологическое производство поможет создать дешевый продукт.

Бактериальное выщелачивание металлов. Только в 1947 г. из шахтных дренажных вод была выделена бактерия *Thiobacillus ferrooxydans*. Она окисляет двухвалентное железо и восстанавливает двухвалентную серу, что является основой перевода многих сульфидных минералов в раствор при бактериальном выщелачивании меди, цинка, урана, серебра. Иногда говорят даже о выщелачивании золота, но правильнее говорить об его «вскрытии»: золото как бы вкраплено в рудах в сульфидные минералы и их выщелачивание приводит к высвобождению золота. Бактериальное выщелачивание применяют для выделения меди и урана из

так называемых «забалансовых» руд, из которых термическим способом выделять эти металлы невыгодно.

Борьба с биоповреждениями материалов. Отдельная ветвь биотехнологии посвящена борьбе с микробными воздействиями на материалы — начиная от пищи и кончая металлами, целлюлозой, смазочными маслами. Здесь эффективно применение антисептиков или тепловых методов стерилизации материалов, традиционных для биотехнологии.

Биоэлектроника. На основе ферментов разработано большое число модификаций датчиков (*биосенсоров*) — приборов для измерения концентраций различных веществ в жидкостях и газах. Ведется создание так называемых *биочипов* — базового элемента для построения ЭВМ нового поколения. При этом предполагается повысить емкость информации и тем самым продолжить миниатюризацию вычислительной техники.

Сверхчувствительные фотоматериалы. На основе синтезируемого галобактериями *бактериородопсина* созданы *фоторегистрирующие пленки*, которые могут служить микроэлементами для оптической памяти.

2.7. ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ БИОТЕХНОЛОГИИ

Биотехнология ведет свое начало с древнейших времен. Уже в Ветхом завете Библии упоминаются вино и так называемый «квасной хлеб», при приготовлении которых применялась дрожжевая закваска (впрочем, без отчетливого знания микробиологического характера этого агента).

История становления биотехнологии может быть подразделена на пять основных этапов (периодов), которые вследствие их важности для развития биотехнологии иногда не совсем строго называют «эрами».

1. *Допастеровская эра* (до 1865 г.). В этот период биотехнологическими методами получали пиво, вино, сыр, хлеб, йогурт, кефир, разного рода ферментированную пищу.

2. *Пастеровская эра* (1865—1940 гг.). Стали известны микроорганизмы-продуценты, и это позволило создать производства этанола, бутанола, ацетона, глицерина, лимонной кислоты, многих вакцин, организовать процессы биологической очистки стоков аэробными микроорганизмами.

3. *Эра антибиотиков* (1940—1960 гг.). Были открыты пенициллин, стрептомицин и многие другие антибиотики, разработана технология культивирования клеток животных и получение вирусных вакцин, технология биотрансформации стероидных гормонов.

4. *Постантибиотическая эра* (1960—1975 гг.). Созданы технологии аминокислот, микробиологического белка на парафинах

нефти, ферментов, используемых в стиральных порошках. Разработана технология иммобилизации ферментов (закрепления их на носителях) для получения глюкозо-фруктозных сиропов. К аэробной обработке стоков добавилась анаэробная обработка твердых отходов с получением биогаза. Открыт микробиологический способ получения полисахаридов (начиная от ксантана для увеличения вязкости раствора нефтяных скважин до жевательной резинки). В этот период стали серьезно говорить о газохоле и вообще о техническом спирте как топливе для автомобилей.

Созданы микробиологические технологии витаминов B_2 и B_{12}, а также микопротеина — мицелиального микроскопического гриба, используемого как заменитель мяса. Ученые научились культивировать изолированные растительные клетки, что положило начало биотехнологическому производству многих ценных лекарственных веществ с использованием огромного потенциала лекарственных растений. К этому же периоду относится зарождение биометаллургии — бактериального выщелачивания меди и цинка из руд.

5. *Эра новой биотехнологии* (после 1975 г.). Характеризуется разработкой генной инженерии, которая позволяет целенаправленно изменять геном микроорганизмов, переносить в него свойства, заимствованные из геномов растений и животных. Это позволило создать микробиологическую технологию человеческого инсулина, интерферона, соматотропного и ростовых гормонов и многого другого.

Создана гибридомная технология, позволяющая получать моноклональные антитела, являющиеся основой для огромного разнообразия диагностических препаратов. Появились так называемые «трансгенные» растения и животные, в которых осуществлялось целенаправленное конструирование генома.

Разработанные основы биотехнологических производств дают возможность уже сейчас получать большое число продуктов с помощью биотехнологии, и эта область стремительно расширяется.

Вопросы для повторения

1. В каких отраслях народного хозяйства используют биотехнологические процессы?
2. Приведите 5 основных этапов развития биотехнологии.
3. Какие продукты биотехнологии применяют в медицине?
4. Что такое вакцина и какие бывают типы вакцин?
5. Что такое антибиотики? Кто открыл антибиотики, когда это было?
6. Чем отличается биотехнологический инсулин от обычного?
7. Что такое иммуномодуляторы, иммунодепрессанты и гормоны роста? Какова роль биотехнологии в их получении?
8. Что такое ферменты, как их получают с помощью биотехнологии? Приведите примеры их использования в медицине.
9. Расскажите о биоразлагаемых полимерах и их роли в медицине.
10. Что вы знаете о подсластителях, получаемых методами биотехнологии?

11. Какие пищевые продукты получали биотехнологическим путем с древних времен?
12. Какую кислоту сначала получали из цитрусовых, а затем разработали биотехнологический способ ее производства?
13. Что такое глюкозо-фруктозные сиропы и как их получают?
14. Как получить пищевой белок биотехнологическим способом?
15. Какие ферменты используют в пищевой промышленности?
16. Как получают безвредные пищевые красители?
17. Назовите примеры пищевых консервантов.
18. Что такое «отрицательная биотехнология»?
19. Какие биотехнологические препараты используют для лечения животных?
20. Расскажите о роли ростовых гормонов для сельского хозяйства и их получении биотехнологическими методами.
21. В чем заключаются проблема кормового белка и вклад биотехнологии в ее решение?
22. Назовите примерное содержание белка в растениях (пшенице, сое) и в микроорганизмах (бактериях, дрожжах).
23. Объясните роль соотношения аминокислот в белках растений и животных с учетом сбалансированности кормов.
24. Какова роль биотехнологии в получении лизина и других незаменимых аминокислот?
25. Что такое пробиотики и как их получают биотехнологическими способами?
26. Расскажите о силосных закваске, их назначении и способах получения.
27. Что такое энтомопатогенные препараты и какова их роль в защите растений?
28. Что такое бактериальные удобрения?
29. Как получают безвирусную рассаду картофеля?
30. Назовите главные направления использования биотехнологии для охраны окружающей среды.
31. Чем отличаются аэробная и анаэробная биологические очистки стоков?
32. Какой биотехнологический процесс используется для очистки стоков от растворенных в них тяжелых металлов?
33. Что такое биокомпостирование и где оно используется?
34. Что такое биогаз и в результате какого процесса он образуется?
35. Как используют биотехнологию для очистки газовых выбросов от загрязнений и неприятных запахов?
36. Какова роль биотехнологии в биодеградации нефтяных загрязнений?
37. Расскажите о микроводорослях и их использовании для трансформации углекислоты в кислород.
38. Что вы знаете о биоразлагаемых полимерах и их применении для упаковки продуктов?
39. Что такое вермикультивирование и копрокультивирование?
40. Объясните роль метанового сбраживания отходов в энергетике.
41. Расскажите о биосинтезе углеводородов микроорганизмами.
42. В чем заключается биофотолиз воды, в чем его перспективы?
43. Расскажите о получении нетрадиционных моторных топлив биотехнологическими методами.
44. В чем суть использования биотехнологических препаратов для увеличения нефтедобычи?
45. Как происходит бактериальное выщелачивание металлов из руд? В чем состоят его преимущества перед пиролитическими способами извлечения металлов?

Глава 3

ТИПОВАЯ СХЕМА И ОСНОВНЫЕ СТАДИИ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДСТВ

●

Рассмотренные продукты биотехнологии получают по индивидуальным технологиям со своими биологическими агентами, сырьем, числом стадий производства и их технологическими режимами. Тем не менее можно представить себе обобщенную типовую схему биотехнологических производств.

Схема состоит из стадий, в каждой из которых сырье претерпевает определенные технологические воздействия и последовательно превращается во все более сложные полупродукты и, наконец, в конечный продукт. Общий вид такой типовой схемы представлен на рис. 3.1.

3.1. БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ СТАДИЯ

Основной стадией является собственно биотехнологическая стадия, на которой с использованием того или иного биологического агента (микроорганизмов, изолированных клеток, ферментов или клеточных органелл) происходит преобразование сырья в тот или иной целевой продукт.

Обычно главной задачей биотехнологической стадии является получение определенного органического вещества.

Однако биотехнологическая стадия, как правило, включает в себя не только синтез новых органических соединений, но и ряд других биотехнологических процессов, перечисленных далее (см. рис. 3.1).

Ферментация — процесс, осуществляемый с помощью культивирования микроорганизмов.

Биотрансформация — процесс изменения химической структуры вещества под действием ферментативной активности клеток микроорганизмов или готовых ферментов. В этом процессе обычно не происходит накопления клеток микроорганизмов, а химическая структура вещества меняется незначительно. Вещество как бы уже в основном готово, биотрансформация осуществляет его химическую модификацию: добавляет или отнимает радикалы, гидроксильные ионы, дегидрирует и т. п.

Биокатализ — химические превращения вещества, протекающие с использованием биокатализаторов-ферментов.

Рис. 3.1. Типовая схема, основные стадии и реализующие их технологические процессы в биотехнологических производствах

Биоокисление — потребление загрязняющих веществ с помощью микроорганизмов или ассоциации микроорганизмов в аэробных условиях.

Метановое брожение — переработка органических отходов с помощью ассоциации метаногенных микроорганизмов в анаэробных условиях.

Биокомпостирование — снижение содержания вредных органических веществ ассоциацией микроорганизмов в твердых отходах, которым придана специальная взрыхленная структура для обеспечения доступа воздуха и равномерного увлажнения.

Биосорбция — сорбция вредных примесей из газов или жидкостей микроорганизмами, обычно закрепленными на специальных твердых носителях.

Бактериальное выщелачивание — процесс перевода нерастворимых в воде соединений металлов в растворенное состояние под действием специальных микроорганизмов.

Биодеградация — деструкция вредных соединений под воздействием микроорганизмов-биодеструкторов.

Обычно биотехнологическая стадия имеет в качестве выходных потоков один жидкостной поток и один газовый, иногда только один — жидкостной. В случае, если процесс протекает в твердой фазе (например, созревание сыра или биокомпостирование отходов), выходом является поток переработанного твердого продукта.

3.2. ПОДГОТОВИТЕЛЬНЫЕ СТАДИИ

Подготовительные стадии служат для приготовления и подготовки необходимых видов сырья биотехнологической стадии.

На стадии подготовки могут быть использованы следующие процессы.

Приготовление среды, обычно жидкой, включающей необходимые компоненты питания для биотехнологической стадии.

Стерилизация среды — для асептических биотехнологических процессов, где нежелательно попадание посторонней микрофлоры.

Подготовка и стерилизация газов (обычно воздуха), необходимых для протекания биотехнологического процесса. Чаще всего подготовка воздуха заключается в очистке его от пыли и влаги, обеспечении требуемой температуры и очистке от присутствующих в воздухе микроорганизмов, включая споры.

Подготовка посевного материала. Очевидно, что для проведения микробиологического процесса или процесса культивирования изолированных клеток растений или животных необходимо подготовить и посевной материал — предварительно выращенное малое по сравнению с основной стадией количество биологического агента.

Подготовка биокатализатора. Для процессов биотрансформации или биокатализа необходимо предварительно подготовить биокатализатор — либо фермент в свободном или закрепленном на носителе виде, либо биомассу микроорганизмов, выращенную предварительно до состояния, в котором проявляется ее ферментативная активность.

Предварительная обработка сырья. Если сырье поступает в производство в виде, непригодном для непосредственного использования в биотехнологическом процессе, то проводят операцию по предварительной подготовке сырья. Например, при получении спирта пшеницу сначала дробят, а затем подвергают ферментативному процессу «осахаривания», после чего осахаренное сусло на

биотехнологической стадии путем ферментации превращается в спирт.

Другой пример — использование древесины для получения дрожжей. Древесину сначала измельчают, а затем подвергают нагреву до 200°С в кислой среде. В результате такого процесса кислотного гидролиза происходит превращение древесины в раствор глюкозы и лигнин. Раствор глюкозы (гидролизат) как раз и используется в биотехнологическом процессе для получения кормовых дрожжей.

Переходим теперь к стадии, следующей за биотехнологической.

3.3. РАЗДЕЛЕНИЕ ЖИДКОСТИ И БИОМАССЫ

Чаще всего целевой продукт находится либо в самой биомассе, либо в жидкости. В обоих случаях необходимо сначала разделить эти две фазы. В зависимости от свойств биомассы и жидкости для этих целей могут быть использованы различные процессы.

Отстаивание — разделение под действием гравитационных сил (обычно при очистке сточных вод).

Фильтрация — пропускание суспензии через фильтрующий материал, на котором задерживаются частицы твердой фазы — биомасса. Такой способ применяют в производстве антибиотиков, особенно в тех случаях, когда микроорганизм-продуцент имеет мицелиальный характер.

Сепарация, центрифугирование — разделение под действием центробежных сил. Наиболее часто используется для отделения дрожжей или бактерий в производстве кормовой биомассы.

Микрофильтрация, ультрафильтрация — пропускание суспензии через мембраны с весьма малым размером пор, обеспечивающее удержание клеток микроорганизмов на мембране и получение раствора, свободного от взвешенных клеток. Ультрафильтрация задерживает уже не только клетки, но и крупные молекулы растворенных веществ.

Коагуляция — добавление в суспензию реагентов, способствующих образованию и осаждению более крупных клеточных агломератов и отделению их от жидкости путем отстаивания.

Флотация — захват биомассы микроорганизмов пузырьками пены и выделение ее из пенной фракции.

3.4. ВЫДЕЛЕНИЕ ПРОДУКТОВ БИОСИНТЕЗА

Эта стадия имеет определенные отличия, связанные с тем, являются продукты внеклеточными или внутриклеточными.

Так, *для внутриклеточных продуктов* сначала необходимо разрушить клеточную оболочку одним из методов, среди которых можно назвать следующие.

Дезинтеграция клеток. Этот процесс разрушения клеточной оболочки может осуществляться физическими методами (с помощью мелющих тел, путем замораживания и продавливания, воздействием ультразвуком, методом декомпрессии — резкого сброса давления) или химическими и биотехнологическими методами.

Гидролиз — разрушение клеточных оболочек под действием химических реагентов и температуры.

Ферментолиз — разрушение клеточных оболочек под действием ферментов при повышенной температуре.

Автолиз — разновидность ферментолиза, когда используют собственные ферменты клетки.

После проведения предварительной операции разрушения клеток выделение целевого продукта осуществляется из раствора методами, которые являются *общими для внеклеточных и внутриклеточных продуктов.*

Экстракция — переход целевого продукта из водной фазы в несмешивающуюся с водой органическую жидкость (экстрагент). Наиболее известно выделение жироподобных веществ жидкими углеводородами (типа бензина), но применяются и многие другие виды экстрагентов (хлороформ, эфир, бутилацетат). Экстракция прямо из твердой фазы (в том числе и биомассы микроорганизмов) называется *экстрагированием.*

Осаждение — выделение целевого продукта путем добавления к жидкости реагента, взаимодействующего с растворенным продуктом и переводящего его в твердую фазу.

Адсорбция — перевод растворенного в жидкости продукта в твердую фазу путем его сорбции на специальных твердых носителях (сорбентах).

Ионный обмен — то же, что адсорбция, но в этом случае в твердую фазу переходят ионы (катионы или анионы), а не целиком молекула целевого продукта или примеси.

Отгонка, ректификация — эти методы используют для выделения растворенных в культуральной жидкости легкокипящих продуктов. Пример — этиловый спирт.

Ультрафильтрация, нанофильтрация и обратный осмос применяются для выделения высокомолекулярных соединений (белков, полипептидов, полинуклеотидов). Обратный осмос и нанофильтрация позволяют отделять даже небольшие по размеру молекулы.

Центрифугирование, ультрацентрифугирование используют для выделения вирусов, клеточных органелл, высокомолекулярных соединений.

3.5. ОЧИСТКА ПРОДУКТА

На стадии выделения продукта главная задача — отделить основную часть продукта, пусть даже и с некоторыми примесями. Получается как бы неочищенный продукт. Поэтому, когда необ-

ходимо получать биопродукты высокой кондиции, добавляют еще стадию очистки продукта. Задача этой стадии — убрать примеси, сделать продукт максимально чистым.

Эта задача решается с помощью разнообразных процессов, в числе которых многие из тех, что уже были рассмотрены ранее. Это **экстракция и экстрагирование, адсорбция, ионный обмен, ультрафильтрация и обратный осмос, ректификация и ферментолиз.** Кроме этих процессов используют и следующие.

Хроматография — процесс, напоминающий адсорбцию. На твердом сорбенте собираются растворенные вещества, но не одно, а несколько, часто близких по структуре. Например, смеси белков, нуклеотидов, сахаров, антибиотиков. При адсорбции они и десорбируются вместе. А вот при хроматографии они выходят из сорбента как бы по очереди, что и позволяет их разделять и, значит, очищать друг от друга.

Диализ — процесс, в котором через полупроницаемую перегородку могут проходить низкомолекулярные вещества, а высокомолекулярные остаются. Путем диализа осуществляют очистку вакцин и ферментов от солей и низкомолекулярных растворимых примесей.

Кристаллизация. Этот процесс базируется на различной растворимости веществ при разных температурах. Медленное охлаждение позволяет формировать кристаллы из растворов целевых продуктов, причем чистота их обычно очень высока. Вся «грязь» остается в маточном растворе. Таким образом, например, получают кристаллы пенициллина.

Можно даже получить еще более чистый продукт, если кристаллы растворить в воде или растворителе, а потом снова кристаллизовать (т. е. провести процесс *перекристаллизации*).

3.6. КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ ПРОДУКТА

После очистки продукта он часто находится все-таки в растворе с небольшими концентрациями примесей. Дальнейшая задача — обеспечить его концентрирование.

Кстати, необходимо рассмотреть, как обычно меняется концентрация целевого продукта от биотехнологической стадии до готовой формы продукта. На выходе из биотехнологической стадии суспензия обычно содержит целевого продукта примерно 0,1—1%, после стадии отделения биомассы — 0,1—2%, после стадии выделения — 1—10%, после очистки — 50—80%, и, наконец, после концентрирования — 90—100%.

На стадии концентрирования применяют такие процессы, как **выпаривание, сушка, осаждение, кристаллизация с фильтрацией получившихся кристаллов, ультрафильтрация и гиперфильтрация или нанофильтрация**, обеспечивающие как бы «отжим» растворителя из раствора.

3.7. ПОЛУЧЕНИЕ ГОТОВОЙ ФОРМЫ ПРОДУКТА

На завершающей стадии производства продукт приобретает товарную форму за счет проведения процессов **гранулирования** (формирование гранул из порошка или прямо из раствора), **дражирования, таблетирования** (формирование драже, таблеток), **розлива** или **фасовки**, **ампулирования** (затаривания в ампулы).

3.8. ОЧИСТКА СТОКОВ И ВЫБРОСОВ

Таким образом, мы рассмотрели схему основного биотехнологического производства, которое на некоторых стадиях, если не на всех, имеет определенные стоки и выбросы в атмосферу. Очистка этих стоков и выбросов — специальная задача, которая обязательно должна решаться в наше экологически неблагополучное время. По существу очистка стоков — это отдельное биотехнологическое производство, имеющее свои подготовительные стадии, биотехнологическую стадию, стадию отстаивания биомассы активного ила и стадию дополнительной очистки стоков и переработки осадка. Очищенная вода иногда может быть возвращена в основное производство. Так организована, например, безотходная технология получения кормового белка из парафинов нефти. На заводе в г. Кириши после создания такой схемы удалось полностью ликвидировать технологические стоки в реку Волхов, а реально — просто заглушить трубопровод большого диаметра. И свежая вода стала забираться из реки Волхов только для компенсации потерь воды за счет испарения из градирен и с готовым продуктом (кормовой белок имеет влажность до 10%).

3.9. ВИДЫ ПРОДУКТОВ ПО ИХ МЕСТУ В ТИПОВОЙ ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ СХЕМЕ

Разные виды продуктов биотехнологии отличаются не только по цвету, вкусу, запаху или химическому составу, но и по тому, какое место в типовой технологической схеме они занимают.

Рассмотрим классификацию продуктов по этому признаку.

1. Продуктом являются **газы со стадии ферментации**. Примеры: диоксид углерода в спиртовом производстве, биогаз в переработке отходов путем метанового брожения, водород при культивировании фототрофов. Особый случай — очищенный газ, если его специально пропускают через биофильтр.

2. Продукт — **среда ферментации**: *культуральная жидкость* вместе с микроорганизмами (например, кефир, йогурт) или *твердый субстрат* (например, сыр или ферментированная с закваской колбаса).

3. **Концентрат культуральной жидкости** — выпаренный или высушенный. Таким образом получают кормовой лизин или кормовые антибиотики.

4. **Жидкость, получающаяся после отделения биомассы от культуральной жидкости**. Она называется в зависимости от способа разделения — *осветленная, надосадочная, нативный раствор, фильтрат, фугат, пермеат или супернатант*. Такая жидкость может быть готовым продуктом, например пиво, вино, квас.

5. **Концентрат** жидкости (см. п. 4), получаемый с помощью выпаривания, сушки или ультрафильтрации.

6. **Биомасса инактивированная** (кормовые дрожжи, которые на завершающих стадиях подвергаются тепловой стерилизации).

7. **Биопрепарат** — жизнеспособная биомасса микроорганизмов (пекарские дрожжи, бактериальные средства защиты растений, биодеструкторы нефтяных загрязнений, бактериальные удобрения, силосные закваски и т. п.).

Биопрепарат может изготавливаться в жидком или в высушенном виде, но во всех случаях входящие в его состав микроорганизмы должны быть жизнеспособными.

8. **Ослабленная биомасса микроорганизмов**. Пример — живые вакцины, когда клетки патогенных микроорганизмов подвергаются обработке тепловыми воздействиями или химическими реагентами для снижения их патогенности.

9. **Внеклеточный биопродукт — легкокипящая жидкость**. Пример — этанол, выделяемый из среды отгонкой или ректификацией.

10. **Внеклеточный биопродукт — твердое вещество или высококипящая жидкость, растворенные в культуральной жидкости**. Биопродукт требует различной степени очистки (в зависимости от назначения). Примеры — многие медицинские антибиотики, чистые пищевые или медицинские аминокислоты, лимонная кислота.

11. **Внутриклеточный продукт** (различной степени очистки) — многие антибиотики, витамины, нуклеотиды.

12. **Переработанная биомасса микроорганизмов**. Примеры: гидролизаты и ферментолизаты, используемые как источники кормления животных или как вкусовые добавки; клеточные оболочки, получаемые после разрушения микроорганизмов и применяемые как сорбент для очистки соков, вина, пищевых жидкостей.

13. **Очищенный от загрязнений поток жидкости** — при очистке сточных вод.

14. **Очищенная от загрязнений твердая среда** — например, почва при микробиологической очистке ее от нефтяных загрязнений.

15. **Жидкая среда (культуральная жидкость) с экстрагированными (выщелоченными) из твердой фазы компонентами**. Примеры — бактериальное выщелачивание металлов из руд, микробиологическое обессеривание угля и нефти.

16. **Среда ферментации (обычно полутвердая), увеличившая свой объем** за счет выделения газов микроорганизмами. Примеры — хлеб, сыр.

Легко убедиться, что для многих из перечисленных видов продуктов технологическая схема будет укороченная, с исключением одной или нескольких стадий. В каждом конкретном случае это определяется целевой задачей, а также свойствами микроорганизмов, сырья и самого готового продукта.

3.10. ПРИМЕРЫ БЛОК-СХЕМ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДСТВ

Рассмотрим несколько примеров блок-схем производства различных продуктов из числа перечисленных ранее. Блок-схема отражает последовательность технологических стадий при получении продукта.

На рис. 3.2 представлена блок-схема производства биогаза. Эта схема значительно короче общей типовой схемы, представленной на рис. 3.1.

Здесь из типовой схемы производства имеются подготовительные стадии, стадия метанового брожения, сушка как стадия концентрирования. Компримирование биогаза можно рассматривать как создание его готовой формы.

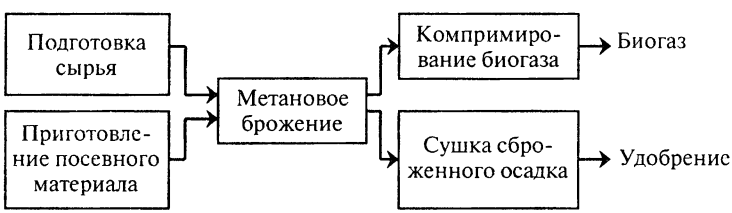


Рис. 3.2. Производство биогаза

В производстве йогурта (рис. 3.3) есть две подготовительные стадии, одна биотехнологическая стадия и стадия розлива, представляющая собой приведение продукта к готовой форме.

Рис. 3.3. Производство йогурта

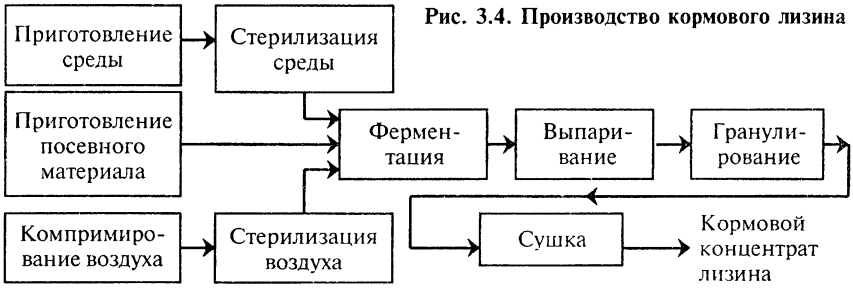


Рис. 3.4. Производство кормового лизина

Производство кормового лизина (рис. 3.4) несколько сложнее. Подготовительные стадии кроме получения посевного материала включают в себя стадии приготовления многокомпонентной сложной среды, ее стерилизацию, а также компримирование и стерилизацию воздуха. Два процесса составляют стадию концентрирования: сначала образующуюся на стадии ферментации культуральную жидкость выпаривают под вакуумом (что дешевле, чем сразу сушить) и только после этого сушат на распылительной сушилке. Есть модификации технологии, когда перед сушкой проводят гранулирование продукта с добавленными отрубями, а сушку осуществляют на ленточной сушилке.

В производстве вина (рис. 3.5) впервые появляется стадия отделения биомассы — фильтрование.

Производство технических внеклеточных ферментов (рис. 3.6) включает в себя полный комплект подготовительных операций для асептической ферментации, отделение биомассы, выделение фермента ультрафильтрацией и затем две стадии сушки для двух продуктов: более мягкая для самого фермента и более жесткая для биомассы микроорганизмов, используемой как кормовой продукт.

Производство паприна (рис. 3.7) представляет собой получение инактивированной биомассы, поэтому кроме сепарации биомассы имеется еще процесс ее тепловой стерилизации. Важной особенностью этого процесса является возврат в ферментер фугата (на-

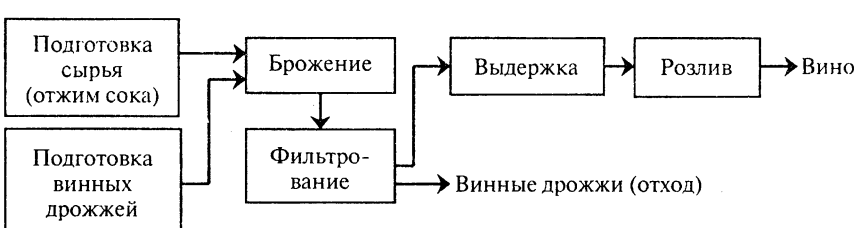


Рис. 3.5. Производство вина

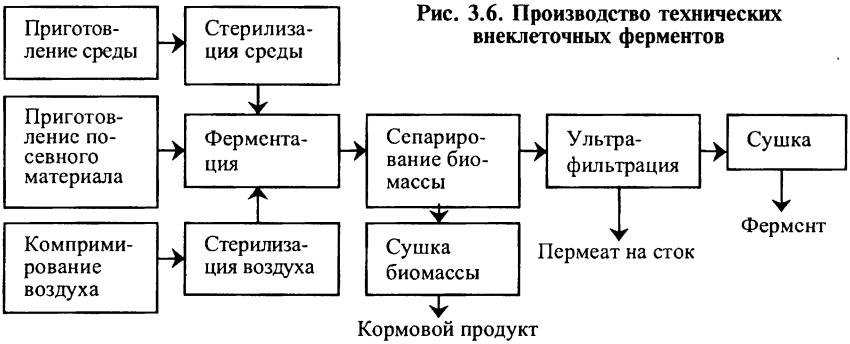


Рис. 3.6. Производство технических внеклеточных ферментов

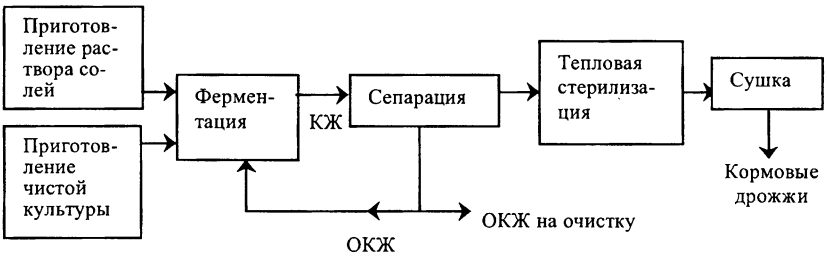


Рис. 3.7. Производство паприна (кормовых дрожжей)

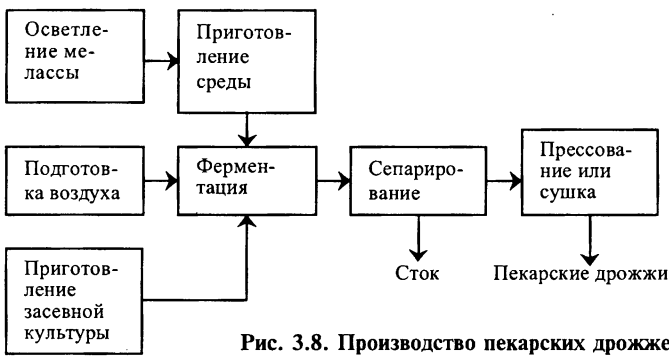
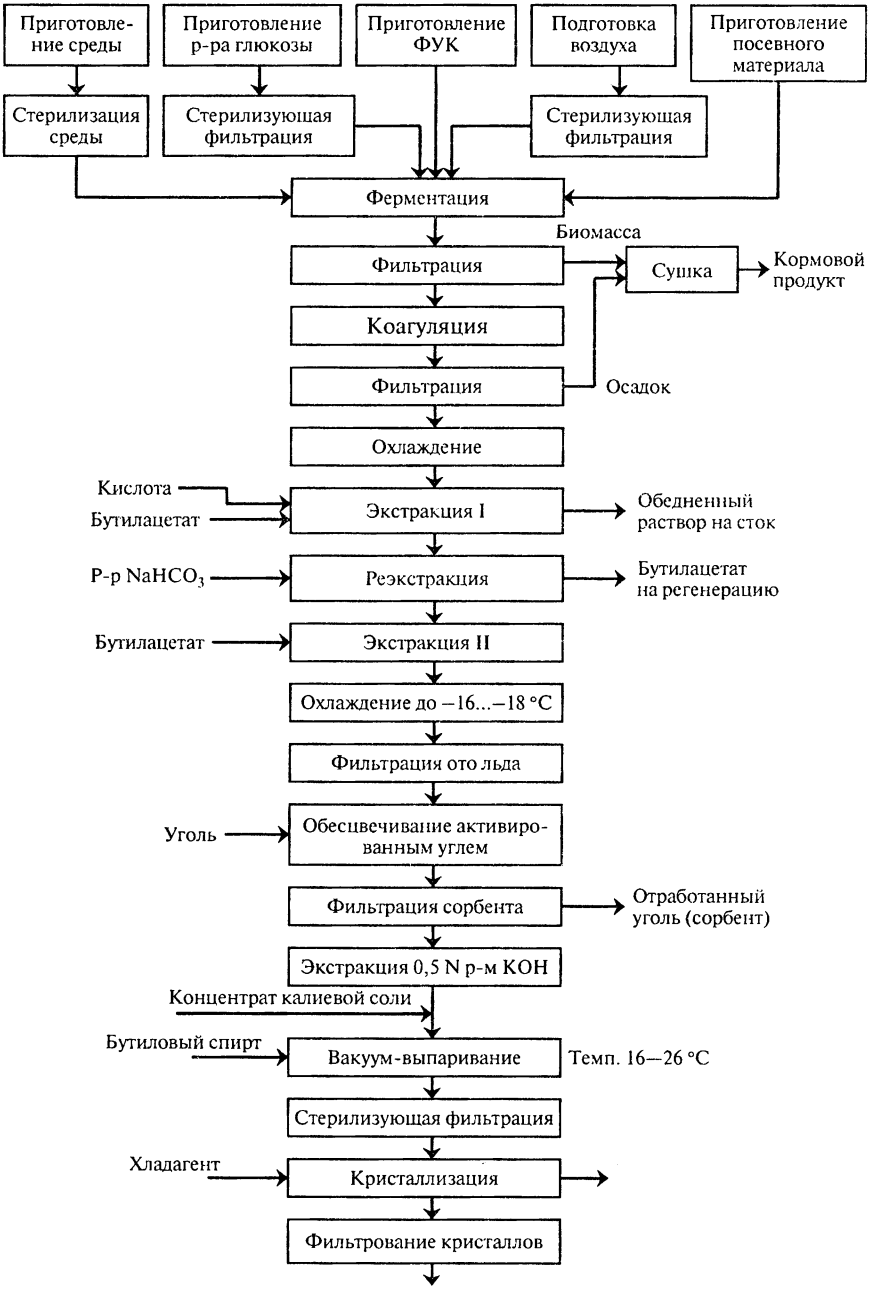


Рис. 3.8. Производство пекарских дрожжей

зываемого ОКЖ — отработанной культуральной жидкостью) через процесс биоокисления активным илом и отделения образовавшейся вторичной биомассы (сгущенного ила), которая присоединяется к основной биомассе перед тепловой стерилизацией (на схеме не показано). В результате полностью исключаются стоки на стадии сепарации.


Приготовление среды
Приготовление р-ра глюкозы
Приготовление ФУК
Подготовка воздуха
Приготовление посевного материала
Стерилизация среды
Стерилизующая фильтрация
Стерилизующая фильтрация
Ферментация
Биомасса
Фильтрация
Сушка
Кормовой продукт
Коагуляция
Фильтрация
Осадок
Охлаждение
Кислота
Бутилацетат
Экстракция I
Обедненный раствор на сток
Р-р $NaHCO_3$
Реэкстракция
Бутилацетат на регенерацию
Бутилацетат
Экстракция II
Охлаждение до −16...−18 °С
Фильтрация ото льда
Уголь
Обесцвечивание активированным углем
Фильтрация сорбента
Отработанный уголь (сорбент)
Экстракция 0,5 N р-м KOH
Концентрат калиевой соли
Бутиловый спирт
Вакуум-выпаривание
Темп. 16—26 °С
Стерилизующая фильтрация
Хладагент
Кристаллизация
Фильтрование кристаллов

В этом же производстве используется сушилка с замкнутым контуром теплоносителя, в которой выбросы в атмосферу пыли биомассы исключены. Так решаются проблемы по стокам и выбросам, вызвавшие большой резонанс при внедрении производства БВК (белково-витаминного концентрата) на разных заводах микробиологической промышленности.

Представленное на рис. 3.8 производство пекарских дрожжей является примером производства живого биопрепарата. При прессовании дрожжей природоохранных проблем не возникает. При сушке необходима относительно низкая температура (клетки должны остаться живыми!). К сожалению, стоки здесь не возвращаются в производство, а идут на очистные сооружения.

На рис. 3.9 представлено производство «гретой» вакцины, в которой выросшие бактерии сначала отделяются ультрафильтрацией, затем происходит нагревание с реагентом и диализ, во время которого удаляются низкомолекулярные примеси из суспензии клеток. Ампулирование дает вакцины в готовой форме.

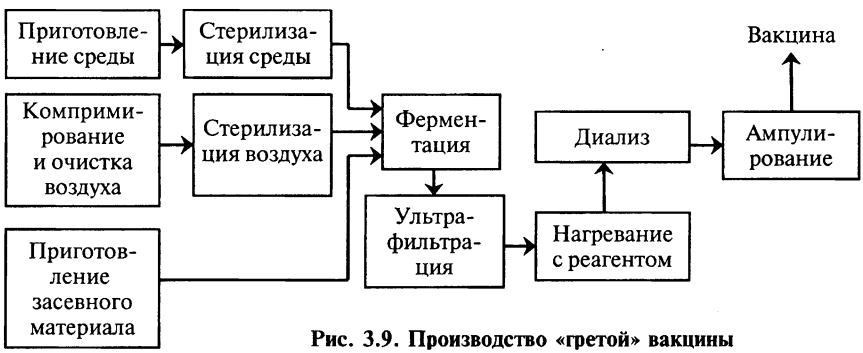


Рис. 3.9. Производство «гретой» вакцины

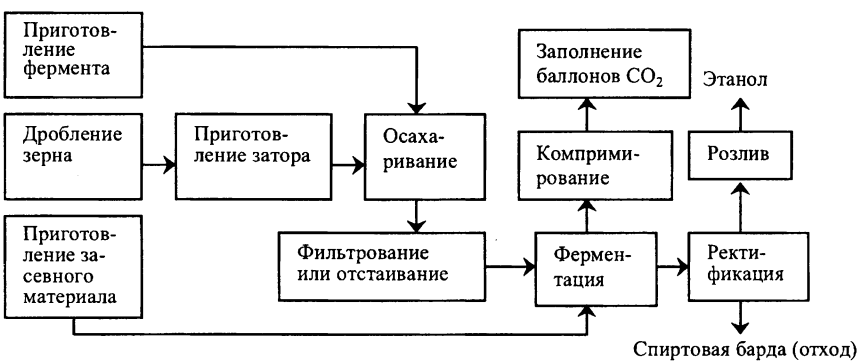


Рис. 3.10. Производство спирта из зерна

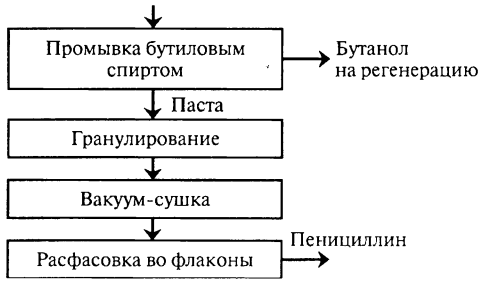


Рис. 3.11. Производство пенициллина

На рис. 3.10 представлено производство спирта из зерна. Зерно приходится дробить, но так, чтобы потом его частицы можно было отфильтровать. Приготовленная среда (ее называют «затор») осахаривается с помощью солодовых ростков ячменя, содержащего фермент глюкоамилазу, или с помощью фермента, полученного микробиологическим путем. Далее проводится анаэробная ферментация (брожение), в результате которой получается этанол и диоксид углерода. Этанол из образовавшейся бражки отделяют и концентрируют ректификацией. Газом заполняют баллоны, готовым спиртом — емкости, а кубовый остаток (барду) используют как корм. Иногда ее тоже сушат, хотя сейчас это стало дорого.

На рис. 3.11 дан пример очень длинной технологической схемы производства пенициллина. Здесь много подготовительных стадий, поскольку наряду с основной средой в процессе ферментации в ферментер подаются растворы глюкозы, аммиачной воды и фенилуксусной кислоты (ФУК). Получаемая после ферментации биомасса отделяется фильтрацией, сушится и используется как кормовой продукт. В фильтрате с помощью коагуляции отделяются белки, получаемый осадок отфильтровывается.

Для обеспечения чистоты продукта предусмотрены последовательные четыре стадии экстракции с переводом пенициллина из водного раствора в органический растворитель бутилацетат, затем обратно в водную фазу — раствор соды, снова в бутилацетат и затем раствором едкого кали в водный раствор.

Интересно выполнена стадия освобождения бутилацетатного раствора от воды — его охлаждают до минус 16—18° С, а затем отфильтровывают от образовавшихся кристалликов льда.

В составе среды есть темно-коричневый компонент — кукурузный экстракт. Этот коричневый пигмент убирают из раствора путем сорбции на угле.

Полученный водный раствор подвергают стерилизующей фильтрации, вакуум-выпариванию с бутиловым спиртом при низкой температуре (16—26° С). Сконцентрированный раствор кристаллизуют охлаждением, а образовавшиеся кристаллы отфильтро-

вывают, гранулируют и сушат под вакуумом, после чего стерильно фасуют в знаменитые пенициллиновые флаконы.

По сравнению с пенициллином производство ферментолизатов (рис. 3.12) кажется совсем простым. В качестве сырья здесь используют суспензию биомассы и фермент. При ферментолизе (биокаталитическом процессе) происходит нарушение клеточных оболочек и выход содержимого клетки в раствор. Один из вариантов предполагает сушку всей образовавшейся суспензии, при этом получают *неочищенный* ферментолизат.

В другом варианте оболочки клеток отделяют от раствора путем сепарирования или центрифугирования. Осадок представляет собой клеточные оболочки, которые после сушки являются хорошим сорбентом. Жидкая же фаза после сушки представляет собой *очищенный* ферментолизат.

На рис. 3.13 представлено производство внутриклеточных ферментов. Здесь после двух стадий отделения биомассы (сепарации и центрифугирования) появляется стадия дезинтеграции клеток, так как для выделения ферментов необходимо нарушить оболочку клеток. Далее происходит отделение оболочек клеток последовательно сначала на центрифуге, а затем с помощью микрофильтрации, и концентрат оболочек клеток поступает на сушку. Из жидкой фазы путем ультрафильтрации выделяется и концентрируется фермент, который затем высушивается в мягких условиях (сублимационная сушка).

Практически полным биотехнологическим производством является биологическая очистка стоков (рис. 3.14). Здесь представлено большое число подготовительных стадий (усреднение стоков, их нейтрализация до необходимой величины pH, очистка от механических примесей фильтрованием или отстаиванием, очистка от нефтепродуктов в нефтеловушке, коагуляция реагентами растворенных примесей; отделение образовавшегося осадка отстаиванием). Подготовленный сток поступает на стадию биоокисления, на которой происходит изъятие растворенных органических веществ активным илом. Это и есть собственно биотехнологичес-

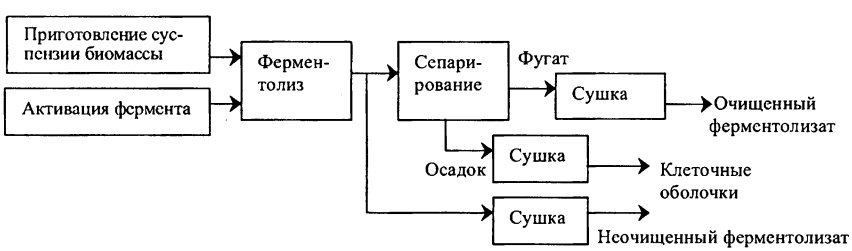


Рис. 3.12. Производство ферментолизатов

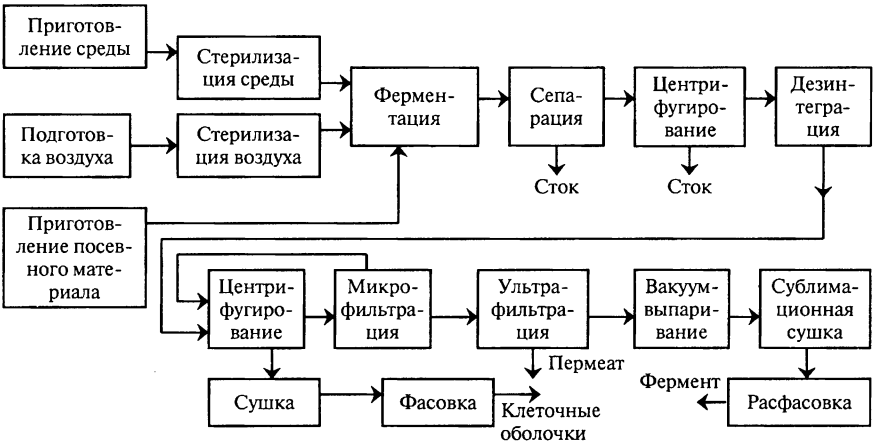


Рис. 3.13. Производство внутриклеточных ферментов

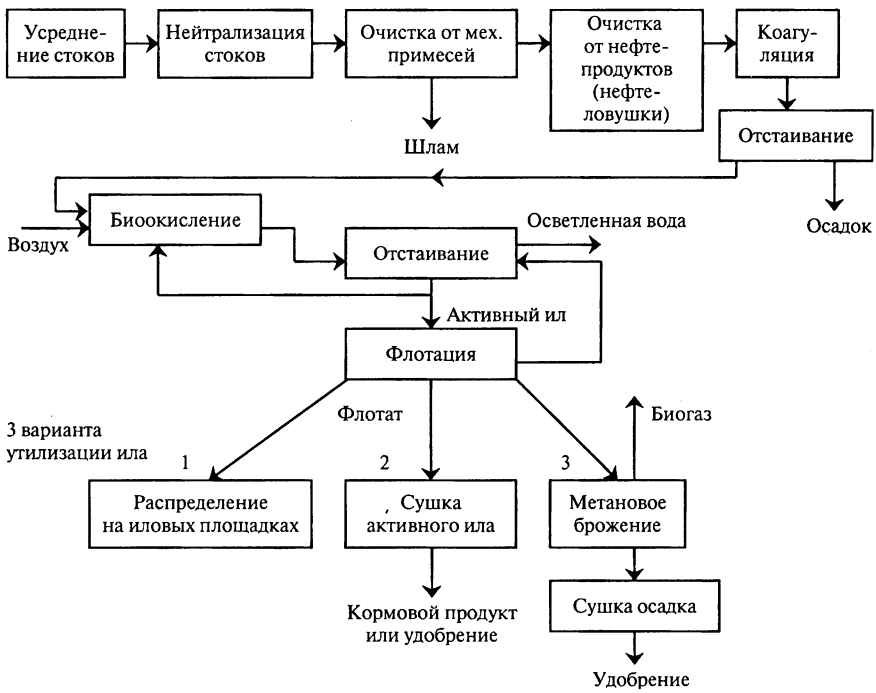


Рис. 3.14. Биологическая очистка стоков

кая стадия, протекающая в аэротенках с подачей воздуха. Далее активный ил отделяется от жидкости отстаиванием, и очищенный сток поступает в водоем. Сгущенный активный ил частично возвращается на стадию биоокисления. Избыточное количество активного ила утилизируют одним из трех способов.

Первый и самый неэкологичный — распределение на так называемых «иловых площадках», где он долго сушится на открытом воздухе, занимая большие площади и распространяя вокруг запахи.

Второй способ предполагает концентрирование ила с помощью флотации. Концентрат активного ила поступает на сушку. Высушенный ил используют в качестве удобрения или кормового продукта — в зависимости от его загрязненности.

И наконец, третий способ: концентрат активного ила перерабатывается метановым брожением в биогаз, а образовавшийся осадок высушивается и также применяется как удобрение.

На рис. 3.15 представлена блок-схема очистки почвы от загрязнений нефтью. Эта технология весьма напоминает сельскохозяйственную. Сначала загрязненный участок подвергают рыхлению путем вспашки. Далее в него вносят удобрение и биопрепарат (живые нефтеокисляющие микроорганизмы). После этого начинается биокомпостирование, в процессе которого обработанный участок периодически взрыхляют для обеспечения доступа воздуха к микроорганизмам, проводят дополнительные подкормки удобрениями. При этом нефтеокисляющие микроорганизмы размножаются и в процессе своего роста потребляют нефтяные загрязнения, разлагая их до диоксида углерода и воды. Когда их содержание снизится до определенного уровня, проводят посев травяных культур, которые дополнительно восстанавливают структуру загрязненной почвы.

Блок-схема процесса бактериального выщелачивания металлов из руд представлена на рис. 3.16. Как и в других процессах, руду перед началом производства измельчают. Затем ее смешивают с раствором минеральных солей, и под действием микроорганизмов *Thyobacillus ferrooxidans* происходит переход ионов металла из руды в раствор. Далее суспензия отстаивается, твердая фаза возвращается на стадию выщелачивания, а жидкая фаза поступает на стадию

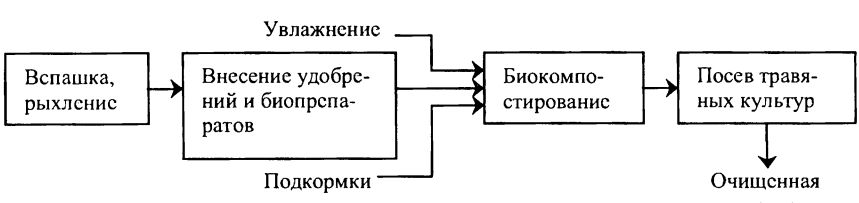


Рис. 3.15. Микробиологическая очистка почвы от загрязнений нефтью

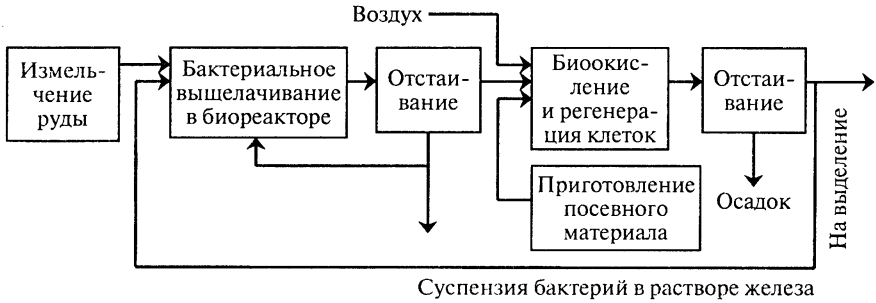


Рис. 3.16. Бактериальное выщелачивание металлов из руд

биоокисления и регенерации клеток. Здесь двухвалентное железо под действием кислорода воздуха и бактерий превращается в трехвалентное, а количество микроорганизмов возрастает. Далее раствор подвергается отстаиванию. При этом образовавшийся осадок, содержащий уже малые концентрации металла, поступает в отвал. Жидкий раствор с регенерированным трехвалентным железом и ионами цветных металлов частично возвращается в биореактор, а частично идет на стадию выделения.

На рис. 3.17 схематически представлен процесс производства хлеба. Приготовление опары (суспензии муки в воде) является аналогом приготовления среды в биотехнологических производствах. В опару добавляют дрожжи, и она подвергается брожению. Затем в нее дополнительно вносят муку («замес теста»), и вновь происходит анаэробный биологический процесс брожения. Далее тесто делят на заготовки и они уже в третий раз подвергаются действию дрожжей в процессе, называемом «расстойка». При этом диоксид углерода, образующийся при брожении, увеличивает объем хлеба и создает его пористость. Последующая стадия выпечки закрепляет полученный результат и превращает по существу жидкий полупродукт в твердое тело — хлеб, батон или прочие хлебобулочные изделия.

Приведенные примеры, конечно, не исчерпывают всех вопросов, связанных с той или иной из рассмотренных технологий. Они только показывают, что в зависимости от типа продукта тех-

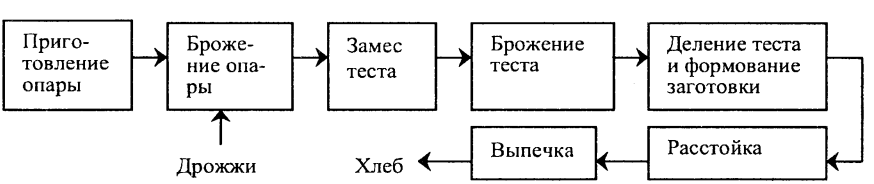


Рис. 3.17. Производство хлеба

нологическая схема может включать в себя различное число стадий и часто не содержит все стадии типовой схемы биотехнологического производства.

Из рассмотренных схем также следует, что биотехнологические производства включают в себя как специфические для биотехнологии стадии (ферментация, биоокисление, биотрансформация, брожение, бактериальное выщелачивание, биокомпостирование, ферментолиз, стерилизация среды и воздуха, дезинтеграция микроорганизмов), так и множество стадий, встречающихся и в химической технологии (фильтрация, сепарация, отстаивание, экстракция, сушка, выпаривание, ультрафильтрация и обратный осмос, кристаллизация, ректификация, коагуляция и др.). Эти стадии, конечно, имеют свою специфику в биотехнологических производствах в связи со специфическими физическими и физико-химическими свойствами биологического объекта, его лабильностью и вариабельностью.

Задачей дальнейшего изучения курса будет рассмотрение отдельных процессов биотехнологических производств — как специфически биотехнологических, так и общих с химической технологией.

Вопросы для повторения

1. Назовите основные стадии типового биотехнологического производства.
2. Расскажите, какие подготовительные стадии встречаются в различных биотехнологических производствах.
3. Назовите варианты процессов, реализующих основную — биотехнологическую — стадию производства.
4. Каковы сходство и различия в стадиях ферментации, биотрансформации и биокатализа?
5. Назовите варианты процессов, осуществляющих стадию разделения жидкости и биомассы.
6. Перечислите процессы, используемые на стадиях выделения внеклеточных и внутриклеточных продуктов метаболизма.
7. Опишите процесс дезинтеграции, его отличие от стерилизации микроорганизмов.
8. Назовите процессы, используемые при очистке биопродукта от примесей.
9. Какие процессы применяют для концентрирования биопродуктов?
10. Расскажите о процессах получения готовых форм биопродукта.
11. Как обычно изменяется концентрация целевого продукта на разных стадиях биотехнологического производства?
12. В чем заключается классификация биотехнологических производств по типам технологических схем?
13. Чем отличаются производства, где продуктом является среда ферментации, от производства концентратов?
14. Чем отличаются производства инактивированной биомассы, биопрепарата, ослабленной биомассы микроорганизмов и переработанной биомассы микроорганизмов?
15. Дайте понятие блок-схем биотехнологических производств.
16. Опишите блок-схему производства кормового лизина.
17. Опишите блок-схему производства хлебопекарных дрожжей.
18. Опишите блок-схему производства ферментолизатов биомассы.
19. Опишите блок-схему производства пенициллина.
20. Опишите блок-схему биологической очистки стоков.

Глава 4

ПРОЦЕСС ФЕРМЕНТАЦИИ: ОСНОВНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

●

Мы уже дали определение процессу ***ферментации*** как процессу, в котором происходит преобразование исходного сырья в продукт с использованием биохимической деятельности микроорганизмов или изолированных клеток.

Практически синонимами слова «ферментация» можно считать такие термины, как ***культивирование***, ***выращивание микроорганизмов, биосинтез.***

Следует отличать ферментацию от *биокатализа* (в котором уже полученный ранее фермент или биомасса микроорганизмов используются как катализаторы биохимического процесса синтеза продукта из исходного сырья и реагентов) и от *биотрансформации* (в этом процессе также применяется биокатализатор в виде фермента или биомассы микроорганизмов, но исходное вещество по химической структуре мало отличается от продукта биотрансформации).

4.1. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРОЦЕССОВ ФЕРМЕНТАЦИИ

По признаку целевого продукта процесса ферментация может быть следующих типов:

1) ферментация, в которой целевым продуктом является сама биомасса микроорганизмов; именно такие процессы часто обозначают словами «культивирование», «выращивание»;

2) целевым продуктом является не сама биомасса, а продукты метаболизма — внеклеточные или внутриклеточные; такие процессы часто называют процессами биосинтеза;

3) задачей ферментации является утилизация определенных компонентов исходной среды; к таким процессам относятся биоокисление, метановое брожение, биокомпостирование и биодеградация.

Исходную среду в процессах ферментации или ее основной компонент часто обозначают словом ***«субстрат»***.

По основной фазе, в которой протекает процесс ферментации, различаются:

1) поверхностная (твердофазная) ферментация (культивирова-

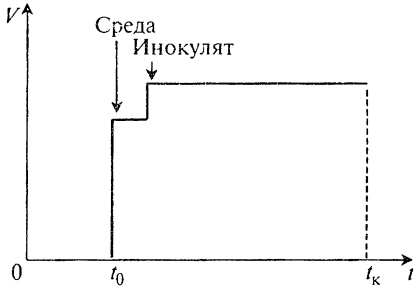


Рис. 4.1. Изменение объема жидкости во времени при периодическом способе ферментации:

t_0 — время подготовки аппарата; $t_к$ — время завершения ферментации; V — объем среды в аппарате

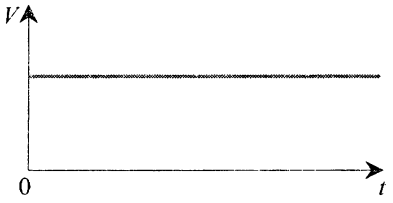


Рис. 4.2. Зависимость объема жидкости от времени при непрерывной ферментации

ферментационной жидкости. В итоге объем среды в аппарате сохраняется постоянным в течение длительного времени (рис. 4.2), теоретически —бесконечно, а практически — до какой-нибудь неполадки.

Многоциклические процессы в основном напоминают периодические, но при выгрузке в аппарате оставляется часть ферментационной жидкости, которая служит посевным материалом для следующей ферментации (цикла), и только после этого добавляется свежая питательная среда (рис. 4.3). Такая организация процесса позволяет обойтись без специальной стадии приготовления посевного материала.

В отъемно-доливных процессах ферментация в промежутках между загрузкой и разгрузкой аппарата протекает как периодическая, но после некоторого времени, определяемого по состоянию процесса, часть ферментационной среды выгружают и заменяют свежей средой (рис. 4.4).

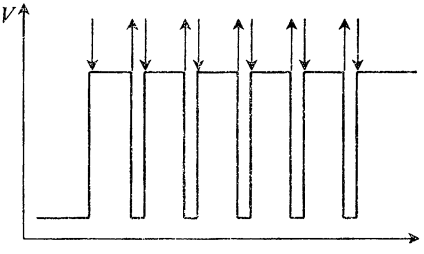


Рис. 4.3. Изменение объема жидкости во времени при многоциклической ферментации. Стрелки вниз указывают загрузку свежей среды, а стрелки вверх — разгрузку аппарата

В сравнении с многоцикли-ческим процессом здесь меньше отбираемая часть жидкости, но зато и интервалы между отборами меньше и число отборов гораздо больше. Процесс при таких частых отборах и добавлениях среды протекает по-другому, чем в строго периодическом процессе, и часто имеет лучшие характеристики, а не только обеспечивает экономию на посевном материале.

ние на агаровых средах, на зерне, производство сыра и колбас, биокомпостирование и др.);

2) глубинная (жидкофазная) ферментация, где биомасса микроорганизмов суспендирована в жидкой питательной среде, через которую при необходимости продувается воздух или другие газы;

3) газофазная ферментация, в которой процесс протекает на твердом носителе, где закрепляются микроорганизмы, но сами частицы носителя взвешены в потоке газа, насыщенном аэрозолем питательной среды. Надо сказать, что подобный способ ферментации используется довольно редко, в основном при очистке газов от вредных и одорирующих примесей.

По отношению к кислороду различают аэробную, анаэробную и факультативно-анаэробную ферментацию — по аналогии с классификацией самих микроорганизмов.

По отношению к свету — световая (фототрофная) и темновая (хемотрофная) ферментация.

По степени защищенности от посторонней микрофлоры — асептическая, условно асептическая и неасептическая ферментация. Иногда асептическую ферментацию называют стерильной, что неверно: в среде есть целевые микроорганизмы, но нет чужеродных.

В условно асептической ферментации допускается некоторый уровень попадания посторонней микрофлоры, которая способна сосуществовать с основной или по содержанию не превышает определенного предела.

По числу видов микроорганизмов различают ферментации на основе монокультуры (или чистой культуры) и смешанное культивирование, в котором осуществляется совместное развитие ассоциации двух или более культур.

По способу организации процессы ферментации могут быть:

1) периодические;
2) непрерывные;
3) многоциклические;
4) отъемно-доливные;
5) периодические с подпиткой субстрата;
6) полунепрерывные с подпиткой субстрата.

Все эти виды ферментации (по способу их организации) легко идентифицировать по способу загрузки сырья и выгрузки продукта.

В *периодических процессах* загрузка сырья и посевного материала в аппарат производится единовременно, затем в аппарате в течение определенного времени идет процесс, а после его завершения полученная ферментационная жидкость выгружается из аппарата. На рис. 4.1 представлен график изменения объема среды в аппарате во времени при периодической ферментации.

В *непрерывных процессах* загрузка и выгрузка среды протекают непрерывно и одновременно, причем скорость подачи в аппарат свежей питательной среды равна скорости отбора из аппарата

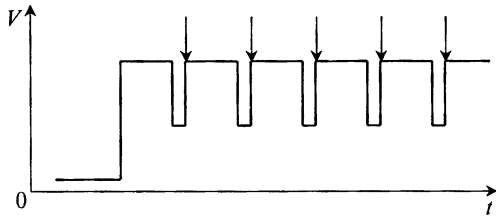


Рис. 4.4. Изменение объема жидкости во времени в отъемно-доливном процессе ферментации. Стрелки указывают момент загрузки свежей среды

В периодическом процессе с подпиткой субстрата часть среды загружается в начале ферментации, а другая часть добавляется непрерывно по мере протекания процесса (рис. 4.5). Естественным завершением процесса является переполнение аппарата, поэтому необходимо переходить на строго периодический процесс с максимальным объемом среды и быстро завершать его.

Полунепрерывные процессы с подпиткой субстрата являются сочетанием отъемно-доливных и подпиточных (рис. 4.6). В рассмотренном процессе с подпиткой после достижения определенного состояния происходит отбор части ферментационной жидкости из аппарата, а затем постепенное добавление субстрата до нового заполнения аппарата.

В результате удается снять с одного аппарата во много раз больше культуральной жидкости, да и процесс при этом протекает значительно интенсивнее.

Следует отметить, что во всех случаях здесь имеется в виду основной материальный поток жидкости. Воздух, например, для аэробной ферментации добавляется непрерывно даже и в периодических процессах, то же часто бывает при добавлении щелочи для регулирования величины pH или жидкого пеногасителя.

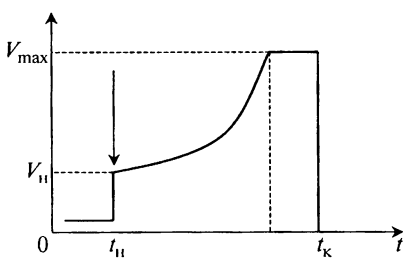


Рис. 4.5. Изменение объема жидкости во времени в периодическом процессе с подпиткой субстрата. Стрелка указывает начало подпитки

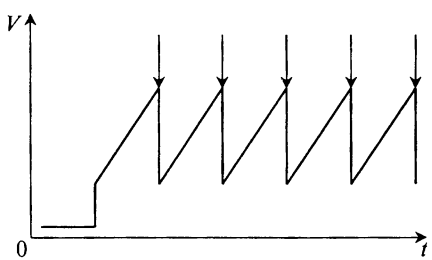


Рис. 4.6. Изменение объема жидкости во времени в полунепрерывном процессе с подпиткой субстрата. Стрелками вниз указаны моменты отбора части жидкости из аппарата

4.2. ОСНОВНЫЕ ПАРАМЕТРЫ ПЕРИОДИЧЕСКОЙ ФЕРМЕНТАЦИИ

Рассмотрим теперь более подробно периодическую ферментацию.

Основные параметры процесса. После того как в аппарат загрузили среду, создали необходимую температуру, добавили посевной материал и стали подавать воздух для аэрации, собственно говоря, и начался процесс ферментации. Как следить за протеканием этого процесса? Для этого необходимо время от времени или непрерывно определять, какие изменения происходят в ферментационной среде.

Обычно состояние процесса характеризуется следующими основными параметрами:

концентрация биомассы микроорганизмов X;

концентрация питательной среды — субстрата (или его основного компонента) S;

концентрация продукта P.

Все эти концентрации приведены к единице объема среды.

Фазы периодической ферментации. Рассмотрим, как изменяется концентрация биомассы в процессе периодической ферментации (***фазы ферментации***) (рис. 4.7).

В начале ферментации некоторое время микроорганизмы как бы приспосабливаются к новой среде, их концентрация не меняется. Этот период называется лаг-фаза. Далее начинается рост — это фаза ускорения роста. Третья фаза — фаза наиболее интенсивного роста, происходит наибольший относительный прирост биомассы. Это фаза экспоненциального роста. Затем скорость роста (относительная) начинает уменьшаться — это фаза замедления роста. Достигнув некоторой максимальной величины, концентрация

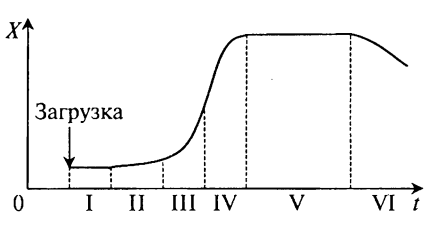


Рис. 4.7. Определение фаз ферментации по кривой роста биомассы во времени в периодическом процессе:

I — лаг-фаза; II — фаза ускорения роста; III — фаза экспоненциального роста; IV — фаза замедления роста; V — стационарная фаза; VI — фаза отмирания

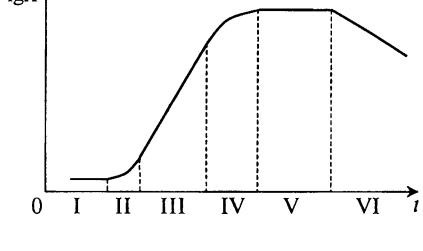


Рис. 4.8. Фазы ферментации в полулогарифмической системе координат (обозначения фаз I—VI соответствуют рис. 4.7)

биомассы далее перестает возрастать. В этой фазе — стационарной — в среде истощаются питательные вещества и накапливаются продукты обмена, тормозящие рост. Биомасса растет и одновременно происходит гибель части клеток (*автолиз*), так что общая концентрация сохраняется постоянной. И наконец, в фазе отмирания автолиз начинает преобладать над ростом, и концентрация биомассы микроорганизмов снижается.

Эту кривую лучше изображать в полулогарифмических координатах $\lg X - t$ (рис. 4.8).

Здесь участок роста, имеющий постоянный наклон, сразу выделяет фазу экспоненциального роста. Остальные фазы также легко определяются.

4.3. КИНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПРОЦЕССА

Кинетические характеристики процесса отражают скорость протекания биохимических превращений. Эти превращения, естественно, отражаются на всех указанных «участниках» процесса — биомассе, продукте и субстрате.

Кинетические показатели роста биомассы. Важным показателем процесса является скорость роста биомассы. Хотя сам вид кривой очень похож для различных микроорганизмов, время ферментации существенно различается. Для быстрорастущих бактерий весь цикл может закончиться за несколько часов, а для мицелиальных микроорганизмов или изолированных клеток растений время составляет недели и месяцы.

Для описания скорости роста используется такая характеристика, как ***общая скорость роста*** Q_X:

$$Q_X = \frac{\mathrm{d}X}{\mathrm{d}t}. \qquad (4.1)$$

Этот показатель не вполне отражает физиологическое состояние биомассы в процессе его роста. На рис. 4.9 представлены два процесса, протекающие с одинаковой общей скоростью роста биомассы.

В первом процессе исходная концентрация биомассы меньше, во втором — больше. Поэтому хотя абсолютный прирост биомассы ΔX за одинаковое время Δt такой же, относительный прирост $\Delta X/X_0$ различается существенно: в первом случае количество биомассы возрастает в несколько раз по отношению к начальному, а во втором — по отношению к начальной биомассе рост составляет всего 20—30%. Ясно, что биомасса «работает» в этих двух процессах по-разному, хотя и «выдает» одинаковое количество продукции за то же время.

Обычно больший интерес для характеристики интенсивности роста представляет не величина Q_X, а ***удельная скорость роста*** в

пересчете на единицу биомассы (ведь рост биомассы пропорционален концентрации клеток) μ:

$$\mu = \frac{Q_X}{X} = \frac{\mathrm{d}X}{X\mathrm{d}t}. \qquad (4.2)$$

Надо сказать, что величина μ в ходе обычного периодического процесса изменяется, как будет показано далее на рис. 4.11.

В экспоненциальной фазе, когда рост ничем не лимитирован, величина μ постоянна, а рост биомассы описывается уравнением

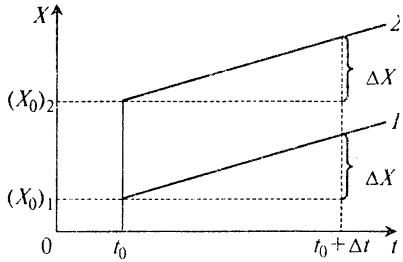


Рис. 4.9. Сравнение двух процессов ферментации (*1* и *2*) с одинаковой общей скоростью роста биомассы (пояснения в тексте)

$$\frac{\mathrm{d}X}{\mathrm{d}t} = \mu x. \qquad (4.3)$$

Если бы процесс с самого начала определялся этой зависимостью, то концентрация биомассы изменялась бы начиная с X_0 по уравнению

$$X = X_0 e^{\mu t}. \qquad (4.4)$$

Прологарифмировав обе части уравнения, получаем:

$$\ln X = \ln X_0 + \mu t. \qquad (4.5)$$

Это уравнение показывает, почему для экспоненциальной фазы в логарифмических координатах график будет прямолинейным, причем тангенс угла наклона пропорционален μ (рис. 4.10).

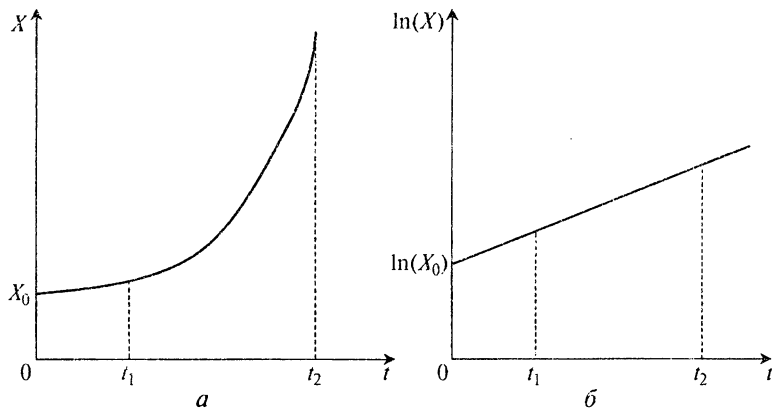


Рис. 4.10. Экспоненциальный рост биомассы во времени, представленный в обычной (*а*) и полулогарифмической (*б*) системе координат; тангенс угла наклона прямой равен μ

Таким образом, по двум точкам на линейном участке полулогарифмического графика можно определить μ по формуле

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_1 - t_2}. \qquad (4.6)$$

Микробиологи предпочитают другой параметр — ***время генерации g*** — время, за которое биомасса культуры удваивается. Легко найти связь между величиной μ и *g*. Как видно из уравнения (4.4),

при $t = 0$ $X = X_0$;

при $t = g$ $X = 2X_0$.

