

МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ  
ЦЕЛЕВЫХ ПРОДУКТОВ. МЕТОДЫ  
РАЗРУШЕНИЯ КЛЕТОК ПРОДУЦЕНТА.



# МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ ЦЕЛЕВЫХ ПРОДУКТОВ В ПРОЦЕССЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

- Завершающей стадией любого микробиологического производства является выделение целевого продукта из культуральной среды и его очистка. Таким целевым продуктом может быть либо биомасса клеток, либо какой-то продукт клеточного метаболизма. Если целевой продукт находится внутри клетки (накапливается или входит в состав клеточных структур или оболочки), то он является **эндометаболитом**, если выделяется клеткой в культуральную жидкость - **экзометаболитом**.
- В большинстве случаев извлечения эндометаболитов необходимо предварительное разрушение клеток. Однако этот процесс удобнее проводить не непосредственно в культуральной среде, извлекаемой из реактора, а с концентратом клеток после удаления культуральной жидкости. Поэтому первым этапом выделения большинства продуктов микробиологического синтеза является отделение биомассы микроорганизмов продуцентов из культуральной жидкости. При этом в зависимости от типа используемых микроорганизмов могут применяться самые различные методы.

- Для отделения бактериальных культур применяются вакуум-фильтры: нутч-фильтры, ленточные, барабанные, камерные. Фильтрация бактериальных суспензий сопряжена с большими трудностями, которые обусловлены малым размером клеток, высокой вязкостью суспензий и наличием большого количества примесей микрочастиц. Поэтому стадии фильтрации обычно предшествует предварительная обработка суспензий с целью максимально возможной коагуляции клеток и примесей в более крупные и легко фильтруемые частицы. Применяются несколько видов **коагуляции** : тепловая, органическими и неорганическими кислотами, неорганическими солевыми электролитами (**Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>**, **Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>**), которые взаимодействуют с ионами **Ca<sup>2+</sup>**, находящимися в культуральной жидкости, с образованием труднорастворимых соединений.



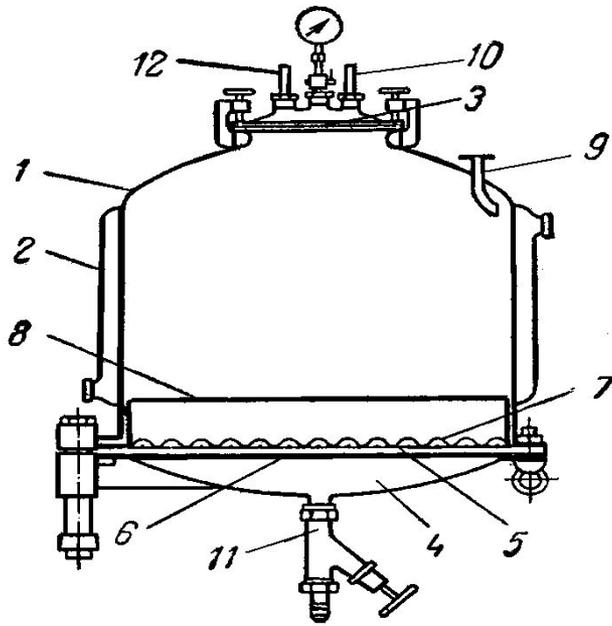
- 



- Образующиеся частицы осадка захватывают клетки микроорганизмов и примеси.
- Процесс коагуляции улучшается при использовании комбинированных методов, таких, как кислотная и тепловая, электролитная и тепловая коагуляция. Эффективным методом коагуляции суспензий является обработка их высокомолекулярными полиэлектролитами - *флокулянтами*. При этом в отличие от обычной коагуляции образуются флокулы, или осадки рыхлой структуры, что значительно улучшает процесс фильтрации.

