

Министерство образования Республики Беларусь
Учреждение образования «Витебский государственный
университет имени П.М. Машерова»
Кафедра фундаментальной и прикладной биологии

ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

Курс лекций

*Витебск
ВГУ имени П.М. Машерова
2024*

УДК 60(075.8)
ББК 28.087.1я73
О-75

Печатается по решению научно-методического совета учреждения образования «Витебский государственный университет имени П.М. Машерова». Протокол № 3 от 29.02.2024.

Составитель: доцент кафедры фундаментальной и прикладной биологии ВГУ имени П.М. Машерова, кандидат биологических наук, доцент **П.Ю. Колмаков**

Р е ц е н з е н т :
доцент кафедры экологии и географии ВГУ имени П.М. Машерова,
кандидат биологических наук, доцент *И.А. Литвенкова*

О-75 Основы биотехнологии : курс лекций / сост. П.Ю. Колмаков. – Витебск : ВГУ имени П.М. Машерова, 2024. – 46 с.

Данное издание предназначено для специальности 6-05-0511-03 Микробиология и содержит теоретический материал по основным вопросам общей биотехнологии, описываются ее ключевые направления, принципы промышленной организации биопроцессов. Рассмотрены цели, задачи, история развития биотехнологии как науки. Курс лекций является вспомогательным теоретическим материалом для учебной ознакомительной практики по биотехнологии для студентов первого курса факультета химико-биологических и географических наук. Он может быть использован при чтении лекций студентам специальности 6-05-0511-03 Микробиология по предмету «Основы биотехнологии».

**УДК 60(075.8)
ББК 28.087.1я73**

© ВГУ имени П.М. Машерова, 2024

СОДЕРЖАНИЕ

	ВВЕДЕНИЕ	5
1.	БИОТЕХНОЛОГИЯ КАК НАУКА	6
1.1.	Цель, задачи и предмет биотехнологии	6
1.2.	Этапы истории развития биотехнологии	7
1.3.	Преимущества биотехнологических процессов	8
2.	ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ БИОТЕХНОЛОГИИ	9
3.	ОСНОВНЫЕ ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ БИОТЕХНОЛОГИИ	12
3.1.	Классификация живых организмов	12
3.2.	Вирусы	12
3.3.	Бактерии	13
3.4.	Грибы	14
3.5.	Клетки растений и животных	14
3.6.	Методы биотехнологии	15
4.	ЗНАЧЕНИЕ БИОТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ РАЗЛИЧНЫХ ОБЛАСТЕЙ НАРОДНОГО ХОЗЯЙСТВА	16
4.1.	Биотехнология в животноводстве и ветеринарии	16
4.2.	Биотехнология в растениеводстве	17
4.3.	Биотехнология в пищевой промышленности	17
4.4.	Экологическая биотехнология	18
4.5.	Биотехнология в медицине	19
4.6.	Биотехнология и энергетика	20
4.7.	Другие приложения биотехнологии	20
5.	СЫРЬЕВАЯ БАЗА БИОТЕХНОЛОГИИ	21
5.1.	Классификация сырья и питательных субстратов	21
5.2.	Источники углеродного питания	21
5.3.	Источники азотного питания	22
5.4.	Другие виды сырья	23
5.5.	Принципы составления рецептур питательных сред	25
5.6.	Оптимизация ферментационных сред	26

6.	ПОДГОТОВИТЕЛЬНЫЕ И ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ СТАДИИ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДСТВ	27
6.1.	Общая характеристика подготовительных стадий	27
6.2.	Основы приготовления питательных сред	27
6.3.	Получение и подготовка посевного материала	28
6.4.	Стерилизация питательных сред, оборудования и воздуха	29
6.5.	Очистка отработанного воздуха	31
7	СОБСТВЕННО-БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ СТАДИЯ	32
7.1.	Способы получения целевого продукта на биотехнологиче- ской стадии	32
7.2.	Стадии роста микроорганизмов	33
7.3.	Классификация процессов ферментации	35
7.4.	Основные характеристики процесса ферментации	37
8.	ПОСТФЕРМЕНТАЦИОННЫЕ СТАДИИ БИОТЕХНО- ЛОГИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДСТВ	37
8.1.	Отделение биомассы от культуральной жидкости	37
8.2.	Дезинтеграция клеток	38
8.3.	Выделение продуктов метаболизма и синтеза	39
8.4.	Очистка продукта	39
8.5.	Концентрирование продукта	40
8.6.	Получение готовой формы продукта	40
9.	АППАРАТЫ В БИОТЕХНОЛОГИИ И ПРОЦЕССЫ, ПРОТЕКАЮЩИЕ В НИХ	40
9.1.	Биореакторы и процессы в них	40
10.	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ	45

ВВЕДЕНИЕ

Биотехнология (от гр. βίος – жизнь, τέχνη – искусство, мастерство, способность, λόγος – слово, смысл, мысль, понятие) – дисциплина, изучающая возможности использования живых организмов, их систем или продуктов их жизнедеятельности для решения технологических задач, а также создания живых организмов с необходимыми свойствами.

Биотехнология – наука, которая на основе применения знаний в области микробиологии, биохимии, генетики, геной инженерии, иммунологии, химической технологии, приборостроения и машиностроения использует биологические объекты (микроорганизмы, клетки тканей животных и растений и др.) или молекулы (нуклеиновые кислоты, белки, ферменты и др.) для целей промышленного производства полезных для человека и животных веществ и продуктов.

Биотехнология занимается выявлением физических, химических, биологических закономерностей с целью изучения и использования наиболее эффективных ресурсосберегающих производственных процессов.

Курс лекций «Основы биотехнологии» для специальности 6-05-0511-03 Микробиология включает в себя теоретический материал по основным вопросам общей биотехнологии и ее направлениям, принципам промышленной организации биопроцессов. Рассмотрены цели, задачи, история развития биотехнологии как науки. Данное издание может быть использовано при чтении лекций студентам специальности 6-05-0511-03 Микробиология по предмету «Основы биотехнологии».

1. БИОТЕХНОЛОГИЯ КАК НАУКА

1.1. Цель, задачи и предмет биотехнологии

Биотехнология – от греч. *bio(s)* – жизнь; *techne* – искусство, мастерство; *logos* – учение.

Впервые термин «биотехнология» предложил в 1917 г. венгерский инженер Карл Эрике. Он предложил процесс крупномасштабного промышленного выращивания свиней с использованием в качестве корма сахарной свеклы. При этом Эрике рассматривал превращение сырья (свеклы) в целевой продукт (свинину) как ряд биотехнологических этапов. Этот процесс был назван им биотехнологией, так как целевой продукт получался в результате жизнедеятельности биологических систем.

Второе рождение и популярность термин «биотехнология» приобрел после того, как в 1961 г. шведский микробиолог Карл Герен Хеден предложил заменить название научного журнала «Журнал микробиологической и химической инженерии и технологии» на «Биотехнология и Биоинженерия». Этот журнал публиковал работы по прикладной микробиологии и промышленной ферментации. С этого момента биотехнология оказалась связанной с исследованиями в области «промышленного производства товаров и услуг при участии живых организмов, биологических систем и процессов». Именно эти представления и начали вкладываться в термин «биотехнология».

Биотехнология – это совокупность промышленных методов, в которых используют живые организмы и биологические процессы для производства различных продуктов.

Биотехнология тесно связана с такими науками как молекулярная биология, микробиология, ветеринария, генетика, инженерные технологии, биохимия, физиология растений, микробиология, геновая инженерия.

Цель биотехнологии – дать будущему специалисту представление о современном состоянии и перспективах развития биотехнологии при использовании биообъектов и биомолекул в промышленном производстве, сельском хозяйстве, здравоохранении и окружающей среде.

Задачи биотехнологии:

- Стимулирование обмена веществ клеток для производства запланированных продуктов при одновременном подавлении других реакций метаболизма.
- Получение клеток или их составных частей, которые способны к направленному изменению других сложных биоструктур.
- Создание рекомбинантных ДНК, которые способны кодировать биосинтез особо ценных соединений.
- Создание безотходных и экологически безопасных биотехнологических процессов.
- Совершенствование аппаратного оформления биотехнологических процессов с целью получения максимального выхода продукции.

- Повышение технико-экономических показателей биотехнологических процессов по сравнению с существующими.

Предмет биотехнологии: углубленное изучение, в т.ч. и на молекулярном уровне, биообъектов; улучшение аппаратного оформления биотехнологических процессов; изучение взаимосвязей биообъектов и оборудования для повышения их совместимости.

1.2. Этапы истории развития биотехнологии

В развитии биотехнологии как науки выделяют 4 периода.

Эмпирический период (от греч. *empeiria* – опыт; основанный на опыте). Насчитывает около 8 тыс. лет. Тогда люди еще ничего не знали о микроорганизмах. Они интуитивно использовали биотехнологические процессы для получения хлеба, пива, спирта, уксуса, кисломолочных продуктов, силосования кормов, выделки кожи и т.д.

Этиологический период (от греч. *aitia* – причина, *logos* – учение) (1856–1933 гг.). Связан с именем французского ученого Л. Пастера, который открыл микробную природу брожения, предложил оригинальный метод стерилизации – пастеризацию, создал научные основы вакцинопрофилактики и вакцинотерапии. В это время развивается учение о грибах (микология); создаются питательные среды для культивирования различных биообъектов; разрабатываются методы стерилизации питательных сред; созданы простые установки для очистки сточных вод и др.

1814 г. Русский академик К.С. Кирхгоф впервые получил жидкий ферментный препарат амилазы из проросшего ячменя и описал ферментативный процесс.

1857 г. Французский ученый Луи Пастер установил, что микробы играют ключевую роль в процессах брожения, и показал, что в образовании отдельных продуктов участвуют разные виды микроорганизмов. Его исследования послужили основой развития бродильного производства органических растворителей (ацетона, бутанола, этилового спирта и др.).

1875 г. Немецкий микробиолог Роберт Кох разработал метод получения чистых культур микроорганизмов, который гарантировал содержание в посевном материале клетки только определенного вида.

1893 г. Немецкий ученый К. Вемер установил способность плесневых грибов синтезировать лимонную кислоту.

1894 г. Японский ученый И. Такамаине создал первый ферментный препарат, который получил из плесневого гриба, выращенного на влажном рисе.

1923 г. Организовано первое микробиологическое промышленное производство лимонной кислоты, а затем молочной, глюконовой и других органических кислот.

1925 г. Русские ученые Г.А. Надсон и Г.С. Филиппович установили возможность искусственного мутагенеза микроорганизмов (грибов) под влиянием рентгеновского облучения.

В 30-е годы в СССР было организовано производство микробиологическим способом технических препаратов ферментов и витаминов (рибофлавина В2, эргостерина – провитамин D2).

Биотехнический период (1934-1971 гг.). В этот период внедряется крупномасштабное герметизированное оборудование для проведения процессов в стерильных условиях; развивается производство антибиотиков; выделен нуклеопротеин (ДНП); разработана кинетика ферментативных реакций; выяснены условия, необходимые для культивирования клеток растений, животных и человека; открыт цикл лимонной кислоты и др.

