

Лекция 13. Промышленное культивирование микроорганизмов

1. Технология промышленного культивирования..... 
 2. Рост микроорганизмов в популяции..... 
 3. Способы промышленного культивирования..... 
-
-

1

Технология промышленного культивирования



Промышленное культивирование микроорганизмов - выращивание микроорганизмов в специальных биореакторах, обеспечивающих поддержание условий, необходимых для получения биомассы клеток и продуктов их метаболизма в промышленных объемах.

Основные виды культивирования

По типу и объему среды: глубинное, поверхностное

По продолжительности роста культуры:
периодическое, непрерывное, полупериодическое



Выбор технологии промышленного культивирования:

Параметры

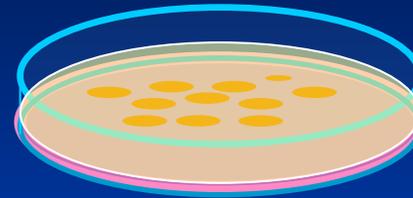


Этапы технологии промышленного культивирования микроорганизмов

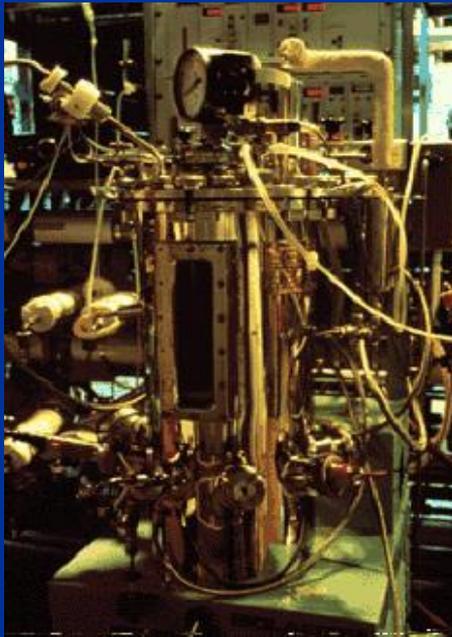
1. Отбор штамма – продуцента необходимого вещества



2. Выделение в чистой культуре (получение потомства одной клетки)



3. Подготовка инокулята - посевного материала: масштабирование культуры до необходимого объема (колба, лабораторный ферментер)



4. Выбор способа культивирования в соответствии с физиологией микроорганизма и задачами производства.



5. Приготовление питательной среды в нужном для производства объеме (стерилизация)



6. Стерилизация ферментаторов, воды, очистка подаваемого воздуха.



7. Засев питательной среды инокулятом



8. Проведение основной ферментации, в период которой при необходимости осуществляется перемешивание, пеногашение и отбор проб для анализа процесса.



9. Разделение культуральной жидкости и биомассы.



10. Выделение, очистка, концентрирование получаемого метаболита.



11. Стандартизация и фасовка препарата.



