



ФЕДОРЕНКО Борис Николаевич

**доктор технических наук, профессор
Московского государственного
университета пищевых производств**

ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОРУДОВАНИЕ ОТРАСЛИ (биотехнологические производства)

**Лекция 3.
ОБОРУДОВАНИЕ
ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ
МИКРООРГАНИЗМОВ
(биореакторы непрерывного действия)**



БИОРЕАКТОРЫ НЕПРЕРЫВНОГО ДЕЙСТВИЯ

Оборудование непрерывного действия характеризуется:

- одновременностью протекания всех стадий технологической операции;
- неизменностью параметров на этих стадиях;
- разобщенностью этих стадий в пространстве (т.е. они осуществляются в различных частях машины, аппарата или различных машинах и аппаратах единой технической системы).



В биореакторе непрерывного действия обеспечивается **стабилизация культуры микроорганизмов на стадии активного биосинтеза** при непрерывном добавлении питательной среды и непрерывном отборе готовой культуры.



Работу биореактора в непрерывном режиме можно уподобить сельскохозяйственным работам, осуществляемым в оранжерее, когда в одних и тех же условиях, одновременно, но на разных участках оранжереи могут выполняться различные работы, например, на одном – высаживаться посевной материал, на другом – сниматься урожай, на третьем – проводится поливка и пр.



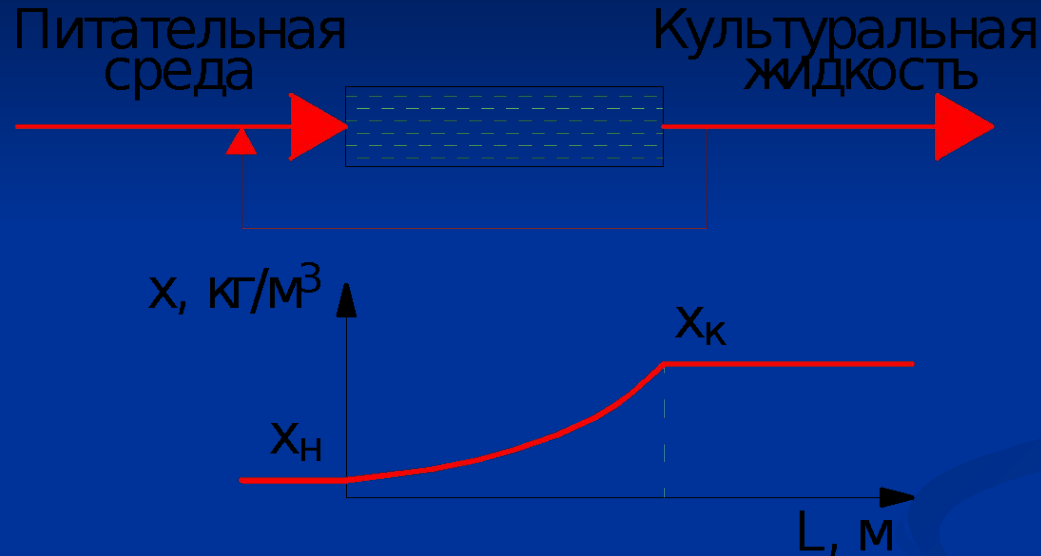
ОСНОВНЫЕ МОДЕЛИ АППАРАТОВ НЕПРЕРЫВНОГО ДЕЙСТВИЯ

По характеру процессов, которые в них протекают, аппараты непрерывного действия можно разделить на:

- аппараты идеального (полного) вытеснения;
- аппараты идеального (полного) смешения;
- аппараты промежуточного типа.