В военные годы (1941 - 1945 гг.) возросла потребность в дрожжах как источнике белковых веществ. Изучалась способность дрожжей накапливать белоксодержащую биомассу на непищевом сырье (древесные опилки, гороховая и овсяная шелуха). Так, в блокадном Ленинграде, Москве были созданы установки, на которых производили пищевые дрожжи. В военной Германии биомассу дрожжей добавляли в колбасу и супы.

1948 г. Советский биохимик В.Н. Букин с помощью микроорганизмов получил витамин В12, который не способны синтезировать ни растения, ни животные.

Геннотехнический период (с 1972 г.). В этот период создана рекомбинантная молекула ДНК, генно-инженерный инсулин; развивается хромосомная и клеточная инженерия; внедряются автоматизация и компьютеризация; развиваются новые направления (медицинская биотехнология, иммунобиотехнология, биогеотехнология, инженерная энзимология).

1972 г. Американский биохимик П. Берг разработал технологию клонирования ДНК.

1975 г. С возникновением генной инженерии появилась возможность направленно создавать для промышленности микроорганизмы с заданными свойствами.

1.3. Преимущества биотехнологических процессов

По сравнению с химической технологией биотехнология имеет ряд преимуществ:

- Биотехнологическим путем можно получить специфичные и уникальные природные вещества, часть из которых (например, белки, ДНК) еще не удастся получить путем химического синтеза.
- Биотехнологические процессы можно вести при относительно невысоких температурах и давлении.
- Микроорганизмы имеют значительно более высокие скорости роста и накопления клеточной массы, чем другие организмы. Так, с помощью микроорганизмов в ферментере объемом 300 м³ 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 численностью 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 можно использовать дешевые отходы сельского хозяйства и промышленности.
- Биотехнологические процессы обычно более экологичны, имеют меньше вредных отходов, близки к протекающим в природе естественным процессам.
- Технология и аппаратура более просты и дешевы.

2. ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ БИОТЕХНОЛОГИИ

Биотехнологию в настоящее время можно определить как междисциплинарную область научно-технического прогресса, возникшую на стыке биологических, химических и технических знаний.

В настоящее время биотехнология является одним из крупнейших промышленных секторов с точки зрения рыночной стоимости, охватывая продвижения в пищевой и сельскохозяйственной промышленности, а также научные исследования и разработки в области медицины, генетических исследований и биоинженерии. В этой отрасли большие деньги тратятся на фармацевтические препараты, различные приборы и диагностические средства, разработки более устойчивых культур, биотоплива, биоматериалов, а также средств контроля за загрязнением. Чистая годовая прибыль (% от выручки) крупных фармацевтических компаний, к которым можно смело отнести и биофармацевтические, с 2000 по 2018 гг. выросла почти на 80 %. И этот показатель не захватывает период пандемии, вызванной SARS-CoV-2, что ожидается увеличит его значение. Сравнивая долю чистой прибыли 35 крупных фармацевтических компаний за этот же период с показателем 357 нефармацевтических компаний, можно указать, что она составляет 20 % (1,9 млрд. долларов США против 9,4). Согласитесь, вес доли – весьма внушительный. Биофармацевтические компании, получая прибыль от продажи препаратов, инвестируют в исследования и разработки (НИОКР).

Биотехнология имеет прикладной характер и сводится к использованию живых организмов (микроорганизмов, животных и растительных клеток) или же их ферментов для синтеза, разрушения или трансформации (превращения) различных материалов с целью получения полезных продуктов для различных нужд человека. Используемое определение термина «биотехнология» требует небольшого уточнения, а именно, в качестве объектов определены живые организмы, относящиеся к клеточным формам жизни, но мы не можем не сказать, что и неклеточные формы являются важными объектами данной отрасли науки, и имя им – вирусы.

В настоящее время с помощью микробиологического синтеза производят антибиотики, ферменты, аминокислоты, полупродукты для дальнейшего синтеза разнообразных веществ, феромоны, органические кислоты, кормовые белки и др. Можно сказать, что биотехнология изучает методы получения полезных для человека веществ и продуктов в управляемых условиях, используя микроорганизмы, клетки животных и растений или изолированные из клеток биологические структуры. Таким образом, биотехнология – понятие более широкое, чем микробный синтез, поскольку используются не только микроорганизмы, но и клеточные структуры растительных и животных тканей, протопласты, клеточные ферменты и любые биологические системы, способные к биосинтезу или конверсии. Продукция, получаемая сегодня в мире с помощью промышленных биотехнологий, используется практически во всех отраслях экономики. В энергетике это жидкие и твердые биотоплива – бутанол, этанол,

биодизель, биогаз, в медицине – сырье для фармацевтической промышленности, биофармацевтические технологии и препараты, в сельском хозяйстве – кормовой белок, аминокислоты, средства защиты растений и животных, в пищевой промышленности – пищевые ферменты, сахарозаменители, компоненты для перерабатывающей промышленности. Фактически биотехнологии решают глобальную геополитическую задачу – проблему перехода от использования не возобновляемых ресурсов к возобновляемому сырью.

Основой развития современных биотехнологий являются достижения в области фундаментальных наук о жизни, в первую очередь физико-химической биологии, а также разработки новых методических подходов и исследовательских платформ. Только за последние несколько лет возникли такие научные направления, как системная и синтетическая биология, бурно развиваются высокопроизводительные методы исследований генома, транскриптома, протеома, микробиома и т. д.

Биотехнология как наука на современном этапе является синтезом разделов биохимии в соединении с геной инженерией. И в качестве пример можно привести опыт компании Perfect Day, разрабатывающая «настоящее» молоко, для производства которого не нужно ни единой коровы, используя технологию ферментации. Основатели стартапа предложили получать белки молока не из животных, а из дрожжей. Благодаря такой технологии мы, возможно, будем производить молоко у себя дома, или заказывать свежую порцию напитка в молоко-варне из ближайшего супермаркета, настраивая параметры продукта и оформляя заказ в мобильном приложении.

Почти любая технология пищевых продуктов основана на биохимических процессах, поэтому изучение процесса обмена веществ в живой клетке – актуальный вопрос для развития биотехнологии. Это имеет большое значение не только для животноводства и растениеводства или переработки промышленным способом сельскохозяйственного сырья, но и для медицины, а также экологии. Современная пищевая биотехнология озабочена не только производством пищевых продуктов, но и потреблением этих продуктов с учетом персонализированных требований. Сейчас взоры исследователей обращены к человеку как объекту, содержащему в себе микробиоту, влияющую на поведение, характер, пищевые предпочтения и даже развитие заболеваний.

Быстрыми темпами развиваются такие отрасли, как современные биологические методы защиты культурных растений, биоэнергетика и биodeградируемые полимеры, а также природоохранные биотехнологии. Ведутся научные работы по созданию новых биополимеров, в будущем они могут заменить ныне популярные пластмассы. Биополимеры имеют большое преимущество в сравнении с пластмассами, так как они нетоксичны и могут разлагаться после их применения, не загрязняя при этом окружающее пространство.

Конструирование необходимых генов даст возможность управлять жизнедеятельностью не только растений, но и животных, создавать новые организмы с иными свойствами.

В некоторых странах, где значительные объемы биомассы не используются полностью, биотехнология в обозримом будущем превратит их в ценные продукты или в биологические виды топлива. Биотехнология все больше перестает быть прикладной наукой, она активно входит в обычную жизнь людей, помогая решать насущные проблемы современного человечества. Биотехнологии и генная инженерия, более чем все остальные, связана с фундаментальными научными исследованиями. Создание организмов с «заданными параметрами», лечение генетически обусловленных болезней, производство белковой массы вне организма, внедрение в организм «биологических чипов», влияющих на жизнедеятельность – все эти направления нуждаются в дорогостоящих исследованиях, сложном оборудовании и высококвалифицированных специалистах.

Классифицировать биотехнологии можно и по определенным критериям: текущему состоянию, потенциалу развития, социально-экономическому эффекту на следующие виды:

- **Биофармацевтика** – вакцины нового поколения, антибиотики и бактериофаги.
- **Биомедицина** – диагностикумы *in vitro*, персонализированная медицина, клеточные биомедицинские технологии, биосовместимые материалы, системная медицина и биоинформатика, банки биообразцов, исследования на животных.
- **Промышленная биотехнология** – производство ферментов, аминокислот, глюкозно-фруктовых сиропов, полисахаридов, субстанций антибиотиков, биodeградируемые полимеры, комплексы по переработке древесной биомассы и др.
- **Биоэнергетика** – производство электрической энергии и тепла из биомассы; поглощение (утилизация) эмиссии парниковых газов, образующихся в энергетических производственных циклах, промышленных и коммунальных стоков для интенсификации производства непищевой биомассы; предотвращение и ликвидация последствий вредного антропогенного воздействия на окружающую среду энергетической отраслью методами биоконверсии; биоэнергетическое машиностроение; производство биотоплива и его компонентов из биомассы с заданными химмотологическими¹² свойствами; промышленное производство непищевой биомассы для получения топливно-энергетических ресурсов, включая технологии селекции и методы биоинженерии и пр.
- **Сельскохозяйственная** – биологическая защита растений; сорта растений, созданные с использованием методов биотехнологии; технологии молекулярной селекции животных и птицы; трансгенные и клонированные животные; биотехнология почв и биоудобрения; биопрепараты для животноводства; кормовой белок и др.
- **Пищевая биотехнология** – пищевой белок; ферментные препараты; пребиотики, пробиотики, синбиотики; функциональные пищевые продукты,

включая лечебные, профилактические и детские; пищевые ингредиенты, включая витамины и функциональные смеси и т. д. [7, 14].

- **Лесная биотехнология** – применение биотехнологий для управления лесонасаждениями, для сохранения и воспроизводства лесных генетических ресурсов; создание биотехнологических форм деревьев с заданными признаками; биологические средства защиты леса и др. Природоохранная (экологическая) биотехнология – биоремедиация¹³; экологически чистое жилье; биологические коллекции и биоресурсные центры.
- **Морская биотехнология** – создание сети аквабиоцентров; глубокая переработка промысловых гидробионтов и продукции аквакультур; специализированные корма для аквакультур.

3. ОСНОВНЫЕ ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

3.1. Классификация живых организмов

В основу представленной классификации положена морфологическая организация генетической системы: безъядерные (акариоты) – вирусы и вирионы; предъядерные (прокариоты) – бактерии и сине-зеленые водоросли (цианобактерии); ядерные (эукариоты) – царства грибы, растения, животные.

Объекты биотехнологии: вирусы; бактерии; грибы (микро- и макромицеты); простейшие; клетки и ткани растений, животных и человека, а также некоторые биогенные и функционально сходные с ними вещества (ферменты, простагландины, лектины и др.). В настоящее время основным объектом биотехнологии являются прокариоты.

Микроорганизмы, используемые в промышленности для получения целевых продуктов представлены в таблице 1.

3.2. Вирусы

Вирусы – бесклеточные частицы размером несколько нм и видны только под электронным микроскопом. Они являются паразитами и могут размножаться только в клетках других организмов.