Тогда

$$2X_0 = X_0 e^{\mu g}. \qquad (4.8)$$

$$e^{\mu t} = 2; \qquad (4.9)$$

$$\mu g = \ln 2; \qquad (4.10)$$

$$g = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{0{,}69}{\mu}. \qquad (4.11)$$

Удельную скорость роста μ иногда называют «коэффициент скорости роста». Это не совсем правильно. Слово «коэффициент» неявно подразумевает, что это некая постоянная величина, которая не изменяется со временем. На самом деле величина μ в ходе периодического процесса изменяется, и можно построить кривую этого изменения (рис. 4.11). Это не коэффициент, а параметр — такой же, как *X*, *S*, *P*.

Из рис. 4.11 следует, что в фазе отмирания удельная скорость роста приобретает отрицательное значение.

Размерность величины μ — [$ч^{-1}$] или [$мин^{-1}$], но лучше первое, так как микробиологические процессы протекают не так быстро.

Удельная скорость роста для различных видов микроорганизмов имеет разные значения. Для многих бактерий она велика и может достигать 0,5 и даже 1,0 $ч^{-1}$. Для грибов и актиномицетов скорость роста не выходит за пределы 0,1 $ч^{-1}$, а для микроводорослей, а также растительных и животных клеток находится на уровне 0,01 $ч^{-1}$.

Кинетика потребления субстрата. Рассмотрим теперь, что происходит со вторым параметром процесса ферментации — концентрацией субстрата *S*. Поскольку субстрат потребляется, его концентрация с течением времени падает, и в конце концов недостаток субстрата начинает тормозить дальнейший рост клеток микроорганизмов (рис. 4.12).

По аналогии со скоростью роста биомассы можно ввести кинетическую характеристику — ***общую скорость потребления субстрата*** Q_S:

$$Q_S = -\frac{dS}{dt}. \tag{4.12}$$

Знак (–) обозначает, что скорость потребления положительна, когда концентрация субстрата в среде падает (т.е. скорость изменения концентрации отрицательна).

Аналогично, ***удельная скорость потребления субстрата***, которую обозначим буквой q_S, равна

$$q_S = \frac{Q_S}{X} = -\frac{1}{x}\frac{dS}{dt}. \tag{4.13}$$

Кинетика биосинтеза продуктов метаболизма. В некоторых процессах наряду с ростом биомассы происходит накопление в среде продукта метаболизма (его текущая концентрация P).

Общая скорость биосинтеза продукта метаболизма Q_P в периодическом процессе

$$Q_P = \frac{dP}{dt}. \tag{4.14}$$

Удельная скорость биосинтеза продукта из единицы биомассы обозначается q_P и равна

$$q_P = \frac{Q_P}{X} = \frac{1}{x}\frac{dP}{dt}. \tag{4.15}$$

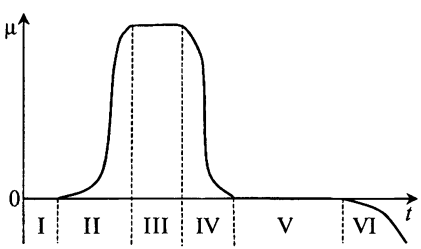


Рис. 4.11. Изменение удельной скорости роста биомассы во времени в периодическом процессе ферментации (обозначения фаз I—VI соответствуют рис. 4.7)

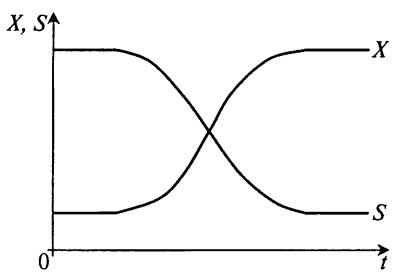


Рис. 4.12. Типичная взаимозависимость изменения во времени концентраций биомассы и субстрата

4.4. МАКРОСТЕХИОМЕТРИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПРОЦЕССА

Все рассмотренные ранее характеристики Q_X, μ, Q_S, q_S, Q_P и q_P являются выражением скорости изменения того или иного параметра во времени, т.е. *кинетическими* характеристиками.

Наряду с этими характеристиками важное значение имеют и так называемые *макростехиометрические*, которые выражают взаимосвязь между приростом биомассы, продукта и расходованием субстрата.

Простейшей такой характеристикой процесса ферментации является ***выход по субстрату***, или ***экономический коэффициент*** (или *коэффициент выхода*). Его определяют, сравнивая количество выросшей за весь цикл ферментации биомассы $X_к$ к количеству загруженного субстрата S_0 (проще говорить об их концентрациях, чтобы абстрагироваться от объема среды):

$$Y = X_к / S_0. \tag{4.16}$$

Это — экономический коэффициент по биомассе, но аналогичный коэффициент может быть вычислен и по продукту метаболизма:

$$Y = P_к / S_0. \tag{4.17}$$

Ясно, что обозначения коэффициентов должны различаться. Это можно сделать с помощью индексов: первый обозначим как Y_{XS}, второй — как Y_{PS}.

Вернемся к коэффициенту Y_{XS}. Понятно, что он определен не совсем точно. В начале процесса уже существует некоторое количество биомассы, определяемое ее концентрацией X_0, так что прирост ее за время ферментации меньше, чем $X_к$, и равен $(X_к - X_0)$.

В то же время не весь субстрат до конца расходуется за время процесса; какая-то часть его, определяемая конечной концентрацией $S_к$, останется, так что потребление субстрата будет не S_0, а $(S_0 - S_к)$.

Таким образом, сам биологический процесс более правильно характеризовать коэффициентом, найденным по формуле

$$Y_{XS} = \frac{X_к - X_0}{S_0 - S_к} = \frac{\Delta X}{\Delta S}\left[\frac{\text{г биомассы}}{\text{г субстрата}}\right]. \tag{4.18}$$

С точки зрения производственника лучше первое определение, так как остаточный субстрат — это в любом случае невосполнимые его потери, а выращенный до ферментации посевной материал — это достижение.

Аналогичным образом для продукта метаболизма:

$$Y_{PS} = \frac{P_к - P_0}{S_0 - S_к} = \frac{\Delta P}{\Delta S}\left[\frac{\text{г продукта}}{\text{г субстрата}}\right]. \quad (4.19)$$

Иногда вместо экономических коэффициентов используют обратные им и называют их *метаболическими*, или *трофическими*, *коэффициентами*:

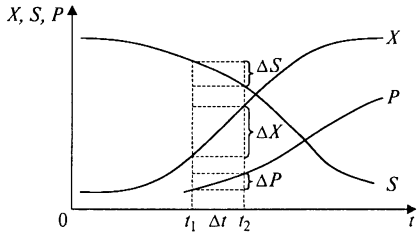


Рис. 4.13. К определению экономического коэффициента за произвольный промежуток времени $\Delta t = t_2 - t_1$

$$Y_{SX} = \frac{1}{Y_{XS}} = \frac{S_0 - S_к}{X_к - X_0} = \frac{\Delta S}{\Delta X}\left[\frac{\text{г субстрата}}{\text{г биомассы}}\right]; \quad (4.20)$$

$$Y_{SP} = \frac{1}{Y_{PS}} = \frac{S_0 - S_к}{P_к - P_0} = \frac{\Delta S}{\Delta P}\left[\frac{\text{г субстрата}}{\text{г продукта}}\right]. \quad (4.21)$$

Любой вид экономического или трофического коэффициента можно вычислять не только по начальным и конечным значениям параметров, т. е. за весь период ферментации, но и за любой произвольно взятый промежуток времени Δt, используя для его вычисления соответственно этому промежутку определенные значения ΔX, ΔS и ΔP (рис. 4.13).

Тогда получим значения коэффициентов Y_{XS}, Y_{PS} за данный промежуток времени.

В пределе можно рассматривать промежуток Δt сколь угодно малым — вплоть до бесконечно малого dt, и ему будут соответствовать сколь угодно малые приросты dX, dP и dS.

Так же можно получить мгновенные текущие коэффициенты (будем их в общем виде называть относительными стехиометрическими коэффициентами):

$$Y_{XS} = \frac{dX}{dS}; \quad (4.22) \qquad Y_{PS} = \frac{dP}{dS}; \quad (4.23) \qquad Y_{SX} = \frac{dS}{dX}; \quad (4.24) \qquad Y_{SP} = \frac{dS}{dP}. \quad (4.25)$$

Можно определить и еще пару относительных коэффициентов (образования продуктов в соответствии с приростом биомассы):

$$Y_{PS} = \frac{dP}{dX}; \quad (4.26) \qquad Y_{XS} = \frac{dX}{dP}. \quad (4.27)$$

Вопросы для повторения

1. Дайте классификацию процессов ферментации:
   а) по признаку целевого продукта;
   б) по признаку основной фазы;
   в) по отношению к кислороду;
   г) по отношению к свету;
   д)по степени защищенности от посторонней микрофлоры;
   е) по числу видов микроорганизмов;
   ж) по способу организации.
2. Как изменяется объем жидкости в процессах периодической, непрерывной, многоциклической и отъемно-доливной ферментации?
3. Как изменяется объем среды в периодическом процессе с подпиткой субстрата и в полунепрерывных процессах?
4. Каковы основные параметры, характеризующие состояние процесса ферментации?
5. Назовите обозначения, используемые для концентрации биомассы микроорганизмов, субстрата и продукта метаболизма в процессах ферментации.
6. Назовите основные фазы ферментации.
7. Чем отличается лаг-фаза от фазы стационарного роста?
8. Чем отличается скорость роста в фазах ускорения роста, экспоненциальной и замедления роста?
9. Дайте определение общей и удельной скорости роста микроорганизмов.
10. Расскажите о способах определения удельной скорости роста по кривой роста микроорганизмов во времени.
11. Что такое время генерации и какова его связь с удельной скоростью роста?
12. Укажите размерность удельной скорости роста и ее примерные значения для бактерий, дрожжей, грибов, микроводорослей, растительных клеток.
13. Что такое общая и удельная скорости потребления субстрата?
14. Как выражаются общая и удельная скорости биосинтеза продуктов метаболизма?
15. Перечислите известные вам кинетические характеристики процесса ферментации.
16. Что такое экономический коэффициент? Расскажите о способах его определения.
17. Что такое метаболический, или трофический, коэффициент?
18. Как определяются экономический и метаболический коэффициенты по продукту?
19. Назовите известные вам макростехиометрические коэффициенты процесса ферментации.
20. Дайте понятие о затратах субстрата на поддержание жизнедеятельности микроорганизмов.
21. Расскажите о кинетике потребления субстрата с учетом поддержания жизнедеятельности микроорганизмов.
22. Поясните различие между «кажущимся» и «истинным» коэффициентами.
23. Укажите способы определения «истинного» экономического коэффициента и коэффициента поддержания жизнедеятельности.
24. Напишите дифференциальное уравнение баланса потребления субстрата во времени, учитывающее рост микроорганизмов, биосинтез продуктов метаболизма и затраты субстрата на поддержание жизнедеятельности микроорганизмов.
25. Расскажите о средней производительности процесса ферментации и методах ее графического определения.
26. Как найти время завершения периодического процесса ферментации, обеспечивающее оптимальное значение средней производительности процесса?
27. Назовите преимущества и недостатки периодических процессов ферментации.

Глава 5

СТЕХИОМЕТРИЯ ПРОЦЕССОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

●

5.1. ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ СТЕХИОМЕТРИИ

Экономический, метаболический коэффициенты выхода продукта по субстрату и биомассе — это в простейшем виде стехиометрические коэффициенты.

Они нужны для того, чтобы по одной из известных величин (например, ΔS), рассчитать и другие характеристики процесса (например, ΔX, ΔP).

Если в химии в результате взаимодействия реагентов A и B получаются продукты C и D и выделяется тепло ΔH, то можно записать с помощью стехиометрических коэффициентов ν_A, ν_B, ν_C, ν_D и ν_H следующее стехиометрическое уравнение:

$$\nu_A A + \nu_B B = \nu_C C + \nu_D D + \nu_H \Delta H. \qquad (5.1)$$

Как известно, стехиометрические коэффициенты подбирают таким образом, чтобы выразить фундаментальный закон природы — закон сохранения материи. Количество атомов любого элемента, входящего в вещества A, B, C и D, не должно изменяться в процессе превращения веществ.

В биологии также действует закон сохранения материи. В ходе биологических превращений в клетке *перегруппировываются* атомы углерода, азота, фосфора, водорода, кислорода и других жизненно важных химических элементов. Но общее количество каждого из этих элементов, включенное в структуры клетки, в точности равно количеству, взятому клеткой из питательной среды.

Процесс ферментации можно представить как систему, в которой происходит преобразование исходных реагентов (субстратов) в продукты (клетки и продукты метаболизма) (рис. 5.1).

В аэробных процессах в число субстратов входит кислород O_2, а в число продуктов — диоксид углерода CO_2. Другие субстраты и продукты в разных процессах различные, но стехиометрические соотношения между ними должны соблюдаться.

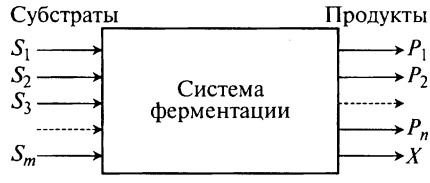


Рис. 5.1. Схематическое представление процесса превращения субстратов в биомассу и продукты метаболизма

По аналогии со стехиометрией в химии можно записать стехиометрическое уравнение для микробиологического процесса:

$$\nu_C\,[\text{углеродный субстрат}] + \nu_N\,[\text{азотный субстрат}] + \\ + \nu_Ф\,[\text{фосфорный субстрат}] + \nu_{O_2}\,[O_2] + \ldots = \nu_X\,[\text{биомасса}] + \\ + \nu_P\,[\text{продукт метаболизма}] + \nu_{CO_2}\,[CO_2] + \ldots + \nu_{H_2O}\,[H_2O] + \\ + \nu_H \Delta H. \qquad (5.2)$$

Первое замечание по данному уравнению состоит в том, что хотя биомасса микроорганизмов является *продуктом* «реакции», она же будет и «исходным реагентом» Действительно, как бы мы не смешивали и что бы мы не делали с исходными субстратами, из них никогда не получится биомасса. Правильно было бы записать биомассу в качестве «субстрата», а в числе продуктов биомассу указать с коэффициентом ($\nu_X + 1$) — большим, чем коэффициент при «биомассе-субстрате».

Учитывая это, можно все же использовать представленное выше результирующее уравнение, в котором биомасса записана только как продукт. Кстати, такие реакции, в которых образовавшийся продукт является катализатором реакции, в химии называют *автокаталитическими.*

5.2. ВЫВОД «ФОРМУЛЫ» БИОМАССЫ МИКРООРГАНИЗМОВ

Разница между «истинной» стехиометрией и микробиологической в том, что наряду с веществами, имеющими определенную химическую формулу, в нее входит биомасса, состоящая из множества индивидуальных веществ — белков, нуклеиновых кислот, липидов и так далее, многие из которых даже не идентифицированы. Все эти вещества записывают целой совокупностью, «связкой». Отсюда следует, что какой-то существующей в природе истинной «формулы» биомассы нет. Однако для работы со стехиометричес-

Сравнение этих «формул» показывает, что состав биомассы микроорганизмов различных классов не очень-то различается.

Интересно, что «молекулярная масса» для каждой из этих «формул» будет 100 или около того (неучтенной золой можно пренебречь).

На первый взгляд кажется непреложным, что в гипотетической «молекуле» биомассы не может быть дробных атомов углерода, серы и т.д. Поэтому, чтобы придать видимость правдоподобия «формуле», ее умножают на какое-то очень большое число, чтобы все коэффициенты оказались целыми числами. Самое простое в данном случае — умножить на 100. Однако никакой беды в дробных коэффициентах или в молекулярной массе, умноженной или разделенной на то или иное число, нет. Надо учесть, что в конечном счете стехиометрическое уравнение нужно просто для расчета соотношения между массами элементов, и это соотношение вполне можно вычислять и без целочисленных коэффициентов атомных индексов в «формуле» биомассы и стехиометрических коэффициентов в самом уравнении.

Кроме того, в стехиометрических расчетах обычно пренебрегают элементами, составляющими малую часть состава биомассы. В «формуле» отбрасывают, таким образом, фосфор и серу, а иногда и азот.

Далее. Мы уже говорили, что в стехиометрическом уравнении все члены можно умножить или разделить на одно и то же число. Значит, без ущерба для расчетов можно произвольно «принять» «молекулярную массу» для биомассы какой угодно, лишь бы потом мы пересчитали все стехиометрические коэффициенты в уравнении.

Удобно принимать такую «молекулярную массу», чтобы в ней оказался только один атом (грамм-атом) углерода. Для этого в ранее вычисленных «формулах» биомассы достаточно все индексы при атомах разделить на индекс при атоме углерода. Такой условный моль, приведенный к одному атому углерода, называют С-*моль*.

В наших примерах:

дрожжи — $CH_{1,66}O_{0,48}N_{0,14}$;

бактерии — $CH_{1,58}O_{0,28}N_{0,19}$;

«усредненная» биомасса — $CH_{1,92}O_{0,30}N_{0,24}$.

Однако для «усредненной» биомассы более часто используется формула, предложенная Стоутхамером для С-моля:

$$CH_{1,8}O_{0,5}N_{0,2}.$$

Из-за простоты эту формулу часто применяют в расчетах. С этого момента забудем о существующих мелких различиях в составах биомассы микроорганизмов!

Рассчитаем «молекулярную массу» С-моля:

$$M = 1 \cdot 12 + 1{,}8 \cdot 1 + 0{,}5 \cdot 16 + 0{,}2 \cdot 14 = 24{,}6.$$

ким уравнением и подбора коэффициентов какой-то, хотя бы фиктивный, эмпирический вид «формулы» биомассы нужен.

За основу при этом можно выбрать элементный состав биомассы (высушенной). Существуют приборы элементного анализа, с помощью которых путем сжигания образца можно определять элементный состав чего угодно.

Такие измерения проводились. Естественно, что есть некоторые различия в содержании тех или иных элементов в зависимости от вида микроорганизма и типа используемых субстратов. Однако эти различия не очень велики.

В табл. 5.1 представлен элементный состав для «средних» бактерий, дрожжей и (с определенной погрешностью) вообще для «усредненных микроорганизмов».

Таблица 5.1

Элементный состав биомассы микроорганизмов

Род микроорганизмов	Элементный состав, %						
	C	H	O	N	P	S	Зола
Дрожжи	47,0	6,5	30,0	7,5	1,5	1,0	6,5
Бактерии	53,0	7,0	20,0	12,0	3,0	1,0	4,0
«Усредненный»	50,0	8,0	20,0	14,0	3,0	1,0	4,0

Как теперь из этого элементного состава получить «формулу» биомассы?

Если принять сухую массу биомассы равной 100 г, то состав, выраженный в табл. 5.1 в процентах, будет отражать массу соответствующего элемента в граммах. Разделив эту массу на атомную массу соответствующего элемента, получаем количество грамм-атомов в 100 г сухой биомассы (табл. 5.2).

Таблица 5.2

Расчет числа грамм-атомов элементов в 100 г сухой биомассы

Тип микроорганизмов	$\frac{C}{12}$	$\frac{H}{1}$	$\frac{O}{16}$	$\frac{N}{14}$	$\frac{P}{31}$	$\frac{S}{32}$
Дрожжи	3,92	6,5	1,88	0,54	0,05	0,03
Бактерии	4,42	7,0	1,25	0,86	0,1	0,03
«Усредненный»	4,17	8,0	1,25	1,0	0,1	0,03

Итак, в первом приближении «формулу» дрожжей можно записать как $C_{3,92}H_{6,5}O_{1,88}N_{0,54}P_{0,05}S_{0,03}$, бактерий — $C_{4,42}H_{7,0}O_{1,25}N_{0,86}P_{0,1}S_{0,03}$, «усредненной» биомассы — $C_{4,17}H_{8,0}O_{1,25}N_{1,0}P_{0,1}S_{0,03}$.

Имея теперь брутто-формулу биомассы, можно проводить и стехиометрические расчеты, как в химических уравнениях.

5.3. РАСЧЕТ ВЫХОДА БИОМАССЫ НА УГЛЕРОДНЫЙ СУБСТРАТ

Обычно наибольший интерес с учетом выхода составляет самый дорогой субстрат — углеродный.

Мы уже упоминали, что в качестве углеродного субстрата могут использоваться разные вещества: глюкоза, крахмал, этанол, метанол, парафины нефти, метан и другие. Эти вещества можно также пересчитать на С-моль (т.е. оставить в молекуле только один атом углерода). Например, для глюкозы с формулой $C_6H_{12}O_6$ С-моль будет иметь формулу CH_2O, для крахмала с формулой $(C_6H_{12}O_6)_n$ вид С-моля не изменится. Вот почему эти вещества определяются словом «углеводы». Рассчитав молекулярную массу С-моля субстрата и сравнив ее с массой С-моля биомассы, можно найти теоретический выход биомассы, если весь углерод субстрата перейдет в углерод биомассы (табл. 53).

Таблица 5.3

Расчет стехиометрического выхода биомассы для различных субстратов

Субстрат	Химическая формула	Молекулярная масса субстрата	Молекулярная масса С-моля субстрата	Стехиометрический выход биомассы	Фактически измеренный выход биомассы, г/г
Глюкоза	$C_6H_{12}O_6$	180	30	0,82	0,5
Крахмал	$(C_6H_{12}O_6)_n$	$180n$	30	0,82	0,5
Целлюлоза	$(C_6H_{12}O_6)_n$	$180\ n$	30	0,82	0,5
Этанол	C_2H_5OH	46	23	1,07	0,75
Метанол	CH_3OH	32	32	0,77	0,5
Парафины (n-алканы)	$(CH_2)_nH_2$	$14\ n+2$	~14	~1,76	1,0
Метан	CH_4	16	16	1,54	0,62

Из таблицы следует, что разные субстраты дают различный стехиометрический выход по биомассе. Последний столбец таблицы 5.3 включает в себя данные о фактически измеренном выходе биомассы в реальных микробиологических процессах, проведенных на указанных в таблице субстратах. Из сравнения теоретического (стехиометрического) и фактического выходов видно, что

«тенденция» прослеживается: максимальный выход — на парафинах, минимальный — на углеводах. Но при этом фактический выход «не дотягивает» до стехиометрического.

Чтобы как-то объяснить эти расхождения, ввели понятие «*энергетический выход*» биомассы. Это понятие базируется на том, что в каждом субстрате заключена энергия, которая зависит от *степени восстановленности* субстрата γ_S, которую легко определить, если известна формула вещества. При этом, как и в биомассе, учитывают основные элементы — углерод, водород, кислород и азот. Обобщенная формула субстрата — $C_mH_nO_pN_q$.

Степень восстановленности зависит от числа так называемых «доступных электронов», или «редоксонов». Принимают (и это легко объяснить исходя из строения атомов и даже просто из понятия химической валентности), что один атом углерода имеет 4 доступных электрона, один атом водорода –1 доступный электрон. Кислород доступных электронов не имеет, а наоборот, как бы забирает на себя 2 электрона, т.е. имеет отрицательное число (–2) доступных электронов. То же и с азотом, который забирает 3 доступных электрона.

Итак, для обобщенной формулы субстрата $C_mH_nO_pN_q$ степень восстановленности рассчитывают по формуле

$$\gamma_S = 4m + n - 2p - 3q. \qquad (5.3)$$

Рассмотрим примеры:

Метан (CH_4)	$\gamma_S = 1 \cdot 4 + 4 = 8$
Гексан (C_6H_{14})	$\gamma_S = 4 \cdot 6 + 14 = 38$
Метанол (CH_3OH)	$\gamma_S = 4 \cdot 4 + 4 - 2 \cdot 1 = 6$
Глюкоза ($C_6H_{12}O_6$)	$\gamma_S = 4 \cdot 6 + 12 - 2 \cdot 6 = 24$
Этанол (C_2H_5OH)	$\gamma_S = 4 \cdot 2 + 6 - 2 \cdot 1 = 12$
н-Алканы $(CH_2)_nH_2$	$\gamma_S = 4 \cdot n + (2n + 2) = 6n+2$
Щавелевая кислота ($H_2C_2O_4$)	$\gamma_S = 4 \cdot 2 + 2 - 2 \cdot 4 = 2$

Степень восстановленности различна прежде всего из-за разного числа углеродных атомов, а также и их соотношения с другими атомами (кислорода, азота, водорода). Для субстратов, как и для биомассы, можно ввести понятие С-моля и пересчитать для таких С-молей степень восстановленности. Это позволит сравнивать между собой различные субстраты.

Биомасса, как и другие вещества, согласно «формуле» может быть оценена по степени восстановленности (обозначение уже не γ_S, а γ_X).

Биомасса ($CH_{1,8}O_{0,5}N_{0,2}$):

$$\gamma_X = 4 \cdot 1 + 1{,}8 - 2 \cdot 0{,}5 - 3 \cdot 0{,}2 = 4{,}2. \qquad (5.4)$$

Легко убедиться, что для диоксида углерода CO_2, воды H_2O и аммиака NH_3 степень восстановленности $\gamma_S = 0$.

В.К. Ерошиным введено понятие *энергетический выход биомассы*, представляющий собой отношение энергии в субстрате к энергии, заключенной в биомассе:

$$\eta = \gamma_S / \gamma_X. \tag{5.5}$$

Величина η показывает, какое количество С-молей биомассы можно получить из одного С-моля субстрата исходя из соотношения энергий.

Рассмотрим примеры:

Метан

$$\eta = \frac{8,0}{4,2} = 1,9 \frac{\text{С - моль биомассы}}{\text{С - моль субстрата}}.$$

Гексан $$\eta = \frac{6,3}{4,2} = 1,5 \frac{\text{С - моль биомассы}}{\text{С - моль субстрата}}.$$

Метанол $$\eta = \frac{6,0}{4,2} = 1,43 \frac{\text{С - моль биомассы}}{\text{С - моль субстрата}}.$$

Глюкоза $$\eta = \frac{4,0}{4,2} = 0,95 \frac{\text{С - моль биомассы}}{\text{С - моль субстрата}}.$$

Этанол $$\eta = \frac{6,0}{4,2} = 1,43 \frac{\text{С - моль биомассы}}{\text{С - моль субстрата}}.$$

н-Алканы $$\eta = \frac{6,0}{4,2} = 1,43 \frac{\text{С - моль биомассы}}{\text{С - моль биомассы}}.$$

Щавелевая кислота $$\eta = \frac{1,0}{4,2} = 0,24 \frac{\text{С - моль биомассы}}{\text{С - моль биомассы}}.$$

В формуле для η выход выражен в С-молях биомассы на С-моль субстрата. От него можно перейти и к обычному массовому выходу:

$$Y_{XS} = \eta \frac{M_X}{M_S}, \tag{5.6}$$

где M_X и M_S — молекулярные массы С-молей биомассы и субстрата соответственно.

Для приведенных примеров получаем:

Метан $$Y_{XS} = 1{,}9\frac{24{,}6}{16} = 2{,}92\frac{\text{г биомассы}}{\text{г субстрата}}.$$

Гексан $$Y_{XS} = 1{,}5\frac{24{,}6}{14{,}3} = 1{,}72\frac{\text{г биомассы}}{\text{г субстрата}}.$$

Метанол $$Y_{XS} = 1{,}43\frac{24{,}6}{32} = 1{,}1\frac{\text{г биомассы}}{\text{г субстрата}}.$$

Глюкоза $$Y_{XS} = 0{,}95\frac{24{,}6}{30} = 0{,}78\frac{\text{г биомассы}}{\text{г субстрата}}.$$

Этанол $$Y_{XS} = 1{,}43\frac{24{,}6}{23} = 1{,}53\frac{\text{г биомассы}}{\text{г субстрата}}.$$

н-Алканы $$Y_{XS} = 1{,}43\frac{24{,}6}{14} = 2{,}51\frac{\text{г биомассы}}{\text{г субстрата}}.$$

Щавелевая кислота $$Y_{XS} = 0{,}24\frac{24{,}6}{45} = 0{,}13\frac{\text{г биомассы}}{\text{г субстрата}}.$$

Если теперь сравнить полученные выходы с фактическими для этих субстратов (см. табл. 5.3), то можно убедиться, что голько для глюкозы энергетический выход биомассы дает значения чуть ниже стехиометрического (0,78 против 0,82), но при этом отличие от фактического (0,5) все еще велико. Для других же субстратов различия стали еще больше. Получается, что биомассы может быть даже больше, чем по стехиометрическим расчетам, а это просто противоречит здравому смыслу. Ведь из одного атома углерода не может получиться два, как это предсказывает, например, энергетический выход по метану.

5.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТЕХИОМЕТРИЧЕСКИХ СООТНОШЕНИЙ В РЕАЛЬНЫХ ПРОЦЕССАХ ФЕРМЕНТАЦИИ

Таким образом, исходные предпосылки «энергетической» теории материального баланса неверны. Они не учитывают того, что в клетке одновременно протекают как бы два процесса.

1. ***Катаболизм*** — преобразование субстратов в элементарные биохимические соединения, в том числе и содержащие энергию (АТФ), которые в дальнейшем используются при биосинтезе. Есть здесь и «отходы» — диоксид углерода, тепло — то, что напрямую не идет для синтеза биомассы и других продуктов.

2. ***Анаболизм*** — построение макромолекулярных соединений (белков, нуклеиновых кислот, компонентов клеточной стенки), а также продуктов метаболизма с использованием универсальных биохимических «кирпичей».

При катаболизме энергия выделяется, при анаболизме — расходуется.

Затраты энергии (да и материи — молекул, атомов) на анаболизм никогда не бывают равны разности энергетических уровней исходных и конечных веществ. Прежде всего это вытекает из второго закона термодинамики (нужна энергия на осуществление биохимических превращений). С другой стороны, биохимические механизмы не идеальны, часть энергии и вещества расходуется на побочные продукты и тепло. Эти потери вещества учитываются реальными стехиометрическими (экономическими) коэффициентами, которые как раз и определяются из эксперимента — сравнением кривых изменения концентрации биомассы, субстрата и продуктов.

При этом общее стехиометрическое соотношение для объединенного процесса, включающего катаболизм и анаболизм, может быть записано в виде:

$$\nu_S\, S + \nu_{O_2}\, [O_2] + \nu_N\, [NH_3] \rightarrow X + \nu_P\, [P] + \nu_{CO_2}\, [CO_2] + \\ + \nu_{H_2O}\, [H_2O]. \qquad (5.7)$$

Здесь биомасса выражена в С-молях, а субстрат — в обычных молях.

Другое соображение, поясняющее различия между стехиометрическим и фактическим выходом биомассы, заключается в следующем. В ходе процесса культивирования наряду с «конструктивными» биохимическими превращениями (образование биомассы и различных продуктов метаболизма) протекают также биохимические процессы, которые в совокупности можно назвать «поддержанием жизнедеятельности» микроорганизмов. При этом происходит синтез клеточных компонентов, которые естественным образом деградируют, и для сохранения жизнеспособности клеток нужна их «репарация». В принципе мы можем так подавать субстрат, чтобы его хватало только на поддержание жизнедеятельности, а новая биомасса микроорганизмов и продукты метаболизма при этом не образовывались. Ясно, что в таких процессах выход биомассы Y_{XS} равен нулю. И он (то, что в табл. 5.3 определено как «фактический» выход) не является постоянным и зависит от условий и скорости роста биомассы. Представленные цифры характеризуют максимально достигнутый выход, но и он далек от стехиометрического. Затраты субстрата на поддержание жизнедеятельности существуют всегда.

Рассмотрим теперь вопрос о нахождении стехиометрических коэффициентов, указанных в объединенном стехиометрическом

уравнении (5.7), если известны из эксперимента фактические данные по потреблению субстрата и образованию продуктов биохимического взаимодействия.

Необходимо знать, по меньшей мере, количество израсходованного субстрата (в реальных мерах — граммы, килограммы и т. д.) и соответствующие данные по количеству образовавшейся биомассы микроорганизмов или продукта метаболизма — соответственно G_S, G_X и G_P (в пересчете на весь аппарат) или для периодического процесса приращения их концентраций — соответственно ΔS, ΔX и ΔP.

Разделив эти величины на молекулярные массы соответственно субстрата, биомассы или продукта, получаем для этих веществ количества г · молей (или кг · молей), которые и являются основой для последующих стехиометрических расчетов.

Первый из этих расчетов — приведение всех количеств к одному С-молю биомассы. Мы уже упоминали, что все стехиометрические коэффициенты можно умножать или делить на одно и то же число. Поэтому условимся находить такие стехиометрические коэффициенты, которые дают стехиометрический коэффициент при биомассе (выраженной в С-молях) равным 1, как это и записано в уравнении (5.7).

Таким образом сразу находим ν_S и ν_P.

Для определения коэффициентов по другим веществам (O_2, CO_2, NH_3 и H_2O) необходимо составить и решить систему уравнений ***элементного баланса***, имея в виду, что каждое вещество (субстрат, биомасса, продукт, вода, кислород, диоксид углерода) может быть описано общей элементной формулой $C_mH_nO_pN_q$.

При этом индексы в формуле субстрата обозначим как m_S, n_S, p_S, q_S, а в формуле продукта — соответственно m_P, n_P, p_P, q_P. Для биомассы соответствующие индексы $m_X = 1$, $n_X = 1{,}8$, $p_X = 0{,}5$, $q_X = 0{,}2$.

Тогда уравнение баланса по *углероду* можно записать следующим образом:

$$\nu_S m_S = 1 + \nu_P m_P + \nu_{CO_2}. \tag{5.8}$$

То же для *водорода:*

$$\nu_S n_S + \nu_{NH_3} \cdot 3 = 1{,}8 + \nu_P n_P + \nu_{H_2O} \cdot 2. \tag{5.9}$$

Уравнение баланса по *кислороду*:

$$\nu_S p_S + \nu_{O_2} \cdot 2 = 0{,}5 + \nu_P p_P + \nu_{CO_2} \cdot 2 + \nu_{H_2O} \cdot 1. \tag{5.10}$$

Уравнение баланса по *азоту*:

$$\nu_S q_S + \nu_{NH_3} = 0{,}2 + \nu_P q_P. \tag{5.11}$$

Решение системы уравнений (5.8) — (5.11) позволит найти все

Баланс по кислороду [см. уравнение (5.10)]:

$$0{,}24 \cdot 11 + 2\nu_{O_2} = 0{,}5 + 7 \cdot 0{,}26 + 2 \cdot 0{,}32 + \nu_{H_2O}, \qquad (5.16)$$

или

$$2\nu_{O_2} - \nu_{H_2O} = 0{,}32. \qquad (5.17)$$

Баланс по азоту [см. уравнение (5.11)]:

$$O + \nu_{NH_3} = 0{,}2 + O,$$

откуда

$$\nu_{NH_3} = 0{,}2. \qquad (5.18)$$

Из (5.15) получаем:

$$\nu_{H_2O} = 1{,}0. \qquad (5.19)$$

Из (5.16) следует:

$$\nu_{O_2} = 0{,}66. \qquad (5.20)$$

Таким образом, стехиометрическое уравнение для данного процесса можно записать следующим образом:

$$0{,}24\,[C_{12}H_{22}O_{11}] + 0{,}66\,[O_2] + 0{,}2\,[NH_3] \rightarrow [CH_{1{,}8}O_{0{,}5}N_{0{,}2}] + \\ + 0{,}32\,[CO_2] + [H_2O]. \qquad (5.21)$$

То, что в итоговом уравнении большинство коэффициентов оказалось меньше единицы, не должно смущать. Главное — полученное уравнение дает четкую количественную связь между участвующими в биохимических превращениях веществами.

5.5. РАСЧЕТ ТЕПЛА, ВЫДЕЛЯЕМОГО В БИОХИМИЧЕСКОМ ПРОЦЕССЕ

В стехиометрическом соотношении (5.7), если произвести расчеты степени восстановленности веществ, указанных слева (субстратов) и справа (продуктов), часто получается все же определенная разница в пользу левой части равенства. Это говорит о том, что энергия в субстрате больше энергии, заключенной в биомассе и продуктах метаболизма. Именно эта разность энергий и преобразуется в тепловыделения, имеющие место в ходе микробиологического процесса.

Вообще в биотехнологии определение величины тепловыделений является важной задачей, которая нужна для расчета биореакторов. Это определение легко выполнить с помощью сравнения суммарной степени восстановленности субстратов, продуктов и

стехиометрические коэффициенты для данного процесса ферментации.

Для примера рассмотрим конкретный процесс производства лимонной кислоты.

Известно, что в процессе ферментации на 1 кг потребленной сахарозы получается 0,6 кг лимонной кислоты и 0,3 кг сухой биомассы.

Рассчитаем стехиометрические коэффициенты уравнения (5.7).

Переведем все величины в г · моли соответствующих веществ.

Молекулярная масса сахарозы ($C_{12}H_{22}O_{11}$) равна 342, лимонной кислоты ($C_6H_8O_7$) — 192, С-моля биомассы — 24,6.

Отсюда получаем в молях:

$$\frac{1000\ \text{г}}{342\ \text{г}}[C_{12}H_{22}O_{11}] \rightarrow \frac{300\ \text{г}}{24,6\ \text{г}}[X] + \frac{600\ \text{г}}{192\ \text{г}}[C_6H_8O_7].$$

$$2,92\,[C_{12}H_{22}O_{11}] \rightarrow 12,2\,[X] + 3,125\,[C_6H_8O_7]. \qquad (5.12)$$

Пересчитаем все стехиометрические коэффициенты на С-моль биомассы, т.е. разделим обе части равенства (5.12) на 12,2. Получаем:

$$0,24\,[C_{12}H_{22}O_{11}] \rightarrow [X] + 0,26\,[C_6H_8O_7]. \qquad (5.13)$$

Иначе говоря, для полного уравнения (5.7) уже имеем $\nu_S = 0,24$ и $\nu_P = 0,26$.

Для нахождения оставшихся коэффициентов записываем систему уравнений элементного баланса для данного процесса.

При этом для субстрата (сахарозы) значения индексов $m_S = 12$, $n_S = 22$, $p_S = 11$, $q_S = 0$.

Для продукта (лимонной кислоты) $m_P = 6$, $n_P = 8$, $p_P = 7$, $q_P = 0$.

Баланс по углероду [см. уравнение (5.8)]:

$$0,24 \cdot 12 = 1 + 0,26 \cdot 6 + \nu_{CO_2},$$

откуда получаем:

$$\nu_{CO_2} = 0,32. \qquad (5.14)$$

Баланс по водороду [см. уравнение (5.9)]:

$$0,24 \cdot 22 + \nu_{NH_3} \cdot 3 = 1,8 + 0,26 \cdot 8 + 2\nu_{H_2O},$$

или

$$2\nu_{H_2O} - 3\nu_{NH_3} = 1,4. \qquad (5.15)$$

образовавшейся биомассы с учетом соответствующих стехиометрических коэффициентов.

Формула для расчета следующая:

$$\Delta H = \left(\sum_{i=1}^{m} \nu_i \gamma_{Si} - \gamma_X - \sum_{j=1}^{n} \nu_j \gamma_{Pj} \right) \cdot 115 \frac{\text{кДж}}{\text{С-моль биомассы}}, \quad (5.22)$$

где ΔH — тепловыделение; ν_i- стехиометрический коэффициент для i-го субстрата; ν_j — стехиометрический коэффициент для j-го продукта; m — общее количество субстратов; n — общее количество продуктов; γ_{Si} — степень восстановленности i-го субстрата; γ_{Pj} — степень восстановленности j-го продукта; γ_X — степень восстановленности биомассы.

Вернемся к примеру, рассмотренному в разделе 5.4, — производству лимонной кислоты, для которого в разделе 5.4 были определены стехиометрические коэффициенты.

Каково тепловыделение в пересчете на С-моль биомассы?

Подставим в формулу (5.22) ранее вычисленные значения ν_S, γ_S, ν_X, ν_P и γ_P:

$$\Delta H = \nu_S \gamma_S - \gamma_X - \nu_P \gamma_P = (0{,}24 \cdot 48 - 4{,}2 - 0{,}26 \cdot 18) \cdot 115 =$$
$$= (11{,}52 - 4{,}2 - 4{,}68) \cdot 115 = 303{,}6 \text{ кДж/С-моль биомассы.}$$

Чтобы получить количество тепловыделений на 1 кг израсходованной сахарозы, нужно учесть соотношение стехиометрических коэффициентов. Из стехиометрического уравнения видно, что на 1 кг сахарозы получено 12,2 С-молей биомассы. Следовательно, тепловыделение составляет:

$$\Delta H = 303{,}6 \cdot 12{,}2 = 3704 \text{ кДж/кг сахарозы.}$$

Обычная же схема расчета тепловыделения, принятая в химии, включает определение теплот сгорания всех входящих в реакцию веществ:

$$\Delta H = \sum_{i=1}^{m} \nu_i \cdot (\Delta H_{Si}) - \Delta H_X - \sum_{j=1}^{n} \nu_j \cdot (\Delta H_{Pj}), \quad (5.23)$$

где ΔH_S, ΔH_X и ΔH_P — теплота сгорания субстратов, биомассы, продуктов, m — общее число субстратов, n — общее число продуктов метаболизма.

Для химических соединений (субстрата, продукта) есть данные по ΔH в справочниках или же можно их определить в «калориметрической бомбе». Для биомассы тоже сделаны такие измерения:

$$\Delta H_{\text{дрожжей}} = 20{,}4 \text{ кДж/г биомассы;} \quad (5.24)$$

$$\Delta H_{\text{бактерий}} = 21{,}0 \text{ кДж/г биомассы.} \quad (5.25)$$

Стоит запомнить также тепло́ты сгорания для протеина (13,5 кДж/г), моносахаров — 15,7 кДж/г, дисахаров — 16,5 кДж/г, глицерина — 18,1 кДж/г. В среднем для биомассы обычно принимают 22,0 кДж/г.

И еще один способ расчета теплового эффекта. Если известно количество кислорода, израсходованное на окисление субстрата, то тепловыделение можно определить по формуле

$$\Delta H = \Delta G_{O_2} \cdot 460 \text{ кДж}, \qquad (5.26)$$

где ΔG_{O_2} — количество израсходованного кислорода, г · моль O_2.

Как известно, в 1 г · моле O_2 содержится 2 г · атома кислорода, следовательно, это соответствует степени восстановленности, а точнее, степени окисленности $\gamma_S = -4$. Отсюда $460 = 4 \cdot 115$, где 115 — коэффициент в формуле (5.22).

В данном примере мы можем определить ΔG_{O_2} из найденных ранее стехиометрических коэффициентов. Интересно рассчитать количество г · молей кислорода, полученное на С-моль биомассы. Оно численно равно стехиометрическому коэффициенту в итоговом уравнении (5.21), т. е. 0,66 г · молей O_2 на 1 г · моль биомассы.

Тогда из формулы (5.26) получаем:

$$\Delta H = 0{,}66 \cdot 460 = 303{,}6 \text{ кДж/С-моль биомассы.}$$

Таким образом, расчет по обеим формулам (5.22) и (5.26) дает одинаковые результаты. Однако использование формулы (5.26) более предпочтительно в случаях, когда легко определяется потребление кислорода культурой.

Вопросы для повторения

1. Объясните обобщенное стехиометрическое уравнение микробиологического процесса по аналогии с химической реакцией.
2. Как определить условную «формулу» биомассы из ее элементного состава?
3. Поясните понятие С-моля биомассы.
4. Приведите формулу Стоутхамера для биомассы. Какова молекулярная масса С-моля?
5. Как рассчитать стехиометрический выход биомассы от используемого углеродного субстрата?
6. Что такое «доступные электроны» в субстратах и в биомассе?
7. Как рассчитать степень восстановленности субстратов, биомассы и продуктов метаболизма?
8. Как рассчитать стехиометрические коэффициенты процесса ферментации, имея количество израсходованного субстрата и образовавшихся продуктов и биомассы?
9. Какова степень восстановленности воды, диоксида углерода, аммиака, метана?
10. Как определить количество тепла, выделившегося в процессе ферментации, зная скорости потребления субстрата и образования продуктов метаболизма и самой биомассы?
11. Как определить интенсивность тепловыделения в процессе ферментации на основании скорости потребления кислорода?

мами не используется. Содержит также аминокислоты и витамины группы В (биотин — до 80 мг/т). В золе много калия, магния, кальция, железа, но мало фосфора. Меласса — продукт сезонный. При хранении могут быть потери сахаров в результате деятельности микроорганизмов.

Кукурузная мука содержит 67—70% крахмала, 10% других углеводов, около 12% белков. Влажность — до 15%, зола — до 0,9%. В золе есть много фосфора, калия, магния.

Пшеничные отруби — отход мукомольного производства, используются в твердофазной ферментации. Содержат 16—20% крахмала, 10—12% белков, 10% клетчатки, 3—4% жиров.

Молочная сыворотка (творожная, подсырная). Содержит до 4—4,7% лактозы, 0,5—1,0% белков, 0,2—0,3% жиров, органические кислоты.

Недостаток — нестабильность при хранении, которого в значительной степени лишены сухая и сгущенная сыворотки.

Свекловичный жом — отход сахарного производства, содержит пектины и целлюлозу — до 22% и до 65% «безэкстрактивных веществ», белки — до 9%.

Гидролизаты древесины. Сама древесина является не очень «вкусным» сырьем для микроорганизмов, но после предварительной обработки — высокотемпературного кислотного гидролиза — превращается в гидролизаты. Целлюлоза и пентозаны гидролизуются до глюкозы и других сахаров. Содержание сахаров зависит от породы древесины и технологии гидролиза и составляет 4—8%. Кроме древесины можно использовать для тех же целей различные целлюлозосодержащие сельскохозяйственные отходы (солому, кукурузные кочерыжки, стебли хлопчатника и т.п.).

Сульфитные щелока — отход целлюлозно-бумажного производства, продукт гидролиза лигнина и гемицеллюлозы, содержит сбраживаемые сахара (до 3,5%).

Гидролизаты торфа — получают после кислотного гидролиза торфа, который содержит полисахариды до 50% от их содержания в древесине. Упаренный гидролизат имеет 25—30% редуцирующих веществ, а также азот и фосфор в доступной для микроорганизмов форме.

Сок растений (коричневый сок) — до 2% сахаров.

Отходы спиртового производства (картофельная или зерновая барда — содержат от 2,0 до 2,9% редуцирующих веществ).

Картофельный сок — содержит до 1% углеводов (крахмала).

Неуглеводные источники углерода.

Углеводороды жидкие — парафины с длиной углеродной цепи C_{10}–C_{27}. Используются в производстве кормовых дрожжей, лимонной кислоты, биопрепаратов — деструкторов нефти.

Углеводородные газы — метан, этан, пропан, бутан — применялись для получения кормового белка и некоторых продуктов переработки биомассы (в том числе феромонов).

Спирты. Этанол используется для выращивания кормовых дрожжей, производства уксусной кислоты и многих других биопродуктов.

Метиловый спирт, хотя и является ядом для человека, очень подходит для культивирования многих видов микроорганизмов — кормового белка и продуктов их переработки (например, убихинонов — средств для лечения сердечно-сосудистых заболеваний).

Уксусная кислота — (синтетическая) иногда используется как источник углерода при получении аминокислот микробиологическим синтезом.

Жиры и масла. В историческом аспекте жиры и масла сначала применяли как средство для предотвращения пенообразования в процессах ферментации.

Например, в производстве тетрациклина долгое время использовали кашалотовый жир, пока международная конвенция не наложила запрет на промысел кашалотов и китов. Для предотвращения вспениваемости стали применять синтетические поверхностно-активные вещества — пеногасители. Тогда и выяснилось, что кашалотовый жир был нужен продуценту тетрациклина и как источник углеродного питания.

Пришлось заменять его свиным жиром (лярдом), растительными маслами. Говяжий и бараний жир, а также пальмовое масло использовать более трудно, так как они при обычной температуре являются твердыми продуктами.

Среди растительных масел в процессах ферментации применяют подсолнечное, соевое, арахисовое, льняное, рапсовое, касторовое, кокосовое масла, иногда даже масло бобов какао.

Надо отметить, что излишнее употребление жиров приводит к трудностям на стадиях выделения и очистки продукта.

Экзотические углеродные субстраты. Довольно медленно используется микроорганизмами *лигнин* — отход гидролизного производства.

В лабораторной практике часто применяют агаризованные среды — на основе *агара* — полисахарида из морских водорослей.

Хитин — покрытие насекомых и морских моллюсков, некоторых грибов — пока без больших успехов пытаются использовать как углеродный компонент питательных сред. Еще меньшие результаты дает использование *каменного угля* и *сланцев* (конечно, с предварительной термохимической обработкой).

6.3. ИСТОЧНИКИ АЗОТНОГО ПИТАНИЯ

Многие микроорганизмы способны утилизировать **источники неорганического азота:**

сульфат аммония (чаще всего);

Глава 6
СЫРЬЕ ДЛЯ ПРОЦЕССОВ ФЕРМЕНТАЦИИ

●

6.1. ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ

Сырье для процессов ферментации прежде всего решает проблему формирования питательных сред, в которых должны содержаться необходимые элементы для построения биомассы микроорганизмов; среда является также средой обитания микроорганизмов.

Мы уже касались вопросов элементного состава биомассы микроорганизмов, главным образом основных элементов, составляющих до 95—96% сухой массы клеток. Это углерод (50%), водород (8%), кислород (20%), азот (14%), фосфор (3%) и сера (1%).

Кроме того, в клетках содержится 3—4% **макроэлементов** — таких, как калий (до 1%), натрий (до 1%), кальций (до 0,5%), магний (до 0,5%) и железо (до 0,2%). Их содержание в биомассе сравнительно велико.

Микроэлементы входят в биомассу в следовых количествах (в целом до 0,3%), в том числе марганец, кобальт, медь, молибден, цинк, бор и др. Повышенные концентрации этих элементов оказывают ингибирующее действие на развитие микроорганизмов, но без их микродоз обойтись нельзя.

Витамины требуются для развития многих микроорганизмов *ауксогетеротрофов* — неспособных синтезировать их самостоятельно. Чаще всего необходим комплекс витаминов группы В — тиамин, никотиновая кислота, пантотеновая кислота, пиридоксин, инозит и биотин (последнего недостает чаще всего). Но количество витаминов требуется довольно малое (тысячные доли миллиграмма в литре среды), они могут находиться в натуральном сырье.

Потребности микроорганизмов в питании разнообразны, они идут от физиологии и являются основой рецептуры сред. Универсальных сред нет.

По физическому состоянию среды могут быть твердые (агар-агар, желатин и т. д.), жидкие и сыпучие (увлажненные отруби, зерно, солома, опилки).

По составу среды могут быть натуральными или синтетическими. *Натуральные* среды включают в себя продукты животного или растительного происхождения, сложные и непостоянные по составу. *Синтетические* среды составляются из определенных

химических соединений, обычно из небольшого числа веществ. Они более дороги и менее продуктивны. В них-то и необходимо вносить макро- и микроэлементы, а также витамины.

Сырье представляет собой имеющиеся в распоряжении конкретные вещества, чистые или комплексные, которые содержат необходимые питательные компоненты. Они должны быть доступными и не очень дорогими и не содержать вредных примесей. Поэтому на каждый вид используемого сырья (в том числе и натурального) должны быть стандарты, определяющие его качество.

Вода — по массе самый значительный вид сырья, хотя и самый дешевый. Например, на 1 т пекарских дрожжей при производстве расходуется 150—180 $м^3$ воды. Многие виды продуктов биотехнологии определяются качеством воды (взять хотя бы пиво, вино). Рассмотрим основные требования к этому виду сырья.

Вода должна быть биологически чистой (не более 100 микроорганизмов в 1 мл воды), бесцветной, без привкуса и запаха, не должна давать осадка. Сухой остаток воды после выпаривания — не более 1 г/л, общая жесткость — не более 7 мг-экв/л. Слишком жесткая вода неблагоприятно влияет на процессы ферментации. По содержанию вредных примесей введены следующие ограничения:

свинец — до 0,1 мг/л;
мышьяк — до 0,05 мг/л;
фтор — до 1,5 мг/л;
цинк — до 5,0 мг/л;
медь — до 3,0 мг/л.

6.2. ИСТОЧНИКИ УГЛЕРОДНОГО ПИТАНИЯ

Углеводы — наиболее часто используемые в процессах ферментации вещества. К ним относятся приведенные ниже соединения.

Глюкоза $C_6H_{12}O_6$; влажность — до 9%, зола — до 0,07%, в том числе железо — не более 0,004%.

Сахароза $C_{12}H_{22}O_{11}$; влажность — до 0,15%, зола — до 0,03%.

Лактоза $C_{12}H_{22}O_{11}$ (получается из молочной сыворотки); лактоза — 92%, влажность — до 3%, зола — до 2%, белок — около 3%, молочная кислота — до 1%.

Крахмал $(CH_2O)_n$. В зависимости от сорта зола 0,35—1,2%.

Гидрол — отход крахмало-паточного производства. Представляет собой густой темный сироп с запахом. Содержит до 50% углеводов, в основном глюкозу, а также органические кислоты. Часть сахаров не сбраживается. Зольность — до 6%.

Меласса — отход производства сахара (упаренная маточная жидкость после отделения кристаллов сахара). Имеет темно-коричневый цвет, плотность 1,35—1,4 г/мл. Содержит 40—55% сахарозы, 0,5—2% инвертного сахара. Имеется 1,1—1,5% азота, причем третья часть его — в форме бетаина, который микроорганиз-

нитрат аммония;
карбамид;
аммиачная вода (используемая одновременно как источник азотного питания и как титрант для поддержания заданной величины pH).

Часто для процессов ферментации в состав среды требуется включать **источники органического азота**, действующим началом которых являются аминокислоты и белки. Сырьем при этом могут быть различные натуральные продукты растительного и животного происхождения. Рассмотрим наиболее распространенные из этих продуктов.

Кукурузный экстракт — отход крахмало-паточного производства, получающийся путем упаривания жидкости от замачивания («настоя») кукурузных зерен («замочная жидкость») с содержанием сухих веществ не ниже 48%. В процессе замачивания происходит ферментативный гидролиз белков кукурузы, вследствие чего около половины азотсодержащих веществ экстракта представляет собой смесь аминокислот, полипептидов и белков. Экстракт — темная вязкая жидкость, содержит 6,4—8% общего азота, не более 24% золы. В золу входят фосфор, калий, магний, причем фосфор — до 5%, частично в связанном состоянии в виде фитина. Имеются также витамины группы В (биотин), ростовые вещества и биостимуляторы. Таким образом, кукурузный экстракт представляет собой хорошую смесь различных источников питания, что предопределило его использование во многих рецептурах сред.

Традиционно кукурузный экстракт используется при биосинтезе пенициллина. И хотя его применение имеет недостатки (например, темный пигмент сохраняется на стадиях очистки и его приходится сорбировать в дальнейшем активированным углем), попытки замены этого источника питания другими обычно приводят к снижению продуктивности процесса ферментации.

Соевая мука получается при размалывании соевого зерна, а также соевого жмыха и шрота, образующихся после извлечения соевого масла. В зависимости от этого получается обезжиренная, необезжиренная и полуобезжиренная мука. Бывает еще дезодорированная (обработанная паром) соевая мука, что позволяет ей храниться в течение года. В недезодорированной муке сохраняются ферменты, в связи с чем срок хранения ее не превышает 1,5—3 месяца.

В соевой муке содержится до 45% протеина и 32% углеводов, так что ее можно использовать и как источник углерода. В состав ее золы (4,5—6,5%) входит калий, кальций и магний, а также довольно много фосфора.

Соевая мука наряду с кукурузным экстрактом является прекрасным источником азотного, углеродного и фосфорного питания.

Недостаток соевых сред — сильная вспениваемость и некоторые трудности выделения продукта из-за наличия твердого осадка.

Выпускают продукт в сельскохозяйственном секторе, где еще

Сульфат цинка	$ZnSO_4$
Цинковый купорос	$ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$
Сульфат меди	$CuSO_4$
Медный купорос	$CuSO_4 \cdot 7\ H_2O$
Сульфат кобальта	$CoSO_4$

Титранты для корректировки pH. *Мел* позволяет стабилизировать величину pH без добавления других титрантов. Обычно используют *мел химически осажденный*, а не природный, особенно в фармацевтической биотехнологии. В качестве титрантов применяют также кислоты и щелочи.

Пеногасители. Используются различные виды жиров, олеиновая кислота, различные модификации поверхностно-активных веществ: пропинол, лапрол и др.

6.5. ВЫБОР СЫРЬЯ ДЛЯ КОНКРЕТНЫХ ПРОЦЕССОВ ФЕРМЕНТАЦИИ

Прежде всего при выборе учитывают эффективность того или иного источника питания, которую проверяют экспериментально при подборе сред. Подбор сред до настоящего времени остается не только наукой, но и искусством.

И, конечно, при выборе сырья учитывается стоимость различных его видов. В качестве примера можно привести сопоставление стоимости различных углеродных источников питания (табл. 6.1).

Таблица 6.1

Сравнительная стоимость углеродных источников питания

Наименование сырья	Содержание углерода, % к глюкозе	Стоимость 1 т глюкозного эквивалента, долл. США
Глюкоза	100	290
Сахароза-сырец	105	133
Сахароза рафиниров.	105	629
Меласса	50	140
Уксусная кислота	100	550
Крахмал	100	65—90
Этанол	130	430
Метанол	94	160

Вопросы для повторения

1. Изложите основные понятия о сырье для технологических процессов и стандартах на него.
2. Каковы требования к воде, используемой для процессов ферментации?
3. Назовите углеводные источники сырья в процессах ферментации.

не очень налажена культура производства. Например, качество соевой муки в ГОСТе определялось по такому показателю, как «хруст на зубах при разжевывании» (в случае, когда в муке имеются механические примеси — песок и т. п.).

Мука семян хлопка содержит 41% протеина и до 29% углеводов. На ее основе путем определенной переработки готовится среда с фирменным названием «Фарма-медиа», имеющая до 59% белков и 24% углеводов. Эта среда используется на Западе для получения многих антибиотиков.

Мука семян льна содержит 36% протеинов и 38% углеводов.

Арахисовая мука — 45% протеина, 5% жира и 23% углеводов.

Рыбная мука содержит до 65% белков и в некоторых случаях используется в качестве компонента сред.

Кровяная мука является чемпионом по содержанию белка — до 80%.

Мясокостная мука содержит до 50% белков.

Сухое молоко обезжиренное содержит лишь 34% белка. Тем не менее молочные белки (казеин, сывороточные белки) в виде гидролизатов часто используются как компоненты питательных сред.

Продукты переработки животного сырья — желатин, белкозин — также содержат органический азот, приемлемый для использования в качестве компонента сред.

Дрожжевые автолизаты, ферментолизаты, гидролизаты в высушенном виде содержат до 52% органического азота, в основном в виде смеси аминокислот.

Мясной и рыбный пептоны используются для лабораторных питательных сред. Полная аналогия супа, бульона или студня. К тому же используются довольно качественные пищевые продукты.

6.4. ДРУГИЕ ВИДЫ СЫРЬЯ

Источники фосфорного питания. Часто упоминавшиеся ранее источники органического азота (например, кукурузный экстракт, соевая мука) являются одновременно и источниками фосфора.

Неорганические источники также содержат азот. Это — аммофос (смесь моно-, ди- и триаммонийфосфата), отдельно МАФ (моноаммонийфосфат) и ДАФ (диаммонийфосфат).

Иногда применяют ортофосфорную кислоту, но обычно это наиболее дорогой источник фосфорного питания.

Макро- и микроэлементы. Используются в основном неорганические соли:

Карбонат калия	K_2CO_3
Сульфат калия	K_2SO_4
Хлорид калия	KCl
Сульфат магния	$MgSO_4$
Сульфат марганца	$MnSO_4$
Сульфат железа	$FeSO_4$
Железный купорос	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$

4. К какому виду сырья относятся гидрол, меласса, кукурузная мука, пшеничные отруби, молочная сыворотка, свекловичный жом, гидролизаты древесины, сульфитные щелока?

5. Расскажите о неуглеводных источниках углеродного сырья в процессах ферментации.

6. Назовите неорганические вещества — источники азотного питания в ферментационных средах.

7. Что такое «органический азот» в ферментационных средах?

8. Назовите основные источники органического азота, используемого в ферментационных средах.

9. Где больше органического азота — в кукурузном экстракте, соевой муке, муке семян хлопка, кровяной муке, сухом молоке, мясо-костной муке или дрожжевых автолизатах?

10. Назовите источники фосфорного питания в процессах ферментации.

11. Перечислите источники микро- и макроэлементов в процессах ферментации.

Глава 7
ОПТИМИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТАЦИОННЫХ СРЕД

●

7.1. ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ

Следует отметить, что даже для одного штамма микроорганизмов могут существовать среды, используемые при решении разных задач:

1) генетических исследований, при обработке штаммов мутагенами;

2) селекции мутантов — полноценные и селективные среды;

3) длительного хранения и пересевов штаммов микроорганизмов;

4) оптимизации продуктивности штамма в колбах;

5) для инокулята и посевного материала (в том числе вегетативного и спорового);

6) оптимизации продуктивности в ферментерах производственного масштаба.

В настоящем разделе мы рассмотрим методику оптимизации ферментационных сред в колбах.

Выбор критерия оптимизации. Применительно к средам в колбах это могут быть:

количество целевого продукта;

производительность по целевому продукту;

выход целевого продукта по субстрату;

минимизация стоимости среды для получения единицы целевого продукта.

Чаще всего критерием оптимальности в колбах служит количество целевого продукта или, проще, его концентрация в конце процесса ферментации (если пренебречь изменением объема среды в результате испарения).

Выбор исходных компонентов среды. Кажется естественным, что при подборе сред в первую очередь следует обратить внимание на химический состав биомассы микроорганизмов и на химический состав внеклеточного продукта, если он является целевым.

Однако такой подход не очень-то продуктивен. Мы уже видели (см. табл. 5.1), что по составу биомассы разных видов микроорганизмов мало различаются. К тому же элементный состав близок у многих субстратов. Лишь в некоторых случаях, когда в клетке наблюдается наличие некого экзотического элемента в заметных количествах (кобальта, например, или серебра), это может служить

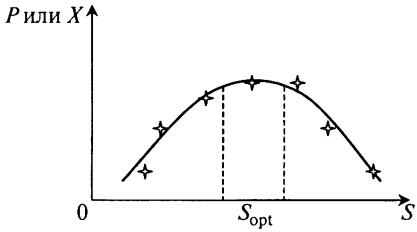


Рис. 7.1. Определение оптимального диапазона концентраций одного компонента среды

указанием на включение этого элемента в состав среды. Чаще всего, однако, удачный выбор исходных компонентов среды — либо случайность, либо интуиция. В первую очередь, конечно, берут компоненты сред, на которых уже выращивался данный микроорганизм или его близкие аналоги.

Основные компоненты среды — источники углерода (и одновременно энергии), азота, фосфора, серы, микроэлементов, ростовых факторов и витаминов для начала роста биомассы. В главе 6 приведен большой выбор натуральных компонентов сред.

Определение соотношения компонентов среды. Даже когда основной выбор сделан и мы уже знаем, какие компоненты будут входить в состав среды, остается еще определить главное: в каком соотношении они будут находиться в среде.

Это соотношение как раз и надо искать при оптимизации состава сред. Рецептуры сред для промышленных штаммов охраняются как большой секрет, и многие микробиологи занимаются их подбором.

Далее рассмотрены методы оптимизации более подробно.

Однофакторные зависимости. Когда в составе среды только один компонент не изучен и необходимо определить его оптимальную концентрацию, достаточно провести серию опытов, в которых исследуемый компонент будет находиться в разных концентрациях.

Проведения опытов с 4—5 разными концентрациями (уровнями) компонента достаточно, чтобы получить представление о характере его влияния (рис. 7.1).

Невооруженным глазом обычно видно, при каких концентрациях процесс идет наилучшим образом. Для большей убедительности эксперимент можно описать тем или иным уравнением, что для однофакторной задачи можно рассматривать скорее как украшение, чем как необходимость.

7.2. ТРАДИЦИОННЫЕ МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ МНОГОФАКТОРНЫХ ЗАВИСИМОСТЕЙ

Если в составе среды изучают не один фактор, а два или более, задача усложняется. Например, для двух факторов нужно уже построить *поверхность отклика*, напоминающую топографическую карту. На этой карте на двух осях координат отложена величина

затем поставить в этих точках эксперименты, то при этом выбирается такое сочетание уровней факторов, которое дает наибольшее значение S_1.

Попробуем оценить, сколько экспериментов нужно поставить при тотальном переборе для обычного числа факторов в средах (5...8). Если количество уровней каждого фактора выбрать 5, а число факторов тоже 5, необходимо $5 \cdot 5 \cdot 5 \cdot 5 \cdot 5 = 3125$ экспериментов. Для числа факторов 8 число экспериментов будет 390625. Если уменьшить число уровней фактора для более грубого изучения, например до 4, то число экспериментов для 8 факторов будет 65536, а для 4 — 256.

Отсюда следует, что метод тотального перебора на прямоугольной сетке требует довольно большого числа экспериментов.

Поскольку время и деньги у исследователя обычно ограничены, применение такой схемы на практике нерационально. Вот если бы был известен аналитический вид функции $P = f(S_1, S_2, ..., S_n)$, то на компьютере такой подход вполне осуществим. Тотальный перебор при хорошем быстродействии там вполне возможен и часто применяется в несложных экстремальных задачах.

Отдельное изучение каждого фактора. Обычно при подборе сред микробиологи применяют исходный «фон» — определенное соотношение уровней факторов (концентраций компонентов) в среде. На этом «фоне» ставят однофакторные эксперименты по каждому из n факторов и получают столько же кривых, сколько изучают факторов. Число уровней, как мы уже говорили, может быть 5—6, так что общее число экспериментов будет $5n$ или $6n$ — значительно меньше, чем 5^n или 6^n. Так, для 5 факторов на 5 уровнях это будет 25 опытов, для 8 факторов на 5 уровнях — 40. Это несоизмеримо меньше, чем при тотальном переборе. Затем находят «локальный» оптимум по каждому фактору (он обычно отличается от уровня фактора в «фоне») и «собирают» как бы оптимальное (квазиоптимальное) значение всех факторов, составленное из этих локальных оптимумов для S_1, S_2, S_3 и т. д. Если в результате величина P дает превышение над «фоном», а еще лучше — над каждым «локальным» оптимумом, микробиологи считают, что нашли оптимальное соотношение компонентов в среде.

Однако для такого заключения не всегда достаточно оснований. Если, например, выход процесса соответствует рассмотренному семейству характеристик, то из него при величине фактора $S_1 = (S_1)_1$, варьируя фактор S_2 на всех 5 уровнях, можно заключить, что оптимальное значение фактора S_2 находится где-то в диапазоне между $S_2 = (S_2)_2 ... (S_2)_3$. Посмотрев же на семейство характеристик в целом (т.е. проведя тотальный перебор), можно убедиться, что оптимальное значение фактора S_2 равно или даже больше $(S_2)_4$, а фактора S_1 — где-то между $(S_1)_3$ и $(S_1)_4$. Это показывает ненадежность выводов в методе отдельного изучения каждого фактора.

факторов S_1 и S_2, а в самом графике проведены контурные *линии равного уровня*, соответствующие одинаковому выходу P — параметру оптимизации (рис. 7.2).

На этом рисунке в качестве примера представлены линии равного уровня для величины выходного показателя — 10, 20, 30 и 40. В точке A с координатами S_{1A} и S_{2A}, например, выход является средним между 30 и 40.

Ясно, что для построения такой «топографической карты» нужно «изрешетить» всю площадь в изучаемом диапазоне S_1 и S_2 опытами. Обычно поступают следующим образом.

Выбирают значение фактора S_1, а затем для этого значения проводят, например, 5 экспериментов, варьируя фактор S_2. Затем берут новое значение S_1 и вновь проводят 5 экспериментов, варьируя S_2. И так повторяют несколько раз, пока не получится 5 уровней фактора S_1, каждый из которых проверен со всеми 5 уровнями фактора S_2.

Это можно было бы отразить в виде семейства характеристик $P(S_2)$ при разных значениях S_1 (рис. 7.3) или наоборот.

Из этого семейства кривых $P = f(S_2)$ можно найти максимальное значение выхода. Оно имеет место в точке с координатами $S_1 = (S_1)_5$ и $S_2 = (S_2)_4$, хотя, если бы мы «изрешетили» поверхность отклика более часто, можно было бы ожидать чуть больших значений в квадрате между $S_1 = (S_1)_4 \ldots (S_1)_5$ и $S_2 = (S_2)_4 \ldots (S_2)_5$. Можно «изрешетить» более часто только этот квадрат и тем самым уточнить оптимум функции $P = f(S_1, S_2)$.

Ясно, что такой подход к изучению оптимума (а он называется *тотальным перебором на прямоугольной сетке*) можно распространить и на большее число изучаемых факторов. Правда, графически результат уже представить невозможно: физически существует только трехмерное пространство. Но «изрешетить» *гиперповерхность* отклика $P = f(S_1, S_2, S_3, \ldots, S_n)$ всегда можно. Если

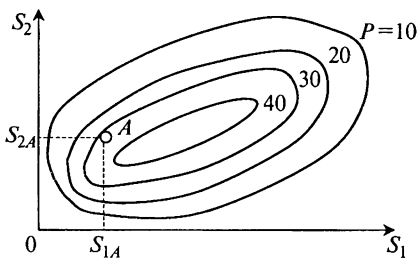


Рис. 7.2. Пример поверхности отклика по концентрации продукта P для двух компонентов среды (S_1 и S_2)

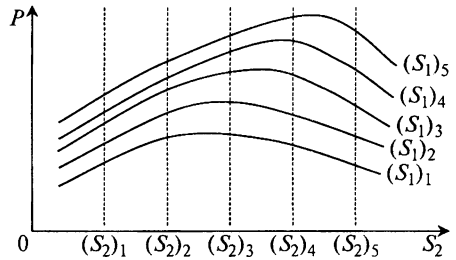


Рис. 7.3. Семейство зависимостей $P(S_2)$ при разных значениях S_1

Отсюда следует также, что такой метод будет вполне приемлем при симметричном виде зависимости $P(S_1, S_2, ..., S_n)$, а это совсем не обязательно имеет место.

Метод Гаусса — Зайделя. Микробиологи называют этот метод «последовательным изучением каждого фактора». Здесь частные зависимости $P(S_1)$, $P(S_2)$, $P(S_n)$ находят не сразу на одном и том же «фоне», а по очереди. Сначала определяют $P(S_1)$, анализируют эту зависимость, находят частный оптимум для фактора S_1, затем меняют «фон», установив в нем значение S_1, равное этому частному оптимуму.

Далее на новом «фоне» изучают влияние фактора S_2, отыскивают его частный оптимум, снова меняют «фон», добавив в него новое значение S_2, и так продолжают с факторами S_3, S_4, ..., S_n, каждый раз (т. е. после каждой серии экспериментов) изменяя «фон».

Закончив изучение последнего фактора, считают задачу выполненной и объявляют «оптимальное» соотношение уровней факторов. И опять не совсем правильно. Ведь вполне могло быть, что на старом «фоне» частный оптимум для фактора S_1 или S_2 мог отличаться от общего оптимума (что мы и видим в том же примере, приведенном на семействе характеристик). Поэтому, строго говоря, метод Гаусса — Зайделя следует повторять и дальше (перейдя к новому циклу изучения факторов), пока частные оптимумы по отдельным факторам не перестанут изменяться от одной серии опытов к другой.