2

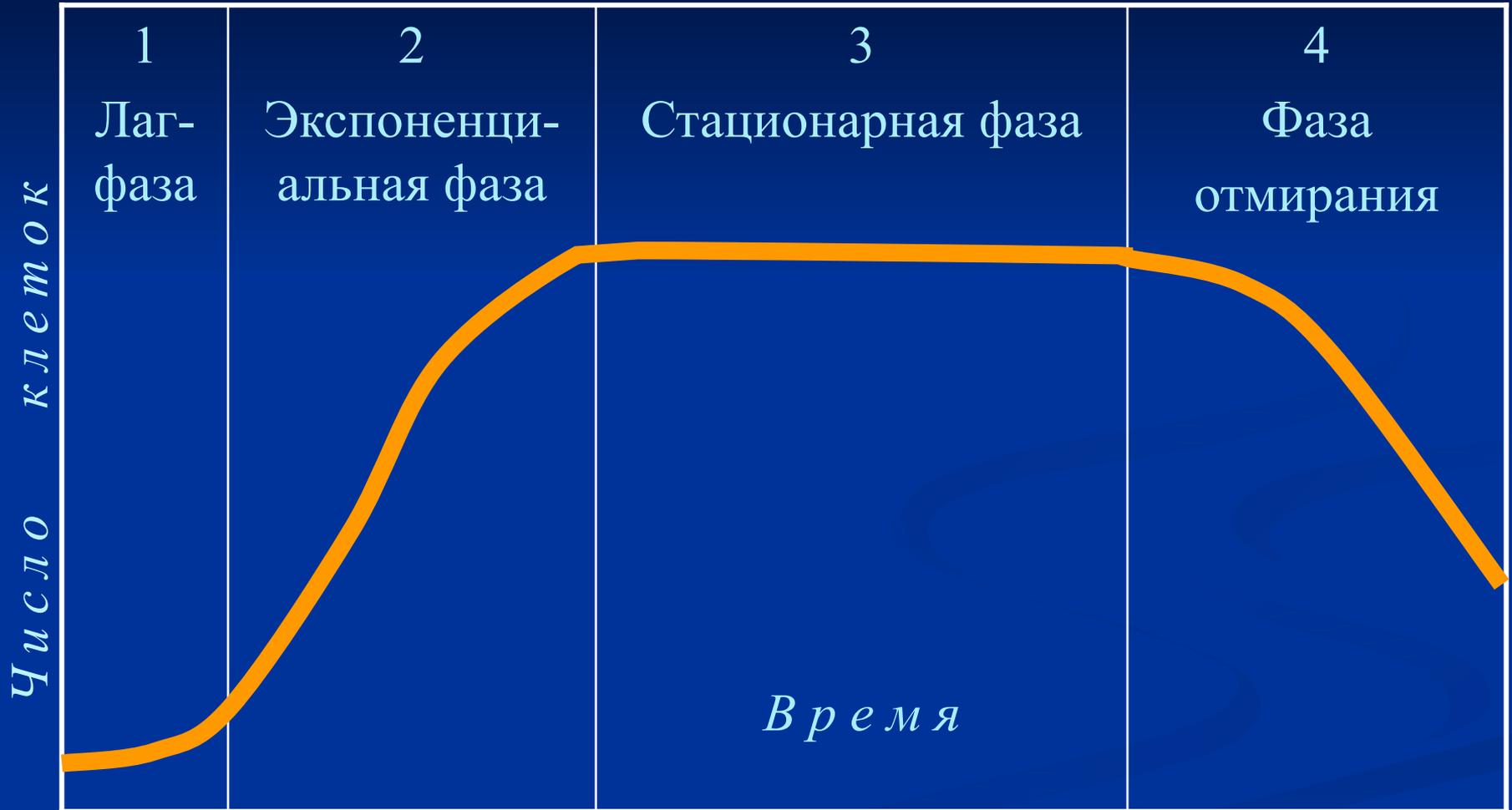
Рост микроорганизмов в популяции



В процессе роста популяция микроорганизмов, (при несменяемой среде), проходит несколько фаз развития:

- Начальная фаза (лаг-фаза), фаза покоя.
- Экспоненциальная (логарифмическая) фаза
- Стационарная фаза
- Фаза отмирания

Кривая роста культуры микроорганизмов в несменяемой среде



Описание фаз роста:

Начальная фаза (лаг-фаза), во время которой внесенные в питательную среду микроорганизмы адаптируются к питательной среде, идет наработка необходимых ферментов

- Экспоненциальная (логарифмическая) фаза или фаза логарифмического роста. Характеризуется максимальным увеличением клеток в культуре. Новые, биологически активные клетки возникают в культуре в геометрической прогрессии. В конце фазы, когда питательные вещества истощаются, накапливаются продукты обмена, рост культуры замедляется.
 - Стационарная фаза или период зрелости культуры. Наступает равновесие между количеством отмирающих и образующихся особей. Увеличивается накопление токсических продуктов, питательная среда истощается.
4. Фаза отмирания - уменьшается общее количество клеток, изменяется их форма, культура отмирает.



