

Способы и системы культивирования микроорганизмов

1. Способы культивирования микроорганизмов.
2. Системы культивирования микроорганизмов.
3. Методы, используемые в биотехнологическом производстве.

Биотехнологические процессы воспроизводства микроорганизмов могут быть основаны на **периодическом или непрерывном культивировании.**



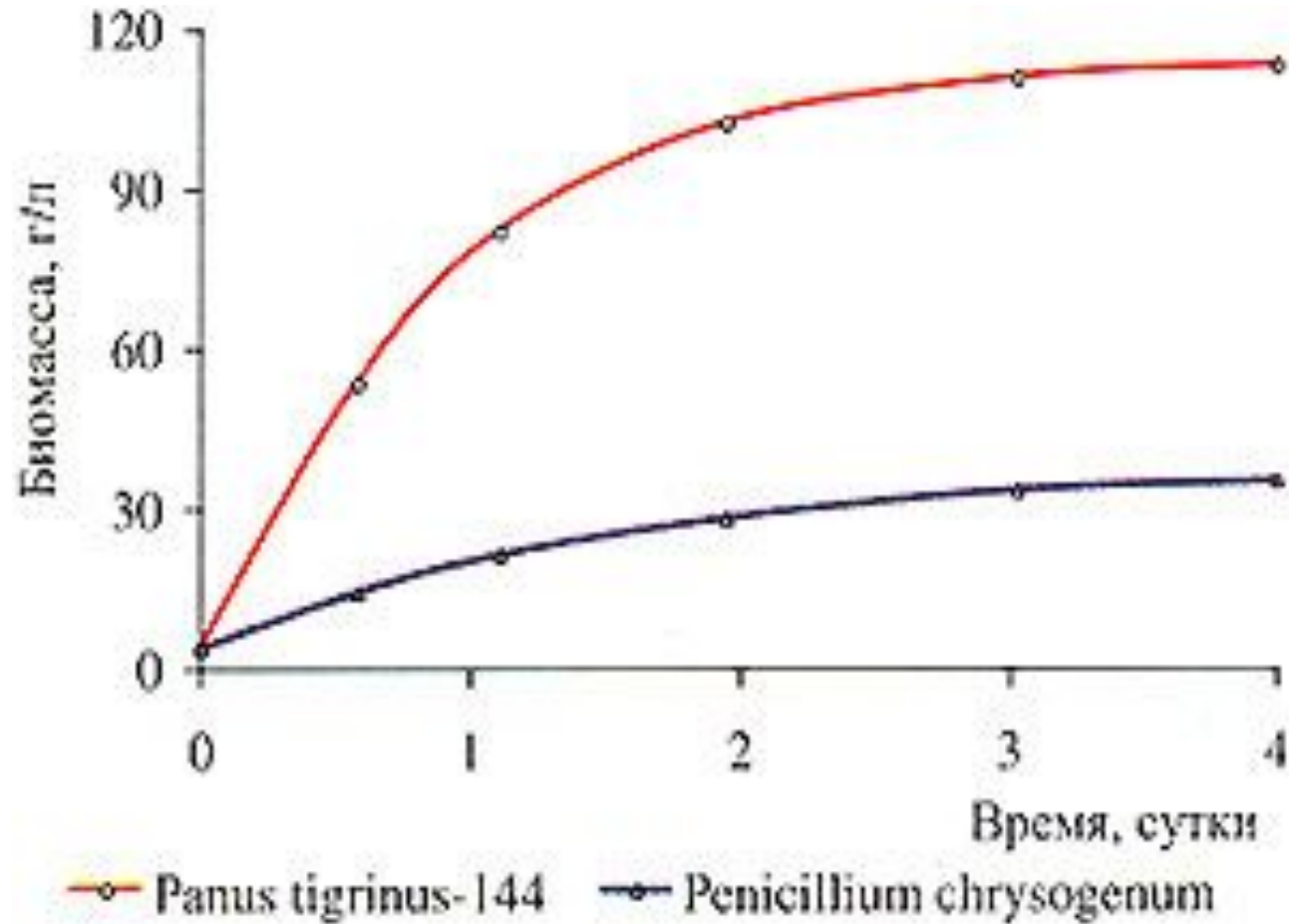
- **Биореактор, ферментер или ферментатор** - это закрытая или открытая емкость, в которой при определенных условиях (давление, температура, концентрация сухих веществ, рН среды и т.д.) протекает на клеточном или молекулярном уровне контролируемая реакция, осуществляемая с помощью микроорганизмов.

- Периодический процесс включает:
- а) стерилизацию сред, биореакторов и вспомогательного оборудования;
- б) загрузку аппарата питательной средой;
- в) внесение посевного материала (клеток, спор);
- г) рост культуры, который может совпадать во времени со следующим этапом или предшествовать ему;
- д) синтез целевого продукта;
- е) отделение и очистку готового продукта.

Этапы роста культуры

- а) лаг-фазу - сравнительно медленный рост внесенной культуры, осваивающей новую среду обитания в объёме биореактора;
- б) экспоненциальную фазу - бурное деление клеток, сбалансированный рост культуры;
- в) фазу замедленного роста, связанного с исчерпанием питательных субстратов и накоплением токсических продуктов метаболизма;
- г) стационарную фазу - прирост клеток равен их убыли;
- д) фазу отмирания - постепенное снижение числа жизнеспособных клеток.

Динамика накопления биомассы различными популяциями грибов



- Биотехнологически ценные продукты синтезируются в экспоненциальную фазу (нуклеотиды, многие ферменты, витамины - так называемые **первичные метаболиты**) или в стационарную фазу роста (антибиотики, красящие вещества и т.д. — так называемые **вторичные метаболиты** или идиоолиты).

