Лекция 2

Биотехнологическое производство

1. Основные стадии биотехнологических производств
2. Технология получения посевного материала. Приготовление питательных сред.
3. Способы и методы культивирования микроорганизмов (поверхностный, глубинный, периодический, непрерывный).

.

1. Основные стадии биотехнологических производств

Схема состоит из стадий, в каждой из которых сырье претерпевает определенные технологические воздействия и последовательно превращается во все более сложные полупродукты и, наконец, в конечный продукт.

Типовая схема и стадии БТ производства



1 Подготовительные стадии

Подготовительные стадии служат для приготовления и подготовки необходимых видов сырья биотехнологической стадии.

На стадии подготовки могут быть использованы следующие процессы.

Приготовление среды, обычно жидкой, включающей необходимые компоненты питания для биотехнологической стадии.

Стерилизация среды - для асептических биотехнологических процессов, где нежелательно попадание посторонней микрофлоры.

Подготовка и стерилизация газов (обычно воздуха), необходимых для протекания биотехнологического процесса заключается в очистке его от пыли и влаги, микроорганизмов, споры.

Подготовка посевного материала. Посевной материал - это предварительно выращенное малое по сравнению с основной стадией количество биологического агента.

Подготовка биокатализатора - фермента в свободном или закрепленном на носителе виде, или биомассу микроорганизмов, выращенную предварительно до состояния, в котором проявляется ее ферментативная активность.

Предварительная обработка сырья. Если сырье поступает в производство в виде, непригодном для непосредственного использования в биотехнологическом процессе, то проводят операцию по предварительной подготовке сырья. Например, при получении спирта пшеницу сначала дробят, а затем подвергают ферментативному процессу "осахаривания", после чего осахаренное сусло на биотехнологической стадии путем ферментации превращается в спирт.

Другой пример - использование древесины для получения дрожжей. Древесину сначала измельчают, а затем подвергают нагреву до 200°С в кислой среде. В результате такого процесса кислотного гидролиза происходит превращение древесины в раствор глюкозы и лигнин. Раствор глюкозы (гидролизат) как раз и используется в биотехнологическом процессе для получения кормовых дрожжей.

2 Биотехнологическая стадия

Основная стадия - с помощью биологического агента (микроорганизмов, изолированных клеток, ферментов или клеточных органелл) происходит преобразование сырья в тот или иной целевой продукт.

Биотехнологическая стадия включает синтез новых органических соединений и ряд других биотехнологических процессов.

Ферментация - процесс, осуществляемый с помощью культивирования микроорганизмов.

Биотрансформация - процесс изменения химической структуры вещества под действием ферментативной активности клеток

микроорганизмов или готовых ферментов. В этом процессе обычно не происходит накопления клеток микроорганизмов, а химическая структура вещества меняется незначительно. Вещество как бы уже в основном готово, биотрансформация осуществляет его химическую модификацию: добавляет или отнимает радикалы, гидроксильные ионы, дегидрирует и т.п.

Биокатализ - химические превращения вещества, протекающие с использованием биокатализаторов-ферментов.

Биоокисление - потребление загрязняющих веществ с помощью микроорганизмов или ассоциации микроорганизмов в аэробных условиях.

Метановое брожение - переработка органических отходов с помощью ассоциации метаногенных микроорганизмов в анаэробных условиях.

Биокомпостирование - снижение содержания вредных органических веществ ассоциацией микроорганизмов в твердых отходах, которым придана специальная взрыхленная структура для обеспечения доступа воздуха и равномерного увлажнения.

Биосорбция - сорбция вредных примесей из газов или жидкостей микроорганизмами, обычно закрепленными на специальных твердых носителях.

Бактериальное выщелачивание - процесс перевода нерастворимых в воде соединений металлов в растворенное состояние под действием специальных микроорганизмов.

Биодеградация - деструкция вредных соединений под воздействием микроорганизмов-биодеструкторов.

Обычно биотехнологическая стадия имеет в качестве выходных потоков один жидкостной поток и один газовый, иногда только один - жидкостной. В случае, если процесс протекает в твердой фазе (например, созревание сыра или биокомпостирование отходов), выходом является поток переработанного твердого продукта.

3 Разделение жидкости и биомассы

Целевой продукт находится в биомассе или в жидкости, поэтому небходимо разделить эти две фазы. Для этого используются следующие процессы:

Отстаивание - разделение под действием гравитационных сил (обычно при очистке сточных вод).

Фильтрация - пропускание суспензии через фильтрующий материал, на котором задерживаются частицы твердой фазы - биомасса. Такой способ применяют в производстве антибиотиков, особенно в тех случаях, когда микроорганизм-продуцент имеет мицелиальный характер.

