

# СЫРЬЕВЫЕ РЕСУРСЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

О.В.Мосин

Любое производство начинается с сырья. Общий объем биотехнологической продукции в мире измеряется в миллионах тонн в год. В микробиологической промышленности наибольшая доля сырья (более 90 %) идет на производство этанола. Производство хлебопекарных дрожжей требует 5 % расходуемого в микробиологической промышленности сырья, антибиотики — 1,7 %, органические кислоты и аминокислоты — 1,65 %.

Ферментная биотехнология является крупным потребителем крахмала, так как только одной фруктозной патоки производится свыше 3,5 млн в год. С точки зрения экономики, сырье в биотехнологических производствах, особенно в крупнотоннажных, занимает первое место в статьях расходов и составляет 40—65 % общей стоимости продукции (рис. 4.1). При тонком биосинтезе доля сырья в общей себестоимости продукции уменьшается.

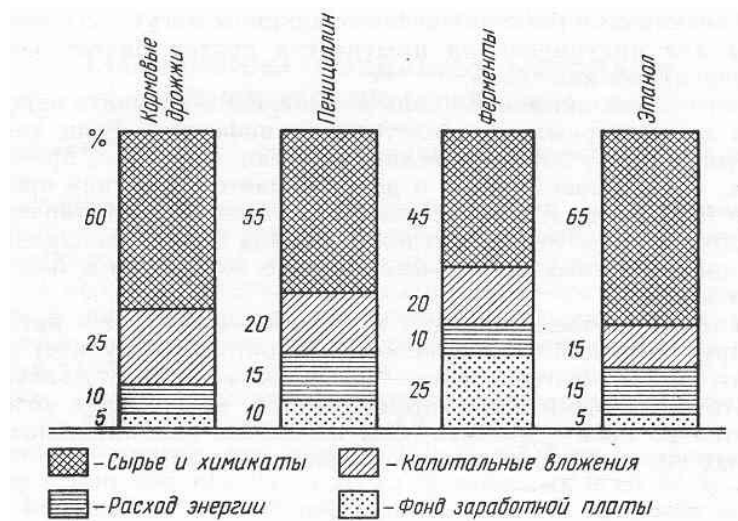


Рис. 4.1. Структура себестоимости некоторых продуктов микробного синтеза

Питательный субстрат, или питательная среда, является сложной трехфазной системой, содержащей жидкие, твердые и газообразные компоненты. Много ферментов расположено на поверхности клетки или выделяется в окружающую среду. Кроме того, значительная часть продуктов биосинтеза после экскреции из клеток накапливается в среде. Некоторые промежуточные метаболиты служат резервным питательным фондом, которым клетка пользуется после истощения основных источников питания. Существует тесное взаимодействие между культивируемым биообъектом и физико-химическими факторами среды. С одной стороны, эти факторы (рН, осмотическое давление и др.) контролируют рост клеток и биохимическую активность продуцентов. С другой стороны, химический состав и физико-химические свойства

среды постоянно меняются в результате жизнедеятельности самих клеток. Эти обстоятельства заставляют рассматривать ферментируемый субстрат как продолжение внутренней среды клетки. Во время ферментации формируется совокупность субстрата и биообъекта.

## **СЫРЬЕ ДЛЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ Сырьевые ресурсы Земли**

В принципе, микроорганизмы способны ассимилировать любое органическое соединение, поэтому потенциальными ресурсами для микробиологической биотехнологии могут служить все мировые запасы органических веществ, включая первичные и вторичные продукты фотосинтеза, а также запасы органических веществ в недрах Земли.

Но, к сожалению, каждый конкретный вид микроорганизмов, используемый в биотехнологии, весьма избирателен к питательным веществам, и органическое сырье (кроме лактозы, сахарозы и крахмала) без предварительной химической обработки малопригодно для микробного синтеза. Тем не менее целлюлозосодержащее сырье после химического или ферментативного гидролиза и очистки от ингибирующих или балластных примесей (фенол, фурфурол, оксиметилфурфурол и др.) может быть использовано в биотехнологическом производстве. Каменный уголь, природный газ и древесина могут служить сырьем для химического синтеза технических спиртов или уксусной кислоты, а последние, в свою очередь, являются отличным сырьем для микробиологической промышленности.