Этот метод имеет и еще один недостаток по сравнению с предыдущими: необходимо *поочередное* выполнение серий экспериментов, так как изменение «фона» требует анализа результатов каждой серии. Между тем при проведении экспериментов в колбах можно единовременно ставить большую серию экспериментов с различным составом среды в разных колбах, и это удобно, так как длительность эксперимента может быть очень велика.

Представим теперь графически метод Гаусса — Зайделя на топографической карте «поверхности отклика» для двух факторов (рис. 7.4).

Из рисунка видно, что для поверхностей отклика типа «хребтов» движение к оптимуму методом Гаусса — Зайделя идет весьма медленно.

Чем больше количество факторов, тем более длителен путь движения к оптимуму и тем больше вероятность ошибки в определении оптимума при отказе от продолжения варьирования факторов.

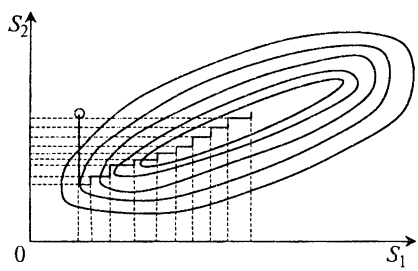


Рис.7.4. Процедура оптимизации по методу Гаусса—Зайделя

7.3. МЕТОД БОКСА — УИЛСОНА

Идея метода. По этому методу вблизи исходной точки («фона») ставится специальным образом спланированная небольшая серия опытов, в которой одновременно варьируются *все* изучаемые факторы, каждый на 2 уровнях (верхнем и нижнем). Результаты этих опытов *математически обрабатывают* для получения приближенного математического описания процесса в этой локальной области. Для двух уровней варьирования факторов можно найти только линейное уравнение, величина факторов входит в первой степени (его иногда называют *уравнением регрессии*). В уравнение могут входить также коэффициенты при S_1S_2, S_2S_3, S_1S_3 и так далее — мультипликативные члены, учитывающие межфакторные взаимодействия.

Уравнение используют для определения направления *крутого восхождения*, при котором возрастает выходной показатель P наиболее круто, по градиенту. Так происходит до тех пор, пока уравнение адекватно процессу. Что когда-нибудь оно станет неадекватным, очевидно, раз процесс имеет оптимум в виде «хребта» или «купола».

Поэтому по методу Бокса — Уилсона в направлении крутого восхождения ставят 5—6 поверочных экспериментов с ожидаемым возрастанием величины P, рассчитанной по уравнению. В какой-то точке при экспериментальной проверке этих опытов происходит снижение параметра оптимизации (вслед за его повышением в предыдущих точках).

Поскольку микробиологические процессы сложны и плохо воспроизводимы, планируемые опыты не приводят сразу к «тотальному» оптимуму. Поэтому в наилучшей достигнутой точке ставят новую серию «изучающих» экспериментов, и цикл крутого восхождения повторяется.

Графически данная процедура представлена на рис. 7.5.

Точки 1, 2, 3 и 4 представляют собой начальную серию исследовательских экспериментов вокруг исходной среды A. Их математический анализ дает уравнение, по которому определяют направление крутого восхождения (градиента), показанное на рисунке сплошной прямой, перпендикулярной к топографическим линиям поверхности отклика. Проверочные точки на прямой не представлены, указана только точка «перевала» при движении в этом направлении (точка 5), после которой значение выходного показателя начинает уменьшаться.

В этой точке проводят новую серию опытов 6, 7, 8 и 9, их обрабатывают, находят новое уравнение и по нему вновь ставят эксперименты в направлении крутого восхождения (прямая между точками 5 и 10). В точке 10 достигнуто новое значение оптимума, уже весьма близкое к «тотальному». Линии крутого восхождения до «перевала» изображены сплошными, после — пунктирными. По-

скольку для метода Гаусса — Зайделя и крутого восхождения на графике показана одна и та же поверхность отклика, из графика отчетливо видно преимущество метода Бокса — Уилсона: всего за два «прохода» удалось получить близкий к оптимальному результат.

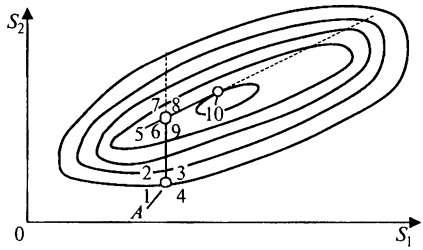


Рис. 7.5. Процедура оптимизации по методу Бокса—Уилсона

Далее рассмотрим технику применения метода Бокса — Уилсона, в которой математические процедуры планирования опытов и расчетов чередуются с определенным образом поставленными экспериментами.

Исследовательская серия опытов. Как уже указывалось, сначала ставится небольшая серия опытов на двух уровнях — верхнем и нижнем. Для каждого фактора эти уровни отличаются от *основного уровня* (исходного уровня «фона») на одну и ту же величину.

Эта величина называется *интервалом варьирования* и обозначается λ. Для разных факторов величина λ может быть разной.

Выбирают интервалы варьирования на основе предварительных данных о процессе, а проще говоря, на основе интуиции исследователя. Не следует брать слишком большие интервалы варьирования: в них может «спрятаться» сам оптимум и исказить всю картину. Лучше выбирать небольшие интервалы, но так, чтобы разница между выходным показателем процесса P для верхнего и нижнего уровней изучаемого фактора была заметной (с учетом возможных погрешностей измерения и вариабельности процесса).

Обычно степень влияния разных факторов на результат процесса различна. Поэтому и интервалы варьирования для разных факторов, как правило, различаются.

Для чего ставится исследовательская серия опытов? Чтобы получить линейное уравнение, связывающее выходной параметр оптимизации P с влияющими факторами:

$$P = b_0 + b_1S_1 + b_2S_2 + b_3S_3 + ... + b_nS_n. \qquad (7.1)$$

В этом уравнении S_1, S_2, S_3, ..., S_n — значение уровней соответствующих факторов; b_1, b_2, b_3, ..., b_n — соответствующие линейные коэффициенты; b_0 — также коэффициент, свободный член.

Итого необходимо найти $(n + 1)$ коэффициентов для процесса с числом факторов n.

Значит, минимальное число опытов в исследовательской серии не может быть меньше $(n + 1)$.

Однако для более точного определения направления крутого восхождения (т. е. более точного математического описания про-

Таблица 7.4

Пример оптимизации 4-компонентной среды по методу Бокса—Уилсона

Наименование этапов работы		Наименование факторов (концентраций компонентов среды)				Конечная концентрация антибиотика, ед/мл					
		S_1, крахмал, %	S_2, $(NH_4)_2SO_4$, %	S_3, кукурузный экстракт, %	S_4, соевая мука, %	P_1	P_2	$\bar{P}$	$(P_j - \bar{P})$	$(P_j - \bar{P})^2$	$\hat{P}$
Основной уровень $(S_i)_0$		6,0	0,6	0,75	2,0	—	—	—	—	—	—
Максимальный уровень (S_i) max		10,0	2,0	2,0	5,0	—	—	—	—	—	—
Минимальный уровень (S_i) min		0,0	0,0	0,0	0,0	—	—	—	—	—	—
Интервал варьирования λ_i		0,7	0,1	0,15	0,3	—	—	—	—	—	—
Матрица планирования эксперимента	№ варианта										
	1	(–)5,3	(–)0,5	(–)0,6	(–)1,7	5600	5800	5700	100	10000	5553
	2	(+)6,7	(–)0,5	(–)0,6	(+)2,3	7200	7000	7100	100	10000	7149
	3	(–)5,3	(+)0,7	(–)0,6	(+)2,3	6750	6450	6600	150	22500	6663
	4	(+)6,7	(+)0,7	(–)0,6	(–)1,7	6030	6210	6120	90	8100	6179
	5	(–)5,3	(–)0,5	(+)0,9	(+)2,3	6930	7030	6970	60	3600	7027
	6	(+)6,7	(–)0,5	(+)0,9	(–)1,7	6740	6400	6520	120	14400	6563
	7	(–)5,3	(+)0,7	(+)0,9	(–)1,7	6080	5940	6040	70	4900	6057
	8	(+)6,7	(+)0,7	(+)0,9	(+)2,3	8000	7600	7800	200	40000	7653
$\Sigma(P - \bar{P})^2$	—	—	—	—	—	—	—	—	—	113500	—

цесса) лучше иметь большее число экспериментов, учитывая погрешности анализов и плохую воспроизводимость микробиологических процессов.

Кроме того, для упрощения расчетов по методу Бокса—Уилсона опыты ставят не при произвольным образом измененных значениях уровней разных факторов, а по так называемым *ортогональным матрицам*.

В этих матрицах (а проще, перечне вариантов, взятых в данной исследовательской серии опытов) из всех возможных 2^n вариантов опытов, когда n факторов варьируется на 2 уровнях, выбрано небольшое количество вариантов со следующими свойствами:

1) в каждой серии количество вариантов опытов с верхним уровнем *каждого фактора* равно количеству вариантов с нижним уровнем того же фактора;

2) верхний уровень *любого фактора* сочетается одинаковое число раз и с верхними, и с нижними уровнями *всех остальных факторов*, он как бы проверяется на усредненном фоне, в котором влияние уровней остальных факторов нивелируется. Это же положение справедливо и для нижних уровней.

Такие ортогональные матрицы обязательно имеют число вариантов планирования, *кратное четырем* (4, 8, 12, 16, 20, 24, 32 и т. д.).

Планы ортогональных матриц разработаны для различного числа факторов n и могут включать разное число вариантов планирования. Практически в исследовательских сериях стараются уменьшить число вариантов опытов. Для этого целесообразно выбрать ближайшую матрицу с числом вариантов бо́льшим, чем $(n + 2)$.

Планы экспериментов имеются в различных справочниках и руководствах.

Для $n = 2$ это, очевидно, полный факторный эксперимент, где взяты все возможные сочетания нижнего и верхнего уровней двух факторов (табл. 7.1.)

Таблица 7.1

Матрица планирования для 2 факторов на 2 уровнях

№ варианта	S_1	S_2
1	–	–
2	+	–
3	–	+
4	+	+

Матрица планирования для 6 факторов на 2 уровнях (табл. 7.2), состоящая из 8 экспериментов, может быть использована также для 3 факторов (это — полный факторный эксперимент), для 4 и для 5 факторов (вычеркивая за ненадобностью 1, 2 или 3 столбца из этой матрицы).

Таблица 7.2

Матрица планирования для 6 факторов на 2 уровнях

№ вариантов	S_1	S_2	S_3	S_4	S_5	S_6
1	–	–	–	–	–	–
2	+	–	–	+	+	–
3	–	+	–	+	–	+
4	+	+	–	–	+	+
5	–	–	+	+	+	+
6	+	–	+	–	–	+
7	–	+	+	–	+	–
8	+	+	+	+	–	–

Аналогичным образом может быть использована также матрица для 8 факторов на 2 уровнях из 12 опытов (табл. 7.3).

Таблица 7.3

Матрица планирования для 8 факторов на 2 уровнях

№ варианта	S_1	S_2	S_3	S_4	S_5	S_6	S_2	S_8
1	–	–	–	–	–	–	–	–
2	–	–	+	+	–	+	+	–
3	+	–	–	+	+	–	+	–
4	+	–	–	–	+	+	+	+
5	–	+	–	–	+	+	–	–
6	+	–	+	–	–	+	–	+
7	+	+	–	+	–	–	–	+
8	+	+	+	–	–	–	+	–
9	–	–	+	+	+	–	–	+
10	–	+	–	+	–	+	+	+
11	–	+	+	–	+	–	+	+
12	+	+	+	+	+	+	–	–

Обычно при планировании эксперимента редко варьируют число факторов больше 8. Поэтому и в исследовательских матрицах редко используют число опытов больше 12 или в крайнем случае 16.

После выбора матрицы планирования, числа варьируемых факторов и интервалов планирования можно переходить от условных обозначений матриц, выраженных чередованием знаков (–) и (+), к их физическому наполнению реальными значениями концентраций компонентов среды, которые предстоит проверять в опытах при оптимизации состава среды. Все результаты удобно записывать в сводную табл. 7.4, которую мы и будем заполнять по мере объяснений.

Наименование этапов работы		Наименование факторов (концентраций компонентов среды)				Конечная концентрация антибиотика, ед/мл					
		S_1, крахмал, %	S_2, $(NH_4)_2SO_4$, %	S_3, кукурузный экстракт, %	S_4, соевая мука, %	P_1	P_2	$\bar{P}$	$(Pj - \bar{P})$	$(P_j - \bar{P})^2$	$\hat{P}$
Коэффициенты регрессии b_i		+283	+30	+222	+515	($b_0 = 6603$)			—	—	—
Произведение $b_i\lambda_i$		+198	+3	+33	+155	$\Sigma\Sigma(P_j - \bar{P})^2 = 2 \cdot 113500 = 227000$					
Запас Δ_i		4,0	1,4	1,25	3,0	$\Sigma(\bar{P} - \hat{P})^2 = 58258$					
Критичность $\lvert\Delta_i/(b_i\lambda_i)\rvert$		0,02	0,47	0,038	0,019						
Шаг ΔS_i		+0,64	–	+0,11	+0,5	Расч. знач. $\hat{P}$	Экспер. знач. P	—	—	—	—
Опыты крутого восхождения	9	6,6	0,6	0,86	2,5	7879	7140	—	—	—	—
	10	7,3	0,6	0,97	3,0	9155	7630	—	—	—	—
	11	7,9	0,6	1,08	3,5	10430	8350	—	—	—	—
	12	8,6	0,6	1,19	4,0	11706	8510	—	—	—	—
	13	9,2	0,6	1,30	4,5	12982	6220	—	—	—	—

7.4. МАТЕМАТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕДУРЫ В МЕТОДЕ БОКСА—УИЛСОНА

Мы уже говорили, что основной уровень («фон») и интервалы варьирования определяются интуицией исследователя. Точно так же определяется минимальный и максимальный уровни фактора, при которых исследователь допускает протекание процесса. Они понадобятся в дальнейшем при расчете программы крутого восхождения.

Итак, необходимо найти физические значения верхнего и нижнего уровней факторов. Для этого к основному уровню нужно прибавить интервал варьирования — для верхнего уровня или вычесть его — для нижнего уровня.

После заполнения матрицы для всех факторов становится ясно, какими должны быть варианты сред в исследовательской серии опытов. По ним надо готовить среды.

Разумеется, кроме варьируемых факторов в составе среды могут быть факторы, по которым все известно и которые нет смысла специально искать. Их значение одинаково для всех вариантов среды. Надо не забывать при приготовлении сред добавлять и эти постоянные для всех сред компоненты, хотя в матрице планирования они и не указаны. Забывчивым рекомендуем расширить матрицу и поместить в специальных столбцах значения уровней этих постоянных факторов.

Постановка эксперимента. В микробиологических исследованиях принято для надежности повторять опыты, зачастую и не по одному разу. Это касается и опытов с планированием эксперимента при подборе сред.

Однако необходимо отметить, что в данных опытах есть одна особенность. Нас в общем-то не очень интересуют конкретные цифры для каждой отдельной среды. *Вся серия в целом* служит одной задаче: найти более точно описание всей области эксперимента уравнением, а с ним — и более точное направление движения к оптимуму. Здесь как бы каждая точка матрицы помогает другой и все они дают *совокупный результат*. Это позволяет снизить требования к повторению опытов; обычно бывает достаточно для каждой среды всего двух повторений.

Результаты эксперимента (измеренные после проведения опыта) записывают в столбцы для выходного показателя P_1 и P_2 (два повторения), имеется также столбец для среднего значения величины P в каждой строчке (т. е. для каждой отдельной среды) — $\overline{P}$.

Расчет коэффициентов уравнения регрессии. Благодаря ортогональности матрицы планирования расчет очень прост.

Свободный член уравнения b_0 находится просто как среднее из

значений P для всех N вариантов матрицы:

$$b_0 = \frac{\sum_{u=1}^{N} \bar{P}_u}{N}, \tag{7.2}$$

где $\bar{P}_u$ — среднее значение величины P для всех повторений для u-го варианта матрицы.

Коэффициент регрессии i-го фактора определяется как разность сумм выходов $\bar{P}_u$, в которых фактор S_i находился со знаком (+), и выходов $\bar{P}_u$, где фактор S_i находился со знаком (–), деленная на число вариантов в матрице планирования N:

$$b_1 = \frac{\sum_{u=1}^{N} \left(\bar{P}_u S_{iu+}\right) - \sum_{u=1}^{N} \left(\bar{P}_u S_{iu-}\right)}{N}. \tag{7.3}$$

Если принять кодированные значения факторов X_i, т.е. S_{iu}, как (+1) для верхнего уровня и (–1) для нижнего, то получаем:

$$b_i = \frac{\sum_{u=1}^{N} \left(\bar{P}_u S_{iu}\right)}{N}. \tag{7.4}$$

В этой формуле знаки получаются сами собой, так как вычисляется алгебраическая сумма.

Например, для фактора S_2 в таблице коэффициент регрессии вычисляют следующим образом:

$$b_2 = \frac{(-1)\cdot 5700 + (-1)\cdot 7100 + 1\cdot 6600 + 1\cdot 6120 + (-1)\cdot 6970}{8} +$$

$$+ \frac{(-1)\cdot 6520 + 1\cdot 6040 + 1\cdot 7800}{8} = +30.$$

Рассчитанные таким образом коэффициенты имеют разные знаки. Знак (+) означает, что при увеличении данного фактора происходит возрастание параметра оптимизации P, знак (–) — наоборот, уменьшение P.

Чем больше коэффициент регрессии, тем больше он влияет на результат процесса.

Все коэффициенты регрессии записываем в отдельную строку. На основе этих коэффициентов можно записать и уравнение

$$\bar{P} = 6603 + 283 S_1 + 30 S_2 + 222 S_3 + 515 S_4$$

Надо отметить, что эти коэффициенты найдены при условии, что факторы выражены в масштабе кодированных коэффициен-

Уровень воспроизводимости процесса характеризуется *дисперсией*. Для определения дисперсии воспроизводимости существуют два способа.

Первый способ — многократное повторение опытов для одного и того же варианта (среды). В этом случае имеем ряд значений P, их количество обозначим γ, оно не должно быть меньше 8—10. Нужно найти среднюю величину $\bar{P}$ для всех γ опытов, все отклонения от среднего $(P-\bar{P})$, квадраты этих отклонений и сумму квадратов $\sum_{j=1}^{\gamma}\left(P_j-\bar{P}\right)^2$ для всех γ повторений.

Дисперсию воспроизводимости определяют по формуле:

$$\sigma^2=\frac{\sum_{j=1}^{\gamma}\left(P_j-\bar{P}\right)^2}{\gamma-1}. \tag{7.9}$$

Это не среднеквадратичное отклонение, а именно дисперсия воспроизводимости каждого отдельного измерения.

Интересно, что средняя величина $\bar{P}$ колеблется значительно меньше, чем каждое отдельное измерение. Если, например, выполнить несколько серий опытов на одной и той же среде (в каждой серии число опытов γ), затем для каждой серии рассчитать свою среднюю величину $\bar{P}$, а потом посмотреть, какова будет дисперсия воспроизводимости для этих *средних значений*, то получим:

$$\sigma_{\bar{P}}^2=\sigma^2/\gamma. \tag{7.10}$$

Второй способ — расчет дисперсии процесса по данным повторных экспериментов матрицы планирования. Он более удобен при планировании эксперимента, так как повторения в каждом варианте матрицы предусмотрены. Если γ — число повторений в каждом варианте среды, а N — общее число вариантов сред в матрице, то дисперсию воспроизводимости *единичного значения* находят по формуле

$$\sigma^2=\frac{\sum_{u=1}^{N}\sum_{j=1}^{\gamma}\left(P_j-\bar{P}\right)^2}{(\gamma-1)\,N}. \tag{7.11}$$

Надежность вычисления дисперсии воспроизводимости определяется количеством «лишних» опытов, необходимых для нахождения дисперсии (если $\gamma=1$, то дисперсию воспроизводимости по любой из формул найти невозможно). Это количество «лишних» опытов называют *числом степеней свободы f*. Для первого способа

тов. Чтобы перейти к натуральным переменным, нужно подставить выражение для кодированных факторов:

$$S_i = \frac{\tilde{S}_i - \tilde{S}_{0i}}{\lambda_i}, \qquad (7.5)$$

где $\tilde{S}_i$ и $\tilde{S}_{0i}$ — натуральные значения уровня i-го фактора в данном опыте и основного уровня этого фактора; λ_i — интервал варьирования i-го фактора в натуральных величинах (в кодированных величинах это 1).

Для расчета программы крутого восхождения используют коэффициенты регрессии в натуральных величинах ($b_i \lambda_i$). Запишем строчку этих произведений для всех факторов.

Определение запаса для движения в направлении крутого восхождения. При определении программы крутого восхождения от основного уровня необходимо знать для каждого фактора запас Δ_i в сторону движения [для коэффициентов регрессии со знаком (+) — в сторону увеличения, со знаком (–) — в сторону уменьшения]:

$$\Delta_i = S_{i\max} - S_{0i}, \text{ если } b_i > 0 \text{ или } S_{0i} - S_{i\min}, \text{ если } b_i < 0. \qquad (7.6)$$

Отдельная строчка для этого показателя записана в табл. 7.4.

Определение вспомогательного показателя «критичность». Этот показатель представляет собой модуль отношения запаса Δ_i и произведения $b_i \lambda_i$ и физически выражает в сравнительном аспекте, сколько сможет уместиться в «запасе» шагов в направлении крутого восхождения для разных факторов с учетом их степени влияния на результат процесса. Чем ниже значение показателя критичности для фактора, тем меньшее (по сравнению с другими) число шагов уместится в «запасе» для этого фактора.

Выбор шага крутого восхождения. Обычно крутое восхождение проводится путем равномерного пошагового приращения в каждом последующем опыте величины уровня фактора. При этом для одного из факторов — наиболее критичного — величина приращения (шага) выбирается, а для всех остальных — рассчитывается так, чтобы их значения были пропорциональны произведениям $b_i \lambda_i$. При этом надо учитывать и знак приращения: для некоторых факторов с каждым новым шагом необходимо величину фактора увеличивать, для других — снижать, чтобы получить максимально крутое возрастание параметра оптимизации.

Обычно выбирают относительно немного шагов в направлении крутого восхождения: 5—8, не более. По наиболее критичному фактору выбранное количество шагов m позволяет определить и величину шага ΔS_i:

$$\Delta S_б = \frac{\Delta_i}{m}. \qquad (7.7)$$

Здесь $\Delta S_б$ — шаг базового фактора.

оно равно $(\gamma - 1)$, для второго — $N(\gamma - 1)$. Эта величина является важным статистическим показателем и будет использована в дальнейшем.

Необходимо отметить, что для надежного определения дисперсии воспроизводимости процесса число степеней свободы f должно быть не менее 5—8.

Чем больше дисперсия, тем хуже воспроизводимость процесса. Корень квадратный из дисперсии воспроизводимости процесса называют *стандартным отклонением*, или *стандартной ошибкой*.

И последнее замечание по второму способу определения дисперсии воспроизводимости. Очевидно, что в разных вариантах матрицы планирования величина выхода P может быть различной: одна среда плохая, другая хорошая. А разброс данных мы принимаем как бы одинаковым (раз все квадраты отклонений для разных сред мы объединяем и находим по существу *усредненное значение* дисперсии воспроизводимости). Но ведь и уравнение мы ищем *усредненное* для всего изучаемого диапазона. Так что такое допущение вполне приемлемо.

В табл. 7.4 мы для определения дисперсии воспроизводимости добавили поэтому столбцы $(P_u - \overline{P})$ и $(P_u - \overline{P})^2$, из которых находится сумма квадратов отклонений и дисперсия.

Определение значимости коэффициентов регрессии. Уровень возможных случайных колебаний коэффициентов регрессии называется *доверительным интервалом*, обозначается буквой ε и его вычисляют по формуле

$$\varepsilon = t\sqrt{\frac{\sigma^2}{N\gamma}} = t\sqrt{\frac{\sum\sum\left(P_u - \overline{P}\right)^2}{(\gamma-1)\ N^2\gamma}}. \qquad (7.12)$$

В этой формуле появляется новый коэффициент t — критерий Стьюдента, определяемый по таблицам. Для надежности оценки до 95% критерий Стьюдента зависит только от числа степеней свободы f, при которых находили дисперсию воспроизводимости.

Ниже представлены значения критерия Стьюдента для наиболее часто встречающихся значений f при $P = 0{,}95$:

f	t	f	t
1	12,71	10	2,23
2	4,30	12	2,18
3	3,18	16	2,12
4	2,78	20	2,09
5	2,57	30	2,04
6	2,45	60	2,00
7	2,37	100	1,98
8	2,31		

Из приведенных данных следует, что вначале критерий t резко

фактора S_2 с коэффициентом b_2:

$$\hat{P} = b_0 + b_1 - b_2 + b_3 - b_4 = 6593.$$

В табл. 7.4 дан столбец рассчитанных значений $\hat{P}$. Можно добавить еще столбец разностей $(\hat{P} - \overline{P})$, а также столбец квадратов этих разностей $(\hat{P} - \overline{P})^2$. Эти столбцы в таблице отсутствуют, но итог вычислений — сумма квадратов $\Sigma(\hat{P} - \overline{P})^2$ для всех вариантов сред — приведен в нижней части таблицы.

Дисперсия адекватности определяется по формуле

$$\sigma_a^2 = \frac{\Sigma\left(\overline{P}_u - \hat{P}_u\right)^2}{N - n - 1}, \qquad (7.13)$$

где n — число факторов в уравнении; N — число вариантов опытов (условий), по которым определяется дисперсия адекватности; u — номер варианта среды, к которому относятся $\overline{P}$ и $\hat{P}$.

Знаменатель этой дроби представляет собой *число степеней свободы* f_a дисперсии адекватности

$$f_a = N - n - 1, \qquad (7.14)$$

т.е. количество «лишних» опытов, имеющихся в плане сверх минимально необходимых $(n + 1)$ — по числу коэффициентов в уравнении. В данном случае $f_a = 3$ (для примера в таблице).

Степень адекватности математического описания оценивают по критерию Фишера F, который вычисляют по формуле

$$F = \sigma_a^2 \gamma / \sigma_P^2.$$

В этом уравнении множитель γ в числителе связан с тем, что дисперсия воспроизводимости σ_a^2 определяется не для единичного измерения, а для среднего из γ повторений.

Чтобы найти адекватность уравнения, необходимо критерий Фишера сравнить с табличным $F_т$, имеющимся в справочниках по статистике, также для надежности оценки 95%.

Уравнение считается адекватным, если $F < F_т$, и наоборот.

$F_т$ в таблице определяют исходя из двух видов степеней свободы: f_p — для воспроизводимости самого процесса и f_a — для дисперсии адекватности. Искомая величина находится на пересечении столбца для f_a и строки для f_p. Естественно, что дисперсия адекватности σ_a^2 должна быть, как правило, больше дисперсии

Обычно эту величину округляют. Надо отметить, что в отличие от коэффициентов регрессии шаг ΔS_i определен уже в натуральных величинах, так что его можно сразу прибавлять (или отнимать) к исходным уровням факторов.

Запишем строчку для вычисленных значений ΔS_i в нашем примере.

Критичным оказался фактор 4, для него выбрано число шагов, равное 6, и шаг оказался равным $\frac{(5{,}0-2{,}0)}{6}=0{,}5$.

Пропорционально произведениям $b_i\lambda_i$ найден шаг ΔS_i для факторов S_i:

$$\Delta S_i=\frac{\Delta S_б}{(b\lambda)_б}(b\lambda)_i; \tag{7.8}$$

$$\Delta S_1=\Delta S_4\frac{b_i\lambda_i}{b_4\lambda_4}=0{,}5\frac{198}{155}=0{,}64;$$

$$\Delta S_3=\Delta S_4\frac{b_3\lambda_3}{b_4\lambda_4}=0{,}5\frac{33}{155}=0{,}11.$$

Для фактора S_2 в табл. 7.4 вместо ΔS_2 проставлен прочерк. Это связано с тем, что по результатам анализа установлено, что данный фактор не оказывает существенного влияния на результат процесса, а потому его значение пока что нет смысла менять. Но как определить, что тот или иной фактор является значимым или незначимым? Для этого в планировании эксперимента предусмотрена специальная процедура.

7.5. СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Дисперсия воспроизводимости процесса. В биологических процессах, как нигде, результат процесса обычно неоднозначен. Существует какой-то уровень колебаний, возможных по случайным причинам. Природа этих колебаний (источников неоднородности) может быть различной. Это и ошибки в определении результата, и различия в значении факторов при проведении эксперимента, и неточности приготовления сред, и вообще присущая биологическим объектам неоднородность.

А поскольку коэффициенты регрессии определяют по значениям выходного показателя, то и для них есть какой-то уровень случайных изменений, который и следует найти с помощью статистической обработки.

воспроизводимости $\sigma_{\bar{P}}^2 = \sigma_P^2/\gamma$, но не больше ее произведения на критерий Фишера.

Строго говоря, лишь при адекватности линейного уравнения принимают решение о крутом восхождении.

7.6. ЗАКЛЮЧИТЕЛЬНЫЕ ЭТАПЫ ОПТИМИЗАЦИИ СРЕДЫ

Расчет программы крутого восхождения. После скучных, но необходимых расчетов значимости коэффициентов и адекватности уравнения в целом вернемся к главной задаче — расчету программы крутого восхождения.

Для данного примера рассчитываем условия для 6 шагов крутого восхождения, т. е. 6 новых сред.

На каждом шаге к предыдущему уровню фактора (начиная от исходного уровня — центра планирования) прибавляется или от него отнимается рассчитанное значение шага. По наиболее критичному фактору последний шаг будет совпадать с максимальным или минимальным его уровнем, по другим факторам — несколько не доходить до них. Теперь можно составлять 6 сред крутого восхождения и воспроизводить процесс с этими рассчитанными средами. Здесь важно не забыть, что для факторов с отрицательным значением коэффициента регрессии при каждом шаге *отнимается*, а не прибавляется величина рассчитанного ΔS_i.

Анализ результатов крутого восхождения. На основании намеченной программы крутого восхождения можно рассчитать ожидаемые результаты выхода при сохранении адекватности описывающего уравнения. Для этого сначала нужно все значения уровней факторов пересчитать в кодированные

$$S_i = \frac{\tilde{S}_i - \tilde{S}_{i0}}{\lambda_i}, \qquad (7.15)$$

а затем рассчитать величину $\hat{P}$ аналогично тому, как это делалось для опытов в исследовательской матрице, подставив вместо кодированных значений S_i (−1) и (+1) значения, вычисленные по формуле (7.15). Например, для опыта 11 ожидаемое (расчетное) значение P составит:

$$\hat{P} = b_0 + b_1 \frac{7{,}9-6{,}0}{0{,}7} + b_3 \frac{1{,}08-0{,}75}{0{,}15} + b_4 \frac{3{,}5-2{,}0}{0{,}3} =$$

$$= 6603 + 283 \cdot 2{,}7 + 222 \cdot 2{,}2 + 515 \cdot 5 = 1043.$$

В специальном столбце табл. 7.4 приведены результаты расчетных значений выхода в программе крутого восхождения.

Далее следует поставить опыты с рассчитанными значениями факторов.

В колонке рядом с расчетными данными приведены экспериментальные. Очевидно, что столь высоких значений выхода, как ожидали, мы не получаем. Более того, рост выходного показателя идет не все время — после 4-го шага (12-го опыта) начинается даже падение выхода. Но это не должно смущать. Мы ведь и не рассчитывали на то, что уравнение идеально описывает всю область варьирования факторов. Вполне возможно, что линейное приближение недостаточно. Но направление движения к оптимуму найдено. Более того, за один проход результат увеличен с 6603 (среднее по матрице планирования) до 8510. Далее нужно поставить новую матрицу планирования с центром в новой точке и наметить программу крутого восхождения.

Обычно уже за один цикл исследовательской матрицы и крутого восхождения получается довольно заметное увеличение выхода. Но в принципе расчет по этому методу необходимо повторять до тех пор, пока линейное уравнение не станет неадекватным. В этом случае надо использовать другие методы, описывающие процесс уже *уравнением второго порядка*:

$$P = b_0 + \sum_{i=1}^{n} (b_i S_i) + \sum_{i,j=1}^{n} (b_{ij} S_i S_j) + \sum_{i=1}^{n} (b_{ii} S_i^2). \qquad (7.16)$$

Здесь кроме линейных членов $b_i S_i$ появляются еще и квадратичные $b_{ii} S_i^2$, а самое главное — еще и так называемые «коэффициенты взаимодействия», которые учитывают взаимовлияние факторов.

Для таких уравнений существуют и специальные планы эксперимента, и специальные методы оптимизации.

7.7. МНОГОУРОВНЕВЫЕ ПЛАНЫ ЭКСПЕРИМЕНТА

Рассмотрим еще один метод математического описания при оптимизации подбора сред.

Этим методом является *аддитивно-решетчатое описание* процесса.

В этом случае объект описывается *аддитивно-нелинейным решетчатым уравнением*

$$P = b_0 + f_1[S_1] + f_2[S_2] + \ldots + f_n[S_n]. \qquad (7.17)$$

уменьшается с возрастанием f, а затем его значение стабилизируется.

Доверительный интервал ε имеет одно и то же значение для всех коэффициентов b_i (в кодированном виде). Сравнение коэффициента регрессии с доверительным интервалом и позволяет сделать вывод о его значимости. Все коэффициенты b_i, значения которых ниже доверительного интервала, незначимы. Их можно считать нулевыми. Наоборот, если величина коэффициента больше ε, он значим. При этом, очевидно, имеется в виду *модуль* коэффициента: отрицательные коэффициенты регрессии тоже значимы, если они по модулю превосходят ε.

Незначимость коэффициентов может быть вызвана различными причинами:

1) взяты слишком малые интервалы варьирования фактора;

2) плохая воспроизводимость процесса — все различия в выходе нивелируются ошибкой опыта;

3) данный фактор находится на уровне, близком к оптимальному;

4) данный фактор не влияет на процесс вообще, по крайней мере в изученной области.

При незначимости каких-то коэффициентов можно увеличить интервалы варьирования по незначимым факторам и повторить эксперимент при новых условиях. А можно не обращать на них внимания, провести крутое восхождение по остальным факторам, и уже в новой матрице изменить интервалы варьирования незначимого фактора.

Так и сделано в данном примере: для незначимого коэффициента при S_2 сохранен уровень фактора, имевший место в основной среде (0,6 %).

Адекватность математического описания процесса. Кроме оценки значимости коэффициентов в процедуре статистического анализа предусмотрена оценка адекватности полученного математического описания в целом. Для этого сначала находят *дисперсию адекватности*, которая характеризует отклонение рассчитанных по уравнению значений выходного показателя $\hat{P}$ от найденного в эксперименте $\overline{P}$.

Расчетные значения для каждого варианта матрицы можно найти, используя кодированные значения уровней фактора («+» или «–») и соответствующие коэффициенты регрессии.

Например, для варианта 6 (см. табл. 7.4) величину $\hat{P}$ можно определить так:

$$\hat{P} = b_0 + b_1 - b_2 + b_3 - b_4 =$$

$$= 6603 + 283 - 30 + 222 - 515 = 6563.$$

Можно найти эту величину $\hat{P}$ и для уравнения без незначимого

Аддитивное — значит состоящее из суммы членов, каждый из которых зависит только от одного из факторов. Принятое в методе Бокса—Уилсона линейное уравнение регрессии (7.1) тоже было аддитивным, только значения каждой функции были линейными:

$$\begin{aligned} f_1(S_1) &= b_1 S_1; \\ &\cdots\cdots\cdots \\ f_i(S_i) &= b_i S_i. \end{aligned} \qquad (7.18)$$

Здесь же функции могут быть и нелинейными, например:

$$f_i(S_i) = b_i S_i + b_{ii} S_i^2 + b_{iii} S_i^3 + \ldots \qquad (7.19)$$

Фактически не обязательно эту зависимость $f_i(S_i)$ описывать каким-то уравнением. Это сразу сужает возможности описания процесса.

Но можно, как это часто делается, описывать зависимость не уравнением, а значениями функции в заданной точке.

На рис. 7.6 представлен пример такой зависимости.

Здесь значения функции $f[S_i]$ известны лишь для 6 заранее заданных уровней данного фактора, причем безразлично, какие это уровни и каковы расстояния между ними. Важно только, чтобы они перекрывали интересующий исследователя диапазон изменения факторов и были расположены относительно равномерно внутри этого диапазона.

Таким образом, каждая из составляющих функций $f_i[S_i]$ является решетчатой, т. е.

$$f_i[S_i] = \begin{cases} b_{i1} & \text{при} \quad S_i = S_{i1}; \\ b_{i2} & \text{при} \quad S_i = S_{i2}; \\ \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots \\ b_{ik} & \text{при} \quad S_i = S_{ik}. \end{cases} \qquad (7.20)$$

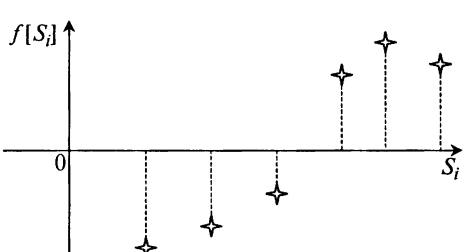


Рис. 7.6. Пример решетчатой функции одного фактора

Чтобы получить с наименьшим числом опытов указанные зависимости и упростить вычисления, целесообразно использовать *ортогональные* матрицы планирования уже не на 2, а на 3, 4, 5 уровнях в соответствии с выбранной разбивкой рабочего диапазона для всех факторов.

вень, а цифра 4 — наибольший. Их можно задавать произвольно, важно только потом знать соответствие.

Если требуется изучить меньшее число факторов на том же числе уровней, то в матрице можно отбросить «лишние» столбцы.

Переход от кодированных обозначений уровней к натуральным переменным (концентрациям компонентов среды) проводят аналогично методу Бокса—Уилсона. При этом исследователь принимает значения уровней S_{i1}, S_{i2}, ..., S_{ik} для каждого фактора.

Далее опыты ставят с повторениями, аналогичным образом находится среднее значение выхода для каждого варианта среды.

Величина эффектов решетчатого описания (b_{ik}) и значение b_0 рассчитываются почти так же просто, как в методе Бокса—Уилсона:

$$b_0 = \frac{\sum_{u=1}^{N} P_u}{N}; \qquad (7.21)$$

$$b_{ik} = \frac{\sum_{u=1}^{N} P_{iu}^k}{N/m} - b_0, \qquad (7.22)$$

здесь P_{iu}^k — выход в u-м варианте плана, где i-й фактор находился на k-м уровне; m — число уровней каждого фактора.

В общем нужно найти средний выход P в тех опытах, где вычисляемый фактор находился на определяемом уровне, и вычесть из него средний выход по всей матрице планирования. При этом часть коэффициентов b_{ik} будет со знаком «+», а часть — со знаком « — ». Для проверки можно использовать соотношение: для каждого фактора алгебраическая сумма b_{ik} равна 0.

Доверительный интервал для оценки значимости коэффициентов определяется по соотношению

$$\varepsilon = t\sqrt{\frac{\sigma^2}{\gamma N/m}}. \qquad (7.23)$$

В результате получается довольно наглядная таблица влияния уровней факторов, приведенная здесь для одного из процессов биосинтеза антибиотиков (табл. 7.6).

Среднее значение по матрице составило $b_0 = 1635$ ед/мл.

Из табл. 7.6 видно, какие уровни факторов обеспечивают наибольший выход антибиотика: 1,5 % соевой муки, 3,0 % кукурузной муки, 0,5 % кукурузного экстракта и 1,2 % мела. Если «собрать» в одной среде эти частные оптимумы по каждому фактору (а среди 16 экспериментов плана такой среды не оказалось), то предсказанное значение выхода составит:

$$P = 1635 + 168 + 267 + 246 + 331 = 2647 \text{ (ед/мл)}.$$

Ортогональность матриц, как и в случае с двумя уровнями, предполагает, что каждый уровень любого фактора сочетается одинаковое число раз со всеми уровнями остальных факторов.

На практике такие схемы планирования эксперимента называют схемами *ортогональных латинских прямоугольников* (или квадратов, если число факторов равно числу уровней каждого фактора).

Есть удобные для практики схемы планирования — 3×3, 4×4, 5×5, 8×4, 9×3. Первая цифра обозначает число факторов, а вторая — число уровней каждого фактора. Число вариантов составляет произведение этих двух цифр, хотя полный факторный эксперимент для такого числа уровней составил бы соответственно 27, 256, 3125, 65536, 19683.

В качестве примера в табл. 7.5 приведен план экспериментов для 4 факторов на 4 уровнях.

Таблица 7.5

Планирование эксперимента для 4 факторов на 4 уровнях

№ п/п	S_1	S_2	S_3	S_4
1	1	1	1	1
2	3	1	3	2
3	4	1	4	4
4	2	1	2	3
5	1	3	3	4
6	3	3	1	3
7	4	3	2	1
8	2	3	4	2
9	1	4	4	3
10	3	4	2	4
11	4	4	1	2
12	2	4	3	1
13	1	2	2	2
14	3	2	4	1
15	4	2	3	3
16	2	2	1	4

Цифры в схемах соответствуют различным уровням факторов. Но не обязательно, чтобы цифра 1 обозначала наименьший уро-

8. Как выбрать основные компоненты ферментационной среды?

9. Как определяется оптимальная концентрация одного из компонентов среды?

10. Опишите метод прямоугольной сетки для оптимизации ферментационных сред, его недостатки.

11. В чем недостаток метода поочередного изучения каждого фактора для оптимизации ферментационных сред?

12. Опишите метод Гаусса—Зайделя для оптимизации сред, его недостатки.

13. Изложите общую идею метода Бокса—Уилсона, используемого для оптимизации ферментационных сред.

14. Поясните порядок постановки «исследовательской серии опытов» в методе Бокса—Уилсона, основной уровень и интервалы варьирования.

15. Каким уравнением описывается процесс ферментации в методе Бокса—Уилсона?

16. Расскажите об ортогональных матрицах планирования в методе Бокса—Уилсона (число уровней варьирования каждого фактора, принцип ортогональности, число вариантов опытов в матрице).

17. Какие существуют матрицы планирования в методах Бокса—Уилсона при разном числе факторов?

18. Какие параметры вычисляют при обработке данных матрицы планирования?

19. Напишите формулы для вычисления коэффициентов регрессии в методе Бокса—Уилсона.

20. Опишите порядок определения опытов крутого восхождения в методе Бокса—Уилсона.

21. Изложите два способа вычисления дисперсии воспроизводимости при планировании эксперимента для подбора сред.

22. Как производится оценка значимости коэффициентов регрессии в методе Бокса—Уилсона?

23. Как производится оценка адекватности линейного уравнения регрессии?

24. Поясните причины незначимости коэффициентов регрессии.

25. В чем заключается аддитивно-решетчатое описание процесса?

26. Поясните планы ортогональных латинских прямоугольников в задачах подбора ферментационных сред.

Это значение выхода более чем на 50 % превышает исходный уровень, а реально при воспроизведении оно оказалось даже выше (3240 ед/мл).

Адекватность аддитивно-решетчатого описания проверяют аналогично методу Бокса—Уилсона. При нахождении дисперсии адекватности число степеней свободы f_a принимают $f_a = N - n(m-1) - 1$.

Таблица 7.6

Итоги расчетов величины эффектов аддитивно-решетчатого описания

№ п/п	Наименование фактора		Натуральные и кодированные (в скобках) значения уровней факторов			
1	S_1, соевая мука	Концентрация, %	1,5 (1)	2,0 (2)	3,0 (3)	4,5 (4)
		Эффект	+168	–51	–52	–67
2	S_2, кукурузная мука	Концентрация, %	2,0 (1)	3,0 (2)	4,0 (3)	6,0 (4)
		Эффект	–155	+267	+92	–195
3	S_3, кукурузный экстракт	Концентрация, %	0 (1)	0,5 (2)	1,0 (3)	2,0 (4)
		Эффект	+62	+246	+181	–490
4	S_4, мел	Концентрация, %	0,4 (1)	0,6 (2)	0,9 (3)	1,2 (4)
		Эффект	–452	+11	+108	+331

Заканчивая изучение раздела, посвященного использованию математических методов планирования эксперимента для подбора сред, отметим, что в этой области научные методы сумели несколько отодвинуть эмпирические подходы. В этой связи вспомним слова Альберта Эйнштейна: «Все должно быть сделано настолько просто, насколько это возможно, но не проще!»

Вопросы для повторения

1. Назовите основные элементы, входящие в состав биомассы микроорганизмов.
2. Можно ли точно определить количественный состав питательной среды по составу биомассы микроорганизмов?
3. Назовите макроэлементы и микроэлементы, содержащиеся в биомассе микроорганизмов, их количество.
4. Изложите классификацию ферментационных сред по составу.
5. Что такое натуральные ферментационные среды?
6. Что такое синтетические ферментационные среды?
7. Какие критерии используют для оптимизации ферментационных сред?

Глава 8

МАТЕМАТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ КИНЕТИКИ ПРОЦЕССОВ ФЕРМЕНТАЦИИ

●

При подборе сред мы использовали так называемые модели «черного ящика» (рис 8.1).

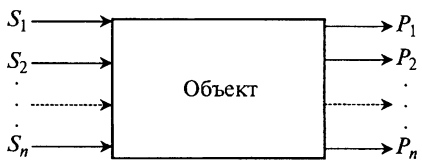


Рис. 8.1. Схематическое изображение модели объекта в виде «черного ящика»

На входе в объект, который принципиально не рассматривался иначе как линейные или нелинейные регрессионные уравнения или еще как аддитивно-решетчатые, задают значения уровней входных факторов (начальных концентраций компонентов среды), на выходе — непосредственно значение параметра оптимизации. Между тем в ходе процесса имеют место все те фазы, о которых мы говорили, характеризуя процесс ферментации, — закономерно изменяются кинетические характеристики роста, биосинтеза продукта метаболизма, потребления субстрата. Все эти изменения подчиняются некоторым кинетическим зависимостям, которые являются по существу основой теории процесса культивирования микроорганизмов и биосинтеза продуктов метаболизма.

Кинетика процессов ферментации изучает закономерности изменения скорости роста микроорганизмов и биосинтеза продуктов метаболизма в зависимости от *текущих* концентраций субстратов, биомассы, продуктов метаболизма, температуры и pH.

Сразу отметим, что нахождение уравнений, описывающих зависимость концентрации биомассы или ее общей скорости от астрономического времени, мало что дает для понимания процесса. Необходимо иметь так называемое «автономное» уравнение, в которое входит в явном виде скорость изменения концентрации биомассы и текущие концентрации субстратов.

Модель Моно. Эта модель основана на ферментативной кинетике протекающих в клетках биохимических превращений и наиболее широко известна:

$$\frac{dX}{dt} = \frac{\mu_m S}{K_S + S} X, \qquad (8.6)$$

или

$$\mu = \frac{\mu_m S}{K_S + S}, \qquad (8.7)$$

где μ_m и K_S — константы.

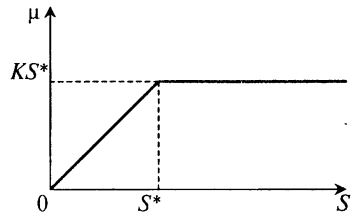


Рис. 8.3. Зависимость удельной скорости роста микроорганизмов от концентрации субстрата по модели Блэкмана

Характерные точки для графика $\mu(S)$, представленного на рис. 8.4, легко найти простой подстановкой в уравнение (8.7) значений S:

$$\mu = 0 \text{ при } S = 0; \qquad (8.8)$$

$$\mu = \mu_m \text{ при } S \to \infty; \qquad (8.9)$$

$$\mu = \mu_m/2 \text{ при } S = K_S. \qquad (8.10)$$

Величину K_s и μ_m проще определить, используя график в обратных координатах (метод Лайнуивера и Бэрка):

$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{\mu_m} + \frac{K_S}{\mu_m}\frac{1}{S}. \qquad (8.11)$$

Этот график приведен на рис. 8.5,*а*.
Из уравнения (8.11) можно получить:

$$\frac{1}{S} = 0, \ \frac{1}{\mu} = \frac{1}{\mu_m}; \qquad (8.12)$$

$$\frac{1}{\mu} = 0, \ \frac{1}{S} = -\frac{1}{K_S}. \qquad (8.13)$$

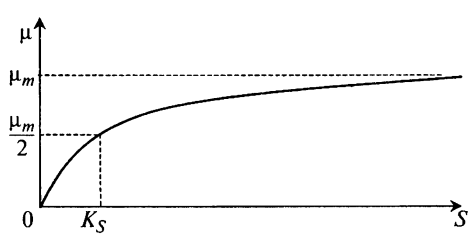


Рис. 8.4. Зависимость удельной скорости роста от концентрации субстрата по модели Моно

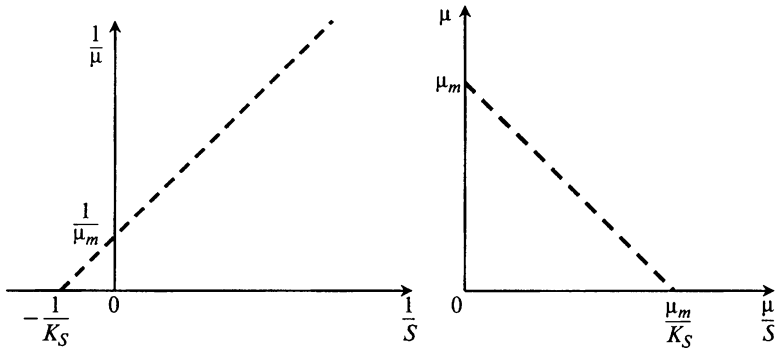


Рис. 8.5. Нахождение параметров уравнения Моно методом Лайнуивера и Бэрка (*а*) и методом Корниш-Боудена (*б*)

Из рис. 8.5,*а* видно, как можно получить значения $1/\mu_m$ и $1/K_S$, построив прямую по экспериментальным точкам.

Есть еще один метод определения μ_m и K_S (метод Корниш-Боудена).

Умножив уравнение (8.11) на $\mu\mu_m$, найдем:

$$\mu = \mu_m - K_S \frac{\mu}{S}. \tag{8.14}$$

Отсюда графически получаем прямую в координатах $\mu - \mu/S$.

Из уравнения (8.14) определим:

$$\text{при } \frac{\mu}{S} = 0 \quad \mu = \mu_m; \tag{8.15}$$

$$\text{при } \mu = 0 \quad \frac{\mu}{S} = \frac{\mu_m}{K_S}. \tag{8.16}$$

Расположив экспериментальные точки на этом графике, легко на осях координат найти искомые величины (рис. 8.5,*б*).

Модель Мозера учитывает сигмоидальный характер зависимости $\mu(S)$, представленной на рис. 8.6:

$$\mu = \mu_m \frac{S^K}{K_S + S^K}. \tag{8.17}$$

Здесь K — новый по сравнению с уравнением Моно параметр, причем $K > 1$.

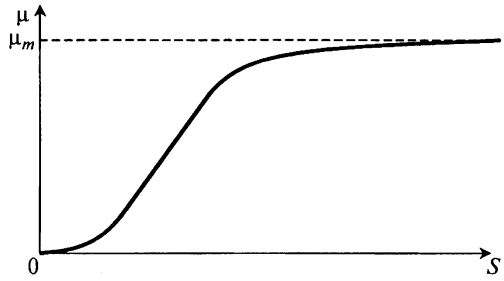


Рис. 8.6. Зависимость μ(*S*) по уравнению Мозера

Как и в уравнении Моно,

$$\text{при } S = 0 \qquad \mu = 0; \tag{8.18}$$

$$\text{при } S \to \infty \quad \mu \to \mu_m, \tag{8.19}$$

но

$$\text{при } \mu = \frac{1}{2}\mu_m \quad S = \sqrt[K]{K_S}\,. \tag{8.20}$$

Модель Перта учитывает зависимость μ(*S*) не для лимитирующего, а для «стимулирующего» субстрата (рис. 8.7) и описывается уравнением

$$\mu = \mu_o + \mu_1 \frac{S}{K_S + S}. \tag{8.21}$$

Из уравнения (8.21) следует, что при $S = 0$ $\mu = \mu_0$, т. е. $\mu \neq 0$. Это значит, что даже при отсутствии данного субстрата уже есть некоторый рост микроорганизмов. Видимо, в среде есть некий другой субстрат. Дальнейшее увеличение удельной скорости роста описывается вторым членом уравнения (8.21), который похож на уравнение Моно, где вместо μ_m стоит новый параметр μ_1. Из уравнения получается, что при $S \to \infty$ $\mu \to (\mu_0 + \mu_1)$, как и показано на рис. 8.7.

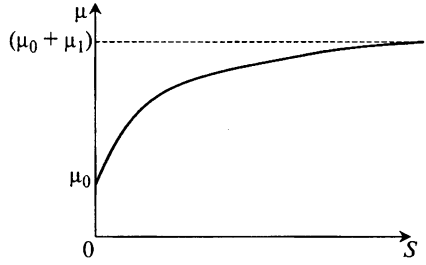


Рис. 8.7. Зависимость μ(*S*) по уравнению Перта

Модель Андрюса учитывает ингибирование повышенными концентрациями субстрата

8.1. ЗАВИСИМОСТЬ СКОРОСТИ РОСТА МИКРООРГАНИЗМОВ ОТ КОНЦЕНТРАЦИИ СУБСТРАТА

Наиболее распространены уравнения, описывающие кинетику в зависимости от концентрации лишь одного субстрата, который называют лимитирующим; другие субстраты при этом полагаются находящимися в избытке и не влияющими на скорость роста.

Мы уже рассматривали одну модель, она вытекает из самого определения удельной скорости роста μ:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X. \tag{8.1}$$

Неявно предполагается, что величина μ здесь постоянна, однако это не так — она строго зависит от концентрации субстрата. Задача как раз в том и состоит, чтобы найти эту зависимость.

В зависимости от штамма и вида микроорганизма, а также и субстрата связь $\mu(S)$ может иметь самый различный характер.

Далее рассмотрим варианты этой связи.

Модель Кобозева. Эта простейшая модель дает аналогию с химической кинетикой:

$$\frac{dX}{dt} = KSX, \tag{8.2}$$

(где K — константа скорости), или

$$\mu = KS. \tag{8.3}$$

Графически эта модель представлена на рис. 8.2.

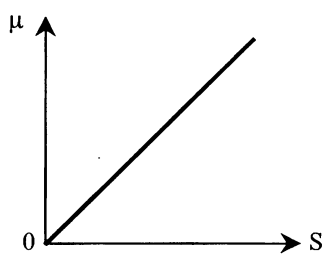


Рис. 8.2. Зависимость удельной скорости роста микроорганизмов от концентрации субстрата, подчиняющаяся химической кинетике (модель Кобозева)

Модель Блэкмана при малых концентрациях дает то же уравнение, однако при достижении величиной S некоторого критического уровня S^* скорость роста прекращает увеличиваться:

$$\frac{dX}{dt} = \begin{cases} KSX \text{ при } S < S^*; \\ KS^*X \text{ при } S \geq S^*, \end{cases} \tag{8.4}$$

или

$$\mu = \begin{cases} KS \text{ при } S < S^*; \\ KS^* \text{ при } S \geq S^*. \end{cases} \tag{8.5}$$

Графически модель Блэкмана представлена на рис. 8.3.

Выражение (8.25) можно свести к следующему:

$$\mu=\mu_m \frac{1}{\frac{2K_S}{\sqrt{K_i K_S}}+1}=\mu_m \frac{1}{\frac{2\sqrt{K_S}}{\sqrt{K_i}}+1}. \qquad (8.26)$$

Отсюда следует, что μ даже в точке экстремума меньше μ_m.

Заканчивая изложение субстрат-зависимых моделей удельной скорости роста микроорганизма, можно построить сравнительный график (рис. 8.9), показывающий характерные особенности всех рассмотренных моделей, их сходство и отличия.

8.2. ЗАВИСИМОСТЬ СКОРОСТИ РОСТА МИКРООРГАНИЗМОВ ОТ КОНЦЕНТРАЦИИ ПРОДУКТА МЕТАБОЛИЗМА

Рост микроорганизмов зависит не только от концентрации субстрата S, но также и от концентрации продуктов метаболизма P. Причем чаще всего накопление продуктов снижает (ингибирует) скорость роста. Это ингибирование учитывается различными моделями.

Модель Хиншельвуда. Наиболее простым является уравнение, предложенное Хиншельвудом:

$$\mu = \mu_m - KP. \qquad (8.27)$$

Графическое выражение этого уравнения дано на рис. 8.10.

В уравнении (8.27) при $P = 0$ $\mu = \mu_m$, при $\mu = 0$ $P = \mu_m/K$, что позволяет легко определять кинетические параметры μ_m и K.

Модель Иерусалимского. Модель Иерусалимского, подобно модели Моно, базируется на ферментативной кинетике и описывается уравнением

$$\mu=\frac{\mu_m}{1+P/K_P}, \qquad (8.28)$$

или

$$\mu = \frac{\mu_m K_P}{P+K_P}, \qquad (8.29)$$

где K_P — константа ингибирования; μ_m — максимальная удельная скорость роста.

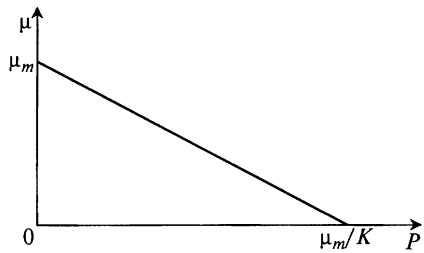


Рис. 8.10. Ингибирование удельной скорости роста микроорганизмов продуктом метаболизма по модели Хиншельвуда

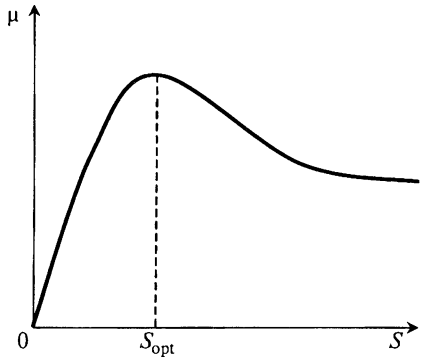


Рис. 8.8. Зависимость μ(*S*) с ингибированием повышенными концентрациями субстрата по модели Андрюса

(рис. 8.8) и описывается уравнением

$$\mu=\mu_m \frac{S}{K_S+S+S^2/K_i}. \quad (8.22)$$

Это уравнение отличается от уравнения Моно наличием в знаменателе квадратичного члена S^2 с новым кинетическим параметром K_i.

Из рис. 8.8 видно, что зависимость μ(*S*) по Андрюсу имеет явный экстремум.

Можно определить, при какой величине S значение μ будет максимальным. Для этого найдем производную по S и приравняем ее нулю:

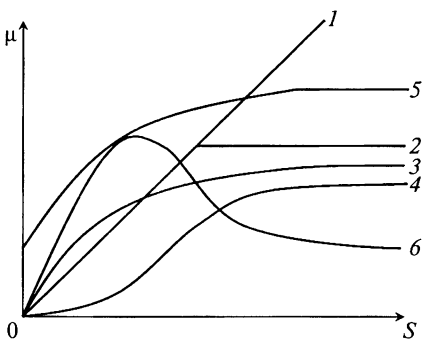
$$\frac{d\mu}{dS}=0=\mu_m \frac{S\left(1+2\frac{S^2}{K_i}\right)-\left(K_S+S+\frac{S^2}{K_i}\right)}{\left(K_S+S+\frac{S^2}{K_i}\right)^2}; \quad (8.23)$$

$$S+2\frac{S^2}{K_i}-K_S-S-\frac{S^2}{K_i}=0;$$

$$\frac{S^2}{K_i}-K_S=0,\ S^2=K_iK_S,$$

откуда оптимальное значение концентрации субстрата

$$S_{opt}=\sqrt{K_iK_S}. \quad (8.24)$$



При $S = S_{opt}=\sqrt{K_iK_S}$

$$\mu=\mu_{opt}=\mu_m \frac{\sqrt{K_iK_S}}{2K_S+\sqrt{K_iK_S}}. \quad (8.25)$$

Рис. 8.9. Сравнительный график зависимостей удельной скорости роста микроорганизмов от концентрации субстрата по уравнениям:

1 — Кобозева; *2* — Блэкмана; *3* — Моно; *4* — Мозера; *5* — Перта; *6* — Андрюса

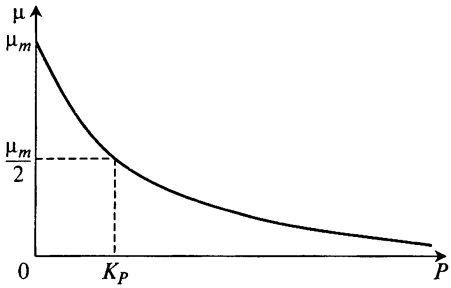


Рис. 8.11. Зависимость μ(*P*) по модели Иерусалимского

Графическое выражение зависимости дано на рис. 8.11.

Характерные точки зависимости можно получить подстановкой разных значений P в уравнение (8.28):

при $P = 0$ $\mu = \mu_m$; (8.30)

при $P \to \infty$ $\mu \to 0$; (8.31)

при $P = K_p$ $\mu = 0{,}5\,\mu$. (8.32)

Уравнение (8.28) можно преобразовать в координаты Лайнуивера и Бэрка:

$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{\mu_m} + \frac{1}{\mu_m K_P} P. \qquad (8.33)$$

В этом уравнении

при $1/\mu = 0$ $P = -K_P$; (8.34)

при $P = 0$ $1/\mu = 1/\mu_m$. (8.35)

Само уравнение (8.33) в координатах $P - 1/\mu$ выглядит как прямая (рис. 8.12).

Модель Бергтера. Уравнение Бергтера учитывает сигмоидальный характер зависимости μ(*P*), отражающей ингибирование удельной скорости роста микроорганизмов продуктом метаболизма (рис. 8.13):

$$\mu = \mu_m \frac{1}{1 + P^K / K_P}, \text{ где } K > 1. \qquad (8.36)$$

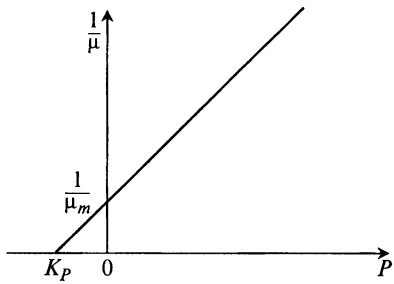


Рис. 8.12. Определение кинетических параметров μ_m и K_P уравнения Иерусалимского

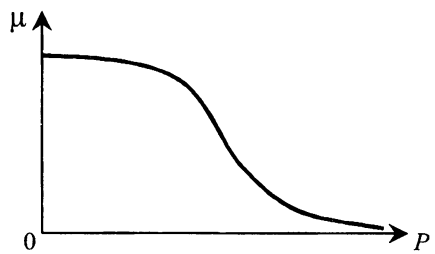


Рис. 8.13. Зависимость μ(*P*) по модели Бергтера

Частично ингибирующий продукт. Бывают ситуации, когда продукт как бы частично ингибирует скорость роста микроорганизмов (не до нуля). Эта ситуация графически выражена на рис.8.14 и может быть описана уравнением, подобным уравнению Перта для стимулирующего субстрата (8.21):

$$\mu = \mu_0 + \frac{\mu_1}{1 + P/K_P}. \quad (8.37)$$

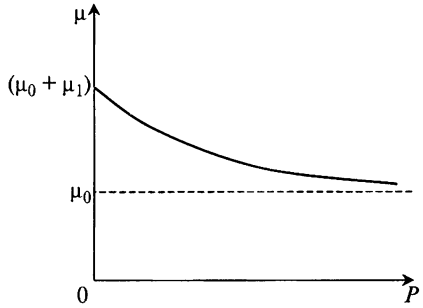


Рис. 8.14. Влияние частично ингибирующего продукта на удельную скорость роста микроорганизмов

Стимулирующий продукт. Изредка встречается процесс, в котором выделяемый клетками продукт метаболизма не ингибирует, а стимулирует рост культуры. Эта ситуация отражена на рис. 8.15 и может быть описана уравнением Перта (8.21) для стимулирующего субстрата, каковым, по существу, и является такой продукт:

$$\mu = \mu_0 + \frac{\mu_1 P}{K_P + P}. \quad (8.38)$$

Аналогично тому, как это сделано для различных субстратов, интересно провести сравнение влияния продуктов метаболизма на рост микроорганизмов по различным моделям. Такое сравнение представлено на рис. 8.16.

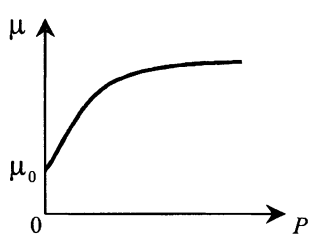


Рис. 8.15. Влияние стимулирующего рост продукта метаболизма на удельную скорость роста микроорганизмов

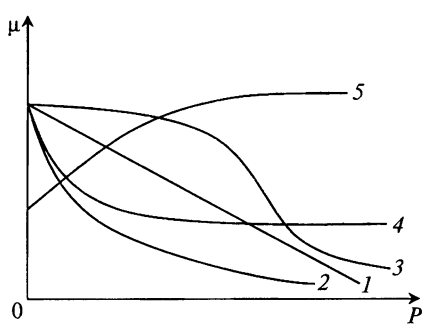


Рис. 8.16. Сравнительный график различных моделей влияния продуктов метаболизма на рост микроорганизмов:

1 — модель Хиншельвуда; *2* — модель Иерусалимского; 3 — модель Бергтера; *4* — частично ингибирующий продукт; *5* — стимулирующий продукт

В разделах 8.1 и 8.2 мы рассматривали ***однофакторные зависимости*** пока только для двух типов влияния факторов — субстрата и продукта. Не забудем, что к субстратам можно отнести растворенный кислород (в аэробных процессах), а к продуктам — растворенный диоксид углерода.

Возникает вопрос: как влияет сама биомасса микроорганизмов? Прежде всего общая скорость роста обычно тем больше, чем выше концентрация биомассы X. А удельная скорость μ? Здесь концентрация биомассы косвенно представляет собой концентрацию неизмеряемого продукта метаболизма, который может ингибировать рост. И зависимости при этом похожи, только вместо P подставляют в уравнения величину X.

П. И. Николаевым было предложено для учета влияния ингибирующего продукта метаболизма заменять концентрацию неизмеряемого продукта на комплекс (S_0—S). Это относится к тем процессам, где продукт метаболизма выделяется пропорционально потребленному субстрату.

8.3. МНОГОФАКТОРНЫЕ КИНЕТИЧЕСКИЕ УРАВНЕНИЯ

До сих пор мы рассматривали кинетические уравнения, в которых на скорость роста влиял один фактор — субстрат (только один), продукт или биомасса.

Но в реальности часто на процесс влияет не один, а несколько факторов. Многофакторные зависимости существуют, и прежде всего — многосубстратные.

«Многосубстратные» уравнения. Чаще всего приходится учитывать влияние двух субстратов (например, углеродного и азотного, углеродного и кислородного).

Такие уравнения бывают четырех основных типов:

1. *Мультипликативные уравнения* — функция является произведением однофакторных зависимостей:

$$\mu = f_1(S_1) f_2(S_2). \tag{8.39}$$

Здесь каждый фактор автономен и может иметь свою собственную зависимость. Например, один субстрат имеет зависимость по Моно, а второй — с ингибированием по Андрюсу:

$$\mu = \mu_m \frac{S_1}{K_1 + S_1} \frac{S_2}{K_2 + S_2 + S_2^2 / K_{22}}. \tag{8.40}$$

Чаще всего, конечно, встречаются мультипликативные зависимости типа Моно—Моно:

$$\mu = \mu_m \frac{S_1}{K_1 + S_1} \frac{S_2}{K_2 + S_2}. \tag{8.41}$$

Возможны и другие сочетания — в зависимости от ситуации можно перебрать любые виды однофакторных зависимостей $\mu(S)$ и создать соответствующую комбинацию.

2. *Аддитивные уравнения* — многофакторная функция является суммой однофакторных. Такие зависимости встречаются довольно редко, чаще для двух субстратов одного назначения (например, два углеродных субстрата: глюкоза и лактоза, глюкоза и крахмал и т.д.):

$$\mu = \frac{\mu_1 S_1}{K_1 + S_1} + \frac{\mu_2 S_2}{K_2 + S_2}. \qquad (8.42)$$

3. *Альтернативные уравнения* — многофакторная зависимость подчиняется принципу кинетического минимума:

$$\mu = \min_{i=1}^{k} [\mu (S_i)]. \qquad (8.43)$$

Это уравнение показывает, что для каждого субстрата существует зависимость $\mu(S_i)$, когда лимитирующим фактором является только этот субстрат. Реально же микроорганизм растет со скоростью, которая является наименьшей из всех возможных $\mu(S_i)$.

Поясним это на рис. 8.17, где представлены три зависимости $\mu(S_1)$, $\mu(S_2)$ и $\mu(S_3)$ для трех факторов. Пусть в данный момент концентрация фактора S_1 равна S^*_1, фактора S_2 — S^*_2 и фактора S_3 — S^*_3. Проведя из точек S^*_1, S^*_2, S^*_3 на оси абсцисс пунктирные линии параллельно оси ординат, получаем значения μ, достигаемые по однофакторным зависимостям. Они будут соответственно μ_1, μ_2 и μ_3. Реализуется то из них, которое меньше других, т. е. лимитирует данный фактор. При этом само значение концентрации этого субстрата может быть и больше других (в данном случае $S^*_1 > S^*_3 > S^*_2$).

4. *Уравнения с неразделяющимися переменными.* Все три рассмотренных варианта, несмотря на кажущееся различие, сходны в одном — они формируются из однофакторных зависимостей. Однако возможны и более сложные случаи, когда многофакторную зависимость трудно разбить на однофакторные. Например, существует уравнение конкурент-

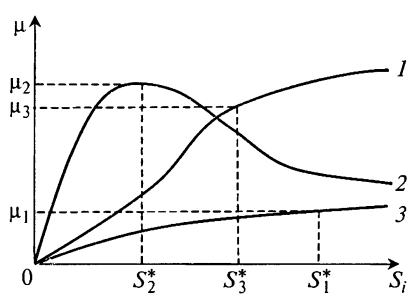


Рис. 8.17. К определению удельной скорости роста микроорганизмов по альтернативной модели кинетики:

1 — $\mu(S_3)$; *2* — $\mu(S_2)$; *3* — $\mu(S_1)$

В этом уравнении только одна независимая переменная — концентрация субстрата S.

8.4. ОТМИРАНИЕ (ДИССИМИЛЯЦИЯ) БИОМАССЫ

Все рассмотренные ранее зависимости, даже и многофакторные, касались собственно роста микроорганизмов. Однако существует представление о том, что в процессе роста микроорганизмов, и особенно при замедлении роста и в стационарной фазе, одновременно с ростом происходит диссимиляция, т. е. отмирание микроорганизмов. Реально измеряя биомассу, мы наблюдаем объединенный процесс роста — диссимиляции:

$$\frac{dX}{dt} = \underset{\text{рост}}{\mu X} - \underset{\text{отмирание}}{\tilde{\mu} X} . \qquad (8.49)$$

В этом уравнении $\tilde{\mu}$ — *удельная скорость отмирания биомассы* в процессе ферментации. При этом общая скорость отмирания обозначается $\tilde{Q}_X = \tilde{\mu} X$.

Существует несколько уравнений, описывающих величину $\tilde{\mu}$.