Периодическое культивирование с подпиткой:

- помимо внесения питательного субстрата в реактор до введения в него биообъекта, в процессе культивирования в аппарат добавляют питательные вещества через определенные промежутки времени порциями или непрерывно «по каплям». Иногда дополнительно вносят биообъект.

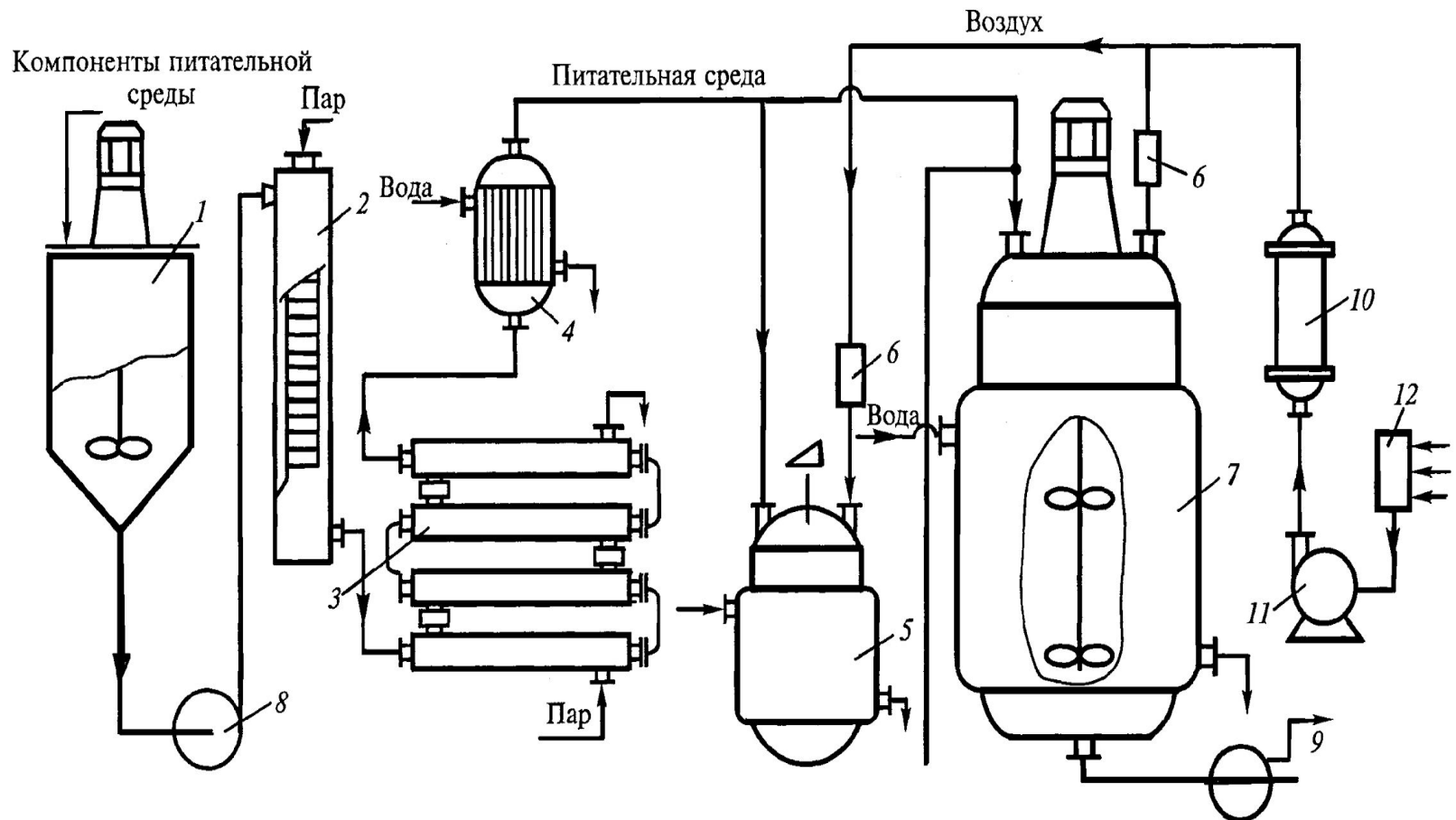
Отъемнодоливочное культивирование или полунепрерывным культивированием

- часть объема из биореактора время от времени изымается при добавлении эквивалентною объема среды. Это приводит к регулярному омолаживанию культуры и к задержке ее перехода к фазе отмирания. Такой режим культивирования в значительной мере уподобляется непрерывному процессу.

Непрерывные процессы

- биообъект постоянно поддерживается в экспоненциальной фазе роста. Обеспечивается непрерывный приток свежей питательной среды в биореактор и отток из него культуральной жидкости, содержащей клетки и продукты их жизнедеятельности.
- Фундаментальным принципом непрерывных процессов служит равновесие между приростом биомассы за счет деления клеток и их убылью в результате разбавления свежей средой. Различают хеMOSTатный и турбидостатный режимы непрерывного культивирования.

Глубинный метод культивирования продуцентов ферментов



- Глубинный метод культивирования заключается в выращивании микроорганизмов в жидкой питательной среде. Он технически более совершенен, чем поверхностный, так как легко поддается механизации и автоматизации.
- Весь процесс должен проводиться в строго асептических условиях, что с одной стороны, является преимуществом метода, а с другой - составляет наибольшую техническую трудность, т.к. нарушение асептики часто приводит к прекращению образования фермента.
- Концентрация фермента в среде при глубинном культивировании обычно значительно ниже, чем в водных экстрактах поверхностной культуры. Фильтраты культуральных жидкостей содержат не более 3% сухих веществ. Это вызывает необходимость предварительного концентрирования фильтратов перед тем, как выделять ферменты любым методом

Поверхностный метод культивирования продуцентов ферментов

- При поверхностном методе культура растет на поверхности твердой увлажненной питательной среды. Мицелий полностью обволакивает и довольно прочно скрепляет твердые частицы субстрата, из которого получают питательные вещества. Поскольку для дыхания клетки используют кислород, то среда должна быть рыхлой, а слой культуры-продуцента небольшим.
- Выращивание производственной культуры происходит обычно в асептических условиях, но среду и кюветы необходимо простерилизовать. Перед каждой новой загрузкой также необходима стерилизация оборудования.
- Преимущества поверхностной культуры: значительно более высокая конечная концентрация фермента на единицу массу среды (при осахаривании крахмала 5 кг поверхностной культуры заменяют 100 кг культуральной жидкости), поверхностная культура относительно легко высушивается, легко переводится в товарную форму.