Вне клеток вирусы существуют в виде вирионов. Вирион представляет собой комплекс нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК) с белком.

Белковые молекулы, которые окружают РНК или ДНК, создают оболочку вируса (капсид).

Таблица 1. Микроорганизмы, используемые в промышленности для получения целевых продуктов

Организм	Тип	Продукт
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Дрожжи	Пекарские дрожжи, вино, эль, саке
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Бактерии	Йогурт
<i>Propionibacterium shermanii</i>	Бактерии	Швейцарский сыр
<i>Gluconobacterium suboxidans</i>	Бактерии	Уксус
<i>Penicillium roquefortii</i>	Плесень	Сыры типа рокфора
<i>Aspergillus oryzae</i>	Плесень	Саке
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Дрожжи	Этанол
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Бактерии	Ацетон
<i>Xanthomonas campestris</i>	Бактерии	Полисахариды
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Бактерии	L-Лизин
<i>Candida utilis</i>	Дрожжи	Микробный белок
<i>Propionibacterium</i>	Бактерии	Витамин В ₁₂
<i>Aspergillus oryzae</i>	Плесень	Амилаза
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Дрожжи	Лактаза
<i>Saccharomycopsis lipolytica</i>	Дрожжи	Липаза
<i>Bacillus</i>	Бактерии	Протеазы
<i>Endothia parasitica</i>	Плесень	Сычужный фермент
<i>Leocanostoc mesenteroides</i>	Бактерии	Декстран
<i>Xanthomonas campestris</i>	Бактерии	Ксантан
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Плесень	Пенициллины
<i>Chehalosporium acremonium</i>	Плесень	Цефалоспорины
<i>Rhizopus nigricans</i>	Плесень	Трансформация стероидов
Гибридомы	–	Иммуноглобулины и моноклональные антитела
Клеточные линии млекопитающих	–	Интерферон
<i>E. coli</i> (рекомбинантные штаммы)	Бактерии	Инсулин, гормон роста, интерферон
<i>Blakeslea trispora</i>	Плесень	β-Каратин
<i>Phaffia rhodozyma</i>	Дрожжи	Астаксантин
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Бактерии	Биоинсектициды
<i>Bacillus popilliae</i>	Бактерии	Биоинсектициды

По типу нуклеиновой кислоты вирусы делятся на: РНК-содержащие – вирусы растений, вирусы, вызывающие грипп, бешенство, СПИД и др.; ДНК-содержащие – вирусы герпеса, оспы и др.

Наряду с типичными вирусами, открыты вириды. Они представляют собой частицы, которые состоят из низкомолекулярных РНК (240–400 нуклеотидов), и не содержат капсиды.

3.3. Бактерии

Бактерии – это безъядерные, как правило, одноклеточные организмы, размером 0,2–10,0 мкм, имеют определенную форму (палочки, кокки, спиралевидные формы). Внутреннее содержимое бактериальной клетки (цитоплазма) изолировано от внешней среды клеточной оболочкой, которая состоит из тонкой мембраны и стенки. Клеточная стенка имеет сложное строение и придает бактериальной клетке определенную форму. Исключение составляют микоплазмы, у которых нет клеточной стенки и, соответственно, определенной формы. Бактериальные клетки, лишенные клеточной стенки, называются протопластами. Протопласты используются в клеточно-инженерных исследованиях.

Для бактерий характерны разнообразные условия обитания, приспособляемость, способы питания и биоэнергообразования, отношение к макроорганизмам (животным и растениям).

Из биомассы бактерий получают различные органические вещества, в частности, аминокислоты, разнообразные белковые вещества, в том числе ферменты. Бактерии являются удобным объектом для генетических исследований, так как быстро размножаются и содержат плазмидную ДНК, способную включать в свой состав чужеродные фрагменты.

В научно-исследовательских и промышленных целях используют генетически модифицированные и иммобилизованные на носителях клетки бактерий. Наиболее изученной и широко применяемой в генноинженерных исследованиях клеткой является кишечная палочка, которая обитает в толстом кишечнике человека (*Escherichia coli*, *E. coli*).

3.4. Грибы

Грибы насчитывают десятки тысяч видов. Они имеют клеточное ядро. Сочетают в себе черты клеток растений (прочная клеточная стенка) и животных (нуждаются в некоторых витаминах и способны синтезировать свойственные животным полисахариды: хитин и гликоген).

Наибольший интерес для биотехнологии представляют микроскопические грибы (дрожжи, плесневые и другие микроорганизмы. Их применяют в хлебопечении, пивоварении и в молочной промышленности, для получения спиртов, органических кислот, антибиотиков, различных биологически активных веществ и кормового белка.

3.5. Клетки растений и животных

Растения насчитывают около 500 000 видов. Они состоят из ядерных клеток, которые имеют сложное строение и выполняют различные специализированные функции. К ним относятся водные организмы водоросли и высшие растения, которые обитают преимущественно на суше.

Водоросли отличаются от высших растений тем, что не имеют органов и тканей, а представляют собой слоевища, которые состоят из недифференцированных (одинаковых) клеток. Они обладают способностью к фотосинтезу, богаты углеводами и пигментами.

Один из видов водорослей – морская капуста – используется в пищу. Из водорослей добывают агар-агар и альгинаты. Это полисахариды, которые используют для изготовления питательных сред для культивирования микроорганизмов и в пищевой промышленности.

Высшие растения – многоклеточные организмы, которые имеют специализированные органы (корни, стебли, листья). Они состоят из тканей, которые образованы дифференцированными клетками. Ткани различаются химическим составом, строением и выполняют различные функции (механические, покровные, выделительные, проводящие и др.).

Особое значение для биотехнологии имеет одна из тканей растений, называемая меристемой. Клетки меристемы способны к делению, благодаря

чему осуществляется рост, а также образование тканей и органов растений. Они не утрачивают способности делиться и после удаления из растения. При выращивании на специальных питательных средах меристемные клетки дают массу делящихся клеток – каллус, который можно длительно культивировать, получать из него новые растения или использовать для извлечения нужных веществ (биостимуляторы из женьшеня, противораковое средство таксол из коры тиса и др.).

Самостоятельную группу организмов составляют *лишайники*, которые представляют собой симбиоз (сожительство) грибов с водорослями или с цианобактериями. Они являются перспективными источниками ряда биологически активных веществ.

Животные бывают простейшими – одноклеточными и высшими – многоклеточными. Они состоят из ядерных клеток.

Среди *простейших* имеются паразиты и возбудители болезней высших животных и человека. Некоторые простейшие выращиваются и используются для целей биоиндикации, в токсикологических исследованиях и для получения отдельных веществ.

Ткани высших животных являются источниками полноценного белка, липидных веществ и некоторых витаминов, необходимых для питания человека. Из органов и крови животных получают различные белковые препараты (альбумин, иммуноглобулины, ферменты), некоторые гормоны и другие биологически активные вещества.

Однако сырье животного происхождения является дорогим, а выход конечных продуктов недостаточно высок. Поэтому чаще используют культуры клеток животных или человека, которые выращивают на искусственных средах (получение интерферона, моноклональных антител).

Перспективный и экономичный способ производства биологически активных веществ – генная инженерия. При этом ген животного внедряют в клетку бактерии, которая начинает синтезировать нужное вещество. Так получают человеческий инсулин – гормон белковой природы.

3.6. Методы биотехнологии

1) *Общие* – методы органической, физической, коллоидной или биологической химии, микробиологии, цитологии, физиологии и других дисциплин (определение окислительно-восстановительного потенциала, электропроводности, pH, концентрации кислорода, диоксида углерода, аммиака, аминокислот и органических кислот, глюкозы, активности ферментов и многих других параметров).

2) *Специальные* – крупномасштабное глубинное культивирование биобъектов в периодическом, полу-непрерывном или непрерывном режиме.

3) *Специфические* – методы генетической и клеточной инженерии. *Генетическая инженерия* – это методы получения рекомбинантных ДНК, которые объединяют последовательности нуклеотидов разного происхождения. В генетической инженерии выделяют:

а) генная инженерия – целенаправленное изменение естественных генетических характеристик известных вирусов и клеток;

б) геномная инженерия – целенаправленная глубокая перестройка генома прокариот и эукариот, в т.ч. вплоть до создания новых видов;

в) хромосомная инженерия – перенос изолированных хромосом от клетки донора одного организма в клетку реципиент другого организма.

Клеточная инженерия – это создание ранее неизвестных клеточных систем с новыми свойствами на основе клеточных взаимодействий.

4. ЗНАЧЕНИЕ БИОТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ РАЗЛИЧНЫХ ОБЛАСТЕЙ НАРОДНОГО ХОЗЯЙСТВА

4.1. Биотехнология в животноводстве и ветеринарии

Недостаток кормового белка можно восполнить биотехнологическим путем. Так, продуцентами кормового белка могут быть бактерии, дрожжи, микроскопические водоросли, микро- и макромицеты, которые можно выращивать на различных отходах.

Один из способов сохранения скошенной травы и увеличения ее питательной ценности – силосование. При этом растительную массу уплотняют в специальных силосных ямах и вводят в нее специальные закваски (смесь микроорганизмов). Это позволяет в зимнее время скармливать животным растительный корм даже более ценный, чем исходный.

Биотехнологическим путем производят кормовые витамины (А, D, B2, B12, С и др.), ростовые гормоны белковой природы.

Пробиотики – это биологические препараты, которые представляют собой культуры симбионтных микроорганизмов или продукты их ферментации, которые способствуют росту последних, подавляют рост патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, нормализуют пищеварение, обладают антитоксическим и антиаллергическим действием и др.

Вакцины – это препараты, которые получают на основе ослабленных, инаktivированных или дезинтегрированных возбудителей болезней. Применяются для иммунизации животных с профилактической и лечебной целями.

Антибиотики – это препараты, которые применяют для профилактики и лечения инфекционных заболеваний. Они вырабатываются микроорганизмами и способны тормозить рост и вызывать гибель бактерий и других микробов. В качестве кормовых используют антибиотики, которые ранее были медицинскими.

Разработан корм из оранжево-красных микроорганизмов рода *Phaffia*, который позволяет получать оранжевый или розовый цвет мяса лосося и форели при их искусственном разведении. Это связано с тем, что *Phaffia* синтезирует каротиноид астаксантин насыщенного красного цвета.

4.2. Биотехнология в растениеводстве

Выпускают специальные антибиотики для растений, которые позволяют «лечить» различные виды заболеваний растений. Биотехнологическими методами получают ростовые вещества для растений (гибберелины).

Вакцин для растений не существует. Однако разработаны оригинальные способы борьбы с насекомыми-вредителями растений (энтомопатогенные препараты; от греч. *entoma* – насекомые). При этом выращивают специальные микроорганизмы, которые заражают и убивают насекомых, но не вредят человеку, животным и самому растению.

Еще один способ борьбы с насекомыми – обработка участков поля феромонами (половыми аттрактантами насекомых; от лат. *attraho* – притягиваю к себе). Их получают микробиологическим путем с использованием химических стадий. Привлеченных феромонами насекомых собирают и уничтожают.