АППАРАТЫ ИДЕАЛЬНОГО ВЫТЭСНЕНИЯ

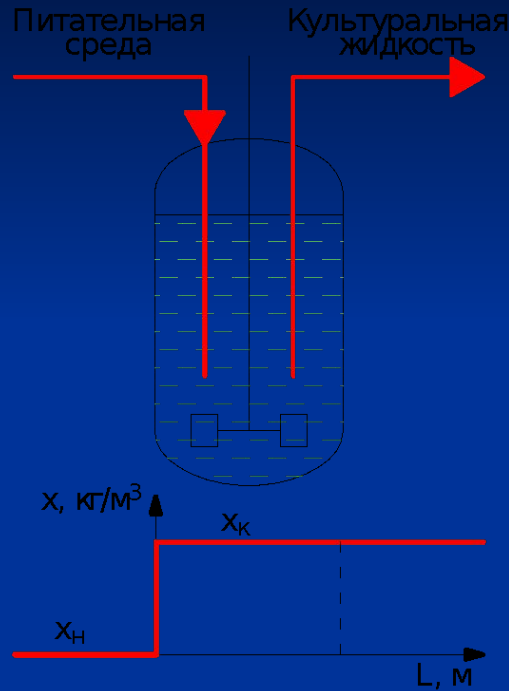


Для аппаратов этого типа характерно стержневое течение среды. Продольное перемешивание среды осуществляется за счет турбулентности потока.

- недостаточная подвижность клеток;
- трудность регулирования pH;
- трудность тепло- и массопереноса;
- необходимость постоянного засева.



АППАРАТ ИДЕАЛЬНОГО СМЕШЕНИЯ



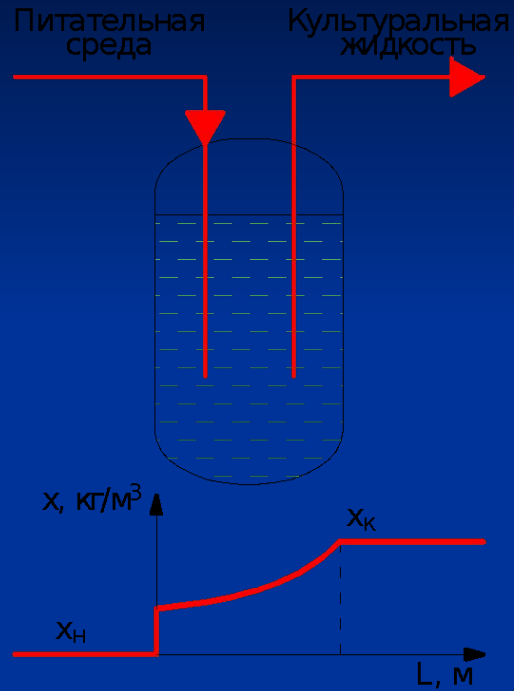
Для аппаратов этого типа характерна высокая интенсивность перемешивания среды с введением в аппарат большой мощности.

Удельная вводимая мощность $N_{уд}$ в биореакторах такого типа составляет обычно 1...3, но может достигать и 5...10 кВт/м³.