Отсутствие отмирания:

$$\tilde{\mu} = 0 . \qquad (8.50)$$

Уравнение Герберта. В этом уравнении принято, что удельная скорость отмирания биомассы является величиной постоянной:

$$\tilde{\mu} = K , \text{ или } \quad \tilde{Q}_X = KX . \qquad (8.51)$$

Уравнение Ферхюльста. В нем удельная скорость отмирания биомассы принята пропорциональной концентрации биомассы, а общая скорость отмирания $\tilde{Q}_X$ — пропорциональной квадрату концентрации биомассы:

$$\tilde{\mu} = KX, \text{ или } \tilde{Q}_X = KX^2 . \qquad (8.52)$$

Образно выражаясь, клетки умирают не в одиночестве, а попарно — для гибели им нужно встретить партнера.

Уравнение Рамкришны. Рамкришна принимал удельную скорость диссимиляции биомассы пропорциональной концентрации ингибирующих продуктов метаболизма P:

$$\tilde{\mu} = KP, \text{ или } \tilde{Q}_X = KXP. \qquad (8.53)$$

Это как бы отражает химическую кинетику взаимодействия продукта и биомассы микроорганизмов.

Это можно объяснить все той же теорией об одновременно протекающих в клетке процессах синтеза и распада клеточного материала. При этом зависимость «объединенной» константы μ_m от температуры отображает разность двух сопряженных процессов, каждый из которых подчиняется закону Аррениуса, что можно описать уравнением

$$\mu_m = \mu_1 e^{-\frac{E_1}{RT}} - \mu_2 e^{-\frac{E_2}{RT}}, \qquad (8.56)$$

где μ_1 и μ_2 — соответственно предэкспоненциальные множители для синтеза и распада биомассы; E_1 и E_2 — энергии активации этих процессов.

Часто для этой цели используют более простые эмпирические зависимости:

$$\mu_m = \mu_0 + \mu_1 T + \mu_2 T^2, \qquad (8.57)$$

где μ_0, μ_1 и μ_2 — коэффициенты, найденные путем обработки экспериментальных данных.

Надо сказать, что такое уравнение описывает только симметричные зависимости. Поэтому приходится применять уравнения более высоких порядков — третьего или даже четвертого:

$$\mu_m = \mu_0 + \mu_1 T + \mu_2 T^2 + \mu_3 T^3 + \mu_4 T^4 + \ldots \qquad (8.58)$$

Само же положение оптимального диапазона температур для разных микроорганизмов может быть различным. Диапазон температур 20—40 °С характеризуется хорошим ростом большинства ***микроорганизмов-мезофилов***, диапазон 0—20 °С — ***психрофилов***, диапазон выше 40 °С и вплоть до 80 °С соответствует ***термофилам***.

8.6. ЗАВИСИМОСТЬ КИНЕТИКИ РОСТА МИКРООРГАНИЗМОВ ОТ ВЕЛИЧИНЫ pH

Величина pH — это отрицательный логарифм концентрации (а точнее, активности) водородных ионов:

$$\mathrm{pH} = -\lg\left[\mathrm{H}^{+}\right]. \qquad (8.59)$$

Известно, что ионное произведение концентраций водородных и гидроксильных ионов в водных растворах близко к 10^{-14}.

При pH 7 концентрация $[H^+] \approx 10^{-7}$ г · ионов/л и такая же концентрация гидроксильных ионов $[OH^-] \approx 10^{-7}$ г · ионов/л. При снижении величины pH увеличивается концентрация водородных ионов и снижается концентрация гидроксильных. В повышенных концентрациях на микроорганизмы ингибирующим образом дей-

ного торможения вторым субстратом:

$$\mu = \mu_m \frac{S_1}{K_S + S_1 + S_2 / K_i}. \qquad (8.44)$$

Многофакторные уравнения со смешанными факторами. До сих пор мы рассматривали многофакторные уравнения с факторами одного типа (двухсубстратные). Однако едва ли не чаще встречаются неоднородные многофакторные уравнения, в которых участвуют, например, такие пары, как субстрат и продукт, субстрат и биомасса.

Среди них наиболее распространены уравнение типа Моно—Иерусалимского:

$$\mu = \mu_m \frac{S}{K_S + S} \frac{1}{1 + P/K_P}, \qquad (8.45)$$

или уравнение конкурентного торможения продуктом метаболизма:

$$\mu = \mu_m \frac{S}{K_S + S + P/K_P}. \qquad (8.46)$$

Особый интерес представляет уравнение Контуа, учитывающее влияние концентрации биомассы на вид зависимости удельной скорости роста от концентрации субстрата:

$$\mu = \mu_m \frac{S}{K_X + S}. \qquad (8.47)$$

Его графическое выражение представлено на рис. 8.18.

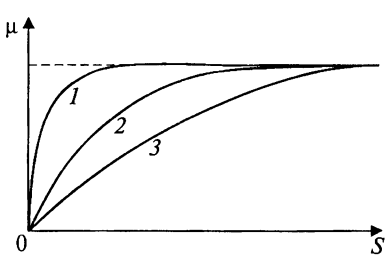


Рис. 8.18. Зависимость скорости роста микроорганизмов от концентрации субстрата по модели Контуа при различных концентрациях биомассы:

1 – $X_1 = X_{min}$; *2* – $X_{min} < X_2 < X_{max}$; *3* – $X_3 = X_{max}$

Эта зависимость как бы искажается по сравнению с Моно при изменении концентрации биомассы. Чем больше биомасса, тем выше кажущееся значение величины K_S.

Интересно, что если в уравнение Моно—Иерусалимского подставить комплекс П. И. Николаева ($S_0 - S$) вместо P, то получается вместо двухфакторного как бы однофакторное кинетическое уравнение:

$$\mu = \mu_m \frac{S}{K_S + S} \frac{1}{1 + (S_0 - S)/K_{PS}}. \qquad (8.48)$$

Уравнение Колпикова связывает удельную скорость диссимиляции с концентрацией субстрата S:

$$\tilde{\mu} = \tilde{\mu}_m \frac{1}{1+S/K_d}, \text{ или } \tilde{Q}_X = X\frac{\tilde{\mu}}{1+S/K_d}, \qquad (8.54)$$

где $\tilde{\mu}_m$ — максимальная удельная скорость диссимиляции при нулевой концентрации субстрата; K_d — константа субстратного ингибирования процесса диссимиляции.

Это уравнение дает переменную скорость отмирания в ходе процесса. Пока субстрата много, идет рост, а отмирания или нет, или почти нет. С уменьшением концентрации субстрата скорость отмирания биомассы плавно повышается. Такая картина вполне правдоподобна.

8.5. ЗАВИСИМОСТЬ СКОРОСТИ РОСТА МИКРООРГАНИЗМОВ ОТ ТЕМПЕРАТУРЫ

Как и в любой кинетике, температура оказывает влияние на константы скорости кинетических уравнений роста микроорганизмов. В принципе любая из констант в той или иной мере может быть подвержена влиянию температуры.

Однако в кинетических уравнениях для роста чаще всего полагают, что температура влияет на максимальную удельную скорость роста μ_m, а на величины K_S, K_i и т.д. — в меньшей степени.

По аналогии с химической кинетикой температурное влияние часто пытаются описывать законом Аррениуса:

$$\mu_m = \mu_{m0} e^{-\frac{E}{RT}}, \qquad (8.55)$$

где μ_{m0} — предэкспоненциальный множитель; E — энергия активации; R — универсальная газовая постоянная; T — абсолютная температура.

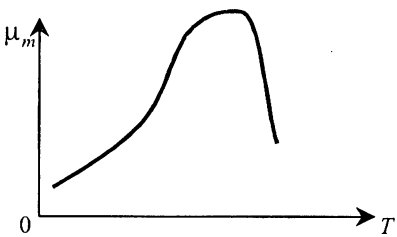


Рис. 8.19. Типичный характер зависимости максимальной удельной скорости роста микроорганизмов μ_m от температуры T

Проблема состоит в том, что данное уравнение описывает только увеличение скорости роста и совсем не учитывает того обстоятельства, что реально зависимость роста микроорганизмов от температуры имеет характер кривой с экстремумом (рис. 8.19).

При этом правая ветвь этой кривой (ниспадающая) значительно более крутая, чем левая (восходящая).

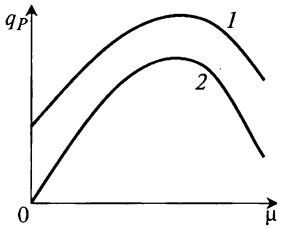


Рис. 8.23. Зависимость $q_P(\mu)$ по уравнениям (8.69) и (8.70) — кривые *1* и *2* соответственно

нительный свободный член q_{P0} (рис. 8.22):

$$q_P = q_{P0} + \frac{a\mu}{b+\mu}; \qquad (8.67)$$

$$q_P = q_{P0} + \frac{a\mu}{b-\mu}. \qquad (8.68)$$

Возможны также эмпирические уравнения типа

$$q_P = b\mu - c\mu^2; \qquad (8.69)$$

$$q_P = a + b\mu + c\mu^2, \qquad (8.70)$$

где a, b, c — коэффициенты (рис. 8.23).

8.8. СУБСТРАТ-ЗАВИСИМЫЕ МОДЕЛИ КИНЕТИКИ БИОСИНТЕЗА ПРОДУКТОВ МЕТАБОЛИЗМА

Надо отметить, что уравнения, в которых в качестве параметра-аргумента выступает μ, неявно предполагают, что совсем неважно, каким образом формируется то или иное значение μ. Мы можем, например, снизить величину μ путем уменьшения концентрации углеродного или фосфорного субстрата, понижения температуры или повышения величины pH. Для процессов, связанных с ростом микроорганизмов, при этом и скорость биосинтеза будет одинакова. Для не связанных с ростом процессов важно, каким путем мы будем снижать величину μ. Лимитирование концентрации углеродного, азотного субстрата, повышение pH или снижение температуры, обусловливая одно и то же значение скорости роста микроорганизмов, могут давать совершенно различные скорости биосинтеза продукта метаболизма.

Для таких процессов необходимо использовать уравнения, в которые в качестве параметра-аргумента входят независимо влияющие параметры: концентрация того или иного субстрата, продукта, температура или величина pH.

Как и рост микроорганизмов, биосинтез продукта может описываться *однофакторными* или *многофакторными* уравнениями. Более того, и сами виды зависимости q_P от S, P, температуры и величины pH практически такие же, как и уравнения для удельной скорости роста микроорганизмов: типа Моно, Андрюса, Перта, Мозера, Бергтера, Хиншельвуда и т. д.

Многофакторные зависимости здесь чаще бывают *мультипликативными,* чем *альтернативными* или *аддитивными.*

Используют также уравнения с неразделяющимися эффектами

факторов типа Контуа или неконкурентного торможения продуктом, например:

$$q_P = \frac{q_{Pm} S}{KX + S}; \tag{8.71}$$

$$q_P = \frac{q_{Pm} S}{K_S + S + P/K_P}. \tag{8.72}$$

Для биосинтеза продуктов метаболизма часто бывает недостаточно также и «внешних» факторов среды. Ведь в биосинтезе участвуют внутриклеточные ферменты микроорганизмов, промежуточные продукты, содержание которых в клетке зависит от предыстории развития культуры. Слишком быстро выросшая культура часто неэффективна с точки зрения биосинтеза продукта. При биосинтезе антибиотиков о таком состоянии культуры, выросшей на богатой среде, говорят «культура ушла в ботву», имея в виду непродуктивность образовавшейся биомассы.

Однако и учитывать эти внутриклеточные компоненты при моделировании опасно — их трудно измерять и, соответственно, находить кинетические коэффициенты.

Вместо этого предложены некоторые феноменологические подходы к оценке физиологического состояния микробной биомассы.

8.9. МОДЕЛИ, ОСНОВАННЫЕ НА КОНЦЕПЦИИ ВОЗРАСТА КУЛЬТУРЫ МИКРООРГАНИЗМОВ

Эти подходы основываются на оценке ***возрастного состояния популяции клеток***.

Если есть измеренная кривая возрастания концентрации биомассы (или клеток) во времени, то в любой заданный момент времени по этой кривой можно определить распределение клеток по возрастам (рис. 8.24).

Откладывая назад от заданного времени промежутки времени Δt и сравнивая концентрации биомассы в эти моменты времени, мы можем определить, какие количества биомассы в данный момент времени имеют

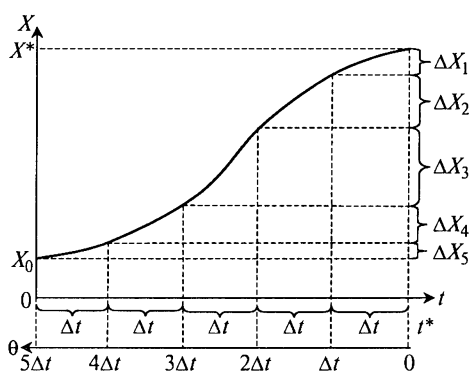


Рис. 8.24. Определение доли клеток разного возраста по кривой роста биомассы:

t — время ферментации; θ — возраст клеток

диапазоны возрастов 0 – Δt, Δt – $2\Delta t$, $2\Delta t$ – $3\Delta t$, $3\Delta t$ – $4\Delta t$, $4\Delta t$ – $5\Delta t$ и выше — вплоть до времени от начала ферментации t^* (табл. 8.1).

Таблица 8.1

Количество биомассы разного возраста в момент времени t^*

Диапазон возрастов клеток	Средний возраст данного диапазона	Концентрация биомассы диапазона возрастов	Доля биомассы данного диапазона возрастов
0 – Δt	$0{,}5\Delta t$	ΔX_1	$\Delta X_1/X^*$
Δt – $2\Delta t$	$1{,}5\Delta t$	ΔX_2	$\Delta X_2/X^*$
$2\Delta t$ – $3\Delta t$	$2{,}5\Delta t$	ΔX_3	$\Delta X_3/X^*$
$3\Delta t$ – $4\Delta t$	$3{,}5\Delta t$	ΔX_4	$\Delta X_4/X^*$
$4\Delta t$ – $5\Delta t$	$4{,}5\Delta t$	ΔX_5	$\Delta X_5/X^*$

Наблюдаемое в проанализированный момент времени t^* значение удельной скорости биосинтеза продукта можно приписать как бы сумме скоростей, привносимых разными фракциями биомассы:

$$q_P = q_1\Delta X_1 + q_2\Delta X_2 + \ldots + q_5\Delta X_5. \qquad (8.73)$$

При этом вполне возможно, что значения q_1, q_2, ..., q_5 не будут одинаковыми: «молодежь» не синтезирует нужный продукт, слишком старые клетки — тоже.

Мы рассмотрели, как найти распределение возрастов клеток в популяции микроорганизмов. Это распределение было «подиапазонное», т. е. сначала мы задавали произвольно ширину диапазонов возрастов, а затем определяли, какая часть клеток находится в том или ином диапазоне.

Ясно, что уменьшая величину диапазонов Δt до бесконечно малых dt, можно найти распределение клеток по возрастам в виде непрерывной функции распределения $X(\theta)$, где θ — возраст отдельных клеток.

Проблемой при учете распределения возрастов является необходимость расчета *интегральной скорости биосинтеза продукта* $\bar{q}_P$, которую для некоторого числа поддиапазонов k можно определить по формуле

$$\bar{q}_P = \frac{\sum_{i=1}^{k} q_i\Delta X_i}{\sum_{i=1}^{k}\Delta X_i}, \qquad (8.74)$$

где ΔX_i — концентрация клеток i-го поддиапазона; k — общее число поддиапазонов.

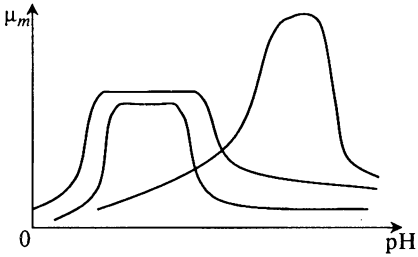


Рис. 8.20. Варианты зависимости максимальной удельной скорости роста микроорганизмов от величины pH

ствуют и водородные ионы, и гидроксильные. Поэтому обычно зависимость скорости роста от величины pH имеет куполообразный характер различной остроты и с различным положением максимума (рис. 8.20).

Левая часть зависимости отражает влияние ингибирующего «продукта» — водородных ионов, а правая — соответственно гидроксильных. Ясно, что степень влияния и механизм его могут быть различными, но подстановка в уравнения $\mu(P)$ непосредственно концентраций $[H^+]$ и/или $[OH^-]$ вместо P часто дает хорошие результаты описания.

Более часто, однако, используют эмпирические регрессионные уравнения тех же типов, что и для температуры:

$$\mu_m = \mu_0 + \mu_1 pH + \mu_2 (pH)^2 + \mu_3 (pH)^3 + \ldots \qquad (8.60)$$

Или описывают отдельно левую и правую части зависимости и зону «плато», если она существует.

По отношению к величине pH также существуют «нормальные» микроорганизмы, развивающиеся в диапазоне pH ≈ 4,0...8,5, *ацидофильные*, предпочитающие более кислую область, и *алкофильные*, наилучшим образом растущие в более щелочных диапазонах величины pH.

8.7. МАТЕМАТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ КИНЕТИКИ БИОСИНТЕЗА ПРОДУКТОВ МЕТАБОЛИЗМА КАК ФУНКЦИИ УДЕЛЬНОЙ СКОРОСТИ РОСТА МИКРООРГАНИЗМОВ

Одновременно с ростом микроорганизмов или несколько сдвинуто во времени, но в одном и том же процессе ферментации происходит также биосинтез продуктов метаболизма. Закономерности этого процесса также требуют своего математического описания.

Казалось бы, искусственно выведенный математический параметр — удельная скорость роста μ — послужил основой составления многих математических моделей биосинтеза продуктов метаболизма. Собственно говоря, процессы биосинтеза продуктов издавна делили на два больших класса — ***связанные с ростом*** и ***не связанные с ростом микроорганизмов***. В качестве примера процессов первого класса можно назвать биосинтез конститутивных фер-

ментов клетки, а второго класса — биосинтез многих антибиотиков, интенсивный синтез которых происходит после прекращения роста микроорганизмов.

Удельная скорость биосинтеза *продуктов, связанных с ростом микроорганизмов,* может быть выражена простым соотношением

$$q_P = K\mu, \tag{8.61}$$

или

$$Q_P = KQ_X \quad (K = Y_{PX}). \tag{8.62}$$

Более сложное выражение было предложено **Людекингом и Пайри**:

$$q_P = q_{PO} + K_\mu, \tag{8.63}$$

или

$$Q_P = q_{PO}X + K\frac{dX}{dt}. \tag{8.64}$$

В этом случае часть продукта образуется непрерывно, независимо от роста микроорганизмов, а часть — пропорционально росту.

Есть ряд уравнений, учитывающих нелинейный характер связи q_P и μ:

$$q_P = \frac{a\mu}{b+\mu}; \tag{8.65}$$

$$q_P = \frac{a\mu}{b-\mu}, \tag{8.66}$$

где a и b — коэффициенты.

Эти уравнения дают выпуклую и вогнутую кривые, выходящие из начала координат (рис. 8.21), но могут иметь также допол-

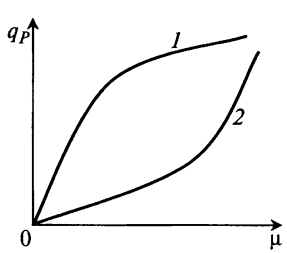


Рис. 8.21. Зависимость $q_P(\mu)$ по уравнениям (8.65) и (8.66) — кривые *1* и *2* соответственно

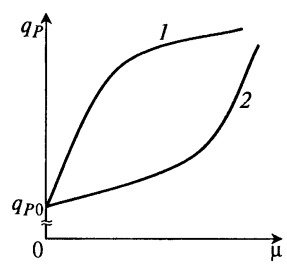


Рис. 8.22. Зависимость $q_P(\mu)$ по уравнениям (8.67) и (8.68) — кривые *1* и *2* соответственно

Очевидно, что $\sum_{i=1}^{k} \Delta X_i = X$ (здесь x — общая концентрация клеток микроорганизмов).

Переходя к непрерывным функциям, получаем:

$$q_i = q_i(\theta), \tag{8.75}$$

$$X_i = X_i(\theta). \tag{8.76}$$

Можно записать выражение для интегральной скорости биосинтеза продукта:

$$\bar{q}_P = \frac{\int_0^{\infty} q_P(\theta) X(\theta) d\theta}{X}. \tag{8.77}$$

Вводя обозначения

$$\varphi(\theta) = \frac{X(\theta)}{X}, \tag{8.78}$$

где $\varphi(\theta)$ — плотность распределения клеток по возрасту, получаем:

$$\bar{q}_P = \int_0^{\infty} q_P(\theta) \varphi(\theta) d\theta. \tag{8.79}$$

Ясно, что такой подход к определению только одного показателя несколько сложен, хотя при использовании компьютеров вполне выполним.

Тем не менее для упрощения этого подхода японским исследователем Аибой предложено использовать для оценки возраста культуры так называемый ***средний возраст популяции*** $\bar{\theta}$. Биологически термин вполне понятен — это сумма возрастов всех клеток, деленная на их количество:

$$\bar{\theta} = \frac{\Sigma[\theta_i \Delta X_i]}{\Sigma X_i}; \tag{8.80}$$

это величина, отражающая «молодость» или «старость» всей популяции в целом.

Если последовательно уменьшать поддиапазоны $\Delta\theta$ и ΔX, доведя их до бесконечно малых dX и $d\theta$, то для среднего возраста можно получить интегральную формулу:

$$\bar{\theta} = \frac{X_0\theta_0 + \int_0^{T} X(t) d\theta}{X}, \tag{8.81}$$

где $X(t)$ — функция изменения концентрации биомассы во времени; X_0 и θ_0 — на-

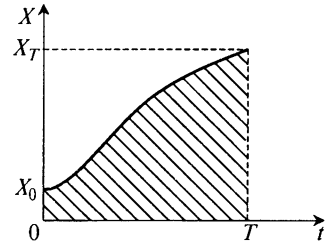


Рис. 8.25. Графическое выражение интеграла из уравнения (8.81)

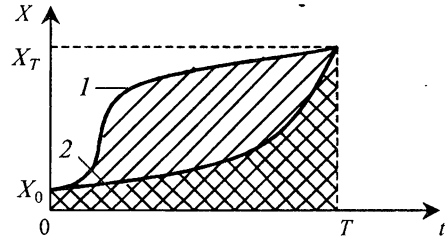


Рис. 8.26. К сравнению возрастных характеристик двух культур микроорганизмов с разной предысторией роста биомассы (кривые *1* и *2*)

чальная концентрация биомассы и ее возраст; T — момент времени, для которого определяем средний возраст культуры.

Представим функцию $X(t)$ графически (рис. 8.25).

Интеграл в формуле (8.81) численно равен заштрихованной площади на рис. 8.25, так что его нахождение практически очень просто.

В качестве примера можно привести два процесса, представленные на рис. 8.26. В момент времени T они характеризуются одной и той же концентрацией биомассы X_T, в начале процесса концентрации X_0 у них также одинаковы. И тем не менее мы можем сказать, что культура в процессе *2* имеет меньший средний возраст (более молодая), чем в процессе *1*.

Это следует из того, что площадь под кривой *2* значительно меньше, чем площадь под кривой *1*.

Другое возможное упрощение предлагает определять не полное распределение клеток по возрастам, а, так сказать, ступенчатое. Предполагается, что клетки синтезируют продукт, если их возраст выше некоторой величины θ*, называемой ***возрастом зрелости*** (рис. 8.27):

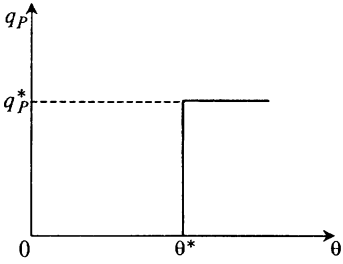


Рис. 8.27. Графическое выражение уравнения (8.82)

$$q_P = \begin{cases} q_P^*, & \theta \geq \theta^*; \\ 0, & \theta < \theta^*. \end{cases} \quad \text{или} \qquad (8.82)$$

Распределение биомассы по возрастам также ступенчатое, состоящее из двух поддиапазонов: доля клеток с возрастом меньше возраста зрелости (ΔX_1) и, соответственно, больше (ΔX_2) — рис. 8.28.

По такой схеме при $t < \theta^*$ получа-

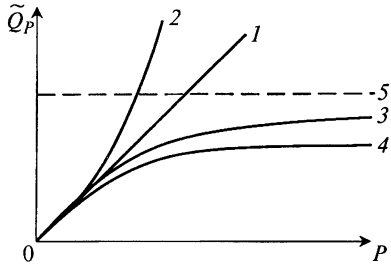


Рис. 8.33. Варианты зависимости $\tilde{Q}_P(P)$:

1 — по уравнениям (8.94) и (8.96); *2* — по уравнению (8.95) при $n > 1$; *3* — по уравнению (8.95) при $n < 1$; *4* — по уравнению (8.97); *5* — по уравнению (8.93)

с показателем степени n (больше или меньше 1):

$$\tilde{Q}_P = KP^n. \qquad (8.95)$$

Реакция разложения зависит не только от концентрации продукта, но и от концентрации биомассы:

$$\tilde{Q}_P = KPX. \qquad (8.96)$$

Скорость реакции разложения зависит от концентрации биомассы и возрастает с концентрацией продукта до какого-то предела:

$$\tilde{Q}_P = \frac{Q_m XP}{K_P + P}. \qquad (8.97)$$

На рис. 8.33 для сравнения представлено графическое выражение различных зависимостей от концентрации продукта метаболизма.

Зависимость может быть описана и другими уравнениями. Важно при построении модели не забывать кинетический параметр $\tilde{Q}_P$ и как-то его описывать.

8.11. КИНЕТИКА ПОТРЕБЛЕНИЯ СУБСТРАТА

Мы рассмотрели варианты различных уравнений роста биомассы (и ее деградации) и биосинтеза продукта (и его инактивации).

Чтобы «замкнуть» материальный баланс, в котором почти во всех уравнениях участвует концентрация субстрата, необходимо дополнить его уравнением кинетики потребления субстрата.

Это уравнение в общем виде может быть представлено как аддитивное, в правой части которого фигурируют затраты на собственно рост микроорганизмов (Q_1), на образование продукта метаболизма (Q_2) и на поддержание жизнедеятельности (Q_3):

$$-\frac{dS}{dt} = Q_1 + Q_2 + Q_3. \qquad (8.98)$$

Два первых члена уравнения связаны с соответствующими скоростями роста биомассы Q_X и продукта метаболизма Q_P выходны-

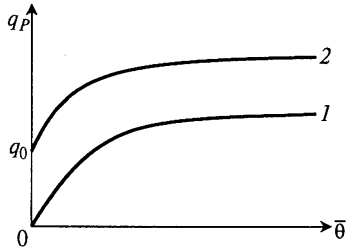


Рис. 8.30. Варианты зависимости $q_P(\bar{\theta})$ с насыщением:

1 — по уравнению (8.85); *2* — по уравнению (8.86)

удобно выразить в форме, похожей на уравнение Моно:

$$q_P = \frac{q_m \bar{\theta}}{K_P + \bar{\theta}} \qquad (8.85)$$

или

$$q_P = q_0 + \frac{q_m \bar{\theta}}{K_P + \bar{\theta}}. \qquad (8.86)$$

Если, наоборот, она убывает с возрастом (рис. 8.31), то лучше подходит выражение, подобное уравнению Иерусалимского:

$$q_P = \frac{q_m}{1 + \bar{\theta}/K_P} \qquad (8.87)$$

или

$$q_P = q_0 + \frac{q_m}{1 + \bar{\theta}/K_P}. \qquad (8.88)$$

Часто используется полиномиальная форма зависимости, учитывающая наличие экстремума:

$$q_P = q_0 + q_1\bar{\theta} + q_2\bar{\theta}^2. \qquad (8.89)$$

Хорошо подходит для многих процессов кусочно-линейная аппроксимация (рис. 8.32) зависимости

$$q_P = \begin{cases} K_1\bar{\theta} \\ K_1\bar{\theta}_1 \\ K_1\bar{\theta}_1 - K_2\left(\bar{\theta} - \bar{\theta}_2\right) \end{cases} \quad \text{при} \quad \begin{cases} \bar{\theta} \le \bar{\theta}_1; \\ \bar{\theta}_1 \le \bar{\theta} \le \bar{\theta}_2; \\ \bar{\theta} > \bar{\theta}_2. \end{cases} \qquad (8.90)$$

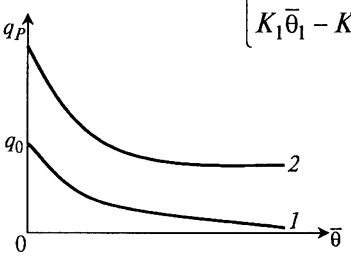


Рис. 8.31. Варианты зависимости $q_P(\bar{\theta})$:

1 — по уравнению (8.87); *2* — по уравнению (8.88)

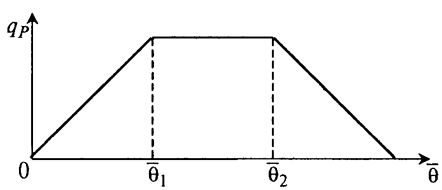
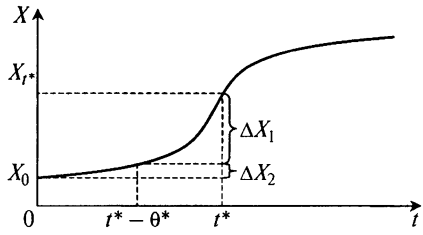


Рис. 8.32. Кусочно-линейная форма зависимости $q_P(\bar{\theta})$ по уравнению (8.90)

Рис. 8.28. Определение соотношения клеток продуктивного и непродуктивного возраста в заданный момент времени t^* по кривой роста биомассы:

X_0 — концентрация биомассы в начале процесса; X_{t^*} — концентрация биомассы в момент времени t^*; ΔX_1 — доля концентрации клеток, имеющих возраст в диапазоне 0—θ^*, т. е. ниже возраста зрелости; ΔX_2 — доля концентрации клеток, имеющих возраст выше θ^*, т. е. выше возраста зрелости



ется, что «зрелых» клеток нет вообще, далее они появляются, а доля «незрелых» падает.

Интересно, что в зависимости от удельной скорости роста культура может сохранять свой возраст в течение долгого времени неизменным, «молодеть» или «стареть». Пример представлен на рис. 8.29.

В момент времени t_0 культура с некоторой предысторией, определяемой ее средним возрастом $\bar{\theta}_0$, в зависимости от технологических воздействий может начать расти медленно с удельной скоростью роста μ_1, или быстрее — μ_2, или еще быстрее — μ_3.

Для того чтобы возраст культуры не изменялся, должно соблюдаться равенство

$$\mu = 1/\bar{\theta}. \qquad (8.83)$$

Допустим, что до момента времени t_0 удельная скорость роста равна μ_2:

$$\mu_2 = 1/\bar{\theta}_0, \qquad (8.84)$$

где $\bar{\theta}_0$ — возраст культуры в момент времени t_0.

Если $\mu > 1/\bar{\theta}_0$, т. е. $\mu_3 > \mu_2 = 1/\bar{\theta}_0$, то культура будет «молодеть». Если же $\mu < 1/\bar{\theta}_0$, в данном примере $\mu_1 < \mu_2 = 1/\bar{\theta}_0$, то культура будет «стареть».

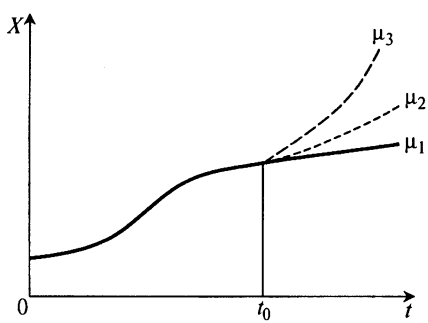


Рис. 8.29. Варианты роста биомассы микроорганизмов после момента времени t_0 при различных μ

Зная оптимальный средний возраст культуры, мы можем так управлять ростом биомассы, чтобы биосинтез продукта был на максимальном уровне.

Теперь остается рассмотреть форму зависимости удельной скорости биосинтеза продукта q_P от среднего возраста культуры $q_P = f(\theta)$.

Если зависимость имеет возрастающий характер с насыщением (рис. 8.30), то ее

Возможны и другие зависимости в соответствии с характером кривой $q_P(\bar{\theta})$.

Надо отметить, что возрастной подход пригоден и для оценки человеческих популяций, а может быть, он и взят из этой практики.

Часто говорят о старении или омоложении населения города, страны, даже вуза или завода. У нас, например, средний возраст студентов практически мало меняется, зато в последнее время очень увеличился средний возраст преподавателей.

8.10. КИНЕТИКА ДЕГРАДАЦИИ (ИНАКТИВАЦИИ) ПРОДУКТОВ МЕТАБОЛИЗМА

Не всегда синтезированные продукты метаболизма остаются устойчивыми; часто они настолько лабильны, что разрушаются уже в процессе самой ферментации. Поэтому описывая материальный баланс по продукту метаболизма, необходимо учитывать кинетику его инактивации:

$$\frac{dP}{dt} = q_P X - \tilde{Q}_P. \tag{8.91}$$

Здесь $\tilde{Q}_P$ — общая скорость деградации продукта метаболизма. В данном случае правильно брать именно общую скорость, так как причиной разложения продукта совсем не обязательно должна быть биомасса.

Образовавшийся продукт существует отдельно от биомассы, и нет никакой необходимости соотносить скорости его деградации с ее концентрацией, т.е. вводить удельную скорость деградации.

Рассмотрим варианты моделирования кинетики деградации.

Деградация отсутствует:

$$\tilde{Q}_P = 0. \tag{8.92}$$

Деградация идет с постоянной скоростью:

$$\tilde{Q}_P = K. \tag{8.93}$$

Такое выражение странно выглядит в начале процесса, когда продукта еще нет; из уравнения же получается, что концентрация продукта может стать ниже нуля, что не имеет физического смысла.

Нормальная реакция разложения первого порядка:

$$\tilde{Q}_P = KP. \tag{8.94}$$

Реакция разложения идет по уравнению химической кинетики

пути расходования субстрата. В экономических коэффициентах мы не выделяли «невидимой» части субстрата, расходуемой на поддержание жизнедеятельности. Поэтому полученные «экономические» коэффициенты приписывали весь расход субстрата чему-то одному — образованию биомассы или продукта метаболизма.

Так, например, если за период времени Δt образовалось ΔX биомассы и ΔP продукта и при этом израсходовалось ΔS субстрата, мы вычисляли экономические коэффициенты по биомассе и продукту таким образом:

$$Y_{XS} = \frac{\Delta X}{\Delta S}; \quad Y_{PS} = \frac{\Delta P}{\Delta S}.$$

Этот способ вычисления неправилен, так как образуется и то и другое, да еще существуют затраты субстрата на поддержание жизнедеятельности.

Как правильно определять эти коэффициенты?

Необходимо находить их все сразу по уравнению

$$-\frac{\Delta S}{\Delta t} = \frac{1}{Y_{XS}} \frac{\Delta X}{\Delta t} + \frac{1}{Y_{PS}} \frac{\Delta P}{\Delta t} + m_S X. \qquad (8.103)$$

Для каждого интервала времени Δt можно определить ΔX, ΔP и X (берут среднее значение для интервала). Подставив найденные числовые значения, получаем линейное уравнение со следующими тремя неизвестными:

$$\frac{1}{Y_{XS}}, \frac{1}{Y_{PS}} \text{ и } m_S.$$

Ясно, что одного интервала для определения всех трех коэффициентов недостаточно. Нужны как минимум 3 точки, которые дадут 3 уравнения, из них можно найти все 3 коэффициента.

Лучше взять больше точек, чем число искомых коэффициентов, тогда получится система уравнений (столько же, сколько взято измеренных точек — интервалов ферментации), в которой коэффициенты находят *методом наименьших квадратов.*

Иногда можно и упростить решение. Например, в стационарном режиме $\Delta X/\Delta t = 0$ получается 2 уравнения с 2 неизвестными — их проще решить.

Или можно найти период времени, где не было ни роста биомассы, ни образования нового продукта.

В качестве примера решения можно рассмотреть данные табл. 8.2.

ми коэффициентами Y_{XS} и Y_{PS}:

$$Q_1 = Q_X / Y_{XS}; \quad (8.99) \qquad Q_2 = Q_P / Y_{PS}. \quad (8.100)$$

Особо следует сказать о затратах субстрата на поддержание жизнедеятельности.

В клетках микроорганизмов все время идут процессы деградации (разрушения) некоторых веществ (белков, нуклеиновых кислот и др.) и одновременно — процессы их синтеза. Вместе взятые эти два процесса можно назвать процессом «репарации», т.е. регенерации утраченных веществ. На этот процесс необходимо расходовать часть субстрата.

Кроме того, субстрат расходуется на синтез определенных, тоже неизмеряемых продуктов метаболизма, образующихся в небольшом количестве.

Особенно это заметно в том случае, когда в конце процесса субстрат исчерпан, рост биомассы и образование целевого продукта прекратились. Если при этом подавать субстрат с небольшой скоростью, то можно создать условия, при которых концентрации биомассы и продукта не возрастали и не падали бы, а сохранялись на постоянном уровне. В этом случае субстрат все время добавляется (т. е. $\Delta S \neq 0$), а биомасса и продукт метаболизма не меняются (т.е. $\Delta X = 0$ и $\Delta P = 0$). Благодаря подаче субстрата не наступает фаза отмирания клеток микроорганизмов.

Это дополнительное расходование субстрата происходит не только в конце ферментации, а в течение всего процесса. Просто эти расходы субстрата обычно «приписывают» к расходам на рост (Q_1) и на образование продукта метаболизма (Q_2).

Правильно было бы выделить эту статью расхода в отдельный член уравнения — на поддержание жизнедеятельности микроорганизмов Q_3.

Вполне очевидно, что эта величина пропорциональна концентрации микроорганизмов:

$$Q_3 = m_S X, \quad (8.101)$$

где m_S — коэффициент поддержания жизнедеятельности, или удельная скорость расходования субстрата на поддержание жизнедеятельности микроорганизмов.

С учетом соотношений (8.99) — (8.101) уравнение (8.98) можно записать следующим образом:

$$Q_S = -\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_{XS}} Q_X + \frac{1}{Y_{PS}} Q_P + m_S X. \quad (8.102)$$

В этом уравнении коэффициенты Y_{XS} и Y_{PS} отличаются от экономических коэффициентов, рассмотренных в главе 4. Математическая модель (8.102) более правильно учитывает различные

Таблица 8.2

Расчет коэффициентов выхода Y_{XS} и Y_{PS} и скоростей роста и биосинтеза продукта по данным периодической ферментации

Концентрация в среде, г/л	Время от начала ферментации, ч			
	$t_1 = 48$	$t_2 = 72$	$t_3 = 96$	$t_4 = 120$
Биомасса (X)	27,5	35,4	39,8	40,2
Субстрат (S)	80,8	60,7	44,1	33,5
Продукт метаболизма (P)	4,2	12,5	21,1	29,4

Приращение параметров	Интервалы времени, ч		
	t_2-t_1	t_3-t_2	t_4-t_3
Δt, ч	24	24	24
ΔX, г/л	7,9	4,4	0,4
$-\Delta S$, г/л	20,1	16,6	10,6
ΔP, г/л	8,3	8,6	8,3
Среднее значение X, г/л	31,5	37,6	40,0
Скорости изменения, г/(л · ч):			
$\Delta X/\Delta t$	0,329	0,183	0,017
$-\Delta S/\Delta t$	0,837	0,692	0,442
$\Delta P/\Delta t$	0,346	0,358	0,346

На основании данных таблицы можно записать уравнения материального баланса (для каждого из 3 интервалов):

$$0{,}837 = \frac{1}{Y_{XS}} \cdot 0{,}329 + \frac{1}{Y_{PS}} \cdot 0{,}346 + m_S \cdot 31{,}5\,;$$

$$0{,}692 = \frac{1}{Y_{XS}} \cdot 0{,}183 + \frac{1}{Y_{PS}} \cdot 0{,}358 + m_S \cdot 37{,}6\,;$$

$$0{,}442 = \frac{1}{Y_{XS}} \cdot 0{,}017 + \frac{1}{Y_{PS}} \cdot 0{,}346 + m_S \cdot 40{,}0\,.$$

Решение системы уравнений дает коэффициенты:

$$Y_{XS} = 1{,}82;\ Y_{PS} = 0{,}36;\ m_S = 0{,}011.$$

Следует отметить, что эти коэффициенты уже не будут меняться в ходе процесса так сильно, как упомянутые ранее экономические.

Показатель m_S по смыслу является кинетическим и может поразному зависеть от других показателей процесса.

Для неэнергетических субстратов, таких, как азот, макро- и микроэлементы,

$$m_S = 0. \tag{8.104}$$

Показатель m_S не изменяется в процессе ферментации:

$$m_S = + m. \tag{8.105}$$

Экзотический случай, когда субстрат при ферментации дополнительно образуется в процессе поддержания жизнедеятельности микроорганизмов:

$$m_S = -m. \tag{8.106}$$

Чем больше концентрация субстрата, тем больше его расходы на поддержание жизнедеятельности микроорганизмов:

$$m_S = KS. \tag{8.107}$$

Расходование субстрата в «побочных» биохимических процессах происходит по ферментативной кинетике Михаэлиса—Ментен:

$$m_S = \frac{q_{mS} S}{K_S + S}. \tag{8.108}$$

Субстрат более интенсивно расходуется на поддержание жизнедеятельности микроорганизмов при его пониженных концентрациях:

$$m_S = \frac{q_{mS}}{1 + S/K_P}. \tag{8.109}$$

Продукт метаболизма стимулирует расходование субстрата на поддержание жизнедеятельности микроорганизмов:

$$m_S = \frac{q_{mS} P}{K_P + P}. \tag{8.110}$$

Существует графический метод определения коэффициентов Y_{XS} и m_S по экспериментальным данным. Этот метод вытекает из уравнения

$$\frac{1}{Y^*_{XS}} = \frac{1}{Y_{XS}} + m_S \frac{1}{\mu}. \tag{8.111}$$

Если представить экспериментальные данные в системе обратных координат $(1/Y^*_{XS}, 1/\mu)$, то получим прямую (рис. 8.34).

Эта прямая отсекает на оси ординат отрезок $1/Y^*_{XS} = 1/Y_{XS}$, а на оси абсцисс — отрезок $1/\mu = -1/(m_S Y_{XS})$, откуда легко найти m_S.

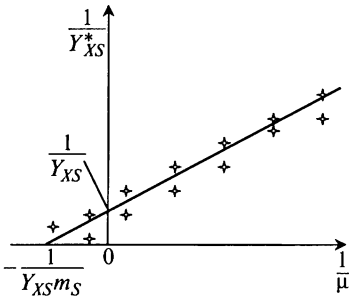


Рис. 8.34. Графическое представление выходных коэффициентов в системе обратных координат ($1/Y^*_{XS}$, $1/\mu$)

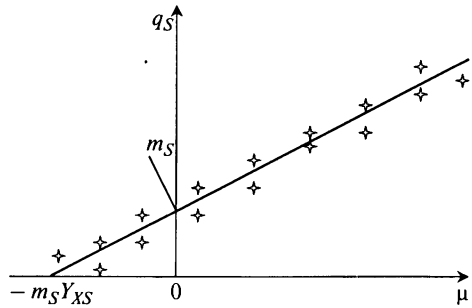


Рис. 8.35. Определение коэффициентов m_S и Y_{XS} графическим методом в координатах (q_S, μ)

Или если выразить данные в координатах (q_S, μ), где $q_S = \dfrac{1}{X}\dfrac{dS}{dt}$, то их можно также аппроксимировать прямой (рис. 8.35):

$$q_S = -\frac{1}{Y_{XS}}\mu + m_S . \qquad (8.112)$$

Она отсекает на оси ординат отрезок, равный m_S, а на оси абсцисс — отрезок $\mu = -m_S Y_{XS}$, откуда можно найти Y_{XS}.

Для неэнергетических субстратов (минеральный азот, микро- и макроэлементы, фосфор) обычно затраты на поддержание жизнедеятельности нулевые, в связи с чем упрощаются расчеты материальных балансов.

8.12. ЗАВИСИМОСТЬ «КАЖУЩЕГОСЯ» ЭКОНОМИЧЕСКОГО КОЭФФИЦИЕНТА ОТ УДЕЛЬНОЙ СКОРОСТИ РОСТА МИКРООРГАНИЗМОВ

Рассмотрим более детально случай, когда нет существенного выделения продукта метаболизма P. Уравнение баланса субстрата имеет следующий вид:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_{XS}} Q_X + m_S X, \qquad (8.113)$$

или

$$-\frac{dS}{dt}\frac{1}{X} = \frac{1}{Y_{XS}}\mu + m_S . \qquad (8.114)$$

8.13. БЛОЧНЫЙ ПОДХОД К МОДЕЛИРОВАНИЮ ПРОЦЕССОВ ФЕРМЕНТАЦИИ

Математическая модель процесса ферментации в общем случае должна давать систему уравнений, совместное решение которых позволяет при заданных начальных условиях найти изменение во времени всех основных параметров ферментации (в данном случае концентраций субстрата, биомассы микроорганизмов и продуктов метаболизма).

В общем виде такая система уравнений представлена системной моделью — совокупностью уравнений материального баланса биомассы, продукта метаболизма и субстрата, в которых не раскрыты функции для основных кинетических параметров — μ, $\tilde{\mu}$, q_P, $\tilde{Q}_P$, m_S:

$$\frac{dX}{dt} = (\mu - \tilde{\mu})X; \tag{8.119}$$

$$\frac{dP}{dt} = q_P X - \tilde{Q}_P; \tag{8.120}$$

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_{XS}}\mu X + \frac{1}{Y_{PS}} q_P X + m_S X. \tag{8.121}$$

Кинетические параметры μ, $\tilde{\mu}$, q_P, $\tilde{Q}_P$ и m_S в системе уравнений (8.119) — (8.121) зависят от текущих значений параметров состояния X, P, S. Эти зависимости разные и многовариантные даже для каждого кинетического параметра. Создание модели требует выбора конкретной формы зависимости для каждого параметра (даже если эта форма нулевая, например $q_P = 0$ или $m_S = 0$ или $\tilde{\mu} = 0$).

Совокупность зависимостей дает модель, вернее структуру модели, потому что необходимо найти еще точные значения входящих в уравнения коэффициентов.

Например, чаще всего рассматривают упрощенную кинетическую модель процесса ферментации, в которой $\tilde{\mu} = 0$, $\tilde{Q}_P = 0$, $m_S = 0$ и $q_P = 0$. Удельную скорость роста μ принимают зависящей от субстрата по Моно.

Система уравнений при этом выглядит следующим образом:

$$\frac{dX}{dt} = \frac{\mu_m S}{K_S + S} X; \tag{8.122}$$

$$\frac{dP}{dt} = 0; \tag{8.123}$$

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y^*_{XS}} \mu X, \tag{8.124}$$

где Y^*_{XS} — принятая постоянной кажущаяся величина экономического коэффициента Y_{XS}.

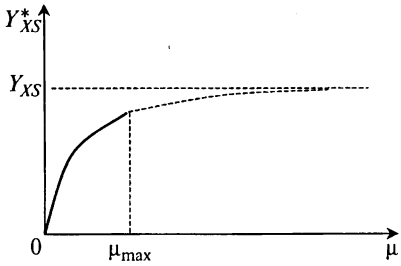


Рис. 8.36. Зависимость «кажущегося» экономического коэффициента от удельной скорости роста биомассы микроорганизмов:

при $\mu = 0$ $Y^*_{XS} = 0$; при $\mu = \infty$ $Y^*_{XS} = Y_{XS}$

В левой части числитель и знаменатель умножим на dX:

$$-\frac{dS}{dX}\frac{dX}{dt}\frac{1}{X} = \frac{1}{Y_{XS}}\mu + m_S. \qquad (8.115)$$

Величина dX/dS — «кажущееся» значение экономического коэффициента Y^*_{XS}, вычисляемое без учета расхода субстрата на поддержание жизнедеятельности микроорганизмов, а $\frac{dX}{dt}\frac{1}{X}$ — удельная скорость роста μ.

Тогда

$$\frac{1}{Y^*_{XS}}\mu = \frac{1}{Y_{XS}}\mu + m_S; \qquad (8.116)$$

$$\frac{1}{Y^*_{XS}} = \frac{1}{Y_{XS}} + \frac{m_S}{\mu}; \qquad (8.117)$$

$$Y^*_{XS} = \frac{Y_{XS}\mu}{m_S Y_{XS} + \mu}. \qquad (8.118)$$

Здесь Y_{XS} — «истинное» значение Y_{XS}.

Графически уравнение (8.118) можно представить как функцию $Y^*_{XS}(\mu)$ (рис. 8.36).

Таким образом, при возрастании удельной скорости роста происходит увеличение и «кажущегося» экономического коэффициента. Он как бы стремится приблизиться к истинному. Но полного приближения не происходит, так как μ не может стать больше, чем μ_{max} (см. рис. 8.36).

В этом анализе «истинное» значение Y_{XS} имеет аналогию со стехиометрическим выходом биомассы, а «кажущееся» значение Y^*_{XS} соответствует фактическому выходу. Полученная зависимость и ее графическое выражение подтверждают переменность этого показателя и недостижимость «теоретического» стехиометрического выхода биомассы.

36. Расскажите о способах оценки возрастного состояния популяции клеток микроорганизмов по кривой роста биомассы во времени.

37. Как учитывается влияние возраста культуры в уравнениях кинетики биосинтеза продуктов метаболизма?

38. Что такое средний возраст культуры и каковы методы его вычисления?

39.В чем суть упрощенной оценки характеристик культуры по «возрасту зрелости»?

40. Каковы методы управления процессом ферментации для «омоложения», «старения» культуры и сохранения постоянного возраста?

41. Расскажите о системной модели, учитывающей одновременное образование продукта метаболизма и его инактивацию.

42. Дайте варианты уравнений кинетики инактивации продуктов метаболизма.

43. Изложите суть блочного подхода к моделированию процессов ферментации.

44. Укажите варианты зависимости коэффициента поддержания жизнедеятельности от параметров процесса ферментации.

Даже такая простая модель позволяет анализировать многие закономерности протекания микробиологических процессов.

Возникает вопрос, сколько вариантов математических моделей для конкретных процессов можно построить, используя рассмотренные в этой главе варианты кинетических уравнений для основных кинетических параметров.

Уже модели зависимости μ от S имеют 6 вариантов. Если μ зависит от P, добавляется еще 5 вариантов, то же для зависимости μ от X. Многофакторные двухсубстратные уравнения дают $6 \cdot 6 = 36$ вариантов, зависимости от субстрата и продукта $\mu(S,P)$ — $6 \cdot 5 = 30$ вариантов. Причем они могут быть как мультипликативными, так и альтернативными, не говоря уже об уравнениях с неразделяющимися переменными. В целом только величина μ в модели может быть раскрыта более чем 120 вариантами.

Для отмирания биомассы рассмотрены 4 варианта кинетических уравнений.

Модели кинетики биосинтеза продукта имеют в общем такое же число вариантов, что и модели для удельной скорости роста, с добавлением зависимостей $q_P(\mu)$ — 8 вариантов и зависимостей от возраста культуры — не менее 6 вариантов. Итого для параметра q_P можно рассмотреть более 130 вариантов.

Для кинетики инактивации продукта метаболизма рассмотрены 6 вариантов, а для поддержания жизнедеятельности субстрата — 7 вариантов.

Итого общее число вариантов структуры модели может быть $120 \cdot 4 \cdot 130 \cdot 6 \cdot 7 = 2\,620\,800$, т. е. более 2 миллионов! Но отбирать их следует, выбирая из меньшего числа вариантов элементарных кинетических уравнений, правильно ставя эксперименты.

Выше мы немного касались вопросов нахождения коэффициентов различных кинетических моделей. Обычно это довольно непростая задача, и для нахождения точных значений коэффициентов необходимо использовать компьютерные методы. В настоящем пособии мы специально на этом вопросе останавливаться не будем.

Вопросы для повторения

1. Что такое кинетические уравнения?
2. Какими уравнениями описывается кинетика роста микроорганизмов по аналогии с кинетикой химического уравнения первого порядка?
3. Опишите модель Блэкмана.
4. Дайте модель Моно — общий вид уравнения.
5. Проведите анализ уравнения Моно, назовите кинетические константы.
6. Расскажите о методе Лайнуивера и Бэрка для определения констант уравнения Моно.
7. В чем заключается метод Корниш-Боудена для определения констант уравнения Моно?

Глава 9

НЕПРЕРЫВНОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

●

Есть две разновидности непрерывных процессов: процессы полного вытеснения, или ***тубулярные***, и процессы полного перемешивания, или ***хемостатные***.

9.1. ТУБУЛЯРНЫЙ ПРОЦЕСС

Питательная среда и посевной материал непрерывно поступают в аппарат, в котором нет обратного смешения. Аппарат выполнен в виде длинной трубы большого диаметра (рис. 9.1).

Жидкость на входе в аппарат смешивается с посевным материалом. По мере их продвижения в аппарате одновременно осуществляются рост биомассы и процесс ферментации. Движение не обязательно должно быть горизонтальным. В аппарате башенного типа жидкость движется снизу вверх. Такой способ часто выбирают для анаэробных процессов. Например, есть башенный способ производства пива.

Время движения жидкости t_l от входа в аппарат до любого сечения по длине потока l можно рассчитать как

$$t_l = lA/F, \tag{9.1}$$

где A — площадь сечения потока; F — объемный расход жидкости.

На выходе из аппарата (при $l = L$) время пребывания жидкости составляет:

$$t_L = LA/F. \tag{9.2}$$

Кривая изменения концентрации субстрата S, биомассы X и продукта P по длине аппарата аналогична кривой изменения во времени в периодическом процессе — с учетом связи t и l.

Таким образом, тубулярный процесс с учетом закономерностей протекания процесса ферментации полностью подобен периодическому.

Некоторую сложность вызывает необходимость непрерывной подачи посевного материала. Ее можно избежать путем организации рециркуляции части потока с выхода аппарата на вход (рис. 9.2).

8. Расскажите о модели Мозера, ее сходстве и отличии от модели Моно.

9. В чем суть модели Перта для роста на стимулирующем субстрате?

10. Модель Андрюса: в чем ее отличие от уравнения Моно?

11. При какой концентрации субстрата по модели Андрюса скорость роста биомассы максимальна?

12. Дайте модель Хиншельвуда, учитывающую влияние на рост микроорганизмов концентрации продуктов метаболизма.

13. Дайте модель Иерусалимского, ее анализ. Назовите способы определения константы ингибирования методом Лайнуивера и Бэрка.

14. Опишите модель Берггера, ее сходство и отличие от модели Иерусалимского.

15. Дайте модель роста на частично ингибирующем продукте; на стимулирующем продукте метаболизма.

16. Как в моделях кинетики роста следует учитывать влияние растворенного кислорода и углекислого газа?

17. Как кинетика роста микроорганизмов зависит от концентрации биомассы?

18. Расскажите о модели П. И. Николаева, учитывающей влияние на рост микроорганизмов количества потребленного субстрата.

19. Назовите виды многофакторных кинетических уравнений.

20. Дайте примеры мультипликативных двухсубстратных кинетических уравнений; аддитивных двухсубстратных кинетических уравнений; многосубстратных альтернативных кинетических уравнений.

21. Расскажите о многофакторных кинетических уравнениях с неразделяющимися переменными; со смешанными влияющими факторами.

22. Запишите уравнение Моно—Иерусалимского.

23. Дайте уравнение кинетики роста с конкурентным торможением продуктом метаболизма.

24. Приведите уравнение Контуа, учитывающее влияние «тесноты» культуры на удельную скорость роста микроорганизмов.

25. Дайте уравнение П.И. Николаева, учитывающее влияние концентрации субстрата и торможение продуктом реакции с измерением только одного фактора.

26. Запишите кинетические уравнения, учитывающие параллельный рост и диссимиляцию (отмирание) биомассы микроорганизмов.

27. Дайте уравнение Герберта для скорости диссимиляции микроорганизмов.

28. В чем заключается кинетика диссимиляции микроорганизмов по Ферхюльсту? по Рамкришна?

29. Расскажите о методах математического описания влияния температуры и pH на кинетику роста микроорганизмов.

30. Расскажите об удельной скорости роста как параметре-аргументе в кинетических зависимостях для биосинтеза продуктов метаболизма.

31. Каковы особенности биосинтеза продуктов метаболизма, связанных с ростом биомассы?

32. Дайте уравнение Людекинга и Пайри для кинетики биосинтеза продуктов метаболизма.

33. Приведите нелинейные уравнения связи удельной скорости биосинтеза продуктов метаболизма с удельной скоростью роста микроорганизмов.

34. В чем заключаются недостатки кинетических уравнений для биосинтеза продуктов метаболизма с удельной скоростью роста как параметром-аргументом?

35. Приведите примеры однофакторных и многофакторных уравнений кинетики биосинтеза продуктов с концентрациями субстрата, продукта, биомассы и величиной pH в качестве параметров-аргументов.

$Q_P = 0$ (нет инактивации продукта метаболизма); (9.6)

$m_S = 0$ (нет затрат на поддержание жизнедеятельности культуры). (9.7)

В этом случае выражение для материального баланса в ферментере записывают следующим образом:

$$V\frac{dX}{dt} = \frac{\mu_m S}{K_S + S}XV - FX; \tag{9.8}$$

$$V\frac{dS}{dt} = FS_0 - \frac{1}{Y_{XS}}\frac{\mu_m S}{K_S + S}XV - FS. \tag{9.9}$$

Приток Расход на рост биомассы Отток

Здесь V — объем ферментационной жидкости в аппарате, сохраняемый на постоянном уровне.

Принимаем:

$$D = F/V, \tag{9.10}$$

где D — *скорость разбавления*, $ч^{-1}$.

Систему уравнений (9.8) и (9.9) можно записать упрощенно:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X - DX; \tag{9.11}$$

$$\frac{dS}{dt} = D\ (S_0 - S) - \frac{1}{Y_{XS}}\mu X. \tag{9.12}$$

Введем в уравнение (9.11) вместо μ зависимость $\mu(S)$:

$$\frac{dX}{dt} = \frac{\mu_m S}{K_S + S} - DX; \tag{9.13}$$

$$\frac{dS}{dt} = D\ (S_0 - S) - \frac{1}{Y_{XS}}\mu X. \tag{9.14}$$

В отличие от периодического в непрерывном хемостатном процессе довольно быстро устанавливается стационарное состояние, при котором скорость роста биомассы будет равна скорости ее вымывания из аппарата, а скорость притока субстрата за вычетом оттока остаточного суб-

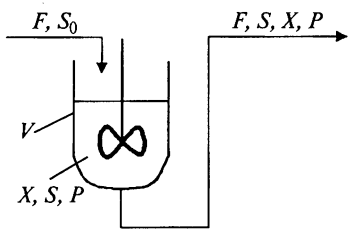


Рис. 9.3. Схема хемостатного непрерывного процесса ферментации

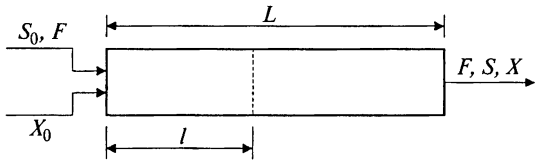


Рис.9.1. Схема тубулярного непрерывного процесса ферментации

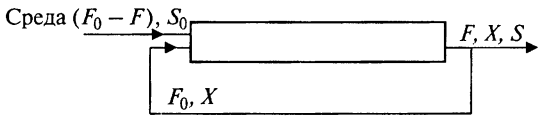


Рис. 9.2. Схема тубулярного непрерывного процесса с рециркуляцией посевного материала

Преимуществом тубулярного процесса является возможность более полного исчерпания субстрата (как и в периодическом процессе), *недостатком* — невозможность организовать аэрацию во всех зонах по длине аппарата, большая склонность к инфицированию.

9.2. ХЕМОСТАТНЫЙ ПРОЦЕСС НЕПРЕРЫВНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

В хемостатном процессе ферментация протекает в аппарате с мешалкой. В аппарат с постоянной скоростью подводится свежая питательная среда; из аппарата непрерывно с той же скоростью отводятся ферментационная среда, содержащая биомассу, продукт метаболизма и остатки субстрата (рис. 9.3).

Предполагают, что в любой точке аппарата и на выходе из него концентрации S, X и P равны.

Интересно, что на вход в аппарат не подают непрерывно посевной материал. Засев производится единовременно при запуске культуры от периодического процесса, а далее биомасса непрерывно сохраняется в ферментере и специального подсева не нужно.

Для описания закономерностей хемостатного процесса необходима математическая модель, описывающая кинетику процесса.

Примем для простоты следующие допущения:

$$\mu = \frac{\mu_m S}{K_S + S} \quad \text{(по Моно);} \tag{9.3}$$

$$\tilde{\mu} = 0 \text{ (отсутствует диссимиляция биомассы);} \tag{9.4}$$

$$Q_P = 0 \text{ (нет образования продукта метаболизма);} \tag{9.5}$$

$$D(S_0 - S) - \frac{1}{Y_{XS}}\mu X = 0. \qquad (9.20)$$

Поскольку $\mu = D$, получаем:

$$X = Y_{XS}(S_0 - S), \qquad (9.21)$$

или

$$X = Y_{XS}\left(S_0 - \frac{K_S D}{\mu_m - D}\right). \qquad (9.22)$$

Графические зависимости между установившимися значениями X и S в хемостатном процессе и скоростью разбавления D называют *хемостатными кривыми* (рис. 9.5).

Хемостатная кривая $X(D)$ имеет особенность: концентрация биомассы снижается до нуля при повышении скорости разбавления до некоторого критического значения и при более высоких скоростях разбавления остается равной нулю. Физически это означает, что культура *вымывается*. Выходит больше биомассы, чем может вырасти.

Определим, при каких значениях $D_{кр}$ происходит вымывание культуры:

$$X = Y_{XS}\left(S_0 - \frac{K_S D}{\mu_m - D}\right) = 0; \qquad (9.23)$$

$$S_0 = \frac{K_S D_{кр}}{\mu_m - D_{кр}}; \qquad D_{кр} = \frac{\mu_m S_0}{K_S + S_0}. \qquad (9.24)$$

Отсюда следует, что вид хемостатной кривой зависит от S_0. При $D = 0$

$$X = Y_{XS} S_0. \qquad (9.25)$$

Таким образом, и начальное положение хемостатной кривой, и точка вымывания зависят от концентрации субстрата в свежей среде (подпитке) S_0. Эта величина наряду со скоростью разбавления является параметром, с помощью которого оператор может управлять процессом. Чем больше S_0, тем выше концентрация биомассы в выходном потоке, причем в довольно широком диапазоне скоростей разбавления концен-

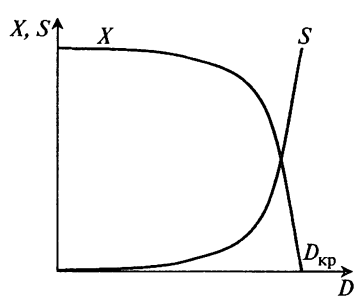


Рис. 9.5. Хемостатные кривые $X(D)$ и $S(D)$ в стационарном состоянии

трация биомассы сохраняется почти на постоянном высоком уровне, лишь немного снижаясь с возрастанием скорости разбавления.

Интересную особенность имеет зависимость стационарной (остаточной) концентрации субстрата от начальной (входной) его концентрации. В уравнении (9.19) нет ничего, кроме D и кинетических констант μ_m и K_S. Из этого следует парадоксальный вывод: при любом изменении концентрации субстрата во входящем потоке S_0 в стационарном состоянии при заданной скорости разбавления устанавливается одна и та же остаточная концентрация субстрата S. Именно это свойство хемостата дало ему название: концентрация субстрата (химического соединения) стабилизируется сама по себе независимо от колебаний на входе.

Если же говорить о том, что же регулируется оператором извне, то это сама скорость разбавления. Поэтому этот процесс иногда называют «*спидостат*» (от английского *speed* — скорость).

Итак, мы знаем, как будут выглядеть кривые $X(D)$. Возникает вопрос: к чему стремиться? Здесь надо снова вспомнить о *производительности процесса* Q_X (количество биомассы, образующейся в единицу времени единицей объема среды в аппарате). Для непрерывного процесса

$$Q_X = DX, \tag{9.26}$$

или после подстановки выражения для X из (9.22):

$$Q_X = DY_{XS}\left(S_0 - \frac{K_S D}{\mu_m - D}\right). \tag{9.27}$$

Как и в периодическом процессе, практический интерес представляет определение условий (в данном случае — скорости разбавления D), при которых величина Q_X будет оптимальной.

Для определения экстремума необходимо приравнять нулю частную производную

$$\frac{\partial Q_x}{\partial D} = 0,$$

откуда

$$D_{\text{опт}} = \mu_m\left(1 - \sqrt{\frac{K_S}{S_0 + K_S}}\right). \tag{9.28}$$

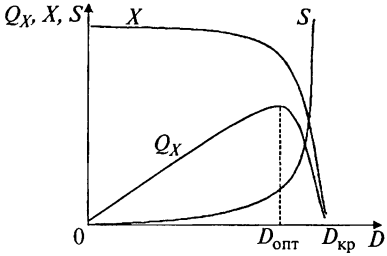


Рис. 9.6. Зависимость производительности по биомассе Q_X в хемостатном процессе, концентрации биомассы X и остаточной концентрации субстрата в аппарате S от скорости разбавления D

$t = t_к$ в уравнение (9.33), получаем:

$$\ln X_m = \ln X_0 + \mu_m (t_к - t_0). \tag{9.34}$$

Отсюда

$$t_к = \frac{1}{\mu_m} \ln \frac{X_m}{X_0} + t_0 \tag{9.35}$$

и

$$Q_x = \frac{X_m}{t_к} = \frac{X_m \mu_m}{\ln \frac{X_m}{X_0} + t_0 \mu_m}. \tag{9.36}$$

Для непрерывного процесса в том же аппарате производительность по биомассе определяется по-другому.

Чтобы найти максимально возможную производительность непрерывного процесса в том же аппарате, в котором проводили и периодический процесс, надо проанализировать формулу (9.30) для $Q_{x\,опт}$. Из нее вроде бы следует, что чем больше задана концентрация субстрата на входе в аппарат, тем больше будет и оптимальная концентрация биомассы. Но это возрастание также не может быть бесконечным, и здесь пределом выступают массообменные возможности аппарата. Таким образом, работу можно проводить при концентрации биомассы не более X_m. Приближенно можно принять, что

$$D_{опт} \approx \mu_m, \text{ так как } K_S \ll S_0 \text{ и } K_S/S_0 \approx 0.$$

Тогда

$$\sqrt{\frac{K_S / S_0}{1 + K_S / S_0}} \approx \sqrt{\frac{0}{1+0}} \approx 0. \tag{9.37}$$

Подставляя (9.37) в уравнение (9.28), получаем:

$$D_{опт} \approx \mu_m.$$

И из уравнения (9.30)

$$Q_{непр} = D_{опт}\, X_{опт} \approx \mu_m\, X_m.$$

Определим соотношение $Q_{непр}/Q_{период}$:

$$\frac{Q_{непр}}{Q_{период}} = \frac{X_m \mu_m}{X_m \mu_m \Big/ \left(\ln \frac{X_m}{X_0} + t_0 \mu_m \right)} = \ln \frac{X_m}{X_0} + t_0 \mu_m. \tag{9.38}$$

На рис. 9.6 показано, что производительность по биомассе в хемостатном процессе сначала возрастает до $D_{опт}$, а затем резко падает.

При оптимальной скорости разбавления $D_{опт}$ концентрация биомассы составляет:

$$X_{опт} = Y_{XS}\left[S_0 + K_S - \sqrt{K_S\ (S_0 + K_S)}\right]. \qquad (9.29)$$

Само же значение оптимальной продуктивности

$$Q_{опт} = D_{опт} X_{опт} \approx D_{опт} Y_{XS} S_0, \qquad (9.30)$$

так как величина $S \ll S_0$.

9.3. СРАВНЕНИЕ ПРОИЗВОДИТЕЛЬНОСТИ ПЕРИОДИЧЕСКОГО И НЕПРЕРЫВНОГО ПРОЦЕССОВ

При сравнении «дадим фору» периодическому процессу. Предположим, что после загрузки и до самого конца процесса биомасса растет с максимальной скоростью $\mu = \mu_m$. Однако учтем, что рост начинается после подготовки аппарата, загрузки среды и посевного материала и лаг-фазы — с момента времени t_0.

Рост биомассы описывается уравнением

$$\frac{dX}{dt} = \mu_m X \quad (\text{при } t > t_0); \qquad (9.31)$$

здесь

$$X = X_0 e^{\mu_m (t - t_0)}; \qquad (9.32)$$

$$\ln X = \ln X_0 + \mu_m (t - t_0). \qquad (9.33)$$

Предположим, что рост идет до некоей максимальной для данного аппарата концентрации биомассы X_m (концентрация биомассы не может возрастать до бесконечности, так как при этом возникают ограничения по массообменным возможностям аппарата; каждый аппарат имеет свой предел). Достижение этой концентрации происходит в момент времени $t_к$ (для периодического процесса). Графически картина роста биомассы при принятых допущениях представлена на рис. 9.7. Подставляя $X = X_m$ и

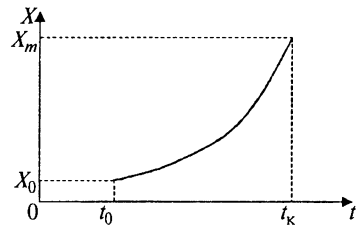


Рис. 9.7. К определению максимальной производительности по биомассе периодического процесса ферментации

Индексы «непр» и «период» относятся к непрерывному и периодическому процессам соответственно.

Упростим решение (подставим обычные значения параметров).

В начале процесса инокулят обычно составляет по объему около 5 % от объема среды, а концентрация биомассы в нем примерно такая же, как в конце ферментации — X_m. Отсюда

$$\frac{X_m}{X_0} \approx 20; \quad \ln\frac{X_m}{X_0} \approx 3. \tag{9.39}$$

После подстановки в соотношение (9.38) получаем:

$$\frac{Q_{\text{непр}}}{Q_{\text{период}}} \approx 3 + t_0\mu_m. \tag{9.40}$$

Примем $t_0 = 10$ ч (это время подготовки аппарата к следующей ферментации).

Для быстро растущих культур (бактерии, дрожжи)

$$\mu_m = 0{,}5 \text{ ч}^{-1}; \tag{9.41}$$

$$Q_{\text{непр}}/Q_{\text{период}} \approx 8.$$

Для медленно растущих культур (грибы, актиномицеты)

$$\mu_m = 0{,}05 \text{ ч}^{-1}; \tag{9.42}$$

$$Q_{\text{непр}}/Q_{\text{период}} \approx 3{,}5.$$

Вывод: непрерывный процесс имеет более высокую продуктивность по биомассе, чем периодический.

9.4. ОТКЛОНЕНИЯ ОТ ТЕОРИИ ХЕМОСТАТА ПРИ ЛИМИТИРОВАНИИ ПРОЦЕССА РАЗЛИЧНЫМИ СУБСТРАТАМИ

Хемостатные кривые $X(D)$ чувствительны к изменению кинетических зависимостей, происходящему при лимитировании процесса различными субстратами.