Из органического сырья наибольшее внимание биотехнологов привлекает крахмал, хотя для его ассимиляции микроорганизмами требуется сложный комплекс амилалитических ферментов, которым владеют только некоторые виды микроорганизмов (например, грибы рода *Aspergillus*, бактерии *Bac. subtilis* и др.)- Много крахмала расходуется для производства этанола, а также для изготовления фруктозных сиропов. Из-за того, что мировые запасы крахмалосодержащего в нашей стране ограничены, целесообразно использовать для целей биотехнологии мелассу, глюкозное сырье, метанол и этанол.

При выборе сырья учитывают не только физиологические потребности выбранного продуцента, но и стоимость сырья (табл. 1).

Таблица 1. Стоимость основного микробиологического сырья

Сырье	Содержание углерода, % от содержания в глюкозе	Стоимость 1 т глюкозного эквивалента, доллары
Кукурузный крахмал	100	64—91
Глюкоза	100	290 133
Сахароза-сырец	105	629 140
Сахароза рафинированная	105	550
Меласса	50	
Уксусная кислота	100	
Метанол	94	160
Этанол	130	430
Метан	180	105
Кукурузное масло-сырец	200	300
Пальмовое масло	200	
Парафины	218	

## Традиционные источники углерода

Углеродсодержащее сырье является основным сырьем микробного синтеза. Наиболее широко применяемые в производственных условиях источники углерода перечислены в табл. 2. Большинство микроорганизмов хорошо ассимилирует углеводы. При катаболизме большое значение имеют строение углеродного скелета молекул (прямой, разветвленный или циклический) и степень окисления углеродных атомов. Легкодоступными считаются сахара, особенно гексозы, за ними следуют многоатомные спирты (глицерин, маннит и др.) и карбоновые кислоты.

До недавнего времени существовало мнение, что органические кислоты малодоступны для большинства микроорганизмов, однако на практике довольно часто встречаются микроорганизмы, успешно утилизирующие органические кислоты, особенно в анаэробных условиях.

Низкомолекулярные спирты (метанол, этанол) можно отнести к числу перспективных видов микробиологического сырья, так как их ресурсы существенно увеличиваются благодаря успешному развитию технологии химического синтеза. Многие дрожжи родов *Candida*, *Hansenula*, *Rhodospiridium*, *Endomycopsis* и др. способны ассимилировать этанол. Дрожжи родов *Pichia*, *Candida*, *Torulopsis* и др. и бактерии, принадлежащие родам *Methylobionas*, *Protaminobacter*, *Flavobacterium* и др., используют в качестве единственного источника углерода метанол и образуют биомассу с высоким содержанием белков (60—70%).

В 1939 г. В. О. Таусоном была установлена способность разных видов микроорганизмов использовать в качестве единственного источника углерода и энергии *n*-алканы и некоторые фракции нефти. Отличительной особенностью углеводородов по сравнению с другими видами микробиологического сырья является низкая растворимость в воде. Этим объясняется тот факт, что только некоторые виды микроорганизмов в природе способны ассимилировать углеводороды. Максимальная растворимость *n*-алканов в воде около 60 мл/л при длине молекул от C<sub>2</sub> до C<sub>4</sub>, но при увеличении цепи растворимость снижается.

**Таблица 2. Источники углерода, применяемые для микробного синтеза**

Субстрат	Содержание основного вещества	Характеристика
Кристаллическая глюкоза	99,5 %	Содержит до 9 % воды, до 0,07 % зольных веществ, в том числе железа не более 0,004 % Влажность до 0,15 %, зольных веществ не более 0,03 % Влажность до 3 %, зольных веществ не более 2 % и 1 % молочной кислоты Сиропобразная жидкость, РВ представлены главным образом глюкозой, зольных веществ до 7 %, рН 4,0 Зольных веществ Q.-35—1,2 % в пересчете на СВ ( Содержит формальдегид и до 1,0 % муравьиной кислоты Содержит до 0,21 % изопропилового спирта и до 15 мг/л органических кислот Содержит до 0,5 % ароматических углеводов и до 0,5 % серы
Техническая сахароза	Сахарозы не менее 99,75 %	
Техническая лактоза	Лактозы не менее 92%	
Гидрол	РВ не менее 70 % в пересчете на СВ	
Крахмал Уксусная кислота	СВ не менее 80 %	
Спирт этиловый синтетический	Уксусной кислоты не менее 60 % Этанол не менее 92%	
Узкая фракция жидкого парафина	н-Алканов 87—93 %	

## Побочные продукты производства

Многие ценные виды побочной продукции раньше считались отходами производства. В канализацию спускали воду после замачивания кукурузных зерен при их переработке в крахмал и глюкозу. Теперь эту воду упаривают, получая экстракт, и используют в микробиологической промышленности. Успешно используют отходы химического производства (смесь карбоновых кислот — янтарной, кетоглутаровой, адипиновой) и др.; сульфитный щелок, зерновую и картофельную барду, мелассу, гидрол и т. д.