Технологические параметры кривой роста:

Урожай клеток (X) – масса клеток, полученная в ходе культивирования, определяется как разница между исходной массой бактерий (X_0) и полученной максимальной массой (X_{\max}), измеряется в граммах.

$$X = X_{\max} - X_0$$

Скорость роста (μ) – константа скорости роста клеток в экспоненциальной фазе определяется по формуле:

$$\mu = \frac{\ln X_t - \ln X_0}{(t - t_0)} = \frac{\lg X_t - \lg X_0}{\lg e (t - t_0)}$$

где X_0 и X_t – плотность клеточной суспензии в момент времени;

t_0 и t – время;

$\lg e = 0,43429$

Время удвоения числа клеток: $t_d = \frac{\ln 2}{\mu}$



Длительность лаг-фазы (T_1) - промежуток времени, между моментом t_r , в который клеточная суспензия достигает определенной плотности X_r , и моментом t_i , в который она могла достичь такой же плотности, если бы сразу после инокуляции начинался экспоненциальный рост, то есть идеальный.

$$T_1 = t_r - t_i = - \frac{\ln X_r - \ln X_0}{\mu}$$

где: T_1 - длительность лаг-фазы;
 t_r - время реального роста;
 t_i - время идеального роста.

Длительность лаг-фазы в генерациях (L) - показывает, на сколько удвоений клеток (генераций) реальная культура отстает от идеальной $L = T_1 * \nu$ (ν - физиологическое время) - разность между наблюдаемым ростом и вычисленным идеальным, выраженная числом, кратным времени генерации, равна.

Длительность лаг-фазы характеризует свойства бактерий, влияние различных питательных веществ, ингибиторов роста, (пригодность питательной среды) и условий культивирования



Экономический коэффициент (Y) - отношение урожая клеток (X) к количеству потребленного субстрата S , выраженное в весовых единицах.

Молярный экономический коэффициент (Y_m) - отношение урожая клеток (X) в граммах к числу молей потребленного субстрата.

Экономический коэффициент позволяет связать урожай клеток с получением энергии из субстрата.



3

Способы промышленного культивирования



Глубинное культивирование -

осуществляется в объеме жидкой питательной среды в специальных аппаратах – биореакторах, или ферментерах, снабженных термостатирующим, аэрирующим, перемешивающим и регулирующим рН среды устройствами.

Ферментёр - аппарат для глубинного выращивания (культивирования) микроорганизмов в питательной среде в условиях стерильности, интенсивного перемешивания, непрерывного продувания стерильным воздухом и постоянной температуры

Емкость промышленных ферментеров – от 100 до 1 500 000 литров.
Применяется для культивирования аэробных и анаэробных микроорганизмов

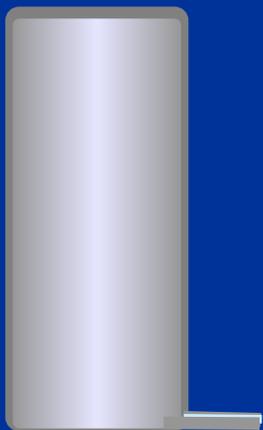


Типы ферментеров для глубинного культивирования

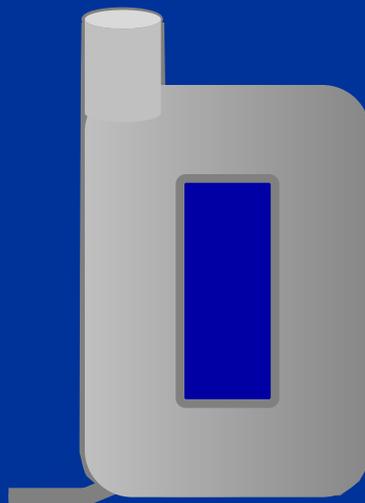
Тип перемешивания среды

Реакторы с циркуляцией
газа (воздуха)