Углерод. Отклонение от классической хемостатной кривой (снижение концентрации биомассы при малых скоростях разбавления) связано с повышенным расходом субстрата на поддержание жизнедеятельности микроорганизмов при малых удельных скоростях роста биомассы. Если решить систему уравнений (9.13), (9.14) с учетом затрат на поддержание жизнедеятельности, получится хемостатная кривая, приведенная на рис. 9.8, *а*.

страта равна скорости его расходования на рост микроорганизмов. При этом

$$\frac{dX}{dt} = 0; \qquad (9.15) \qquad \frac{dS}{dt} = 0. \qquad (9.16)$$

Решая при этих условиях уравнение баланса биомассы, получаем:

$$mX - DX = 0 \quad \text{и} \quad \mu = D. \qquad (9.17)$$

Итак, в установившемся состоянии удельная скорость роста становится равной скорости разбавления D (это управляемый параметр, его задает оператор).

Если в установившемся состоянии в момент времени t_0 по каким-либо причинам $\mu \neq D$, возникает переходный процесс по биомассе (рис. 9.4).

Из уравнения (9.11) следует, что если при этом μ станет больше D, то скорость роста биомассы в аппарате $dX/dt > 0$, и биомасса возрастает (кривая *2* на рис. 9.4). При этом она потребляет из среды больше субстрата, концентрация его снижается, уменьшается и μ. Устанавливается новое равновесие $\mu = D$ при большей концентрации биомассы.

Если величина μ станет меньше D, то $dX/dt < 0$, и концентрация биомассы начнет снижаться и, соответственно, будет возрастать концентрация субстрата. При этом новое установившееся состояние будет при более низкой концентрации биомассы (кривая *3* на рис. 9.4).

Таким образом в хемостате осуществляется *саморегулирование*.

Эти процессы представлены на рис. 9.4.

Определим теперь концентрацию субстрата и биомассы в установившемся процессе в хемостате.

С учетом (9.17) можно записать:

$$\mu = D, \text{ или } \frac{\mu_m S}{K_S + S} = D, \qquad (9.18)$$

откуда

$$S = \frac{K_S D}{\mu_m - D}; \qquad (9.19)$$

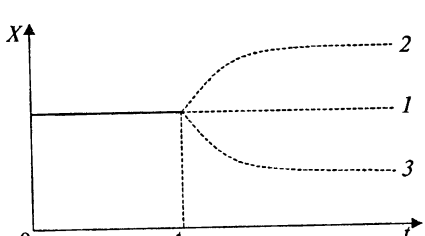


Рис. 9.4. Переходные процессы, возникающие в непрерывном хемостатном процессе при изменении скорости разбавления или удельной скорости роста биомассы:

1 — исходное состояние культуры и продолжение процесса после $t = t_0$ при $\mu_1 = D$; *2* — переходный процесс при увеличении μ в момент времени $t = t_0$ при $\mu_2 > D$; *3* — переходный процесс при снижении μ в момент времени $t = t_0$ при $\mu_3 < D$

9.5. ХЕМОСТАТНЫЙ ПРОЦЕСС КУЛЬТИВИРОВАНИЯ, ЛИМИТИРОВАННЫЙ КИСЛОРОДОМ

Как правило, кинетика роста аэробных культур микроорганизмов зависит не от одного субстрата, а от двух. Вторым субстратом, влияние которого часто преобладающее, является кислород. Общая зависимость может быть представлена в виде альтернативного уравнения

$$\mu = \min\left\{\frac{\mu_m S}{K_S + S}, \frac{\mu_m C}{K_C + C}\right\}. \tag{9.43}$$

Если ферментационное оборудование недостаточно интенсивное, эта зависимость вырождается в однофакторную зависимость от концентрации растворенного кислорода C:

$$\mu = \frac{\mu_m C}{K_C + C}. \tag{9.44}$$

Уравнение баланса биомассы в непрерывном процессе с лимитированием кислородом такое же, как при лимитировании обычным субстратом, только вместо концентрации негазообразного субстрата S в уравнении использована концентрация растворенного кислорода C:

$$\frac{dX}{dt} = \frac{\mu_m C X}{K_C + C} - DX. \tag{9.45}$$

Из условия стационарности $dX/dt = 0$ можно найти значение установившейся концентрации растворенного кислорода:

$$C = \frac{DK_C}{\mu_m - D}. \tag{9.46}$$

Уравнение материального баланса для субстрата дополняется поступлением кислорода за счет массопередачи в жидкую фазу:

$$\frac{dC}{dt} = K_L a\ (C^* - C) - \frac{1}{Y_{XC}} \frac{\mu_m C X}{K_C + C} + D\ (C_0 - C). \tag{9.47}$$

Растворение — Потребление — Поступление и отвод со средой

Последним членом уравнения в связи с низкой растворимостью кислорода в жидкости можно пренебречь.

Для стационарного состояния ($dC/dt = 0$) можно записать:

$$K_L a\ (C^* - C) = \frac{1}{Y_{XC}} DX. \tag{9.48}$$

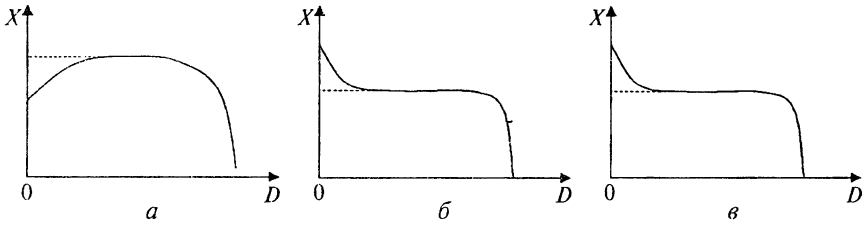


Рис. 9.8. Вид хемостатной кривой при лимитировании процесса источником углерода (*а*), азота или серы (*б*), магния, фосфора или калия (*в*). Пунктиром представлена зависимость для идеального хемостата

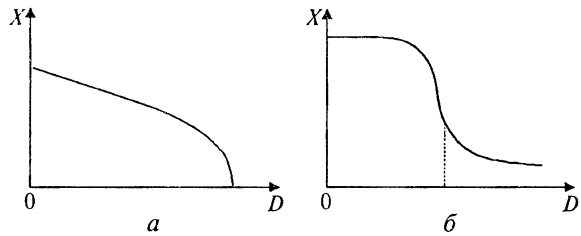


Рис. 9.9. Вид хемостатной кривой на сложных органических средах неопределенного состава (*а*) и при наличии пристеночного роста биомассы (*б*)

Азот или сера. Наблюдаемые отклонения отражают превышение концентрации биомассы при малых скоростях разбавления по сравнению с идеальным хемостатом (рис. 9.8, *б*). Клетки при малой скорости роста накапливают резервные соединения, и по массе их как бы становится больше. Такими соединениями могут быть полисахариды, полиоксибутират, липиды. Такой режим лимитирования в обиходе называют «жировым». Если выражать концентрацию биомассы не в г/л, а в числе клеток на литр, получается обычная форма графика.

Магний, фосфор, калий. По виду хемостатная кривая (рис. 9.8, *в*) похожа на кривую для азота, но причина подобного отклонения здесь другая: клетки, растущие медленно, требуют меньше РНК, чем быстрорастущие.

Сложная среда. На неопределенных по составу питательных средах происходит при различных скоростях разбавления изменение лимитирования (переход с лимитирования одним субстратом на лимитирование другим). Хемостатная кривая (рис. 9.9, *а*) не имеет участка плато, а все время снижается с повышением скорости разбавления. При этом изменяется и биохимический состав биомассы.

Пристеночный рост биомассы. Хемостатная кривая в этом случае (рис. 9.9, *б*) имеет аномально длинный «хвост», рост биомассы возможен даже при $D > \mu_m$ (так как растущая на стенках биомасса не вымывается).

так как снижается скорость сорбции кислорода. Однако при некотором достаточно малом значении скорости разбавления концентрация негазообразного субстрата в соответствии с (9.50) снижается настолько, что начинает лимитировать рост биомассы. При этом зависимость $Q_x(D)$ приобретает вид, характерный для хемостата. Этот участок изображен пунктирной линией.

Таким образом, в этом случае оптимальной скоростью разбавления является как раз точка переключения лимитирования с растворенного в жидкости субстрата S на кислород.

Повышение величины $K_L a$ (т. е. массообменных возможностей аппарата) позволяет сдвинуть эту точку вправо и получить более высокую производительность процесса по биомассе.

9.6. АВТОСЕЛЕКЦИЯ В НЕПРЕРЫВНОМ ПРОЦЕССЕ

В ходе процесса культивирования под воздействием космических лучей и различных мутагенных факторов в культуре происходят изменения, в результате которых может появиться штамм, имеющий более высокую удельную скорость роста, чем исходный. С этого момента оба штамма начинают конкурировать за субстрат. На рис. 9.12 изображены кинетические зависимости $\mu_1(S)$ и $\mu_2(S)$ для двух штаммов.

Если процесс протекает при скорости разбавления D_1, то исходный штамм обеспечивает саморегулирование процесса при концентрации S_1. Если вначале процесс стабилизирован на уровне S_1, то для штамма-мутанта $\mu_2(S_1) = D_2$ значительно больше D_1. Следовательно, концентрация биомассы этого штамма растет:

$$\frac{dX_2}{dt} = \left[\mu_2(S_1) - D_1\right] X > 0. \qquad (9.54)$$

Рост происходит до тех пор, пока концентрация субстрата не снизится до S_2. При этом исходный штамм станет вымываться из аппарата, поскольку $\mu_1(S_2) < D_1$, и тогда

$$\frac{dX_1}{dt} = \left[\mu_1(S_2) - D_1\right] X < 0. \qquad (9.55)$$

Если наблюдать за концентрацией биомассы в непрерывном процессе культивирования, то можно заметить скачкообразное повышение концентрации, сви-

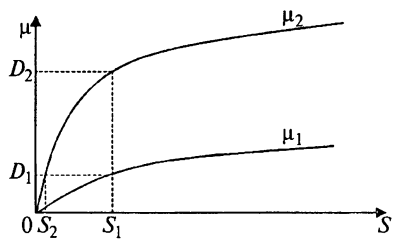


Рис. 9.12. Изменение концентрации остаточного субстрата в непрерывном процессе при замещении штамма 1 штаммом 2

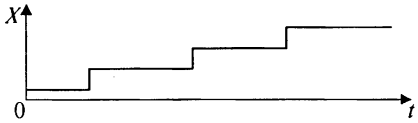


Рис. 9.13. Внешнее проявление автоселекции в непрерывном процессе

детельствующее о самопроизвольной селекции (автоселекции) новых штаммов (рис. 9.13).

Итак, длительный непрерывный процесс культивирования может быть использован для отбора штаммов, обеспечивающих более высокую скорость роста биомассы микроорганизмов.

Надо отметить, что улучшение штаммов по удельной скорости их роста не всегда полезно. При этом иногда происходит ухудшение качества белка и других компонентов клетки, а также снижение ее способности к биосинтезу полезных метаболитов.

9.7. ХЕМОСТАТ С РЕЦИРКУЛЯЦИЕЙ БИОМАССЫ КЛЕТОК

Одним из недостатков хемостата является его склонность к вымыванию культуры. Действительно, для получения высокой производительности необходимо работать при оптимальной скорости разбавления $D_{опт}$, близкой к критической $D_{кр}$. В таких условиях при случайном уменьшении концентрации субстрата на входе или неточном задании протока D может начаться необратимое вымывание культуры из аппарата.

Для борьбы с этим явлением предложено использовать комплекс «ферментер—сепаратор» (рис. 9.14). В этом комплексе выходящая из ферментера жидкость сгущается на сепараторе, и часть сгущенного потока непрерывно возвращается в ферментер, остальная часть идет как товарный продукт. Осветленная жидкость сбрасывается в стоки.

Свежая среда поступает с расходом F_0 и концентрацией субстрата S_0 в ферментер с объемом рабочей жидкости V, где концентрации биомассы X и субстрата S и удельная скорость роста μ одинаковы в каждой его точке. Из-за рециркуляции жидкости из сепаратора (которую рассмотрим позже) поток из ферментера больше, чем входной; он равен F с концентрацией биомассы X.

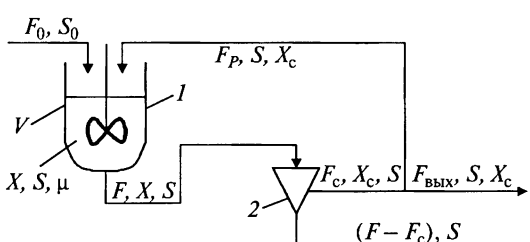


Рис. 9.14. Схема потоков в хемостате с рециркуляцией биомассы клеток:

1 — ферментер; *2* — сепаратор

На сепараторе биомасса сгущается в b раз, т. е. ее концентрация X_c в выходном потоке равна bX. Концентрация же субстрата при этом не меняется и составляет S. Из сепаратора выходят два потока: один — сгущенная биомасса с расходом F_c, второй — осветленная или отработанная жидкость с практически нулевой концентрацией биомассы. При этом расход отработанной жидкости составит $(F - F_c)$ с концентрацией субстрата S.

Материальный баланс биомассы в сепараторе позволяет найти связь между F_c и F:

$$FX = F_c bX \quad \text{или} \quad F_c = \frac{1}{b} F. \tag{9.56}$$

Поток сгущенной жидкости после сепаратора раздваивается. Часть его возвращается в ферментер с расходом F_P, концентрацией биомассы bX и субстрата S;

$$F_P = aF_0, \tag{9.57}$$

где a — коэффициент рециркуляции, причем $0 \le a \le 1$.

Выходящий поток из системы $F_{вых}$ равен:

$$F_{вых} = F_c - F_P. \tag{9.58}$$

С учетом (9.56) и (9.57) получаем:

$$F_{вых} = \frac{1 + a - ab}{b} F_0. \tag{9.59}$$

Поскольку по определению

$$X_c = bX, \tag{9.60}$$

производительность комплекса «ферментер—сепаратор» равна:

$$Q_{компл} = X_c F_{вых} = (1 + a - ab) F_0 X. \tag{9.61}$$

Составляем материальный баланс по субстрату:

$$\frac{dS}{dt} = F_0 S_0 + aF_0 S - (1+a) F_0 S - \frac{1}{Y_{XS}} \mu XV. \tag{9.62}$$

Принимая для стационарного состояния $dS/dt = 0$, получаем:

$$X = \frac{D}{\mu} Y_{XS} (S_0 - S). \tag{9.63}$$

Материальный баланс биомассы в ферментере в стационарном состоянии:

$$F_P X_c - FX + V\mu X = 0. \tag{9.64}$$

Поскольку

$$F = F_0 + F_P \tag{9.65}$$

и скорость разбавления D равна

$$D = F_0/V, \tag{9.66}$$

из уравнений (9.64), (9.57), (9.60), (9.65) и (9.66) можно найти выражение для удельной скорости роста в ферментере:

$$\mu = (1 + a - ab)D. \tag{9.67}$$

Поскольку $b > 1$ по определению, в данной системе удельная скорость роста микроорганизмов меньше скорости разбавления D (в одиночном хемостате эти величины равны).

Совместное решение уравнений (9.63) и (9.67) дает выражение для концентрации биомассы:

$$X = \frac{Y_{XS}(S_0 - S)}{1 + a - ab}. \tag{9.68}$$

Поскольку $b > 1$, концентрация биомассы при рециркуляции в ферментер выше, чем в обычном хемостате (при $a = 0$) и той же концентрации субстрата в исходной среде.

Подставляя выражение (9.68) для X в уравнение (9.61), получаем:

$$Q_{\text{компл}} = Y_{XS}F_0(S_0 - S). \tag{9.69}$$

Связь концентрации субстрата в ферментере со скоростью разбавления можно определить исходя из уравнения Моно:

$$\mu = \frac{\mu_m S}{K_S + S}, \tag{9.70}$$

откуда

$$S = \frac{\mu K_S}{\mu_m - \mu}. \tag{9.71}$$

Подставляя в это выражение соотношение (9.67) для μ, получаем:

$$S = \frac{(1 + a - ab)DK_S}{\mu_m - (1 + a - ab)D}. \tag{9.72}$$

Из (9.72) следует, что при работе комплекса «ферментер—сепаратор» концентрация субстрата на выходе из ферментера S уменьшается по сравнению с обычным хемостатом (при $a = 0$), а про-

Для стационарного состояния

$$\frac{dX_2}{dt} = 0; \qquad (9.79) \qquad \frac{dS_2}{dt} = 0. \qquad (9.80)$$

Подставляя обозначения, получаем:

$$D_{12}X_1 + \mu_2 X_2 - D_2 X_2 = 0; \qquad (9.81)$$

$$D_{12}S_1 + D_{22}S_0 - D_2 S_2 - \frac{1}{Y_{XS}}\mu_2 X_2. \qquad (9.82)$$

Отсюда

$$\mu_2 = D_2 - D_{12}\frac{X_1}{X_2}; \qquad (9.83)$$

$$X_2 = X_1 + \frac{D_2 - \mu_2}{D_{12}}. \qquad (9.84)$$

С другой стороны,

$$\mu_2 = \frac{\mu_m S_2}{K_S + S_2}, \qquad (9.85)$$

и

$$S_2 = \frac{\mu_2 K_S}{\mu_m - \mu_2} = \frac{(D_2 - D_{12}\frac{X_1}{X_2})K_S}{\mu_m - (D_2 - D_{12}\frac{X_1}{X_2})}. \qquad (9.86)$$

В случае, когда подпитки во второй аппарат нет, т. е. $F_2 = 0$ и $D_{22} = 0$, можно найти соотношение между S_2 и S_1:

$$S_2 = \frac{D_{12}}{D_2}S_1 - \frac{1}{Y_{XS}D_2}\mu_2 X_2 \qquad (9.87)$$

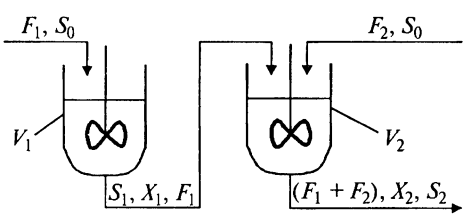


Рис. 9.15. Схема потоков в двухстадийном хемостате

Тогда

$$D_2 = D_{12}, \text{ так как } F_2 = 0. \qquad (9.88)$$

Отсюда

$$S_2 = S_1 - \frac{1}{Y_{XS}}(X_2 - X_1). \qquad (9.89)$$

изводительность системы по биомассе $Q_{компл}$ при этом увеличивается.

Отсюда вытекают основные направления использования рассматриваемого комплекса:

повышение производительности системы непрерывного культивирования, если этого невозможно достичь просто за счет повышения исходной концентрации субстрата S_0, например при очистке сточных вод или утилизации малоконцентрированных растворов субстрата;

более полное потребление из среды субстрата.

9.8. ДВУХСТАДИЙНЫЙ ХЕМОСТАТ

Двухстадийным хемостатом называют два последовательно соединенных аппарата непрерывного культивирования, при котором среда, выходящая из первого аппарата, поступает во второй. Кроме того, имеется дополнительная подпитка свежим субстратом во втором аппарате. Схема двухстадийного хемостата представлена на рис. 9.15.

В общем случае объемы двух аппаратов V_1 и V_2 различны.

Нет смысла анализировать первый по ходу потока аппарат — у него все так же, как в одностадийном хемостате.

Для второго аппарата балансовые уравнения выглядят иначе:

$$\frac{dX_2}{dt} = \underset{\text{Приток биомассы}}{\frac{F_1}{V_2}X_1} - \underset{\text{Отток биомассы}}{\frac{F_1+F_2}{V_2}X_2} + \underset{\text{Прирост биомассы}}{\mu_2 X_2}; \qquad (9.73)$$

$$\frac{dS_2}{dt} = \underset{\substack{\text{Приток из}\\ \text{1-го аппарата}}}{\frac{F_1}{V_2}S_1} + \underset{\substack{\text{Приток}\\ \text{с подпиткой}}}{\frac{F_2}{V_2}S_0} - \underset{\text{Отток}}{\frac{F_1+F_2}{V_2}S_2} - \underset{\text{Потребление}}{\frac{1}{Y_{XS}}\mu_2 X_2}, \qquad (9.74)$$

где V_2 — объем культуральной жидкости во втором ферментере; F_2 — объемная скорость подачи свежей среды во второй ферментер; X_2 — концентрация биомассы во втором ферментере; S_2 — концентрация субстрата во втором ферментере; F_1 — объемная скорость подачи культуральной жидкости из первого ферментера; X_1 — концентрация биомассы в первом ферментере; S_1 — концентрация субстрата в первом ферментере; μ_2 — удельная скорость роста микроорганизмов во втором ферментере.

Примем обозначения:

$$D_{12} = F_1/V_2; \qquad (9.75) \qquad D_{22} = F_2/V_2; \qquad (9.76)$$

$$D_2 = \frac{F_1+F_2}{V_2}; \qquad (9.77) \qquad D_1 = F_1/V_1. \qquad (9.78)$$

Отсюда

$$X = \frac{K_L a Y_{XC}}{D}\left(C^* - \frac{DK_C}{\mu_m - D}\right). \qquad (9.49)$$

Концентрация негазообразного субстрата S, хотя и не лимитирует процесс, также зависит от D:

$$S = S_0 - X/Y_{XS}, \qquad (9.50)$$

или

$$S = S_0 - \frac{K_L a}{D}\left(C^* - \frac{DK_C}{\mu_m - D}\right)\frac{Y_{XC}}{Y_{XS}}. \qquad (9.51)$$

Производительность хемостата определяется формулой

$$Q_X = DX = K_L a Y_{XC}\left(C^* - \frac{DK_C}{\mu_m - D}\right). \qquad (9.52)$$

Следовательно, производительность существенно зависит от величин $K_L a$ и C^*.

Критическая скорость разбавления $D_{кр}$ определяется по выражению

$$D_{кр} = \frac{\mu_m C^*}{K_C + C^*} \text{ (при этом } X = 0). \qquad (9.53)$$

Полученные зависимости представлены на рис. 9.10.

На рис. 9.11 показано, что в данном случае с возрастанием коэффициента разбавления продуктивность все время снижается,

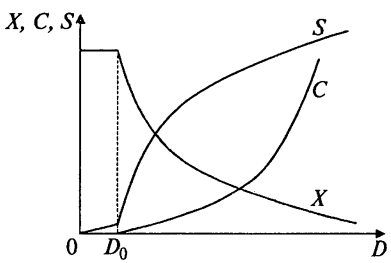


Рис. 9.10. Зависимость стационарных концентраций биомассы X, растворенного кислорода C и нелимитирующего негазообразного субстрата S от скорости разбавления в хемостате при лимитировании кислородом; D_0 — скорость разбавления, при которой происходит переход от лимитирования негазообразным субстратом к лимитированию кислородом

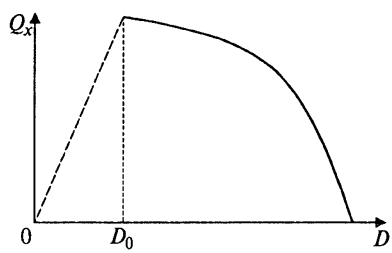


Рис. 9.11. Зависимость продуктивности по биомассе от скорости разбавления в хемостате с лимитированием по кислороду

9.9. МЕТОД ИМПУЛЬСНЫХ ДОБАВОК ДЛЯ ПОДБОРА ОПТИМАЛЬНОЙ СРЕДЫ В ХЕМОСТАТЕ

В непрерывном процессе разные субстраты можно подавать раздельно, меняя их расходы.

На рис. 9.16 представлена ситуация, когда в ферментер подаются четыре потока различных субстратов — F_1, F_2, F_3 и F_4 с концентрациями S_1, S_2, S_3 и S_4 соответственно.

При этом очевидно, что выходящий из аппарата поток жидкости F равен сумме входных потоков:

$$F = F_1 + F_2 + F_3 + F_4. \qquad (9.90)$$

Возможна также ситуация, когда наряду с потоками субстратов в аппарат подается поток воды F_0, величина которого является преобладающей.

Тогда изменение расходов отдельных субстратов мало влияет на общую скорость разбавления. Это влияние можно нивелировать, если изменять подачу воды так, чтобы общий поток F сохранялся постоянным:

$$F = F_0 + F_1 + F_2 + F_3 + F_4. \qquad (9.91)$$

Было бы хорошо иметь возможность быстро обнаруживать, как культура реагирует на изменение в подаче того или иного источника питания (F_1, F_2 и т. д.). Однако концентрация биомассы меняется медленно, и к тому же ее трудно измерять. В связи с этим для аэробных процессов используют другой параметр, пропорциональный общей скорости роста биомассы Q_X. Этот параметр — интенсивность дыхания культуры, или скорость потребления кислорода, или образования углекислого газа.

Обычно удобнее измерять скорость образования углекислого газа Q_{CO_2}, или, точнее, общее количество углекислого газа G_{CO_2} (на весь объем ферментера).

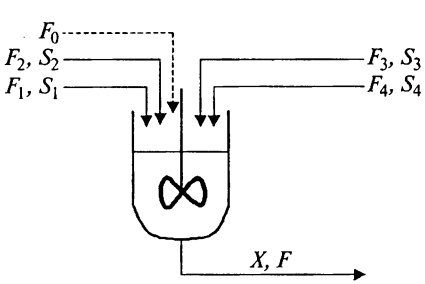


Рис. 9.16. Схема хемостата с раздельной подачей компонентов питательной среды

Для этого измеряют расход воздуха $F_{возд}$ и концентрацию CO_2 в выходящем потоке воздуха C_{CO_2}. Эту концентрацию (объемную) измеряют с помощью непрерывно работающих газоанализаторов, а расход — с помощью расходомера:

$$G_{CO_2} = F_{возд} \frac{C_{CO_2}\ [\%(об.)]}{100\ [\%]}. \qquad (9.92)$$

Обычно расход воздуха поддерживают постоянным, так

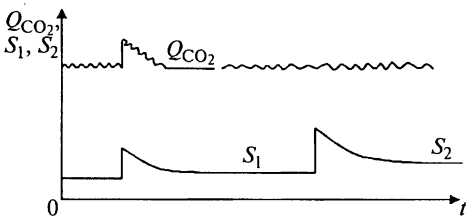


Рис. 9.17. Изменение интенсивности дыхания (Q_{CO_2}) при импульсной подаче лимитирующего (S_1) и нелимитирующего (S_2) субстратов

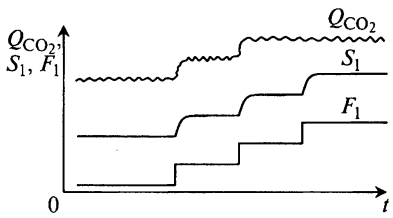


Рис. 9.18. Изменение интенсивности дыхания во времени при последовательном наращивании скорости дозирования лимитирующего субстрата

что для определения скорости образования CO_2 достаточно просто непрерывно определять его концентрацию в выходящем воздухе.

Метод импульсных добавок заключается в следующем. В аппарат вносят дозу одного из субстратов сверх его непрерывной подачи. При этом концентрация этого субстрата сначала кратковременно возрастает, а затем снижается до исходного уровня. Интенсивность дыхания тоже кратковременно возрастает и как бы повторяет кривую изменения концентрации субстрата (S_1 на рис. 9.17), если в среде имеет место его недостаток. Если недостатка нет, то никакого эффекта добавление субстрата не вызывает (см. рис. 9.17 для субстрата S_2).

Таким образом можно перепробовать разные субстраты и выяснить, какого из них не хватает.

Далее можно последовательно менять *скорость подпитки* субстрата и наблюдать за изменением интенсивности дыхания. Изменение расхода субстрата F_1 прекращается, если очередное его увеличение не привело к увеличению интенсивности дыхания (рис. 9.18).

На графике (рис. 9.18) представлено изменение во времени расхода подаваемого субстрата F_1, его концентрации в среде S_1 и интенсивности дыхания Q_{CO_2}. После 3-го повышения скорости подпитки увеличения интенсивности дыхания не произошло, поэтому принято решение в дальнейшем не увеличивать подачу субстрата.

Метод импульсных добавок является удобным способом корректировки подачи субстратов в непрерывном хемостате.

9.10. НЕПРЕРЫВНОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ С ВНЕШНИМ РЕГУЛИРОВАНИЕМ ПАРАМЕТРОВ

Мы рассматривали различные способы хемостатного непрерывного культивирования, в котором регулировался только поток свежей питательной среды, а стабилизация параметров процесса

осуществлялась за счет *саморегулирования*. Такой способ регулирования имеет определенные пределы и при колебаниях концентрации субстрата на входе, характеристик культуры и самого подаваемого потока может приводить либо к новому установившемуся состоянию, либо даже к полному вымыванию культуры из аппарата. Как альтернатива хемостату предложены различные варианты непрерывного процесса ферментации с *внешним контуром регулирования* процесса. Рассмотрим варианты таких процессов.

Турбидостат. Скорость разбавления в аппарате не поддерживается на постоянном уровне, а регулируется в зависимости от концентрации биомассы (рис. 9.19). Если концентрация биомассы начинает уменьшаться, скорость разбавления снижается, и наоборот. Один из способов измерения концентрации биомассы — определение степени поглощения светового потока суспензией. Такой способ называется турбидиметрическим. Отсюда и название «турбидостат». Правда, турбидиметрический способ измерения для высоких концентраций биомассы, для сред окрашенных или с включениями твердых частиц типа муки работает плохо. Но *турбидостатом* называют процесс, где регулируется концентрация биомассы, каким бы образом она ни измерялась.

Респиростат. Уже говорилось о том, что с помощью газоанализаторов кислорода или углекислого газа можно измерять интенсивность дыхания культуры. Эта величина, следуя уравнению материального баланса, пропорциональна росту, образованию продукта и поддержанию жизнедеятельности:

$$Q_{O_2} \approx Q_{CO_2} \approx \frac{1}{Y_{XS}} DX + \frac{1}{Y_{XS}} PX + m_S X . \qquad (9.93)$$

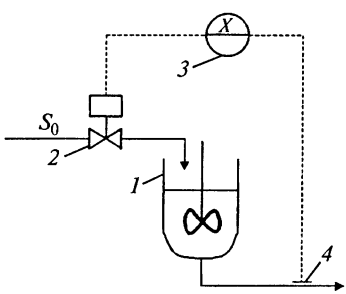


Рис. 9.19. Схема процесса непрерывного культивирования микроорганизмов с внешним контуром регулирования подачи субстрата по концентрации биомассы:

1 — ферментер; *2* — регулирующий клапан или насос-дозатор; *3* — регулятор; *4* — датчик концентрации биомассы

Из этого соотношения видно, что Q_{CO_2} пропорциональна концентрации биомассы. Поэтому, регулируя интенсивность дыхания, можно регулировать и концентрацию биомассы, а следовательно, скорость подачи субстрата.

На рис. 9.20 представлена зависимость Q_{CO_2} от скорости разбавления. Анализируя ее, можно предложить способ управления. Задается определенная величина интенсивности дыхания, близкая к максимальной, на левой или правой ветви кривой. В зависимости от этого и закон регулирования будет различен: при сниже-

Обратим внимание на следующие **особенности двухстадийного хемостата**:

1. Удельная скорость роста биомассы во втором аппарате μ_2 не равна скорости разбавления, как в одностадийном хемостате, а меньше ее. Следовательно, концентрация биомассы во втором аппарате никогда не может стать равной нулю при любом разбавлении.

Задавая высокую скорость разбавления во втором аппарате D_2, можно не беспокоиться, что произойдет вымывание культуры. Значение μ_2 будет возрастать, и будет возрастать экономический коэффициент Y_{XS}.

2. Концентрация субстрата во втором аппарате всегда меньше, чем в первом. Это ясно и из физических соображений: для дополнительного прироста биомассы требуется субстрат, который расходуется из запаса, имеющегося во входящем потоке.

Это очень важная характеристика объекта. Часто бывает не так важна производительность процесса по биомассе, как снижение концентрации остаточного субстрата. Пример: выращивание кормовых дрожжей на парафинах нефти. Остаточный субстрат вместе с биомассой идет в кормовой продукт, но то, что хорошо для микроорганизмов, — не всегда хорошо для животных. Или возьмем систему очистки стоков. Здесь остаточная концентрация субстрата, ее снижение — цель всего процесса.

3. Концентрация биомассы во втором аппарате всегда больше, чем в первом, что также очевидно. Ведь уже существующая в первом аппарате биомасса X_1 проходит через второй аппарат транзитом, а к ней добавляется приросшая в нем биомасса.

4. Общая продуктивность двухстадийного хемостата не превышает суммарной продуктивности эквивалентной по объему системы из двух параллельно работающих одностадийных хемостатов. Но при этом больше концентрация биомассы в выходном потоке, что облегчает выделение и концентрирование биомассы. И другая особенность, о которой мы уже говорили: снижается остаточная концентрация субстрата.

5. Важная особенность двухстадийного и многостадийного хемостатов: последующие аппараты должны *быть более интенсивными* по массопередаче кислорода, так как они «обслуживают» большую концентрацию биомассы.

6. И наконец, двухстадийный хемостат часто оказывается удобным для тех процессов, в которых целевым продуктом является не биомасса, а продукт метаболизма.

Обычно для оптимального протекания процессов биосинтеза продуктов метаболизма требуются условия, отличающиеся от фазы роста микроорганизмов: более низкая скорость протока, меньшая концентрация в среде лимитирующего субстрата.

В этом случае в первом аппарате поддерживают условия, оптимальные для роста микроорганизмов, а во втором — для биосинтеза продуктов метаболизма.

ется таким образом, чтобы величина pH поддерживалась на некотором постоянном уровне. Этот способ называют *pH-стат.* При этом, конечно, исключают регулирование pH другими способами — подачей в аппарат щелочи или кислоты.

Нутристат. В этом способе подача питательной среды в аппарат осуществляется так, чтобы поддерживать заданное значение концентрации субстрата S. Мы уже видели, что в хемостате специально следить за концентрацией субстрата не нужно — она устанавливается сама собой в зависимости от скорости разбавления:

$$S=\frac{K_S D}{\mu_m - D}. \qquad (9.97)$$

Другая ситуация возникает, когда удельная скорость роста μ зависит от концентрации субстрата S не по уравнению Моно, а, например, по уравнению Андрюса, т. е. когда функция $\mu(S)$ проходит через экстремум (рис. 9.23).

Для обеспечения максимальной скорости роста в этом случае концентрацию субстрата необходимо поддерживать на некотором оптимальном уровне S_{opt} (S_X или S_P — в зависимости от цели культивирования) в неустойчивом диапазоне. На этом уровне самопроизвольно концентрация субстрата не установится — при колебаниях она «скатится» в меньшую или большую сторону. Точно так же трудно поддерживать необходимую концентрацию в зоне ингибирования роста, если эта повышенная концентрация способствует оптимальной скорости биосинтеза продукта метаболизма. Вот тут и помогает *нутристат,* из самого названия которого (*nutrition* по-английски — питание) понятно, что речь идет о поддержании концентрации питательного субстрата в аппарате на постоянном уровне. Этот способ имеет неудобство: необходимо непрерывно измерять концентрацию субстрата в аппарате, что не всегда просто осуществить.

Теплостат. Обычно в ходе процесса температура поддерживается на некотором постоянном уровне путем регулирования подачи охлаждающей воды в рубашку или змеевик аппарата. При увеличении теплового потока Q_H^+ повышается температура, регулятор увеличивает скорость подачи охлаждающей воды, увеличивается при этом также и скорость теплоотвода Q_H^-, что позволяет сохранить равновесие, т. е. равенство Q_H^+ и Q_H^-.

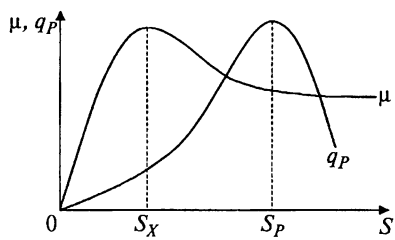


Рис. 9.23. Экстремальные зависимости роста микроорганизмов (μ) или биосинтеза продукта (q_P) от концентрации субстрата

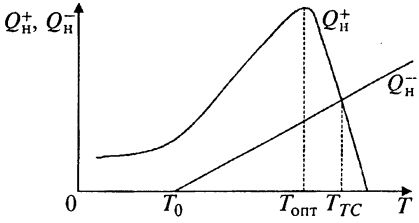


Рис. 9.24. Зависимость скорости тепловыделения $Q_н^+$ и скорости отвода тепла $Q_н^-$ в аппарате без внешнего контура регулирования температуры

Скорость тепловыделения $Q_н^+$ обычно связана с ростом микроорганизмов. Зависимость $Q_н^+$ от температуры (рис. 9.24) подобна зависимости удельной скорости роста от температуры.

Эта зависимость имеет пологий участок подъема, довольно острый экстремум и крутой ниспадающий участок при увеличении температуры выше оптимального уровня $T_{опт}$. В обычном процессе температуру поддерживают на уровне $T_{опт}$. В *теплостате* же она самопроизвольно устанавливается на уровне $T = T_{TC}$, при котором скорость биологического тепловыделения равна скорости отвода тепла в окружающую среду.

При отсутствии внешнего контура регулирования температуры отвод тепла обеспечивается лишь самопроизвольными теплопотерями в окружающую среду:

$$Q_н^- = KF(T - T_0), \qquad (9.98)$$

где K — коэффициент теплопередачи; F — поверхность теплопередачи; T и T_0 — температура в аппарате и в окружающей среде соответственно.

На рис. 9.24 это уравнение представлено прямой, которая пересекается с кривой $Q_н^+(T)$ при $T = T_{TC}$.

Из рисунка видно, что $T_{TC} > T_{опт}$. Хотя при этом процесс ферментации как-то идет (правда, медленно, с фактически постоянной скоростью роста), вряд ли стоит рекомендовать такой способ для использования. Гораздо проще (и точнее) регулировать обычным способом температуру на данном более высоком уровне, если вдруг по каким-то причинам при повышенных температурах выделяется некоторый ценный продукт.

9.11. ПРЕИМУЩЕСТВА И НЕДОСТАТКИ НЕПРЕРЫВНОГО СПОСОБА КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Ниже указаны преимущества и недостатки непрерывного способа культивирования микроорганизмов по сравнению с периодическим способом.

ПРЕИМУЩЕСТВА

1. Рост биомассы можно поддерживать неопределенно долго.
2. Можно исключить влияние физических или химических фак-

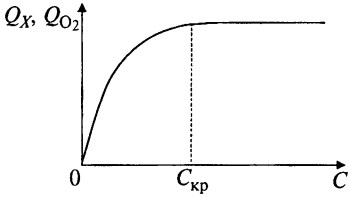


Рис. 9.21. Зависимость скорости роста и/или интенсивности дыхания от концентрации растворенного кислорода

следствие – скорость потребления кислорода) уже практически не зависит от величины C. Поэтому в таком способе и поддерживают концентрацию растворенного кислорода на уровне, близком к $C_{кр}$.

Из уравнения (9.95) можно выразить величину C в явном виде:

$$C = C^* - Q_{O_2} / K_L a. \qquad (9.96)$$

Концентрация C^* для обычных условий может считаться постоянной. Величиной $K_L a$ управляют, изменяя режимные параметры аэрации и перемешивания — расход воздуха, скорость вращения мешалки. Однако в случае оксистата этот способ воздействия на концентрацию кислорода не применяется. Коэффициент массопередачи уже должен быть выведен на максимально возможный для данного аппарата уровень. Воздействие же на C осуществляется опосредованно — путем воздействия на скорость потребления кислорода Q_{O_2} за счет изменения скорости подачи свежей среды в аппарат. При этом изменяется и концентрация негазообразного субстрата S, соответствующим образом изменяя величины Q_X и Q_{O_2}.

На рис. 9.22 представлена схема такого способа ведения непрерывного процесса ферментации, известного также как способ Господки (по фамилии ученого, предложившего его в начале 60-х годов XX в.). Называют его и *оксистат*, при этом в названии отражена его основная характеристика. Этот способ позволяет наилучшим образом использовать массообменные характеристики аппарата по кислороду.

pH-стат. Рост микроорганизмов зачастую сопровождается выделением в среду некоторых кислот (закислением). Замедление же роста при недостатке субстрата вызывает, наоборот, защелачивание культуры, выражающееся в повышении pH. В некоторых процессах величина pH используется как параметр, в зависимости от которого в аппарат подается питательная среда. Скорость подачи при этом регулиру-

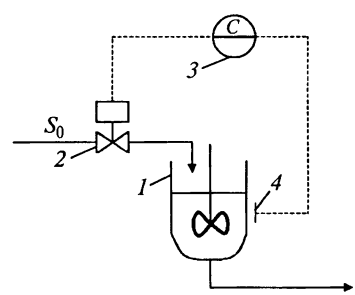


Рис. 9.22. Схема процесса непрерывного культивирования микроорганизмов с внешним контуром регулирования подачи субстрата по концентрации растворенного кислорода в аппарате:

1 — ферментер; *2* — регулирующий клапан или насос-дозатор; *3* — регулятор; *4* — датчик растворенного кислорода

торов на рост и на образование продукта при постоянной скорости роста.

3. Можно за счет разбавления поддерживать постоянную концентрацию биомассы.

4. Можно длительно поддерживать рост, лимитированный одним заданным субстратом, и изучать влияние лимитирования на состав клеток и их активность.

5. Состав среды можно оптимизировать методом импульсных добавок.

6. При непрерывном культивировании удобно определять кинетические константы, выход биомассы.

7. Результаты, полученные при непрерывном культивировании, часто более надежны и воспроизводимы, чем в периодическом процессе.

8. Процесс имеет большую производительность и относительно малое непродуктивное время (лишь в период запуска).

9. Облегчены механизация и автоматизация.

10. При постоянстве технологических режимов постоянно и качество продукта.

11. Невысокий износ измерительных приборов в связи со стерилизацией.

12. Снижается опасность контакта обслуживающего персонала с микроорганизмами.

13. Непрерывные процессы можно использовать для автоселекции микроорганизмов.

НЕДОСТАТКИ

1. Меньшая гибкость, регулировать можно лишь некоторые параметры (скорость разбавления, среду, концентрацию кислорода, температуру).

2. Более высокие требования к постоянству качества сырья.

3. Бóльшие капитальные вложения (непрерывная стерилизация среды, автоматизация и т. д.).

4. Трудно обеспечить непрерывное дозирование нерастворимых твердых субстратов.

5. Больше опасность инфицирования из-за большей длительности культивирования.

6. Возможность «вырождения» культуры (за счет автоселекции) из-за большого времени культивирования.

7. Не всегда можно достичь оптимального выхода продуктов метаболизма, не связанных с ростом.

8. Пристеночный рост и агрегатирование клеток могут вызвать вымывание культуры из аппарата.

9. Трудно культивировать в непрерывном режиме мицелиальные культуры из-за их вязкости и гетерогенности.

27. Респиростат: какое значение интенсивности дыхания должно в нем поддерживаться?

28. Оксистат: как в нем поддерживается концентрация растворенного кислорода?

29. Оксистат: как влияет на ход процесса изменение подачи воздуха, давления в аппарате, интенсивность перемешивания?

30. pH-стат: что используется в этом процессе в качестве управляющего воздействия — подача щелочи или кислоты?

31. Нутристат: в чем его отличие от хемостата?

32. Теплостат: какое значение температуры самопроизвольно устанавливается при отключении контура регулирования?

33. Расскажите о преимуществах и недостатках непрерывного культивирования.

нии интенсивности дыхания в точке D_1 величину D надо повышать, а в точке D_2 — понижать, чтобы сохранить Q_{CO_2} на заданном уровне. Поскольку «дыхание» по-английски — respiration, такой способ называют *респиростатом*.

Еще лучше не поддерживать дыхание на постоянном уровне, а все время искать скорость разбавления, обеспечивающую его максимум. Этот алгоритм управления легко реализуется с помощью современных систем автоматизации.

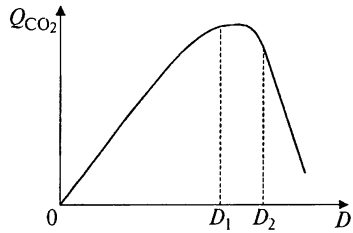


Рис. 9.20. Зависимость интенсивности дыхания в процессе непрерывного культивирования от скорости разбавления

Оксистат. В этом способе регулирования подачу питательной среды в аппарат (скорость разбавления) осуществляют таким образом, чтобы поддерживать постоянное, относительно малое значение концентрации растворенного кислорода в среде.

Скорость потребления кислорода Q_{O_2} пропорциональна сумме его затрат на рост биомассы, образование продукта и поддержание жизнедеятельности культуры:

$$Q_{O_2} = \frac{1}{Y_{XO}} Q_X + \frac{1}{Y_{PO}} Q_P + m_0 X. \qquad (9.94)$$

Поддерживая Q_{O_2} на максимально возможном уровне, максимизируем производительность процесса.

Величина Q_{O_2} связана с концентрацией растворенного кислорода соотношением:

$$Q_{O_2} = K_L a (C^* - C), \qquad (9.95)$$

где $K_L a$ — коэффициент массопередачи между газом и жидкостью, определяемый характеристиками аппарата; C^* — концентрация растворенного кислорода при полном насыщении жидкости кислородом (она зависит от концентрации кислорода в воздухе, давления и свойств среды, определяющих растворимость кислорода).

Согласно этому уравнению максимальная величина Q_{O_2} имеет место при минимальной концентрации растворенного кислорода C. Однако не следует забывать, что, как всякий субстрат, растворенный кислород влияет на скорость роста биомассы и через него — на Q_{O_2}, часто по зависимости Моно (рис. 9.21).

Форма этой зависимости такова, что при возрастании C скорость роста биомассы сначала увеличивается очень быстро, но выше некоторого значения $C_{кр}$, обозначаемого как «критическая» концентрация растворенного кислорода, скорость роста (и как

10. Непрерывный процесс предъявляет повышенные требования к надежности оборудования.

Вопросы для повторения

1. Расскажите о тубулярном процессе непрерывного культивирования микроорганизмов, его сходстве с периодическим процессом ферментации.
2. Назовите недостатки тубулярного процесса непрерывного культивирования микроорганизмов.
3. Опишите хемостатный процесс непрерывного культивирования с одиночным реактором.
4. Почему в хемостатном непрерывном процессе не требуется подачи посевного материала?
5. Приведите математический анализ хемостатного процесса на основе модели Моно.
6. Как зависит от начальной концентрации субстрата при постоянной скорости протока концентрация биомассы микроорганизмов и остаточная концентрация субстрата?
7. Как зависит концентрация биомассы и остаточная концентрация субстрата от скорости разбавления при постоянной концентрации субстрата на входе?
8. Как доказать, что удельная скорость роста биомассы в хемостатном процессе равна скорости разбавления?
9. Что происходит с хемостатным процессом, если скорость роста культуры возрастает или снижается по сравнению со скоростью разбавления?
10. Как осуществляется саморегулирование в хемостате?
11. Как определить скорость разбавления, при которой происходит вымывание культуры из хемостатного процесса?
12. При какой скорости разбавления производительность по биомассе в хемостате является максимальной?
13. Как сравнить производительность по биомассе непрерывного хемостатного процесса и периодического процесса ферментации?
14. В каком процессе производительность по биомассе больше: в хемостатном или в периодическом процессе ферментации?
15. Как изменяются хемостатные кривые при лимитировании различными субстратами и при клеточном росте на стенках аппарата?
16. Как изменяется хемостатная кривая в случае лимитирования роста культуры растворенным кислородом?
17. Чему равна критическая скорость разбавления при лимитировании роста культуры кислородом?
18. При какой скорости разбавления производительность хемостата, лимитированного кислородом, максимальна?
19. Как объяснить явление автоселекции в непрерывном хемостате?
20. Что произойдет, если новый мутант растет с меньшей скоростью, чем исходная культура?
21. Дайте анализ хемостата с рециркуляцией биомассы клеток. Как изменяется производительность в сравнении с обычным хемостатом?
22. Двухстадийный хемостат: как изменяются концентрации биомассы и субстрата во втором аппарате?
23. Двухстадийный хемостат: увеличивается ли суммарная продуктивность двух аппаратов по сравнению с двумя одиночными?
24. Расскажите о методе импульсных добавок для подбора оптимальной среды в хемостате, о вариантах пробной дозы и пробной скорости дозирования одного из субстратов.
25. Чем отличается обычный хемостат от хемостата с внешним контуром регулирования?
26. В чем состоит суть турбидостата? В чем его отличие от хемостата? преимущества и недостатки?

вещества, или — в случае необходимости уменьшения концентрации — добавлением стерильной воды.

Как ни странно, не очень важную роль в управлении процессом играет концентрация биомассы микроорганизмов. Этот параметр характеризует результат процесса, а не условия его проведения. Учитывая, что изменяется он довольно медленно, непосредственное его использование в контуре управления довольно затруднительно. То же самое можно сказать и о концентрациях целевых продуктов метаболизма. Их целесообразно контролировать, учитывать, но не поддерживать на определенном уровне.

Если значения концентраций кислорода и углекислого газа в выходящем воздухе умножить на значение расхода воздуха через аппарат, то можно получить интенсивность дыхания (выделения CO_2) и скорость потребления кислорода культурой микроорганизмов. Эти параметры довольно быстро реагируют на многие управляющие воздействия и поэтому могут быть использованы в качестве косвенных параметров управления процессом.

Перечисленные технологические параметры являются основными параметрами, используемыми для управления процессом ферментации. Простейшие схемы управления построены как совокупность контуров регулирования температуры, давления, расхода воздуха, величины pH, уровня жидкости и пены в аппарате и реже — концентраций растворенного кислорода и различных субстратов в среде.

10.2. ФОРМУЛИРОВАНИЕ ЗАДАЧИ ОПТИМИЗАЦИИ ПРОФИЛЕЙ ИЗМЕНЕНИЯ РЕЖИМНЫХ ПАРАМЕТРОВ ВО ВРЕМЕНИ

Поскольку периодический и полупериодический процессы являются нестационарными (в них все параметры изменяются во времени), логично ожидать, что и значения режимных параметров должны изменяться во времени, а не быть постоянными, как в непрерывных процессах.

Подбор переменных во времени профилей параметров трудно проводить методами статистического планирования эксперимента (хотя и возможно). В этом случае каждый параметр распадается как бы на несколько отдельных параметров, характеризующих его значение в определенный период ферментации (для температуры эта ситуация представлена на рис. 10.1).

Число оптимизируемых факторов при этом резко возрастает, возрастает и число опытов, необходимых для экспериментального отыскания нужного профиля.

Кинетические модели дают больше возможностей для определения оптимальных профилей изменения режимных параметров во времени.

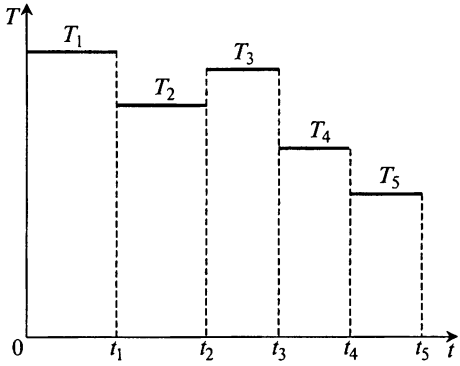


Рис. 10.1. Представление профиля изменения температуры во времени как совокупности постоянных значений температуры для различных участков ферментации:

T_1, T_2, T_3, T_4, T_5 — значения температур для временных диапазонов $0—t_1$, $t_1—t_2$, $t_2—t_3$, $t_3—t_4$, $t_4—t_5$ соответственно

Конкретизируем задачу оптимизации. Речь пойдет о процессах, в которых *целевым продуктом является не биомасса, а продукт метаболизма.* Критерием оптимальности таких процессов для простоты будем считать концентрацию продуктов метаболизма в конце ферментации (хотя возможны и другие критерии, которые мы рассматривали при оптимизации ферментационных сред).

Рассмотрим простейшую задачу оптимизации периодического процесса по одному *режимному параметру* (т. е. регулируемому в ходе всего процесса), например по температуре T.

Запишем простейшую систему кинетических уравнений:

$$\frac{dX}{dt} = X\mu(T); \qquad (10.1)$$

$$\frac{dP}{dt} = Xq_P(T); \qquad (10.2)$$

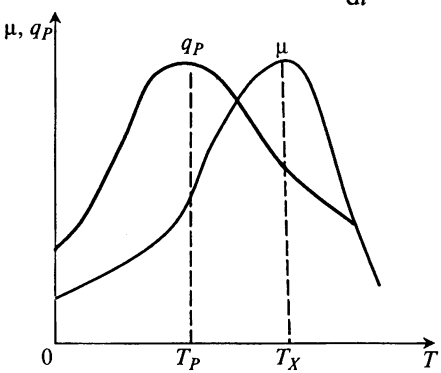


Рис. 10.2. Взаимное положение кинетических зависимостей роста (μ) и биосинтеза (q_P) от температуры при несовпадающих оптимумах

$P \to \max$ при $t = t_к$ (время цикла ферментации). (10.3)

Зависимость μ и q_P от температуры представим на одном графике. Пока не будем расшифровывать аналитический вид этих зависимостей.

В общем случае зависимости $\mu(T)$ и $q_P(T)$ имеют экстремальный характер, а значения температуры, оптимальные для роста микроорганизмов и для биосинтеза продукта, не совпадают (рис. 10.2). Температуру, оптимальную для

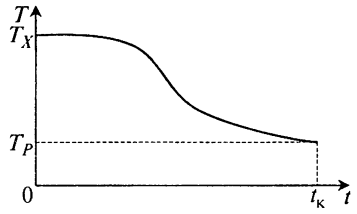


Рис. 10.6. Примерный вид оптимального профиля при управлении по дискордантному фактору

Здесь сразу можно отметить особый частный случай для *конкордантных* факторов. Профиль во времени конкордантного режимного параметра (фактора) вырождается в величину постоянную. Температура, являющаяся оптимальной как для роста, так и для биосинтеза продукта, должна поддерживаться в течение всего периода ферментации.

Более сложная ситуация возникает при несовпадающих оптимумах (для *дискордантных* факторов). В этом случае, как правило, необходимо иметь переменный во времени профиль температуры, изменяющийся от величины T_X, оптимальной для роста микроорганизмов, до величины T_P, оптимальной для биосинтеза продукта (рис. 10.6). Расчет этого профиля довольно сложен.

10.3. СТУПЕНЧАТЫЕ ПРОФИЛИ ИЗМЕНЕНИЯ РЕЖИМНЫХ ПАРАМЕТРОВ ПЕРИОДИЧЕСКОЙ ФЕРМЕНТАЦИИ

Можно вместо точного оптимального профиля рассчитать квазиоптимальный, в котором программа изменения во времени режимного параметра (температуры) заменена ступенчатой (рис. 10.7). В этой программе в начальный период ферментации параметр поддерживается оптимальным для роста биомассы, а затем происходит переключение (момент $t_п$) на значение, оптимальное для биосинтеза, которое и поддерживается до конца ферментации $t_к$:

$$T = \begin{cases} T_X & \text{при } 0 < t < t_п; \\ T_P & \text{при } t_п < t < t_к. \end{cases} \qquad (10.4)$$

Время $t_п$ переключения с одного участка на другой в такой программе можно определить, если известны значения μ:

$$\mu = \mu_X \text{ при } T = T_X \text{ (максимальная скорость роста);} \qquad (10.5)$$

$$\mu = \mu_P \text{ при } T = T_P \text{ (медленный рост до конца процесса).} \qquad (10.6)$$

Кроме того, необходимо знать ограничение X_{max}, определяемое характеристиками аппарата.

Очевидно, что при $t = t_к$

$$X \le X_{max}. \qquad (10.7)$$

В первом периоде ферментации (при $t < t_п$)

$$X = X_0 e^{\mu_X t}. \tag{10.8}$$

В точке переключения (при $t = t_п$)

$$X = X_0 e^{\mu_X t_п}. \tag{10.9}$$

В дальнейшем (при $t > t_п$) рост биомассы подчиняется выражению

$$X = \left[X_0 e^{\mu_X t_п} \right] e^{\mu_P (t - t_п)}. \tag{10.10}$$

При $t = t_к$

$$X = X_{max}; \tag{10.11}$$

$$X_{max} = \left(X_0 e^{\mu_X t_п} \right) e^{\mu_P (t_к - t_п)}, \tag{10.12}$$

откуда

$$t_п = \frac{1}{\mu_X - \mu_P} \left(\ln \frac{X_{max}}{X_0} - \mu_P t_к \right). \tag{10.13}$$

Аналогичным образом можно рассчитать оптимальную ступенчатую программу для величины pH, для концентрации субстрата и других параметров. Надо только знать комплекс значений всех факторов, оптимальный для роста, и другой комплекс — оптимальный для биосинтеза, и соответствующие удельные скорости роста μ_X и μ_P.

Приведем практический пример расчета квазиоптимальной программы управления по величине pH. На рис. 10.8 представлена

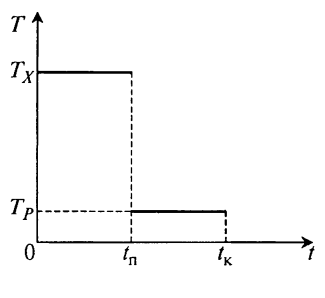


Рис. 10.7. Примерный вид оптимального профиля квазиоптимальной ступенчатой программы

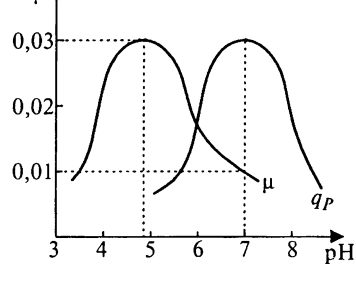


Рис. 10.8. Пример зависимости удельной скорости роста микроорганизмов и удельной скорости биосинтеза антибиотика от величины pH

Глава 10

УПРАВЛЕНИЕ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИМИ РЕЖИМАМИ ПЕРИОДИЧЕСКИХ И ПОЛУПЕРИОДИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ ФЕРМЕНТАЦИИ

●

Мы уже рассматривали задачу оптимизации состава питательных сред применительно к периодическим процессам ферментации. Однако система управления периодическими процессами не ограничивается подбором компонентов питательных сред и их концентраций.

10.1. ОСНОВНЫЕ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ И УПРАВЛЯЮЩИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ В ПРОЦЕССЕ ФЕРМЕНТАЦИИ

Вполне очевидно, что, поскольку на процесс ферментации оказывают влияние многие факторы, существует задача определения оптимальных значений этих факторов и управления ими.

К таким факторам относятся прежде всего температура и pH ферментационных жидкостей, давление в аппарате, уровень жидкости (а также и уровень пены) в аппаратах. Температуру обычно регулируют путем изменения подачи охлаждающей воды в змеевик или рубашку аппарата, величину pH — подачей в аппарат щелочи, аммиачной воды или кислоты. Давление в аппарате поддерживают на определенном уровне при помощи клапана, установленного на линии выхода воздуха из аппарата.

Важной характеристикой является обеспеченность культуры растворенным кислородом. Этот параметр измеряют с помощью специального датчика, и воздействовать на него можно тремя путями: изменяя скорость подачи воздуха в аппарат, частоту вращения мешалки или давление в аппарате. Для некоторых процессов имеет особое значение концентрация растворенного углекислого газа в аппарате, которая управляется теми же воздействиями, что и концентрация растворенного кислорода.

Важную роль в процессе ферментации играют концентрации различных питательных веществ, но не начальные их концентрации в питательной среде, а текущие концентрации, изменяющиеся в ходе процесса. К таким веществам можно отнести углеводы, азот, фосфор и другие компоненты. Их концентрацию можно поддерживать путем подачи в аппарат растворов, содержащих эти

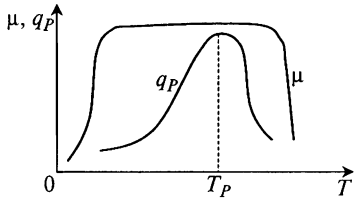


Рис. 10.3. Взаимное положение кинетических зависимостей при широком плато оптимума по росту (μ) и остром оптимуме по биосинтезу продукта (q_P), охватываемом диапазоном оптимального роста

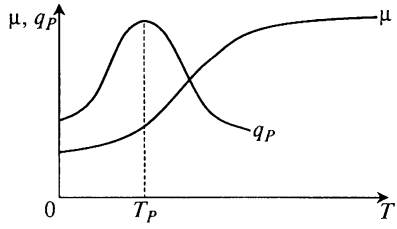


Рис. 10.4. Взаимное положение кинетических зависимостей при широком плато оптимума по росту (μ) и остром оптимуме по биосинтезу продукта (q_P) в зоне температур, не оптимальных для роста микроорганизмов

удельной скорости роста биомассы, обозначим T_X, а оптимальную для удельной скорости биосинтеза продукта — T_P. Возможны и другие варианты. Например, одна из зависимостей может представлять собой плато, охватывающее оптимум на второй (рис. 10.3), или одностороннее плато, выходящее за пределы оптимума второй зависимости (рис. 10.4), или, наконец, оптимумы зависимостей могут совпадать, т. е. $T_X = T_P$ (рис. 10.5).

Это соотношение оптимумов зависимостей μ и q_P от величины фактора является важным свойством процесса ферментации, в конечном счете определяющим характер режима управления процессом.

Конкордантными называются факторы, для которых положение оптимума биосинтеза продукта метаболизма находится в зоне, оптимальной и для роста биомассы микроорганизмов (рис. 10.3 и 10.5).

Дискордантными называются факторы, для которых оптимум по биосинтезу продуктов метаболизма не совпадает с оптимумом для роста микроорганизмов, т. е. $T_X \neq T_P$ (рис. 10.2 и 10.4).

Приведенные определения относятся не только к температуре, но и к любым другим факторам (технологическим параметрам), влияющим на рост биомассы микроорганизмов и биосинтез продукта метаболизма.

Хотя система уравнений (10.1)—(10.3) кажется простой, ее решение, как правило, возможно не аналитически, а с применением компьютерных программ.

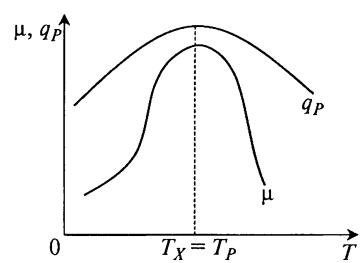


Рис. 10.5. Взаимное положение кинетических зависимостей с совпадающими положениями оптимума по росту микроорганизмов (μ) и биосинтезу продукта (q_P)

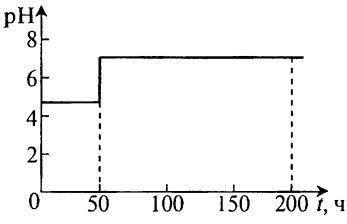


Рис. 10.9. Расчетная ступенчатая программа управления процессом ферментации для примера, рассмотренного в разделе 10.3

зависимость удельной скорости роста μ и удельной скорости биосинтеза антибиотика q_P от pH.

На рис. 10.8 можно определить, что оптимальные значения pH для роста биомассы $pH_X = 4{,}8$, а для биосинтеза антибиотика $pH_P = 7{,}0$. При этом в условиях, оптимальных для роста биомассы (pH 4,8), удельная скорость роста $\mu_X = 0{,}03\ ч^{-1}$, а в условиях, оптимальных для биосинтеза антибиотика (pH 7,0), $\mu_P = 0{,}01\ ч^{-1}$. Начальная концентрация биомассы в аппарате $X_0 = 2$ г/л, максимально допустимая для данного аппарата $X_{max} = 40$ г/л.

Задано также время ферментации $t_к = 200$ ч. Цифровая ось указана только для μ. Ось для величины q_P не представлена, поскольку цифровые значения q_P не играют роли для определения параметров ступенчатой программы управления.

Необходимо определить ступенчатую квазиоптимальную программу управления.

Имея эти значения, можно найти точку переключения квазиоптимальной программы $t_п$:

$$t_п = \frac{1}{\mu_X - \mu_P}\left(\ln\frac{X_{max}}{X_0} - \mu_P t_к\right) = \frac{1}{0{,}03 - 0{,}01}\left(\ln\frac{40}{2} - 0{,}01 \cdot 200\right) = 50\ ч.$$

Величина $t_к$ максимальна при $t_п = 0$:

$$t_к = \frac{1}{\mu_P}\ln\frac{40}{2} = \frac{1}{\mu_P} \cdot 3.$$

Если с начала до конца рост идет при pH = pH_X = 4,8, то $t_к$ = = 100 ч, а если при pH = pH_P = 7,0, то $t_к$ = 300 ч.

При заданном времени ферментации $t_к$ = 200 ч профиль pH соответствует показанному на рис. 10.9.

10.4. ОСОБЕННОСТИ РЕГУЛИРОВАНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ СУБСТРАТА В ПЕРИОДИЧЕСКИХ И ПОЛУПЕРИОДИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ ФЕРМЕНТАЦИИ

Несколько слов о случае, когда режимным параметром является концентрация субстрата. Если в начале процесса задать в среде концентрацию субстрата S_X, оптимальную для роста биомассы, то по мере роста биомассы концентрация субстрата снизится и для

6. Процесс более опасен для человека (аппарат чаще открывают, моют, что сопряжено с контактом человека с микроорганизмами и продуктами их жизнедеятельности).

Вопросы для повторения

1. Сформулируйте задачу обеспечения оптимальных профилей режимных параметров во времени.
2. Укажите недостатки методов планирования эксперимента для определения оптимального профиля режимных параметров в периодическом процессе ферментации.
3. Назовите варианты взаимного расположения оптимумов по режимному параметру для удельной скорости роста и удельной скорости биосинтеза продуктов метаболизма.
4. Что такое конкордантные и дискордантные факторы?
5. Что такое ступенчатая субоптимальная программа режимного параметра?
6. Дайте вывод формулы для определения времени переключения с оптимального роста биомассы на оптимальный биосинтез продукта метаболизма.
7. В чем состоят особенности реализации ступенчатых программ управления в случае поддержания профиля концентрации лимитирующего субстрата?
8. Назовите преимущества и недостатки периодических процессов с подпиткой субстратом.

Немного не доходя до точки переключения $t_п$, прекращают подачу субстрата, и он самопроизвольно потребляется до концентрации S_P, оптимальной для биосинтеза продукта. Далее концентрацию субстрата поддерживают на этом уровне с помощью подпиток субстратом, обычно с меньшей скоростью.

Хотя задачей регулирования является поддержание заданной концентрации субстрата, а не скорости подпитки, практически получается, что скорость подпитки u возрастает во времени по экспоненте. И концентрация биомассы возрастает по экспоненте из-за почти постоянной удельной скорости роста при постоянной величине S. Такие культуры часто называют «расширенными» или «экспоненциальными», в них фаза биосинтеза продлевается по сравнению со строго периодическими процессами без подпитки субстратом.

Мы уже упоминали, что концентрация субстрата — довольно неудобный параметр для непрерывного измерения. Поэтому в процессах с подпиткой распространены косвенные методы управления. Здесь можно отметить следующие варианты.

1. Заранее рассчитывается программа $u(t)$ изменения подпитки во времени, и субстрат подается в аппарат без информации о том, с какой скоростью его потребляет культура. Это может привести как к избытку, так и к недостатку субстрата в среде.

2. Субстрат подается по одному из косвенных параметров, связанных с ростом культуры. Это может быть величина pH, концентрация растворенного кислорода или интенсивность дыхания (подобно тому, как это делалось в pH-стате, оксистате и респиростате в непрерывных процессах).

Лучше всего, конечно, регулировать саму концентрацию субстрата, но об этом можно только мечтать.

Процесс с подпиткой субстратом не может продолжаться сколь угодно долго — в конце концов объем жидкости в аппарате возрастает, что не дает возможности продолжать подпитку.

В этом случае переходят к процессу с чередованием отбора части жидкости из аппарата с продолжением подпитки между отборами. Такой процесс называется *процессом ферментации с повторяющимися подпитками* (repeated fed-batch) и отличается от отъемно-доливного тем, что после отбора жидкости из аппарата не происходит долива свежей среды, а только продолжается прерванная подпитка одним из субстратов. Но и этот способ не решает всех проблем. В конце концов в среде накапливаются ингибирующие продукты метаболизма, и процесс останавливается. Возможна также нехватка ростового субстрата, отсутствующего в подпитке.

поддержание в ходе процесса ферментации оптимальной концентрации субстрата;

поддержание в ходе процесса ферментации оптимальных значений температуры и величины pH, причем не обязательно на постоянном уровне, а меняя их по определенной программе;

поддержание в ходе процесса оптимального режима по параметрам аэрации — концентраций в среде растворенного кислорода и растворенного углекислого газа;

поддержание оптимального режима перемешивания ферментационной жидкости в аппарате.

10.6. ПРЕИМУЩЕСТВА И НЕДОСТАТКИ ПЕРИОДИЧЕСКИХ И ПОЛУПЕРИОДИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ ФЕРМЕНТАЦИИ

Ниже приведены преимущества и недостатки периодических и полупериодических процессов ферментации.

ПРЕИМУЩЕСТВА

1. Малая стоимость аппарата и системы управления.
2. Гибкость — возможность наработки в одном биореакторе разных продуктов.
3. Время культивирования можно произвольно менять.
4. Процесс менее подвержен инфицированию и мутациям клеток из-за отсутствия протока и притока и из-за относительно малого времени ферментации.
5. Процесс удобен для получения малых количеств продукта.
6. Условия культивирования можно поддерживать в оптимуме как в фазе роста биомассы, так и в фазе биосинтеза продукта, причем оптимальные условия для биомассы и продукта могут быть различны.
7. Процесс удобен для реализации биосинтеза вторичных метаболитов.

НЕДОСТАТКИ

1. Необходимость приготовления посевного материала.
2. Велико непродуктивное время ферментации.
3. В связи с необходимостью частой стерилизации быстрее изнашиваются измерительные приборы, особенно датчики величины pH.
4. Производительность по биомассе и продукту часто ниже, чем в непрерывном процессе.
5. Труднее поддерживать необходимые параметры из-за нестационарности периодического процесса.

Глава 11

МАСШТАБИРОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ ФЕРМЕНТАЦИИ

●

11.1. ПОСТАНОВКА ЗАДАЧИ МАСШТАБИРОВАНИЯ

Изучение процессов ферментации в лабораторных условиях происходит сначала в колбах, затем в ферментерах лабораторного масштаба объемом 1—10 л, далее происходит испытание в опытных установках объемом 50, 100, 1000 л и более. Объемы промышленных установок зависят от вида продукта и от потребности в нем. Обычно речь идет уже о десятках кубометров — 10, 20, 50, 60, 100, отдельные аппараты имеют объемы свыше 1000 $м^3$ (для получения кормовых дрожжей).

Обычно в аппаратах разного масштаба используют одинаковые микроорганизмы и одинаковый состав питательных сред. Можно было бы ожидать, что в пересчете на единицу объема — литр, кубометр, миллилитр — количество получаемого продукта (биомассы или продуктов метаболизма) будет одинаковым или почти одинаковым в аппаратах разного масштаба.

Действительность, однако, не оправдывает таких прогнозов. Наоборот, очень часто в аппаратах разного масштаба и конструкции результаты процесса различаются, иногда в несколько раз.

В связи с этим в производственной практике возникает проблема масштабирования.

Масштабирование — это воспроизведение результатов, полученных на оборудовании одного размера (или одной конструкции), при проведении того же процесса в аппаратах другого (обычно большего) размера или другой конструкции.

Обиходный пример масштабирования дан в книге Джонатана Свифта «Путешествия Гулливера». Гулливер оказался пленником лилипутов, и у них возникла проблема кормления Гулливера. Их специалистами по масштабированию был разработан критерий масштабного перехода: Гулливеру давали 1728 лилипутских порций. Происхождение этой цифры таково. Гулливер был в 12 раз крупнее (т. е. выше ростом), чем лилипут. Очевидно, что масса и объем Гулливера и лилипута соотносились как $12^3 : 1 = 1728$.

