

Промышленная микробиология, ферментеры и ферментация

Химический состав микробных биомасс и традиционных белковых продуктов

Состав, %	Водоросли	Нитчатые грибы	Дрожжи	Бактерии	Соя	Рыбная мука
Белок	47–63	31–50	47–56	72–83	45	64
Жиры	7–20	2–8	2–6	1–3	1	9
Зола	7	2	6	8	6	18
Лизин	2.4	1.5	4.2	4.1	2.8	4.0
Метионин- Цистеин	1.7	0.8	1.7	2.3	1.3	2.8
Нуклеи- новые кислоты	3–8	9	6–12	8–16	Нет	Нет

Биообъект

– центральный и обязательный элемент биотехнологического производства, определяющий его специфику.

По производственным функциям:



Продуцент:

- полный синтез целевого продукта через ряд последовательных ферментативных реакций

Биокатализатор

катализ определенной ферментативной реакции, имеющей ключевое значение для получения целевого продукта

Микроорганизмы, используемые для получения целевых продуктов

Организм	Тип	Продукт
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Дрожжи	Пекарские дрожжи, пиво, вино, пищевой спирт
<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 B ₁₂
<i>Aspergillus oryzae</i>	Плесень	Амилаза
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Дрожжи	Лактаза
<i>Saccharomycopsis lipolytica</i>	Дрожжи	Липаза
<i>Bacillus</i>	Бактерии	Протеазы

Микроорганизмы, используемые для получения целевых продуктов

Организм	Тип	Продукт
<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
<i>E. coli</i> (рекомбинантные штаммы)	Бактерии	Инсулин, гормон роста, интерферон
<i>Blakeslea trispora</i>	Плесень	β -Каротин
<i>Phaffia rhodozyma</i>	Дрожжи	Астаксантин
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Бактерии	Биоинсектициды
<i>Bacillus popilliae</i>	Бактерии	Биоинсектициды

Структура БТ процесса

1. два активных и взаимосвязанных представителя средств производства – биообъект и «ферментер»;
2. чем выше темп функционирования биообъекта, тем более высокие требования предъявляются к аппаратному оформлению процессов;
3. оптимизации подвергают и биообъект и аппараты биотехнологического производства

Условия осуществления БТ

Условия осуществления БТ

1. Генетически обусловленная способность биообъекта к синтезу или специфической трансформации связанной с получением целевого продукта;
2. Защищенность биообъекта в БТ системе от внутренних и внешних факторов;
3. Обеспечение функционирующих в БТ системах биообъектов пластическим и энергетическим материалом в объемах и последовательности, гарантирующих нужную направленность и темп биотрансформации.

Основные типы биотехнологических процессов

```
graph TD; A[Основные типы биотехнологических процессов] --> B[Биологические  
Производство биомассы  
(белок одноклеточных)]; A --> C[Биохимические  
производство клеточных компонентов  
(ферменты, нуклеиновые кислоты)]; A --> D[Односубстратные конверсии  
(превращение глюкозы во  
фруктозу, D-сорбита в L-сорбозу  
при получении вит С)]; A --> E[Многосубстратные конверсии  
(обработка сточных вод,  
утилизация лигноцеллюлозных отходов)]; A --> F[Биоаналогичные  
Производство метаболитов – химических продуктов метаболической активности,  
первичные - аминокислоты, полисахариды  
вторичные - алкалоиды, стероиды, антибиотики];
```

Биологические
Производство биомассы
(белок одноклеточных)

Биохимические
производство клеточных компонентов
(ферменты, нуклеиновые кислоты)

Односубстратные конверсии
(превращение глюкозы во
фруктозу, D-сорбита в L-сорбозу
при получении вит С)

Многосубстратные конверсии
(обработка сточных вод,
утилизация лигноцеллюлозных отходов)

Биоаналогичные
Производство метаболитов – химических продуктов метаболической активности,
первичные - аминокислоты, полисахариды
вторичные - алкалоиды, стероиды, антибиотики

Схема БТ производства



1. Вспомогательные операции

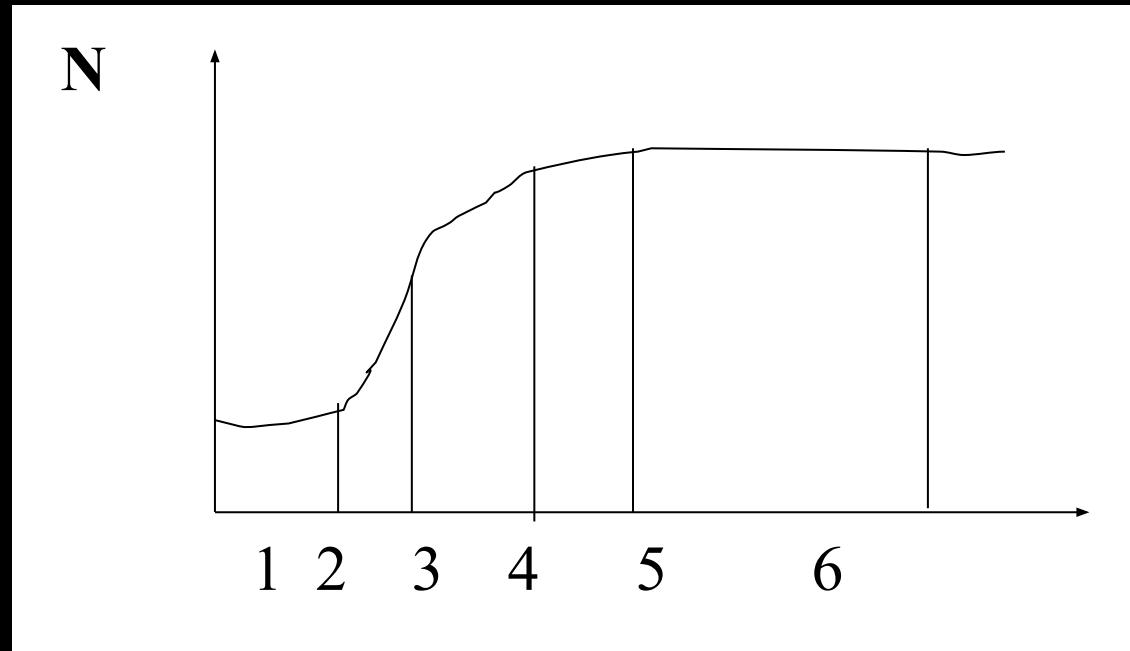
1.1. Подготовка посевного материала (инокулята):

засев пробирок, качалочных колб (1-3 сут),
инокулятора (2-3 % 2-3 сут),
посевного аппарата (2-3сут).