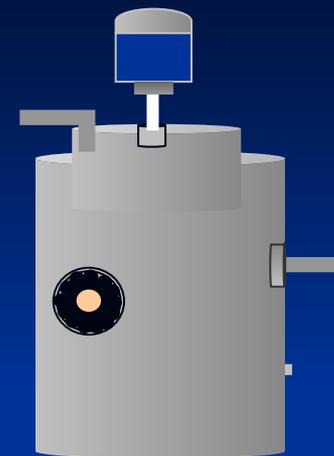
Барботажные
колонны



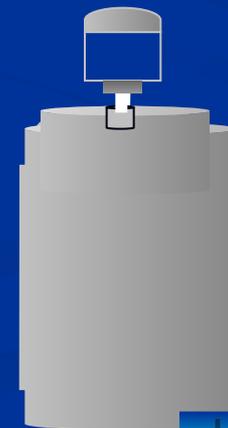
Эрлифтные
реакторы

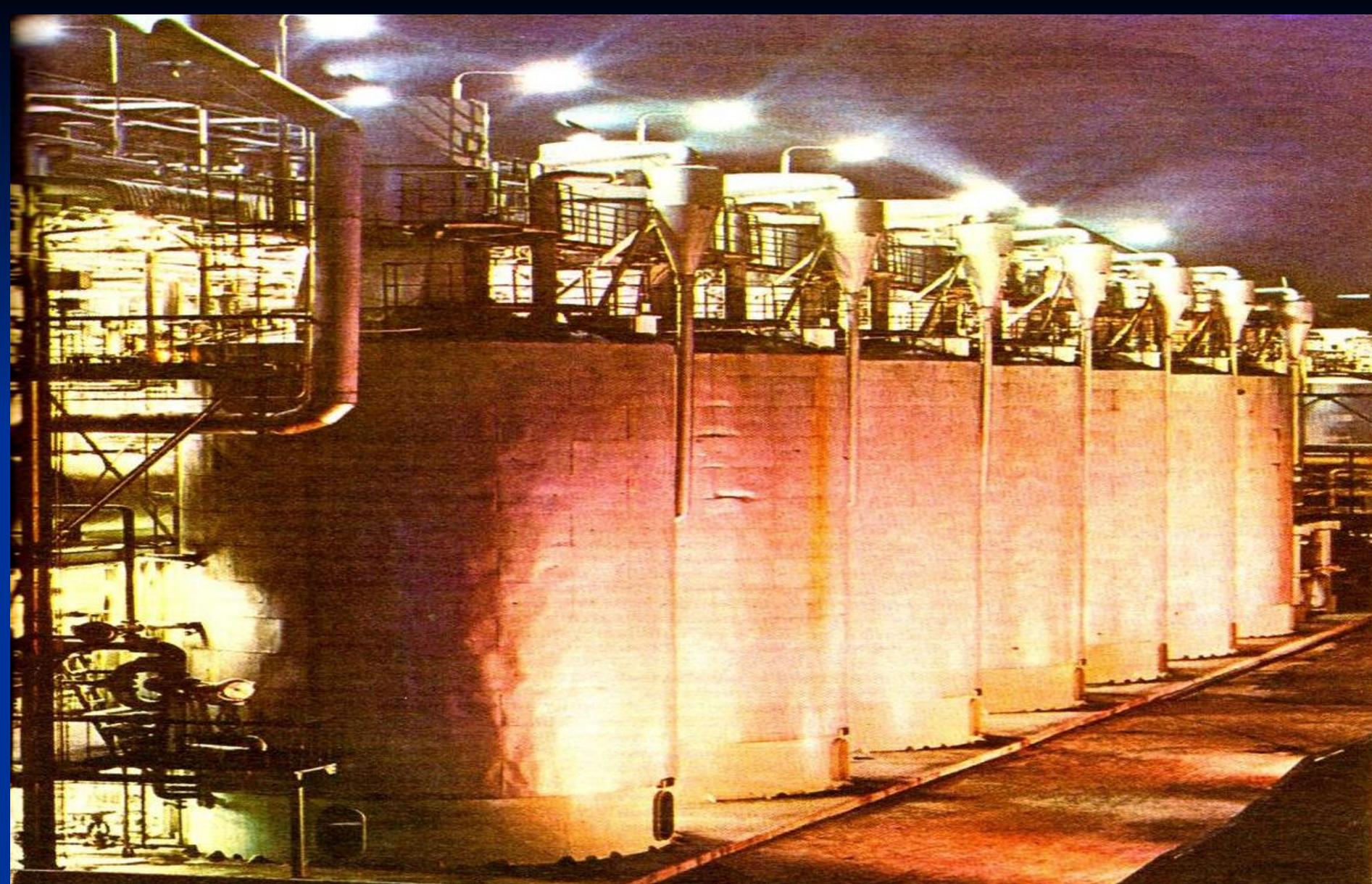


Реакторы с механическим
перемешиванием



Газо-вихревые
реакторы





Общий вид микробиотехнологического производства



Бердский завод микробиологических препаратов



Центральный пульт управления производством



Биоферментеры в цехах



Коллекция штаммов микроорганизмов



Поверхностное культивирование

- культивирование в поверхностном слое питательной среды. Применяется для выращивания строгих аэробов - грибов рода *Aspergillus*, *Rhizopus* и др.