Сепарация, центрифугирование - разделение под действием центробежных сил. Наиболее часто используется для отделения дрожжей или бактерий в производстве кормовой биомассы.

Микрофильтрация, ультрафильтрация - пропускание суспензии через мембраны с весьма малым размером пор, обеспечивающее удержание клеток микроорганизмов на мембране и получение раствора, свободного от взвешенных клеток. Ультрафильтрация задерживает уже не только клетки, но и крупные молекулы растворенных веществ.

Коагуляция - добавление в суспензию реагентов, способствующих образованию и осаждению более крупных клеточных агломератов и отделению их от жидкости путем отстаивания.

Флотация - захват биомассы микроорганизмов пузырьками пены и выделение ее из пенной фракции.

4 Выделение продуктов биосинтеза

Эта стадия имеет определенные отличия, связанные с тем, являются продукты внеклеточными или внутриклеточными.

Для внутриклеточных продуктов сначала необходимо разрушить клеточную оболочку.

Дезинтеграция клеток. Этот процесс разрушения клеточной оболочки может осуществляться физическими методами (размол, замораживание и продавливание, ультразвук, декомпрессия - резкий сброс давления) или химические и биотехнологические методы.

Гидролиз - разрушение клеточных оболочек под действием химических реагентов и температуры.

Ферментолиз - разрушение клеточных оболочек под действием ферментов при повышенной температуре.

Автолиз - разновидность ферментолиза, когда используют собственные ферменты клетки.

После проведения предварительной операции разрушения клеток выделение целевого продукта осуществляется из раствора методами, которые являются *общими для внеклеточных и внутриклеточных продуктов*.

Экстракция - переход целевого продукта из водной фазы в не-смешивающуюся с водой органическую жидкость (экстрагент) - жидкие углеводороды (типа бензина), хлороформ, эфир, бутилацетат. Экстракция прямо из твердой фазы (в том числе и биомассы микроорганизмов) называется *экстрагированием*.

Осаждение - выделение целевого продукта путем добавления к жидкости реагента, взаимодействующего с растворенным продуктом и переводящего его в твердую фазу.

Адсорбция - перевод растворенного в жидкости продукта в твердую фазу путем его сорбции на специальных твердых носителях (сорбентах).

Ионный обмен - то же, что адсорбция, но в этом случае в твердую фазу переходят ионы (катионы или анионы), а не целиком молекула целевого продукта или примеси.

Отгонка, ректификация - эти методы используют для выделения растворенных в культуральной жидкости легкокипящих продуктов. Пример - этиловый спирт.

Ультрафильтрация, нанофильтрация и обратный осмос применяются для выделения высокомолекулярных соединений (белков, поли пептидов, полинуклеотидов). Обратный осмос и нанофильтрация позволяют отделять даже небольшие по размеру молекулы.

Центрифугирование, ультрацентрифугирование используют для выделения вирусов, клеточных органелл, высокомолекулярных соединений.

5 Очистка продукта

Задача этой стадии - убрать примеси, сделать продукт максимально чистым. Для этого используют следующие приемы: **экстракция и экстрагирование, адсорбция, ионный обмен, ультрафильтрация и обратный осмос, ректификация и ферментолиз.**

А также:

Хроматография - процесс, напоминающий адсорбцию. На твердом сорбенте собираются растворенные вещества близкие по структуре. Например, смеси белков, нуклеотидов, Сахаров, антибиотиков. При адсорбции они и десорбируются вместе. А вот при хроматографии они выходят из сорбента как бы по очереди, что и позволяет их разделять и, значит, очищать друг от друга.

Диализ - процесс, в котором через полупроницаемую перегородку могут проходить низкомолекулярные вещества, а высокомолекулярные остаются. Путем диализа осуществляют очистку вакцин и ферментов от солей и низкомолекулярных растворимых примесей.

Кристаллизация. Этот процесс базируется на различной растворимости веществ при разных температурах. Медленное охлаждение позволяет формировать кристаллы из растворов целевых продуктов, причем чистота их

обычно очень высока. Вся "грязь" остается в маточном растворе. Таким образом, например, получают кристаллы пенициллина.

Можно даже получить еще более чистый продукт, если кристаллы растворить в воде или растворителе, а потом снова кристаллизовать (т.е. провести процесс перекристаллизации).

6 Концентрирование продукта

На выходе из биотехнологической стадии суспензия обычно содержит целевого продукта примерно 0,1 - 1%, после стадии отделения биомассы - 0,1-2%, после стадии выделения - 1-10%, после очистки - 50-80%, и, наконец, после концентрирования - 90-100%.