Таблица 3. Химический состав свекловичной мелассы

Наименование	Содержание, %		Наименование	Содержание, %	
	среднее	оптимальное для дрожжей		среднее	оптимальное для дрожжей
Сухое вещество	75—77	—	Зольность	6,6 — 7,5	7
Сахароза	45	—	в том числе:		
Инвертный сахар	0,5 — 1,2	—	К <sub>2</sub> O	2,5—3,5	3,5
Раффиноза	0,5—1,0	—	MgO	0,1—0,24	—
Сбраживаемые сахара (суммарное количество)	46 — 48	50	CaO	0,5—0,8	1,0
Коллоиды	3 — 4	—	Азот		
Доброкачественность	62 — 65	65	общий	1,1 — 1,5	1,4
			аминный		
			до гидролиза	0,2—0,35	—
			после гидролиза	0,5 — 0,6	0,4
Лизин		41	Аланин		118
Гистидин		24	Цистин		89
Аргинин		26	Валин		120
Аспарагиновая кислота		251	Метионин		13
Треонин		41	Изолейцин		

Комплексное использование всей побочной продукции производства далеко от совершенства. В нашей стране ежегодно остается неиспользованной или нерационально используется около 1 млн т лактозы, содержащейся в сыворотке и пахте. В США из всего количества молочной сыворотки, образующейся при производстве сыра (ежегодно 20 млн т), половина теряется со сточными водами. В то же время известно, что из 1 т сыворотки можно получить около 20 кг сухой биомассы дрожжей. Кроме того, из сепарированной бражки можно выделить дополнительно около 4 кг протеина. Нерационально используется картофельный сок, выделяемый из картофеля при производстве крахмала, а также альбуминное молоко, получаемое из сыворотки.

В микробиологической промышленности широко применяются меласса и гидрол — побочный продукт производства глюкозы из крахмала. Меласса характеризуется высоким содержанием сахаров (43—57%), в частности сахарозы (табл. 3).

В микробиологической промышленности используется ряд других побочных продуктов (табл. 4). В дальнейшем

необходимо учесть потенциальные возможности постоянно возобновляющихся сырьевых ресурсов — первичных продуктов фотосинтеза, в первую очередь гидролизатов древесины и депротеинизированного сока растений.

**Таблица 4. Побочные продукты, используемые в микробиологической промышленности в качестве основного сырья**

Продукт	СВ 4,0—4,5 %, в том числе РВ 3,3—3,5 %	Производство	кормовы
Сульфитный щелок	СВ 4,3—4,5 %, в том числе РВ 2,0—2,2 % СВ 7,3—8,1 %, в том числе РВ 2,5—2,9 % СВ 76—78 %, в том числе сбраживаемых Сахаров 50 %	дрожжей То же	
Картофельная барда	СВ 15—20 %, в том числе РВ (мальтоза, декстрины) 8—12 %, витамины СВ 6,5—7,5 %, в том числе лактозы 4,0—4,8 %, белков 0,5—1,0%, жиров 0,05—0,4 %, витамины СВ 5—8 %, в том числе РВ 0,8—2,0 %, аминокислоты,	Производство	дрожжей, антибиотиков, этанола
Зерновая барда	витамины СВ 4—5 %, в том числе РВ 0,5—1,0 %, витамины, аминокислоты	Выращивание	дрожжей, бактерий, микромицетов
Гидрол	СВ 6—9 %, в том числе РВ 3—4 %, органических кислот 0,3—0,4 % СВ 48—52%, в том числе РВ 26—33 % (галактоза, глюкоза, манноза, ксилоза, рамноза); гуминовые вещества	Получение	дрожжей, этанола, лактанов
Солодовое сусло	СВ 90—92 %, в том числе экстрактивных веществ 48—50%, крахмала 25—30%, белков 11—13%, жиров 2,5—3,0 %, целлюлозы 15—17 %	Выращивание	кормовы дрожжей
Молочная сыворотка		Производство	хлебопекарных дрожжей, антибиотиков
Депротеинизированный сок растений		Получение	кормовых дрожжей
Депротеинизированный картофельный сок		То же	
Гидролизат древесных отходов		Производство	ферментов
Гидролизат торфа (упаренный)			
Пшеничные отруби			