1.2. Подготовка питательной среды

- выбор и реализация рецептуры среды,
- стерилизация гарантирующая сохранность пластических и энергетических компонентов, в исходном количестве и качестве.
- Особенностью биообъектов является потребность в многокомпонентных энергетических и пластических субстратах, содержащих O, C, N, P, H – элементы необходимые для энергетического обмена и синтеза клеточных структур.

Кинетическая кривая роста



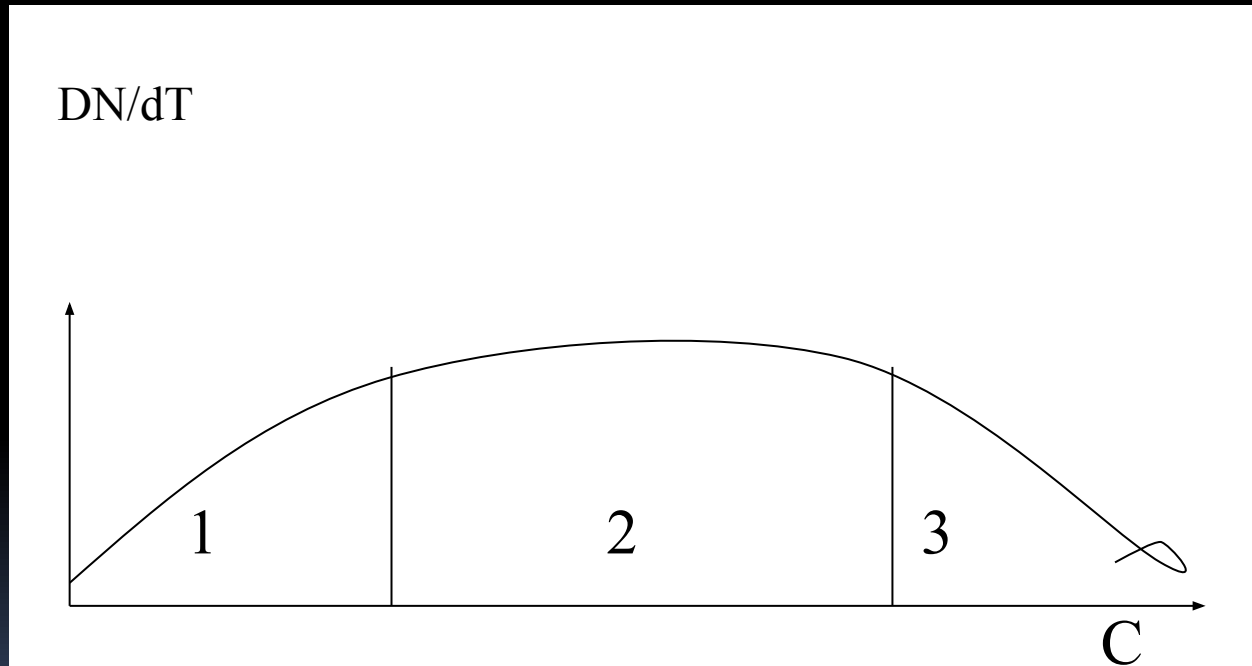
1. индукционный период (лаг-фаза)
2. фаза экспоненциального роста (накопление биомассы и продуктов биосинтеза)
3. фаза линейного роста (равномерный рост культуры)
4. фаза замедленного роста
5. стационарная фаза (постоянство жизнеспособных особей)
6. Фаза старения культуры (отмирания)

Содержание биогенных элементов в биообъектах, %

Микроорганизмы	элементы				
	углерод	азот	фосфор	кислород	водород
бактерии	50,4	12,3	4,0	30,5	6,8
дрожжи	47,8	10,4	4,5	31,1	6,5
грибы	47,9	5,2	3,5	40,4	6,7

Элементный состав и рост культур

Существует количественная закономерность влияния концентрации элементов питательной среды на скорость роста биомассы, равно как и взаимовлияние тех же элементов на удельную скорость роста биообъектов



C – концентрация лимитирующего компонента

DN/dT – скорость роста микроорганизмов.

1 -область лимитирования,

2- область оптимального роста,

3 – область ингибирования.

1.3. Стерилизация питательной среды

- **необходимо полностью исключить контаминантную флору и сохранить биологическую полноценность субстратов**

чаще автоклавирование, реже химические и физические воздействия.