$$N_{уд} = N_p / V_r \text{ кВт/м}^3$$



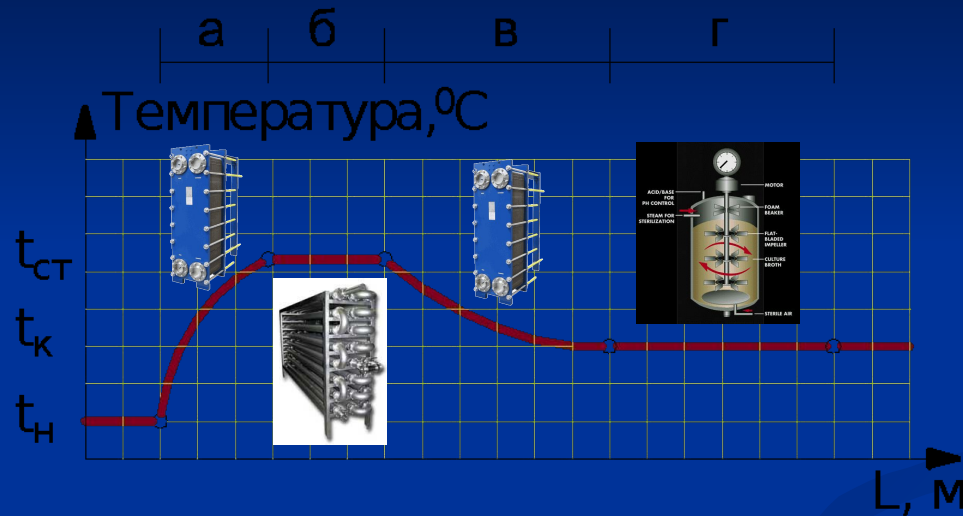
АППАРАТ ПРОМЕЖУТОЧНОГО ТИПА



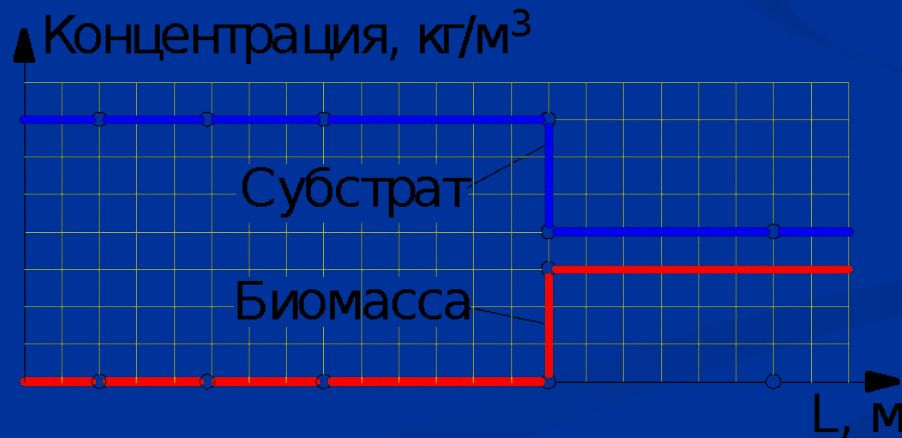
Для аппаратов этого типа характерна невысокая степень интенсивности перемешивания среды.



ТИПИЧНЫЙ ХАРАКТЕР ИЗМЕНЕНИЯ ОСНОВНЫХ ПАРАМЕТРОВ ПРИ НЕПРЕРЫВНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ МИКРООРГАНИЗМОВ

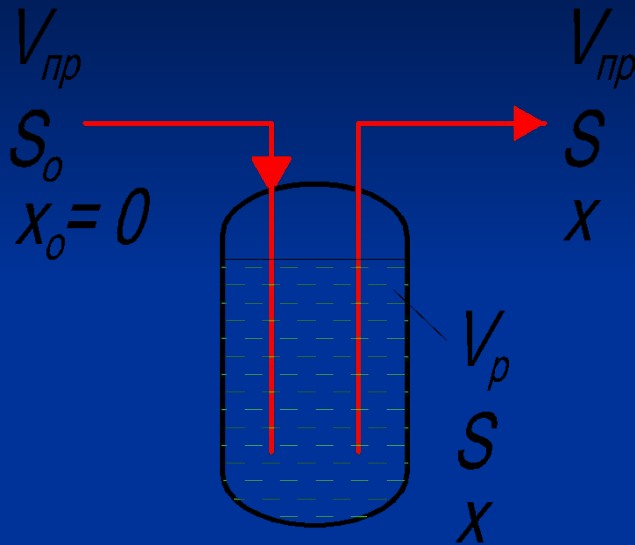


а) нагревание;
б) выдерживание;
в) охлаждение;
г) культивирование.