Бактериальные удобрения – препараты на основе микроорганизмов, которые способны потреблять азот из воздуха и переводить его в аммонийную и органическую форму.

Биотехнология предлагает метод создания безвирусной рассады. Например, изолированные клетки клубней картофеля размножают в суспензии. Затем выращенные клетки «пересаживают» в искусственный грунт и из каждой клетки вырастает «клубенок» размером не более горошины. Эти горошины высевают в поле как рассаду, из которой нормальным путем вырастает растение картофеля с множеством клубней.

4.3. Биотехнология в пищевой промышленности

Разные виды дрожжей применяются в технологии производства спирта, вина, пива, кваса, хлебобулочных изделий.

Различные микроорганизмы в виде заквасок применяют для получения кисломолочные продукты.

Биотехнологическим путем также получают пищевые подкислители: лимонная, яблочная, молочная и другие кислоты.

Микроорганизмами синтезируется глутаминовая кислота (глутамат), которая используется для усиления аромата мясных, рыбных, грибных изделий.

В пищевой промышленности используют витамины, получаемые биотехнологическим путем. Например, бета-каротин (провитамин А) применяют как пищевой краситель (оранжевого цвета).

Возможно получение пищевого белка из микроорганизмов. Так, пищевой продукт микопротеин получают на основе биомассы мицелиальных грибов рода *Fusarium*. Для вкуса и цвета в него вводят специальные пищевые добавки. Стало возможным культивировать мицелий высших съедобных грибов (вешенки, опят, маслят и др.) глубинным способом, т.е. в ферментере.

Для получения сырокопченых колбас в фарш вводят закваски на основе молочнокислых микроорганизмов, которые способствуют созреванию и приданию продукту специфического приятного вкуса.

Ферменты микробного происхождения находят широкое применение в пищевой промышленности. Так, целлюлаза применяется при приготовлении растворимого кофе, для улучшения консистенции грибов и овощей; глюкозо-оксидаза – для удаления кислорода из сухого молока, кофе, пива, майонезов, соков; протеаза – для размягчения мяса; бетагалактозидаза – для получения «безлактозного» молока; пектиназа – для осветления соков и др.

Микроорганизмы или изолированные клетки высших грибов используют для получения пищевых красителей ярко-желтого, красного, синего цвета. Такие красители безопасны в использовании для пищевых целей.

В качестве пищевых загустителей биотехнология предлагает использовать полисахариды микробного происхождения. Например, декстран – стабилизатор при производстве мороженого.

Пищевые консерванты – это вещества, которые добавляют в пищевые продукты для увеличения срока их хранения. Известны консерванты биотехнологического происхождения. Например, низин – выделяется специальными штаммами молочнокислых бактерий.

4.4. Экологическая биотехнология

В начале XX века предложен метод аэробной биологической очистки сточных вод с помощью активного ила. Активный ил – это смесь микроорганизмов, которые способны перерабатывать хозяйственно-бытовые, промышленные и другие загрязнения.

Аналогом аэробной очистки стоков является аэробное биокомпостирование твердых отходов. Это позволяет превратить отходы в удобрение или использовать их в качестве подсыпки для дорог, в строительстве и др.

В результате анаэробного сбраживания жидких концентрированных отходов получают газ, содержащий 65 % метана и 30 % диоксида углерода, который может быть использован для отопления. Сброженный осадок используют как удобрение.

Для очистки газовых выбросов применяют биофильтры, заполненные насадкой, на которой закреплены специальные микроорганизмы. При этом вредные примеси сорбируются на насадке, а затем потребляются и обезвреживаются микроорганизмами.

Разработаны биотехнологические способы восстановления загрязненных территорий при разливах нефти; методы деградации химических пестицидов и инсектицидов; методы снижения концентрации метана в шахтах; стиральные порошки с ферментами микробного происхождения (протеазами).

Определенные виды микроорганизмов способны осаждать на себе (сорбировать) тяжелые металлы из стоков (медь, никель, хром, свинец и др.). Такая биомасса является сырьем для получения цветных металлов.

Многие отходы сельскохозяйственного производства и пищевой промышленности можно перерабатывать в удобрение с помощью низших организмов – червей (вермикULTивирование).

4.5. Биотехнология в медицине

Биотехнологическим путем производят следующие медицинские препараты:

- *вакцины*;
- *антибиотики*;
- *витамины* (В2, В12, D; в химическом производстве витамина С имеется одна биотехнологическая стадия);
- *инсулин*;
- *гормон роста* (соматотропный гормон);
- *иммуномодуляторы*;
- *иммунодепрессанты*;
- *кровезаменители*;
- *медицинские ферменты* (стрептокиназа – растворяет тромбы в кровеносных сосудах; протеаза – очистка гнойных очагов, лечение ожогов);
- *коферменты* – это вещества, которые усиливают деятельность собственных ферментов в организме человека. Многие витамины являются коферментами. Так, рибоксин (инозин) используют для лечения сердечно-сосудистых и других заболеваний;
- *медицинские аминокислоты* – используют вместо белкового питания или спортсмены. Получают ферментативным расщеплением белка или каждую аминокислоту получают биосинтезом особым штаммом микроорганизмов;
- *подсластители* – получают на основе аминокислот. Например, аспартам в 160-200 раз слаще сахара;
- *женьшень* – настойка из корня повышает тонус человека, снижает утомляемость и др. Биотехнология позволяет получить это лекарство путем культивирования изолированных клеток;
- *биоразлагаемые полимеры* (полигидроксibuтират) – в хирургии из него формируют нити, штифты для соединения костей;
- *моноклональные антитела* – на их основе созданы диагностические препараты по определению беременности, предрасположенности к диабету, ревматоидному артриту, по установлению ряда наследственных заболеваний.
- *препараты против комаров* – созданы биопрепараты на основе микроорганизмов, которые патогенны для личинок комаров и безвредны для человека и других животных. Этими препаратами обрабатывают места размножения комаров (подвалы домов).
- *косметические токсины* – известны микроорганизмы, которые продуцируют ботулины – сильнодействующие яды паралитического действия. Их вводят в состав омолаживающих косметических средств.

4.6. Биотехнология и энергетика

Биотехнология позволяет получать источники энергии различными способами:

- *Получение биогаза из органических отходов путем метанового брожения.* Так, в Китае многие сельскохозяйственные фермы имеют установки для переработки отходов и навоза. Получаемый газ используют для отопления и приготовления пищи. Сырье для получения биогаза можно специально выращивать (зеленая масса быстрорастущих растений и деревьев, водоросли).

- *Получение водорода биофототоллизом воды.* Известны фототрофные бактерии, которые способны выделять водород под действием света. Ферменты этих бактерий наряду с водородом образуют и кислород, т.е. происходит биофототоллиз воды. Пока это направление пока еще не дало практических результатов, но является весьма перспективным.

- *Биосинтез углеводов микроорганизмами.* Например, в США для получения жидких углеводов используют микроводоросль *Botriococcus braunii*, которая под действием света накапливает до 75% углеводов от сухой массы клеток.

- *Моторное топливо.* Так, в России разрабатывается технология биоконверсии древесины в этанол, в Бразилии – сахарного тростника, в США – кукурузы. В качестве моторного топлива предложена смесь бензина со с бензином, где спирт составляет около 10% (такая смесь называется *газохол*).

4.7. Другие приложения биотехнологии

Получение растворителей. Путем анаэробного ацетонобутилового сбраживания крахмалосодержащего сырья, мелассы, молочной сыворотки можно получить смесь растворителей (60% бутанола, 30% ацетона и 5–10% этанола), а также газы – водород и диоксид углерода. Бутанол используют при производстве пластмасс, а ацетон – как растворитель.

Органические кислоты технического назначения. Техническую уксусную кислоту используют для получения каучука, пластмасс, синтетических волокон и инсектицидов. Из молочной сыворотки получают молочную кислоту, которую используют при обработке кож, а также для получения биоразлагаемого полимера полилактата. Из сахаросодержащих отходов и парафинов нефти получают лимонную кислоту, которую используют в производстве пластмасс, для очистки металлов, в составе стиральных порошков.

Красители для тканей. Например, при культивировании клеток растения вербейника краснокорневого получают ярко-красный краситель шиконин. Бактериальное выщелачивание металлов. Например, бактерия *Thiobacillus ferrooxydans* окисляет двухвалентное железо и восстанавливает двухвалентную серу. Это является основой перевода многих сульфидных минералов в раствор при бактериальном выщелачивании меди, цинка, урана, серебра.

Биоэлектроника. На основе ферментов разработаны датчики (биосенсоры) – приборы для измерения концентраций различных веществ в жидкостях и газах. Ведется создание так называемых биочипов – базового элемента для построения ЭВМ нового поколения.

5. СЫРЬЕВАЯ БАЗА БИОТЕХНОЛОГИИ

5.1. Классификация сырья и питательных субстратов

Основным компонентом питательной среды для культивирования микроорганизмов считается тот, который служит источником углерода и энергии. Такие компоненты называют субстратом, а все остальные – вспомогательными веществами.

Классификация питательных субстратов

- *Сахара* (глюкоза, сахароза, лактоза, ксилоза, крахмал, целлюлоза, ксилан). Сырьё – крахмал, сахарная свекла, молочная сыворотка, картофель, кукуруза, зерновые и другое растительное сырьё.
- *Спирты* (этанол, метанол). Сырьё – сахаристые субстраты, продукты гидролиза древесины, компоненты нефти и газа.
- *Углеводороды* (алканы). Сырьё – природный газ, нефть и газовый конденсат.
- *Азотсодержащие соединения* (сульфат аммония, фосфат аммония, аммиак, мочевины). Получают из минеральных источников сырья.
- *Субстраты неопределённого состава* (меласса, солод, гидролизаты древесины, смолы, растительные масла, животные жиры, дрожжевой экстракт, соевая мука). Сырьё – побочные продукты производства сахара, ячмень, древесина, травяная масса, растительное и животное сырьё, дрожжи, соевые бобы.

Классификация сырья

- *дорогое, пищевое* – мука кукурузная, соевая, пшеничная; крахмал, пищевой сахар, глюкоза, лактоза, растительные масла;
- *отходы пищевой промышленности* – меласса, зелёная патока, молочная сыворотка, рыбно-костная мука, гидролизаты кукурузных кофрышек, соломы, подсолнечной лузги. Они более дешёвые;
- *специально получаемое сырьё* – гидролизаты древесины и торфа, парафины нефти, метан, этанол и др.

5.2. Источники углеродного питания

Углеводные источники углерода

Легкодоступными источниками углерода считаются сахара: глюкоза, сахароза, лактоза. Далее следуют полисахариды: целлюлоза, гемицеллюлоза, крахмал, которые могут быть источниками углерода либо после превращения их в усвояемые микроорганизмами моно- и низкомолекулярные олигосахариды, либо микроорганизмы должны иметь набор ферментов, гидролизующих эти вещества. Такими микроорганизмами являются плесневые грибы родов *Aspergillus*, *Penicillium*, бактерии рода *Bacillus* и другие.