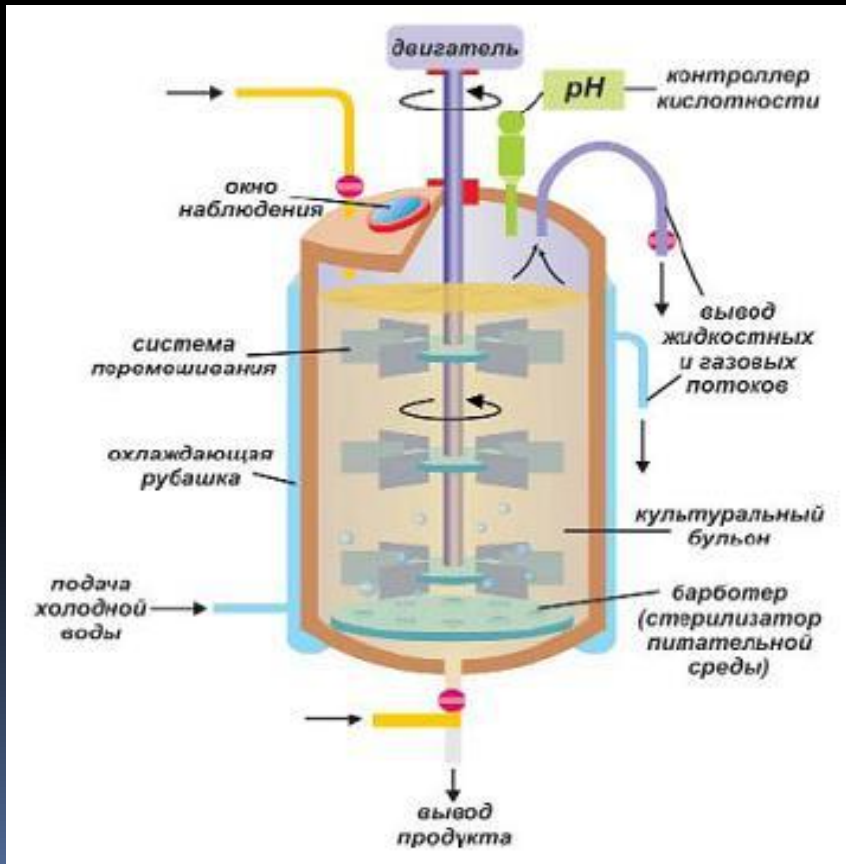
Эффективность выбранного режима стерилизации оценивают по константе скорости гибели микроорганизмов (берется из специальных таблиц) умноженная на продолжительность стерилизации.

1.4. Подготовка ферментера

- Стерилизация оборудования острым паром. Герметизация с особым вниманием к «слабым» точкам тупиковые штуцера малого диаметра, штуцера датчиков контрольно-измерительной аппаратуры.
- Выбор ферментера осуществляется с учетом критериев дыхания биообъекта, теплообмена, транспорт и превращения субстрата в клетке, скорость роста единичной клетки, время ее размножения и т.п.

Ферментация – основной этап БТ процесса

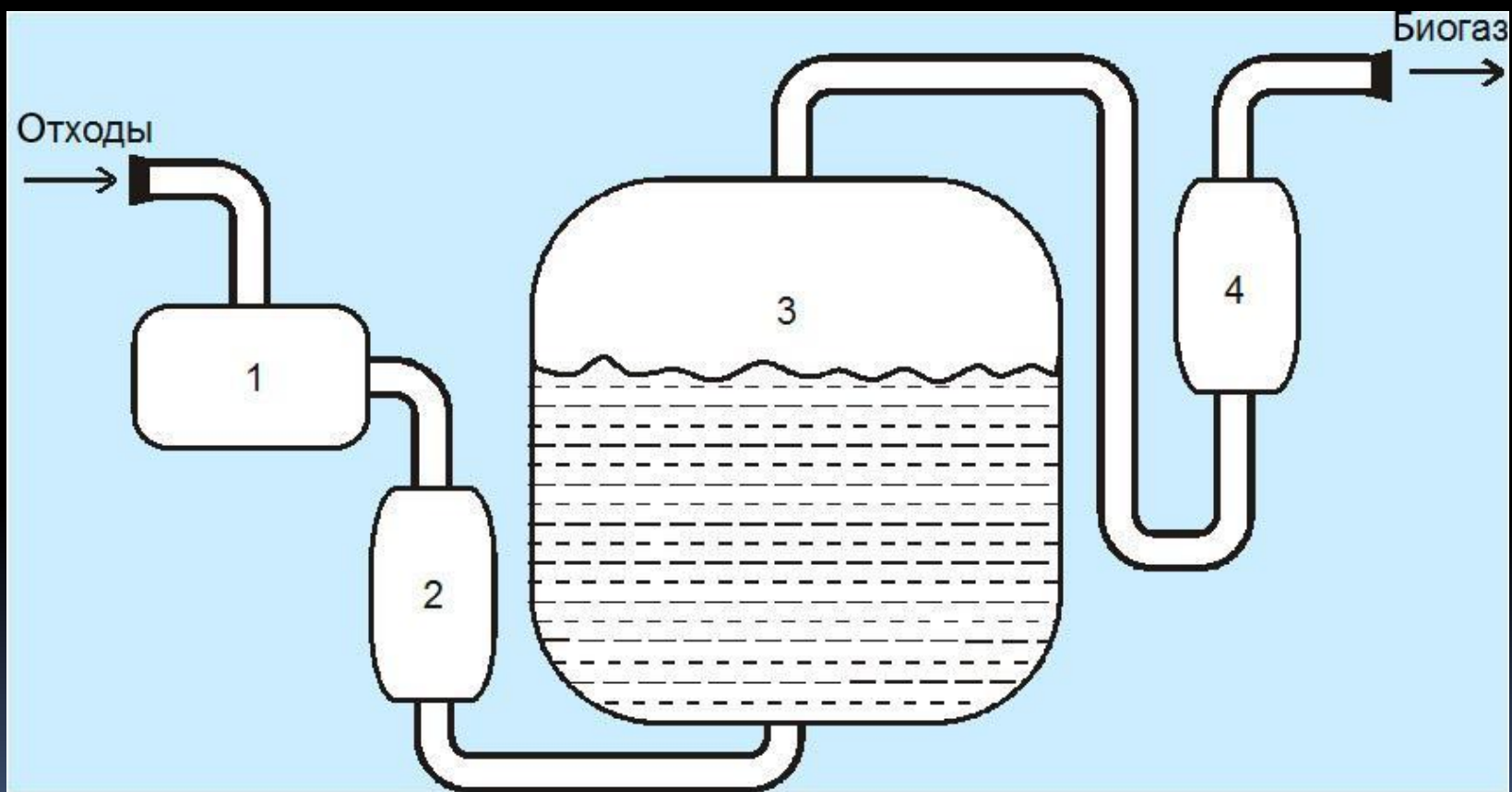
вся совокупность операций от внесения микробов в подготовленную и нагретую до необходимой температуры среду до завершения биосинтеза целевого продукта или роста клеток. Весь процесс протекает в специальной установке – ферментере.



❖ БТ процессы можно разделить на две группы - **периодические** и **непрерывные**.