Масштабирование оказалось удачным: Гулливер совершал множество всяких подвигов и в конце концов освободился от плена.

Другой пример не столь удачен, хотя по существу использовался тот же принцип масштабирования — по массе. Биологическая лаборатория в США проводила испытание действия препарата

10.5. ОПТИМИЗАЦИЯ ВРЕМЕНИ ЗАВЕРШЕНИЯ ПЕРИОДИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА ФЕРМЕНТАЦИИ

Как оценивать результат процесса? Прежде всего, конечно, по *количеству накопленной биомассы или продукта метаболизма* (в зависимости от того, что является целевым продуктом). Это количество пропорционально концентрациям $X_к$ или $P_к$ в конце ферментации ($t = t_к$). Однако чаще интересуются показателем, учитывающим *скорость образования продукта.*

Таким показателем является *средняя продуктивность* процесса, которая в простейшем случае определяется как

$$Q_X = X_к / t_к \text{ или } Q_P = P_к / t_к, \qquad (10.14)$$

где Q_X и Q_P — средние продуктивности по биомассе и по продукту метаболизма соответственно.

Графически эти отношения представляют собой тангенс угла наклона прямой, связывающей начало координат и точку К на кривой $X(t)$ при $t = t_к$ (рис. 10.13). На рисунке эта прямая не проведена.

Следует иметь в виду, что при этом время $t_к$ включает в себя как собственно время ферментации, так и время $t_п$, затрачиваемое на подготовительные операции (мойка, подготовка аппарата, загрузка среды и засев). Практически продуктивность означает количество полученного продукта с единицы объема аппарата в единицу времени, размерность продуктивности — г/(л · ч) или кг/(м^3 · ч).

Следует отметить, что заканчивать ферментацию в точке К, когда достигнута максимальная концентрация биомассы (или продукта метаболизма), по продуктивности нецелесообразно.

Если провести из начала координат касательную к кривой $X(t)$ (она проведена на рис. 10.13 пунктиром), то можно найти точку М (точку касания) и соответствующее ей время $t_м$. Если закончить ферментацию в момент времени $t_м$, то хотя концентрация биомассы $X_м$ меньше, чем $X_к$, продуктивность процесса $Q_X = X_м / t_м$ будет значительно больше, чем $Q_X = X_к / t_к$.

Назовем способы, при помощи которых можно улучшить ход процесса ферментации:

изыскание более продуктивного штамма-продуцента;

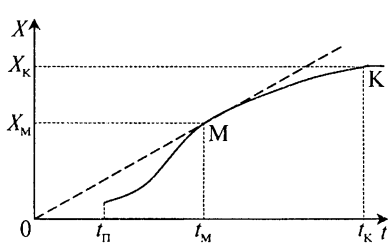


Рис. 10.13. К определению оптимального времени завершения процесса ферментации:

К — точка, соответствующая максимальному накоплению продукта; М — точка, в которой производительность по продукту максимальна

поддержания ее на оптимальном уровне нужно будет добавлять субстрат, т. е. осуществлять подпитку уже в первой фазе процесса.

Если же зависимость $\mu(S)$ имеет насыщение (подобно уравнениям Моно, Мозера и др.), то концентрацию S_0 можно сразу задать побольше в пределах плато, где влияние субстрата на скорость роста биомассы невелико или вообще отсутствует (рис. 10.10).

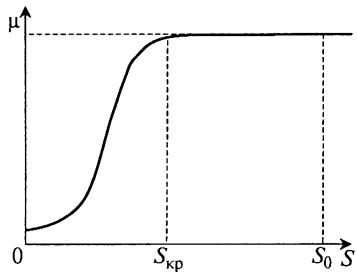


Рис. 10.10. Выбор диапазона регулирования концентрации субстрата при наличии плато на кинетической зависимости

Пока концентрация субстрата не снизится до величины $S_{кр}$, подпитку можно не производить.

Важно отметить, что трудно провести регулирование концентрации субстрата при необходимости резкого переключения на новое, более низкое ее значение. Изъять субстрат из среды нельзя. Приходится предоставить дело естественному ходу вещей, т. е. потреблению субстрата из среды без какого-либо внешнего регулирования (рис. 10.11). Это, конечно, не дает строго ступенчатой программы. Но мы не должны забывать, что эта ступенчатая программа — квазиоптимальная, так что плавное снижение концентрации субстрата для процесса, может быть, даже ближе к истинной оптимальной программе. При этом возможно, что начальной концентрации субстрата S_0 может вообще хватить до момента перехода на второй участок процесса.

Если же зависимость $\mu(S)$ имеет экстремум (например, уравнение Андрюса), то требуется подпитка субстрата с самого начала процесса для поддержания его на уровне S_X.

Реально добавление субстрата обычно идет не непрерывно, а некоторыми дозами, так что концентрация субстрата в аппарате во времени имеет пилообразный характер (рис. 10.12).

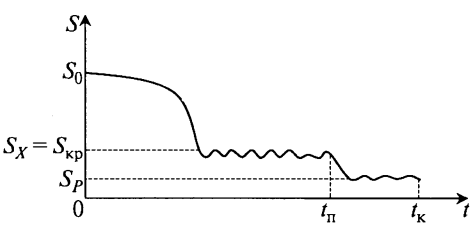


Рис. 10.11. Поддержание квазиоптимального профиля концентрации субстрата с использованием подпитки

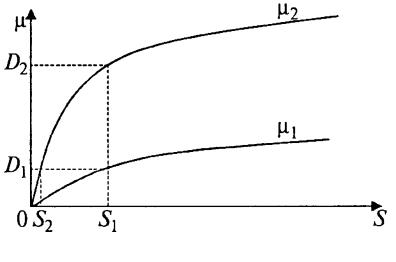


Рис. 10.12. Поддержание квазиоптимального профиля при дробном дозировании субстрата

ЛСД на различных животных. Как обычно принято при испытании лекарственных средств, сначала испытания проводят на мелких животных (мышах, крысах, кошках, кроликах), а затем переносят их на крупных животных и даже на человека; при подборе дозировки исходят из массы тела. Испытав препарат ЛСД на кошках, назначили дозировку для слона с учетом их разницы в весе в 30 000 раз. Результат оказался отличным от ожидаемого: слон зашатался и упал замертво, свидетельствуя тем самым, что проблема масштабирования не столь однозначна, как кажется.

Вернемся теперь к нашему процессу — процессу ферментации. Соотношение массы культуральной жидкости, например, в колбе (100 мл) и в производственном аппарате объемом 63 $м^3$ (объем жидкости 45 $м^3$) равно 450 000 : 1 — даже больше соотношения кошка : слон. Между тем именно с таким соотношением реально приходится работать, если не хочется осложнять себе жизнь и тратить время и деньги на испытания в большом ряду аппаратов промежуточных емкостей.

11.2. ПОДХОД К МАСШТАБИРОВАНИЮ НА ОСНОВЕ КОНЦЕНТРАЦИИ РАСТВОРЕННОГО КИСЛОРОДА

Основные предпосылки. Поскольку ход процесса определяется микроорганизмами, различия в ходе ферментации в аппаратах разного масштаба и конструкции следует искать в микроокружении микробных клеток. Концентрации питательных веществ, продуктов метаболизма, температура и pH вряд ли зависят от масштаба. Более естественным выглядит предположение о различии в концентрациях растворенного кислорода *C*.

Аэробные микроорганизмы не могут развиваться в отсутствие кислорода. Однако растворимость кислорода воздуха в воде очень невелика — 7 мг/л при 20 °C. Если жидкость (или среду) полностью насытить кислородом воздуха, а затем прекратить аэрацию, то многие промышленные культуры микроорганизмов «съедают» этот запас за 5—10 с. Поэтому требуется непрерывная подача воздуха в аппарат.

Надо заметить, что растворимость кислорода зависит еще и от давления воздуха, а вернее, от парциального давления кислорода в газовой фазе. Если, например, повысить давление воздуха в 2 раза, то и концентрация растворенного кислорода при насыщении жидкости воздухом также повысится в 2 раза. Если вместо воздуха для насыщения среды использовать чистый кислород, то концентрация растворенного кислорода возрастет почти в 5 раз — пропорционально парциальному давлению кислорода в воздухе и газообразном кислороде: (100 %) / (21 %) ≈ 4,8. Этот показатель — концентрацию растворенного кислорода — можно измерять с помощью специального датчика растворенного кислорода. Это очень важный прибор для процессов ферментации, хотя в обычных системах кон-

троля и автоматизации химических производств он используется довольно редко.

Профили изменения концентрации растворенного кислорода во времени. Концентрации растворенного кислорода, которые мы указывали ранее, — это концентрации в равновесном состоянии, при насыщении. В реальном процессе происходит непрерывное потребление растворенного кислорода из жидкости и одновременно его непрерывное растворение — массопередача из пузырей воздуха.

Надо иметь в виду важную особенность микробиологических процессов. Микроорганизмы не способны потреблять кислород напрямую из газовых пузырей. Они потребляют лишь растворенный кислород, т. е. кислород переходит в клетку микроорганизма через две ступени: массопередача из газа в жидкость и затем потребление уже растворенного кислорода из жидкости.

Чтобы повлиять на концентрацию растворенного кислорода в жидкости, необходимо изменить либо скорость продувания воздуха через аппарат, либо частоту вращения мешалки в аппарате; либо давление в нем.

Мы можем наблюдать за ходом изменения концентрации растворенного кислорода непрерывно в течение всей ферментации. Обычный ход кривой $C(t)$ представлен на рис. 11.1.

Эта кривая (профиль во времени) отражает разные потребности кислорода в разные периоды ферментации и, соответственно, баланс между подводом кислорода и его потреблением.

Можно, конечно, меняя скорость подачи воздуха и частоту вращения мешалки, поддерживать профиль во времени, например, в большом аппарате таким же, как в малом.

А можно вспомнить о том, что кислород, как и другие субстраты, влияет на процесс обычно по кривой с насыщением (рис. 11.2).

Тогда в ходе процесса достаточно поддерживать величину $C > C_{кр}$.

Обычно зависимость выхода за весь процесс ферментации (P или X) от поддерживаемой концентрации растворенного кислорода имеет вид графика, представленного на рис. 11.3.

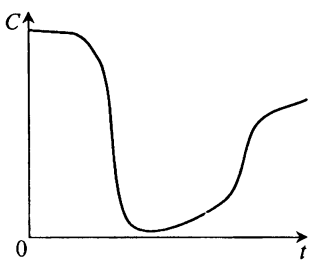


Рис. 11.1. Типичный профиль изменения концентрации растворенного кислорода во времени в ходе периодической ферментации

Повышение концентрации растворенного кислорода выше некоторой величины $C_{кр}$ не ухудшает процесс, но из экономических соображений удобно держать концентрацию поменьше. При высоких концентрациях в аппарат подается больше воздуха, больше скорость вращения мешалки, иногда приходится увеличивать давление и даже добавлять в воздух кислород.

Есть процессы, хотя их и немного, в которых повышение концентрации растворенного кислорода хуже не просто

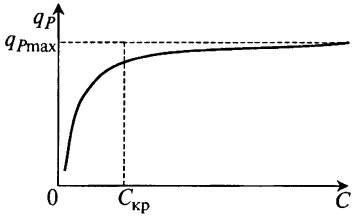


Рис. 11.2. Влияние концентрации растворенного кислорода на удельную скорость биосинтеза целевого продукта

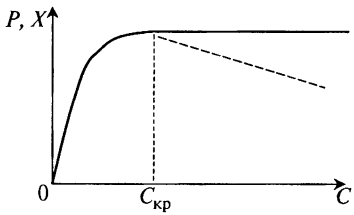


Рис. 11.3. Влияние концентрации растворенного кислорода на выход продукта или биомассы микроорганизмов

из-за перерасхода воздуха и энергии, но также и из-за снижения выхода (показано пунктиром на рис. 11.3).

Так в общем выглядит способ масштабирования процесса путем поддержания профиля растворенного кислорода во времени.

Проблема в том, что обслуживание датчика и прибора для измерения растворенного кислорода — довольно хлопотное дело, и часто на заводах их либо нет, либо отказываются от их регулярной эксплуатации.

Связь концентрации растворенного кислорода с условиями массопередачи. Как бы сделать так, чтобы этот профиль в аппарате большего масштаба выдерживался сам собой? Какую характеристику нужно поддерживать одинаковой в сравниваемых аппаратах, чтобы одинаковым был и кислородный профиль?

Для ответа на этот вопрос рассмотрим основное уравнение массопередачи кислорода в ферментере

$$Q_{O_2} = K_L a\left(C^* - C\right), \qquad (11.1)$$

где Q_{O_2}— скорость потребления кислорода единицей объема среды (кинетический параметр, аналогичный Q_S для негазообразного субстрата); $K_L a$ — объемный коэффициент массопередачи по кислороду; C^* — концентрация растворенного кислорода при насыщении; C — текущая концентрация растворенного кислорода.

Уравнение показывает, что в текущий момент времени скорость потребления кислорода равна его скорости растворения в жидкости из газового потока.

Интересно, что коэффициент $K_L a$ включает в себя площадь межфазной поверхности, поэтому его размерность включает в себя единицу объема.

Размерность Q_{O_2}:

$$\left[Q_{O_2}\right] = \left[\frac{\text{г } O_2}{\text{л} \cdot \text{ч}}\right] \text{ или } \left[\frac{\text{кг } O_2}{\text{м}^3 \cdot \text{ч}}\right] \text{ или } \left[\frac{\text{г} \cdot \text{моль } O_2}{\text{л} \cdot \text{ч}}\right].$$

Такими критериями являются удельная мощность, фиктивная линейная скорость газа, удельный объемный расход воздуха.

Удельная мощность $N_{уд}$, расходуемая на перемешивание жидкости в аппарате, равна:

$$N_{уд} = N/V. \tag{11.4}$$

Мы видим, что величина N/V входит в формулу (11.3) для определения K_La, хотя в формуле есть и другие члены. Отсюда вытекает, что масштабирование по удельной мощности перемешивания оказывается удачным для аппаратов, не слишком различающихся своей конструкцией и масштабом. Поскольку измерение или расчет удельной мощности выполнить просто, этот показатель довольно популярен. Однако из формулы (11.3) видно, что он очень уязвим из-за пренебрежения интенсивностью аэрации: получается, что удельная мощность может быть реализована даже без аэрации, только перемешиванием; величина же K_La при этом падает очень сильно. Конечно, это крайний случай, никто не предполагает отключения аэрации. Но пренебрежение ее величиной и различными значениями коэффициентов α и δ в формуле приводит к изменению связи K_La и $N_{уд}$ и к неправильному масштабированию.

Фиктивная линейная скорость газа, также присутствующая в приведенной выше формуле для расчета K_La, равна:

$$F_S = F_в/S. \tag{11.5}$$

По поводу этого параметра можно высказать те же предостережения, что и по величине $N_{уд}$. Здесь получается, что K_La, наоборот, не зависит от того, производится ли механическое перемешивание.

Удельный объемный расход воздуха равен:

$$F_{уд} = F_в/V, \tag{11.6}$$

где V — объем жидкости в аппарате.

Здесь в прямом виде реализуется метод Джонатана Свифта («метод Гулливера»). В некоторых формулах для K_La используют $F_{уд}$ вместо F_S. Но ограничения для использования $F_{уд}$ вместо K_La те же.

Движущая сила массообмена по кислороду. Когда мы рассматривали формулу для определения концентрации растворенного кислорода (11.2), я намеренно не акцентировал внимание на равновесной концентрации кислорода при насыщении C^*, приняв эту величину одинаковой для любых масштабируемых аппаратов.

Реально же в производственных аппаратах величина C^* зависит от давления в аппарате P и гидростатического давления столба жидкости в нем $H\rho g$.

Размерность C^* и C:

$$[C^*] = [C] = \left[\frac{\text{г } O_2}{\text{л}}\right] \text{ или } \left[\frac{\text{г}\cdot\text{моль } O_2}{\text{л}}\right] \text{ или } \left[\frac{\text{кг } O_2}{\text{м}^3}\right].$$

Отсюда получается размерность для величины $K_L a$:

$$\frac{\left[\frac{\text{г}}{\text{л}\cdot\text{ч}}\right]}{\left[\frac{\text{г}}{\text{л}}\right]} = \frac{\left[\frac{\text{кг}}{\text{м}^3\cdot\text{ч}}\right]}{\left[\frac{\text{кг}}{\text{м}^3}\right]} = \frac{\left[\frac{\text{г}\cdot\text{моль}}{\text{л}\cdot\text{ч}}\right]}{\left[\frac{\text{г}\cdot\text{моль}}{\text{л}}\right]} = \left[\frac{1}{\text{ч}}\right].$$

Из уравнения (11.1) легко получить выражение для текущей концентрации растворенного кислорода C:

$$C = C^* - \frac{Q_{O_2}}{K_L a}. \tag{11.2}$$

Если в ходе процесса скорость потребления кислорода Q_{O_2} изменяется во времени, то изменяется и концентрация растворенного кислорода, что и дает наблюдаемый профиль во времени.

Если мы имеем два разных аппарата, в которые загружена одна и та же культуральная жидкость, имеющая одну и ту же скорость потребления кислорода на единицу объема, то концентрация растворенного кислорода в таких аппаратах зависит только от коэффициента массопередачи $K_L a$.

Отсюда вытекает второй способ масштабирования — по величине $K_L a$.

Если обеспечить равенство значений $K_L a$ в сравниваемых аппаратах, то можно ожидать, что при этом автоматически обеспечивается и равенство профилей концентраций растворенного кислорода во времени.

Кроме того, если $K_L a$, например, недостаточен (мал), то мы не сможем поддержать требуемое значение $C_{\text{опт}}$ в течение всего процесса (рис. 11.4).

Профили растворенного кислорода при различных значениях $K_L a$ (которые можно задать разной частотой вращения мешалки, разными ее размерами и конструкцией, разной скоростью аэрации) должны различаться.

Можно по результатам таких ферментаций построить зависимость выхода от величины $K_L a$ (рис. 11.5).

Хотя здесь за $K_L a$ скрывается профиль $C(t)$ в ходе ферментации, выход продукта в зависимости от $K_L a$ аналогичен зависимости от C: либо с насыщением (с плато в области высоких $K_L a$), либо с экстремумом (оптимальным диапазоном $K_L a$) — в зависимости от процесса. В обоих случаях можно выбрать значение или диапазон

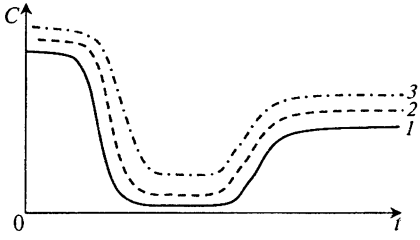


Рис. 11.4. Влияние коэффициента массопередачи K_La на профиль по времени растворенного кислорода в процессе ферментации:

1 — для процесса с минимальным значением K_La;
2 — для процесса с промежуточным значением K_La;
3 — для процесса с максимальным значением K_La

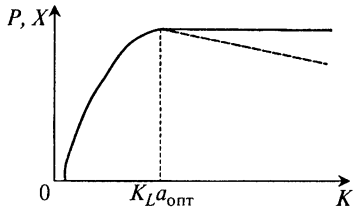


Рис. 11.5. Зависимость выхода продукта от величины K_La:

$K_La_{опт}$ — значение K_La, оптимальное для реализации процесса

значений K_La, которые должны поддерживаться в аппаратах любой конструкции и размера, чтобы получить желаемый результат.

Методы определения K_La в аппаратах различного масштаба. Далее при масштабировании возникает проблема реализации необходимого значения K_La в аппаратах любого типа и размера.

Для этого и нужны формулы, связывающие величину K_La с размерами мешалки, аппарата, числом ярусов, частотой вращения, скоростью подачи воздуха на аэрацию. Подобные формулы для различного вида аппаратов можно найти в специальной литературе.

Например, для аппаратов с мешалкой

$$K_La = (\alpha + \delta n_i)\left(\frac{N}{V}\right)^{0,95}\left(\frac{F_в}{S}\right)^{0,67}, \qquad (11.3)$$

где α и δ — коэффициенты; n_i — число ярусов мешалки; N — мощность, расходуемая на перемешивание жидкости; $F_в$ — расход воздуха; S — поперечное сечение аппарата (равное $\pi D^2/4$).

В курсе «Биореакторы» приводятся такие формулы для аппаратов разной конструкции.

Как определить влияние величины K_La на результат процесса при проведении опытов в колбах?

Прежде всего, можно менять частоту встряхиваний качалки (устройства для встряхивания колб). На рис. 11.6 пред-

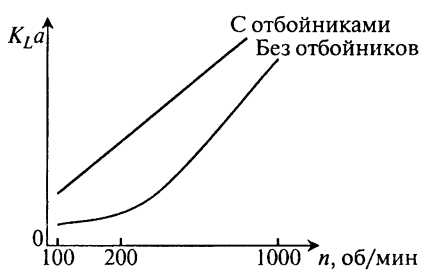


Рис. 11.6. Влияние частоты качаний качалки на величину K_La при проведении опытов в колбах

Тогда равновесная концентрация кислорода в производственном аппарате $C^*_{пр}$ будет отличаться от $C^*_л$ в лабораторном аппарате, даже если равны давления над зеркалом жидкости. Связь между ними имеет вид

$$C^*_{пр} = \frac{\left(P_{пр} + H\rho g/2\right)}{P_л} C^*_л, \qquad (11.7)$$

где $P_{пр}$ и $P_л$ — давление над зеркалом жидкости в производственном и лабораторном аппаратах соответственно; H — высота слоя жидкости в производственном аппарате; ρ — плотность жидкости; g — ускорение свободного падения.

В этой формуле принято, что среднее давление $P_{пр}$ в производственном аппарате больше давления в лабораторном аппарате $P_л$ на величину давления половины высоты гидростатического столба жидкости в нижней точке аппарата.

Таким образом, для выравнивания условий по массопередаче кислорода в лабораторном аппарате необходимо поддерживать давление в нем $P_л$ в соответствии с зависимостью

$$P_л = P_{пр} + H\rho g/2. \qquad (11.8)$$

Концентрация растворенного диоксида углерода. В некоторых процессах ферментации на результат процесса влияет не только кислород, но и растворенный диоксид углерода. Теоретически необходимой скорости массопередачи кислорода Q_{O_2} можно достичь, сильно увеличив перемешивание и подняв давление в аппарате. При этом можно значительно *уменьшить расход воздуха.* Так иногда поступают, чтобы уменьшить пенообразование, которое сильно зависит от расхода подаваемого воздуха. В этом случае, однако, сильно возрастет концентрация CO_2 в выходящем газе, а с ней и концентрация растворенного диоксида углерода, который может ингибировать процесс. Для некоторых процессов известны *критические значения* концентрации CO_2 в газе ($C^г_{CO_2}$) и в жидкости ($C^ж_{CO_2}$), выше которых наблюдается ингибирование процесса ферментации. Для таких процессов при масштабировании необходимо учитывать ограничение по концентрации CO_2. Если известна интенсивность дыхания на единицу объема $Q^г_{CO_2}$ и на весь объем аппарата G_{CO_2}

$$G_{CO_2} = VQ_{CO_2}, \qquad (11.9)$$

то концентрацию CO_2 в выходящем газе $C^г_{CO_2}$ можно определить по формуле

$$C^г_{CO_2} = Q_{CO_2}V/F_в, \qquad (11.10)$$

где $F_в$ — общий объемный расход воздуха через аппарат.

Поскольку для таких процессов должно соблюдаться соотношение

$$C^{г}_{CO_2} \le C^{г}_{CO_2\ кр}, \qquad (11.11)$$

отсюда можно получить ограничение для расхода воздуха:

$$F_в \ge Q_{CO_2\ max} V / C^{г}_{CO_2\ кр}, \qquad (11.12)$$

где Q_{CO_2max} — максимальная интенсивность дыхания в процессе ферментации; $C^{г}_{CO_2кр}$ — критическое значение концентрации CO_2 в выходящем из ферментера воздухе.

Ограничение (11.12) показывает, что в процессах, где есть ингибирование роста и развития культуры повышенными концентрациями диоксида углерода, нельзя снижать расход воздуха до сколь угодно малого значения.

Механическое воздействие мешалки на клетки. Усилия сдвига, действующие у краев мешалки, отбойников, могут механически воздействовать на клетки микроорганизмов, вызывая их разрушение. Различные клетки по-разному реагируют на одно и то же воздействие. Бактерии, имеющие небольшие размеры (0,5 ... 1 мкм), практически нечувствительны к механическим воздействиям. Более чувствительны мицелиальные микроорганизмы и в особенности растительные и животные клетки, для которых перемешивание должно быть особенно мягким.

Экспериментально оценить механическое воздействие перемешивающих устройств разного типа на микробные клетки довольно трудно. На практике обычно проводят экспозицию исследуемой культуры клеток в течение определенного времени в изучаемом аппарате, затем отбирают пробу жидкости и осуществляют прямой рассев ее на агаризованные среды, где определяют содержание живых клеток по сравнению с контролем.

Более быстрым способом является определение изменения оптической плотности жидкости при длине волны 260 нм за время перемешивания в аппарате (ΔE_{260}). Это изменение показывает степень выхода в раствор содержимого клетки.

Такой способ, однако, трудно применить в аппарате большого размера.

Практически для оценки механического воздействия на клетки используют показатель, называемый *окружной скоростью мешалки* $v_л$:

$$v_л = \pi n d_м, \qquad (11.13)$$

где n — частота (угловая скорость) вращения мешалки, об/с; $d_м$ — диаметр мешалки, м.

Обычно окружная скорость мешалки составляет 3—6 м/с. Превышение величины 8 м/с приводит к явлениям кавитации и

Глава 12
БИОКАТАЛИЗ И БИОТРАНСФОРМАЦИЯ

●

12.1. ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ

Мы уже говорили, что ***биокатализ*** и ***биотрансформация*** являются процессами химического превращения одного или более веществ, протекающими под действием катализаторов — ферментов, применяемых в очищенном виде или в составе клеток микроорганизмов либо изолированных животных или растительных клеток.

При этом *биотрансформация* — это относительно неглубокое химическое превращение уже в основном сформированного химического соединения под влиянием ферментов. При *биокатализе* же возможен синтез нового вещества из различных по структуре реагентов или разложение сложного вещества под действием ферментов.

Рассмотрим основные группы технически важных биотрансформаций:

гидроксилирование различных позиций молекулы вещества (добавление гидроксильной группы ОН);

введение двойной связи в том или ином месте;

обрыв боковых цепей у разветвленных молекул;

окисление молекул спиртов до кетонов;

дегидрирование;

изомеризация;

ароматизация (появление ароматических углеводородных радикалов).

Назовем также основные виды реакций биокатализа (практически они будут совпадать с наименованиями основных групп ферментов вообще):

окисление и восстановление;

перенос химических функциональных групп от одних молекул на другие;

гидролиз;

реакции с участием двойных связей (образование или, наоборот, присоединение к ним химических групп);

изомеризация, или структурные изменения в пределах одной молекулы;

синтез сложных соединений (как правило, требующий энергетических затрат).

Как видно из приведенных перечислений, биотрансформация и биокатализ являются процессами, сходными по своей природе.

воздействию на микробные клетки. Для мицелиальных, растительных и животных клеток ограничения по скорости могут быть еще больше: они индивидуальны для разных клеток и могут достигать 0,5 м/с. В аппаратах, предназначаемых специально для культивирования животных клеток, используют весьма низкие окружные скорости мешалок и к тому же стараются создавать рабочие органы мешалок с обтекаемыми поверхностями без острых кромок.

Масштабирование «снизу вверх» и «сверху вниз». Обычно осуществляют *масштабирование «снизу вверх»*. Результат, полученный в лабораторных условиях, переносят на аппарат большего размера, стараясь воспроизвести в этом аппарате все те критерии, которые выбраны для масштабирования. В мировой литературе такое масштабирование обозначают термином «Scale-up».

Это не всегда приводит к успешным результатам, поскольку обычно в промышленном аппарате невозможно создать условия гидродинамики и массопередачи, идентичные условиям в аппаратах малого масштаба.

При этом рекорды производительности, полученные в колбах, оказываются нереалистичными и служат только для победных отчетов научных работников перед производством.

Более реально использовать *масштабирование «сверху вниз»* («Scale-down»).

При этом сразу ориентируются на те промышленные аппараты, которые есть в производстве. Эти аппараты изучают с учетом массообменных характеристик и других критериев масштабирования и уже лабораторные условия подгоняют под критерии, имеющиеся в производственных аппаратах.

Соответственно и в колбах процесс изучают сразу при нужном значении K_La (т. е. при определенном объеме среды). И хотя на такой установке обычно результаты хуже по технико-экономическим показателям, чем можно было бы получить, стремясь выжать максимум из лабораторного оборудования, все же так работать выгоднее, поскольку менее вероятно возникновение трудностей при переходе на промышленное оборудование.

Полученные результаты без большого труда переносятся на промышленные аппараты. Конечные показатели технологического процесса в производстве при этом не хуже, а часто и лучше, чем при масштабировании типа «Scale-up».

Вопросы для повторения

1. Что такое масштабирование процесса ферментации?
2. Можно ли использовать растворенный кислород как параметр масштабирования для аэробных процессов? Преимущества и недостатки этого способа.
3. Объясните связь концентрации растворенного кислорода с коэффициентом массопередачи по кислороду.
4. Что такое K_La? Расскажите о нем как о параметре масштабирования.

5. Как можно определить величину $K_L a$ в колбах на качалке и как ее можно варьировать?

6. Какие характеристики (более легко определяемые) можно использовать для масштабирования вместо $K_L a$?

7. Как учесть влияние движущей силы процесса массопередачи на концентрацию растворенного кислорода? Какие уточнения при этом можно ввести для масштабирования процесса в аппаратах разной высоты?

8. Как учесть при масштабировании ограничение по ингибированию процесса растворенным углекислым газом?

9. Как учесть воздействия механического перемешивания непосредственно на клетки микроорганизмов?

10. Какие значения окружной скорости мешалки допустимы для бактериальных клеток, дрожжей, растительных и животных клеток?

11. Что такое масштабирование «снизу вверх» и «сверху вниз»?

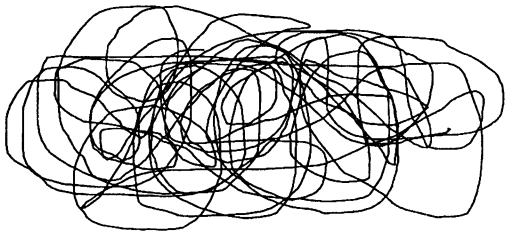


Рис. 12.1. Пространственная конформация молекулы фермента

Объединяет их прежде всего использование специфических катализаторов — молекул ***фермента***, имеющих белковую природу.

Эта природа фермента оказывает решающее влияние на кинетику ферментативных реакций.

В общем случае эта кинетика может быть выражена следующими структурными схемами:

для одного субстрата S

$$S + E \leftrightarrow ES \rightarrow P + E; \qquad (12.1)$$

для двух субстратов S_1 и S_2

$$S_1 + S_2 + E \leftrightarrow ES_1S_2 \rightarrow P + E. \qquad (12.2)$$

В обоих случаях реакции превращения субстрата в продукт протекают через промежуточную стадию взаимодействия фермента с субстратом (субстратами) и образования фермент-субстратных комплексов.

Молекула фермента — очень длинный закрученный белок, к тому же свернутый в виде пространственного упругого клубка причудливой формы (рис. 12.1).

Спутанность и беспорядок белка не случайны — они строго обусловлены чередованием аминокислот в молекуле фермента. В этой структуре есть участки, куда легко притягивается определенная форма молекулы субстрата. Это как бы «ключ—замок», позволяющий нужной молекуле субстрата (или субстратов) быстро занимать свое удобное «ложе», быстро вступать в нужную реакцию и «выскакивать», как только она прошла.

Доказано, что скорость реакции на ферменте в 10 млрд раз больше, чем без него. Вот почему ферменты запросто осуществляют многие процессы, которые кажутся нереальными без них, например взаимодействие атмосферного азота с водой с образованием аммонийных соединений.

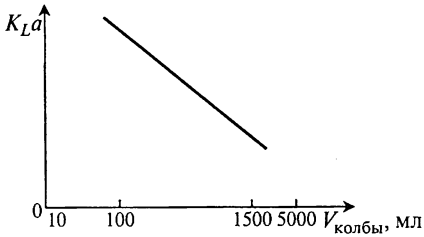


Рис. 11.7. Влияние объема жидкости в колбе V на величину K_La

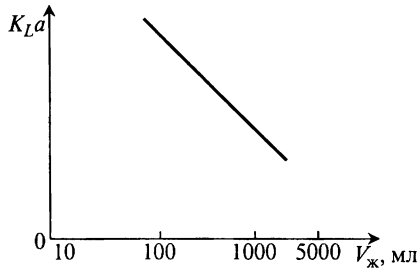


Рис. 11.8. Влияние объема колбы на величину K_La

ставлена зависимость величины K_La от частоты качаний для двух типов колб — обычных полых колб и колб с отбойниками.

Отбойники различной конструкции вставляются в колбы для создания сопротивления движению потока и улучшения условий перемешивания и массопередачи. Колбы с отбойниками позволяют моделировать аппараты высокой интенсивности.

Довольно часто устройства для встряхивания колб (качалки) не имеют приспособлений для регулирования скорости. В этом случае можно использовать для создания различных значений K_La прием, заключающийся в проведении экспериментов с различными объемами жидкости в колбе. На рис. 11.7 представлена зависимость коэффициента K_La от объема жидкости в колбе.

В микробиологической практике используют колбы разного объема и разной конструкции. Даже при их постоянной степени заполнения величина K_La зависит от объема сосуда.

На рис. 11.8 представлен характер изменения величины K_La в колбах разной вместимости при их заполнении на 1/10 объема.

Графики позволяют приблизительно оценить величину K_La для колб разного объема с разной степенью заполнения и с разной частотой качаний.

Практически же при решении реальных задач масштабирования с использованием колб целесообразно провести соответствующие эксперименты по сульфитной методике, в которой скорость массопередачи кислорода определяют по скорости реакции окисления сульфита в сульфат.

11.3. ДРУГИЕ КРИТЕРИИ МАСШТАБНОГО ПЕРЕХОДА

Хотя использование величины K_La в качестве критерия масштабного перехода наиболее обоснованно, в практике часто используют более простые критерии масштабного перехода, связанные с величиной K_La, но являющиеся, так сказать, его «суррогатами».

12.2. ВЫВОД УРАВНЕНИЯ МИХАЭЛИСА—МЕНТЕН

Для описания кинетики этих сложных химических превращений примем, что каждая из входящих в систему реакций является простой химической реакцией, описываемой уравнением кинетики, в котором скорость протекания реакции пропорциональна произведению концентраций реагирующих веществ на соответствующую константу скорости реакции.

Из структуры уравнений видно, что *фермент-субстратный комплекс ES* может образовываться и вновь распадаться, т. е. это процесс обратимый. Обозначим константу скорости прямой реакции K_1, а обратной — K_{-1}; константу скорости образования продукта из фермент-субстратного комплекса обозначим K_2:

$$E + S \underset{K_{-1}}{\overset{K_1}{\leftrightarrow}} ES \xrightarrow{K_2} E + P. \tag{12.3}$$

Запишем материальный баланс для образования фермент-субстратного комплекса (ES)

$$\frac{d[ES]}{dt} = K_1[E]\cdot[S] - K_{-1}\ [ES] - K_2\ [ES] \tag{12.4}$$

и материальный баланс для образования продукта P

$$\frac{dP}{dt} = K_2[ES]. \tag{12.5}$$

Особенность ферментативной кинетики состоит в том, что реакции образования и распада комплекса ES протекают гораздо быстрее, чем процесс образования конечного продукта реакции P.

В связи с этим концентрация комплекса $[ES]$ быстро устанавливается на некотором постоянном уровне, а сама реакция имеет *стационарный* характер по $[ES]$, или *квазистационарную кинетику.*

Иначе говоря, можно принять

$$\frac{d[ES]}{dt} \approx 0. \tag{12.6}$$

Отсюда можем получить выражение для $[ES]$:

$$[ES] = \frac{K_1}{K_{-1} + K_2}\ [E] \cdot [S]. \tag{12.7}$$

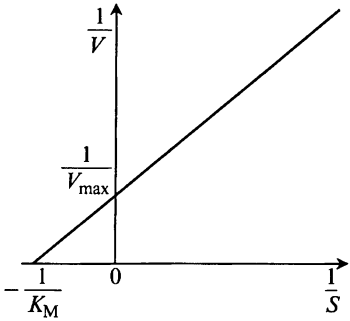


Рис. 12.2. Определение коэффициентов уравнения методом Лайнуивера и Бэрка (двойных обратных координат)

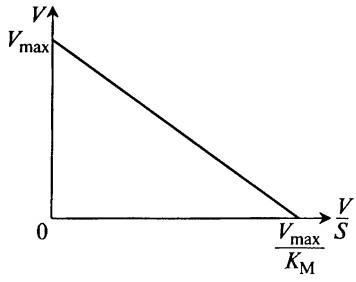


Рис. 12.3. Определение коэффициентов уравнения методом Корниш-Боудэна

Другой вариант — координаты Корниш-Боудэна (V и V/S):

$$V = V_{max} - K_M \frac{V}{S}; \qquad (12.18)$$

$$\text{при } \frac{V}{S} = 0 \quad V = V_{max}, \qquad (12.19)$$

$$\text{при } V = 0 \quad \frac{V}{S} = \frac{V_{max}}{K_M}. \qquad (12.20)$$

На рис. 12.3 показано, как выглядит уравнение (12.8) в этих координатах.

Все эти способы были предложены специалистами по ферментативной кинетике.

12.3. ДРУГИЕ УРАВНЕНИЯ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ КИНЕТИКИ

В ферментативной кинетике кроме уравнения Михаэлиса—Ментен существуют уравнения, учитывающие ингибирование субстратом:

$$V = \frac{V_{max} S}{K_M + S + S^2/K_i}, \qquad (12.21)$$

где K_i — константа ингибирования.

Конкурентное и неконкурентное ингибирование вторым субстратом описывается уравнениями:

$$V = \frac{V_{max} S_1}{K_M + S_1 + S_2/K_i} \text{ (конкурентное)}; \qquad (12.22)$$

центрации биомассы в уравнении Моно, а константа Михаэлиса K_M аналогична субстратной константе Моно K_S.

Это сходство не случайно. Именно имея в виду ферментативный характер превращений субстрата микроорганизмами, Моно предложил форму уравнения, подобную уравнению Михаэлиса—Ментен.

Как определить *количество фермента* в исходной среде E_0 или в системе после протекания реакции?

Для всех других участников ферментативной реакции — субстрата или продукта — существуют количественные методы, позволяющие точно определить массу вещества.

Для ферментов же часто даже неизвестна молекулярная масса — она обычно весьма велика, а ферменты представляют собой не чистое вещество, а смесь с белками и другими ферментами.

Фермент «взвешивают» не в граммах, а в единицах активности. *Единица активности* — это такое количество фермента, которое при 30 °С за 1 минуту превращает 1 микромоль субстрата в продукт. Скорость реакции зависит еще и от концентрации субстрата и величины pH. Для каждого фермента эти стандартные условия его «взвешивания» заранее определены. Таким образом, количество фермента определяется по кинетике модельной реакции, и точное определение приходящейся на единицу активности массы фермента обычно неизвестно. Можно лишь определить концентрацию фермента в единице массы или объема вещества, проявляющего ферментную активность, но в ед/г или ед/мл (здесь «ед» — единица активности фермента).

В уравнении Михаэлиса—Ментен произведение K_2E_0 можно заменить на V_{max}, а скорость образования продукта обозначить через V.

В результате получается принятый в ферментативной кинетике вид уравнения:

$$V = \frac{V_{max}S}{K_M + S}. \tag{12.14}$$

Как и в любом кинетическом уравнении, возникает проблема определения констант V_{max} и K_M по экспериментальным данным. Для этого, аналогично уравнению Моно, используют координаты Лайнуивера и Бэрка (рис. 12.2):

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{max}}\frac{1}{S} + \frac{1}{V_{max}}; \tag{12.15}$$

$$\text{при } \frac{1}{V} = 0 \quad \frac{1}{S} = -\frac{1}{K_M}, \tag{12.16}$$

$$\text{при } \frac{1}{S} = 0 \quad \frac{1}{V} = \frac{1}{V_{max}}. \tag{12.17}$$

Интересно отметить, что фермент в процессе реакции не расходуется. Его начальная концентрация $[E]_0$ просто раскладывается на свободный фермент и фермент-субстратный комплекс:

$$[E]_0 = [E] + [ES]. \tag{12.8}$$

Если подставить сюда выражение для $[ES]$, то можно получить зависимость для концентрации свободного фермента $[E]$:

$$[E] = \frac{[E]_0}{1 + \frac{K_1}{K_{-1}+K_2}[S]}; \tag{12.9}$$

$$[E]_0 = [E] + \frac{K_1}{K_{-1}+K_2}[E]\cdot[S] = [E]\left(1 + \frac{K_1}{K_{-1}+K_2}[S]\right).$$

Подставим теперь это выражение в формулу (12.7) для концентрации фермент-субстратного комплекса $[ES]$:

$$[ES] = \frac{K_1[S]\cdot[E]_0}{\left(1 + \frac{K_1}{K_{-1}+K_2}[S]\right)(K_{-1}+K_2)} = \frac{[S]\cdot[E]_0}{\frac{K_{-1}+K_2}{K_1}+[S]}. \tag{12.10}$$

Найдем окончательное выражение для скорости образования продукта реакции:

$$\frac{\mathrm{d}[\mathrm{P}]}{\mathrm{d}t} = \frac{K_2[E]_0[S]}{\frac{K_{-1}+K_2}{K_1}+[S]} = -\frac{\mathrm{d}[\mathrm{S}]}{\mathrm{d}t} = V, \tag{12.11}$$

где V — скорость ферментативной реакции.

Это уравнение, предложенное в начале XX в. двумя авторами — Михаэлисом и Ментен (женщина-ученый), называют *уравнением Михаэлиса—Ментен.*

Если ввести обозначение

$$K_\mathrm{M} = (K_{-1} + K_2)/K_1, \tag{12.12}$$

где K_M — константа Михаэлиса, и опустить квадратные скобки в обозначении концентраций E, S и P, то уравнение (12.11) преобразуется к виду

$$V = \frac{\mathrm{d}P}{\mathrm{d}t} = -\frac{\mathrm{d}S}{\mathrm{d}t} = \frac{K_2 E_0 S}{K_\mathrm{M} + S}. \tag{12.13}$$

Обратите внимание на сходство этого уравнения с уравнением Моно. Здесь $\mathrm{d}P/\mathrm{d}t$ или V подобно Q_X или $\mathrm{d}X/\mathrm{d}t$; E_0 подобно кон-

3. Дорогостоящий фермент используется только однократно.
4. Свободный фермент быстро инактивируется (т. е. разрушается).
5. В отличие от биомассы, которая самовоспроизводится в процессе непрерывной ферментации, фермент в непрерывном процессе нужно все время вводить, так как он вымывается с продуктом реакции.

12.5. ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ ФЕРМЕНТОВ

Чтобы преодолеть описанные ранее недостатки процессов с использованием свободных ферментов, надо придумать способ удержания ферментов в аппарате или легкий способ их выделения из реакционной жидкости после завершения процесса.

Первое, что напрашивается, это отделение ферментов с помощью ультрафильтрации. Можно, например, вести процесс биотрансформации с ультрафильтрационным выносным модулем (рис. 12.4).

Реакционная жидкость может циркулировать через ультрафильтрационный модуль, который задерживает выход фермента, не мешая выходу продукта. Получается непрерывный процесс, в который не требуется добавлять фермент.

Этот способ, однако, тоже имеет недостатки:

мембранные установки часто выходят из строя, и при их использовании часть ферментов «проскакивает», а часть может «застревать» на мембране, ухудшая фильтрацию и приводя к необратимой потере фермента;

многие ферменты, будучи в свободном состоянии (растворенном в жидкости или в виде взвешенных коллоидных частиц), подвержены довольно быстрой инактивации, так что срок службы фермента небольшой и необходимость расходования свежего фермента, стоимость которого высока, сохраняется.

Поэтому такой путь совершенствования процессов биотрансформации большого применения не нашел. Только если сам субстрат нерастворим или находится в коллоидном состоянии, применение подобных систем имеет смысл.

В середине 1950-х годов возникла блестящая идея создания «нерастворимых», или «прикрепленных к матрице», или «связанных» ферментов, которые позднее стали называть *иммобилизованными.* (К этой идее и ее реализации имел отношение бывший президент Израиля Э. Ка-

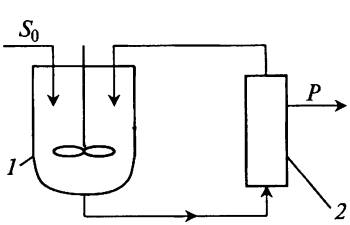


Рис. 12.4. Схема мембранного биореактора с выносным модулем:

1 — биореактор; *2* — проточный мембранный модуль

чальский-Катцир. Мы привыкли, что президентами становятся политики, хозяйственники, юристы. Но этот человек до своего избрания был ученым-биохимиком и после пребывания на президентском посту вернулся в науку и до своей смерти в 1995 г. возглавлял институт биотехнологии в Тель-Авиве.)

Иммобилизация — это прикрепление фермента к некоторому нерастворимому носителю, причем таким образом, чтобы фермент мог обмениваться с раствором молекулами субстрата и продукта.

Даже не вдаваясь в подробности, можно оценить красоту этого способа. Во-первых, появляется простая возможность отделять и многократно использовать такой иммобилизованный фермент. Во-вторых, оказалось, что закрепленный фермент сохраняется в активном состоянии гораздо дольше, чем свободный, растворенный.

12.6. МЕТОДЫ ИММОБИЛИЗАЦИИ ФЕРМЕНТОВ

Методы иммобилизации. Существуют различные способы закрепления ферментов на носителе, основные из которых перечислены ниже.

1. Адсорбция на носителе (рис. 12.5). Носителями могут быть неорганические материалы (стекло, силикагель, бентонит, оксид алюминия, диоксид титана и др.), природные полимеры (целлюлоза, коллаген) и синтетические полимеры (нейлон, полиэтилен, полипропилен).

2. Включение в гель агар-агара, альгинатов, карагинана (типа желе) (рис. 12.6).

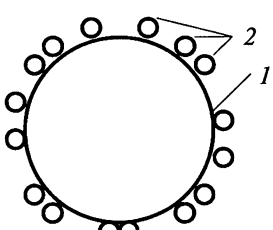


Рис. 12.5. Иммобилизация фермента методом адсорбции на носителе:

1 — гранула носителя; *2* — молекулы фермента

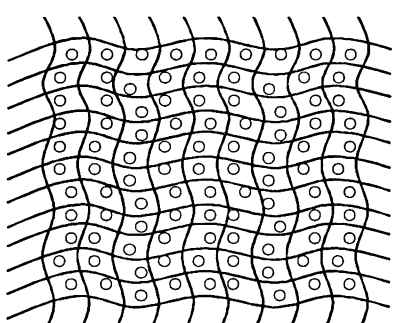


Рис. 12.6. Иммобилизация фермента методом включения в гель

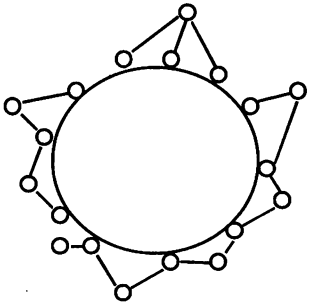


Рис. 12.9. Иммобилизация фермента методом адсорбции на носителе с последующей поперечной «сшивкой»

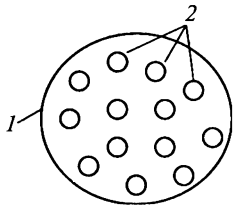


Рис. 12.10. Иммобилизация фермента методом включения в полупроницаемые капсулы:

1 — капсула с полупроницаемой стенкой; *2* — молекулы фермента, взвешенные в растворе внутри капсулы

та и порошка носителя. Метод довольно прост, но не очень надежен. Фермент может отслаиваться от носителя и переходить в раствор.

Оценка качества иммобилизованных ферментов и метода иммобилизации. Разработка иммобилизованного фермента (биокатализатора) — это целое искусство. Здесь и рецептура входящих в биокатализатор компонентов, и режим температуры, pH, перемешивания, при котором осуществляется иммобилизация, и методы отмывки свободного фермента и остатков непрореагировавшего мономера или реагентов.

Эта процедура — а ее смело можно называть технологией — часто является надежно охраняемым секретом фирм.

При *оценке метода* иммобилизации обычно учитывают 3 характеристики получаемого биокатализатора:

1) потеря активности при иммобилизации. Надо отдавать себе отчет в том, что иммобилизация — это всегда некоторое насилие над ферментом. Это особенно справедливо в методах, где в процессе иммобилизации используют химические реагенты, экстремальные для фермента значения pH и температуры. Поэтому сразу после иммобилизации суммарная активность фермента ниже, чем до нее;

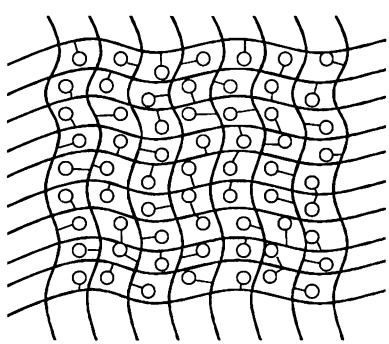


Рис. 12.11. Иммобилизация фермента методом сополимеризации с полимером-носителем

2) стабильность биокатализатора. Это его способность противостоять деградации молекул фермента в процессе последующей его работы и хранения. Наиболее надежно, конечно, проверить образцы биокатализаторов при длительной работе, хотя в практике часто используют ускоренные методы старения и оценки стабильности;

3) активность биокатализатора. Она зависит не только от первого показателя — потери активности, но также и от того, насколько активен был исходный фермент, т. е. насколько хорошо и много удалось «затолкать» фермента в биокатализатор.

Разные *оценки качества биокатализатора* часто бывают противоречивыми. Выбирать приходится на основе экономического сравнения — сколько продукта и с какой производительностью может дать тот или иной биокатализатор и какова при этом получается его цена.

12.7. ОТ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ К ИММОБИЛИЗОВАННЫМ КЛЕТКАМ

Требования к качеству исходных ферментов при их иммобилизации. Иммобилизованные ферменты имеют одно важное преимущество перед свободными ферментами — даже для получения чистых веществ можно использовать не очень хорошо очищенный фермент, особенно когда он включен в матрицу геля или полимера либо в капсулу. Ведь «грязь» не попадает в целевой продукт. Больше того, неочищенные ферменты иногда при иммобилизации оказываются стабильнее.

В случае, когда ферменты являются внутриклеточными, т. е. не выходят в среду при культивировании, логическим продолжением снижения требований к очистке является использование при иммобилизации самих клеток с ферментативной активностью. Это могут быть оболочки клеток после их дезинтеграции или даже целые клетки — нежизнеспособные, но с ферментной активностью. Такие клетки называют также «мумиями». Будучи помещены в «саркофаг» геля или полимера, они медленнее подвержены разложению, а фермент вообще чувствует себя «как дома», что по существу так и есть. Ведь при выделении он как бы «выдирается» из естественной связи с органеллами клетки и тем самым становится более уязвимым для разрушения. Стабильность при этом достигает 3—6 месяцев работы.

Рассмотрим пример. При переходе к полусинтетическим пенициллинам возникает важная задача: сначала нужно «развалить» молекулу обычного природного пенициллина и получить каркас для молекул полусинтетических пенициллинов — 6-аминопеницилланову кислоту (6-АПК). Это расщепление осуществляли с помощью специального фермента — *пенициллинамидазы*. Поначалу

$$V = \frac{V_{max} S_1}{K_1 + S_1} \frac{1}{1 + S_2 / K_2} \text{ (неконкурентное)}, \qquad (12.23)$$

где K_1 — константа Михаэлиса по субстрату S_1; K_2 — константа ингибирования по субстрату S_2.

Конкурентное и неконкурентное ингибирование продуктом реакции выражается соотношениями:

$$V = \frac{V_{max} S}{K_S + S + P / K_P} \text{ (конкурентное)}; \qquad (12.24)$$

$$V = \frac{V_{max} S}{(K_S + S)(1 + P / K_P)} \text{ (неконкурентное)}, \qquad (12.25)$$

где K_S — константа Михаэлиса по субстрату; K_P — константа ингибирования по продукту.

Подобно кинетике микробиологических процессов в ферментативной кинетике учитывается влияние температуры и величины pH на скорость реакции.

Аналогично ферментации можно учитывать инактивацию продукта P.

$$V = V(S, P) - KP. \qquad (12.26)$$

Есть особенность ферментативных реакций, связанная с *деградацией самого фермента*. При выводе уравнения Михаэлиса—Ментен эту особенность не учитывали. Но фермент — вещество лабильное, и оно подвергается старению и разложению. Особенно это касается протеолитических ферментов, т. е. ферментов, способствующих разложению белковых веществ. Наряду с «чужими» белками, протеолитические ферменты часто разрушают собственных «братьев» — белковые молекулы самих протеолитических ферментов.

Деградацию ферментов можно учитывать по выражению

$$\frac{dV_{max}}{dt} = -kV_{max}, \qquad (12.27)$$

где k — константа скорости деградации фермента.

Возможны и другие варианты кинетики деградации фермента:

$$\frac{dV_{max}}{dt} = -KV_{max} S; \qquad (12.28)$$

$$\frac{dV_{max}}{dt} = K_1 V_{max} \frac{1}{1 + S / K_2}, \qquad (12.29)$$

где K_1 и K_2 — кинетические константы.

Процессы биокатализа и биотрансформации могут быть периодическими, непрерывными, с подпиткой субстратом и с подпиткой ферментом.

Вместо *очищенных ферментов* в них могут использоваться ферменты, *имеющие примеси*, и даже *убитые* или *неразмножающиеся клетки*, сохранившие ферментативную активность.

Уравнения кинетики позволяют проводить расчет и оптимизацию подобных процессов.

Следует обратить внимание на одну важную особенность биокаталитических процессов. Условия, оптимальные для биокатализа (основного процесса), могут быть неоптимальны в отношении старения биокатализатора (фермента). Например, низкая температура хороша для предотвращения старения, но замедляет ход самого процесса биокатализа или биотрансформации.

То же и с величиной pH — значения оптимумов для процесса биокатализа и для предотвращения старения фермента могут различаться.

Компромисс между этими противоречивыми требованиями и должен обеспечивать оптимизационный расчет.

12.4. ПРЕИМУЩЕСТВА И НЕДОСТАТКИ БИОКАТАЛИТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

В заключение рассмотрим преимущества и недостатки биокаталитических процессов по сравнению с химическими.

ПРЕИМУЩЕСТВА

1. Каталитическая активность ферментов высокоспецифична и ограничивается одним типом реакций, так что не происходит побочных реакций.
2. Ферменты могут сразу атаковывать исходную молекулу и осуществлять превращение, для которого потребовалось бы несколько вспомогательных многоступенчатых химических синтезов.
3. Химические преобразования вещества упрощаются — одна или две ступени вместо многоступенчатого синтеза.
4. Ферментативные реакции могут протекать с большой скоростью в мягких условиях.

НЕДОСТАТКИ

1. Для получения чистого продукта нужен и чистый фермент, а его выделение очень дорого.
2. В выходящем из реактора продукте сохраняется фермент, который продолжает действовать.

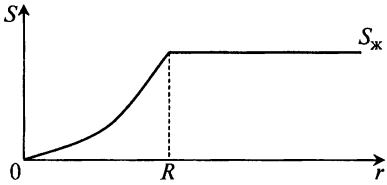


Рис. 12.12. Профиль изменения концентрации субстрата по глубине гранулы иммобилизованного фермента:

$S_ж$ — концентрация субстрата в жидкости; r — текущее расстояние от центра гранулы; R — радиус гранулы

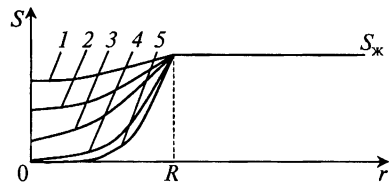


Рис. 12.13. Варианты профиля концентрации субстрата по глубине гранулы в зависимости от концентрации фермента в грануле:

1—5 — различные концентрации фермента в грануле в порядке возрастания

В центре гранулы может быть, а может и не быть зона голодания. Ясно, что и общая средняя скорость потребления субстрата гранулой при этом будет разная.

Можно найти теоретическое решение для профиля распределения концентрации субстрата по грануле и для средней скорости потребления субстрата гранулой $\bar{V}$.

Эти расчеты приводят к новой зависимости:

$$\bar{V} = \frac{V_m S_ж}{K'_S + S_ж}. \qquad (12.32)$$

Здесь вместо V стоит средняя скорость $\bar{V}$, вместо текущей концентрации S около каждой клетки по всему объему гранулы стоит концентрация на ее поверхности, принятая равной концентрации в жидкости $S_ж$.

Показано, что максимальная скорость потребления субстрата V_m такая же, как для одиночной клетки.

А вот константа K_S, по смыслу аналогичная субстратной константе Михаэлиса, которую часто называют «кажущейся» константой, отличается от величины K_S «истинной», т. е. от субстратной константы, определяемой закономерностью $V(S)$, которой подчиняется каждая отдельная клетка в грануле. Связь $K'_S(K_S)$ выражается соотношением

$$K'_S = K_S(1+0{,}0175\ \mathrm{Da}). \qquad (12.33)$$

Здесь Da — критерий Дамкелера для гранулы радиуса R, определяемый следующим выражением:

$$\mathrm{Da} = \frac{V_m R^2}{K_S D_S}, \qquad (12.34)$$

где V_m — максимальная скорость потребления субстрата на единицу объема; R —

его делали очищенным; выход фермента на стадиях очистки составлял всего 1 %, и он был очень дорог. Затем его стали иммобилизовывать — это увеличило срок его службы; потом применили неочищенные иммобилизованные ферменты и, наконец, дошли до иммобилизованных клеток — «мумий». Эта работа вызвала большой резонанс в России, так как позволила сразу получить довольно дешевую 6-АПК для производства ампициллина, оксациллина, диклоксациллина и других полусинтетических пенициллинов.

Иммобилизованные живые клетки. Многие процессы биотрансформации осуществляются живыми клетками, так как фермент действует с участием кофермента, который требует для своей постоянной регенерации существования живой клетки (в частности, функции дыхания). Казалось бы обеспечить жизнеспособность клетки, особенно нуждающейся в подводе кислорода и отводе диоксида углерода, довольно трудно. Тем не менее разработаны способы иммобилизации, позволяющие в течение длительного времени сохранять жизнеспособность клеток и проводить непрерывные процессы биотрансформации.

12.8. ДИФФУЗИОННЫЕ ОГРАНИЧЕНИЯ В ГРАНУЛАХ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ И КЛЕТОК

Иммобилизованные ферменты и клетки — это всегда гранула того или иного размера (или плоский слой иммобилизованного агента).

Размер гранулы определяется ее радиусом R.

Субстрат (в том числе растворенный кислород) проходит внутрь гранулы через поры или через гель и одновременно на своем пути потребляется клетками.

Если клетки свободно витают в питательной среде, можно принять, что скорость реакции V зависит от концентрации субстрата S или кислорода C по уравнению Михаэлиса—Ментен:

$$V = \frac{V_M S}{K_S + S}; \qquad (12.30) \qquad V = \frac{V_M C}{K_C + C}. \qquad (12.31)$$

Но при наличии гранулы концентрация субстрата в грануле разная в зависимости от расстояния до центра гранулы (рис. 12.12).

В середине гранулы может образовываться зона, куда субстрат не доходит, т. е. $S = 0$. В жидкости $S = S_ж$, на поверхности гранулы $S = S_R = S_ж$.

В зависимости от размеров гранулы, скорости потребления субстрата, концентрации фермента (или биомассы) в грануле профиль субстрата по ее глубине будет разный (рис. 12.13).

радиус гранулы; K_S — «истинное» значение константы Михаэлиса; D_S — коэффициент диффузии субстрата внутри гранулы.

Физически *критерий Дамкелера* представляет собой соотношение максимально возможных скоростей потребления субстрата и его диффузии внутрь гранулы.

Если речь идет об иммобилизованных клетках микроорганизмов, то вместо V_m можно записать:

$$V_m = \upsilon_m X, \qquad (12.35)$$

где υ_m — удельная скорость потребления субстрата на единицу массы клеток; X — концентрация клеток в грануле на единицу объема.

Мы здесь использовали обозначения V и υ для общей и удельной скоростей, принятые в ферментативной кинетике. Поскольку иммобилизованные клетки подчиняются уже закономерностям микробной кинетики, логично перейти к обозначениям Q и q. В результате получаем:

$$Q_{S\max} = q_{S\max} X \text{ и } \mathrm{Da} = \frac{q_{S\max} X R^2}{K_S D_S} \qquad (12.36)$$

или для кислорода

$$Q_{O_2\max} = q_{O_2\max} X \text{ и } \mathrm{Da} = \frac{q_{O_2\max} X R^2}{K_{O_2} D_{O_2}}. \qquad (12.37)$$

Обычно величина второго члена в скобках уравнения (12.33) значительно больше 1. Поэтому кажущаяся константа Михаэлиса возрастает при увеличении размера гранулы R, или максимальной удельной скорости потребления субстрата, или концентрации клеток микроорганизмов в грануле (плотности заполнения гранулы клетками).

Функция $\bar{Q}_S(S_ж)$ (зависимость среднего по грануле потребления субстрата от концентрации субстрата в жидкости на поверхности гранулы) для разных гранул будет иметь разный вид в зависимости от величины критерия Дамкелера (рис. 12.14).

Были проведены расчеты для разных субстратов. И для одного и того же процесса оказалось, на-

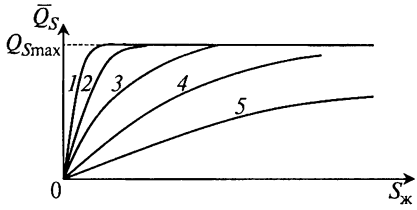


Рис. 12.14. Искажение зависимости $Q_S(S_ж)$ при изменении критерия Дамкелера для гранулы:

1 — неискаженная кинетическая зависимость для свободных клеток; *2—5* — зависимости для гранул с различными (возрастающими) значениями критерия Дамкелера

Молекулы фермента сидят в порах геля. Гель проницаем для молекул субстрата и продуктов реакции за счет молекулярной диффузии.

3. Ковалентное связывание с носителем. Носителем в этом случае является полимерный материал, длинные молекулы которого в разных местах связаны химическими ковалентными связями с молекулами фермента (рис. 12.7).

4. Поперечная «сшивка» молекул фермента при помощи бифункциональных реагентов. Молекулы фермента, свободно перемещающиеся в растворе, соединяются между собой различными своими участками с помощью определенных реагентов (рис. 12.8).

Получается некое пространственное образование, включающее активные молекулы фермента и довольно большие пространства между ними, удобные для диффузии молекул субстрата и продукта реакции.

5. Адсорбция на носителе с последующей поперечной «сшивкой». Этот способ сочетает в себе способы 1 и 4.

По сравнению с обычной адсорбцией на носителе получается более глубокий слой молекул фермента, доступных для субстрата и продукта, а по сравнению с обычной «сшивкой» — более прочная гранула, имеющая жесткий остов в центре (рис. 12.9).

6. Включение в полупроницаемые капсулы. Внутри капсулы (рис. 12.10) как бы существует коллоидный раствор фермента. Внешняя оболочка капсулы довольно прочная, непроницаема для фермента, но проницаема для продукта и субстрата.

7. Сополимеризация фермента и полимера-носителя. Напоминает включение в гель, но матрица создается путем сополимеризации полифункционального реагента и фермента (т. е. фермент не просто находится в «клетке» геля, но и сцеплен с ней). Этот способ является сочетанием способов 2 и 4 (рис. 12.11).

Примером является широко распространенный полиакриламидный гель, в котором в качестве реагента используется глутаровый альдегид.

8. Физическое смешение — перемешивание фермен-

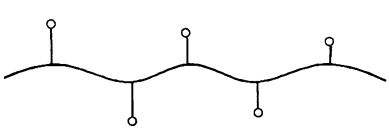


Рис. 12.7. Иммобилизация фермента методом ковалентного связывания с носителем

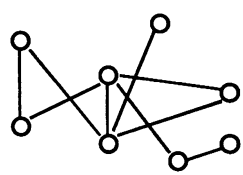


Рис. 12.8. Иммобилизация фермента методом поперечной «сшивки»

Интересной модификацией является реактор, в котором имеются полые трубки, а межтрубное пространство заполнено биокатализатором (рис. 12.20). Трубки не имеют стенок, они как бы вырезаны в теле иммобилизованного биокатализатора. Получается это следующим образом: биокатализатор вместе с гелеобразователем (каррагинаном) в жидком виде заливают в сосуд, заполненный стержнями; затем биокатализатор застывает (полимеризуется), а стержни вынимаются, образуя полые каналы для протекающего раствора.

В отношении аэрации система несколько лучше — воздух барботирует через жидкость, без гранул биокатализатора; поверхность биокатализатора контактирует с аэрированной жидкостью напрямую, без мембраны.

Реакторы, в которых фермент или клетки иммобилизованы на мембранах, проницаемых для субстрата, продуктов и кислорода. Возможно выполнение реактора в виде пластинчатого «сэндвича» из плоских мембран (рис. 12.21) или в виде свернутых в рулон мембран, в промежутках между которыми проходит поток (рис. 12.22). При этом жидкость поступает в полости между мембранами, заполненными ферментом, и проходит через их поры, выходя из полостей, не заполненных ферментом.

12.10. ОБЩАЯ ОЦЕНКА ПРОЦЕССОВ БИОТРАНСФОРМАЦИИ

Рассмотрим преимущества и недостатки процессов биотрансформации с иммобилизованным биокатализатором в сравнении с процессами ферментации.

ПРЕИМУЩЕСТВА

1. Более высокая концентрация реагентов в потоке.
2. Более чистый и менее сложный по составу поток.
3. Проще выделяется продукт.
4. Меньшие капитальные затраты.
5. В непрерывном процессе биотрансформации более эффективно используются оборудование и рабочая сила.
6. Процесс биотрансформации легче автоматизировать.
7. Меньше и проще требования к отходам.

НЕДОСТАТКИ

1. Стоимость сырья выше, чем для обычной ферментации.
2. Существуют проблемы со стабильностью биокатализатора.
3. Для получения биокатализатора все-таки требуется ферментация. Ее стоимость, как и стоимость установленного оборудования, накладывается на процесс биотрансформации.

рый остается в аппарате в течение довольно продолжительного времени.

Рассмотрим технологические схемы реализации процесса биотрансформации.

Проточный аппарат с мешалкой, заполненный гранулами биокатализатора (рис. 12.15). На выходе потока из биореактора нужны сетчатые или пористые фильтры, задерживающие гранулы биокатализатора. При этом в аппарат можно «вогнать» достаточно много биокатализатора. Но для аэробных процессов биотрансформации возникают проблемы со снабжением гранул кислородом. Мы знаем, что для обеспечения высоких значений $K_L a$ требуется интенсивное перемешивание, а для гранул биокатализатора еще возрастает кажущееся значение $C_{кр}$, так что массопередача нужна больше, чем для свободных клеток. Мешалка при этом может разрушать и истирать гранулы.

Аппарат с упакованной насадкой биокатализатора (рис. 12.16). Концентрация биомассы или фермента в рабочем объеме аппарата возрастает, что, конечно, хорошо, но одновременно возникают проблемы с аэрацией для аэробных процессов. В анаэробных процессах (например, получение спирта) такое оформление процесса вполне приемлемо и даже оптимально. При наличии потребности в кислороде можно использовать модификацию аппарата — секционирование его на невысокие секции, для которых хватает запаса растворенного в жидкости кислорода, с промежуточной аэрацией жидкостного потока.

Аппарат с псевдоожиженной насадкой (рис. 12.17). В этом случае

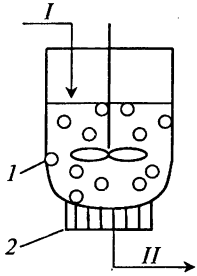


Рис. 12.15. Схема биореактора с механическим перемешиванием:

1 — биореактор; *2* — фильтр; *I* — субстрат; *II* — продукт

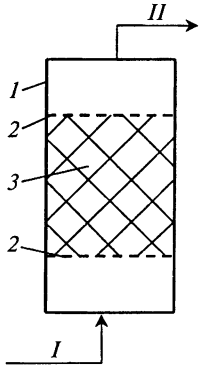


Рис. 12.16. Схема биореактора с неподвижной насадкой гранул биокатализатора:

1 — корпус; *2* — фильтрующие сетки; *3* — насадка биокатализатора; *I* — субстрат; *II* — продукт

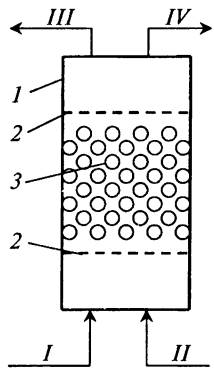


Рис. 12.17. Схема биореактора с псевдоожиженным слоем биокатализатора:

1 — корпус; *2* — фильтрующие сетки; *3* — псевдоожиженный слой биокатализатора; *I* — субстрат; *II*, *IV* — воздух; *III* — продукт

пример, что для медленно потребляемых субстратов (глюкоза) кажущееся значение K'_S мало отличается от K_S, а для кислорода, например при биосинтезе пенициллина, отличие K'_S от K_S — в тысячи раз.

А раз отличается K'_S, то и критическая концентрация кислорода, которую нужно поддерживать в среде, оказывается значительно больше, чем для свободных клеток. В табл. 12.1 представлены сравнительные данные по значениям q_{O_2max}, X и Q_{O_2max}, формирующим величину критерия Дамкелера, для разных культур.

Таблица 12.1

Сравнительные данные по дыханию клеток

Вид клеток	q_{O_2max}, $\frac{\text{ммоль } O_2}{\text{л·ч}}$	X_{max}, г/л	Q_{O_2max}, $\frac{\text{ммоль } O_2}{\text{л·ч}}$
Бактерии	10,8	600	6480
Дрожжи	8,0	210	1680
Грибы	3,0	550	1650
Животные клетки	0,025	800	20
Растительные клетки	0,007	1000	7

Сравнительные данные по дыханию клеток показывают, что наиболее критична ситуация с иммобилизацией бактерий, в то время как животные и растительные клетки самой природой предназначено иммобилизовать — они ведь обычно практически и существуют в виде «тканей», т. е. как раз прикрепленных клеток. Наоборот, они меньше привыкли к «свободному витанию».

Анализ зависимости показывает, что диффузия кислорода лучше идет в более мелких гранулах. Крупные, которые, казалось бы, лучше отделяются, имеют зоны кислородного голодания, а также больше подвержены механическому воздействию мешалки и могут разрушаться. Компромисс достигается при размере гранул 200—500 мкм, которые не вызывают проблем.

12.9. ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ СХЕМЫ РЕАЛИЗАЦИИ ПРОЦЕССОВ БИОТРАНСФОРМАЦИИ

Обычно в процессах биотрансформации, даже если они осуществляются живыми клетками микроорганизмов, целевым продуктом является не биомасса, а *продукт* биотрансформации.