Не углеводные источники углерода

Углеводороды жидкие – 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).

Низкомолекулярные спирты: метанол и этанол – относятся к числу перспективных видов сырья. Многие дрожжи родов *Candida*, *Hansenula* и др. способны ассимилировать этанол. Дрожжи родов *Pichia*, *Candida* и другие, бактерии рода *Flavobacterium* используют в качестве единственного источника углерода метанол. Этанол используется для выращивания кормовых дрожжей, производства уксусной кислоты и многих других биопродуктов. Метиловый спирт подходит для культивирования многих видов микроорганизмов.

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

Жиры и масла изначально применяли как средство для предотвращения пенообразования в процессах ферментации. Среди растительных масел в процессах ферментации применяют подсолнечное, соевое, арахисовое, льняное, рапсовое, касторовое, кокосовое масла, иногда даже масло бобов какао.

5.3. Источники азотного питания

Биообъекты могут утилизировать как органические, так и неорганические азотсодержащие субстраты.

Многие микроорганизмы способны утилизировать источники неорганического азота: сульфат аммония (чаще всего); 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 крахмалопаточного производства, получающийся путем упаривания жидкости от замачивания («настоя») кукурузных зерен («замочная жидкость») с содержанием сухих веществ не ниже 48 %. Экстракт содержит 6,4 - 8 % общего азота, не более 24 % золы. В золу входят фосфор, калий, магний. Имеются также витамины группы В (биотин), ростовые вещества и биостимуляторы. Кукурузный экстракт используется при биосинтезе пенициллина.

Соевая мука получается при размалывании соевого зерна, а также соевого жмыха и шрота, образующихся после извлечения соевого масла. 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.

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

Мука семян льна содержит 36 % протеинов и 38 % углеводов; *арахисовая мука* содержит 45 % протеина, 5 % жира и 23 % углеводов; *рыбная мука* содержит до 65 % белков и в некоторых случаях используется в качестве компонента сред; *кровяная мука* содержит до 80 % белка, *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, ферментоллизаты, гидролизаты в высушенном виде содержат до 52 % органического азота, в основном в виде смеси аминокислот.

Мясной и рыбный пептоны используются для лабораторных питательных сред.

Так, дрожжи хорошо усваивают аммиачные соли (сульфат аммония, фосфат аммония), а также аммиак, мочевины. Некоторые грибы, вырабатывающие целлюлолитические ферменты, наиболее активны при добавлении в питательную среду органического азота (аспарагин, пептон и др.). Известно, что бактерии более требовательны к источникам азота, чем другие микроорганизмы (грибы, актиномицеты и дрожжи).

5.4. Другие виды сырья

Источники фосфорного питания. Упомянутые 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.

Побочные продукты производства

Свекловичная меласса – отход производства сахара из свеклы, богата органическими и минеральными веществами, необходимыми для развития микроорганизмов. Она содержит 45–60 % сахарозы, 0,25–2,0 % инвертного сахара, 0,2–3,0 % рафинозы, аминокислоты, органические кислоты и их соли, бетаин, минеральные вещества, а также некоторые витамины. Используется для промышленного производства лимонной кислоты, этанола и других продуктов.

Мелассная барда – отход мелассно-спиртового производства; является полноценным сырьем для производства кормовых дрожжей, не требующим добавок ростовых веществ, так как содержит достаточное количество витаминов.

Зерно-картофельная барда – отход спиртового производства. Содержание растворимых сухих веществ обычно составляет 2,5–3,0 %, в том числе

0,2–0,5 % редуцирующих веществ, имеются источники азота и микроэлементы. Применяется для получения микробного белка.

Отходы пивоварения (пивная дробина и солодовые ростки). Так, для производства кормовых дрожжей это сырье соответствующим образом гидролизуют и вводят в питательную среду в соотношении 8 : 0,2 : 0,05 (дробина : ростки : отходы ячменя).

Пшеничные отруби – отход мукомольного производства, используется для приготовления питательных сред при твердофазном способе культивирования. Имеют богатый химический состав и могут использоваться в качестве единственного компонента питательной среды. Так как пшеничные отруби являются дорогим продуктом, их смешивают с более дешевыми компонентами: древесными опилками, солодовыми ростками, фруктовыми выжимками и т.д.

Молочная сыворотка – отход производства сыров, творога и казеина. Сухой остаток молочной сыворотки содержит 70–80 % лактозы, 7–15 % белковых веществ, 2–8 % жира, 8–10 % минеральных солей, а также значительное количество гормонов, органических кислот, витаминов и микроэлементов. Так, из одной тонны молочной сыворотки можно получить около 20 кг воздушно-сухой биомассы дрожжей.

Свекловичный жом – отход сахарного производства, содержит пектины и целлюлозу (до 22 %) и до 65 % «безэкстрактивных веществ», до 9 % белков.

Гидролизаты древесины. В результате высокотемпературного кислотного гидролиза древесина превращается в гидролизаты. При этом 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 и другие 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 %).

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

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

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

Сырье имеет свои особенности:

- соевая мука вызывает вспенивание среды;
- жиры и сахара следует стерилизовать отдельно;
- кукурузный экстракт нужно кипятить с мелом для нейтрализации аминокислот и органических кислот;
- при изготовлении кровезаменителей нужно применять бидистиллированную воду.

5.5. Принципы составления рецептур питательных сред

Для составления рецептур все компоненты должны быть взяты в соотношениях, пропорциональных физиологическим потребностям микроорганизмов и с учетом предполагаемого урожая биомассы.

Питательные среды могут иметь неопределенный состав, то есть включать биогенные (растительные, животные, микробные) добавки – мясной экстракт, кукурузную муку, морские водоросли и т.д. Применяют также среды, приготовленные из чистых химических соединений в заранее определенных соотношениях – синтетические среды.

В состав практически любой питательной среды входят такие компоненты, как вода, соединения углерода, азота, фосфора и других минеральных веществ, витамины.

В питательные среды также вводят ингредиенты, которые положительно влияют на процесс ферментации (белки, аминокислоты, органические кислоты, минеральные вещества и др.).

Важными компонентами среды являются примерно 10 макроэлементов (фосфор, кальций, магний, калий и др.). В питательной среде должны быть микроэлементы (цинк, марганец, молибден, селен, медь, железо и др.). Потребность в микроэлементах возникает тогда, когда его содержит целевой продукт. Так, при биосинтезе витамина В₁₂ в состав питательной среды включают кобальт.

Кислород плохо растворим в среде. Его запасы в среде обеспечивают жизнедеятельность аэробного продуцента в течение 0,5–2 мин. Так, для аэробных микроорганизмов, которые растут в сахаросодержащих субстратах, лимит дыхания клеток наступает при концентрации кислорода 0,05–0,10 мг/л или 3–8 % от полного насыщения среды кислородом.

По мере увеличения плотности культуры содержание растворенного кислорода в культуральной жидкости падает. При уменьшении концентрации кислорода в питательной среде экспоненциальный рост задерживается, и культура медленно переходит в стационарную фазу.

Решить эту проблему простым продуванием кислорода или воздуха через среду нельзя. Для решения этой проблемы в *E. coli* ввели ген, ответственный за синтез гемоглобиноподобного вещества. В результате этого увеличивается количество кислорода в клетке и среде, возрастает эффективность протонных насосов, увеличивается количество АТФ и т.д.

Вода для приготовления питательных сред должна быть чистой, бесцветной, без привкуса, запаха и осадка. В ней должно содержаться не более (в мг/л): хлоридов – 50, сульфатов – 60; свинца – 0,2; мышьяка – 0,05; фтора – 1,5; цинка – 5,0; меди – 3,0.

Микроорганизмам необходимы витамины, аминокислоты, цитокинины и другие БАВ. Поэтому в рецептуру сред вводят кукурузный экстракт, дрожжевой автолизат, дрожжевой экстракт, гидролизат дрожжей, клеточный сок картофельных клубней, молочную сыворотку, экстракт пшеничных

отрубей, экстракт солодовых ростков, мясной или рыбный пептоны. При культивировании животных клеток – экстракт плаценты и плазму крови животных. При выращивании клеток растений или мицелия высших грибов – экстракты тыквы, листьев хлопчатника, отвар слив и др.

Так, концентрация метанола выше 1% или этанола выше 1,5–2,0% токсичны для микроорганизмов. Рост дрожжей подавляется при концентрации серебра – 10^{-6} %, меди – 10^{-3} %. Глюкоза, сахароза, фруктоза в концентрациях более 7–8 % тормозят рост большинства микроорганизмов, и должны вноситься по мере их ассимиляции.

Количество необходимых азотосодержащих веществ определяют по содержанию азота в биомассе и предполагаемого ее урожая, при этом следует учитывать, что около 5% азота остается не использованным.

В среды для выращивания клеток растений и животных вводят специфические стимуляторы роста. Для клеток растений – индолуксусная кислота, кинетин и гиббереллиновая кислота. Для клеток животных – незаменимые аминокислоты и ростовые вещества (инсулин, глюкагон, гидрокортизон, прогестерон и др.).

5.6. Оптимизация ферментационных сред

Задача специалиста, оптимизирующего состав среды для конкретного вида микроорганизма, - выбрать такие источники углерода, азота, фосфора и других веществ, которые наиболее оправданы в экономическом и экологическом отношении.

Обычно оптимизация процесса культивирования начинается с выбора питательной среды, обеспечивающей питательные потребности популяции микробов или синтез максимального количества продуктов метаболизма.

Количество компонентов, входящих в питательную среду для выращивания микроорганизмов, может превышать десяток элементов. На рост микроорганизмов влияет также взаимное соотношение компонентов.

Высоко объективным является метод балансировки состава питательной среды, в основу которого заложено использование уравнения ассимиляции микробной популяции, где учитываются такие показатели, как: концентрация потребляемого субстрата; время потребления; концентрация биомассы; коэффициент метаболизма; константы скорости образования и отмирания микроорганизмов; концентрация субстрата в начальный момент культивирования.

6. ПОДГОТОВИТЕЛЬНЫЕ И ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ СТАДИИ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДСТВ

6.1. Общая характеристика подготовительных стадий

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. Посевной материал – это предварительно выращенное малое по сравнению с основной стадией количество биологического агента. Для проведения микробиологического процесса или процесса культивирования изолированных клеток растений или животных необходимо его подготовить.

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.

6.2. Основы приготовления питательных сред

Основу питательных сред для культивирования микроорганизмов составляют источники углерода. Кроме углерода клетки микроорганизмов в процессе роста испытывают потребность в азоте, фосфоре, макро- и микроэлементах. Все вещества этого рода находятся в питательных средах в виде солей, исключение составляют среды, где азот и фосфор могут усваиваться растущими культурами из органических источников, например, аутолизатов или гидролизатов микробного или животного происхождения.