МАТЕРИАЛЬНЫЙ БАЛАНС ПО БИОМАССЕ В БИОРЕАКТОРЕ НЕПРЕРЫВНОГО ДЕЙСТВИЯ



Прирост

Отвод

$$V_p dx = \mu x V_p dt - V_{пр} x dt$$



$$dx/dt = \mu x - (V_{пр}/V_p)x$$

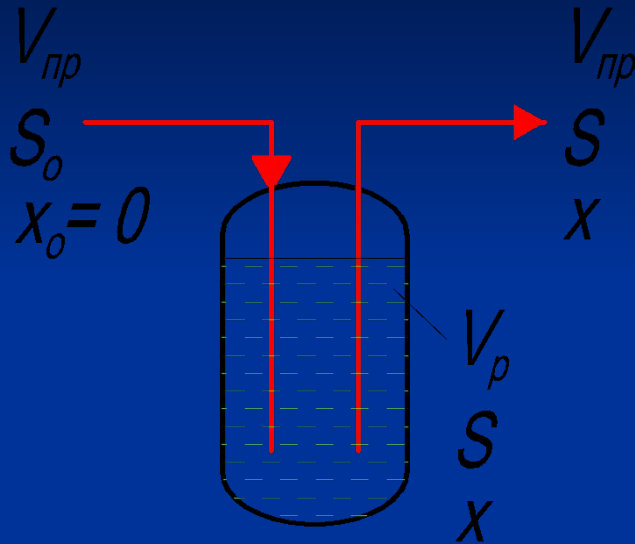
$$V_{пр}/V_p = D$$

D – коэффициент разбавления (или скорость протока);

Физический смысл D – кратность обновления среды в биореакторе за единицу времени (за час), ч⁻¹.



ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЙ ПРИНЦИП НЕПРЕРЫВНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ



dx/dt – скорость изменения концентрации биомассы в биореакторе, кг/ч;
Для стационарных условий непрерывного режима $dx/dt = 0$.

В открытой системе непрерывного культивирования устанавливается и сохраняется **динамическое равновесие**. При этом культура находится в самых благоприятных условиях.

$$dx/dt = \mu x - (V_{пр}/V_r)x$$

$$dx/dt = \mu x - Dx$$

$$0 = \mu x - Dx$$

$$D = \mu$$



ВЛИЯНИЕ СКОРОСТИ ПРОТОКА НА КОНЦЕНТРАЦИЮ БИОМАССЫ



При $D \geq D_{кр}$ происходит вымывание культуры из биореактора, прекращается потребление субстрата и его концентрация в биореакторе становится равной начальному значению S_0 .

Тогда, исходя из условия стационарности процесса и уравнения микрокинетики, можно определить **критическое значение скорости протока**:

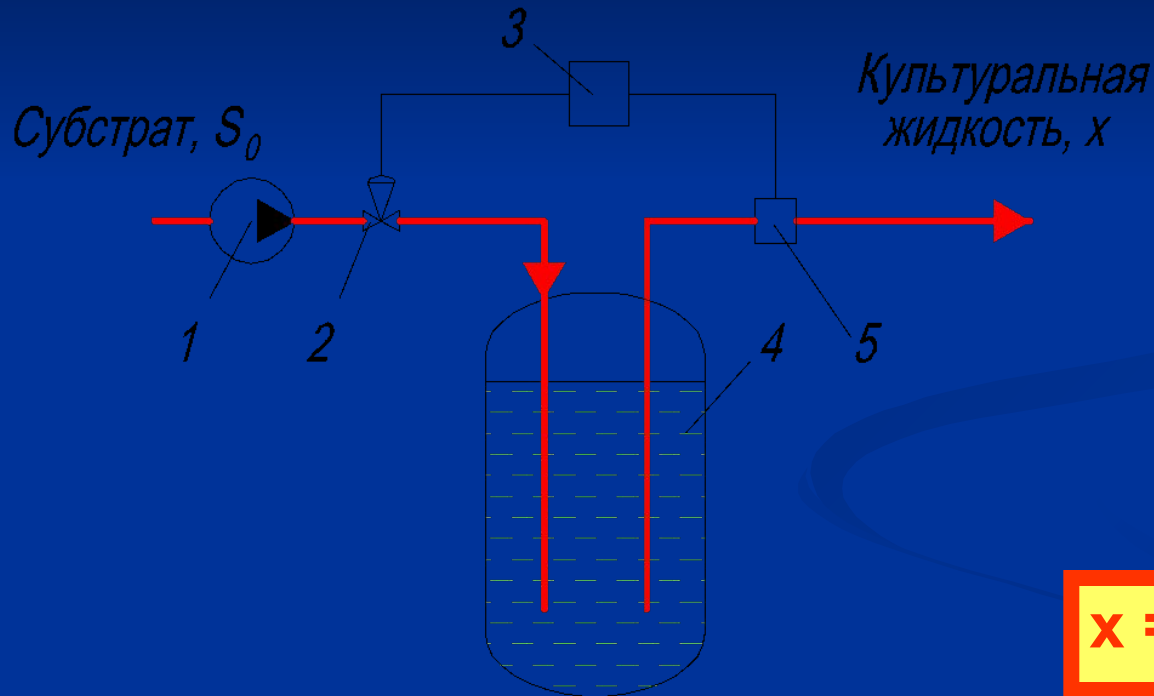
$$D_{кр} = \mu S_0 / (K_s + S_0)$$

Рабочие значения скорости протока лежат в пределах $0,01 \dots 0,30 \text{ ч}^{-1}$.