- При **периодическом** способе производства стерилизованный ферментер заполняется питательной средой, уже содержащей нужные микроорганизмы. Биохимические процессы в этом ферментере продолжаются от нескольких часов до нескольких дней.
- При **непрерывном** способе подача равных объемов сырья (питательных веществ) и отвод культуральной жидкости, содержащей клетки продуцента и целевой продукт осуществляется одновременно. Такие ферментационные системы характеризуются как открытые.

Схема метановой установки



Типы биореакторов.

1. Реактор колоночного типа.



Реактор колоночного типа используется для иммобилизованных ферментов. Если много носителя, то возможно замедление тока растворителя.

2. Модифицированный реактор колоночного типа.



Модифицированный реактор колоночного типа используется для иммобилизованных клеток. Вверху сетка для сдерживания вспучивания при прохождении газа, имеется клапан для выхода газообразных продуктов. В реакторе имеется мешалка. Количество носителя уменьшается.

Аппаратурное оформление БТ процесса - ферментеры:

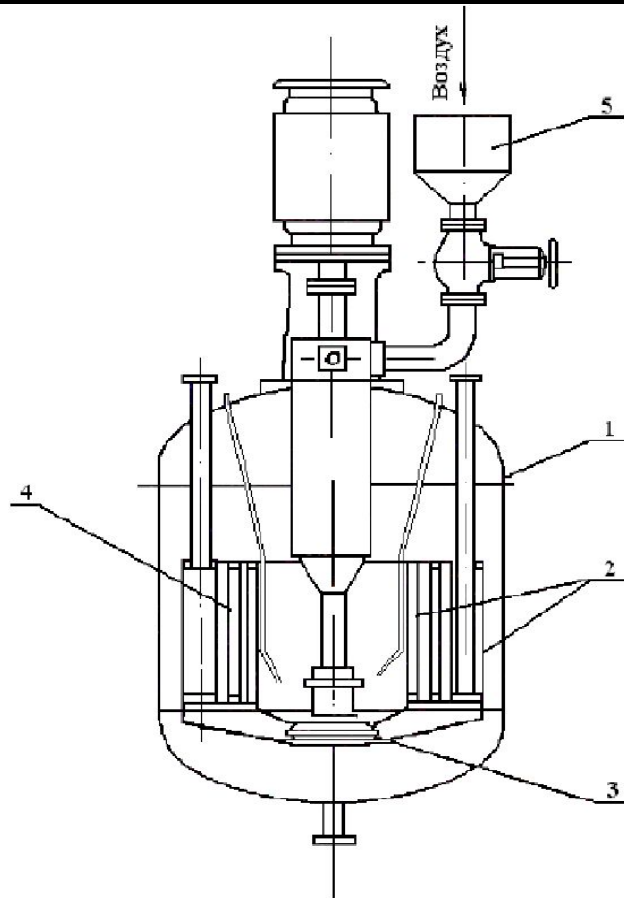


Рис.27. Ферментатор с самовсасывающей мешалкой непрерывного действия:
1- корпус, 2 – диффузор, 3 – самовсасывающая мешалка, 4 – теплообменник,
5 – фильтр

по объёму:

- лабораторные 0,5 -100 л,
 - пилотные 100л -10 мЗ,
 - промышленные 10 - 100 мЗ и более.
- критерии выбора ферментера:
- теплообмен,
 - скорость роста единичной клетки,
 - Тип дыхания биообъекта,
 - Вид транспорта и превращения субстрата в клетке
 - время размножения отдельной клетке.

Ферментеры



Ферментационный цех



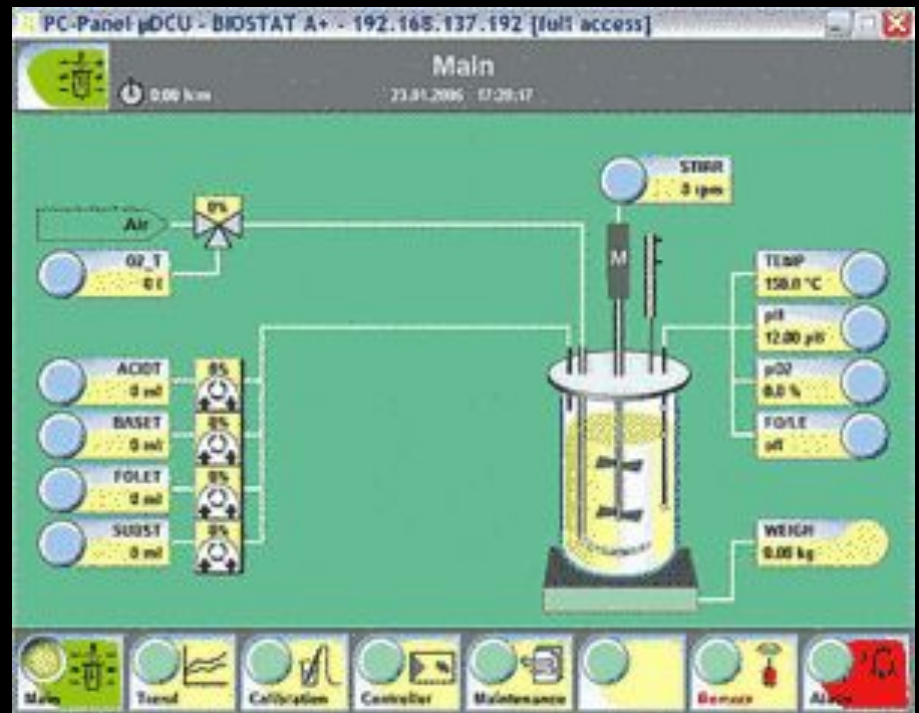
Инкубационная качалка



Лабораторный
газовихревой



Производственный



Biostat A plus - автоклавируемый ферментер со сменными сосудами (рабочий объем 1,2 и 5 л) для культивирования микроорганизмов и культур клеток и является полностью масштабируемым при переходе к большим объемам.