Отделение приготовления питательной среды представляет собой цех, оборудованный емкостями для хранения жидких и твердых веществ,

средствами их транспортировки и аппаратами с перемешивающими устройствами для приготовления растворов, суспензий или эмульсий. При этом питательные соли хранятся обычно в твердом виде, а приготовление их смеси с заданным соотношением компонентов производится в аппарате с мешалкой, куда подаются твердые компоненты в необходимом количестве и далее происходит их растворение. Иногда соединяются и перемешиваются заранее приготовленные растворы. Жидкие и твердые источники углерода обычно вводят в уже готовую питательную среду непосредственно перед ферментацией, так как это устраняет опасность заражения посторонней микрофлорой, вероятность которого возрастает при хранении готовой питательной смеси.

При непрерывном культивировании в производстве микробного белка углеводороды и растворы солей вводят в ферментер отдельно по индивидуальным линиям, а смешение и эмульгирование нерастворимых в воде п-алканов происходит уже в самом биореакторе. При культивировании бактерий на метане последний постоянно барботируют в аппарат через специальные устройства.

При периодической ферментации в начале процесса инокулят вносится в уже готовую питательную среду, содержащую все компоненты. Поэтому источники углерода вводят непосредственно перед засевом или отдельные компоненты среды вводят по мере потребления их культурой, поддерживая в ферментере некоторую оптимальную их концентрацию, которая на разных этапах ферментации может меняться по определенному закону.

6.3. Получение и подготовка посевного материала

Посевным материалом (инокулятом) называют чистую культуру микроорганизма, которую получают путем ее последовательного пересева из пробирки в колбу, а затем в аппараты увеличивающегося объема до количества, необходимого для промышленного производства. Сначала чистую культуру размножают в лаборатории, затем в цехе чистых культур и инокуляции, далее направляют на культивирование.

Приготовление посевного материала состоит из следующих стадий:

1. Получение культуры микроорганизма в микробиологической лаборатории завода.
2. Выращивание микроорганизмов в малом посевном аппарате.
3. Выращивание микроорганизмов в большом посевном аппарате.
4. Накопление культуры микроорганизмов в малом ферментере.

Передачу чистых культур из одного аппарата в другой осуществляют в конце логарифмической фазы роста. Качество полученного посевного материала контролируют путем микроскопирования.

В биотехнологии широко применяются плесневые грибы, дрожжи, актиномицеты, бактерии и водоросли в виде чистых и смешанных культур. В традиционных процессах ферментации предпочтение обычно отдается

смешанным культурам, а в большинстве современных ферментационных процессов – монокультурам (чистым культурам), выращиваемых в асептических условиях. Поддержание чистой культуры штамма-продуцента – ключевая задача любого биотехнологического производства.

Культуры микроорганизмов-продуцентов заводы получают из коллекций в пробирках на агаризованных питательных средах или в ампулах. Чистая культура микроорганизма может постоянно или по мере необходимости использоваться в производстве. При длительном хранении чистых культур могут происходить случайные нерегулируемые мутации. Для избежания мутаций следует не только соблюдать правила хранения и поддержания исходной культуры, но и периодически проводить пересев культуры и проверку ее однородности как по морфологическим, так и по физиологическим признакам.

6.4. Стерилизация питательных сред, оборудования и воздуха

Асептика – это комплекс мероприятий, направленных на предотвращение попадания в среду или на объект посторонних микроорганизмов.

Необходимость обеспечения асептических условий в биотехнологических процессах обусловлена следующими факторами:

- посторонние микроорганизмы-контаминанты потребляют компоненты питательных веществ и при этом выделяют метаболиты, тормозящие рост основной культуры;
- развитие контаминантов неконтролируемо влияет на условия режима роста и развития основной культуры;
- наличие в культуральной жидкости посторонней микрофлоры и продуктов ее жизнедеятельности затрудняет выделение целевого продукта и снижает его качество.

Стерилизация всех компонентов биотехнологического процесса, сопрягающимися с чистыми культурами микроорганизмов – важнейший этап биотехнологического производства.

Методы, применяемые для исключения попадания в культуру посторонней микрофлоры, основаны на задержке или уничтожении микроорганизмов. Добиться требуемой чистоты вещества возможно установкой физической преграды для микроорганизмов (фильтры) или уничтожив их до подачи в стерильный объект.

К способам, основанным на принципе задержки микроорганизмов, относят стерилизующую фильтрацию воздуха и жидкостей и герметизацию технологического оборудования и коммуникаций. Эти способы по своей сути являются физическими.

К способам стерилизации, основанным на уничтожении микроорганизмов, относят термическую, химическую и радиационную стерилизацию, которые применяют для обеззараживания оборудования, коммуникаций, питательных сред и технологических растворов.

Методы стерилизации

В качестве стерилизующего агента при *термической стерилизации*

обычно используют водяной пар, подаваемый под различным давлением и температурой. Так, пустые аппараты и коммуникации чаще всего стерилизуют насыщенным водяным паром; питательные среды и другие жидкости – путем нагревания под давлением, в ряде случаев применяют горячий воздух (сухой жар). Сухой горячий воздух используют для стерилизации материалов и предметов, которые могут быть испорчены при обработке паром (безводные жиры, масла, порошки, предметы, подверженные коррозии, и т.п.).

Химическую стерилизацию применяют для тех элементов оборудования, которые не выдерживают нагревания до 110–130° С (например, датчики, фильтры воздуха и т.п.).

В качестве агентов *химической стерилизации* используют формальдегид, оксид этилена, перекись водорода, щелочи, спирты, кислоты, β-пропиониллактон.

Радикационная стерилизация вызывает гибель микроорганизмов за счет воздействия ионизирующего излучения. В силу многих технических причин этот способ пока не нашел широкого применения в микробиологической промышленности.

Способ *стерилизующей фильтрации* обеспечивает полное или частичное задержание микроорганизмов. Он широко применяется для очистки газов (аэрирующего воздуха) и жидкостей (главным образом, на конечных стадиях производства фармацевтических препаратов).

Очистка и стерилизация воздуха

Важным технологическим процессом в биологических производствах является очистка от механических включений и стерилизация воздуха, используемого для вентиляции цехов и боксов, передачи под давлением стерильных культуральных жидкостей и растворов, поддержания избыточного давления в стерильных емкостях. В значительных количествах стерильный воздух используется для аэрации процесса культивирования.

Для стерилизации газовых потоков используют процесс фильтрации через специальные волокнистые фильтры с последовательно расположенными фильтрующими элементами. Фильтрующий материал периодически стерилизуется подачей острого пара в отключенный фильтр через заданные промежутки времени.

Эффективность работы фильтров для стерилизации воздуха определяется следующими факторами:

- эффективность и механическая прочность фильтрующего материала;
- герметичность крепления фильтрующего материала в корпусе фильтра;
- удобство и быстрота перезарядки фильтра.

По конструкции фильтры для стерилизации воздуха делятся на две группы:

1. Фильтры глубинного типа с применением волокнистых фильтрующих материалов.
2. Фильтры с отдельными фильтрующими элементами.

Ряд субстратов не требует стерилизации, так как они сами обладают асептическим действием; сюда относят метанол, этанол, концентрированная уксусная кислота и др. В этом случае ограничиваются стерилизацией прочих элементов питательной среды.

6.5. Очистка отработанного воздуха

Отводимый из лабораторных и производственных помещений отработанный воздух также должен подвергаться очистке от присутствующих в нем микроорганизмов и контролироваться на чистоту.

Например, на гидролизно-дрожжевом заводе, при обследовании воздуха, выбрасываемого из ферментера, было выявлено от $16 \cdot 10^3$ до $316 \cdot 10^3$ клеток микроорганизмов на m^2 , а на заводе по производству белково-витаминных концентратов – $(200-436) \cdot 10^3$ клеток на $1 m^3$.

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

Одним из важнейших мероприятий, снижающих выброс микроорганизмов в окружающую среду, является герметизация ферментеров, флотаторов и оборудования узла сепарации. На ряде предприятий дрожжевого профиля высокоэффективная очистка отработанного воздуха из ферментаторов, флотаторов, узла, сушильных установок и упаковочного отделения осуществляется с помощью скрубберов Вентури. Он состоит из трубы Вентури (турбулентный промыватель), предназначенной для коагулирования мелких твердых частиц, инерционного аппарата и центробежного скруббера для отделения газа и укрупненных частиц и капелек жидкости. Запыленный газ подается вентилятором в трубу Вентури и смешивается с водой. Скоагулированные частицы пыли с мелкими капельками воды и газа поступают в инерционный аппарат, где газ частично отделяется от жидкости. Окончательное отделение жидкости от газа осуществляется в центробежном скруббере. Очищенный газ выбрасывается в атмосферу, а вода с твердыми частицами выводится из инерционного аппарата и скруббера в сборник. Вода из сборника многократно используется для орошения трубы Вентури и может направляться в производство с целью утилизации уловленных частиц.

Представляет интерес мокрое улавливание пылевидных частиц концентрата лизина, уносимых с газом из циклонов распылительной сушилки. В этом случае потери лизина на стадии сушки сводятся к минимуму в связи с хорошей растворимостью лизина в воде и возвратом его в производство в концентрированном виде с последующей сушкой на предприятиях, со сравнительно небольшими объемами загрязненных воздушных выбросов. Очистку воздуха до чистого или стерильного состояния можно осуществлять с помощью фильтров грубой и тонкой очистки или путем сжигания. В ряде случаев снижения вредных выбросов в атмосферу можно достичь путем совершенствования технологии.

7. СОБСТВЕННО-БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ СТАДИЯ

7.1. Способы получения целевого продукта на биотехнологической стадии

Продукты биотехнологии получают по индивидуальным технологиям со своими биологическими агентами, сырьем, числом стадий производства и их технологическими режимами.

Обобщенная типовая схема биотехнологических производств представлена на рисунке 1.



Рисунок 1. – Типовая схема, основные стадии и реализующие их технологические процессы в биотехнологических производствах

Основной стадией является собственно биотехнологическая стадия. На этой стадии с помощью биологического агента (микроорганизмов, изолированных клеток, ферментов или клеточных органелл) сырье преобразуется в тот или иной целевой продукт.

Биотехнологическая стадия включает в себя следующие процессы:

1. **Ферментация** – процесс, осуществляемый с помощью культивирования микроорганизмов.

2. **Биотрансформация.**
3. **Биокатализ** – химические превращения вещества, которые протекают с использованием биокатализаторов – ферментов.
4. **Биоокисление** – потребление загрязняющих веществ с помощью микроорганизмов в аэробных условиях.
5. **Метановое брожение** – переработка органических отходов с помощью ассоциации метаногенных микроорганизмов в анаэробных условиях.
6. **Биокомпостирование** – снижение содержания вредных органических веществ микроорганизмами в твердых отходах, которым придана специальная взрыхленная структура для обеспечения доступа воздуха и равномерного увлажнения.
7. **Биосорбция** – сорбция вредных примесей из газов или жидкостей микроорганизмами, обычно закрепленными на специальных твердых носителях.
8. **Бактериальное выщелачивание.**
9. **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. Если процесс протекает в твердой фазе (например, созревание сыра или биокомпостирование отходов), выходом является поток переработанного твердого продукта.