2. Системы культивирования микроорганизмов

- *Культивирование микроорганизмов может осуществляться в открытой или закрытой системе.*

Закрытая система

- Ни одна составная часть этой системы после начала процесса в биореакторе не вводится и не выводится. В периодическом процессе в ферментер сначала подают все питательные вещества, водную фазу и посевной материал.
- Процесс идет в соответствии с кривой роста микроорганизмов с заключительным замиранием реакции, обусловленным недостатком субстрата, накоплением токсических метаболитов, неблагоприятным изменением физико-химических условий окружающей среды (рН, температура, парциальное давление кислорода, вязкость), гибелью и лизисом микроорганизмов. Во время культивирования все параметры непрерывно изменяются.
- Развитие управляемых периодических процессов привело к созданию **объемно-доливочной системы**: в процессе культивирования главные компоненты среды добавляют дробно, чем исключают субстратное ингибирование. Никакие жидкие компоненты из среды не отводят

- **Открытые системы работают** в непрерывном потоке.
- В процессе реакции часть отработанной питательной среды из биореактора удаляют и добавляют новую, что обеспечивает непрерывность процесса.
- В единицу времени субстрата вводят не больше, чем может переработать культура.
- Проводят непрерывное культивирование по крайней мере с одной лимитирующей рост концентрацией вещества.
- Регулирование осуществляют поддержанием концентрации биомассы или продукта на постоянном уровне путем изменения концентрации субстрата (турбидостат) или применения строго лимитированной концентрации питательных веществ с соответствующим изменением концентрации клеток или продукта (хеостат).

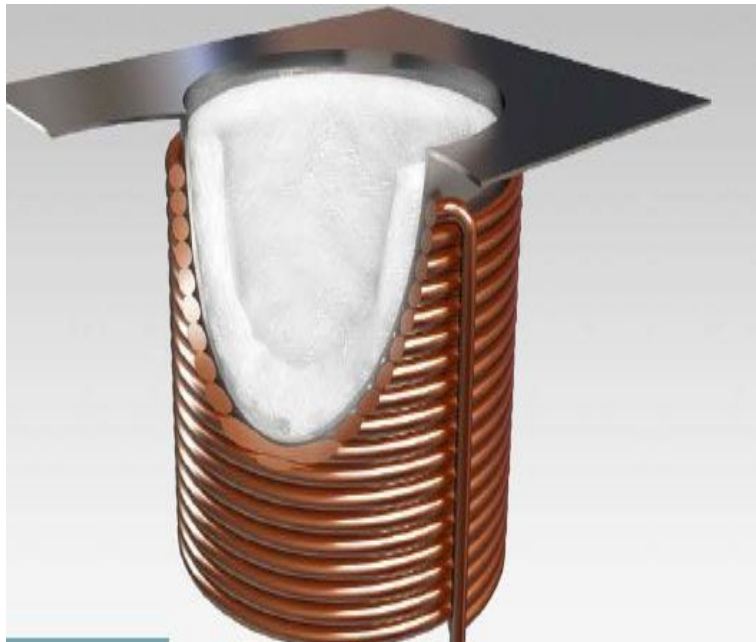
Методы, используемые в биотехнологическом производстве

- Методы хранения посевного материала. При промышленном культивировании клеток в биореакторах идет процесс постепенного вытеснения менее приспособленных форм более приспособленными, часто менее продуктивными по отношению к вырабатываемым веществам. Он получил название **автоселекции**. В связи с этим встает проблема длительного хранения клеток без утраты ценных свойств. Это возможно, если резко затормозить все протекающие в них

Лиофильное высушивание

(обезвоживание после замораживания при температуре $-40\sim 60^{\circ}\text{C}$ и ниже).

- Применяется в отношении продуцентов антибиотиков.
- а) Высушивание на воздухе в стерильной среде (на почве, бумаге, дисках агар-агара и т.д.).
- б) Сохранение спор (пригоден для спорообразующих бактерий рода *Bacillus*).
- в) Криоконсервация - глубокое замораживание клеток с их последующим хранением в жидком азоте ($- 196^{\circ}\text{C}$) или в



Выделение целевого продукта.