## Источники минерального питания

**Азот.** В бактериальных клетках азота до 12 % в пересчете на сухую биомассу, в мицелиальных грибах — до 10%. Микроорганизмы могут использовать как органические, так и неорганические источники азота. Известно, что бактерии более требовательны к источникам азота, чем большинство микромицетов, актиномицетов и дрожжей. У клеток животных и растений особые требования к источникам азота. Продуктивность по биомассе в зависимости от источника азота не всегда совпадает с продуктивностью целевого метаболита и зависит также от условий культивирования (табл. 5). При выращивании биомасс

**Таблица 5. Влияние минеральных источников азота на рост биомассы и биосинтез лимонной кислоты мутантом *A. niger* при поверхностном и глубинном культивирования (Р. Я- Карклиньш)**

Источник азота	Поверхностное культивирование		Глубинное культивирование	
	АСБ, г/л	Лимонная кислота, г/л	АСБ, г/л	Лимонная кислота, г/л
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	6,2	40	12	82
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	4,2	59	15	95
$\text{NH}_4\text{Cl}$	5,5	60	14	101
$\text{KNO}_3$	5,0	30	9	15
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	3,5	35		
$\text{NH}_4\text{CONH}_2$	6,9	58		

в концентрации 30—40 г/л потребность в добавках азотсодержащих солей обычно не превышает 0,3—0,4 % от объема среды. В периодических режимах культивирования потребление азота заканчивается в первые 6—12 ч роста (в первой половине экспоненциальной фазы). При направленном биосинтезе азотсодержащих метаболитов потребность в азоте существенно возрастает.

Большинство дрожжей хорошо усваивает аммиачные соли -сульфат аммония, фосфат аммония, а также аммиак из водного раствора. Соли азотной кислоты не всегда хорошо усваиваются. Только некоторые виды дрожжей испытывают потребность в нитратах. Часто источником азота в состав сред включают мочевины. При направленном биосинтезе, например, целлюлолитических ферментов грибом *Peniophora gigantea* наивысшая биохимическая активность клеток наблюдается на средах с органическим азотом (аспарагин, пептон и др.).

**Другие минеральные соли.** Фосфор, как известно, входит в состав нуклеиновых кислот, фосфолипидов и других важных компонентов клетки. Иногда фосфор накапливается в ней в виде полифосфатов. Небольшая часть усвоенного фосфора существует в форме макроэргических соединений — АТФ.

Фосфор является важным компонентом клетки. Микроорганизмы нуждаются еще в 10 минеральных элементах, но в значительно меньших количествах ( $10^{-3}$ — $10^{-4}$ М). Повышенная потребность микроорганизмов в микроэлементах возникает, если целевой метаболит содержит микроэлемент. Так, при биосинтезе витамина В<sub>12</sub> в состав питательной среды включают кобальт; молибден и бор стимулируют биосинтез тиамин в клетках клубеньковых бактерий; медь присутствует в ряде ферментов, переносащих электроны от субстрата к кислороду.

Минеральный состав питательной среды формирует распределение электрических зарядов на поверхности клеток. Обычно клетки микроорганизмов имеют отрицательный потенциал (16—20 мВ). При добавлении в среду электролитов он снижается, и тем сильнее, чем выше валентность добавляемого противоиона. Увеличение содержания  $\text{K}^+$  или  $\text{Na}^+$  до 500 мг/л уменьшает величину потенциала клеток до 10—12 мВ. Введение в среду 60—80



мг/л  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  или  $\text{Si}^{2+}$ , равно как и 5 мг/л  $\text{Al}^{3+}$ , может привести клетки в электронейтральное состояние. В отличие от бактерий дрожжи и мицелиальные грибы не перезаряжаются и не приобретают положительный потенциал. Изменение электрического потенциала клеток может изменить их физиологическую деятельность, воздействовать на селективность клеточной мембраны, вызвать флокуляцию или флотацию клеток.

## Комплексные обогатители сред

Микроорганизмы лучше растут в присутствии витаминов, аминокислот, цитокининов и других биологически активных веществ. С наступлением эры антибиотиков и в связи с широким применением микроорганизмов в промышленности остро встал вопрос об экономически оправданных, сбалансированных по составу питательных средах. Эффективной добавкой оказался кукурузный экстракт благодаря наличию в нем витаминов, аминокислот и минеральных элементов в легко усваиваемых формах. Химический состав кукурузного экстракта приведен ниже.