7.2. Стадии роста микроорганизмов

Микроорганизмы, попав в свежую полноценную питательную среду, начинают размножаться не сразу. Этот период называют лаг-фазой – **I фаза** (рисунок). В этот период культура как бы привыкает к новым условиям обитания. Активируются ферментные системы, если необходимо, синтезируются новые ферментные системы, клетка готовится к синтезу нуклеиновых кислот и других соединений. Продолжительность этой фазы зависит от физиологических особенностей микроорганизмов, состава питательной среды и условий культивирования. Чем эти различия меньше и чем больше посевного материала, тем короче эта фаза.

II фаза называется фазой ускоренного роста, она характеризуется началом деления клеток, увеличением общей массы популяции и постоянным увеличением скорости роста культуры; обычно она непродолжительна.

Затем следует логарифмическая, или экспоненциальная фаза роста – **III фаза**. В этот период отмечается максимальная скорость роста культуры, интервалы между появлением предыдущего и последующего поколения постоянны. Логарифм числа клеток линейно зависит от времени.

Вследствие интенсивного роста и размножения культуры запас необходимых питательных веществ в среде уменьшается. Это является основной причиной снижения скорости роста культуры. Кроме того, в среде накапливаются продукты метаболизма, которые в определенной концентрации могут мешать

нормальному протеканию биохимических процессов обмена веществ. Иногда в питательной среде образуется так много клеток, что для новых поколений клеток не хватает пространства, а точнее, поверхности. Скорость роста снижается, уменьшается число делений клеток, наступает **IV фаза** – фаза замедления или уменьшения скорости роста.

Кривая роста микроорганизмов (зависимость количества клеток от времени культивирования) представлена на рисунке 2.

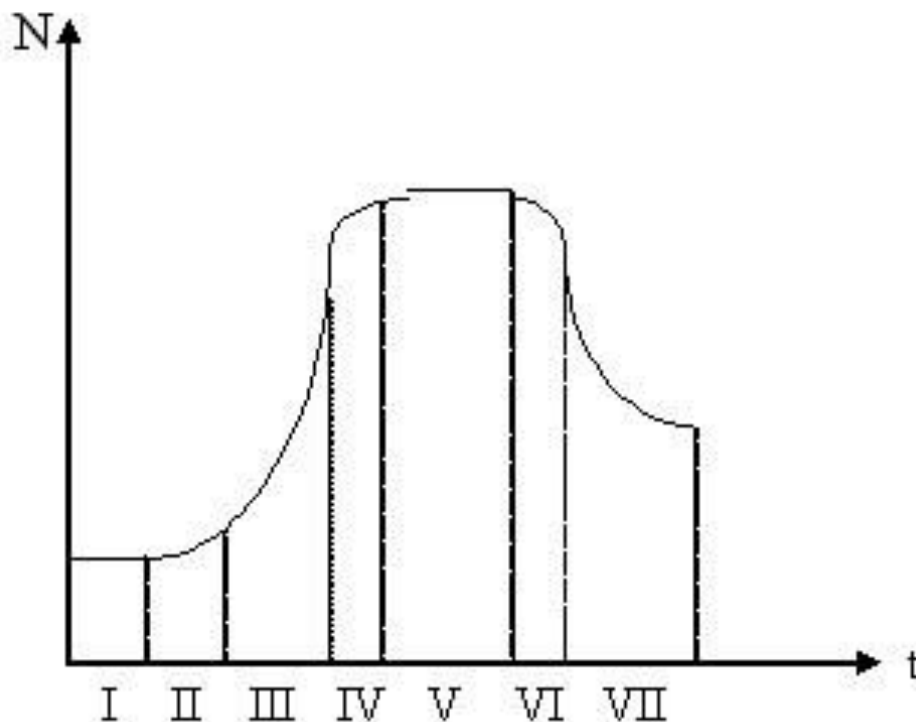


Рисунок 2. – Кривая роста микроорганизмов (зависимость количества клеток от времени культивирования): I, II, III, IV, V, VI, VII – фазы роста

V фаза называется стационарной (фазой линейного роста). Масса и количество всех живых клеток достигает максимума. Количество вновь образовавшихся клеток на этом этапе равно количеству клеток, отмерших и автолизированных (разрушенных клеточными ферментами).

В какой-то момент это равновесие нарушается и количество отмерших клеток превышает прирост. Наступает **VI фаза** – фаза ускорения отмирания.

Завершается цикл роста и развития популяции в замкнутом объеме **VII фазой**, характеризующейся отмиранием и автолизом микроорганизмов, которая называется фазой отмирания. На этой стадии биомасса клеток значительно уменьшается, так как запасные вещества клетки исчерпываются.

Для выращивания любой культуры необходимы **условия**: 1) жизнеспособный посевной материал; 2) источники энергии и углерода; 3) питательные вещества для синтеза биомассы; 4) отсутствие ингибиторов роста; 5) соответствующие физико-химические условия (температура, pH среды, наличие или отсутствие кислорода и др.). Если все эти требования выполнены, то скорость

роста (увеличения биомассы) одноклеточных микроорганизмов с бинарным делением, размножающихся в условиях хорошо перемешиваемой периодической культуры, будет пропорциональна концентрации микробной массы.

Если концентрация микробной массы является постоянной величиной, то такой рост культуры микроорганизмов называют экспоненциальным или логарифмическим. Он имеет место тогда, когда состав микробной биомассы и условия окружающей среды остаются постоянными. Это относится и к смешанным культурам, в которых одноклеточные организмы равномерно распределены в культуральной среде.

7.3. Классификация процессов ферментации

Ферментация (культивирование) – это вся совокупность последовательных операций от внесения в заранее приготовленную и термостатированную питательную среду посевного материала (инокулята) до завершения процессов роста и биосинтеза вследствие истощения питательных веществ среды.

Известно множество процессов культивирования микроорганизмов. Они различаются следующим образом.

1) По признаку целевого продукта процесса ферментация может быть следующих типов:

- ферментация, в которой целевым продуктом является сама биомасса микроорганизмов; такие процессы часто обозначают словами «культивирование», «выращивание»;
- целевым продуктом является не сама биомасса, а продукты метаболизма – внеклеточные или внутриклеточные; такие процессы называют процессами биосинтеза;
- задачей ферментации является утилизация определенных компонентов исходной среды; к таким процессам относятся биоокисление, метановое брожение, биокомпостирование и биodeградация.

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

- поверхностная (твердофазная) ферментация – культивирование на агаровых средах, на зерне, производство сыра и колбас, биокомпостирование и др.;

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

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

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

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

5) 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.

6) 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.

7) По способу организации процессы ферментации могут быть: периодические; непрерывные; многоциклические; отъемно-доливные; периодические с подпиткой субстрата; полунепрерывные с подпиткой субстрата.

В *периодических процессах* загрузка сырья и посевного материала в аппарат производится одновременно, затем в аппарате в течение определенного времени идет процесс, а после его завершения полученная ферментационная жидкость выгружается из аппарата.

В *непрерывных процессах* загрузка и выгрузка среды протекают непрерывно и одновременно, причем скорость подачи в аппарат свежей питательной среды равна скорости отбора из аппарата ферментационной жидкости. В итоге объем среды в аппарате сохраняется постоянным в течение длительного времени.

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. 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. В сравнении с многоциклическим 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.

В *периодическом процессе с подпиткой субстрата* часть среды загружается в начале ферментации, а другая часть добавляется непрерывно по мере протекания процесса. 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 отъемнодоливных и подпиточных. В таком 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; процесс при этом протекает значительно интенсивнее.

7.4. Основные характеристики процесса ферментации

Характеристики процесса ферментации отражают скорость протекания биохимических превращений во времени.

1. Показатели роста биомассы. Скорость роста биомассы – важный показатель процесса ферментации. Вид кривой роста очень похож для различных микроорганизмов, однако 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.

Большой интерес для характеристики интенсивности роста представляет *удельная скорость роста μ* (*коэффициент скорости роста*) в пересчете на единицу биомассы (так как рост биомассы пропорционален концентрации клеток).

Микробиологи предпочитают другой параметр – *время генерации g* – время, за которое биомасса культуры удваивается.

2. Скорость потребления субстрата. Поскольку субстрат потребляется, его концентрация с течением времени падает, и, в конце концов, недостаток субстрата начинает тормозить дальнейший рост клеток микроорганизмов.

3. Биосинтез продуктов метаболизма. В некоторых процессах наряду с ростом биомассы происходит накопление в среде продукта метаболизма, который выводится из зоны биотехнологического производства.

8. ПОСТФЕРМЕНТАЦИОННЫЕ СТАДИИ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДСТВ

8.1. Отделение биомассы от культуральной жидкости

Ассортимент продуктов, получаемых в биотехнологических процессах, чрезвычайно широк. По разнообразию и объемам производства на первом месте стоят продукты, получаемые в процессах, основанных на жизнедеятельности микроорганизмов. Эти продукты подразделяются на три основные группы:

1 группа – биомасса, которая является целевым продуктом (белок одноклеточных) или используется в качестве биологического агента (биометаногенез, бактериальное выщелачивание металлов);

2 группа – первичные метаболиты – это низкомолекулярные соединения, необходимые для роста микроорганизмов в качестве строительных блоков

макромолекул, ко-ферментов (аминокислоты, витамины, органические кислоты);

3 группа – вторичные метаболиты (идиолиты) – это соединения, не требующиеся для роста микроорганизмов и не связанные с их ростом (антибиотики, алкалоиды, гормоны роста и токсины).

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 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.

8.2. Дезинтеграция клеток

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.

Ферментализ – разрушение клеточных оболочек под действием ферментов при повышенной температуре.

Автолиз – разновидность ферментализа, когда используют собственные ферменты клетки.

8.3. Выделение продуктов метаболизма и синтеза

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.

8.4. Очистка продукта

На стадии выделения продукта главная задача – отделить основную часть продукта. Получается как бы неочищенный продукт. Поэтому, когда необходимо получать биопродукты тонкой очистки, 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 ферментализ.*

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 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.

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

8.5. Концентрирование продукта

После очистки продукта он часто находится в растворе с небольшими концентрациями примесей. Дальнейшая задача – обеспечить его концентрирование.

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.

8.6. 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), *дражжирования, таблетирования* (формирование драже, таблеток), *розлива* или *фасовки, ампулирования* (затаривания в ампулы).

9. АППАРАТЫ В БИОТЕХНОЛОГИИ И ПРОЦЕССЫ, ПРОТЕКАЮЩИЕ В НИХ

9.1. Биореакторы и процессы в них

Для большинства ферментативных биотехнологических процессов необходимы **ферменторы** или **биореакторы**, которые обеспечивают необходимые физические условия, способствующие наилучшему взаимодействию катализатора со средой и поставляемым материалом.

Биореакторы варьируют от простых сосудов до весьма сложных систем с различным уровнем компьютерного оснащения. Биореакторы изготавливаются в двух вариантах или типах.

Первый тип для нестерильных систем, когда нет абсолютной необходимости оперировать с чистыми культурами микроорганизмов (например, ферментация при пивоварении, производство пекарских дрожжей и т. п.).