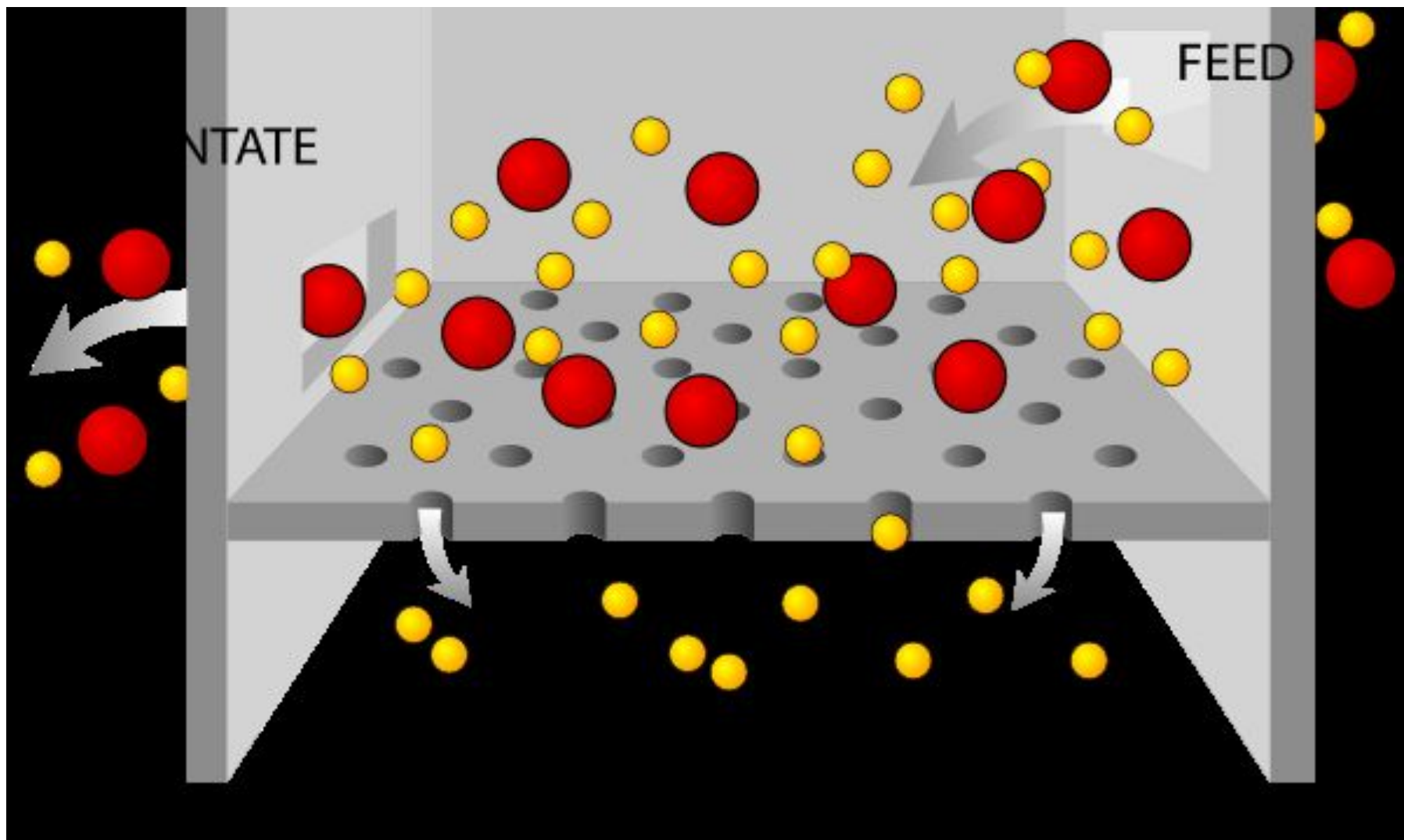
- Это завершающая стадия биотехнологического процесса.
- Продукт может накапливаться в клетке или выделяться в культуральную жидкость.
- Наиболее сложно выделение продукта, накапливающегося в клетках.
- Для этого клетки необходимо отделить от культуральной жидкости, разрушить, затем целевой продукт очистить от массы компонентов разрушенных клеток.

- Первым этапом на пути к очистке целевого продукта является отделение биомассы от культуральной жидкости - **сепарация.**

Виды сепарации:

- **1. Флотация.**
- Если клетки продуцента в биореакторе из-за низкой смачиваемости накапливаются в поверхностных слоях жидкости, то жидкость предварительно вспенивают, затем отделяют ее верхний слой с клетками.
- Флотаторы различных конструкций сцеживают, откачивают или соскребают пену, состоящую из пузырьков газа с прилипшими к ним клетками.
- Флотацию широко используют как первый этап отделения дрожжевой массы для осветления культуральной жидкости.

- 2. Фильтрация - задержание биомассы на пористой фильтрующей перегородке. Применяют фильтры однократного или многократного использования: барабанные, дисковые, ленточные, тарельчатые, карусельные, вакуум-фильтры, фильтр-прессы различных конструкций, мембранные фильтры. Диаметр пор может превышать размеры клеток. Иногда биомассу сдувают с поверхности фильтра сжатым воздухом или срезают специальным ножом.



- **Центрифугирование** - осаждение взвешенных в жидкости частиц с применением центробежной силы. Требуется более дорогостоящего оборудования, чем фильтрование. Поэтому оно оправдывает себя, если:
 - а) суспензия фильтруется медленно;
 - б) поставлена задача максимального освобождения культуральной жидкости от содержащихся частиц;
 - в) необходимо наладить непрерывный процесс сепарации в условиях, когда фильтры рассчитаны только на периодическое действие.

- **Вторым этапом** при получении продукта, накапливающегося в клетках, является разрушение клеток, которое проводят физическим, химическим и химико-ферментативным методами.

- **Физическое разрушение** проводят ультразвуком, с помощью вращающихся лопастей или вибраторов, встряхиванием со стеклянными бусами, продавливанием под высоким давлением через узкое отверстие, раздавливанием замороженной массы, растиранием в струнке, осмотическим шоком, замораживанием - оттаиванием, сжатием с последующим резким снижением давления.
- Этим способам дезинтеграции клеток присуща определенная не избирательность: обработка может отрицательно влиять на качество получаемого продукта.
- Физические методы позволяют целенаправленно выделять какую-либо одну фракцию внутриклеточного содержимого.

- **Химическое и химико-ферментативное разрушение клеток** избирательно, не всегда пригодно. Его проводят обработкой клеток толуолом или бутанолом при промышленном получении дрожжевого автолизата и ряда ферментов.
- **Эффективный лизис клеток вызывают** антибиотики полимиксины, тироцидины. новобиоцин, нистатин и другие, некоторые по верхностно-активные вещества, а также глицин.