### Содержание, мг/г СВ

Аланин	24—59	Метионин	2—6
Аргинин	10—24	Фенилаланин	8—13
Аспарагиновая кислота	10—27	Пролин	16—20
Цистин	2—4	Серин	12—20
Глутаминовая кислота	35—88	Треонин	4—11
Глицин	Следы	Тирозин	5—10
Гистидин	2—4	Триптофан	5—10
Изолейцин	35—42	Валин	8—18
Лейцин	27—42	Лизин	16—37

### Содержание, мкг/г СВ

Рибофлавин	7—12	Биотин	15—55
Тиамин	80—100	Никотиновая кислота	120—180
Пантотеновая кислота	80—140		

### Содержание, % от золы

Калий	25—35	Натрий	4—6
Кальций	12—18	Железо	1—2
Фосфор ( $\text{P}_2\text{O}_5$ )	0,3—0,5	Марганец	0,2—0,6
Цинк	0,2—0,5	Медь	0,05—0,1
Магний	10—15	Алюминий	0,4—0,5

Кроме кукурузного экстракта в рецептуры сред промышленного микробного синтеза включают дрожжевой автолизат, дрожжевой экстракт, гидролизат дрожжей, клеточный сок картофельных клубней, молочную сыворотку, экстракт пшеничных отрубей, экстракт солодовых ростков и другие продукты. Иногда добавляют мясной и рыбный пептоны. Для культивирования животных клеток используют экстракт плаценты, плазму крови животных. Для выращивания клеток растений или мицелия высших грибов применяют экстракты тыквы, листьев хлопчатника, отвар слив и др.

**Пеногасители.** Процессы пенообразования и пеногашения играют важную роль при аэробном глубинном культивировании микроорганизмов. При сбалансированных пенных режимах увеличивается межфазная контактная поверхность и достигается интенсивный массообмен между средой и аэрирующим воздухом. Вспенивание питательной среды, устойчивость пены и ее реологические свойства (поверхностное натяжение, поверхностная вязкость) зависят от состава среды (содержания Сахаров, липидов, белков, структурообразующих солей), режимов стерилизации и аэрации среды и пр.

Для создания устойчивых режимов пенообразования применяют механические и химические пеногасители и их комбинации. Химические пеногасители (поверхностно-активные вещества -ПАВ) делятся на жировые и



синтетические. Жиры проявляют пеногасящие свойства в относительно высоких концентрациях (0,2—1,0% от объема среды и выше). Кроме того, для многих микробиологических процессов они являются необходимыми или дополнительными питательными компонентами. При ассимиляции жиры, расщепляясь до жирных кислот, изменяют рН среды.

Весьма эффективны синтетические пеногасители, (силиконы, пропинолы, контрамин, полиформаль и др.), выпускаемые для пищевой промышленности.

В каждом конкретном процессе микробного синтеза экспериментальным путем подбирают оптимальный пеногаситель и рассчитывают его максимально допустимую дозировку.

**Флокулянты.** В некоторых микробиологических процессах целесообразно стимулировать флокуляцию (конгломеризацию) клеток продуцента, например, для более эффективного фракционирования клеток или с целью удерживания клеток в условиях непрерывной ферментации. Применяют химические флокулянты (хлорид кальция, соли фосфорной кислоты) или синтетические полиэлектролиты, которые могут быть анион-или катионактивные, или неионогенны. На выпадающем в осадок фосфате кальция, например, адсорбируются клетки продуцента. Из анионактивных полиэлектролитов используют сополимер акриламида и натриевой соли акриловой кислоты. Катионактивные полиэлектролиты (например, цетазолакриламид с сополимером — катионогенным мономером) осаждают белковые вещества ферментируемой среды (до 20 г на 1 г полиэлектролита) и на них адсорбируются клетки.

Эффективность применения флокулянтов во многом зависит от температуры культивирования, рН среды и физиологического состояния клеток.

## Кислород и вода

Потребность аэробных микроорганизмов в молекулярном кислороде зависит от источника окисляемого источника углерода и от физиологических свойств и активности роста микроорганизмов (рис. 2, табл. 7). Для биосинтеза 1 кг дрожжевой биомассы необходимо, например, 0,74—2,6 кг молекулярного кислорода. При интенсивном потреблении субстрата продуцент ассимилирует независимо от источника углерода 0,83—4,0 мг кислорода на 1 л среды в минуту.