Единый корпус с интегрированным оборудованием измерения и управления, насосами, системой температурного контроля, подачи газа и мотором

Ноутбук с программным обеспечением MFCS / DA для управления процессами ферментации и их документирования

Получение лимонной кислоты

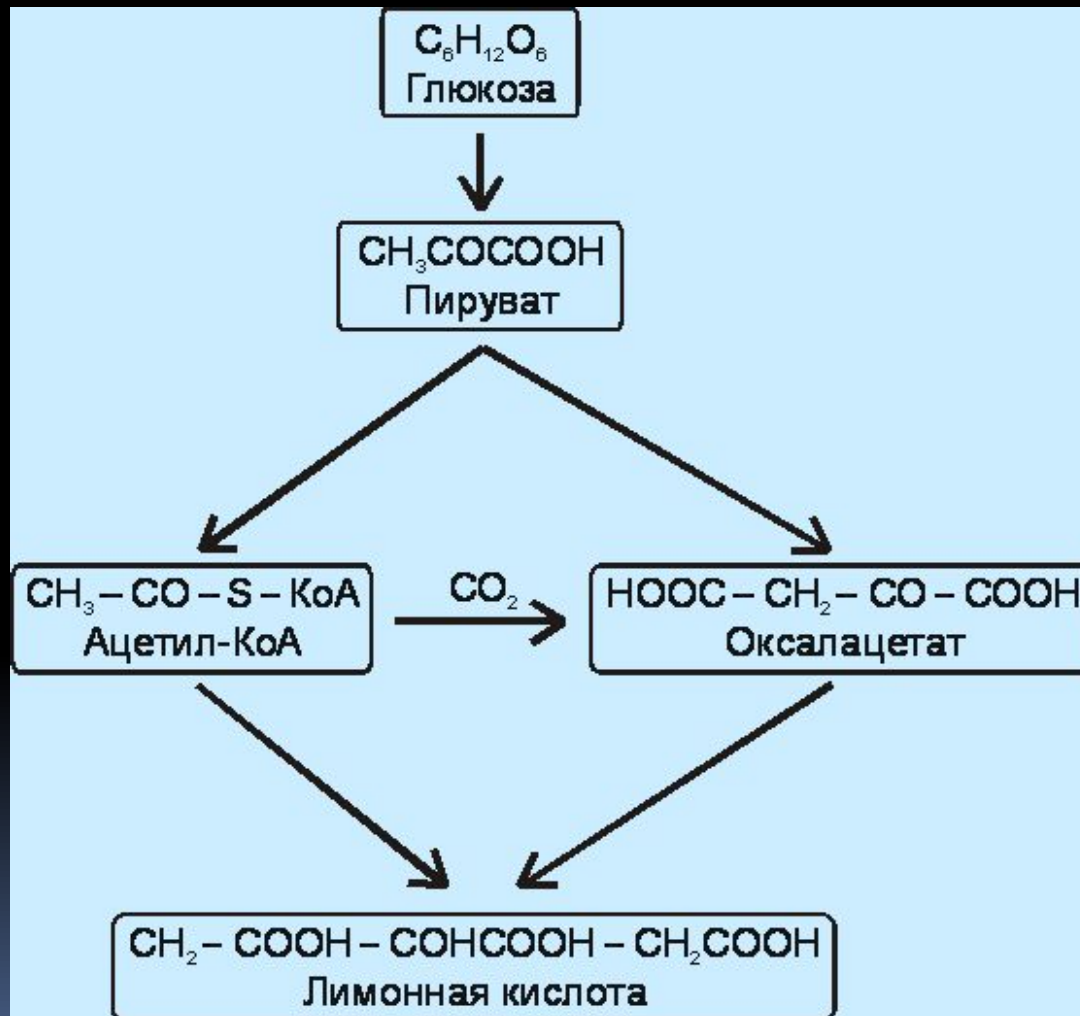
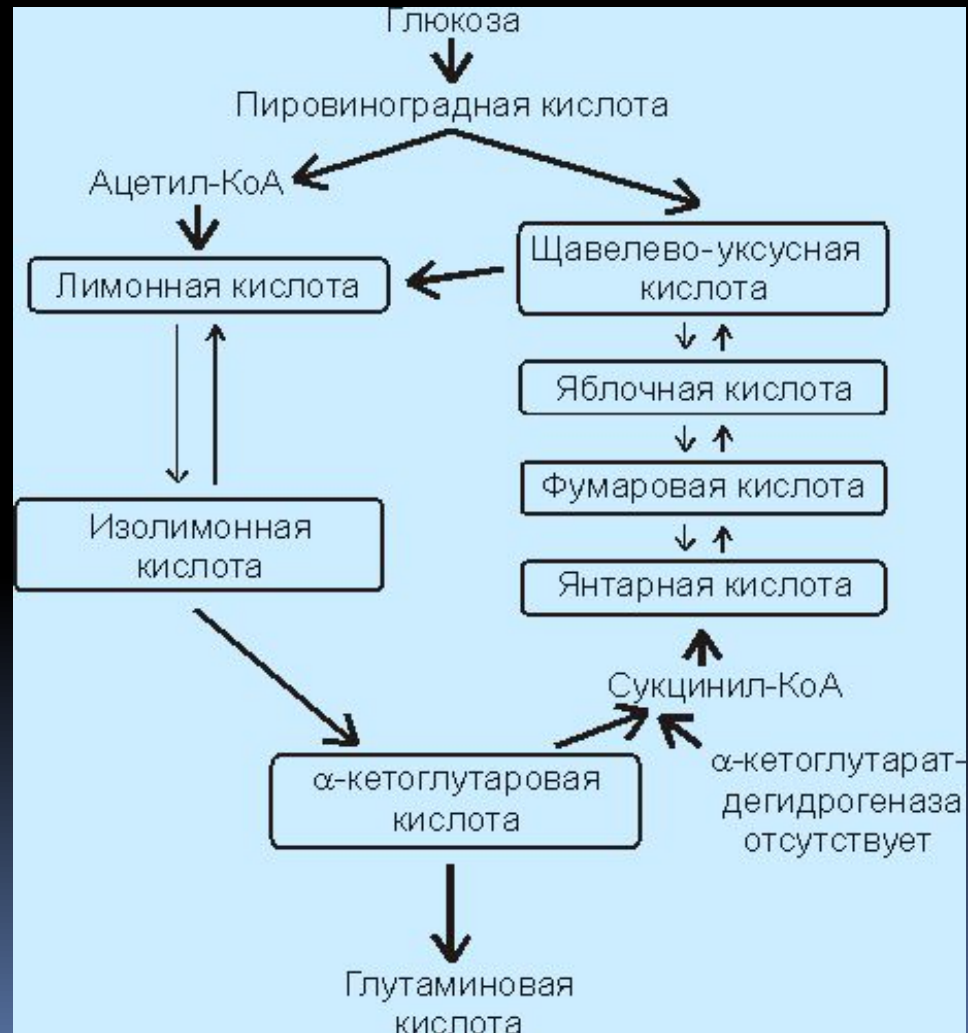
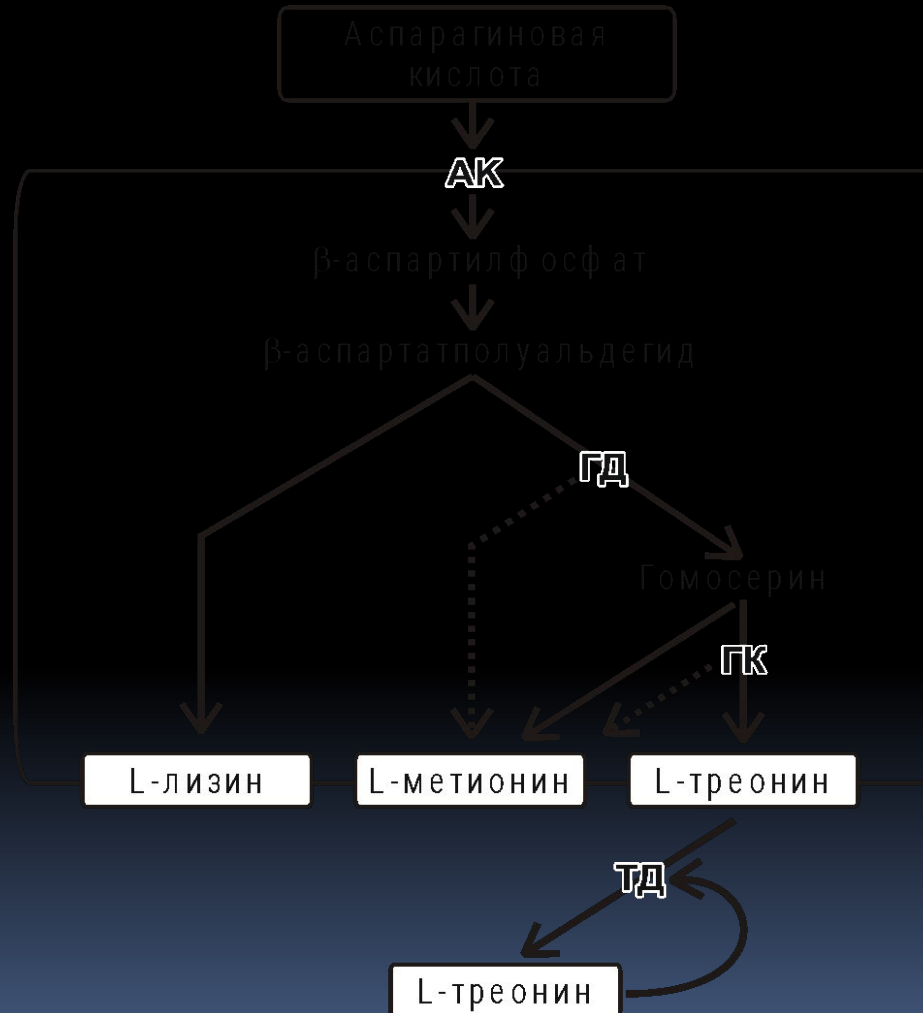