- Разрушенные клеточные стенки отделяют методами сепарации.
- В большинстве биотехнологических процессов клеточные стенки отбрасывают как балласт, но возможно и промышленное получение компонентов клеточных стенок как целевого продукта.

- **Третий этап** - выделение целевого продукта из культуральной жидкости или гомогената разрушенных кислот проводят путем его осаждения, экстракции или адсорбции.

Осаждение растворенных веществ

- возможно физическими (нагревание, охлаждение, разбавление или концентрирование раствора) или химическими методами, переводящими отделяемый продукт в малорастворимое состояние. Так, пенициллин переводят в кристаллический осадок в присутствии соединений калия или натрия.
- Белки осаждают добавлением сульфата аммония, органических растворителей (этанола, ацетона).
- Нуклеиновые кислоты осаждают с помощью полииминов, основные группы которых вступают во взаимодействие с их фосфатными группами. Современной модификацией метода является аффинное осаждение.

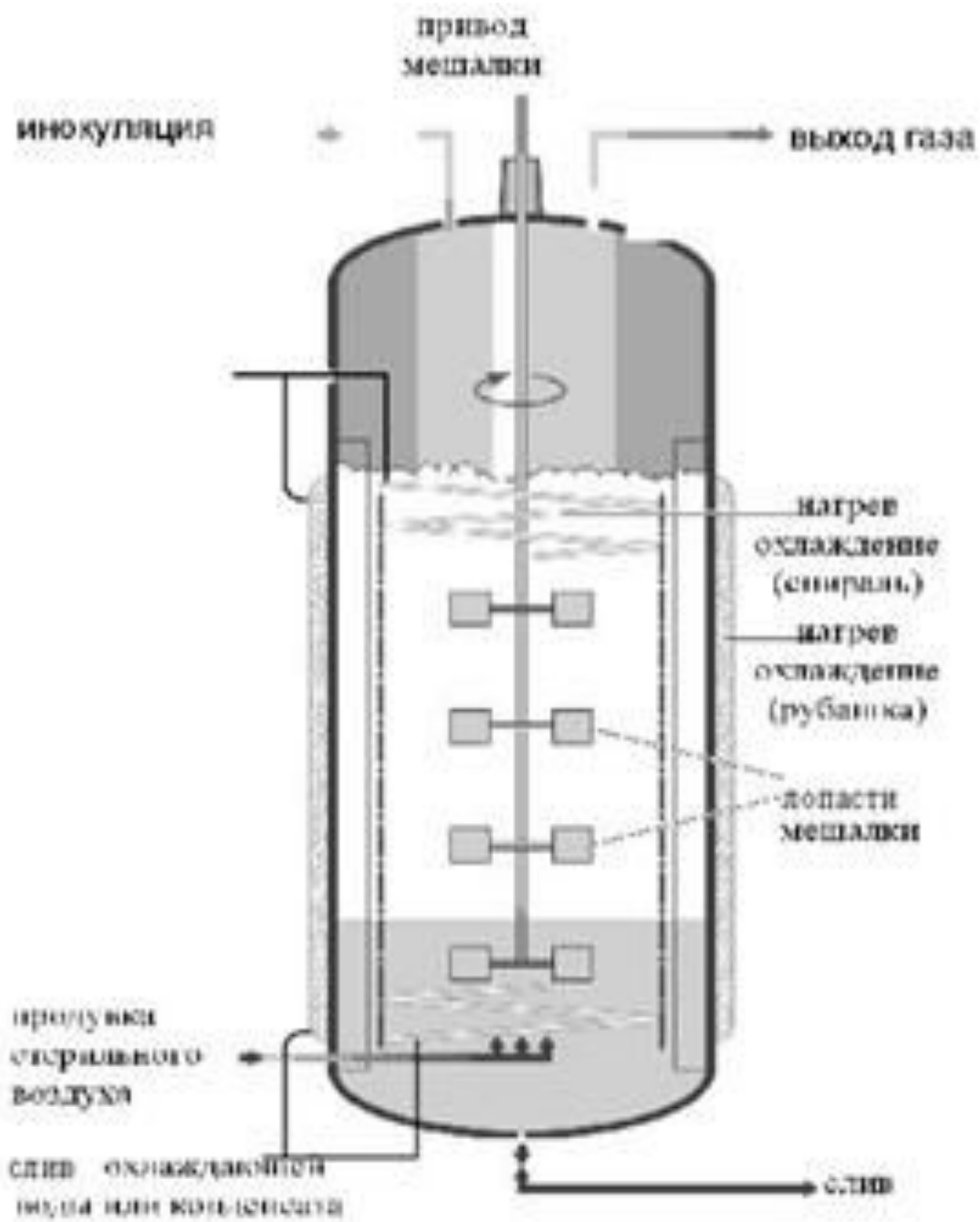
Аффинное осаждение — affinity precipitation

- **Система, в которой осадок образуется в результате реакции между двумя типами молекул благодаря связыванию в месте специфического взаимодействия (*например, фермента и субстрата, антитела и антигена*).**

Экстракция — извлечение продукта из твердого (**твердо-жидкофазная**) или жидкого (**жидко-жидкофазная**) образца.

- К твердо-жидкофазной экстракции относится обливание образца водой с целью извлечения из него растворимых веществ, например солей металлов из руд, подвергнутых бактериальной обработке, или растворимых продуктов из массы субстрата (соломы и т.д.) при твердофазном культивировании. Применяют органические растворители, например, при экстракции клеточной массы ацетоном, переводящим в раствор ряд липидных и белковых компонентов
- Экстракция может быть разовой (однократной или многократной) или непрерывной (**перколяция**)..