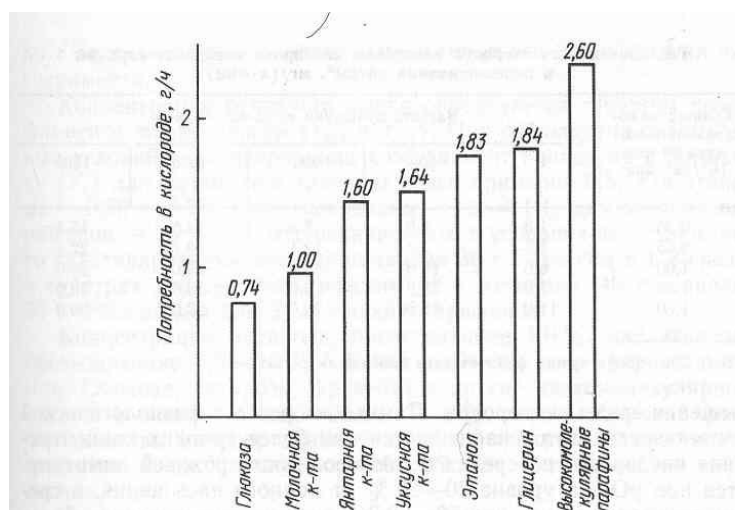


Рис. 4.2. Потребность микроорганизмов в кислороде на образование 1 г биомассы в зависимости от источника углерода

Растворимость кислорода в среде сравнительно низка и зависит от температуры, давления и от концентрации растворенных, эмульгированных и диспергированных

компонентов. При давлении 0,1 МПа (1 кгс/см<sup>2</sup>) и температуре 30 °С в 1 л дистиллированной воды максимальное количество растворенного кислорода составляет 7,5 мг. В реальной питательной среде максимальная растворимость кислорода 2—5 мг/л. Запасы кислорода в среде обеспечивают жизнедеятельность аэробного продуцента в течение 0,5—2 мин.

При глубинном культивировании запасы кислорода в питательной среде возобновляются при подаче аэрирующего воздуха. Скорость адсорбции кислорода увеличивается с ростом интенсивности перемешивания среды (табл. 7).

**Таблица 7. Зависимость абсорбции кислорода в воде (мг/л) от концентрации растворенных, эмульгированных и диспергированных компонентов при температуре 20 °С**

Сахароза		Подсолнечное масло		Биомасса	
Концентрация, %	Абсорбция O <sub>2</sub>	Концентрация, %	Абсорбция	Концентрация, %	Абсорбция O <sub>2</sub>
0	8,2	0,78	8,9	0,11	8,0
2,5	0,05		,6	3,0	4,1
5,0	7,2	0,10	18,9	6,0	2,4
7,5	6,6	0,15	19,0	9,6	1,5
10,0	5,9	0,20	22,3	16,0	1,2
15,0	4,8	0,25	24,0	32,0	0,8

Установлено, что во время роста биомассы микроорганизмы обычно потребляют больше кислорода, чем во время сверхсинтеза целевого метаболита. Принято говорить о критической концентрации кислорода, при которой наблюдается лимитация дыхания клеток. Для большинства аэробных микроорганизмов, растущих в сахаросодержащих субстратах, критическая концентрация кислорода 0,05—0,10 мг/л, что соответствует 3—8 % от полного насыщения среды кислородом. Лимитация роста и физиологической деятельности клеток наблюдается при более высоких концентрациях кислорода: на средах с глюкозой рост дрожжей лимитируется при O<sub>2</sub> на уровне 20—25% от полного насыщения, в средах с парафинами — при 50—60 % от полного насыщения. Дальнейшее повышение интенсивности аэрации приводит к резким изменениям физиологической деятельности клеток.

**Таблица 8. Зависимость скорости абсорбции кислорода в воде от аэрации и перемешивания среды, мг/(л·мин)**

Количество поглощаемого воздуха в 1 мин, (л <sup>3</sup> /л <sup>3</sup> -мин)	Частота вращения мешалки, об/мин				
	0	500	800	1000	1200
0,35	1,3	4,0	7,5	14,5	15,1
0,65	3,5	7,3	12,1	19,1	22,1
1,00	6,0	10,0	15,0	23,0	24,0
1,30	7,5	13,9	18,0	26,0	28,0
1,60	11,0	15,5	20,0	27,0	29,0

\* Для лабораторного ферментатора рабочей емкостью 8 л.

Оптимальной для роста биомассы считается концентрация кислорода 50—60 % от полного насыщения, для биосинтеза целевых метаболитов— 10—20%.