Наилучшим способом при этом является непрерывный процесс, в котором через аппарат протекает жидкость, а пространство аппарата заполнено иммобилизованным биокатализатором, кото-

гранулы биокатализатора под воздействием протекающего раствора и подаваемого в аппарат для аэрации воздуха постоянно движутся в растворе, что обеспечивает хороший коэффициент массопередачи между жидкостью и биокатализатором. Более интенсивный гидродинамический режим обеспечивает более высокое значение коэффициента массопередачи кислорода от воздушных пузырьков к жидкости, чем в аппарате с насадкой.

Недостаток — меньшее количество работающего биокатализатора и механическое воздействие на гранулы вследствие их соударений, вызывающее разрушение и истирание гранул.

Аппарат с внутренним контейнером биокатализатора (рис. 12.18). В аппарате имеется контейнер, заполненный гранулами катализатора. Контейнер имеет перфорированные или сетчатые стенки и днище и вращается с помощью привода относительно вертикальной оси. Подаваемый снизу воздух насыщает жидкость кислородом и частично циркулирует через контейнер благодаря отверстиям в днище и стенках. Такой аппарат лучше, чем традиционный аппарат с мешалкой, однако гранулы внутри контейнера, отбрасываемые центробежной силой к цилиндрической стенке, частично застревают в отверстиях или в сетках контейнера и разрушаются или истираются под действием соударений.

Реакторы с трубками, заполненными биокатализатором (рис. 12.19). Жидкость протекает через эти трубки, при этом субстрат с участием биокатализатора постепенно преобразовывается в продукт.

В отношении аэрации — те же проблемы, что и для насадочного биореактора.

Для анаэробных процессов некоторое преимущество заключается в более организованном потоке жидкости через трубки, отсутствии застойных зон (т. е. более полном использовании биокатализатора).

Реакторы с трубками, имеющими диффузионно-проницаемые стенки (см. рис. 12.19). Трубки заполнены биокатализатором, а межтрубное пространство — обрабатываемым раствором, который может аэрироваться. Надо отметить, что массопередача кислорода за счет диффузии через стенку трубки недостаточна по сравнению с прямой массопередачей жидкость—газ с интенсивным перемешиванием.

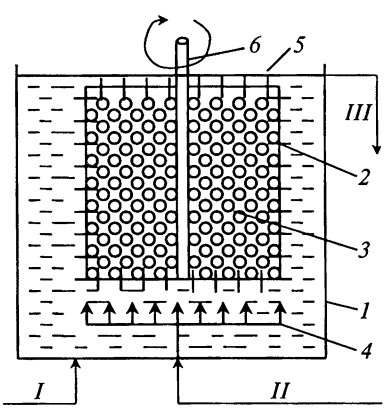


Рис. 12.18. Схема реактора с внутренним вращающимся контейнером гранул биокатализатора:

1 — корпус аппарата; *2* — перфорированный вращающийся контейнер; *3* — псевдоожиженный слой гранул биокатализатора; *4* — барботер; *5* — уровень жидкости в аппарате; *6* — вращающийся вал; *I* — субстрат; *II* — воздух; *III* — продукт

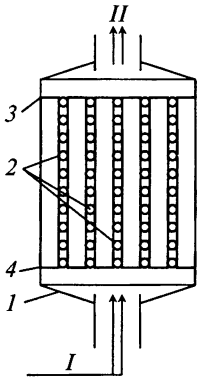


Рис. 12.19. Схема биореактора с трубками, заполненными гранулами биокатализатора:

1 — корпус аппарата; *2* — трубки, заполненные биокатализатором; *3, 4* — трубная решетка; *I* — раствор субстрата; *II* — раствор продукта

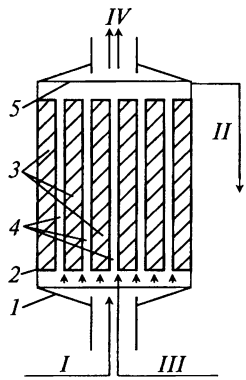


Рис. 12.20. Схема биореактора с трубками, имеющими диффузионно-проницаемые стенки:

1 — корпус аппарата; *2* — трубная решетка; *3* — иммобилизованный биокатализатор; *4* — полые каналы для обрабатываемого раствора; *5* — уровень жидкости в аппарате; *I* — раствор субстрата; *II* — раствор продукта; *III* — вход воздуха; *IV* — выход воздуха

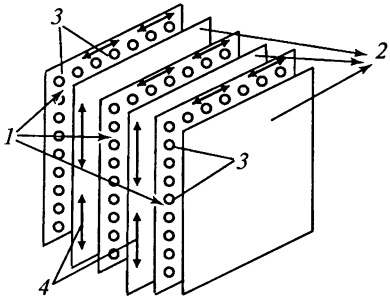


Рис. 12.21. Схема пластинчатого мембранного биореактора:

1 — вход раствора субстрата; *2* — выход продукта; *3* — иммобилизованный биокатализатор; *4* — движение жидкости

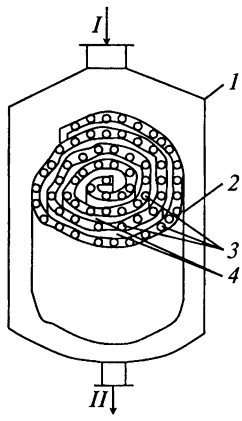


Рис. 12.22. Схема рулонного мембранного биореактора:

1 — корпус аппарата; *2* — рулонный элемент; *3* — пространство, заполненное иммобилизованным ферментом; *4* — пространство, куда через полупроницаемые мембраны рулонного элемента проникает пермеат с продуктом;
I — субстрат; *II* — продукт

12.11. ПРИМЕРЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ФЕРМЕНТОВ

Заканчивая раздел, связанный с процессами биокатализа и биотрансформации, перечислим наиболее известные примеры использования ферментов.

1. Получение глюкозо-фруктозных сиропов из крахмала. Здесь используется 3 фермента: *амилаза* — для разжижения крахмала, *глюкоамилаза* — для осахаривания крахмала (трансформации в глюкозу) и *глюкозоизомераза* — для изомеризации глюкозы в более сладкий сахар фруктозу.

2. Обработка молочной сыворотки. Фермент *бета-галактозидаза* способствует расщеплению молочного сахара лактозы на глюкозу и галактозу.

Тот же фермент используется для обработки молока и получения безлактозного молока.

3. Производство этанола, пива. Здесь используют те же ферменты, что и для получения глюкозо-фруктозных сиропов (кроме глюкозоизомеразы), — амилаза и глюкоамилаза.

4. Обработка молока при получении творога и сыров. Здесь используется молокосвертывающий фермент *микробный реннин.*

5. Стиральные порошки с биодобавками. Используются ферменты *протеазы.*

6. Производство вина и соков. Здесь используется фермент *пектиназа,* который позволяет превращать взвешенные частицы виноградной или фруктовой мезги в растворимые сахара.

7. Получение *L*-аминокислот, преимущественно усваиваемых животными, из *D*-аминокислот, которые получаются при химическом синтезе. Такую изомеризацию осуществляют ферменты *аминоацилазы.*

8. Очистка кожи от волос в кожевенной промышленности. Эта операция осуществляется с использованием ферментов *протеаза, коллагеназа.*

9. Осуществление превращений стероидов (например, превращение гидрокортизона в преднизолон). Используется иммобилизованный фермент *дегидрогеназа.*

10. Модификация природных антибиотиков. Мы уже упоминали практически важный процесс получения 6-аминопенициллановой кислоты (6-АПК) из пенициллина. Используется фермент *пенициллинамидаза* или иммобилизованные клетки бактерий, продуцирующих этот фермент.

Вопросы для повторения

1. Назовите основные группы технически важных биотрансформаций.
2. Перечислите основные виды реакций биокатализа.
3. Приведите стехиометрические схемы одно- и двухсубстратных ферментативных реакций.

Недостатками метода являются: большая продолжительность процесса (порядка нескольких часов) и не очень хорошее разделение (в осадке концентрация биомассы не превышает 1—3 %). Скорость отстаивания зависит от размеров и плотности хлопьев, а также от их поверхностных свойств.

Применительно к осаждению осадка сточных вод — активного ила — используют *иловый индекс*, характеризующий содержание биомассы активного ила в осаждаемом слое за 30 мин отстаивания.

Но биологический осадок не является монодисперсным (частицы, а точнее агломераты, имеют разный размер). В результате высота слоя осадка изменяется со временем не по прямой линии, а по кривой, причем скорость осаждения снижается во времени (рис. 13.2).

Еще чаще клетки с какого-то момента перестают осаждаться. Это связано с тем, что мелкие клетки имеют поверхностные свойства, удерживающие их от осаждения. Многие мелкие клетки не осаждаются вовсе.

13.3. ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕ И СЕПАРАЦИЯ

Для преодоления отмеченных ранее трудностей осаждения скорость осаждения клеток усиливают, помещая суспензию в поле центробежных сил. Центрифуги и сепараторы, которые это поле создают, часто называют *осадительными.*

На частицу в центробежном поле действует центробежная сила $F_ц$:

$$F_ц = \frac{4}{3}\pi r^3(\rho_ч - \rho_ж)\omega^2 R, \qquad (13.1)$$

где r — радиус частиц; $\rho_ч$ и $\rho_ж$ — плотность частицы и жидкости соответственно; ω — угловая скорость; R — радиус вращения частицы вокруг оси центрифуги.

Сила сопротивления среды F_c определяется согласно закону Стокса:

$$F_c = 6\pi\eta r\upsilon, \qquad (13.2)$$

где η — динамическая вязкость жидкости; υ — скорость движения частицы относительно жидкости.

Приравнивая эти силы, получаем:

$$\upsilon = \frac{2}{9}(\rho_ч - \rho_ж)\frac{r^2\omega^2 R}{\eta}. \qquad (13.3)$$

Итак, чем больше скорость вращения центрифуги и ее радиус и

4. В чем причина резкого ускорения реакций под действием ферментов?
5. Дайте вывод кинетического уравнения Михаэлиса—Ментен.
6. Расскажите о способах определения констант уравнения Михаэлиса—Ментен.
7. Назовите единицы активности фермента. Какова их связь с массой ферментного препарата?
8. Укажите варианты уравнений ферментативной кинетики, учитывающие ингибирование повышенной концентрацией субстрата, концентрацией второго субстрата (конкурентное и неконкурентное), концентрацией продукта реакции (конкурентное и неконкурентное).
9. Как осуществляется учет инактивации продукта реакции в ферментативной кинетике?
10. Как учитывается деградация фермента в ходе биокаталитического процесса в уравнении ферментативной кинетики?
11. Перечислите преимущества и недостатки биокаталитических процессов по сравнению с химическими.
12. Расскажите о способе удержания фермента в зоне реакции с помощью мембранного биореактора. Назовите недостатки этого способа.
13. В чем заключается принцип иммобилизации ферментов?
14. Каковы основные методы иммобилизации ферментов?
15. Опишите методы оценки качества процесса иммобилизации ферментов.
16. Опишите различия между иммобилизованными клетками: нежизнеспособными (но с сохранившейся ферментативной активностью) и живыми.
17. Каковы диффузионные ограничения в гранулах иммобилизованных ферментов и клеток?
18. Объясните причины искажения макрокинетики ферментативных реакций. Приведите зависимость степени искажений от критерия Дамкелера.
19. Что такое критерий Дамкелера для гранул иммобилизованных клеток? Какова связь критерия Дамкелера с целесообразностью иммобилизации клеток?
20. Приведите принципиальные технологические схемы реализации процессов с иммобилизованными ферментами и клетками.
21. Опишите преимущества и недостатки процессов биотрансформации с иммобилизованным катализатором.
22. Приведите примеры использования ферментов в промышленных технологиях.

Глава 13

ОТДЕЛЕНИЕ БИОМАССЫ ОТ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ

●

13.1. ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ

Для отделения взвешенных биологических частиц от культуральной жидкости используются различные физико-химические свойства:

плотность частиц;

размер частиц;

поверхностные свойства частиц.

При разделении суспензий по плотности частиц используют следующие методы:

1) **седиментация** (отстаивание) — для крупных частиц размером от 2,3 мкм до 1 мм, по плотности отличающихся от окружающего раствора;

2) **гидроциклонирование** — от 5 до 700 мкм;

3) **центрифугирование** — от 400 до 900 нм;

4) **ультрацентрифугирование** — от 10 нм до 1 мкм.

По размеру частиц методы разделения биологических суспензий могут быть следующими:

1) **фильтрация** через тканевые фильтры — для частиц размером от 10 мкм до 1 мм;

2) **микрофильтрация** — для частиц размером от 200 нм до 10 мкм;

3) **ультрафильтрация**, позволяющая отделять частицы размером от 10 нм до 5 мкм.

Для сведения: размеры микроорганизмов следующие: *вирусы* — чуть больше 10 нм, *бактерии* — 0,3—1,0 мкм (т. е. 300—1000 нм), *дрожжи* — 3—5 мкм, *мицелий грибов* и *эритроциты* — до 10 мкм.

Мицелиальные грибы имеют размеры микроколоний до 1 мм, что упрощает их отделение от жидкости. Есть также нерастворимые компоненты среды (мука, дробина в спиртовом производстве). Гранулы биокатализаторов имеют размеры около 1 мм (чтобы их легче было отделять).

Макромолекулы имеют размеры частиц в диапазоне 10—120 нм, *микрочастицы* — от 120 нм до 10 мкм, *тонкие взвеси* — от 10 до 100 мкм и *грубые взвеси* — от 100 мкм до 1 мм.

Поверхностные свойства частиц используются в процессе **флотации.** За основу в этом методе принимается не размер, а способность клеток удерживаться пузырьками воздуха; ори-

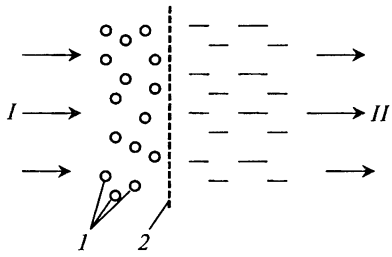


Рис. 13.4. Схема фильтрации культуральной жидкости через ситовую перегородку:

1 — клетки и агломераты микроорганизмов; *2* — ситовая фильтрующая перегородка; *I* — культуральная жидкость; *II* — фильтрат

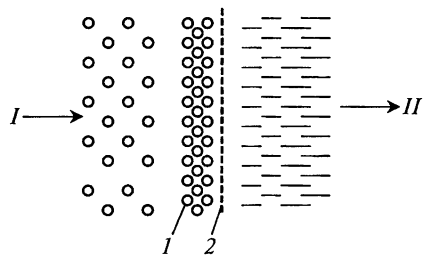


Рис. 13.5. Схема фильтрации культуральной жидкости через слой осадка:

1 — слой осадка; *2* — фильтрующая перегородка; *I* — культуральная жидкость; *II* — фильтрат

При обычной фильтрации задерживаются частицы, величина которых больше размеров пор. Такая фильтрация называется «*ситовой*», и используется она при малом количестве взвешенных частиц, для осветления жидкости. Через какое-то время вся поверхность «сита» закрывается микроорганизмами, и фильтрация прекращается.

Обычно же при фильтрации микроорганизмов используют фильтры, размер пор которых больше размера микроорганизмов. В этом случае фильтрация происходит *через слой осадка* (рис. 13.5).

Сначала клетки микроорганизмов могут «проскакивать» через поры ткани. Затем на поверхности образуется слой осадка, и фактически фильтрование идет через него. По мере фильтрации все время возрастает толщина слоя осадка.

Уравнение Пуазейля определяет основные закономерности фильтрации:

$$\frac{1}{F}\frac{\mathrm{d}V}{\mathrm{d}t} = \frac{\Delta P}{\eta\left[r_{\text{ос}}\dfrac{m_{\text{ос}}V}{F} + r_{\text{ф.п}}\right]}, \qquad (13.9)$$

где F — поверхность фильтрации; V — объем суспензии, подаваемой на фильтрацию; ΔP — перепад давления на фильтровальной перегородке; η — динамическая вязкость жидкости; $r_{\text{ос}}$ — коэффициент сопротивления осадка; $m_{\text{ос}}$ — концентрация осадка во входящей на фильтр суспензии (для биомассы совпадает с X); $r_{\text{ф.п}}$ — коэффициент сопротивления фильтровальной перегородки.

В ходе фильтрования возрастает объем жидкости, прошедшей через фильтр, знаменатель выражения (13.9) возрастает, а скорость фильтрации падает.

чем больше разность плотностей жидкости и частицы, тем быстрее происходит осаждение. Вязкость жидкости снижает скорость осаждения.

Разные типы центрифуг оценивают по так называемому *фактору разделения* $\Phi_Р$, показывающему, во сколько раз ускорение центробежного поля больше ускорения свободного падения g:

$$\Phi_Р = \frac{\omega^2 R}{g}. \qquad (13.4)$$

У обычных центрифуг этот фактор составляет до 3500, а у суперцентрифуг выше — 5000—7000. Ультрацентрифуги могут иметь $\Phi_Р$ до 20 000.

Скорость вращения барабана варьируется от 3000 до 30 000 об/мин.

Существенным показателем работы центрифуги является *индекс производительности* Σ:

$$\Sigma = F_{ос}\Phi_Р, \qquad (13.5)$$

где $F_{ос}$ — площадь цилиндрической поверхности осаждения.

Скорость свободного осаждения υ_0 связана со скоростью осаждения в центробежном поле соотношением

$$\upsilon_0 = \upsilon/\Phi_Р, \qquad (13.6)$$

или

$$\upsilon_0 = \frac{2}{9}(\rho_ч - \rho_ж)r^2 g/\eta. \qquad (13.7)$$

Общая производительность центрифуги определяется соотношением

$$Q_X = \upsilon_0\Sigma. \qquad (13.8)$$

В этом уравнении член Σ характеризует свойства центрифуги (суммарную поверхность осаждения, умноженную на суммарный фактор разделения). Его следует определять экспериментально для заданной скорости вращения центрифуги.

Величина υ_0 характеризует приведенную скорость свободного осаждения и зависит только от свойств жидкости. Ее лучше определять экспериментально на центрифуге с известной величиной Σ (например, на лабораторной стаканчиковой).

Рассчитывать υ_0 исходя из свойств жидкости нецелесообразно, так как обычно различаются размеры и плотность частиц, да и вязкость жидкости.

Рассмотрим теперь конструкцию наиболее распространенного в биотехнологии тарельчатого сепаратора (рис. 13.3).

Из уравнения видно, что скорость фильтрации можно увеличить путем повышения перепада давления. Однако для биологических суспензий это не так. Дело в том, что рыхлая структура слоя осадка даже при незначительном превышении оптимального перепада давления нарушается и образуется плотная «лепешка», плохо пропускающая жидкость. Такие системы называются *системами со сжимаемым осадком.* Важно удержаться от соблазна поднять давление: кратковременное повышение производительности фильтра, достигнутое благодаря увеличению разности давлений, обычно сопровождается последующим катастрофическим падением производительности.

Для улучшения скорости фильтрации в биотехнологии часто используют *фильтровальные порошки* для организации фильтрования через намывной слой порошка (рис. 13.6).

Частицы порошка (кизельгур, перлит, диатомит) имеют размеры больше клеток микроорганизмов, но после «намывки» создают объемный слой с системой пор. Суспензия, проходя через этот слой, оставляет биомассу микроорганизмов на частицах порошка.

Коэффициент сопротивления осадка при этом снижается в десятки раз, что позволяет фильтровать труднофильтруемые жидкости.

Барабанные вакуум-фильтры. В них непрерывно осуществляется снятие внешнего тонкого намывного слоя с осевшим осадком, что постоянно обновляет фильтровальную поверхность.

Лучше всего для работы с намывным слоем подходит барабанный вакуум-фильтр, в котором непрерывно проходят последовательные операции фильтрации, подсушки, промывки и отделения осадка, а также регенерации ткани и намывного слоя осадка.

Как и при отстаивании, обработка жидкости перед фильтрацией повышает скорость фильтрации. В биотехнологии используют следующие способы обработки:

тепловая коагуляция (нагрев жидкости с частичной инактивацией целевого продукта);

кислая коагуляция (подкисление жидкости, что так-

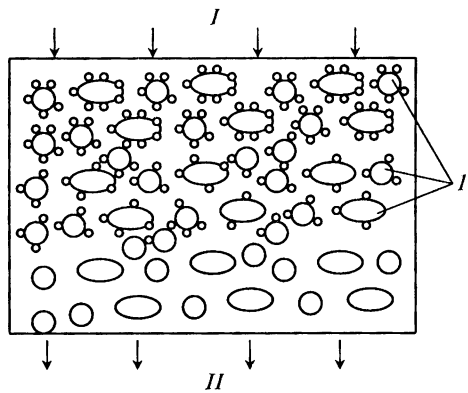


Рис. 13.6. Схема фильтрации культуральной жидкости через намывной слой фильтровального порошка:

I — гранулы фильтровального порошка с осажденными на них клетками микроорганизмов; *I* — культуральная жидкость; *II* — фильтрат

же часто неблагоприятно влияет на целевой продукт и вызывает его потери);

реагентная коагуляция (солями железа, алюминия);

флокуляция (полиэлектролитами);

добавление наполнителей (порошков, образующих зерна, или ионов, образующих нерастворимые осадки с веществами, растворенными в суспензии).

Назовем преимущества и недостатки фильтрации через намывной слой порошка по сравнению с отстаиванием или сепарацией.

Преимущества. С помощью фильтрации получают более обезвоженные осадки (20—40 % по сухой массе), чем при отстаивании или сепарации.

Недостатки. Проблематично использовать фильтрацию с намывным слоем, если целевым продуктом является сама биомасса или внутриклеточные продукты из нее. Даже если целевой продукт находится в фильтрате, возникает *проблема утилизации загрязненного биомассой порошка.* Скармливать животным перлит, диатомит нежелательно. Регенерировать порошки отжигом биомассы в печах можно, но это энергоемко и при этом часто нарушаются фильтровальные свойства порошков. Если использовать более мягкие порошки (отруби, древесную муку), то осадок с биомассой можно использовать как корм. Однако эти порошки имеют худшие фильтровальные свойства.

Осветляющие фильтры. Эта модификация служит для отделения твердой фазы (мути) от суспензий, содержащих малое количество твердых частиц. Но и это малое количество в готовом продукте или полупродукте иметь нежелательно.

Мы ранее уже говорили о *ситовых фильтрах* (размеры пор меньше размеров твердых частиц). Вот такие фильтры здесь чаще всего и применяются — другие не работают: слишком долго приходится ждать, когда твердые частицы образуют слой осадка. Обычно используют пластинчатые фильтры: микрофильтрационные, если размеры частиц 0,1—10 мкм, ультрафильтрационные, если размеры частиц 10—100 нм.

Мы уже упоминали о недостатках обычного способа ситовой фильтрации, при которой направление потока жидкости перпендикулярно фильтровальной перегородке (или совпадает с направлением фильтрации) (см. рис. 13.4). В этом случае довольно быстро происходит забивание пор перегородки твердыми частицами осадка, и скорость фильтрации сначала уменьшается, а затем фильтрация и вовсе прекращается. *Регенерация забитых мембран довольно сложна.*

Этих недостатков лишены фильтры, в которых направление потока жидкости параллельно фильтровальной перегородке (перпендикулярно направлению фильтрации) (рис. 13.7). В этом случае значительно снижается опасность забивания пор фильтровальной перегородки.

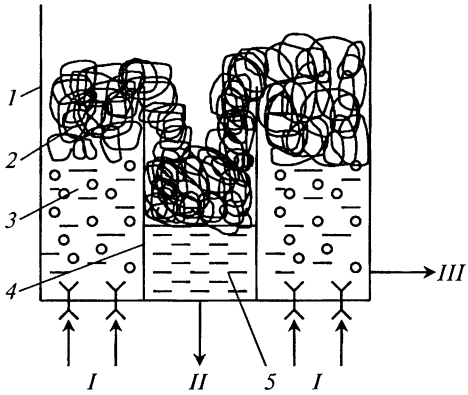


Рис. 13.8. Схема флотации культуральной жидкости:

1 — внешняя обечайка флотатора; *2* — пена; *3* — флотируемая жидкость; *4* — внутренняя обечайка флотатора; *5* — скоалесцированная пена; *I* — воздух; *II* — флотат; *III* — обедненный раствор

через специальный диспергатор сжатый воздух, при этом образуется большое количество мелких пузырей. Пузыри всплывают, захватывая по пути клетки микроорганизмов. Далее пена переваливается через край внутреннего цилиндра и отстаивается в кольцевом зазоре внешнего. При этом пузыри разрушаются. *Флотат* — обогащенная по биомассе жидкость.

Измерения показали, что для хорошо флотирующихся клеток концентрация клеток в пене в 5—7 раз превышает их концентрацию в исходной суспензии.

Для оценки производительности флотатора важно знать время отстоя пены, а оно зависит от множества физико-химических факторов. При этом в обедненной жидкости после ее отвода из аппарата остается 5—8 % общего количества биомассы микроорганизмов, что является *потерями.*

Во время *отстоя пены* происходит ее *осушение:* жидкость по стенкам пузырьков стекает вниз, а биомасса остается в осушенной пене.

Размеры клеток флотируемой жидкости — до 10 мкм.

Для облегчения флотации в суспензию добавляют *флотореагенты* — длинноцепочечные жирные кислоты и амины.

Для обычной флотации размеры пузырей составляют 100 мкм и выше.

Такая флотация называется **пневматической**, или **барботажной.**

Важной модификацией процесса флотации является **напорная** флотация. Сущность ее состоит в том, что жидкость сначала насыщается газом (обычно воздухом) под давлением (до 5 атм), после чего происходит резкий сброс давления. В результате появляются мелкие пузырьки воздуха, которые и оказывают флотационное действие. При этом размеры пузырьков меньше — около 40 мкм, что облегчает флотацию.

Размеры пузырьков получаются различными, если использовать для насыщения *углекислый газ* или смесь углекислого газа с воздухом. За счет более высокой растворимости углекислоты насыщение происходит быстрее, а сами пузырьки больше по разме-

Глава 14

ДЕЗИНТЕГРАЦИЯ КЛЕТОК МИКРООРГАНИЗМОВ

●

В случаях, когда целевой продукт локализован в клетках микроорганизмов и самопроизвольно не переходит в жидкость, приходится применять специальную операцию разрушения клеток, в результате чего их содержимое оказывается в водной фазе, откуда его можно выделять практически теми же методами, что и другие, внеклеточные, продукты метаболизма.

14.1. ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ

Дезинтеграция клеток — это не стерилизация. При **дезинтеграции** важно не просто сделать клетки нежизнеспособными (например, путем нагрева), но главное нарушить оболочку клеток, чтобы внутриклеточное содержимое (цитоплазма) могло выделиться в окружающую клетку жидкость или могло быть выделено из нее через ослабленную клеточную стенку.

Нежелательны дальнейшие измельчения полученного дезинтеграта. Именно «однократность» процесса разрушения клетки отличает дезинтеграцию от измельчения обычных материалов.

И все же в терминах процессов и аппаратов химической технологии процесс дезинтеграции более всего близок к процессу измельчения материалов. Трудности по сравнению с традиционными объектами химической технологии заключаются в следующем:

микробные клетки весьма малы;

они имеют плотность, близкую к плотности окружающего раствора;

клеточные стенки построены из природных биополимеров, достаточно эластичных и прочных.

Различия в составе клеточных стенок. Клеточные стенки различных видов микроорганизмов отличаются по толщине, составу и свойствам. Рассмотрим эти различия.

Грамположительные бактерии. Стенки достаточно толстые (15—20 нм), содержат 40—90% пептидо-гликанов (т. е. полимеров с аминокислотными и глюкозными составляющими цепи), а остальное — полисахариды и тейхоевые кислоты.

ентировочный диапазон размеров флотируемых частиц варьирует от 1 до 200 мкм.

Конкретный выбор того или иного метода зависит от опытной проверки, так как не всегда точно известны свойства отделяемых частиц и их поведение в условиях использования тех или иных методов разделения.

Основные характеристики методов разделения суспензий подробно рассматриваются в курсе «Процессы и аппараты химической технологии». Здесь же даны особенности их использования в биотехнологических процессах.

13.2. ОТСТАИВАНИЕ И ОСАЖДЕНИЕ

Этот метод наиболее часто используют в процессах очистки стоков — отстаивание активного ила. Используется он также для отделения животных и растительных клеток, мицелиальных грибов и пивных дрожжей.

Для успешного проведения процесса отстаивания не обязательно сами микроорганизмы должны быть крупными: они могут концентрироваться на хлопьях, агломератах.

Часто процесс отстаивания комбинируется с предварительной коагуляцией или флокуляцией. В обоих случаях к суспензии добавляется реагент (соли алюминия или железа при коагуляции и полиэлектролиты при флокуляции).

Прикрепленные к длинным молекулам коагулянтов или флокулянтов несколько клеток создают основу агломерата, который в результате имеет больший вес и меньшую подвижность, что приводит к седиментации осадка (рис. 13.1).

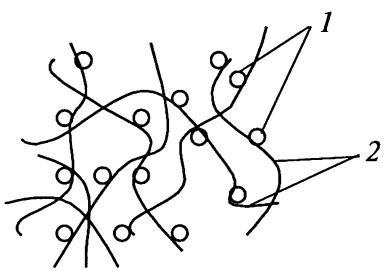


Рис. 13.1. Схема коагуляции или флокуляции микробной биомассы под воздействием реагентов:

1 — клетки или агломераты микроорганизмов; *2* — молекулы коагулянтов или флокулянтов

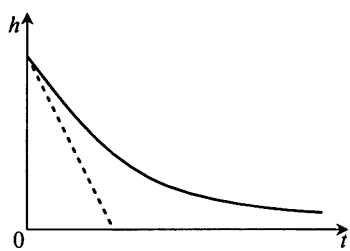
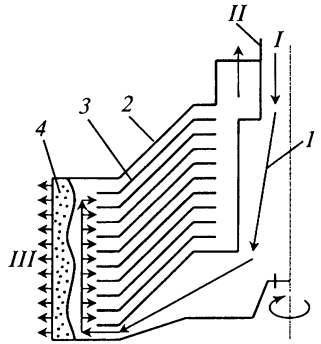


Рис.13.2. Изменение высоты *h* границы раздела фаз (осадка и жидкости) во времени при осаждении:

сплошная линия — полидисперсная суспензия; пунктирная линия — монодисперсная система

Рис. 13.3. Принципиальная схема центробежного сепаратора:

1 — полый вал; *2* — корпус; *3* — коническая тарелка; *4* — слой осадка; *I* — вход жидкости; *II* — выход жидкости; *III* — выход сгущенной биомассы



Этот сепаратор изобрел шведский ученый Густав де Лаваль в 1896 г. Сепараторы выпускает известная в биотехнологической промышленности фирма, которая так и называется — «Альфа Лаваль».

Сепаратор имеет полый вал, неподвижный корпус с размещенным в нем пакетом вращающихся с валом конических тарелок, находящихся одна над другой так, что образуется коническое пространство. Жидкость входит по полому валу под нижней тарелкой и доходит до внешнего цилиндрического края корпуса. Далее она движется между коническими тарелками к центробежному коллектору, из которого осуществляется выход жидкости.

В процессе этого движения частицы биомассы отбрасываются по направлению от центра вращения и сползают по коническим поверхностям тарелок к боковой стенке корпуса, создавая в конечном счете возле нее слой сгущенной биомассы.

В корпусе расположены сопла, из которых под большим давлением происходит выгрузка сгущенной биомассы.

Существуют различные модификации подобных сепараторов, в том числе с ручной, а также механизированной циклической и непрерывной выгрузкой осадка.

В целом такая конструкция увеличивает время пребывания частиц в сепараторе и тем самым его производительность.

Преимущества центробежных сепараторов:

высокая производительность;

хорошая степень концентрирования (до 10—15); достигается концентрация биомассы 5—15 % по сухой массе;

возможность повышения скорости сепарирования предварительной обработкой жидкости флокулянтами.

Недостатки:

сложность оборудования;

энергоемкость процесса (хотя по сравнению с выпаркой затраты энергии все же меньше).

13.4. ФИЛЬТРАЦИЯ

Фильтрация — это задержание взвешенных частиц сетчатой (тканевой) или пористой перегородкой. Движущей силой является разность давлений, вызывающая протекание жидкости (рис. 13.4).

Грамотрицательные бактерии. Клетки содержат гораздо более тонкий пептидо-гликановый слой (до 2 нм), но зато имеют внешнюю мембрану.

Дрожжи имеют стенки клетки толщиной около 70 нм (чем клетка старше, тем толще). Они построены в основном из полисахаридов (глюканов и маннанов).

Грибы. В большинстве грибов стенки клетки состоят главным образом из полисахаридов — глюкана, хитина, а также гликопротеина.

Животные клетки имеют очень тонкие стенки (одна цитоплазматическая мембрана).

Чувствительность клеток к внешним механическим воздействиям. По чувствительности к внешним механическим воздействиям клетки разной природы располагаются в таком ряду (в порядке понижения чувствительности):

животные клетки → грамотрицательные бациллы и кокки → грамположительные бациллы → дрожжи → грамположительные кокки → споры → мицелий грибов.

Классификация методов дезинтеграции клеток. В общей форме классификация представлена на рис. 14.1.

Все методы состоят из двух больших групп: механические (физические) и немеханические методы.

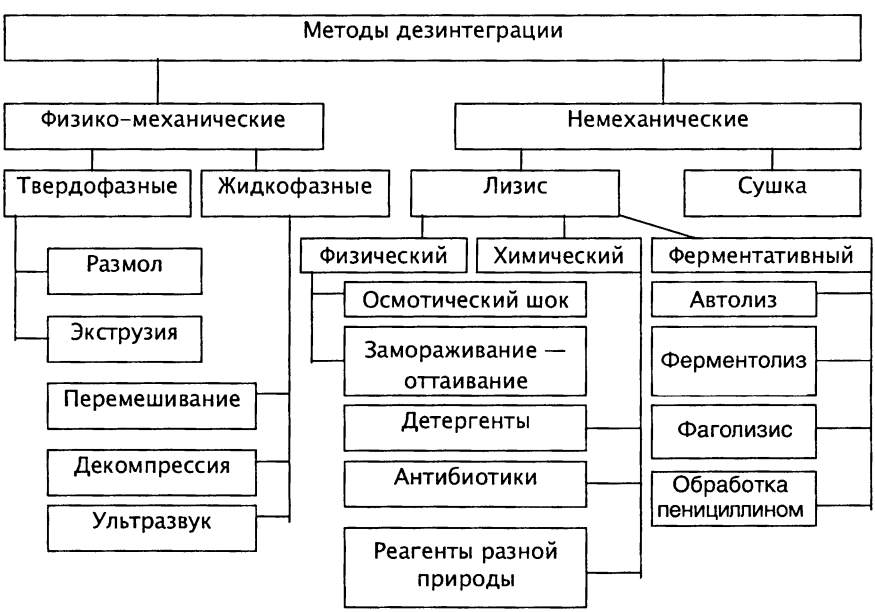


Рис. 14.1. Классификация методов разрушения клеток

ру. Большие пузырьки полезны, когда необходимо «поднимать» относительно крупные частицы, такие, как хлопья активного ила.

Не всегда удобно при напорной флотации насыщать газом саму суспензию. В установках очистки стоков, например, используют *вспомогательную флотационную жидкость* (воду, или это может быть очищенный от твердых частиц *возвратный поток*). Эта вспомогательная жидкость насыщается под давлением газом, а затем вводится под слой очищаемой жидкости. Растворенный газ переходит в пузырьки, которые и выполняют флотационные задачи.

Электрофлотация — модификация процесса флотации, в котором пузырьки создаются за счет электролиза. Образующиеся пузырьки водорода или кислорода имеют размер до 30 мкм, а пена обогащается флотируемой биомассой в 15—20 раз больше по сравнению с исходной суспензией. Недостатком такой системы является возможность вредного воздействия электрического тока на клетки микроорганизмов.

Вопросы для повторения

1. Назовите границы использования различных методов разделения суспензий по размеру частиц.
2. В чем состоят особенности методов отстаивания для отделения биомассы микроорганизмов?
3. Что такое иловый индекс?
4. Чем отличается коагуляция от флокуляции?
5. Какую роль играют процессы коагуляции и флокуляции при отделении биомассы микроорганизмов от культуральной жидкости?
6. Как определяется сепарируемость культуральных жидкостей?
7. Какова движущая сила процессов сепарирования и центрифугирования биомассы микроорганизмов?
8. По какому показателю сравнивают между собой сепараторы и центрифуги?
9. Поясните различие между ситовым и объемным принципами фильтрации суспензий.
10. В чем суть фильтрации с намывным слоем фильтровального порошка?
11. Какие материалы используются в биотехнологии в качестве фильтровальных порошков?
12. Осветляющие фильтры — в чем их отличие?
13. Микрофильтрация: что обеспечивает возможность высоких скоростей фильтрации при достаточно концентрированных суспензиях?
14. Каковы недостатки микрофильтрации биомассы микроорганизмов по сравнению с тканевой фильтрацией?
15. На чем основана флотация микроорганизмов?
16. Что дает использование различных методов флотации — пневматической, напорной, электрофлотации?
17. В чем смысл использования специальной флотирующей жидкости при напорной флотации?

Механические методы делятся на две подгруппы в зависимости от фазы, в которой происходит процесс дезинтеграции: твердофазные и жидкофазные. Твердофазные методы подобны методам измельчения твердых тел любого происхождения (размол, экструзия). Понятно, что биомасса клеток перед началом такого процесса должна быть переведена в замороженное состояние.

Немеханические методы включают в себя сушку, которая резко изменяет структуру клеток и их оболочек, и лизис различной природы (под воздействием физических, химических и ферментативных факторов).

14.2. МЕХАНИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Механические жидкофазные методы. В этих методах биомассу используют в виде суспензии, хотя это уже не просто культуральная жидкость, а достаточно хорошо сгущенная суспензия (с концентрацией биомассы 4—30 %).

Рассматривая проблемы масштабного перехода, мы упоминали о механическом воздействии на клетки. Указывались даже пределы окружной скорости мешалки, которые не нужно превышать, чтобы клетки не повреждались (8 м/с). Может быть, достаточно просто превысить эту скорость, да еще специально сделать мешалки с острыми краями, чтобы достичь нужного эффекта? Что-то в этом роде используется для измельчения и гомогенизации растительных и животных тканей — гомогенизаторы. Однако эффективность таких устройств по отношению к клеткам не столь радикальна. Для бактерий размером 0,5—1 мкм никакие острые края мешалок не будут достаточно остры, разве что для нежных клеток животного происхождения.

Наиболее распространены в этом классе баллистические дезинтеграторы, напоминающие по своей конструкции шаровые мельницы. Эти дезинтеграторы имеют камеру с вращающимся ротором (или просто вращающуюся камеру).

Камера заполняется специальными мелющими телами — стеклянными или полимерными шариками — и обрабатываемой суспензией микроорганизмов. Размеры шариков порядка 0,3—0,5 мм (установлено, что эти размеры являются оптимальными). Далее обеспечивается вращение ротора и воздействие мелющих тел на клетки путем истирания, раздавливания.

Чем выше *скорость вращения барабана* (а скорости здесь достигают 2000 об/мин и более), тем больше эффективность дезинтеграции.

Эффективность оценивается по величине R — отношению концентрации разрушенных клеток к исходной концентрации клеток, загруженных в дезинтегратор.

Концентрация микроорганизмов в суспензии не влияет на качество дезинтеграции в довольно широких пределах (40—200 г/л).

Недостатки баллистических дезинтеграторов:

сложность устройства;

большая энергоемкость;

низкая производительность;

разогревание суспензии, которое приводит к порче тех компонентов клетки, ради которых и проводится их дезинтеграция.

Для преодоления последнего из перечисленных недостатков используют охлаждение, вплоть до охлаждения сжиженным CO_2, но и это не очень помогает.

Воздействие на клетки перепада давления. В таких дезинтеграторах клетки могут находиться либо во *взвешенном состоянии в жидкости* (тогда она пропускается через сопло), либо в *замороженном состоянии* (тогда их продавливают через узкую щель методом экструзии).

В первом случае действуют два эффекта: *кавитационный* с образованием срезающих турбулентных пульсаций и *декомпрессионный*, в результате которого при резком сбросе давления клетка как бы взрывается изнутри.

Во втором случае влияют именно механические воздействия кристаллов льда на стенки клетки.

В *жидкостном варианте* давление создается плунжерным насосом или прессом. Величина давления варьируется от 10 до 210 МПа, чаще — 50—55 МПа.

Экспериментально установлена связь показателя эффективности R с давлением:

$$\ln\frac{1}{1-R} = kNP^{2,9}, \qquad (14.1)$$

где N — число «пропусканий» суспензии через дезинтегратор; P — давление в дезинтеграторе.

Почти кубическая зависимость от давления показывает, что его надо увеличивать. Но и здесь надо проводить мероприятия по охлаждению зоны декомпрессии.

Недостатки этого способа:

необходимость высоких давлений;

низкая производительность (отверстие мало!);

плохая работа на мицелиальных микроорганизмах (они забивают отверстие даже при столь высоких перепадах давления).

Те же недостатки характерны и для экструзии. Здесь давления достигают 550 МПа! Ясно, что этот способ можно использовать лишь в лаборатории.

Ультразвуковая дезинтеграция. Применяются частоты озвучивания суспензии 15—25 кГц. Здесь также происходит нагрев суспензии.

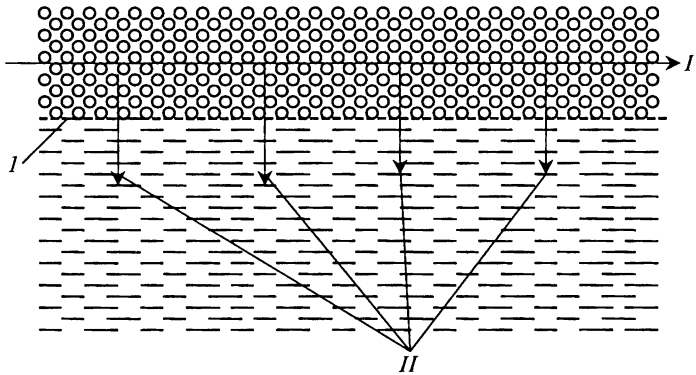


Рис. 13.7. Схема фильтрации, перпендикулярной направлению потока фильтруемой жидкости:

I — микрофильтрационная мембрана; *I* — культуральная жидкость-концентрат; *II* — пермеат

Скорость потока жидкости в первом варианте *равна* скорости фильтрации. Во втором же варианте скорость потока суспензии значительно *больше* скорости потока фильтрата. Технически это требует создания контура *циркуляции суспензии.*

Такой прием позволяет повышать концентрацию микроорганизмов до 10 % и при этом продолжать микрофильтрацию.

Конструкции и материалы, из которых изготовлены подобного рода фильтры, могут быть различными, но для промышленности наиболее привлекательны м*еталлокерамические.* Они регенерируются обратным потоком фильтрата (подачей давления в обратном направлении к перегородке) и позволяют проводить тепловую стерилизацию.

13.5. ФЛОТАЦИЯ

Флотация — это выделение клеток микроорганизмов из культуральной жидкости за счет адгезии (прилипания) микроорганизмов к поднимающимся в жидкости пузырькам воздуха и затем сбора пены и ее конденсации (коалесценции). Обычно чем меньше пузыри, тем медленнее они поднимаются и тем больше время пребывания их в жидкости и вероятность захвата клеток микроорганизмов.

На рис. 13.8 представлен один из вариантов конструкции флотатора.

Флотатор представляет собой две коаксиально расположенные цилиндрические обечайки, кольцевой канал между которыми заполняется флотируемой суспензией. В этот канал снизу подается

Физические методы лизиса включают в себя метод осмотического шока и метод попеременного замораживания — оттаивания.

Осмотический шок. По этому методу в суспензии сначала создается высокое осмотическое давление (например, с помощью 1 М глицеринового или 1 М сахарозного раствора). Затем производится резкое разбавление суспензии водой. При этом клетки разрушаются под действием высокого внутриклеточного осмотического давления. Подобным же образом действуют растворы солей.

Есть, например, такие микроорганизмы — *галофилы*, которые культивируются на высококонцентрированных солевых средах. По окончании процесса культивирования разбавление культуральной жидкости водой почти сразу приводит к лизису клеток. Это используется в технологии — не требуется специальных ухищрений по дезинтеграции клеток!

Замораживание—оттаивание. Известно, что замораживание используется в противоположных целях — для длительного хранения микроорганизмов в жизнеспособном состоянии. Но при этом и замораживание, и оттаивание проводят в специальном программированном режиме, препятствующем повреждению клеток. При дезинтеграции, наоборот, используют режимы, способствующие повреждениям клеточных оболочек.

Недостатками метода являются большая длительность и энергоемкость и к тому же невысокая степень дезинтеграции. Это не позволяет широко использовать данный метод в промышленном масштабе.

Химические способы лизиса предусматривают воздействия на клетку химических реагентов различной природы, которые приводят к деструкции упорядоченных структур клеточной стенки микроорганизмов.

Обработка суспензии микроорганизмов такими реагентами, как *щелочь, кислота, мочевина, аммиак, бутанол, толуол, пероксид водорода, детергенты*, повышает проницаемость клеточных стенок, благодаря чему биополимеры выводятся из клеток в раствор. Для усиления действия возможно использование упомянутых реагентов в комплексе с повышением температуры, резким изменением величины pH.

Некоторые *антибиотики*, ингибирующие рост клеток микроорганизмов, оказывают литическое воздействие на клетки. Среди реагентов упоминают также *глицерин, олеиновую кислоту*, способствующие быстрому лизису клеток.

Эти способы имеют важный недостаток. Химические реагенты могут вступать в реакцию с извлекаемыми из клетки биополимерами и к тому же остаются в лизированной суспензии, откуда их потом трудно выделять.

Ферментативные способы лизиса. Использование биологических агентов для ферментативного лизиса клеточных оболочек является одним из наиболее перспективных мето-

дов. Среди этих методов различают: *автолиз* — разрушение клеточных стенок собственными клеточными ферментами, *ферментолиз* — добавление протеаз, гликаназ и других ферментов в раствор, добавление *пенициллина* как вещества, препятствующего синтезу материала клеточной стенки, и *фаголизис* — разрушение клеток под воздействием фагов.

Автолиз. Для разложения клеточных стенок собственными протеолитическими ферментами клетки необходимо сначала осуществить шоковое воздействие или величиной pH (обычно закислением), или температурой, или затравочной дозой таких реагентов, как толуол, хлороформ, этилацетат, олеиновая кислота. Далее процесс автолиза протекает при температуре, свойственной данному виду микроорганизмов. Например, автолиз дрожжей происходит при 45—50 °С. Надо отметить, что это довольно длительный процесс (12—24 ч).

Ферментолиз. Недостатки автолиза привели к использованию интродуцируемых в суспензию внеклеточных ферментов, вызывающих лизис клеточной стенки. Исходя из рассмотренного ранее состава клеток, такими ферментами могут быть *протеазы, гликаназы, манназы* и иногда *лизоцим*, представляющий собой комплекс различных ферментов.

Для этих целей эффективно применение *иммобилизованных* ферментов, которые можно использовать многократно.

Получаемые при автолизе и ферментолизе растворы часто содержат легкоусвояемые вещества (белки, нуклеиновые кислоты, аминокислоты и др.). Поэтому автолизаты и ферментолизаты — не просто полупродукт для выделения внутриклеточных составляющих, но также могут быть хорошим кормовым продуктом. Он особенно подходит для молодняка рыб и животных, которые еще не приспособились своими ферментами переваривать клеточные оболочки и разрушать их.

Клеточные оболочки, также являющиеся продуктом процесса дезинтеграции, могут быть отделены от раствора, высушены, после чего их вполне можно использовать как хороший сорбент для вредных примесей в пищевых продуктах или как тот же корм для животных.

Добавление пенициллина. Биохимическая основа действия пенициллина на микробные клетки — это торможение синтеза нового материала клеточной стенки. В результате стенка истончается за счет собственного всегда идущего автолиза и становится проницаемой для внутриклеточных биополимеров.

Фаголизис. Известно «вирусное заболевание» микробных культур, вызываемое фагом. Его отличительным свойством является как раз лизис микробных клеток, т. е. вроде бы то, что нам нужно при дезинтеграции.

Теоретически такую возможность себе можно представить. Однако последствия заражения фагом производственных фер-

ментеров настолько велики, что в практике такая возможность выглядит примерно как способ устранения головной боли с помощью гильотины.

Несмотря на большое разнообразие рассмотренных методов, следует признать, что в промышленных условиях наиболее перспективно применение методов лизиса — с использованием либо мягких химических реагентов, либо ферментативных. Другие методы имеют лишь вспомогательное значение для опытов в лаборатории.

Вопросы для повторения

1. Каково основное назначение дезинтеграции клеток микроорганизмов? Поясните отличие дезинтеграции от стерилизации и измельчения.
2. Каковы особенности клеточных стенок бактерий, дрожжей, грибов, животных и растительных клеток?
3. Назовите виды клеток в порядке возрастания чувствительности к механическим воздействиям.
4. Что такое баллистическая дезинтеграция? Назовите ее достоинства и недостатки.
5. Что такое декомпрессионная дезинтеграция? Назовите движущую силу этого процесса.
6. Что является причиной разрушения клеток при экструзионной дезинтеграции?
7. Как влияют концентрация клеток и давление на эффективность баллистической дезинтеграции?
8. Чем отличаются ферментативные методы дезинтеграции от автолиза?
9. Каковы затраты энергии на механическую дезинтеграцию клеток микроорганизмов?
10. За счет каких факторов происходит дезинтеграция клеток при их замораживании и последующем оттаивании?
11. Какие методы дезинтеграции наиболее эффективны в крупномасштабном промышленном производстве?

Из этого соотношения видно, что концентрация растворенного вещества в биомассе после однократного экстрагирования существенно меньше, чем перед ним. Эта величина тем меньше, чем больше коэффициент распределения $y_{жт}$ и чем больше соотношение объемов жидкости и твердой фазы $V_ж / V_т$.

Кстати, отсюда же видно, что на конечную величину концентрации не влияет коэффициент массоотдачи K_Y: он лишь ускоряет или замедляет процесс экстрагирования, но итоговый результат одинаковый.

Степень извлечения η при этом составляет:

$$\eta = \frac{C_{т0} - C_{тр}}{C_{т0}} = \frac{1}{1 + \frac{1}{(V_ж / V_т) y_{жт}}}. \qquad (15.7)$$

Чтобы повысить концентрацию вещества в экстракте, стараются не слишком увеличивать отношение $V_ж$ к $V_т$.

Лучше сначала отделить твердую фазу от экстракта и провести повторно экстрагирование свежим растворителем. Так можно делать несколько раз, а затем объединить экстракты. Это будет лучше для полноты извлечения, чем сразу однократно добавить весь объем экстрагента. В этом заключается смысл **многоступенчатого**, или **многократного, экстрагирования**.

Еще лучше использовать **противоточное экстрагирование**: свежую биомассу с наиболее высокой концентрацией извлекаемого вещества соединяют с экстрактом, полученным после двух-трех операций экстрагирования, а биомассу после 2-го или 3-го экстрагирования — со все более чистым экстрагентом (рис. 15.3).

На схеме не отмечено, но предполагается, что после каждой стадии происходит разделение жидкой и твердой фаз.

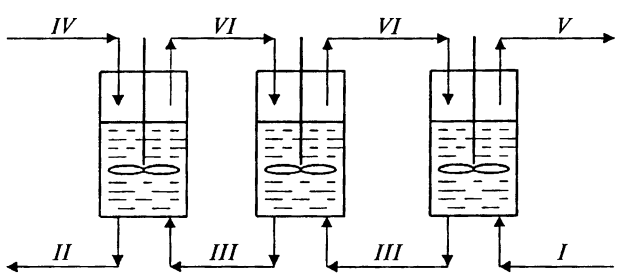


Рис. 15.3. Схема противоточного 3-ступенчатого экстрагирования:

I — свежая биомасса; *II* — отработанная биомасса (шрот); *III* — промежуточно экстрагированная биомасса; *IV* — чистый экстрагент; *V* — насыщенный экстрагент; *VI* — экстрагент промежуточного насыщения

Глава 15

ЭКСТРАКЦИОННЫЕ МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ПРОДУКТОВ МЕТАБОЛИЗМА

●

Экстракционные методы выделения продуктов, используемые в биотехнологии, подразделяются на две основные группы: методы ***экстрагирования***, когда целевой продукт извлекается жидкостью (экстрагентом) из твердой фазы (рафината) — чаще всего биомассы микроорганизмов, и методы ***жидкостной двухфазной экстракции***, в которой продукт, растворенный в жидкой фазе (рафинате), извлекается другой жидкостью (экстрагентом) — обычно это органический растворитель. В обоих случаях фаза, из которой выделяется продукт, называется ***рафинат***, жидкая фаза, служащая агентом процесса экстракции, называется ***экстрагент,*** эта же фаза после перехода в нее растворенного вещества называется ***экстракт.*** Твердую фазу (рафинат) после извлечения из нее растворенного вещества называют ***шрот***.

15.1. ТРАДИЦИОННЫЕ МЕТОДЫ ЭКСТРАГИРОВАНИЯ ПРОДУКТОВ ИЗ БИОМАССЫ

Экстрагирование из биомассы клеток. Некоторые из продуктов метаболизма можно выделить из биомассы без разрушения клеточных стенок (липиды, некоторые ферменты). В большинстве же случаев используют сначала рассмотренные ранее способы дезинтеграции клеток и экстрагированию подвергают ***дезинтеграт*** — разрушенные клетки или их оболочки. Экстрагирование применяется для извлечения *ферментов* из культур грибов, выращенных твердофазной ферментацией, *микробного жира* или *липидов* из биомассы дрожжей, *антибиотиков* и *полипептидов*, локализованных на клетках микроорганизмов, при выделении *внутриклеточных биополимеров* типа белков, нуклеиновых кислот, полисахаридов и т. д.

Всегда за экстрагированием следует стадия отделения твердой фазы, в результате чего извлекаемое вещество переводится в жидкую фазу — экстракт, из которого в дальнейшем и выделяют продукт.

В качестве экстрагентов в зависимости от вида извлекаемого

На рис. 15.1 показано, что концентрация вещества в твердой фазе резко падает от начального значения $C_{т0}$ до равновесного $C_{тр}$. Концентрация же в жидкой фазе увеличивается не так значительно: от $C_{ж0} = 0$ до равновесного $C_{жр}$, но при этом концентрация в жидкости $C_ж$ после некоторого момента времени начинает превышать концентрацию в твердой фазе, т. е. $C_ж > C_т$. Казалось бы, при этом растворенное вещество должно переходить из жидкости обратно в твердую фазу, но реально извлечение идет, пока не установятся равновесные значения $C_{тр}$ и $C_{жр}$. Если же сравнивать между собой значения $C_т$ и $C_ж/y_{жт} = C_т^*$, то график выглядит по-другому (рис. 15.2).

Этот график показывает, что к концу процесса движущая сила массоотдачи становится равной нулю.

Во всех случаях должно быть справедливо при равновесии $C_{жр} = y_{жт}C_{тр}$, или *в промежуточных ситуациях*:

$$C_т^* = C_ж / y_{жт}. \qquad (15.4)$$

С другой стороны, *в равновесном состоянии* сумма количеств вещества, растворенного в твердой и жидкой фазе, должна быть равна величине, имевшей место в начале процесса экстрагирования:

$$V_т C_{т0} = V_т C_{тр} + V_ж C_{жр}. \qquad (15.5)$$

Решая эти уравнения вместе, получаем:

$$C_{тр} = C_{т0} \frac{1}{1 + \frac{V_ж}{V_т} y_{жт}}. \qquad (15.6)$$

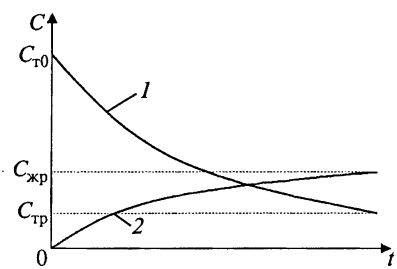


Рис. 15.1. Изменение в процессе экстрагирования концентраций растворенного вещества в твердой (*1*) и жидкой (*2*) фазах:

$C_{т0}$ — начальная концентрация в твердой фазе; $C_{тр}$ — равновесная концентрация в твердой фазе в конце процесса; $C_{жр}$ — равновесная концентрация в жидкой фазе в конце процесса

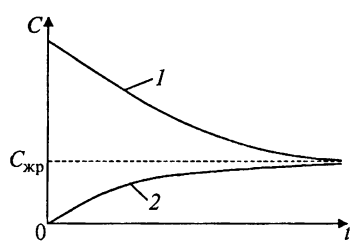


Рис. 15.2. Изменение движущей силы процесса экстрагирования:

1 — концентрация растворенного вещества $C_т$ в твердой фазе; *2* — равновесная концентрация растворенного вещества в твердой фазе $C_т^*$ к его текущей концентрации в жидкой фазе $C_ж$

Для больших масштабов метод мало применим, так как отсутствуют мощные генераторы ультразвука, к тому же в толстых слоях жидкости происходит гашение звука.

В табл. 14.1 представлена сравнительная чувствительность отдельных видов клеток к разрушению различными механическими методами.

Таблица 14.1

Чувствительность клеток к разрушению различными методами*

Вид клеток	Способ дезинтеграции			
	ультразвук	перемешивание	сжатие жидкости	сжатие при замораживании
Животные клетки	7	7	7	7
Грамотрицательные бациллы и кокки	6	5	6	6
Грамположительные бациллы	5	4	5	4
Дрожжи	3,5	3	4	2,5
Грамположительные кокки	3,5	2	3	2,5
Споры	2	1	2	1
Мицелий грибов	1	6	1	5

* Оценка выражена в баллах от 1 до 7 в порядке возрастания чувствительности, определенной по показателю ΔE_{260}.

Показатель эффективности дезинтеграции R колеблется в широких пределах — от 10—20 % до 90—95 % и даже до 100 % с различными, конечно, затратами.

Энергетические затраты составляют для баллистических дезинтеграторов 0,3—1 Дж/мг биомассы и для нагнетательных дезинтеграторов 0,5—1 Дж/мг биомассы (это очень большие затраты).

14.3. НЕМЕХАНИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Сушка — наиболее простой метод, который резко изменяет структуру клеточной оболочки. После сушки, в результате которой клетки не остаются живыми и теряют внутриклеточную влагу, в оболочке клетки появляется много «трещин». Ресуспендирование высушенных клеток в водной фазе позволяет выделить внутриклеточные компоненты. Недостатком метода является то, что при горячей сушке денатурируются ферменты и инактивируются многие биологически активные вещества.

Лизис, т. е. разрушение, «разъединение» клеточной оболочки, кажется наиболее привлекательным для решения задач выделения внутриклеточных продуктов. Методы лизиса можно подразделить на физические, химические и ферментативные в зависимости от характера воздействий, вызывающих лизис клеточной оболочки.

вещества используются: вода, водные растворы кислот или щелочей, органические растворители — спирты, ацетон, нефрас (смесь легких углеводородов).

Существует несколько способов осуществления экстрагирования: экстрагирование с *перемешиванием*, экстрагирование *в неподвижном слое*, экстрагирование *одно-* и *многоступенчатое, прямоточное* и *противоточное*.

Экстрагирование с перемешиванием является наиболее простым способом экстрагирования. В аппарат с мешалкой загружается твердая фаза (биомасса после сгущения или отделения на фильтре) и жидкая фаза (экстрагент). Процесс далее протекает при перемешивании.

Концентрация извлекаемого вещества в экстрагенте изменяется во времени в соответствии с уравнением

$$V_{\text{ж}} \frac{\mathrm{d}C_{\text{ж}}}{\mathrm{d}t} = K_V \left(C_{\text{ж}}^{\text{р}} - C_{\text{ж}}\right), \qquad (15.1)$$

где $V_{\text{ж}}$ — объем жидкой фазы в аппарате; $C_{\text{ж}}$ — концентрация растворенного вещества в экстракте в момент времени t; K_V — коэффициент массоотдачи жидкость—твердое тело в пересчете на объем жидкой фазы.

Величина $C_{\text{ж}}^{\text{р}}$ в формуле обозначает концентрацию растворенного вещества в жидкости, равновесную с его содержанием в твердой фазе $C_{\text{т}}$. Предполагается, что связь между ними определяется законом Рауля:

$$C_{\text{ж}}^{\text{р}} = y_{\text{жт}} C_{\text{т}}, \qquad (15.2)$$

где $y_{\text{жт}}$ — коэффициент распределения, показывающий, во сколько раз концентрация растворенного вещества в жидкости при равновесии (отсутствии дальнейшего растворения) больше, чем его концентрация в твердой фазе. Обычно экстрагент подбирается таким образом, что растворимость в нем извлекаемого вещества значительно больше, чем в твердой фазе (т.е. $y_{\text{жт}} >> 1$).

С другой стороны, концентрация растворенного вещества в твердой фазе соответствует уравнению

$$V_{\text{т}} \frac{\mathrm{d}C_{\text{т}}}{\mathrm{d}t} = -K_V \left(C_{\text{ж}}^{\text{р}} - C_{\text{ж}}\right), \text{ или } V_{\text{т}} \frac{\mathrm{d}C_{\text{т}}}{\mathrm{d}t} = -K_V \left(y_{\text{жт}} C_{\text{т}} - C_{\text{ж}}\right), \qquad (15.3)$$

где $V_{\text{т}}$ — объем твердой фазы в аппарате.

Решая уравнения (15.2) и (15.3), можно определить, как меняется концентрация растворенного вещества в жидкой и твердой фазах.

Таблица 15.1

Критическая температура и давление «суперкритических» экстрагентов

Вещество	Критическая температура, °С	Критическое давление, МПа
Диоксид углерода	31,1	7,3
Этан	32,3	4,8
Этилен	9,5	4,9
Оксид азота	36,5	7,0
Фреон	25,9	4,6

Таким образом, процесс выделения продукта проводится *при обычной температуре* и *не требует выпарки* для разделения продукта и растворителя-экстрагента.

«Суперкритические» жидкости являются неполярными растворителями и лучше растворяют неполярные вещества. Ионизированные вещества в «суперкритических» жидкостях практически нерастворимы.

Хорошо растворяются: углеводороды и растворимые в жирах органические соединения — парафины, многие эфиры, лактоны и

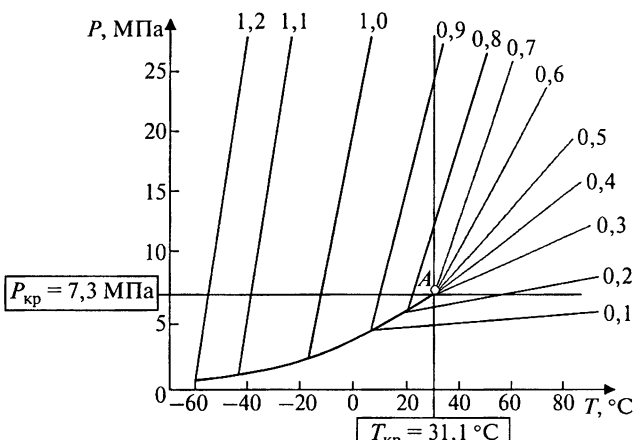


Рис. 15.5. Влияние температуры и давления на физические свойства углекислоты:

A — критическая точка. Сплошной линией дана граница между условиями, в которых углекислота существует в виде жидкости (сверху) и газа (снизу). Справа от точки *A* имеют место промежуточные состояния (сверхкритические)

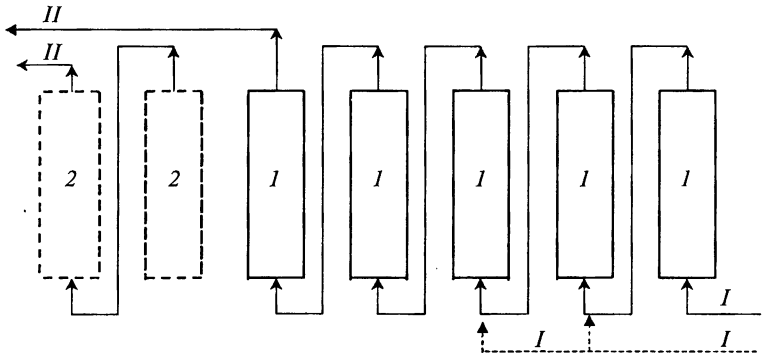


Рис. 15.4. Схема экстрагирования в каскаде диффузоров:

1 — диффузор; *2* — добавляемые диффузоры со свежей биомассой; *I* — свежий экстрагент; *II* — насыщенный экстрагент

Экстрагирование в неподвижном слое используется в том случае, когда биомасса уже предварительно высушена. Она загружается в колонны или патроны (диффузоры), через которые проходит жидкий экстрагент. Обычно используют батарею из 20 или более последовательно соединенных диффузоров (рис. 15.4).

По мере исчерпания веществ в диффузорах производят переключение патронов и их перезагрузку. Свежий патрон (по биомассе) является последним по ходу потока экстрагента. Происходит как бы ступенчатое движение биомассы (без ее отделения от жидкости, как в экстрагировании с перемешиванием).

Организация межфазной поверхности. Массоотдача локализованного в биомассе вещества от порошка биомассы к жидкости в аппарате — не самый лучший способ экстрагирования. При этом образуются агломераты биомассы, в результате чего не все клетки оказываются доступными для экстрагента. Кроме того, для повышения коэффициента массоотдачи важно повысить относительную скорость движения биомассы и жидкой фазы.

Для улучшения структуры межфазной поверхности часто из биомассы формируют специальной формы гранулы, называемые «лепесток». Так поступают при экстракции липидов (жиров) из микробной биомассы. Для этого сначала просто гранулируют биомассу, получая сферические гранулы. Затем эти гранулы пропускают через вальцы, получая сплющенные лепешки толщиной 0,2—0,3 мм — «лепестки». Далее уже эти «лепестки» загружают в аппарат для экстрагирования, и при этом обеспечивается более эффективная массоотдача.

Как видно из уравнений, конечные значения равновесной концентрации продукта в рафинате и степени извлечения зависят от коэффициента распределения, соотношения объемов фаз и не зависят от коэффициента массоотдачи.

Из схемы диссоциации пенициллина следует, что для перевода его в недиссоциированное состояние [HA] нужно увеличивать концентрацию ионов водорода в растворе, подкисляя его. Причем наибольшее значение этой концентрации и самой величины коэффициента распределения пенициллина в водной фазе и в бутилацетате имеет место при очень низкой величине pH (рис. 15.6).

На рис. 15.6 показана зависимость K_p (pH) не только для наиболее активного бензилпенициллина (кривая *1*), но и для пенициллинов *F* и *K* (соответственно кривые *2* и *3*), которые имеют низкую активность, а потому засоряют готовый продукт и не нужны в нем. Для этих пенициллинов оптимальный коэффициент распределения K_p достигается при pH 3,0—3,3. Следовательно, проводя экстракцию при pH 2,0, мы не только достигаем хорошего коэффициента распределения для бензилпенициллина, но и одновременно решаем вторую важную задачу — предотвращаем переход пенициллинов *F* и *K* в бутилацетатный экстракт.

Отсюда ясно, что проводить экстракцию было бы хорошо при pH, равном 2,0.

Однако возникает препятствие: бензилпенициллин очень неустойчив и разрушается при низких значениях pH. Еще Флеминг, первооткрыватель пенициллина, жаловался, что пенициллин исчезает прежде, чем успеешь на него посмотреть. Такая ситуация, правда, характерна для водных растворов пенициллина. В органической фазе он вполне устойчив и может сохраняться долго без инактивации.

Где же выход из положения? Выход в том, чтобы провести процесс экстракции максимально быстро. Вот когда понадобится высокое значение K_V! В теории это вполне понятно, а как осуществить такую рекомендацию на практике?

Для этого процесс экстракции должен осуществляться в такой последовательности:

подкисление водного раствора пенициллина;

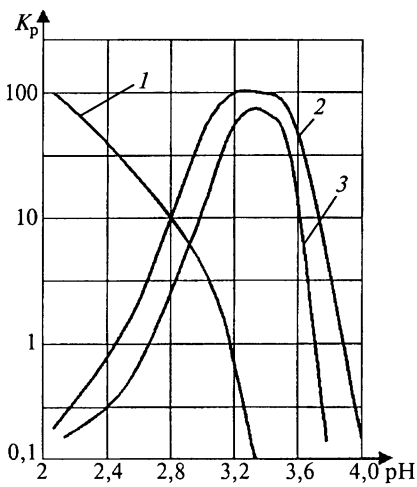


Рис. 15.6. Зависимость коэффициента распределения между органической фазой (бутилацетатом) и водным раствором бензилпенициллина (*1*), пенициллина *F* (*2*) и пенициллина *K* (*3*)

15.2. ЭКСТРАГИРОВАНИЕ «СУПЕРКРИТИЧЕСКИМИ» ЖИДКОСТЯМИ

При выделении липидов и всякого рода неустойчивых, лабильных соединений, проводя экстрагирование, следует учитывать дальнейшие операции выделения. Поэтому часто используют легкокипящие соединения — спирт, нефрас, гексан, ацетон, которые в дальнейшем удаляют путем выпаривания.

Но для выпаривания этих соединений требуются относительно высокие температуры, которые могут повлиять на качество выделяемых биопродуктов. При этом также необходимы затраты энергии на испарение экстрагентов и их последующую конденсацию.

Кажется очевидным, что для решения этих проблем следовало бы брать в качестве растворителей жидкости, имеющие более низкую температуру кипения. Одной из таких жидкостей является диоксид углерода. Правда, при атмосферном давлении температура его кипения довольно низка (ниже −50 °С). Но с повышением давления температура повышается: при давлении 7,3 МПа, например, температура кипения составляет +31 °С.

На рис. 15.5 представлены линии равной плотности жидкости (сверху от граничной линии) и газа (снизу). Числа даны в размерности плотности — г/см^3.

Обычно плотности газа и жидкости резко различаются. Например, при +10 °С плотность жидкости CO_2 составляет 0,86 г/см^3, а газа — 0,14 г/см^3. При 20 °С — соответственно 0,77 и 0,19 г/см^3, а при 30 °С — 0,59 и 0,35. А вот при 31,1 °С и давлении 7,3 МПа плотность жидкости и газа становится равной. Если и температура, и давление выше своих критических значений, вещество обладает свойствами, промежуточными между жидкостью и газом. Эта фаза — фаза *«суперкритической» жидкости.*

На рис. 15.5 показано, что путем повышения давления газ при любой температуре до критической точки *А* (31,1 °С) можно превратить в жидкость. И наоборот, газ при любом давлении ниже критического (7,3 МПа) можно превратить в жидкость путем снижения температуры.

Физические и диффузионные свойства «суперкритических» жидкостей находятся в диапазоне между значениями соответствующих свойств газов и истинных жидкостей и обычно весьма благоприятны для их применения в качестве экстрагентов. В частности, очень низка их вязкость, что снижает затраты на перекачивание. Кроме того, при работе на границе области критических значений температуры и давления можно путем небольших температурных воздействий переводить «суперкритические» жидкости в газы и обратно в жидкости.

Существуют и другие вещества, имеющие критические температуры в областях, близких к нормальной температуре (табл. 15.1).

центрациями вещества в твердой и жидкой фазах (т. е. связь, определяемая как коэффициент распределения) имеет место при относительно малых концентрациях вещества в твердой фазе, далеких от насыщения. Такая ситуация представлена на рис. 16.2 пунктирной линией.