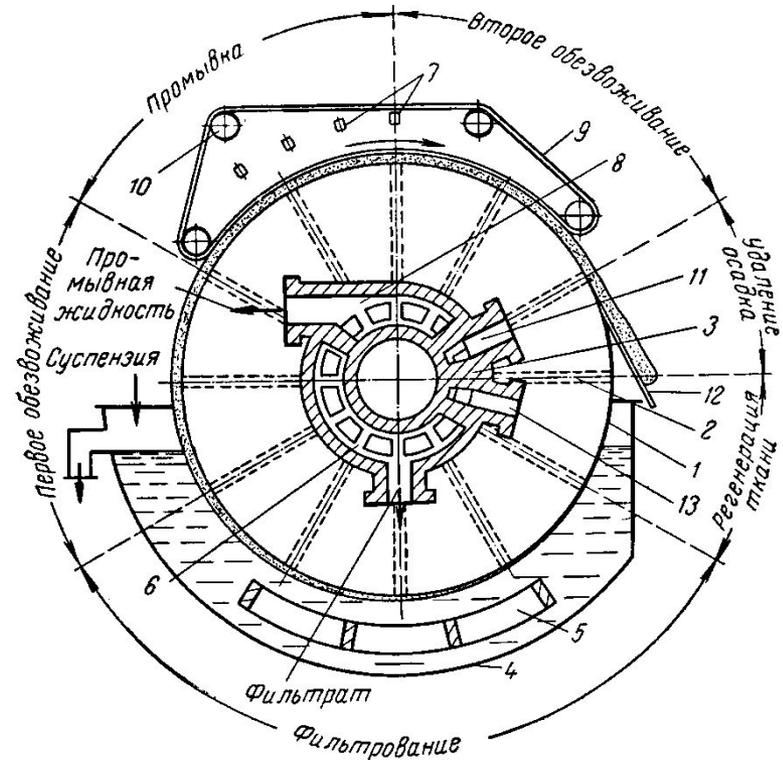
- Процесс коагуляции улучшается при использовании комбинированных методов, таких, как *кислотная и тепловая, электролитная и тепловая коагуляция*. Эффективным методом коагуляции суспензий является обработка их высокомолекулярными полиэлектролитами - *флокулянтами*. При этом в отличие от обычной коагуляции образуются флоккулы, или осадки рыхлой структуры, что значительно улучшает процесс фильтрации
- Образующиеся в результате коагуляции и флокуляции крупные частицы перед фильтрованием могут быть подвергнуты **седиментации** (осаждению под действием силы тяжести) с последующей **декантацией** надосадочной жидкости, которая далее может быть дополнительно очищена фильтрованием.

# ВИДЫ ФИЛЬТРОВ



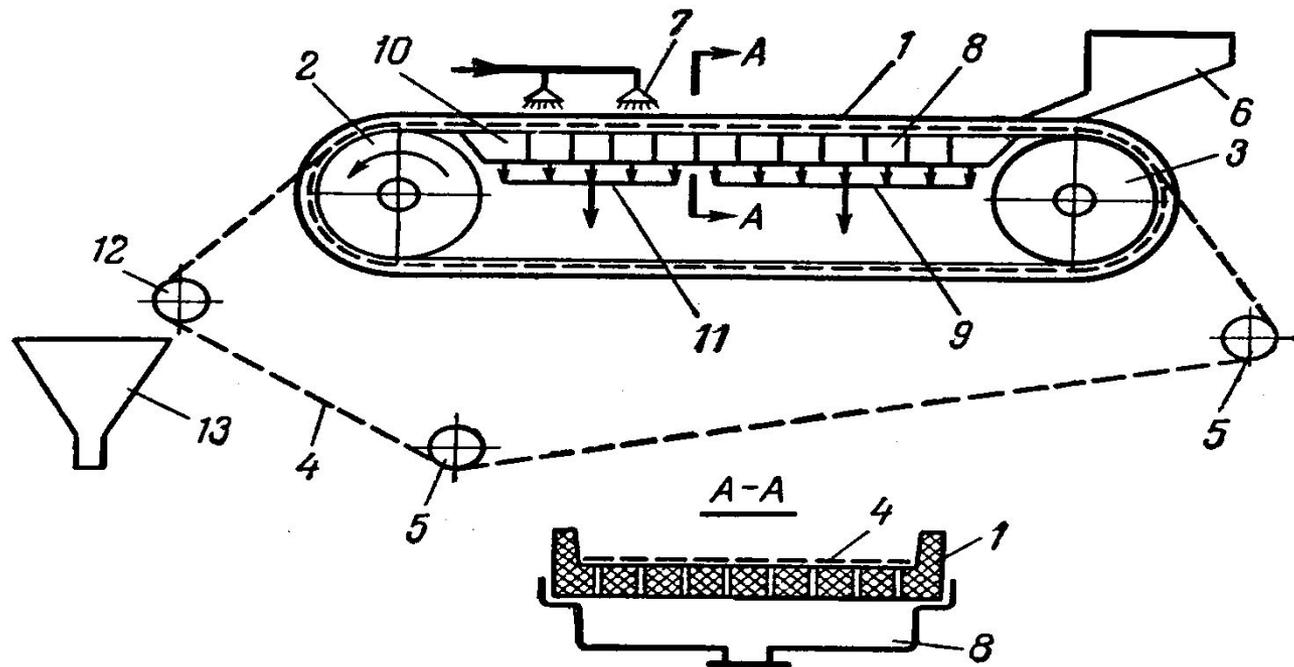
**Рис. 1.** Нутч, работающий под давлением до 3 ат:

1 — корпус; 2 — рубашка; 3 — съемная крышка; 4 — перемещающееся дно; 5 — фильтровальная перегородка; 6 — опорная перегородка; 7 — защитная сетка; 8 — кольцевая перегородка; 9 — штуцер для подачи суспензии; 10 — штуцер для подачи сжатого воздуха; 11 — штуцер для удаления фильтрата; 12 — предохранительный клапан.