Виды поверхностного культивирования

На плотных средах

(влажность 56 – 65%):

отруби, отходы пивоваренного производства - солодовые ростки, просяная и соевая мука и т.д

Для аэрации вносятся опилки (10-20%), разрыхляющие среду.

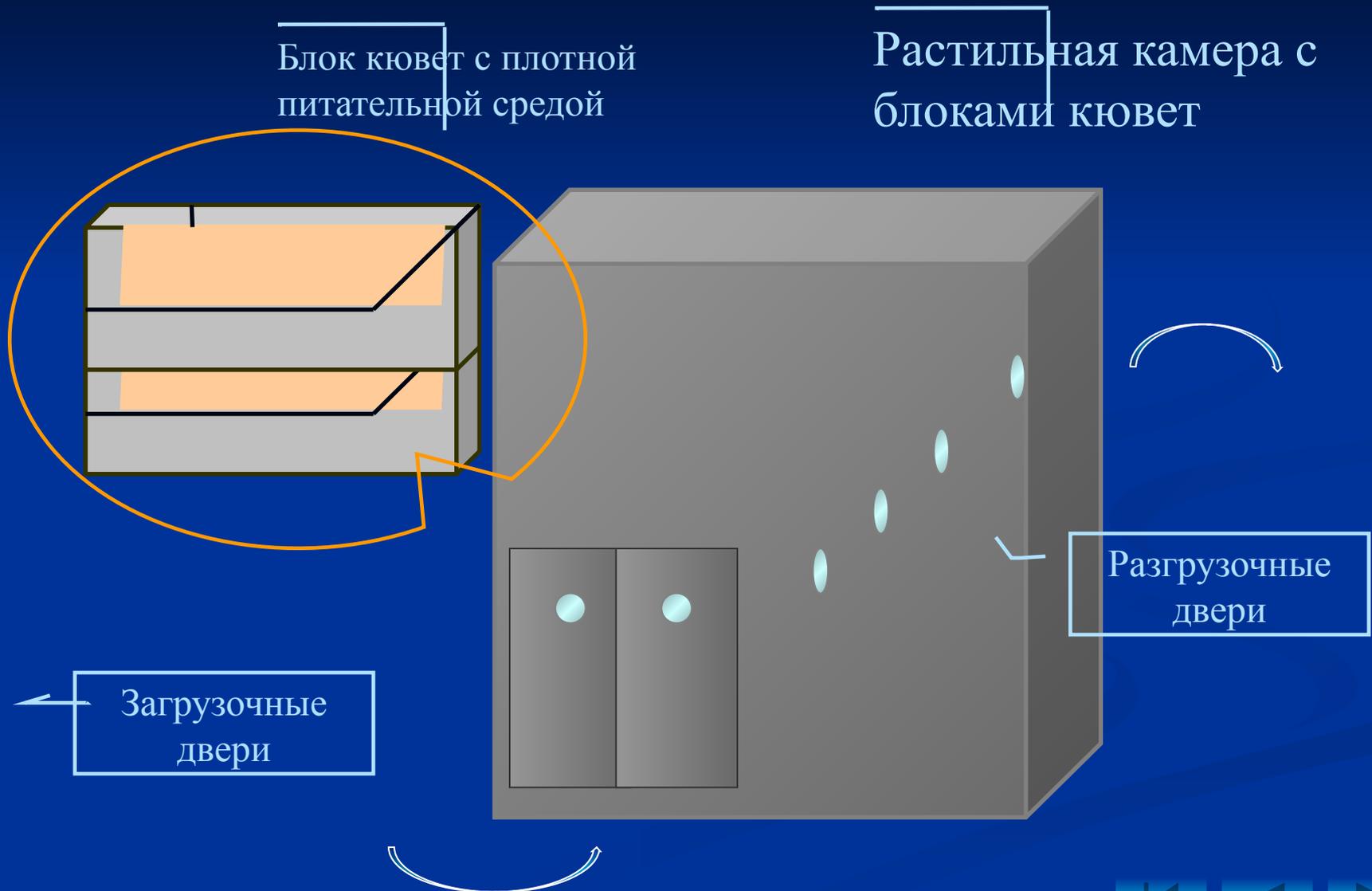
В жидких средах

микроорганизмы развиваются в верхнем слое жидкости.