Вода составляет 80—90 % биомассы микроорганизмов. Для приготовления питательных сред требуется чистая бесцветная вода, без привкуса, запаха и осадка, отвечающая требованиям ГОСТа. В воде, используемой для приготовления питательных сред, должно содержаться не более 50 мг/л хлоридов и не более 60 мг/л сульфитов. Концентрации ионов металлов (в мг/л) не должны превышать следующих

цифр: свинец — 0,2, мышьяк — 0,05, фтор — 1,5, цинк — 5,0, медь — 3,0.

## СОСТАВЛЕНИЕ РЕЦЕПТУР ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД. Среды для культивирования микроорганизмов

Основной принцип составления рецептур питательных сред — удовлетворение физиологических потребностей микроорганизмов. В каталогах культур и в определителях указаны эти потребности, а также оптимальные значения pH и температуры. Задача специалиста, оптимизирующего состав среды для конкретного штамма — продуцента целевого продукта, — выбрать из перечня источников углерода, азота, фосфора и других веществ наиболее оправданные в экономическом и экологическом отношении компоненты. С этой целью проводят лабораторные опыты, желательно с использованием методов математического планирования эксперимента.

Концентрация основного сырья определяется с учетом коэффициента его конверсии ( $Y_{p/s}$  и  $Y_{x/s}$ ). При соблюдении оптимальных условий культивирования коэффициент конверсии в биомассу ( $Y_x$ ) для метанола и глюкозы равен примерно 0,5; для этанола — 0,70 — 0,75; для гексадекана — 1,0 — 1,1; для жидких парафинов — 1,2 — 1,3. Это означает, что в условиях периодического культивирования для выращивания 30 г биомассы в 1 л среды в субстрат должны быть внесены 60 г метанола, 40 г этанола, 30 г гексадекана или 24 г жидких парафинов.

Концентрации метанола, превышающие 1,0%, или этанола, превышающие 1,5—2,0%, обычно токсичны для микроорганизмов. Глюкоза, сахароза, фруктоза и другие низкомолекулярные сахара в концентрациях более 7—8 % также тормозят рост большинства микроорганизмов, поэтому при необходимости эти вещества вводят в питательный субстрат постепенно, по мере ассимиляции.

Количество азотсодержащих веществ для конструктивного метаболизма определяют из содержания азота в биомассе и предполагаемого ее урожая, учитывая, что около 5 % азота остается неиспользованным. Кроме минерального азота ряд микроорганизмов усваивает азот белка, пептидов и аминокислот, внесенных в среду с органическим сырьем.

Точную потребность микроорганизмов в минеральном питании выясняют, культивируя их на строго синтетических средах, состоящих из компонентов в чистом виде (перекристаллизованные соли) и дистиллированной воды. Потребность в минеральных элементах, необходимых для выращивания биомассы (30 г/л), перечислена ниже.

Компонент	Концентрация, г/л
Источник азота — $(NH_4)_2SO_4$	12
Источник фосфора — $KH_2PO_4$	1,3
Источник магния — $MgSO_4$	1,5
Макроэлементы Fe, Ca, Mg	По $10^{-3}$
Микроэлементы Si, Co, Zn, Mo, Mn	По $10^{-4}$

Таким образом, для составления рецептур все компоненты должны быть взяты в соотношениях, пропорциональных потребностям культивируемого микроорганизма, и с учетом предполагаемого урожая биомассы. Рецептуры составляют, пользуясь следующей формулой:

$$C_1/A_1 = C_2/A_2 = C_3/A_3 = S_0$$

где  $C$  — концентрация компонента  $i$  в сбалансированной питательной среде ( $i=1,2$  /г);  $A$  — коэффициент конверсии компонента / для выбранной культуры;  $S_0$  — заданный запас

компонентов в среде, в единицах концентрации биомассы.

Соблюдение данного правила обеспечивает разработку состава сред, сбалансированных по всем компонентам, и более или менее полную ассимиляцию всех ингредиентов среды во время ферментации.

Для ауксотрофных микроорганизмов необходимую концентрацию дефицитных факторов подсчитывают с учетом потребностей выращиваемой культуры. В 1 г сухой биомассы метионин- и треониндефицитного мутанта *Brevibacterium flavum* содержится 7 мг треонина и 15 мг метионина. Соответственно для выращивания, например, 20 г биомассы этого мутанта в 1 л среды питательный субстрат должен содержать 30 мг% метионина и 14 мг% треонина, которые вносят с комплексным обогатителем. Тиаминдефицитный мутант *Candida lipolytica* для синтеза 1 г биомассы требует 0,09 мкг тиамин, для выращивания биомассы 20 г/л среда должна содержать 18 мкг треонина.