- **Жидко-жидкофазная экстракция** - добавление органических растворителей для извлечения из культуральной жидкости антибиотиков, витаминов, каротиноидов, липидов, некоторых гидрофобных белков.
- Витамин В12 экстрагируют фенолом и его производными (крезол, другие алкилфенолы, галогениды). Используют бензиловый спирт, особенно в щелочных условиях.
- Фосфолипиды извлекают путем экстракции хлороформом.



- Полностью избежать нагревания, губительного для многих ценных веществ, позволяют методы холодной экстракции (**криоэкстракции**).
- Она как бы нивелирует различие между твердым субстратом и культуральной жидкостью, поскольку и то и другое находится в замороженном состоянии.
- Криоэкстракция осуществляется растворителями, кипящими при низких температурах и находящимися при комнатной температуре в газообразном состоянии.
- Криоэкстракция может использоваться в комбинации с криоконсервацией клеток.
- Урожай клеток длительное время хранится без потери свойств в условиях глубокого замораживания.

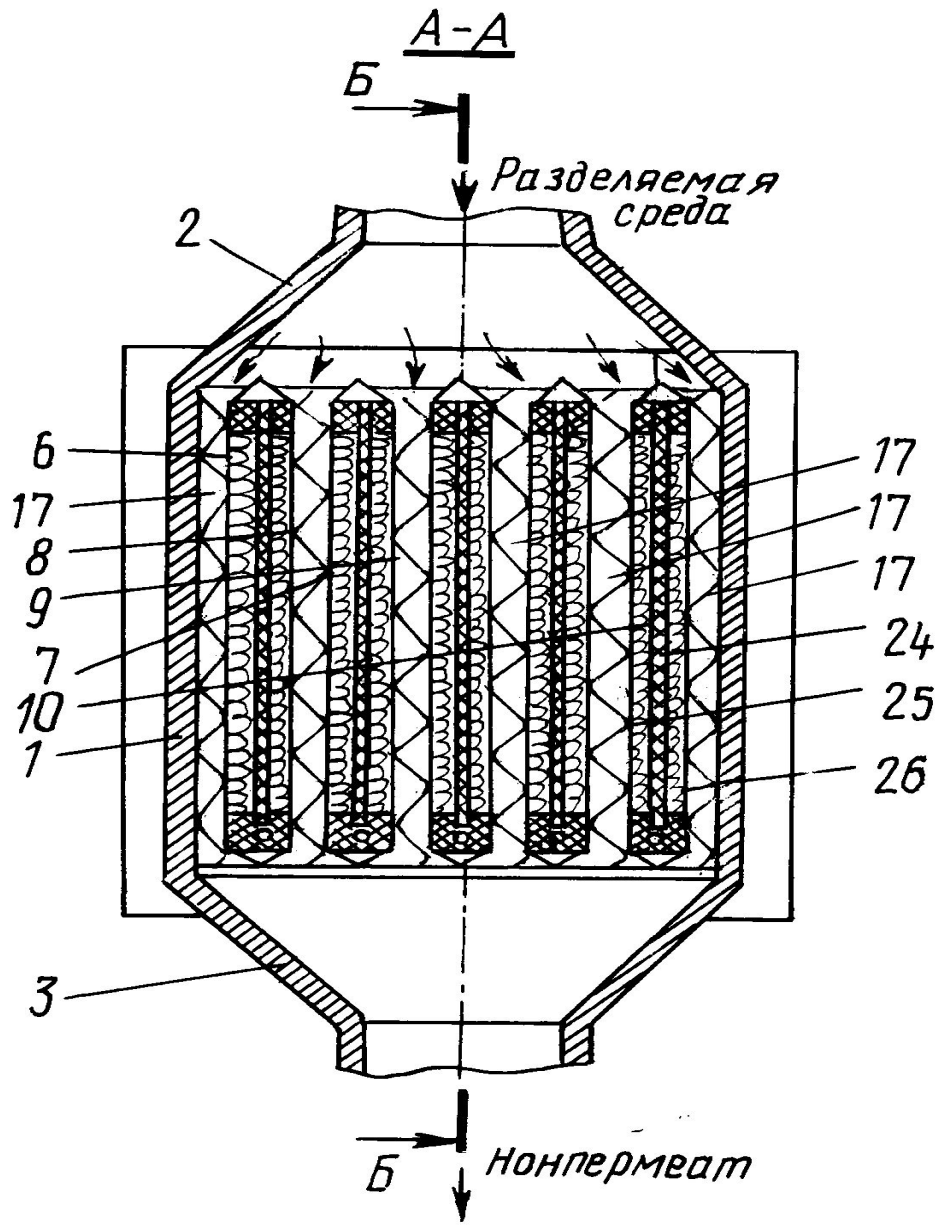
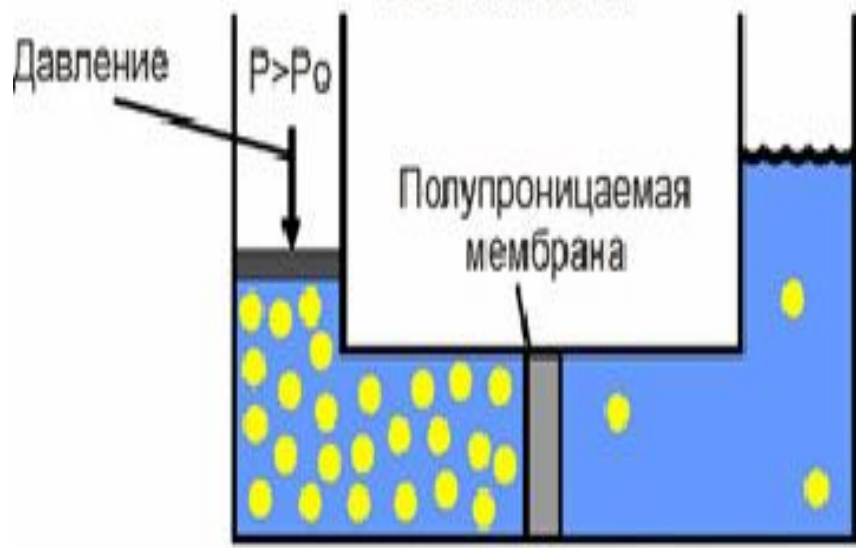
- **Адсорбция** - частный случай экстракции, при котором экстрагирующим веществом из жидкой или газовой фазы является твердое тело.
- Хорошими адсорбентами являются древесный уголь, глины с развитой пористой поверхностью. Путем адсорбции из культуральной жидкости выделяют антибиотики и витамины.
- К современным методам разделения веществ, основанным на принципах экстракции и адсорбции, относятся хроматография, электрофорез, изотахофорез, электрофокусировка.