ТУРБИДОСТАТ (ПЛОТНОСТАТ)

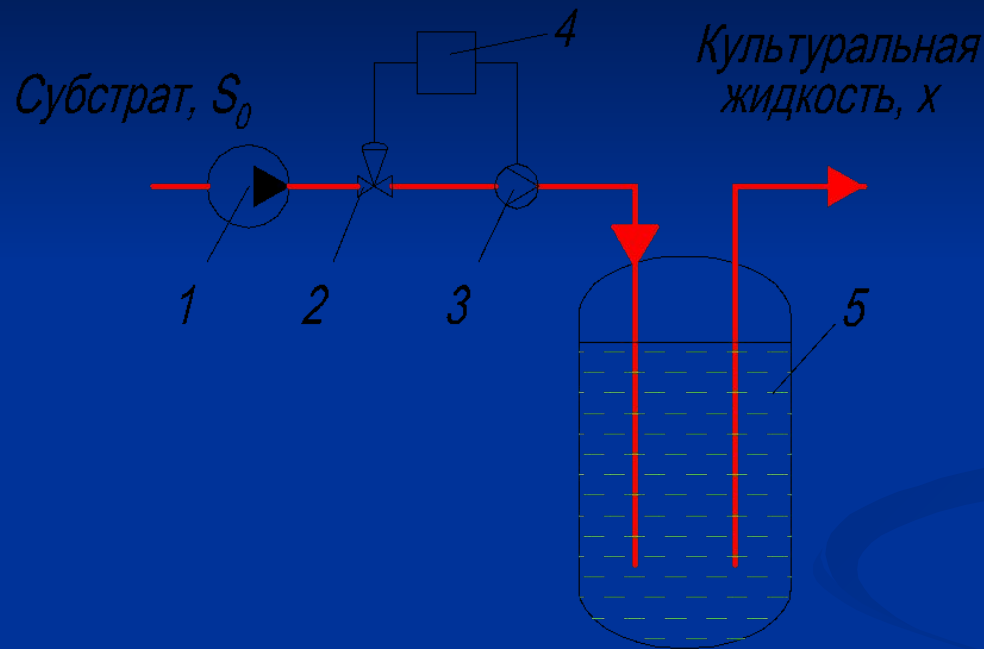
- основан на прямом контроле концентрации биомассы.



Область функционирования – высокие скорости потока, при которых происходит быстрое и резкое изменение концентрации биомассы.