**Рис. 2.** Схема действия барабанного вакуум-фильтра с наружной поверхностью фильтрования:

1 — барабан; 2 — соединительная трубка; 3 — распределительное устройство; 4 — резервуар для суспензии; 5 — качающаяся мешалка; 6, 8 — полости распределительного устройства, сообщающиеся с источником вакуума; 7 — разбрызгивающее устройство; 9 — бесконечная лента; 10 — направляющий ролик; 11, 13 — полости распределительного устройства, сообщающиеся с источником сжатого воздуха; 12 — нож для сема осадка.

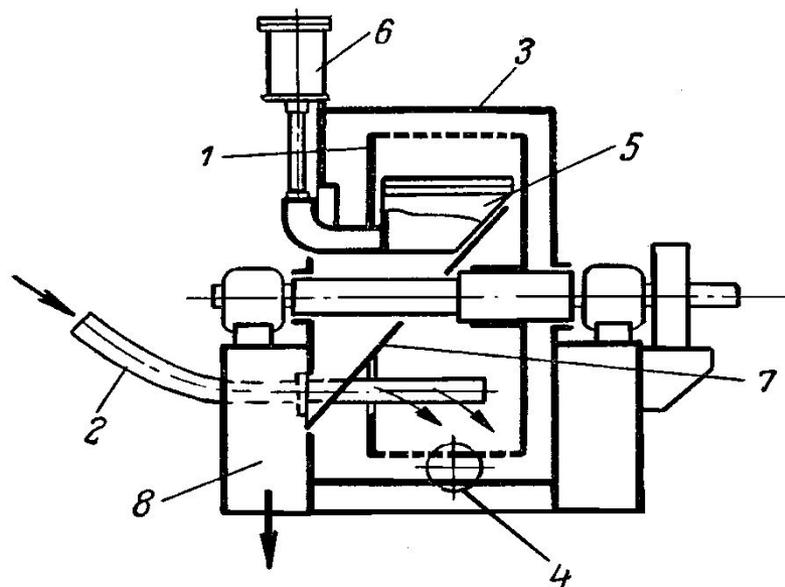


**Рис. 3.** Ленточный вакуум-фильтр:

1 — опорная резиновая лента; 2 — приводной барабан; 3 — натяжной барабан; 4 — фильтровальная ткань; 5 — натяжные ролики; 6 — лоток для подачи суспензии; 7 — форсунки для подачи промывной жидкости; 8 — вакуум-камеры для фильтрата; 9 — коллектор для фильтрата; 10 — вакуум-камеры для промывной жидкости; 11 — коллектор для промывной жидкости; 12 — направляющий ролик; 13 — бункер для осадка.

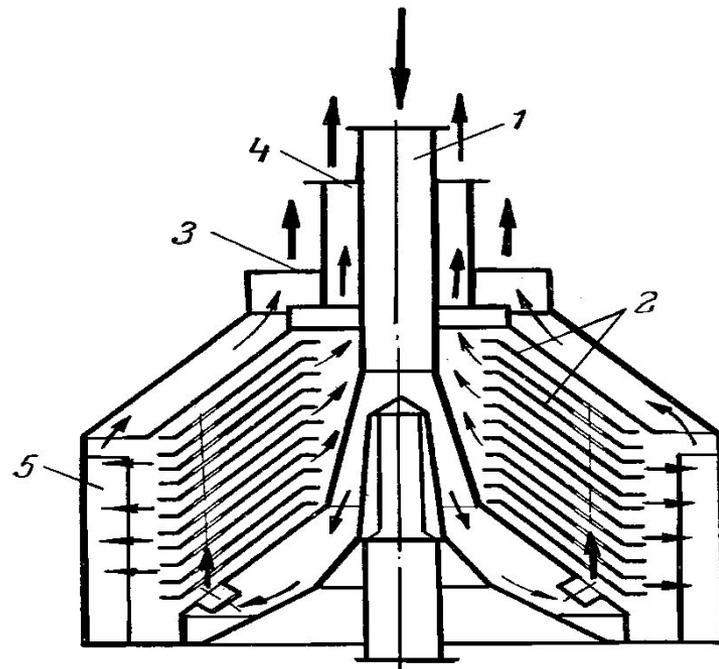
- Для предварительного концентрирования (сгущения) более крупных и тяжелых клеток дрожжей и микрогрибов широко используют **флотацию**. Основной движущей силой флотации являются всплывающие пузырьки газа, которые захватывают клетки и выносят их на поверхность. В результате над слоем отработанной культуральной жидкости образуется пенный слой, в котором сконцентрированы клетки. Процесс проводят в специальных аппаратах - флотаторах, в которых нагнетают воздух и, в зависимости от их конструкции, диспергируют его через барботер или эжектор, пену гасят и выводят сконцентрированную в 4-6 раз суспензию клеток (получение пекарских дрожжей).