неполное использование питательной среды, слабое развитие продуцента будет, незначительный выход целевого продукта



Устройства для поверхностного культивирования



Непрерывное культивирование

Непрерывное культивирование - длительное культивирование микроорганизмов (до 200 суток и более) при постоянном поступлении питательных веществ в реактор и удалении продуктов метаболизма и использованной среды.

В результате микроорганизмы остаются в определенном физиологическом состоянии, и концентрация клеток остается постоянной. Основным показателем является скорость потока среды за единицу времени.



Примеры производств на основе непрерывного культивирования:

1. Производство уксуса. Содержащий спирт субстрат (отходы виноделия) просачивается через твердую насадку, на которой в виде пленки растет смешанная культура микроорганизмов, окисляющих этанол в уксусную кислоту.
2. Промышленная очистка сточных вод. Сточные воды просачиваются через фильтры, состоящие из камней, фрагментов керамики, пластика. На фильтрах растет пленка из микроорганизмов, окисляющих медленно протекающие воды. Чистая вода выходит из реакторов.
3. Производство кормовых дрожжей - при непрерывном культивировании в 3 раза больше, чем при прерывистом.



Необходимые условия непрерывного культивирования

- Оптимальный состав питательной среды, рН, температура, кислород и т.д.
- Постоянный отвод продуктов обмена из зоны роста.
- Постоянное поступление новой питательной среды.
- Стабилизация кривой роста в нужной фазе.

Особенности непрерывного культивирования

Преимущества:

1. Необходимый продукт получается постоянно в процессе культивирования.
2. Не требуется часто прерывать производственный процесс, что является экономически выгодным
3. Обеспечивается полная переработка подаваемого питательного субстрата
4. Непрерывный процесс обеспечивает однородность и стандартность конечного продукта.
5. Условия культивирования постоянны и легко регулируются.
6. Непрерывная система – открытая система, стремящаяся к динамическому равновесию
7. Для культивирования нет необходимости строго соблюдать правила асептики, что значительно удешевляет производство.

Недостатки

1. Сложность поддержания полной стерильности при длительном постоянном культивировании определенного вида микроорганизма.
2. Возможность попадания в реактор посторонних микроорганизмов, что приведет к большим затратам на остановку и очистку оборудования.
3. Возможность появления нежелательных мутантов с неизвестными свойствами в процессе длительного культивирования микроорганизмов.