Схема синтеза глутаминовой кислоты *C. glutamicum*



Синтез лизина



Индикаторы работы ферментера

БИОСИНТЕЗ

- Стерильное оборудование
- Стерильная питательная среда
- Стерильный воздух

Параметры, влияющие на биосинтез (физически, химические, биологические)

1. Температура
2. Число оборотов мешалки (для каждого м/о (микроорганизмы) – разное число оборотов, разные 2х, 3х, 5-ти ярусные мешалки).
3. Расход подаваемого на аэрацию воздуха.
4. Давление в ферментере
5. рН среды
6. Парциальное давление растворенного в воде кислорода (количество кислорода)
7. Концентрация углекислого газа при выходе из ферментера
8. Биохимические показатели (потребление питательных веществ)
9. Морфологические показатели (цитологические) развитие клеток м/о, т.е. надо следить в процессе биосинтеза за развитием м/о
10. Наличие посторонней микрофлоры
11. Определение в процессе ферментации биологической активности

2 . Основные операции

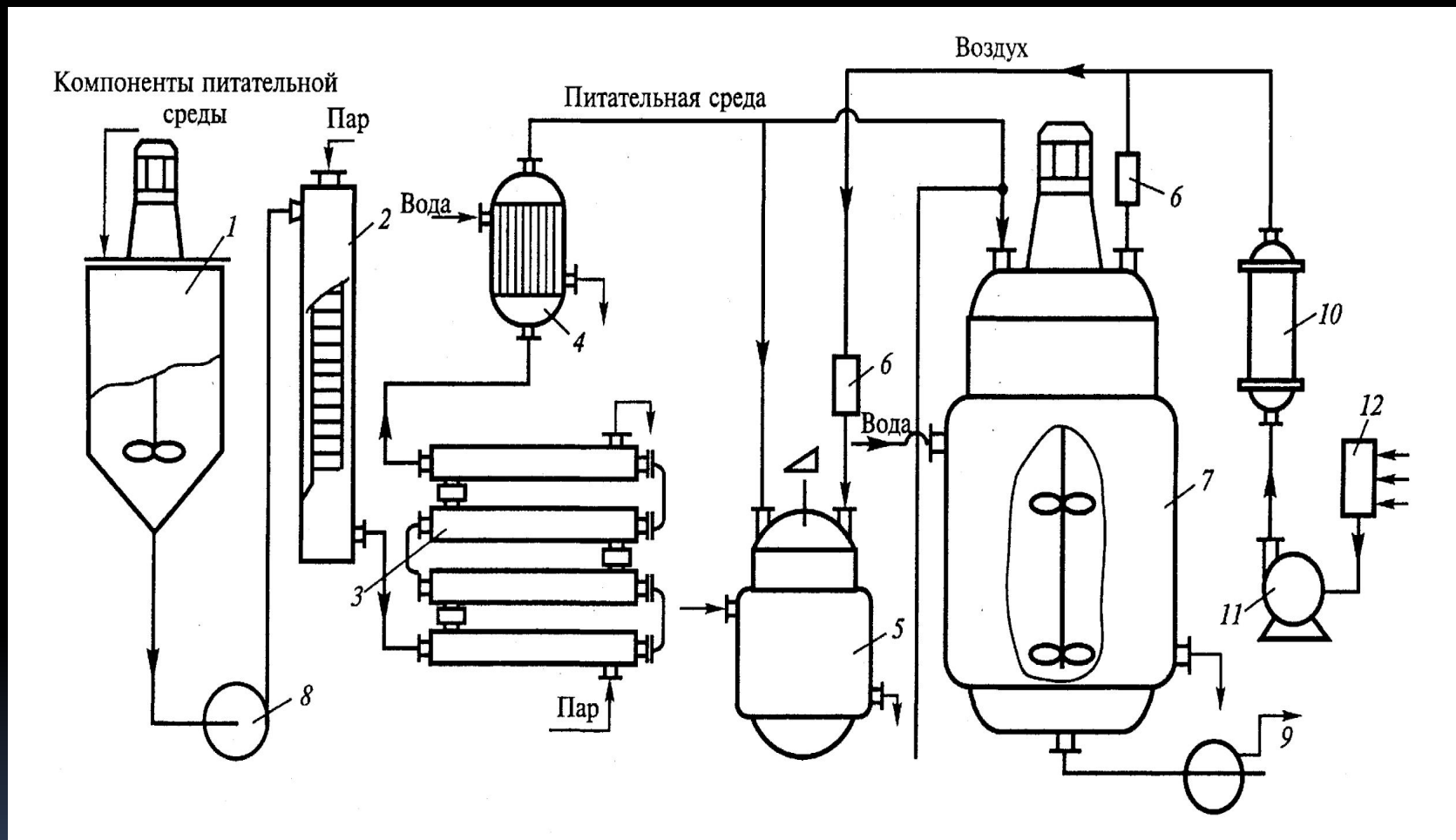
2.1. Стадия биосинтеза, где в максимальной степени используются возможности биообъекта для получения лекарственного продукта (накапливается внутри клетки или секретруется в культуральную среду).

2.2. Стадия концентрирования, одновременно предназначена для удаления баласта.

2.3. Стадия очистки, реализующая за счет повтора однотипных операций или за счет набора различных препаративных приемов (ультрафильтрация, экстракция, сорбция, кристаллизация и т. п) повышение удельной специфической активности лекарственного продукта.

2.4. Стадия получения конечного продукта (субстанции или готовой лекарственной формы) с последующими операциями фасовки и упаковки.

ГЛУБИННОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ



Технологическая схема глубинного культивирования микроорганизмов.

Расчетные параметры для управления биотехнологическими процессами

Измеряемые параметры	Расчеты на базе измерений
<p>Концентрация основных субстратов и продуктов в культуральной среде (сахара, спирты, органические кислоты и пр.)</p>	<p>Продуктивность (кг/м³ ч) Удельная скорость роста, μ (ч⁻¹) Удельная скорость потребления субстрата, q_s (кг/кг·ч)</p>
<p>Концентрации важнейших внутриклеточных компонентов (ферменты метаболизма углерода, ключевые метаболиты, АТФ, НАДФ и др.)</p> <p>Концентрация биомасс Состав микрофлоры в культуре. Концентрация растворенных O₂ и CO₂ в культуральной среде Уровень и состояние пены Концентрация целевого продукта</p>	<p>Удельная скорость образования продукта, q_p (кг/кг·ч) Экономический коэффициент, Y_p, Y_x (кг/кг) Объемный коэффициент массопередачи по кислороду, K_{vO_2} (ч⁻¹) Энергетический выход биосинтеза, η Теплопродукция Суммарный удельный расход сырья</p>

Критерии для оценки эффективности БТ

Скорость роста продуцента

$$dX / dt = \mu X,$$

где dX/dt – скорость роста, X – биомасса,
 μ – коэффициент пропорциональности («удельная скорость роста»).

Продуктивность процесса

$$П = q_s Y_{p/s} X \text{ [г/л·ч]},$$

где q_s – скорость потребления субстрата (метаболический коэффициент),
 $Y_{p/s}$ – выход продукта (экономический коэффициент), X – концентрация биомассы,
 p – продукт, s – субстрат.

Выход продукта (Y) (экономический коэффициент)

$$Y = X / S_0 - S,$$

где S и S_0 – конечная и исходная концентрации субстрата.

Непродуктивные затраты субстрата (h) – это затраты энергии субстрата, которые не проявляются в приросте продукта.

$$h = Y_{\text{экспериментальный}} / Y_{\text{теоретический}} < 1.$$

Этапы очистки

Этап 1. СЕПАРАЦИЯ - отделение массы продуцента от жидкой фазы.

Предварительно для повышения эффективности может проводиться:

- изменение рН,
- нагревание,
- добавление коагулянтов белков или флокулянтов.

СПОСОБЫ СЕПАРАЦИИ

1. Флотация (буквально – плавание на поверхности воды) – разделение мелких частиц и выделение капель дисперсной фазы из эмульсий. Основана на различной смачиваемости частиц жидкостью и на их избирательном прилипании к поверхности раздела жидкость – газ (реже твердые частицы – жидкость).