ХЕМОСТАТ

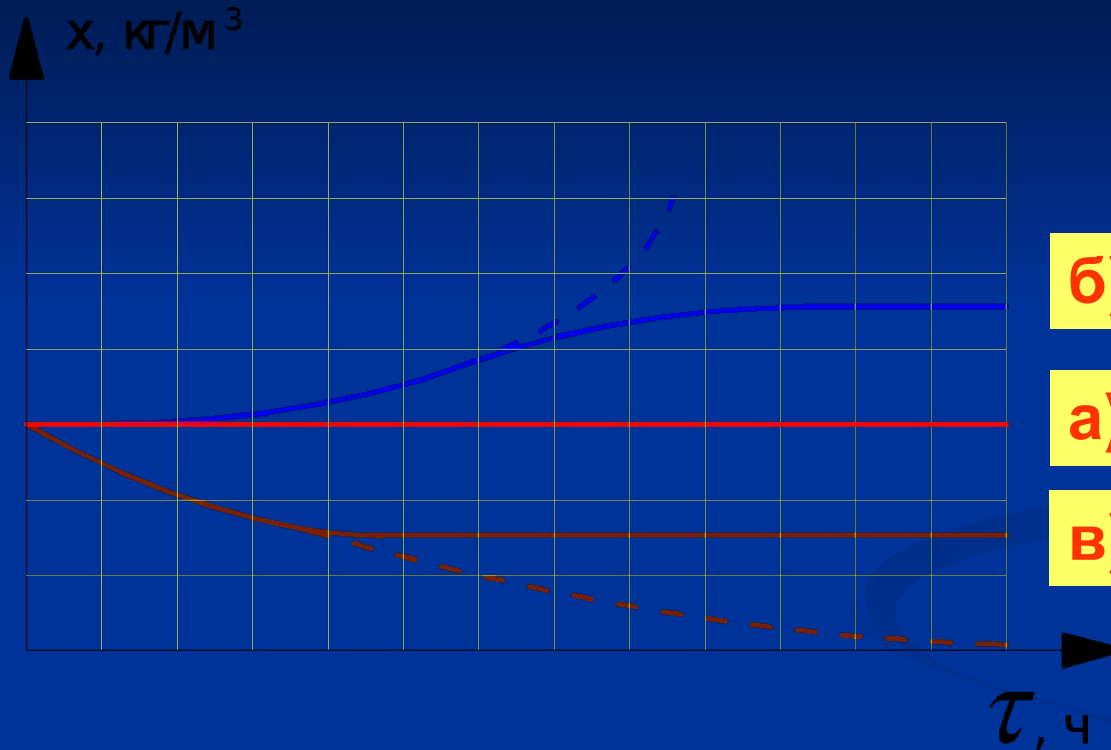


$$D = \text{const}$$

Хемостат эффективен при малых протоках, когда концентрация клеток меняется незначительно, что облегчает саморегулирование системы.



К ОБЪЯСНЕНИЮ ПРИНЦИПА ХЕМОСТАТА



б) $D_1 < \mu \rightarrow D_1 = \mu_1$

а) $D = \mu$

в) $D_2 > \mu \rightarrow D_2 = \mu_2$

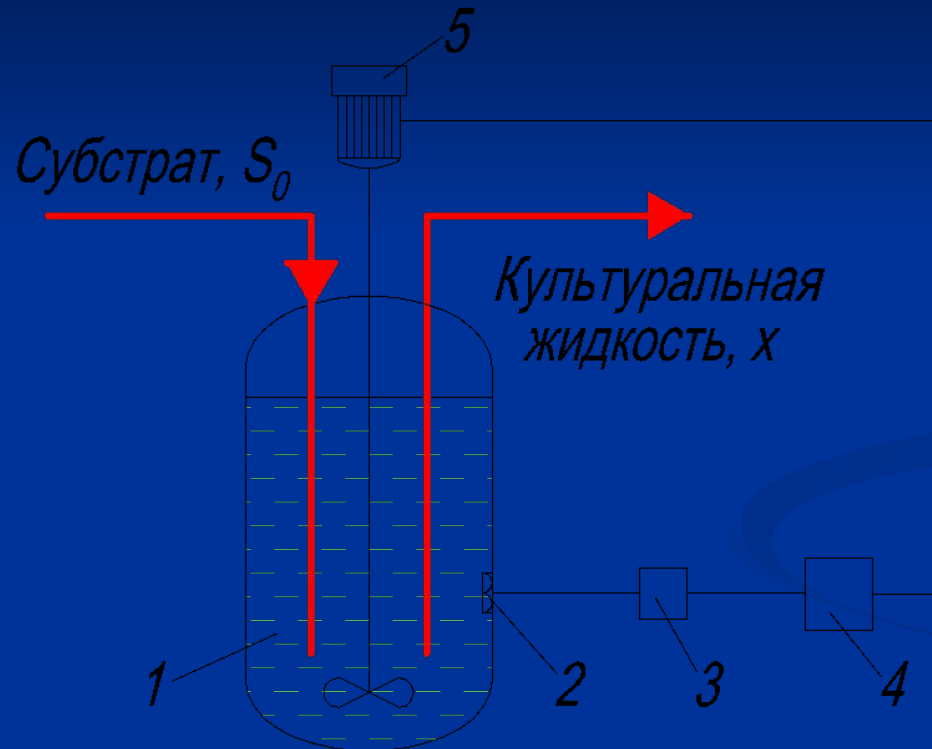
При изменении **D** удельная скорость роста **μ** также начинает изменяться, но с течением времени стабилизируется на другом уровне.