- **ХРОМАТОГРАФИЯ** - это метод разделения, анализа и физ.-хим. исследования веществ.
- **Электрофорез** — направленное движение коллоидных частиц или макроионов под действием внешнего электрического поля.
- **Изотахорез (ИТФ)** — метод разделения различных типов ионов по их подвижности в электрическом поле. При ИТФ все виды ионов мигрируют в одном направлении, образуя набор зон, находящихся в равновесном состоянии и перемещающимися с одинаковыми скоростями.
- **Электрофокусирование** - метод разделения белков, основанный на перемещении их молекул под действием постоянного напряжения в область с величиной рН, соответствующей, изоэлектрической точке данного белка

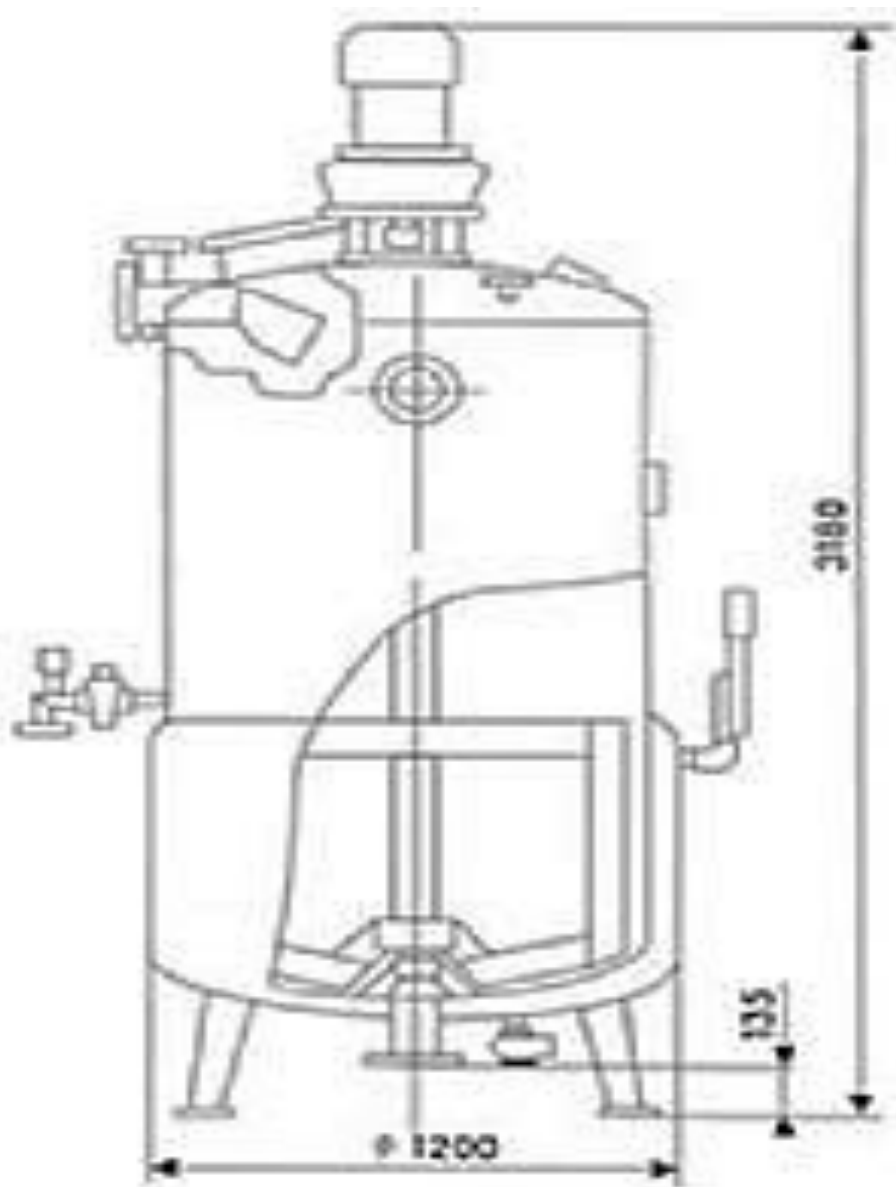
Концентрирование, обезвоживание, модификация и стабилизация продукта

- **Концентрирование** продукта проводят методами обратного осмоса, ультрафильтрации, выпаривания.
- Если мембрана пропускает воду, задерживая растворенные в ней вещества, речь идет об **осмосе**.
- **Ультрафильтрация** - отделение веществ с помощью мембранных фильтров.