Основные виды флотации:

- **пенная** (культуральную жидкость с биомассой микроорганизмов непрерывно вспенивают воздухом, подаваемым снизу вверх под давлением, клетки и их агломераты «прилипают» к пузырькам и всплывают вместе с ними, собираясь в специальном отстойнике)
- **масляная пленочная.**

СПОСОБЫ СЕПАРАЦИИ

2. Фильтрация - используется принцип задержки биомассы на пористой фильтрующей перегородке.

Используются фильтры:

- однократного и многократного использования;
- периодического и непрерывного действия (с автоматическим удалением слоя биомассы, забивающего поры);
- барабанные,
- дисковые,
- ленточные,
- тарелочные,
- карусельные вакуум-фильтры,
- фильтры-прессы различной конструкции,
- мембранные фильтры.

СПОСОБЫ СЕПАРАЦИИ

3. Физическое осаждение. Если биомасса содержит заметных количеств целевого продукта, она осаждается добавлением извести или других твердых компонентов, увлекающих клетки или мицелий на дно.

4. Центрифугирование. Осаждение взвешенных частиц происходит под действием центробежной силы с образованием 2 фракций: биомассы (твердая) и культуральной жидкости.

«-»: необходимо дорогостоящее оборудование;

«+»: позволяет максимально освободить культуральную жидкость от частиц;

Цетрифугирование и фильтрация могут проходить одновременно в *фильтрационных центрифугах*.

Высокоскоростное центрифугирование разделяет клеточные компоненты по размеру: более крупные частицы при центрифугировании движутся быстрее.

Этап 2. ДЕЗИНТЕГРАЦИЯ БИОМАССЫ

Стадия используется, если искомые продукты находятся внутри клеток продуцента.

МЕТОДЫ ДЕЗИНТЕГРАЦИИ

- механические,
- химические
- комбинированные.

Физические методы - обработка ультразвуком, вращение лопасти или вибратора, встряхивание со стеклянными бусами, продавливание через узкое отверстие под давлением, раздавливание замороженной клеточной массы, растирание в ступке, осмотический шок, замораживание-оттаивание, декомпрессия (сжатие с последующим резким снижением давления).

«+»: экономичность методов.

«-»: избирательность методов, обработка может снижать качество получаемого продукта.

МЕТОДЫ ДЕЗИНТЕГРАЦИИ

Химические и химико-ферментативные методы - клетки могут быть разрушены толуолом или бутанолом, антибиотиками, ферментами.

«+»: более высокая избирательность методов

Примеры:

- клетки грамотрицательных бактерий обрабатывают лизоцимом в присутствии этилендиаминтераксусной кислоты или других детергентов,
- клетки дрожжей – зимолиазой улитки, ферментами грибов, актиномицетов.

ЭТАП 3. ОТДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА ПРОДУКТА

Выделение целевого продукта из культуральной жидкости или из гомогената разрушенных клеток проводят путем его осаждения, экстракции или адсорбции.

Осаждение:

- физическое (нагревание, охлаждение, разбавление, концентрирование);
- химическое (с помощью неорганических и органических веществ - этанол, метанол, ацетон, изопропанол).

Механизм осаждения органическими веществами:
снижение диэлектрической постоянной среды, разрушение гидратного слоя молекул.

Высаливание:

Механизм высаливания: гидратируются диссоциирующие ионы неорганических солей.

Реагенты: сульфат аммония, сульфаты натрия, магния, фосфат калия.

Экстракция – процесс избирательного извлечения одного или нескольких растворимых компонентов из твердых тел и растворов с помощью жидкого растворителя – экстрагента.

Типы экстракции:

- Твердо-жидкостная (вещество из твердой фазы переходит в жидкую) - например, хлорофилл из спиртовой вытяжки переходит в бензин
- Жидко-жидкостная (вещество переходит из одной жидкости в другую (извлечение антибиотиков, витаминов, липидов)).
- Экстрагенты: фенол, бензиловый спирт, хлороформ, жидкий пропанили бутан и др.

Способы повышения эффективности экстракции:

- повторная экстракция свежим экстрагентом;
- выбор оптимального растворителя;
- нагревание экстрагирующего агента или экстрагируемой жидкости;
- понижением давления в аппарате для экстракции.
- Для экстракции хлороформом в лабораторных условиях используется аппарат «Сокслет», что позволяет многократно использовать растворитель.

Адсорбция – частный случай экстракции, когда экстрагирующий агент является твердым телом - идет по ионообменному механизму.

Адсорбенты: иониты на основе целлюлозы:

- катионит – карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ);
- анионит – диэтиламиноэтилцеллюлоза (ДЭАЭ),
- сефадексы на основе декстрана и т.д.

МЕТОДЫ ТОНКОЙ ОЧИСТКИ И РАЗДЕЛЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ

Хроматография (от греч. *chroma* – цвет, краска и *-графия*) – физико-химический метод разделения и анализа смесей, основанный на распределении их компонентов между двумя фазами – неподвижной и подвижной (элюент), протекающей через неподвижную.

Виды хроматографии по технике выполнения:

- колоночная - разделение веществ проводится в специальных колонках
- плоскостная:
 - тонкослойная (ТСХ) – разделение проводится в тонком слое сорбента;
 - бумажная – на специальной бумаге.



Для крупномасштабных БТ применимы:



- *аффинная преципитация* - лиганд прикрепляют к растворимому носителю, при добавлении смеси, содержащей соответствующий белок, образуется его комплекс с лигандом, который выпадает в осадок сразу после его формирования или после дополнения раствора электролитом.
- *аффинное разделение* - основано на применении системы, содержащей два водорастворимых полимера – наиболее высокоэффективный из аффинных методов очистки.

Гидрофобная хроматография основана на связывании белка в результате взаимодействия между алифатической цепью адсорбента и соответствующим гидрофобным участком на поверхности белковой глобулы.

Система **аффинной** очистки рекомбинантных белков Profinia.

- *Электрофорез* – метод разделения белков и нуклеиновых кислот в свободном водном растворе и пористом матриксе, в качестве которого можно
- использовать полисахариды, например, крахмал или агарозу.

Модификацией метода является электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН-ПААГ)



Gel electrophoresis is a common method for separating protein or DNA

Гель-электрофорез - распространенный метод разделения белков или ДНК