Основной характеристикой обменной способности ионита является ***полная обменная емкость*** (ПОЕ). Она определяется как число обменных групп в мг-эквивалентах, приходящееся на 1 г ионита.

Практически это и есть K, выраженное в мг-эквивалентах растворенного вещества:

$$K = C^*_{\text{т max}}, \tag{16.7}$$

Не надо забывать, что связь, определяемая изотермой Ленгмюра, характеризует условия ***равновесия.*** В реальном же процессе, пока идет насыщение ионообменной смолы ионами растворенного вещества, текущая концентрация $C_\text{т}$ в сорбенте отличается от равновесной.

Движущей силой процесса массопередачи как раз и является разность между равновесной концентрацией $C^*_\text{т}$ (определяемой по изотерме Ленгмюра или по коэффициенту распределения, если концентрация находится в зоне малых значений) и текущей концентрацией $C_\text{т}$:

$$\frac{\mathrm{d}C_\text{т}}{\mathrm{d}t} = K_V\left(C^*_\text{т} - C_\text{т}\right), \tag{16.8}$$

где K_V — объемный коэффициент массоотдачи между жидкостью и ионитом, учитывающий, в частности, и концентрацию гранул ионита в системе, и поверхность массообмена в каждой грануле, и истинный коэффициент массоотдачи растворенного вещества; $C^*_\text{т}$ — концентрация, равновесная с той, которая есть в жидкости, $C_\text{ж}$.

В зависимости от знака выражения в скобках ($C^*_\text{т} - C_\text{т}$) будет происходить либо процесс сорбции (концентрация $C_\text{т}$ во времени будет возрастать), либо процесс десорбции (концентрация $C_\text{т}$ падает).

Рассмотрим пример. Концентрация антибиотика в жидкости $C_\text{ж} = 1$ мг/мл. Концентрация того же антибиотика в ионите $C_\text{т} = 10$ мг/л. Коэффициент распределения $K_\text{р} = 20$. Что происходит: сорбция или десорбция?

Определим величину $C^*_\text{т}$, равновесную с концентрацией растворенного вещества в жидкости $C_\text{ж}$:

$$C^*_\text{т} = K_\text{р} C_\text{ж} = 20 \text{ мг/л}.$$

Отсюда видно, что разность ($C^*_\text{т} - C_\text{т}$) = 20 – 10 = 10 мг/л, т. е. имеет положительное значение. Следовательно, идет сорбция антибиотика из жидкости, хотя физически его концентрация (1 мг/л) в жидкости меньше, чем в ионите. Если бы концентрация в жид-

рый представляет собой отношение равновесной концентрации распределяемого вещества в органической фазе $C_{ор}$ (в экстракте) к его равновесной концентрации в водной фазе $C_{вр}$ (рафинате):

$$K_р = \frac{C_{ор}}{C_{вр}}. \qquad (15.8)$$

Аналогично процессу экстрагирования (где коэффициент распределения обозначали $y_{ж т}$), чем выше $K_р$, тем больше способность данного экстрагента извлекать целевой компонент.

Уравнения динамики изменения во времени концентраций продукта в органической фазе $C_о$ и в водной фазе $C_в$ во многом аналогичны процессу экстрагирования:

$$V_о \frac{dC_о}{dt} = K_V \left(C_о^р - C_о\right), \qquad (15.9)$$

где $V_о$ — объем органической фазы; $C_о$ — концентрация продукта в органической фазе; K_V — коэффициент массоотдачи; $C_о^р$ — концентрация продукта в органической фазе, равновесная по отношению к его концентрации в водной фазе $C_в$.

Иначе говоря, величина $C_о^р$ определяется выражением

$$C_о^р = K_р C_в. \qquad (15.10)$$

Для водной фазы (рафината)

$$V_в \frac{dC_в}{dt} = -K_V \left(C_о^р - C_о\right), \qquad (15.11)$$

где $V_в$ — объем водной фазы (рафината); $C_в$ — концентрация продукта в водной фазе.

С новыми обозначениями концентрации в рафинате и в экстракте можно получить выражение для равновесной концентрации продукта в рафинате после завершения однократного процесса экстракции, если начальная концентрация в рафинате составляет $C_{вн}$:

$$C_{ор} = C_{вн} \frac{1}{1 + \frac{V_о}{V_в} K_р} \qquad (15.12)$$

и

$$\eta = \frac{C_{вн} - C_{вр}}{C_{вн}} = \frac{1}{1 + \frac{V_о}{V_в} K_р}, \qquad (15.13)$$

где $C_{вр}$ — равновесная концентрация продукта в водной фазе (рафинате) после завершения однократного процесса экстракции.

глицериды; многие лекарства, кофеин, никотин, стероиды и алкалоиды, вкусовые и ароматические компоненты.

Интересно, что выделение может быть даже из водных растворов!

Общая оценка процесса экстрагирования «суперкритическими жидкостями» такова.

Преимущества:

высокая энергетическая эффективность;

низкие температуры;

нетоксичные и недорогие растворители (экстрагенты);

низкая вязкость, высокая диффузионная способность;

силой растворителя можно управлять.

Недостатки:

необходимо оборудование высокого давления;

относительно низкая сила растворителя;

плохие растворители для полярных соединений;

недостаточно данных для надежного проектирования (все нужно проверять экспериментально).

15.3. ЖИДКОФАЗНАЯ ЦЕНТРОБЕЖНАЯ ЭКСТРАКЦИЯ

Жидкофазная экстракция наиболее часто используется в производствах антибиотиков, в том числе при производстве наиболее крупнотоннажного из них — пенициллина. Ранее мы уже рассматривали блок-схему технологии этого антибиотика и видели, как много там стадий жидкофазной экстракции: сначала пенициллин из водной фазы переводят в органическую (бутилацетат), затем из органической фазы — опять в водную, затем опять в органическую и т. д.

Рассмотрим более подробно основы этого процесса.

Пенициллин является слабой кислотой, которая диссоциирует на анион и ион водорода:

$$[HA] \Leftrightarrow H^+ + A^-,$$

где [HA] — пенициллин в недиссоциированной форме; H^+ — ион водорода; A^- — анион.

Показано, что антибиотик в неионизированной форме [HA] хорошо растворяется в некоторых органических растворителях (бутилацетате или амилацетате). Растворимость его в таких растворителях почти в 100 раз больше, чем в воде. Диссоциированный же анион не имеет столь хорошей растворимости в органической фазе.

Из курса «Процессы и аппараты химической технологии» известно, что основной характеристикой процесса экстракции «жидкость—жидкость» является *коэффициент распределения* K_p, кото-

добавление к нему экстрагента — органической фазы;

диспергирование фазы для обеспечения наибольшей поверхности раздела фаз и повышения K_V;

интенсивное перемешивание для осуществления процесса собственно экстракции, причем время протекания процесса должно быть настолько малым, чтобы не успело проявиться разрушающее действие низких значений pH на водные растворы пенициллина;

после завершения процесса экстракции — разделение (редиспергирование) водной и органической фаз.

Все эти операции быстро можно провести, только если:

процесс проводится в непрерывном режиме;

в качестве аппарата используется центробежный экстрактор.

Вот почему в биотехнологических процессах экстракция осуществляется в центробежных экстракторах, напоминающих по конструкции центробежные сепараторы. В них происходит эмульгирование фаз путем смесителя-инжектора, экстракция в центробежном поле и затем деэмульгирование органических фаз. Кроме того, в многоступенчатых центробежных экстракторах обеспечивается еще противоточное движение фаз, создающее равномерную по ходу потока движущую силу массоотдачи.

Преимущества таких экстракторов — высокая производительность и возможность работы с лабильными продуктами.

Недостатки: высокие энергетические затраты, возможность проскока частично эмульгированного слоя («третьего слоя»), что увеличивает потери целевого продукта.

Вопросы для повторения

1. Назовите термины, обозначающие основные материальные компоненты, участвующие в процессе экстрагирования, — жидкую и твердую фазу до и после процесса экстрагирования.
2. В чем различие между одноступенчатым и многоступенчатым процессами экстрагирования биомассы микроорганизмов?
3. Каковы способы организации противотока и увеличения средней движущей силы при экстрагировании биомассы микроорганизмов?
4. В чем заключается метод создания эффективной межфазной поверхности при экстрагировании компонентов из биомассы микроорганизмов?
5. Что дает экстрагирование «суперкритическими» жидкостями?
6. Назовите вещества, используемые в качестве экстрагентов биомассы — «суперкритических» жидкостей, и параметры их критических точек по температуре и давлению.
7. Какие вещества можно экстрагировать, используя «суперкритические» жидкости?
8. Расскажите об особенностях жидкофазной экстракции лабильных продуктов микробиологического синтеза.
9. Почему при экстракции пенициллина используют низкие значения pH?
10. Почему для экстракции пенициллина используют центробежные экстракторы?

Глава 16

СОРБЦИОННЫЕ МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ПРОДУКТОВ БИОСИНТЕЗА

●

16.1. ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ

Сорбционные методы представляют собой выделение растворенного в жидкой фазе компонента с помощью твердофазного ***сорбента***. В какой-то мере этот процесс является по смыслу противоположным экстрагированию, где, наоборот, полезный компонент локализован в твердой фазе, а в процессе экстракции переходит в жидкую (экстрагент). При сорбции же растворенное вещество из раствора переводится в твердую фазу (сорбент).

На этом, однако, сорбционный метод не заканчивается. Далее следует ***отделение твердой фазы*** от рафината — раствора, из которого извлечен растворенный компонент, и последующая ***десорбция*** этого компонента из сорбента в новую жидкость, отличающуюся от исходного раствора какими-то свойствами или просто более чистую, не содержащую посторонних примесей, которые есть в исходном растворе. Эта вторая операция (десорбция) уже точно практически ничем не отличается от экстрагирования, разве что при экстрагировании твердой фазой является сама биомасса, а при десорбции — промежуточный рабочий агент, специально вносимый в жидкую фазу извне. Твердая фаза — «временное пристанище» растворенного вещества.

Рассмотрим 4 различных модификации сорбционных методов:

ионный обмен;

адсорбция микропористыми сорбентами;

хроматография;

биосорбция.

Во всех случаях мы будем подразумевать, что сорбционный метод включает в себя как собственно сорбцию, так и десорбцию, и рассматривать метод выделения как совокупность этих двух процессов.

16.2. ИОННЫЙ ОБМЕН

Ионообменный метод основан на способности специальных сорбентов — ***ионообменных смол*** — сорбировать биологически активные вещества, имеющие ионную природу (т. е. являющиеся кислотой, основанием или солью), благодаря эквивалентному *обмену* между ионами вещества, находящегося в растворе, и ионами сорбента.

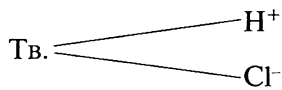
Ионообменные смолы, или ***иониты,*** представляют собой синтетические высокомолекулярные органические вещества, практически нерастворимые в воде. Они содержат обменные ионы, один из которых связан с твердым носителем и называется ***фиксированным***, или ***анкерным*** ионом. С ним электростатически связан противоположно заряженный ион, называемый ***подвижным ионом***, или ***противоионом.***

По этому подвижному иону ионообменные смолы подразделяются на ***катионообменники*** и ***анионообменники***:

Тв. — H^+ (катионообменник);

Тв. — OH^- или Тв. — Cl^- (анионообменник).

Кроме того, существуют и ***амфотерные иониты***, которые содержат и катионо-, и анионообменные группы, обладая, таким образом, двойственными свойствами:



При введении ионита в жидкость он немного *набухает*, так как в его поры проникает вода. Но структура ионита построена не из линейных, а из *пространственных трехмерных* полимеров, что ограничивает способность к набуханию. Это связано с тем, что при полимеризации матрица вещества образует длинные продольные цепи, соединенные между собой поперечными мостиками — «химическими узлами» (рис. 16.1). Увеличение или уменьшение числа таких узлов влияет на *размер микропор* ионитов, а значит, и на их *проницаемость*.

Набухшая структура ионита подобна пространственной сетке (губке), внутри которой передвигаются обменивающиеся ионы.

Сам ***процесс ионного обмена*** имеет обратимый характер и протекает следующим образом:

$$\underset{\text{Ионит}}{\text{Тв.}—H^+} + (\text{растворенный ион}) \leftrightarrow \underset{\substack{\text{Ионит, сорбировавший}\\ \text{растворенный ион}}}{\text{Тв.}—(\text{растворенный ион})^+} + H^+. \quad (16.1)$$

Высвобождающийся противоион диффундирует далее через поры ионита в жидкость. Движение ионов растворенного вещества внутрь гранулы ионита и, наоборот, вывод противоионов в окружающую жидкость происходят за счет *диффузии*.

Как и в любом массообменном процессе, в какой-то момент наступает равновесие между скоростями сорбции и десорбции

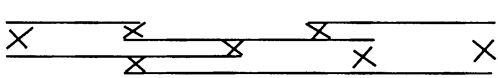


Рис. 16.1. Схема химической структуры ионита

(раз это обратимый процесс). Для жидкофазной экстракции связь между концентрациями растворенного вещества в условиях равновесия в разных фазах определяется *коэффициентом распределения.*

Для твердой фазы в условиях сорбции существует определенная особенность. Количество активных центров ионообменника ограничено (числом анкерных ионов), в связи с этим максимальное количество ионов растворенного вещества, связанных ионитом (т. е. сорбированных), не может быть больше определенного предела. Поэтому связь между равновесными концентрациями растворенного вещества в жидкости и в ионообменной смоле определяется соотношением, называемым **изотермой Ленгмюра**:

$$C_{\text{т}}^{*} = \frac{KC_{\text{ж}}^{*}}{a + C_{\text{ж}}^{*}}, \qquad (16.2)$$

где $C_{\text{т}}^{*}$ и $C_{\text{ж}}^{*}$ — соответственно равновесные концентрации растворенного иона в твердой фазе (сорбенте) и в жидкости (рафинате); K и a — константы, зависящие от свойств продукта и от свойств ионита соответственно.

Графическое выражение зависимости дано на рис. 16.2.

Из рисунка видно, что при $C_{\text{ж}}^{*} \to \infty$ величина $C_{\text{т}}^{*} \to K$, причем эта величина после какого-то значения $C_{\text{ж}}^{*}$ уже мало отличается от K и практически не изменяется.

Если

$$C_{\text{т}}^{*} = \frac{1}{2}K,$$

то

$$C_{\text{ж}}^{*} = a. \qquad (16.3)$$

Величина a — характерный параметр изотермы Ленгмюра.

Если

$$C_{\text{ж}}^{*} \ll a,$$

то

$$a + C_{\text{ж}}^{*} \approx a,$$

и тогда

$$C_{\text{т}}^{*} \approx \frac{K}{a} C_{\text{ж}}^{*}; \qquad (16.4)$$

если обозначить

$$K_{\text{Р}} = K/a, \qquad (16.5)$$

то

$$C_{\text{т}}^{*} \approx K_{\text{р}} C_{\text{ж}}^{*}. \qquad (16.6)$$

Иначе говоря, линейное распределение между равновесными кон-

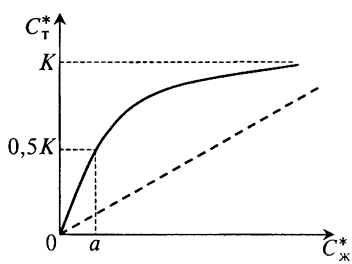


Рис. 16.2. Зависимость между равновесными концентрациями растворенного вещества в жидкости и в твердом сорбенте

кости была $C_ж = 0{,}5$ мг/л, то имело бы место равновесие, и лишь при $C_ж < 0{,}5$ мг/л происходила бы десорбция антибиотика из ионита в раствор.

На практике при десорбции несколько изменяется рабочая жидкость, для нее может быть своя изотерма Ленгмюра и свой коэффициент распределения.

Сорбция же обычно осуществляется до тех пор, пока вся обменная емкость ионита не будет заполнена (т. е. пока концентрация $C_т^*$ не достигнет величины K).

Кстати, в процессах ионообмена процесс десорбции имеет специфическое название ***элюция***, а десорбирующая жидкость называется ***элюентом.***

Как на практике осуществляется процесс ионного обмена?

Наиболее прост **статический способ**. В аппарат с мешалкой загружают ионит и обрабатываемый раствор. Затем при перемешивании ионит суспендируется и дается время, достаточное для установления равновесия. Далее раствор сливают или фильтруют (если гранулы ионита слишком мелкие). Раствор обычно направляют в канализацию (так как он обеднен по целевому продукту) или повторно используют на стадии ферментации. Ионит же возвращают в аппарат, заливают элюентом, т. е. водным раствором, часто с измененным значением pH или с добавлением противоиона (иона хлора). Происходит обратный процесс (десорбция, элюция) — противоион сорбируется в ионите, а сорбированное ранее вещество переходит в элюент. При этом продукт освобождается от примесей, которые не сорбируются и уходят с исходным раствором.

Однократная сорбция—десорбция имеет недостаток: при этом сорбент не полностью поглощает растворенное вещество и не полностью переходит в элюент. Поэтому процесс иногда повторяют.

Чаще же в промышленности используют **динамический способ**. В этом способе ионит загружается в аппарат и обрабатываемый раствор непрерывно протекает через слой ионита. Назвать этот процесс полностью непрерывным нельзя, так как ионит загружается и выгружается периодически, поэтому процесс *нестационарный.*

Аппарат с загруженным ионитом называется ***ионитовым фильтром***, или ***ионообменной колонной.*** Возможны два варианта таких «фильтров»: закрытый (напорный) и открытый (безнапорный).

Закрытый фильтр (рис. 16.3) представляет собой колонну, заполненную грану-

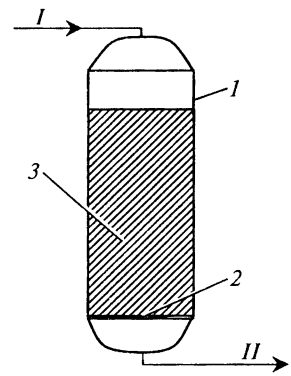


Рис. 16.3. Схема «закрытого фильтра»:

1 — корпус; *2* — колпачковый фильтр; *3* — слой ионита; *I* — исходный раствор; *II* — отработанный раствор

В измерительных приборах (хроматографах) высота и площадь пиков являются основой для определения концентрации вещества. В препаративной хроматографии поток элюента, собираемый за различные промежутки времени (Δt_1, Δt_2, ..., Δt_n), является основой для разделения смеси веществ на более однородные по составу растворы.

Так можно разделять разные белки, разные аминокислоты или разные сахара. За основу разделения берется время выхода, отсюда и название метода («хромато» — время).

Рассмотренный пример можно назвать ***адсорбционной хроматографией***, он основан на поверхностном связывании растворенного компонента. Аналогично этому существует ***ионообменная хроматография***, где сначала связываются, а затем с разной скоростью десорбируются ионы растворенных компонентов.

Интересной разновидностью хроматографии в биотехнологии является так называемая «аффинная хроматография». В ней для сорбции и десорбции используют биоспецифичное вещество, которое подходит к соответствующей выделяемой молекуле, как ключ к замку. Это могут быть ферменты или иммуносорбенты. Сначала практически полностью происходит связывание специфичного вещества, а потом путем изменения элюента оно выделяется с довольно четким фронтом.

Так можно разделять и ферменты, если в качестве сорбента использовать закрепленный на носителе «лиганд» — вещество, подобное субстрату, на который фермент действует. Разное сродство ферментов к субстрату может являться основой для их разделения по скорости образования и распада фермент-субстратного комплекса:

$$E_1 + S \leftrightarrow E_1S; \quad E_2 + S \leftrightarrow E_2S; \quad E_3 + S \leftrightarrow E_3S. \quad (16.9)$$

Преимущества хроматографии:

высокая селективность;

возможность разделения веществ с близкими свойствами;

мягкие условия проведения процесса.

Недостатки:

более низкая скорость десорбции, необходимая для улавливания разных «пиков» выделения веществ;

обычно более разбавленные растворы;

более сложное аппаратурное оформление процесса.

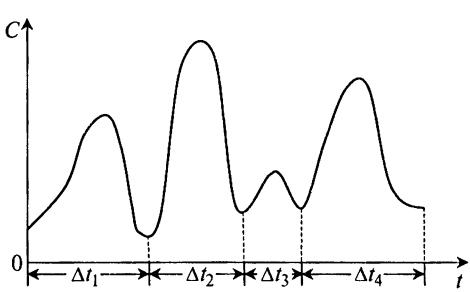


Рис. 16.5. График изменения во времени концентрации десорбируемого вещества в элюате:

C — концентрация вещества в элюате; t — время от начала десорбции (элюирования); Δt_1, Δt_2, Δt_3, Δt_4 — интервалы времени для сбора различных фракций элюата, содержащих различные вещества

Они имеют более высокую удельную поверхность взаимодействия сорбента с жидкостью.

16.6. ИММУНОСОРБЦИЯ

Рассмотренные методы биосорбции, относящиеся к металлам, не слишком специфичны. При выделении многих белков, наоборот, часто используют очень специфичные высокоселективные методы. Они основаны на связывании ***антител*** с определенным участком молекулы изучаемого белка. Такой метод позволяет «распознавать» в смеси белков только один из них, к которому выработано иммунной системой антитело.

Выделенные из крови иммунизированных животных антитела (а среди них могут быть и очень специфичные ***моноклональные антитела***, которые могут определить среди белков, например, белки родственников) иммобилизуются на каком-либо носителе и становятся таким образом иммуносорбентами, используемыми для высокоселективного выделения веществ.

На основе иммуносорбентов разрабатывают ***диагностикумы***, которые позволяют не только распознавать различные инфекционные заболевания, в том числе и вирусные (например, СПИД), но также и наследственные заболевания, опухоли и многое другое.

Вопросы для повторения

1. Назовите основные разновидности сорбционных методов выделения продуктов микробиологического синтеза.
2. Что такое изотерма Ленгмюра?
3. Что является движущей силой процесса ионного обмена?
4. По каким принципам выбирают размер гранул ионообменной смолы?
5. Чем отличаются ионообменные колонны в виде открытого и закрытого фильтров?
6. Назовите термины, используемые для участвующих в процессе ионного обмена веществ на стадиях сорбции и десорбции.
7. Можно ли использовать ионообменное выделение продукта непосредственно из суспензии микроорганизмов? Укажите преимущества и недостатки такого процесса.
8. Чем отличаются жидкие ионообменники от жидкофазных экстрагентов?
9. Чем отличается адсорбция микропористыми сорбентами от ионного обмена?
10. Какая основная характеристика используется для оценки качества микропористых сорбентов?
11. Чем хроматография отличается от десорбции?
12. Какие существуют разновидности хроматографии?
13. Перечислите преимущества и недостатки хроматографии при выделении продуктов микробиологического синтеза.
14. Назовите основные механизмы биосорбции металлов.
15. Расскажите о разновидностях биосорбции металлов: с деструкцией и с регенерацией клеток микроорганизмов.
16. Расскажите об иммуносорбции: принцип действия, преимущества и недостатки.

Поскольку в рассмотренной схеме слой ионита остается неподвижным, приходится иметь батареи аппаратов, постепенно переключая их на тот или иной режим работы.

Обычно количество элюата меньше, чем количество исходного раствора, что позволяет наряду с очисткой вещества от примесей проводить частичное концентрирование раствора.

Главное же в этом методе — это отделение продукта от примесей, «грязи». Способность ионообменных смол сорбировать именно целевой продукт называется ***селективностью.***

При помощи ионитов с очень высокой селективностью делались попытки выделения растворенного компонента (например, антибиотиков) прямо из культуральной жидкости, содержащей биомассу микроорганизмов. Хотя при этом исключается стадия фильтрации, это не всегда хорошо — остатки сред и микроорганизмы забивают поры ионита, способствуют обрастанию его гранул.

Ионообменным способом выделяют многие антибиотики, аминокислоты, ферменты.

Несколько слов о самих *ионообменных смолах*. Есть много типов ионитов, имеющих размеры гранул от 300 мкм до 2 мм и более. При этом очень важен их равномерный дисперсный состав (чтобы не было уноса). Иногда делают смолы с ***непористым*** внутренним ядром, внешний слой смолы занимает лишь 30—50 мкм, что способствует более быстрой сорбции — десорбции.

В качестве матриц в смолах используют:

полистирол (поливинилбензол);

полиакрилат, полиметакрилат;

полиамин;

целлюлозу, декстран и др.

В качестве функциональных групп применяются:

карбоксильные;

сульфоновые;

первичные — четвертичные аминогруппы.

Преимущества метода:

простота аппаратурного оформления;

многократное использование ионообменных смол;

возможность полной механизации и автоматизации процесса;

протекание процесса в водных растворах, без использования вредных органических растворителей.

Недостатки метода:

нельзя использовать для извлечения неполярных веществ;

селективность метода не всегда достаточна для разделения смеси веществ;

наличие твердой фазы затрудняет возможность использования противотока для создания равномерной движущей силы процесса;

довольно велико гидравлическое сопротивление колонн при малых размерах гранул ионита.

Мембранная фильтрация позволяет только концентрировать выделяемые частицы в меньшем по сравнению с первоначальным объеме жидкости (т. е. сгущать суспензию), в то время как обычная фильтрация может отделять биомассу от жидкости практически полностью.

Мембранная фильтрация имеет «ситовой» характер, т. е. это обычно тонкая мембрана с контролируемым размером пор.

При обычной фильтрации поток фильтруемой среды направлен перпендикулярно поверхности фильтра. При мембранной поток идет параллельно поверхности фильтра («тангенциально»), а та его часть, которая проходит через поры мембраны, движется перпендикулярно поверхности фильтра. Иначе говоря, это так называемая «фильтрация в поперечном потоке». Такая фильтрация обычно проводится в замкнутой системе, в которой осуществляется непрерывная циркуляция фильтруемой суспензии с непрерывной подпиткой для компенсации убыли объема за счет фильтрата (пермеата).

С помощью микрофильтрации отделяют бактерии, дрожжи, жировые шарики молока и крупные мицеллы белков (например, казеина).

По мере проведения микрофильтрации концентрация биомассы в фильтруемой жидкости (концентрате) возрастает, а растворенные вещества уходят с пермеатом. Тем не менее концентрация растворенных веществ в жидкой фазе, окружающей клетки микроорганизмов и другие нефильтруемые твердые частицы, остается постоянной. Эти нефильтруемые частицы за счет высокой скорости циркуляции как бы смываются с поверхности мембраны, что позволяет иметь довольно высокую скорость фильтрации, не снижающуюся из-за образования слоя осадка, который, как и при обычной фильтрации, может быть сжимаемым.

Обычно скорость движения циркулирующего потока составляет 1—2 м/с для полимерных мембран и 4—7 м/с для керамических.

С целью удаления из фильтруемой суспензии растворенных веществ после концентрирования культуральной жидкости проводят промывку концентрата водой. Для этого вместо подпитки исходным фильтруемым раствором подают воду так, что ее общий объем превышает в 2—3 раза и более «мертвый» объем циркулирующей жидкости. Фильтрат после промывки присоединяют к основному потоку пермеата или обрабатывают отдельно. Целью такой промывки является либо снижение потерь, если целевой продукт — растворенное вещество, либо очистка биомассы от загрязняющих растворенных примесей. Такую операцию называют еще *диафильтрацией*.

При диафильтрации скорость фильтрации может возрасти, в результате чего появляется возможность повысить концентрацию микроорганизмов в концентрате.

В некоторых случаях вместо воды при диафильтрации используют растворы солей, кислот или щелочей, совмещая процесс концентрирования с процессом экстракции продуктов из биомассы.

лами ионита. Жидкость подается под напором сверху. У днища внутри аппарата устанавливается колпачковый фильтр с прорезями 0,2—0,3 мм, через которые проходит жидкость, но задерживаются гранулы ионита.

Недостатком такой простой конструкции является неподвижность слоя ионитов, который сжат давлением нагнетаемой жидкости. Происходит слипание частиц ионита, образование каналов и застойных зон. В результате довольно большая часть ионита не участвует в процессе ионообмена, возможно также инфицирование застойных участков посторонней микрофлорой.

Открытый фильтр (рис. 16.4) — раствор подается в него снизу через специальный слой зернистого материала. Скорость потока в аппарате выбирается таким образом, чтобы слой ионита находился во взвешенном состоянии. Чтобы при этом не происходило выноса гранул ионита, верхняя часть колонны выполнена расширенной. В этой части колонны скорость потока снижается, что способствует оседанию гранул. Вывод отработанного раствора из колонны снабжен системой улавливания гранул ионита (за счет изменения направления потока).

В обоих случаях после насыщения слоя ионита (определяемого по повышению концентрации растворенного вещества в отработанном растворе) раствор переключается на другую колонну, затем на третью, четвертую и т. д.

Обычно существует батарея ионообменных колонн, работающих в различных режимах. На отключенной колонне сначала проводят вытеснение рабочего раствора обессоленной водой, затем промывают ионит раствором антисептика.

Далее осуществляется процесс извлечения полезного вещества из сорбента — *элюция*. Элюат (чистый раствор, содержащий десорбированное вещество) поступает на дальнейшие стадии концентрирования. Элюция прекращается после снижения концентрации в выходном потоке до предельного уровня.

После элюции проводится процесс *регенерации ионита*. Для этого через слой ионита пропускают раствор противоиона, который сорбируется на ионите, занимая там свое «законное место».

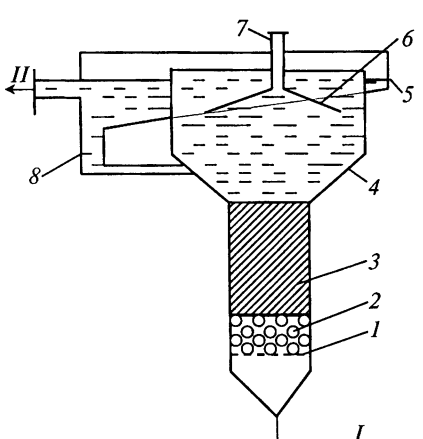


Рис. 16.4. Схема «открытого фильтра»:

1 — колпачковый фильтр; *2* — слой зернистого материала; *3* — слой ионита; *4* — корпус; *5* — кольцевой карман; *6* — экран для задержания гранул ионита; *7* — патрубок сообщения с атмосферой; *8* — переливной патрубок; *I* — исходный раствор; *II* — отработанный раствор

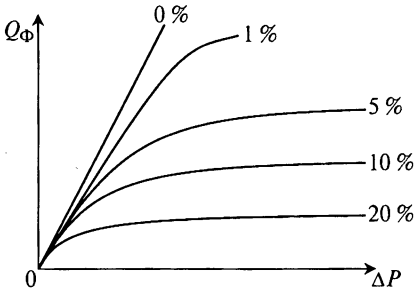


Рис. 17.3. Зависимость скорости ультрафильтрации растворов белка от перепада давления на мембране при различных концентрациях белка в обрабатываемом водном растворе (числа у кривых)

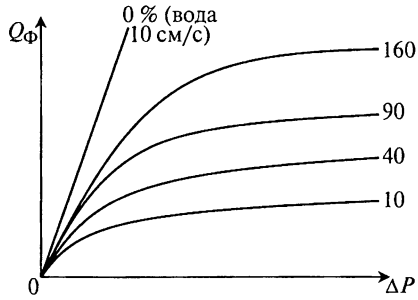


Рис. 17.4. Зависимость скорости фильтрации 10%-го раствора белка от перепада давления при различных линейных скоростях потока фильтруемого раствора над мембраной:

0 % — вода; 10, 40, 90, 160 — линейные скорости потока в см/с

В процессе ультрафильтрации вблизи обращенной к потоку поверхности мембраны возникает градиент концентрации. Это изображено схематически на рис. 17.5. На рис. 17.6 показано изменение концентрации $C_к$ в зависимости от расстояния до мембраны L.

Возникающий градиент концентрации напоминает диффузионный пограничный слой при массопередаче (хотя закономерности здесь другие), которая вызывает дополнительное (помимо мембраны) сопротивление потоку растворителя. Эффективная толщина слоя δ зависит, с одной стороны, от концентрации растворен-

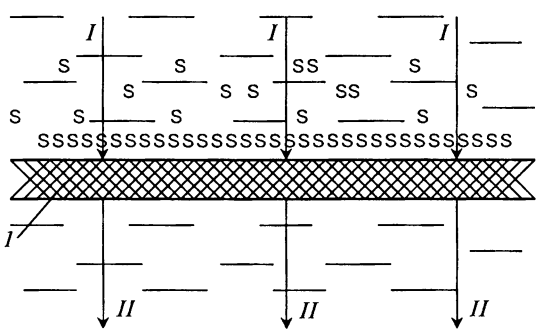


Рис. 17.5. Распределение взвешенных коллоидных частиц со стороны концентрата в зависимости от расстояния до мембраны (*I*):

I — поток фильтрации в концентрате; *II* — пермеат

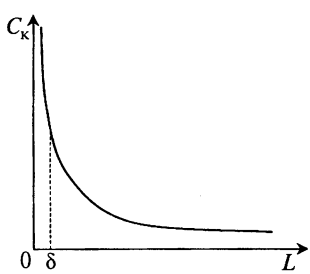


Рис. 17.6. Изменение концентрации $C_к$ отфильтровываемых высокомолекулярных веществ в зависимости от расстояния до мембраны L

Жидкие ионообменники. Использование твердофазных ионитов связано с одним противоречием. С одной стороны, для быстрой сорбции следует снижать размер гранул. С другой стороны, это технологически неудобно: создается большое гидравлическое сопротивление, увеличивается возможность уноса ионитов, затрудняется отделение гранул от раствора.

Часть этих недостатков исключается при использовании жидких ионообменников, представляющих собой амины или органические кислоты или алкилфосфаты с молекулярной массой 250—500.

В этих случаях ионный обмен протекает быстро, а для его аппаратурного оформления используются аппараты для экстракции жидкость—жидкость. Собственно говоря, и сам процесс очень напоминает экстракцию, хотя в обмене участвуют ионы, а не молекулы.

16.3. АДСОРБЦИЯ МИКРОПОРИСТЫМИ СОРБЕНТАМИ

Процесс адсорбции по существу ничем не отличается от ионного обмена, с той лишь разницей, что на микропористых сорбентах обычно сорбируются не ионы, а целиком молекулы, чаще неполярных веществ. Соответственно в качестве сорбентов выступают не ионообменные смолы, а материалы без функциональных групп или микропористые адсорбционные смолы.

Связывание субстанций на этих сорбентах происходит не по стехиометрическим соотношениям, как в ионитах, например, а под воздействием сил Ван-дер-Ваальса.

Важнейшими *характеристиками* этих сорбентов являются:

объем пор;

удельная поверхность;

средний диаметр пор;

распределение пор по размерам.

Наиболее типичным и первым из такого рода сорбентов является *активный уголь.*

Сейчас выпускаются полимерные сорбенты, которые по качеству превосходят активный уголь.

Химический состав этих сорбентов:

неполярные — стирол;

полуполярные — акриловые эфиры;

полярные — сульфоксиды, амиды.

Физические свойства:

внутренняя поверхность 20—800 $м^2/г$ (для сравнения: у активного угля — около 60 $м^2/г$);

объем пор 0,5—1,2 мл/г;

средний диаметр пор 5—130 нм (у активного угля — около 13 нм).

Практически любое вещество, которое можно экстрагировать органическим растворителем, можно связать и специально подобранным сорбентом.

Глава 17

МЕМБРАННЫЕ МЕТОДЫ В БИОТЕХНОЛОГИИ

Мембранные методы используют в биотехнологии для выделения, очистки и концентрирования продуктов. Все они внешне похожи на фильтрацию (поскольку схема процесса включает в себя полупроницаемую перегородку), но предназначены для разделения частиц разного размера и несколько отличаются по движущей силе процесса и аппаратурному оформлению.

Мы уже упоминали ***микрофильтрацию***, основной задачей которой является отделение микроорганизмов и взвешенных частиц.

В процессах выделения и очистки продукта чаще используют мембранные методы другого типа: ***диализ, ультрафильтрация и обратный осмос,*** которые позволяют «фильтровать» уже не только твердую фазу, но и просто растворенные в жидкости молекулы, причем не обязательно очень большие по размеру.

Ультрафильтрация проводится обычно при размерах частиц или молекул 10 нм — 10 мкм, ***обратный осмос*** и ***диализ*** — при размерах 0,5 нм — 0,5 мкм.

17.1. МИКРОФИЛЬТРАЦИЯ

Микрофильтрация является наиболее близкой к обычной фильтрации системой, которую мы уже упоминали в разделе, связанном с отделением биомассы от культуральной жидкости. Размер пор микрофильтрационных мембран варьируется от 0,1 до 3 мкм. Это позволяет задерживать бактерии, дрожжи, грибы и высокомолекулярные вещества, такие, как жиры.

Наиболее известно использование микрофильтрации как средства деконтаминации питательных сред, дозируемых подпиток, жидких пеногасителей и титрующих агентов для поддержания величины pH. Это позволяет избежать теплового воздействия на стерилизуемые растворы. В связи с этим важно, чтобы сами микрофильтры могли стерилизоваться паром перед началом операции и регенерироваться после длительной эксплуатации. Такими свойствами в наилучшей степени обладают металлокерамические трубчатые мембранные элементы, которые могут регенерироваться обратным током пара.

Для ускорения процесса микрофильтрации часто повышают температуру, чтобы снизить вязкость жидкости.

Микрофильтрация часто используется для стерилизации сред. В этом случае поры должны быть не более 0,2 мкм, чтобы исключить проскок микроорганизмов очень маленьких размеров.

Такое использование микрофильтрации позволяет предотвратить потери ценных компонентов и образование нежелательных соединений во время тепловой стерилизации. Но при этом важно иметь возможность тепловой стерилизации самих микрофильтрационных элементов. Это трудно осуществить с полимерными мембранами, но при использовании металлокерамических элементов (трубок) вполне возможно.

17.2. ДИАЛИЗ

В этом процессе (рис. 17.1) раствор, содержащий высокомолекулярные соединения, отделен полупроницаемой мембраной от камеры, содержащей чистый растворитель (обычно воду или водные растворы солей).

Содержащиеся в растворе низкомолекулярные вещества за счет диффузии через поры мембраны проходят в камеру *пермеата*, через которую непрерывно протекает вода. Высокомолекулярные вещества остаются в растворе, и таким образом происходит их очистка от низкомолекулярных.

Так, например, происходит обессоливание растворов ферментов или вакцин.

Мембраны для диализа изготавливают из пергамента, целлофана и других материалов. Часто мембраны выполняют в виде трубок, имеющих сходство с оболочками колбасных изделий, причем изготавливают такие трубки те же фирмы, что и оболочки для колбас. Собственно говоря, первая по хронологии оболочка колбасы — стенка кишок животных — также выполняет функции диализа, пропуская в кровь лишь низкомолекулярные вещества, образующиеся в процессе ферментолиза пищи в организме.

Новое поколение диализующих мембран представляет собой кассеты из большого количества микротрубок, заделываемых в так

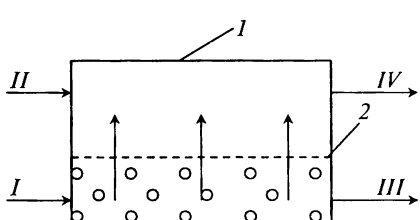


Рис. 17.1. Схема диализной установки:

1 — корпус; *2* — полупроницаемая диализная мембрана;
I — раствор со взвешенными или растворенными высокомолекулярными соединениями или микроорганизмами; *II* — свежая вода; *III* — диализованный раствор; *IV* — отработанный пермеат

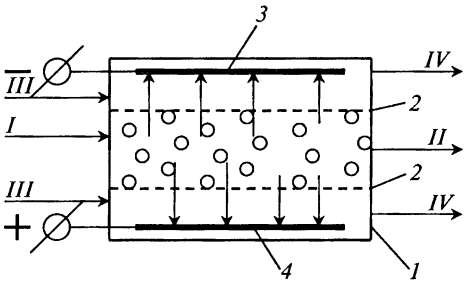


Рис. 17.2. Схема электродиализа:

1 — корпус; *2* — полупроницаемые перегородки; *3* — катод; *4* — анод; *I* — обрабатываемый раствор; *II* — диализованный раствор; *III* — свежая вода; *IV* — диализованный пермеат

называемый модуль с общим входом и общим выходом.

Преимуществами процесса диализа являются:

работа в мягких условиях температуры и pH;

отсутствие органических растворителей;

возможность высокой степени очистки высокомолекулярных веществ от примесей низкомолекулярных соединений, солей и металлов.

Недостатки:

низкая скорость диализа, определяемая молекулярной диффузией, поскольку движущая сила в этих случаях — разность концентраций веществ, ее нечем повысить;

возможность обрастания диализных мембран и забивания их пор.

Некоторых недостатков диализа удается избежать за счет применения ***электродиализа.***

В этом случае, если задачей является обессоливание ферментов или других биополимеров, перпендикулярно мембранам и потоку диализуемого раствора накладывается электрическое поле, в результате чего анионы и катионы из раствора диффундируют через диализные мембраны к аноду и к катоду, а биополимеры остаются в растворе (рис. 17.2).

В простейшем случае электродиализатор состоит из трех камер: для обрабатываемого раствора, для пермеата в зоне катода и для пермеата в зоне анода.

Движущей силой в этом случае, как и в процессе диализа, является разность концентраций ионов. Электрический ток лишь ускоряет процесс диффузии.

Мембраны при катоде и при аноде могут быть выполнены из разного материала, селективные для катионов и для анионов.

17.3. УЛЬТРАФИЛЬТРАЦИЯ

В процессе ультрафильтрации используют селективные полупроницаемые мембраны, пропускающие низкомолекулярные и задерживающие высокомолекулярные соединения. Известно, что движущей силой процесса ультрафильтрации является *пере-*

пад давления на мембране, как и при обычной фильтрации. Применительно к ультрафильтрации высокомолекулярные соединения — это те соединения, у которых молекулярная масса растворенного вещества превосходит молекулярную массу растворителя более чем в 500 раз.

При ультрафильтрации происходит не разделение фаз, а перераспределение растворенных в жидкости веществ. По существу здесь используется ***ситовой эффект.***

Полимерные мембраны, используемые при ультрафильтрации, обычно являются *двухслойными.* Основной фильтрующий слой имеет толщину менее 1 нм. Очевидно, такой слой не может быть механически прочным, и поэтому он дублируется со вторым слоем толщиной от 20 мкм до 2 мм, который к тому же имеет и значительно больший размер пор. Выполнены оба слоя как единое целое, но мембрана является анизотропной. Давление должно быть приложено *со стороны тонкого слоя*, а не наоборот.

Ясно, что для создания прочности мембраны дополнительно должна использоваться и более жесткая (металлическая или пластмассовая) арматура: ведь перепад давления для процессов ультрафильтрации достигает 0,3—1 МПа.

Обычный материал мембран — полиуретаны, сложные эфиры целлюлозы, полисульфон. В последнее время научились делать и металлокерамические (наиболее прочные) мембраны.

Обычно не существует мембран с совершенно одинаковым размером пор. Среди пор попадаются и такие, которые по размеру больше молекул растворенного вещества. Поэтому частично оно все же проходит в пермеат. Важной характеристикой мембраны является так называемый ***коэффициент удержания R***:

$$R = \frac{C_к - C_п}{C_к}, \qquad (17.1)$$

где $C_к$ и $C_п$ — концентрации растворенного вещества соответственно в концентрате и в пермеате (фильтрате).

От чего зависит скорость ультрафильтрации $Q_Ф$?

Рассмотрим это на примере ультрафильтрации растворов белка. На рис. 17.3 представлена зависимость скорости $Q_Ф$ от перепада давления ΔP при различных концентрациях белка в растворе.

Из рисунка видно, что с повышением концентрации белка скорость падает и, главное, повышение давления в широком диапазоне перестает влиять на скорость ультрафильтрации.

На рис. 17.4 для раствора одной концентрации белка приведены данные по зависимости скорости фильтрации от перепада давления на мембране при различной линейной скорости фильтруемого раствора параллельно поверхности мембраны.

Очевидно, что причина такого поведения раствора в ***концентрационной поляризации.***

Особенность адсорбентов — их емкость увеличивается при возрастании концентрации солей в среде (для ионообменников, наоборот, уменьшается).

В остальном сорбция микропористыми сорбентами протекает аналогично ионному обмену (имеется изотерма адсорбции, динамика сорбции подчиняется тем же закономерностям, что и ионный обмен). Соответственно аппаратура и технологические схемы для этого процесса также аналогичны используемым для ионного обмена.

16.4. ХРОМАТОГРАФИЯ

Сорбция в двух изложенных ранее модификациях — ионный обмен и адсорбция микропористыми сорбентами — предполагает высокую селективность сорбентов или отсутствие в обрабатываемом растворе веществ, имеющих близкие характеристики по селективности. Между тем в биологических растворах часто оказывается смесь близких по природе веществ, имеющих в то же время различную биологическую активность. Сорбенты при этом адсорбируют всю эту смесь, да и при десорбции в конечном счете все эти вещества выделяются вместе, хотя и очищенными от других загрязняющих веществ. Возникает задача разделения этих близких по природе веществ.

Эту задачу выполняет процесс ***хроматографии.*** Хроматография известна больше в измерительной технике, где с ее помощью решают задачу количественного определения вещества, находящегося в сложной смеси близких по составу веществ (например, углеводороды нефти или углеводы в сложных природных смесях сахаров). Между тем в технологии на тех же принципах основан процесс, который более точно называют ***препаративная хроматография***. По существу, это специфический способ *десорбции* сорбированной любым способом смеси веществ, чаще всего на микропористых сорбентах.

Как уже было сказано, при обычной схеме десорбция не очень-то различает разные вещества близкого состава и молекулярной массы, которые при десорбции выделяются вместе. Хроматография позволяет это сделать.

При хроматографии поток элюента, выходящий из слоя сорбента, не собирается весь в одну емкость, а фракционируется по времени пропускания элюента через колонку.

Дело в том, что десорбция разных по молекулярной массе или, точнее, разных по сродству к сорбенту веществ протекает с разной скоростью. Поэтому сначала в поток перейдут вещества с меньшей молекулярной массой и менее связанные с сорбентом, а затем все более и более трудно десорбируемые. Если измерять концентрацию вещества в потоке элюента во времени, то можно наблюдать ряд пиков различной высоты, разделенных участками низкой концентрации (рис. 16.5).

16.5. БИОСОРБЦИЯ

Биосорбцией обычно называют такие процессы, в которых в качестве сорбента используются сами микроорганизмы, клетки или их компоненты.

Наиболее известно применение биосорбентов для извлечения металлов из растворов.

Микроорганизмы обладают биохимическими механизмами сорбции металлов, позволяющими достигать концентраций металлов, в тысячи и даже в миллионы раз бóльших по сравнению с их концентрацией в жидкости, из которой металл извлекается.

Некоторые из таких сорбируемых металлов входят в состав ферментов и нужны клеткам. Поэтому сорбция железа, магния, цинка, меди, молибдена — нормальная физиологическая функция клеток.

Но эти же пути связывания клетки используют и для совсем чужеродных металлов, таких, как серебро, ртуть, уран, которые клетке для нормального развития не нужны. Но клетка сорбирует эти металлы как бы «по привычке».

Механизмы связывания металлов. Металлы могут связываться как растущими, так и нерастущими и даже мертвыми или разрушенными клетками. Сначала металл связывается поверхностью клетки, а затем медленно проникает внутрь. Бактерии связывают металлы лучше, чем дрожжи. Известно, например, накопление *урана* или *свинца* клетками бактерий рода Micrococcus. *Кадмий, никель, кобальт, рубидий* сорбируются клетками родов Bacillus и Esherichia coli. Клетки бактерий рода Pseudomonas использовали даже для извлечения *урана* из морской воды, где он содержится в очень низких концентрациях. Описано также выделение *золота, серебра*, других драгоценных металлов платиновой группы с помощью биосорбции.

Общая схема биосорбции металлов. В раствор с металлами добавляется суспензия микроорганизмов. Происходит поверхностное связывание металлов, образование комплекса металл—микроорганизмы.

Биомасса с сорбированным металлом отделяется от суспензии одним из методов разделения.

Выделение металла осуществляется:

либо десорбцией в мягких условиях, после чего освобожденная от металла биомасса вновь отделяется от раствора и может быть многократно использована в процессах биосорбции;

либо деструктурированием биомассы путем добавления к ней крепкой кислоты, щелочи или даже в пирометаллургическом процессе. Такое жесткое обращение с биомассой возможно в случаях, когда ее получение дешево или сама она является отходом какого-либо производства.

В некоторых технологиях в качестве биосорбента используют *дезинтегрированные клетки* микроорганизмов, часто высушенные.

ного вещества, а с другой — от коэффициента турбулентной диффузии, т. е. степени турбулизации потока.

Образуется что-то похожее на «динамическую мембрану». Но в дальнейшем за счет полимеризации белков возможно образование не просто динамической мембраны, но и геля, «лепешки», которая практически закупоривает реальную мембрану.

Борьба с концентрационной поляризацией. Для этого кроме повышения скорости потока над мембраной используют следующие приемы:

предварительная обработка раствора (создание подходящей температуры, pH, ионной силы);

предварительная фильтрация через мембрану определенных растворов полимеров, создающих на поверхности мембраны слой, препятствующий осаждению растворенного вещества на поверхности мембраны;

покрытие мембраны ферментом, способствующим разжижению геля;

создание на поверхности мембраны отрицательно заряженных ионогенных групп, предотвращающих осаждение белков;

гидрофилизация мембраны полиэтиленгликолем;

очистка мембраны.

Последний прием (очистка мембраны) осуществляется:

легким обратным потоком жидкости (для больших потоков операция рискованна, так как может быть нарушена целостность мембраны);

пузырями пены;

биологическими детергентами (например, сывороткой);

раствором щавелевой кислоты (для жирных стоков);

раствором пероксида водорода (для белков);

раствором гипохлорита калия;

добавлением в поток порошков, имеющих легкое абразивное действие на мембрану (тоже есть опасность «царапания» мембран, снижающего их долговечность).

Конструктивное оформление ультрафильтрационных систем реализуется в следующих вариантах:

трубчатые (с диаметром трубок 6—25 мм) могут развивать плотность упаковки (поверхность фильтрования на единицу объема) 60—200 $м^2/м^3$;

плоскорамные — 60—300 $м^2/м^3$;

рулонные — 300—800 $м^2/м^3$;

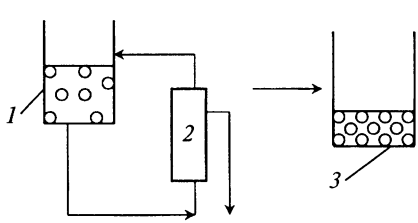


Рис. 17.7. Схематическое изображение процесса концентрирования:

1 — сосуд с исходным раствором; *2* — ультрафильтрационный модуль; *3* — сосуд со сконцентрированным раствором после ультрафильтрации

процессов биосинтеза продуктов метаболизма, отличных от биомассы микроорганизмов.

3. Технологическая схема производства.

Технологическая схема производства наглядно (в виде блок-схемы) отображает последовательность выполнения работ в производстве с разделением их по стадиям и операциям технологического процесса, указанием основных материальных потоков (поступление сырья, промежуточных продуктов) и мест образования отходов, сточных вод, выбросов в атмосферу, систем очистки и утилизации.

Каждая стадия и операция должны быть пронумерованы (ТП-1, ТП-2 и т. д.).

В этом же разделе дают сведения о подготовке культуры микроорганизма-продуцента.

4. Аппаратурная схема производства со спецификацией оборудования.

Этот раздел содержит чертеж с аппаратурной схемой производства и спецификацию оборудования, закрепленного за данным производством.

На схеме указывают все оборудование, включая вспомогательное, в том числе приборы и системы автоматического управления.

Все оборудование и приборы изображают и нумеруют в строгой последовательности по ходу технологического процесса.

Спецификация включает в себя наименование, количество, материал, техническую характеристику и регистрационный номер единиц оборудования и приборов.

Такого же типа аппаратурно-технологическую схему выполняют при курсовом и дипломном проектировании.

5. Характеристика сырья, материалов и полупродуктов.

Этот раздел оформляют в виде таблицы с указанием сорта, обозначений и показателей, обязательных для проверки.

Сюда же заносят сведения о характеристике микроорганизма-продуцента. Эти сведения обычно излагают в документе, который называется ***паспорт на штамм-продуцент.*** Сюда входят морфологические характеристики, методы диагностирования и испытаний, ссылка на разрешение Санэпиднадзора, номер регистрации по Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов. Очень часто штаммы-продуценты патентуют, и для получения патента обычно предварительно требуются те же документы.

Требования к полупродуктам (т. е. сырью, получаемому непосредственно на предприятии) определяются стандартами предприятия или непосредственно регламентом производства.

6. Изложение технологического процесса.

В этом разделе технологический процесс рассматривается по стадиям с учетом временной последовательности проведения операций.

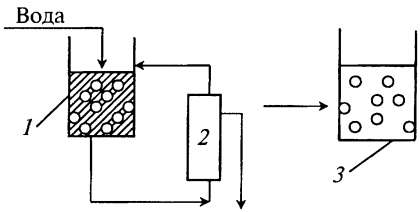


Рис. 17.8. Схема процесса диафильтрации:

1 — сосуд с исходным раствором, содержащим высокомолекулярные и низкомолекулярные соединения; *2* — ультрафильтрационный модуль; *3* — сосуд с раствором после диафильтрации, в котором остались только растворенные или взвешенные высокомолекулярные соединения

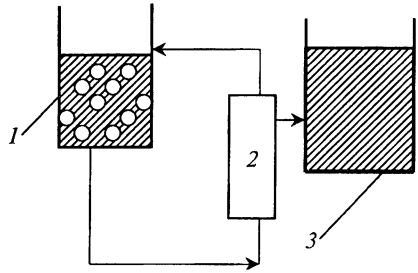


Рис. 17.9. Схема очистки, в которой продуктом является низкомолекулярное соединение (например, антибиотик пенициллин):

1 — исходный раствор, содержащий низкомолекулярные и высокомолекулярные растворенные вещества; *2* — ультрафильтрационный модуль; *3* — сборник пермеата с низкомолекулярными веществами

с полыми волокнами (капилляры диаметром 20—100 мкм и толщиной стенки 10—50 мкм) — до 30 000 $м^2/м^3$; недостаток — трудность замены поврежденных волокон.

Рассмотрим несколько примеров использования ультрафильтрационных установок при концентрировании (рис. 17.7), диафильтрации (очистка от низкомолекулярных веществ) (рис. 17.8) и очистке от высокомолекулярных соединений (рис. 17.9).

Схема, представленная на рис. 17.10, предусматривает двухступенчатое разделение, по сути фракционирование сыворотки на три потока.

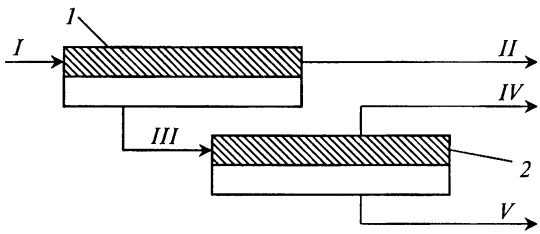


Рис. 17.10. Схема процесса выделения протеина и лактозы из молочной сыворотки:

1 — ультрафильтрационный модуль; *2* — установка обратного осмоса или нанофильтрации; *I* — разделяемая молочная сыворотка; *II* — протеиновый концентрат (сывороточные белки); *III* — лактозосодержащий пермеат; *IV* — концентрат лактозы; *V* — сток без лактозы

Общая оценка процессов ультрафильтрации приведена ниже.

Преимущества:

мягкие технологические режимы, нет перехода выделяемого вещества ни в жидкую органическую фазу, ни в твердую;

возможность одновременно осуществлять очистку и концентрирование растворов;

мембранные установки не имеют движущихся элементов, невелики по габаритам;

из-за несжимаемости жидкостей энергетические затраты малы.

Недостатки:

необходимость тщательной подготовки и очистки растворов;

наличие концентрационной поляризации;

значительные объемы пермеатов, требующих утилизации или очистки;

трудности эксплуатации мембранных элементов в течение длительного времени без нарушения их целостности.

17.4. ОБРАТНЫЙ ОСМОС

Процесс обратного осмоса представляет собой фильтрование раствора через мембраны с порами меньшего по сравнению с ультрафильтрацией диаметра (до 0,5 нм). При этом со стороны раствора должно быть приложено давление более высокое, чем осмотическое давление, обычно до 7—10 МПа.

Обратный осмос используют либо для концентрирования растворов биологически активных веществ, либо для получения чистого растворителя (например, для опреснения воды).

Несмотря на влияние перепада давления на скорость процесса, в обратном осмосе разделяются молекулы растворителя и растворенного вещества, близкие по размеру. Здесь срабатывает не эффект пористой мембраны, а растворение в мембране и затем выделение из нее растворенного вещества. Иначе говоря, здесь важна различная растворимость вещества и растворителя в мембране и различная диффузия, создающая концентрационный градиент растворителя.

В табл. 17.1 представлены различия между обратным осмосом и ультрафильтрацией.

Для обратного осмоса выпускают различные мембраны, среди них:

для обессоливания (молекулярная масса растворенных веществ более 150);

для нанофильтрации (лактоза, фармацевтические препараты, красители), молекулярная масса задерживаемых веществ более 220.

ходов и каковы потери (влага, газообразные продукты, механически неучтенные потери).

8. Переработка и обезвреживание отходов производства.

В этом разделе дается материальный баланс по перерабатываемым и обезвреживаемым отходам производства.

В сводной таблице приводится краткая характеристика всех отходов производства; таблица содержит следующие графы:

- наименование отхода;
- количество на единицу готовой продукции;
- агрегатное состояние;
- вещества, которые должны быть регенерированы или обезврежены;
- процентное содержание вещества в отходе до и после обработки;
- количество утилизируемого вещества.

9. Контроль производства.

Необходимые данные сводятся в таблицу, в которой предусматриваются следующие графы:

- стадия производства;
- контролируемый параметр;
- значение и размерность нормы;
- методы и средства контроля;
- как производится контроль (его периодичность) и где регистрируется (производственные журналы или диаграммы приборов либо ЭВМ, если имеется автоматизированная система управления).

10. Техника безопасности, пожарная безопасность, производственная санитария.

Содержание этого раздела ясно из названия, правила его оформления даны в специальных нормативных документах.

11. Охрана окружающей среды.

В этом разделе указывают перечень выбросов в окружающую среду, данные о фактической величине выбросов и концентрации содержащихся в них вредных веществ.

Указывают ПДК (предельно допустимые концентрации) этих веществ в рабочей зоне, а также ПДВ (предельно допустимый объем выбросов), согласованный с санитарно-эпидемиологическими органами.

Аналогичные данные приводятся по стокам, твердым и жидким отходам.

Указывают мероприятия, обеспечивающие обезвреживание выбросов в атмосферу, стоков и твердых отходов.

12. Перечень производственных инструкций.

Для каждого рабочего места в производственном цикле должна быть разработана производственная инструкция, по которой работает обслуживающий персонал. В регламенте приводится перечень таких инструкций.

Глава 18

НОРМАТИВНЫЕ ДОКУМЕНТЫ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДСТВ

●

Результаты изучения биотехнологических процессов и формирования технологических схем производства продуктов биотехнологии должны оформляться в виде специальных ***нормативных документов.***

Существуют два основных документа по технологии производства и к ним — много дополнительных.

Технические условия на продукт регламентируют качественные и количественные характеристики самого продукта биотехнологии.

Технологический регламент производства определяет способ получения продукта и все относящиеся к нему материалы.

По всем этим документам существуют определенные каноны оформления, ***стандарты.*** Этих стандартов должны придерживаться все, кто предполагает работать в области биотехнологии.

18.1. ТЕХНИЧЕСКИЕ УСЛОВИЯ НА ПРОДУКТ

Технические условия (ТУ) на продукт — это совокупность требований к характеристикам и качеству готового продукта, позволяющие его стандартизовать, сертифицировать и браковать (если продукт требованиям не соответствует).

Технические условия включают в себя:

данные о назначении продукта;

форму выпуска (порошок, гранулы, таблетки, ампулы, суспензия, паста, брикеты и т. п.);

сведения о наличии сортности продукта с учетом его качества;

описание характеристик продукта:

- органолептические: цвет, запах, вкус, «хруст», консистенция и т.п.;
- содержание основных компонентов (не менее);
- содержание примесей, в том числе вредных (не более);
- обсемененность (общая и санитарно-показательная микрофлора);
- токсичность, канцерогенность, кумулятивность, для живых культур — патогенность;
- физические характеристики;

промышленных условиях не будут воспроизведены показатели, предусмотренные в исходных данных. После этого составляется постоянный ***производственный регламент***, действующий в течение всего времени функционирования производства.

Вопросы для повторения

1. Каким документом регламентируется качество продукта биотехнологии? Каково его содержание?
2. Какой документ используется для описания технологии? Приведите состав документа.
3. Каким документом характеризуются штаммы-продуценты, используемые в биотехнологических производствах?
4. Что такое гигиенический сертификат, гигиеническое заключение?
5. Какими документами регламентируется содержание вредных примесей в выбросах в атмосферу и в стоках?

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

Аиба Ш., Хэмфри А., Миллис Н. Биохимическая технология и аппаратура: Пер. с англ. / Под ред. Г. К. Скрябина и П. И. Николаева. — М.: Пищевая промышленность, 1975. 587 с.

Бейли Дж., Оллис Д. Основы биохимической инженерии. В 2 т. — М.: Мир, 1989. 592 с.

Бирюков В. В., Кантере В. М. Оптимизация периодических процессов микробиологического синтеза. — М.: Наука, 1985. 292 с.

Варфоломеев С. Д., Гуревич К. Г. Биокинетика: Практический курс. — М.: ФАИР-ПРЕСС, 1999. 720 с.

Кантере В. М. Теоретические основы технологии микробиологических производств. — М.: Агропромиздат, 1990. 272 с.

Мосичев М. С., Складнев А. А., Котов В. Б. Общая технология микробиологических производств. — М.: Легкая и пищевая промышленность, 1982. 264 с.

Перт С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток: Пер. с англ. / Под ред. И. Л. Работновой. — М.: Мир, 1978. 332 с.

Промышленная микробиология / Под ред. Н. С. Егорова. — М.: Высшая школа, 1989. 688 с.

Сассон А. Биотехнология: свершения и надежды: Пер. с англ. / Под ред. В. Г. Дебабова. — М.: Мир, 1987. 412 с.

Ферментация и технология ферментов / Д. Уонг, Ч. Кооней и др.: Пер. с англ. / Под ред. К. А. Калунянца. М.: Легкая и пищевая промышленность, 1983. 336 с.

Яковлев В. И. Технология микробиологического синтеза. Л.: Химия, 1987. 272 с.

13. Технико-экономические нормативы.

В этом разделе указывают следующие интегральные характеристики по всему производству:

- выходы целевых продуктов;
- нормы расхода сырья;
- нормы энергозатрат;
- трудовые затраты.

14. Информационные материалы.

Данный раздел включает в себя следующие сведения:

- сведения о разработчиках;
- сведения о производстве на данном предприятии;
- сведения о зарубежных аналогах;
- полные сведения о штамме-продуценте;
- фармакологические свойства (для лекарств);
- обоснование выбора технологии исходя из отчета о научно-исследовательской работе (часто прикладывают сами отчеты);
- обоснование свойств веществ, тепловых расчетов, данных по кинетике и т. д. (со ссылкой на справочные материалы или на отчеты).

18.3. ЭТАПЫ РАЗРАБОТКИ ТЕХНОЛОГИИ

Обычно технология производства разрабатывается по этапам. Сначала проводят научные исследования, итогом которых является ***лабораторная технология.*** При этом определяется принципиальная возможность получения целевого продукта в лабораторных условиях (не только в колбах, но и в аппаратах небольшого масштаба). Итоговым документом по этому этапу работ является ***лабораторный регламент.***

Следующим этапом работы является создание ***опытно-промышленной установки.*** Здесь технология проверяется на установке более крупного масштаба и, кроме того, осуществляется наработка опытных партий продукта в количестве, необходимом для проведения испытаний свойств продукта (для кормовых продуктов — в экспериментах по кормлению животных, для лекарств — для медико-биологического изучения в клинике, для пищевых продуктов — для оценки их качества как продуктов питания и т. д.).

Итогом этого этапа исследований является ***опытно-промышленный регламент.***

Опытно-промышленный регламент является основой для создания ***исходных данных на проектирование производства***, по которым в дальнейшем проектируется и строится ***промышленная установка*** по данному производству.

После того как строительство и монтаж оборудования закончены, производство должно быть введено в действие. На этот период создается ***пусковой регламент***, действующий до тех пор, пока в

требования к сырью (в некоторых случаях);

требования безопасности, в том числе пожаро- и взрывоопасность;

сведения о разрешениях санитарно-эпидемиологической и экологических служб, для лекарств — фармакопейные статьи, для пищевых продуктов — разрешение контрольных служб продуктов питания. Эти сведения могут быть отражены в виде ссылок на гигиенический сертификат, утвержденные ПДК (предельно допустимые концентрации) для воды, почвы, воздуха рабочей зоны и в воздухе селитебной (жилой) зоны. Для микроорганизмов обязательны справка о непатогенности и справка о регистрации во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов;

методы контроля вещества в разных средах;

способы транспортировки, упаковки, сроки хранения.

Технические условия могут быть постоянными и временными. Временные технические условия выпускают на опытную партию продукта, объем которой оговаривается. Обычно оговариваются также сроки действия утвержденных технических условий.

18.2. ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ РЕГЛАМЕНТ ПРОИЗВОДСТВА

Технологический регламент является довольно объемным комплексным документом, включающим в себя все «ноу-хау» технологии и являющимся поэтому строго охраняемым объектом. Его не разрешают выносить из учреждения и копировать. Тем не менее студенты на практике обычно начинают с изучения технологического регламента. Этот материал является основой для соответствующих разделов курсовых и дипломных проектов.

Технологический регламент состоит из следующих основных разделов.

1. Характеристика конечной продукции производства.

В этом разделе приводится наименование и номер утвержденного ТУ на данную продукцию и в основном переносятся данные из ТУ:

- основное назначение;
- внешний вид и физико-химические свойства;
- химические и структурные формулы, молекулярная масса и содержание основного вещества, для многокомпонентных продуктов — их состав;
- другие данные из ТУ.

2. Химическая схема производства.

Эта схема строится по аналогии с производствами химической технологии, особенно многостадийными химическими синтезами, где почти на каждой стадии происходит то или иное химическое превращение вещества.

В биотехнологии такая схема особенно необходима для процессов биотрансформации и биокатализа, в меньшей степени — для

Излагается сущность протекающих процессов с указанием основных и побочных реакций, тепловых эффектов, температур, давления, скоростей, величины pH, рецептур, технологических режимов и т. д.

В заключение для каждой стадии составляют таблицу баланса материальных потоков по форме:

израсходовано на стадии — указывается наименование полупродуктов и сырья, концентрации основного вещества, количество, объем, масса израсходованных ингредиентов;

получено на стадии — с подразделением на готовый продукт (для финишных стадий), ***отходы*** производства и ***потери***. Отходы — это неиспользуемый продукт. Потери — это безвозвратные потери основного вещества в данном технологическом процессе;

для *отходов* указывают содержание ценных веществ («в том числе»).

Наиболее крупные статьи *потерь*: унос влаги при высушивании, газообразные продукты реакции, а также «механические неучтенные потери».

Содержание работ излагают по операциям (ТП-1, ТП-2 и т. д.), с подзаголовками в следующей последовательности:

- подготовка сырья;
- осмотр и подготовка оборудования перед загрузкой;
- загрузка сырья и полупродуктов;
- ведение технологических процессов и методы контроля;
- выгрузка и передача продуктов, отходов на дальнейшую обработку.

В этом же разделе описывают требования к осмотру и подготовке оборудования: сухость, остатки среды, продувка газом, состояние уплотнения и герметичности, антикоррозионные покрытия, прокладки и т. д.

Описывается, как проводится загрузка, особенно загрузка в ходе проведения технологической операции.

Указываются основные параметры процесса и способы их контроля и регулирования.

Приводится сводная таблица «***Нормы технологического режима***», в которой указывают аппарат, его контролируемые или регулируемые показатели, их числовые значения с возможными отклонениями. В другой сводной таблице дают «***Возможные неполадки и способы их ликвидации***».

7. Материальный баланс.

Раздел содержит сводную таблицу материального баланса по одному из вариантов:

- на единицу выпускаемой продукции;
- на один производственный поток;
- на все производство в целом.

В таблице указывают, сколько ***израсходовано*** сырья и полупродуктов и соответственно сколько ***получено*** конечного продукта, от-

Таблица 17.1

Сравнение ультрафильтрации и обратного осмоса по рабочим характеристикам

Характеристика	Обратный осмос	Ультрафильтрация
Молекулярная масса задерживаемых частиц	Менее 500—1000	Более 1000
Осмотическое давление, Н/см^2	До 800—1000	Пренебрежимо мало́
Рабочее давление, Н/см^2	100—1500	До 100
Принцип	Различная растворимость удерживаемого вещества и растворителя в мембране	Разделение по размеру молекул; важен лишь размер пор

Вопросы для повторения

1. Назовите основные мембранные методы, используемые в биотехнологии.
2. В чем состоят особенности использования процессов микрофильтрации для стерилизации сред жидкофазных компонентов?
3. Расскажите о тангенциальной фильтрации — основном приеме при использовании мембранных методов. Что он дает?
4. Что такое диафильтрация, какие задачи решаются с помощью этого процесса?
5. Что является движущей силой процесса диализа?
6. Какие мембраны используют при диализе?
7. Перечислите недостатки процесса диализа.
8. Электродиализ: для каких целей этот процесс предназначен?
9. Ультрафильтрация: движущая сила процесса, для каких задач используется?
10. Какое давление используют при ультрафильтрации?
11. Назовите причины концентрационной поляризации при ультрафильтрации. Перечислите факторы, влияющие на скорость процесса ультрафильтрации.
12. Каковы способы борьбы с концентрационной поляризацией?
13. Приведите варианты технического оформления ультафильтрационных систем. Каковы плотности упаковки поверхности фильтрации для разных вариантов?
14. Приведите примеры использования процессов ультрафильтрации при очистке и концентрировании растворов.
15. Перечислите преимущества и недостатки процесса ультрафильтрации.
16. Какой принцип используют в процессе обратного осмоса?
17. При каких давлениях происходят процессы нанофильтрации и обратного осмоса?

Учебное издание

Бирюков Валентин Васильевич

ОСНОВЫ ПРОМЫШЛЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

Учебное пособие для вузов

Художественный редактор *В. А. Чуракова*
Технический редактор *Н. Н. Зиновьева*
Корректоры *В. Г. Лузгина, О. М. Стерлядникова*
Компьютерная верстка *В. А. Маланичевой*

Сдано в набор 6.11.03. Подписано в печать 29.04.04.
Формат 60×88¹/₁₆. Бумага офсетная. Печать офсетная.
Гарнитура Ньютон. Усл. печ. л. 18,13. Уч.-изд. л. 19,35.
Изд. № 081. Тираж 3000 экз. Заказ 4350.

ООО «Издательство «КолосС», 101000, Москва,
ул. Мясницкая, д. 17.
Почтовый адрес: 129090, Москва, Астраханский пер., д. 8.
Тел. (095) 280-99-86, тел./факс (095) 280-14-63,
e-mail: koloss@koloss.ru, наш сайт: www.koloss.ru

Отпечатано в ГУП «Брянское областное полиграфическое объединение»
241019, г. Брянск, пр-т Ст. Димитрова, 40

ISBN 5-9532-0231-8

9 785953 202312