Для прототрофных культур, которые получают интенсификаторы роста, оптимальные дозы выбранного комплексного стимулятора устанавливают экспериментальным путем для каждой конкретной системы культивирования.

Побочные ингредиенты. Для приготовления питательных сред, как правило, используют технические и нестандартные продукты, содержащие разного рода примеси, которые также влияют на рост и биосинтетическую активность продуцента. Примеси и побочные продукты могут положительно влиять на процесс ферментации (белки, аминокислоты, органические кислоты, минеральные вещества и др.), но могут оказать и тормозящее влияние. Допустимые концентрации некоторых потенциально вредных примесей для дрожжей представлены в табл. 10.

Таблица 10. Концентрация (в %) некоторых примесей, ингибирующих дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*

Примеси	Рост за- лежи- вается	Рост по- давляет- ся	Примеси	Рост за- лежи- вается	Рост подав- ляется
Органические кис-			Нитриты	0,0005	—
Лоты			Формалин	0,09	—
щавелевая	0,001	0,2	Фтористый натрий	0,002	—
муравьиная	0,0085	0,2	Тяжелые металлы		
уксусная	0,02	0,2	медь	—	0,005
масляная	0,005	0,05	серебро	—	0,000001
молочная	1,35	—	мышьяк	—	0,0005
Оксид серы	0,0025	—			

## Среды для выращивания клеток растений и животных

Помимо источников углерода, азота и других минеральных компонентов, среда для клеток многоклеточных организмов содержит специфические стимуляторы и регуляторы роста. Клетки растений, как правило, требуют индолуксусную кислоту, кинетин и гиббереллиновую кислоту. Клетки животных нуждаются в ростовых веществах и незаменимых аминокислотах. Клетки растений и животных более чувствительны, чем микроорганизмы, к присутствию посторонних ингредиентов, поэтому требуют химически чистых компонентов среды. Общая характеристика сред для культивирования клеток растений и животных приведена в табл. 11.

Таблица 11. Состав сред (в мг/л) для клеток животных и растений

Компоненты	Клетки животных	Клетки растений
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	185—264	150—440
$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	0,03—0,1	27—28
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		
KCl	320—440	—
KNO <sub>3</sub>		1900—2500

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	60	170—340
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	170	—
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	161—242	250—370
$\frac{N}{14} \cdot \frac{C}{12}$	5100—8000	
NaHCO <sub>3</sub>	350—3700	—
NaH <sub>2</sub> PCv2H <sub>2</sub> O	100—1500	134
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	—	1200—1650
Незаменимые аминокислоты	+	—
Ростовые вещества	Специфичные, в том числе инсулин — 0,1—10; глюкагон — 0,05—5,0; простагландины E <sub>1</sub> —E <sub>2</sub> — по 0,01; соматомедин C - 0,001; гидрокортизон — до 0,03; прогестерон — до 0,003; эстрадной -- до 0,003; тестостерон — до 0,003 и др.	Специфичные, в том числе индолуксусная кислота — 1—30; кинетин — 0,02—10; 6-бензиладенин—1,0—5,0; гиббереллиновая кислота — 0,5—10 и др.

## ЛИТЕРАТУРА.

- Биотехнология/под ред. И. Хиггинса, Д. Беста, Дж. Джонса/перевод с английского/под ред. А. А. Баева. — М.: Мир, 1988. — 479 с.
- Биотехнология микробного синтеза/под ред. М. Е. Бекера — Рига: Зинатне, 1980. — 350 с.
- Быков В. А., Винаров В. А., Шерстобитов В. В. Расчет процессов микробиологических производств. — Киев: Техника, 1985. — 244 с.
- Виестур У. Э., Кристаксонс М. Ж., Былинкина Е. С. Культивирование микроорганизмов. — М.: Пищевая промышленность, 1980. — 232 с.
- Виестур У. Э., Шмитте И. А., Жилевич А. В. Биотехнология. — Биотехнологические агенты, технология, аппаратура. — Рига: Зинатне, 1987. — 263 с.
- Воробьев Л. И. Техническая микробиология. — М.: Высшая школа, 1987. — 94 с.
- Дебабов В. Г., Лившиц В. А. Биотехнология. — М.: Высшая школа, 1988.
- Лиепиньш Г. К., Дунце М. Э. Сырье и питательные субстраты для промышленной биотехнологии. — Рига: Зинатне, 1986. — 156 с.