Биореакторы **второго типа** предназначены для асептических процессов, обычно используемых в производстве таких соединений как, антибиотики, аминокислоты, полисахариды и одноклеточный бактериальный белок. В реакторах такого типа все посторонние микроорганизмы должны быть исключены, что, естественно, связано со значительными сложностями при их конструировании и разработке самого биотехнологического процесса.

Основное требование к биореакторам любого типа сводится к обеспечению оптимальных условий роста продуцента или накоплению синтезируемого им продукта. Для достижения указанных целей необходимо разрабатывать технологию, призванную оптимизировать процесс, а именно: использовать подходящий источник энергии, набор питательных веществ должен соответствовать питательным потребностям организма-продуцента, из ростовой среды должны быть удалены соединения, ингибирующие его жизнедеятельность, должна быть подобрана соответствующая посевная доза и, наконец, обеспечены все остальные требуемые физико-химические условия. Экономически рентабельные процессы в своей основе весьма сходны, независимо от избранного продуцента, используемой среды и образуемого продукта. Главная задача – получение максимального количества клеток с одинаковыми свойствами при их выращивании в определенных тщательно контролируемых условиях. Фактически один и тот же биореактор (лишь с небольшими изменениями) может быть использован для производства ферментов, антибиотиков, органических кислот или одноклеточного белка.

Биотехнологические процессы принципиально отличаются от процессов химического синтеза и могут быть двух типов: **периодическими** и **непрерывными**.

Специфика биотехнологических процессов состоит в том, что в них участвуют живые клетки, субклеточные структуры или выделенные из клеток ферменты и их комплексы. Это оказывает довольно существенное влияние на процессы массопередачи (обмена веществ между различными фазами – перенос кислорода из газообразной фазы в жидкую) и теплообмена (перераспределение тепловой энергии между взаимодействующими фазами). Поэтому одним из важнейших **компонентов биореакторов** является **система перемешивания**, обеспечивающая однородность условий в аппарате, оптимальность массопередачи между фазами реактора, между культуральной жидкостью и клетками и т.д. Другим существенным различием между биотехнологическими и химическими процессами является необходимость **создания аэробных или анаэробных условий**, требуемых для культивирования соответствующего организма. Поэтому в определенных случаях необходимо подавать кислород и удалять образующиеся газообразные продукты иного рода, в первую очередь двуокись углерода (CO_2). **Системы аэрации** зачастую бывают очень сложной

конструкции, поскольку они должны обеспечить баланс между расходом O_2 и его поступлением в нужных количествах, учитывая тот факт, что потребность в кислороде не одинакова на различных стадиях культивирования. Крайне важным является обеспечение должного уровня **теплообмена** в биореакторах, поскольку жизнедеятельность и метаболическая активность объектов зависит в значительной степени от колебаний температуры.

Поддержание температуры в определенном узком диапазоне диктуется: 1) резким снижением активности ферментов по мере падения температуры и 2) необратимой инактивацией (денатурацией) макромолекул (в первую очередь белков) при ее повышении до критических значений. Температурный оптимум у каждого организма лежит в определенных пределах.

Большинство биотехнологических процессов осуществляется в мезофильных условиях (30–50 °C). С одной стороны, это имеет преимущество, потому что лишь в редких случаях приходится обеспечивать повышенный подогрев реакторов. Однако, с другой стороны, возникает проблема удаления избыточного тепла, выделяющегося при интенсивном росте культивируемых клеток, поэтому биореактор должен быть оснащен эффективной **системой охлаждения**. Еще одной серьезной проблемой при культивировании в биореакторах является **пенообразование**, связанное с необходимостью аэрирования содержимого, в котором постоянно присутствуют поверхностно-активные вещества (ПАВ) продукты распада жиров (мыла) и белки (составные компоненты субстрата, например, белки соевой и кукурузной муки и т.п.). Образующийся слой пены опять же, с одной стороны, способствует росту аэробных микроорганизмов, а с другой – сокращает полезный объем реактора и способствует заражению культуры посторонней микрофлорой. Это заставляет интенсивно разрабатывать эффективные системы пеногашения. Специфическим элементом биореактора является система, обеспечивающая **стерильность** процесса. Стерилизация осуществляется на разных этапах процесса, как до его начала, так и при осуществлении, и после окончания.

В последнее время в биотехнологию внедряется принцип **дифференцирования режимов культивирования**: разные этапы одного итого же процесса осуществляются при различных условиях – температура, pH, аэрация и т.п. Естественно, это создает новые (дополнительные) требования при конструировании реакторов. Таким образом, в соответствии с основными принципами реализации биотехнологических процессов **современные биореакторы должны обладать следующими системами**:

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

Биотехнологически ценные продукты синтезируются как в экспоненциальной фазе (нуклеотиды, многие ферменты, витамины – так называемые первичные метаболиты), так и в стационарной фазе роста (антибиотики, пигменты и т.п. так называемые вторичные метаболиты). Довольно широко в биотехнологии используется периодическое культивирование с подпиткой, при котором, помимо первичного внесения питательного субстрата до засева культуры, в процессе культивирования в аппарат через определенные интервалы добавляют питательные вещества либо порциями, либо непрерывно «по каплям». Существует также отъемно-доливочное культивирование, когда часть содержимого биореактора периодически изымается и добавляется равное количество питательной среды. Такой прием обеспечивает регулярное «омолаживание» (обновление) культуры и задерживает (отдаляет) ее переход в фазу отмирания. Этот прием иногда называется **полу непрерывным культивированием**.

Модификацией периодического культивирования является культивирование с диализом, при котором питательный субстрат постоянно поступает в реактор через специальную мембрану. Диализ ведет к снижению концентрации продуктов жизнедеятельности клеток, неблагоприятно влияющих на их жизнеспособность. Помимо этого, диализ удаляет из культуры часть жидкости, что позволяет получать в конце процесса концентрированную биомассу. В непрерывных процессах культивирования клетки постоянно поддерживаются в экспоненциальной фазе роста. С этой целью в биореактор непрерывно подается свежая питательная среда и обеспечивается отток из него культуральной жидкости, содержащей клетки и продукты их жизнедеятельности. Основным принципом непрерывных процессов (как уже отмечалось выше) является точное соблюдение равновесия между приростом биомассы вследствие деления клеток и их убылью в результате разбавления содержимого свежей средой. **Различают хеостатный и турбидостатный режимы** непрерывного культивирования.

При **хеостатном режиме** культивирования саморегулируемая система возникает в силу следующих причин: если первоначальное поступление свежей питательной среды и вымывание биомассы превышает скорость деления клеток, то в результате разбавления культуры снижается концентрация веществ, ограничивающих ростовые процессы и скорость роста культуры повышается; увеличивающаяся популяция начинает активнее "выедать" субстрат, что в свою очередь приводит к торможению роста культуры. Конечным итогом этих процессов является (после серии затухающих колебаний) установление равновесия между скоростью роста культуры и ее разбавлением. Биореактор, работающий в хеостатном режиме культивирования, называют **хеостатом**. Его конструкция предусматривает наличие: 1) приспособления для подачи питательной среды; 2) устройства, обеспечивающего отток культуральной жидкости вместе с клетками, и 3) системы, контролирующей концентрацию элементов питательной среды и управляющей скоростью подачи питательной

среды. Последнее является наиболее важным и наиболее сложно осуществимым устройством.

Турбидостатный режим культивирования базируется на прямом контроле концентрации биомассы. Наиболее распространенным методом ее определения является измерение светорассеивания с помощью фотоэлементов. Повышение концентрации клеток и соответственно оптической плотности автоматически ускоряет проток жидкости и наоборот. По своей конструкции **турбидостаты** отличаются от хемостатов лишь системами контроля скорости потока. Хемостаты применяются в процессах, характеризующихся малым протоком, когда концентрация клеток изменяется незначительно с изменением скорости потока, что облегчает саморегулировку системы. Область использования турбидостатов – высокие скорости разбавления, обуславливающие быстрое и резкое изменение концентрации биомассы. С технической точки зрения турбидостат может применяться только для культивирования одноклеточных микроорганизмов. При длительном культивировании в турбидостате возникает довольно серьезная проблема, связанная с прилипанием клеток к фотоэлементу. Однако имеются и определенные преимущества. Так, например, если засеивается смешанная культура, то в турбидостате автоматически отбирается более быстро растущий вид, что может использоваться для предохранения от массивного заражения посторонней микрофлорой (если, конечно, она растет медленнее) и селекции определенных форм.

Непрерывное культивирование в одном биореакторе называется **одностадийным**. **Многостадийное** выращивание предусматривает последовательное или каскадное расположение биореакторов, позволяющее обеспечивать внедрение принципа дифференцированных режимов в непрерывные биотехнологические процессы, основанные на создании системы биореакторов.

При разработке новых биотехнологических процессов сначала прибегают к периодическому культивированию. На непрерывный режим пока еще переведено небольшое число процессов, однако перспективность его не вызывает сомнений, несмотря на более сложные конструкции аппаратов и систем контроля (иными словами, на более солидные капиталовложения). Конечно, и периодическое культивирование еще не исчерпало своих возможностей. Пока что выбор режима (периодическое или непрерывное культивирование) подчиняется (да и будет подчиняться в дальнейшем) соображениям экономической целесообразности.

10. СПИСОК

ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Каменская, Е.П. Основы биотехнологии : учебное пособие для студентов направления 19.03.02 «Продукты питания из растительного сырья» и 19.03.01 «Биотехнология» всех форм обучения / Е.П. Каменская, В.П. Вистовская ; Алт. гос. техн. ун-т им. И.И. Ползунова. – Барнаул: АлтГТУ, 2023. – 121 с.
2. Основы биотехнологии: краткий курс лекций для студентов III курса направления подготовки 19.03.01 Биотехнология / Сост.: Е.А. Фауст // ФГБОУ ВО «Саратовский ГАУ». – Саратов, 2015. – 52 с.
3. Евтушенков, А.Н. Введение в биотехнологию: Курс лекций / А.Н. Евтушенков, Ю.К. Фомичев. – Мн.: БГУ, 2002. –105 с.
4. Елинов, Н.П. Основы биотехнологии. Для студентов институтов, аспирантов и практических работников / Н.П. Елинов. – СПб: Наука, 1995. – 600 с.

Учебное издание

ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

Курс лекций

Составитель

КОЛМАКОВ Павел Юрьевич

Технический редактор

Г.В. Разбоева

Компьютерный дизайн

Е.А. Барышева

Подписано в печать 12.07.2024. Формат 60х84 ¹/₁₆. Бумага офсетная.

Усл. печ. л. 2,67. Уч.-изд. л. 2,53. Тираж 35. Заказ 100.

Издатель и полиграфическое исполнение – учреждение образования
«Витебский государственный университет имени П.М. Машерова».

Свидетельство о государственной регистрации в качестве издателя,
изготовителя, распространителя печатных изданий
№ 1/255 от 31.03.2014.

Отпечатано на ризографе учреждения образования
«Витебский государственный университет имени П.М. Машерова».
210038, г. Витебск, Московский проспект, 33.