На стадии концентрирования применяют такие процессы, как **выпаривание, сушка, осаждение, кристаллизация с фильтрацией получившихся кристаллов, ультрафильтрация и гиперфильтрация или нанофильтрация**, обеспечивающие как бы "отжим" растворителя из раствора.

7 Получение готовой формы продукта

На завершающей стадии производства продукт приобретает товарную форму за счет проведения процессов **гранулирования (**формирование гранул из порошка или прямо из раствора), **дражирования, таблетирования** (формирование драже, таблеток), **розлива** или **фасовки**, **ампулирования (**затаривания в ампулы).

2. Технология получения посевного материала. Приготовление питательных сред.

Посевной материал – это чистая культура, размноженная до такого количества, чтобы ею можно было засеять промышленный ферментер.

Приготовление посевного материала в зависимости от вида продукта, его физиолого – биохимических особенностей состоит из нескольких последовательных этапов: исходная культура (в пробирке) → выращивание на скошенной агаризованной среде (в пробирках) → выращивание в колбах на качалке на жидкой среде (одна - две стадии) → выращивание в посевном аппарате (инокуляторе) → накопление культуры микроорганизмов в малом ферментере → посевной материал.

Выращивание посевного материала производится по следующим стадиям:

- получение культуры микроорганизма в микробиологической лаборатории завода;

- выращивание посевного материала в малом посевном аппарате (вместимостью 300 л);

- выращивание дрожжей в большом посевном аппарате (вместимостью 3200 л);

- накопление культуры дрожжей в малом ферментаторе (вместимостью 50м^3).



ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ

3.Способы и методы культивирования микроорганизмов (поверхностный, глубинный, периодический, непрерывный).

В мире существует два основных способа культивирования микроорганизмов: **периодическое (статическое)** и **непрерывное (проточное)**.

Периодическое (статическое) культивирование

Рост бактерий в периодической культуре происходит до тех пор, пока содержание какого-нибудь из компонентов питательной среды не достигнет минимума, после чего рост прекращается. Если на протяжении этого времени не добавлять питательных веществ и не удалять конечных продуктов

метаболизма, то получим так называемую **периодическую культуру** (популяцию клеток в ограниченном жизненном пространстве).

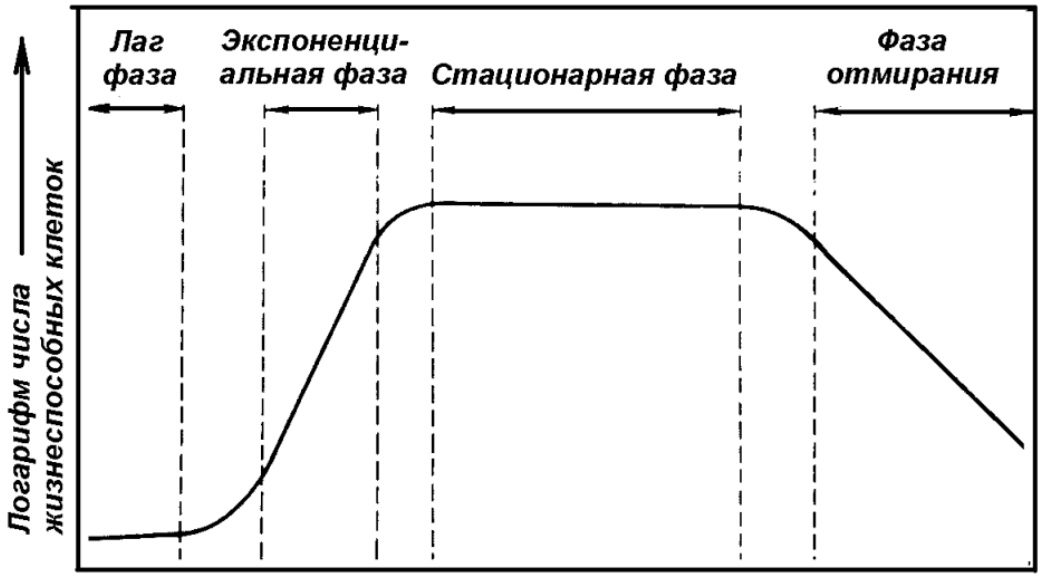
Изменение численности популяции клеток при периодическом культивировании имеет определенную закономерность. Если по оси абсцисс отложить время, а по оси ординат – логарифм числа жизнеспособных клеток, то можно построить **кривую роста** бактерий. Типичная кривая роста имеет S-образную форму. Анализируя кривую можно различить несколько фаз роста, сменяющих друг друга в определенной последовательности:

Начальную или лаг-фазу;

Экспоненциальную или логарифмическую фазу;

Стационарную фазу;

Фазу отмирания.