То есть, культура самонастраивается на новую величину скорости протока **D**.



ОКСИСТАТ

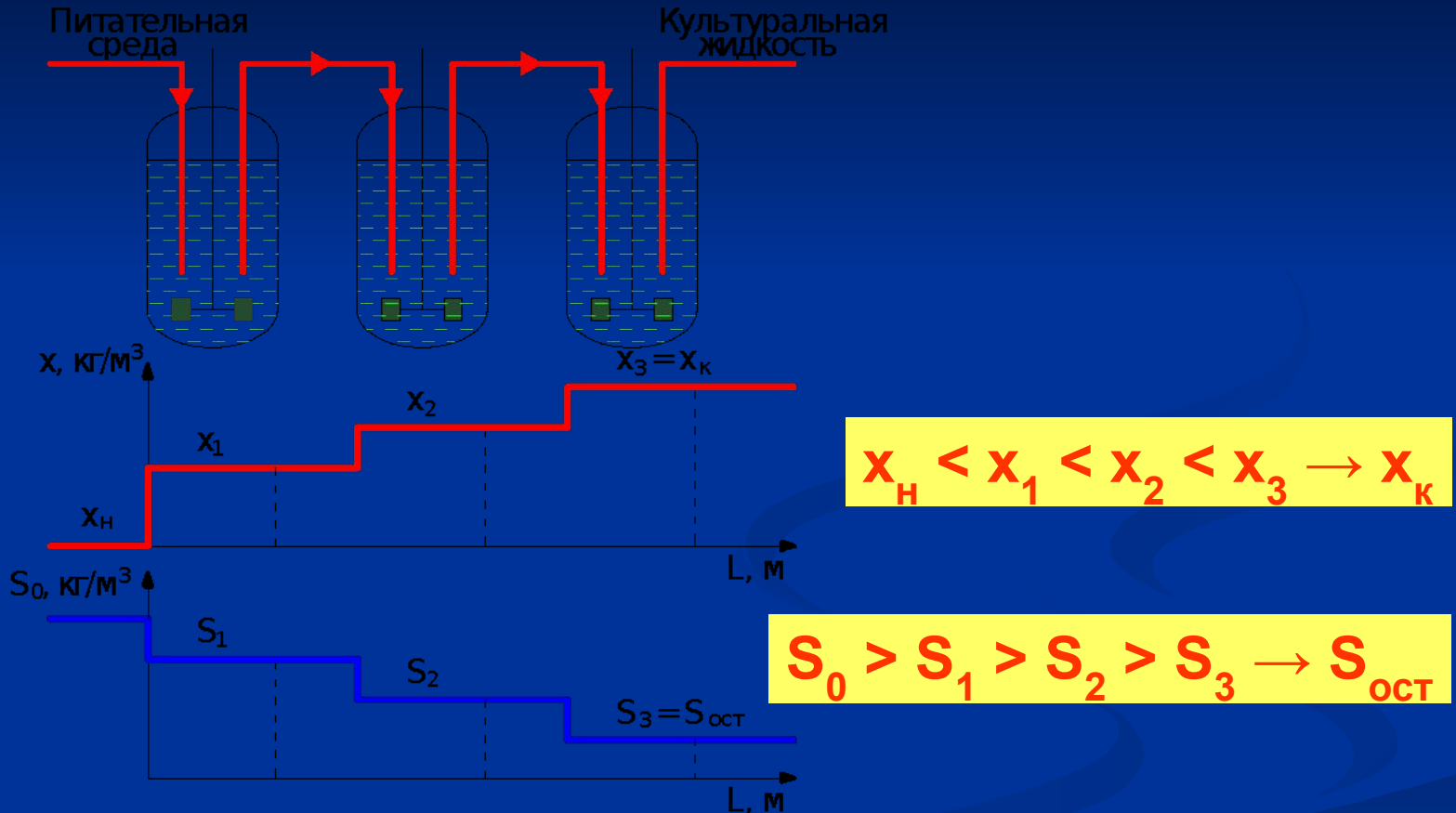
Оксистат - разновидность хемостата



В аналогичной системе регулируют не частоту вращения мешалки, а подачу кислорода в биореактор.