Аппараты для непрерывного культивирования

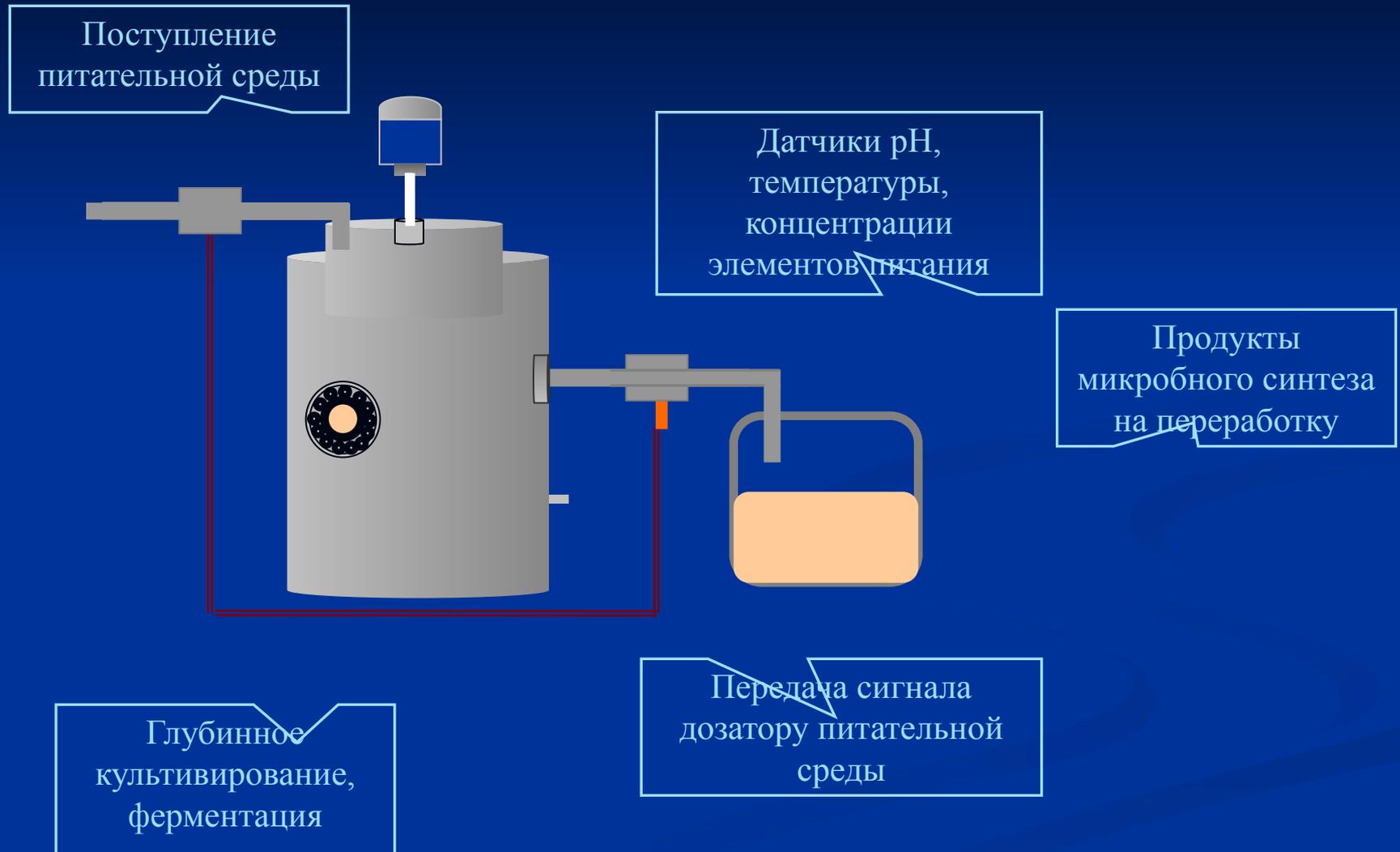
Виды аппаратов в зависимости от контролируемых параметров

Хемотрат – аппарат, обеспечивающий оптимальные температурные условия и постоянное поступление свежей питательной среды при одновременном удалении части бактериальной культуры.

Турбидостат – аппарат, обеспечивающий поддержание постоянной плотности бактериальной суспензии (мутности, измеряемой фотоэлементом). количество поступающей в аппарат питательной среды регулируется автоматически с тем, чтобы мутность суспензии была постоянной.



Схема работы хемостата



Периодическое культивирование микроорганизмов

Периодическое культивирование - непродолжительное культивирование (от нескольких часов до нескольких дней) в условиях несменяемой питательной среды, продолжающееся до максимальной концентрации необходимого продукта в среде.

Недостатки:

1. Периодическое прерывание процесса, что экономически невыгодно.
2. Необходимость тщательной подготовки (стерилизация оборудования, питательной среды, воды, воздуха), что связано с затратами.
3. Обеспечение роста только одной культуры в процессе всего цикла.
4. Постоянный контроль за процессом, что требует отбора проб и может нарушить стерильность.
5. Из 6-ти фаз развития популяции первые две – лаг-фаза и переходная фаза являются потерей времени, т.к. продукт в этот период не образуется.



Полупериодическое культивирование

- Процесс регулируемый, что позволяет вносить поправки в период ферментации
- Улучшается рост продуцента, и следовательно, биосинтез целевого продукта
- Метод более совершенен по сравнению с периодическим культивированием

Отъемно-доливной метод

- Метод является промежуточным между периодическим культивированием и непрерывным.
- Культуральная жидкость периодически, крупными партиями (более крупными, чем при непрерывном процессе) отбирается для дальнейшей обработки.
- На место отобранной жидкости доливается новая среда.



Конец