Лаг-фаза включает период от посева бактерий на свежую питательную среду до достижения ими максимальной скорости роста. В начале лаг-фазы бактерии приспосабливаются к новым условиям. В клетках идет синтез ферментов, нуклеиновых кислот, белков, активируются обменные процессы. Клетки интенсивно растут, и размеры их заметно увеличиваются. Деления бактерий на этой стадии практически не происходит. Длительность этой фазы зависит от полноценности питательной среды и от состояния культуры микроорганизма. Чем полноценнее питательная среда и чем моложе культура бактерий, тем короче лаг-фаза.

Экспоненциальная фаза характеризуется активным делением подавляющей массы клеток бактериальной популяции. Число клеток возрастает

в геометрической прогрессии. Характеризуется постоянной максимальной скоростью или скоростью роста. Эта скорость зависит от вида бактерий. Бактерии E. coli при 37^0C делятся каждые 20 мин, а бактерии родов Nitrosomonas и Nitrobacter – 5-10 часов.

Во время этой фазы клетки имеют приблизительно равный размер, содержание белка в них тоже постоянно. Клетки содержат максимальное количество РНК. Клетки на этой фазе наиболее жизнеспособны и обладают высокой биохимической активностью.

Стационарная фаза наступает тогда, когда число живых клеток достигает максимума и перестает увеличиваться, так как скорость размножения бактерий равна скорости их отмирания. Так как скорость роста зависит от концентрации субстрата, то при уменьшении этой концентрации, еще до полного использования субстрата, она начинает снижаться. Скорость роста может снижаться не только из-за нехватки субстрата, но также из-за большой плотности бактериальной популяции, из-за низкого парциального давления O_2 или накопления токсичных продуктов обмена. Клетки по химическому составу отличаются от состава клеток в экспоненциальной фазе. Клетки в стационарной фазе меньше по размеру, содержат меньше РНК, более устойчивы к физическим воздействиям и химическим агентам, чем в экспоненциальной фазе роста культур. В этот период в клетках и в среде нередко накапливаются продукты вторичного метаболизма (антибиотики, пигменты, бактериоцины и др.). Продолжительность этой фазы от нескольких часов до недели в зависимости от вида микроорганизмов.

В стационарную фазу роста поведение клеток бактериальной популяции регулирует такое явление как **апоптоз** - при исчерпании питательного субстрата голодающая популяция разделяется на две субпопуляции, одна из которых гибнет и подвергается автолизу, а клетки другой субпопуляции, используя продукты автолиза как субстрат, продолжают размножаться.

В фазе **отмирания** происходит снижение числа живых клеток. Скорость отмирания бактерий широко варьирует в зависимости от условий и особенностей организма. Например, энтеробактерии отмирают медленно в отличие от некоторых видов бактерий рода *Bacillus,* которые отмирают быстро. Причины отмирания клеток могут быть разными: накопление органических кислот (как у бактерий родов *Escherichia. Lactobacillus),* автолиз (лизис под действием собственных ферментов), накопление антибиотиков, и другие причины.

Непрерывное проточное культивирование заключается в том, что в сосуд, содержащий популяцию бактерий, периодически подается свежая

питательная среда и одновременно удаляется из него избыток среды с клетками микроорганизмов. Это позволяет задержать культуру в состоянии экспоненциального роста.

Проточное культивирование осуществляется в аппаратах двух типов: **хемостатах и турбидостатах.**

В **хемостатах** рост бактериальной популяции контролируется концентрацией питательного субстрата по источнику углерода и азота. Для равномерного распределения питательных веществ содержимое культиватора механически перемешивается и аэрируется стерильным воздухом. Излишняя микробная масса с питательной средой через сливной сифон вытекает из культиватора.

Турбидостат – это тот же хемостат, но снабженный фотоэлекрическим элементом, регистрирующим мутность среды. Когда плотность биомассы увеличивается относительно некоторого выбранного уровня, фотоэлемент, соединенный системой реле, подает свежую питательную среду.

Для глубинного культивирования бактерий с аэрацией в промышленных и лабораторных условиях применяют **биореакторы или ферментеры**. **Ферментеры** представляют собой герметические котлы, в которые заливается жидкая питательная среда. Ферментеры снабжены автоматическими приспособлениями, позволяющими поддерживать постоянную температуру, оптимальную pH и редокс-потенциал, дозированное поступление необходимых питательных веществ. Они продуваются стерильным воздухом и в них установлены мешалки, с помощью которых среда постоянно перемешивается.

Непрерывное культивирование широко используется в промышленной микробиологии, при проведении физиологических, биохимических, генетических исследований, так как при данном культивировании поддерживается постоянство плотности популяции и концентрации всех компонентов питательной среды.