ОБРАТНЫЙ ОСМОС



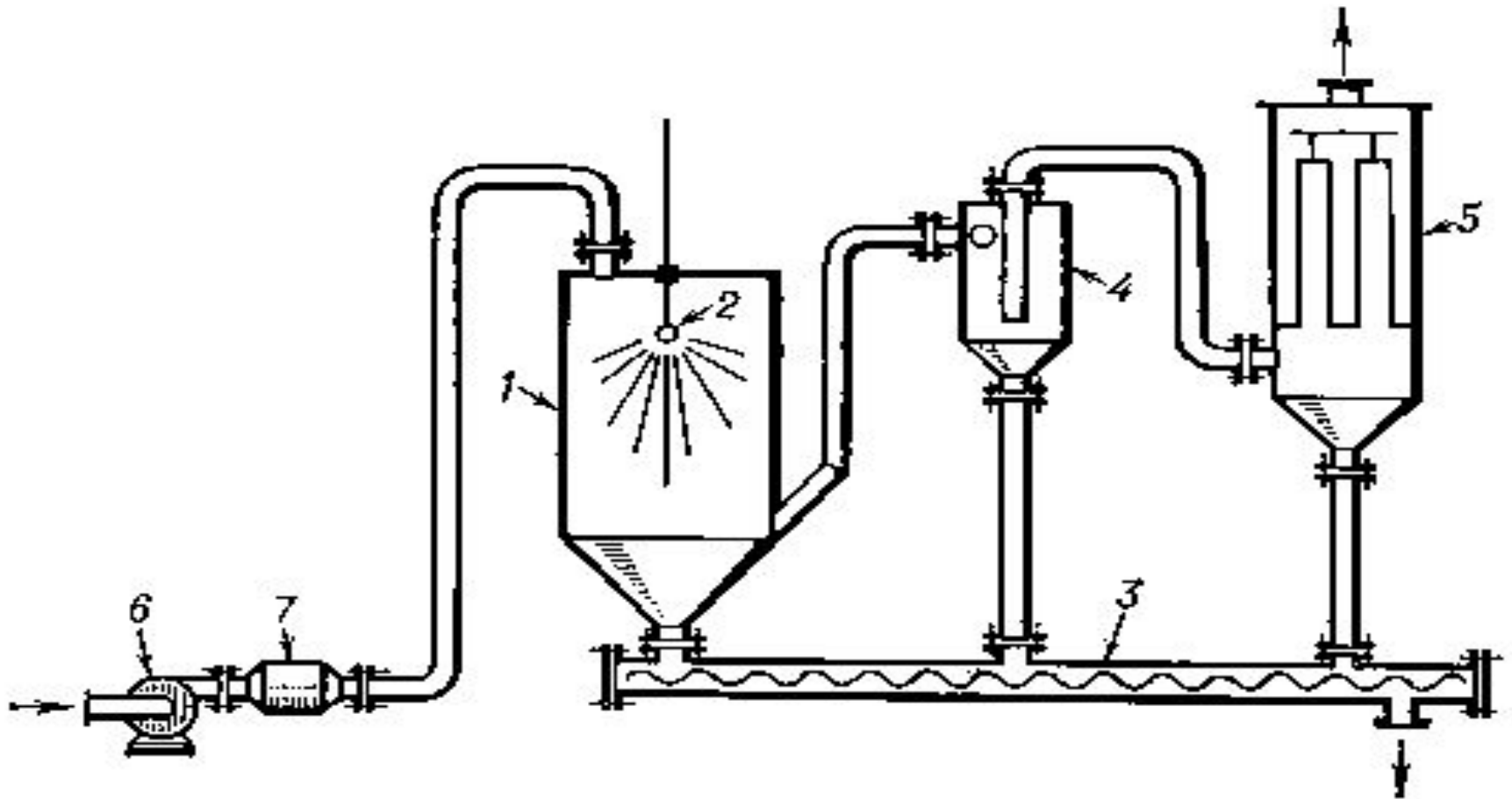
Фиг. 1



- **Выпаривание.** Его недостаток состоит в необходимости нагревания, которое проводят при низком давлении. Используют вакуум-выпарные аппараты. Нагревающим агентом чаще всего служит водяной пар, хотя используют также обогрев жидким теплоносителем или электрообогрев. Пар характеризуется большой теплотой конденсации и облегчает регулировку процесса выпаривания.

- **Обезвоживание продукта** - сушка на подносах, на ленточном конвейере с подогревом, подачей газообразного нагревательного агента (воздух, CO_2 , дымовые или топочные газы и др.) в сушильный аппарат, в вакуум - сушильных шкафах, в барабанных и распылительных сушилках.

Распылительная сушилка



- **Модификация продукта** - перестройка полученных соединений животного, растительного или микробного происхождения с целью придания им специфических свойств, необходимых человеку.
- Химическая модификация необходима в тех случаях, когда биотехнологический процесс дает лишь «заготовку» целевого продукта.
- Модификация - необходимый этап в получении ряда ферментов, гормонов, препаратов медицинского назначения. Например, у бычьего инсулина «отстригают» аминокислотные остатки, после чего он становится идентичным человеческому гормону.

- Стабилизация продукта направлена на сохранение свойств продукта в период его хранения и использования потребителем (добавление наполнителей, модификация и др.). Включает физико-химические воздействия на продукт.
- Сушка повышает устойчивость продукта к внешним воздействиям. Обезвоживание ферментов вызывает их устойчивость к нагреванию.
- К стабилизации продуктов, в том числе кормового микробного белка, ведет добавление наполнителей из грибного мицелия, пшеничных отрубей, кукурузной муки, которые сами обладают питательной ценностью.



- **Стабильность** - неизменность свойств содержащихся в растворах лекарственных веществ - достигается подбором оптимальных условий стерилизации, использованием консервантов, применением стабилизаторов, соответствующих природе лекарственных веществ.
- Стабилизация солей сильных оснований и слабых кислот осуществляется добавлением щелочи или натрия гидрокарбоната.
- К числу солей, стабилизируемых едким натрием или натрия гидрокарбонатом, относятся: никотиновая кислота, кофеин-бензоат натрия, натрия тиосульфат, натрия нитрит.