- Для последующего концентрирования и отделения биомассы грибов и дрожжей используют **сепарирование** (одноступенчатое или многоступенчатое) для разделения суспензий и эмульсий, а также **центрифугирование** для отделения твердых осадков и клеток от культуральной жидкости. Так для сгущения суспензии дрожжей от 20-30 г/л до 550-600 г/л с помощью сепаратора- сгустителя непрерывного действия тарельчатого типа **СОС-501 К-3**, необходимо последовательное сепарирование в 2-3 ступени. С помощью центрифуг различных конструкций удастся отделять из культуральных жидкостей бактерии, дрожжи, мицелиальные грибы. Наличие в культуральной жидкости высоковязких компонентов, таких как различные экзополисахариды типа декстрана, аубазидана, пуллулана и др. существенно затрудняет процесс центрифугирования.



**Рис. 4.** Горизонтальная центрифуга с ножевым устройством для удаления осадка:

1 — перфорированный ротор; 2 — труба для подачи суспензии; 3 — кожух; 4 — штуцер для удаления фугата; 5 — нож; 6 — гидравлический цилиндр для подъема ножа; 7 — наклонный желоб; 8 — канал для удаления осадка.



**Рис. 5.** Жидкостный сепаратор тарельчатого типа:

1 — труба для подачи эмульсии; 2 — тарелки; 3 — отверстие для отвода более тяжелой жидкости; 4 — кольцевой канал для отвода более легкой жидкости; 5 — ребра.

# МЕТОДЫ РАЗРУШЕНИЯ КЛЕТОК ПРОДУЦЕНТА

- Для извлечения целевых продуктов эндометаболитов из концентрата микробной биомассы ее либо обрабатывают каким-либо экстрагентом без разрушения клеток (экстракция петролейным эфиром биожира из кормовой биомассы дрожжей, извлечение полиеновых антибиотиков), либо клетки разрушают каким-либо из методов, а затем экстрагируют продукты.
- Для разрушения (дезинтеграции) клеток применяют целый набор методов, которые можно отнести к трем основным группам: *физико-механические, химические и энзиматические* (ферментные) методы. Все процедуры должны быть достаточно жесткими, чтобы разрушить клеточную стенку, и в то же время достаточно мягкими, чтобы исключить денатурацию или разрушение целевого продукта. А поскольку клеточные стенки у разных микроорганизмов состоят из различных полимеров (иногда сопоставимых или превосходящих по прочности лучшие сорта сталей), то никакого универсального метода их разрушения не существует.

- К *физическим* методам относятся: разрушение клеток баллистическим способом с применением бус баллотини, кварцевого песка, растирание клеток в дисковой мельнице, дробление замороженных в жидком азоте или в сухом льде клеток; экструдирование клеток под высоким давлением через узкую щель или отверстие; гаэодекомпрессионная дезинтеграция, основанная на создании в камере с разрушаемым материалом высокого давления и быстрым сбросом его, приводящим к разрыву клеточных стенок; ультразвуковая дезинтеграция.
- *Энзиматические* методы основаны на применении литических ферментов, разрушающих клеточную стенку: **лизоцима**, выделяемого из белка куриных яиц и разрушающего главным образом оболочки бактериальных клеток; ферментного комплекса или продуцируемого некоторыми видами актиномицетов, лизирующего оболочки эукариотических клеток, в частности грибов.
- *Химические* методы дезинтеграции основаны на разрушении клеточной оболочки под воздействием щелочей, кислот, детергентов, ингибиторов синтеза оболочки клетки.

- Выбор метода дезинтеграции определяется целью работы: для получения внутриклеточных ферментов наиболее приемлемы баллистические и экструзионные способы; энзиматические методы широко применяют в научных исследованиях для выделения в целостности различных субклеточных структур (органелл, мембран и т.д.), а так же для получения протопластов. Применение химических методов дезинтеграции микроорганизмов ведет к нарушению целостности клеточных структур, инактивации ферментов. Поэтому химические методы обычно применяют для получения пищевого белка и биожира из дрожжей.