МНОГОСТАДИЙНОЕ НЕПРЕРЫВНОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ



Возможна реализация принципа дифференцированных режимов.



ПРЕИМУЩЕСТВА НЕПРЕРЫВНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

- **Компактность и меньшая материалоемкость** по сравнению с биореакторами периодического действия той же производительности;
- **Простота обслуживания**, поскольку сокращаются затраты рабочего времени на вспомогательные операции - загрузку и разгрузку биореактора, его мойку и санитарную обработку;
- **Простота автоматизации**;
- **Постоянная работа с полной нагрузкой**;
- **Более высокое качество получаемого продукта**, поскольку культивирование осуществляют в условиях установившегося режима, обеспечивающих оптимальное физиологическое состояние культуры - в фазе экспоненциального роста;
- **Более высокая продуктивность**, чем у биореактора периодического действия, однако концентрация продукта всегда бывает ниже.



ПРИЧИНЫ, СДЕРЖИВАЮЩИЕ ПЕРЕХОД НА НЕПРЕРЫВНОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ

- **Более высокие требования к герметизации** биореакторов для сохранения асептики;
- **Более сложное конструктивное устройство аппаратуры и систем контроля**, что ведет к увеличению капитальных затрат;
- **Загрязнение биомассой внутренних поверхностей** биореактора и расположенных внутри его устройств при продолжительном культивировании микроорганизмов, особенно микроскопических грибов;
- **Угроза утраты ценных свойств генноинженерных штаммов;**
- **Инерционность мышления.**



ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ РЕАЛИЗАЦИИ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

- **Принцип масштабирования**, предусматривающий поэтапное увеличение вместимости аппаратов;
- **Принцип однородности** физико-химических условий (рН, температуры, концентрации растворенных веществ, включая O_2 и т. п.);
- **Принцип асептики**, предусматривающий надежную стерилизацию питательных сред, добавочных компонентов, титрующих растворов, пеногасителей, технологического воздуха, биореактора и коммуникаций;
- **Принцип дифференцированных режимов** культивирования, при котором разные этапы процесса осуществляют при различных (оптимальных) условиях, варьируя такие параметры как температура, рН и т. п.



ОСНОВНЫЕ ТЕХНИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ БИОРЕАКТОРА

В соответствии с основными принципами реализации биотехнологических процессов биореактор должен обладать следующими системами:

- системой перемешивания (для гомогенизации культуральной жидкости и интенсификации тепло- и массообмена);
- системой аэрации культуральной жидкости (для подвода и равномерного распределения стерильного воздуха);
- системой теплообмена (для стабилизации температуры культуральной жидкости);
- системой пеногашения (для понижения уровня пены в биореакторе);
- системами стерилизации оборудования, сред и воздуха;
- системой контроля и регулирования процесса.



НАЗНАЧЕНИЕ СИСТЕМ БИОРЕАКТОРА

- Системы биореактора, должны обеспечивать такие условия культивирования, чтобы μ была как можно выше.
- Прежде, чем рассматривать отдельные системы биореакторов, необходимо четко представлять какие параметры и в каком диапазоне они должны обеспечивать при культивировании микроорганизмов.
- Кинетические зависимости, которые описывают влияние различных параметров культивирования на удельную скорость роста используют при расчете биореакторов, при определении их конструктивных параметров.



УДЕЛЬНАЯ СКОРОСТЬ РОСТА – КОМПЛЕКСНЫЙ ПОКАЗАТЕЛЬ, ХАРАКТЕРИЗУЮЩИЙ ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ

Удельную скорость роста μ можно представить в виде произведений ряда функций, каждая из которых характеризует влияние того или иного параметра культивирования на μ_m .

$$\mu = \mu_m f_1(t) f_2(\text{pH}) f_3(\text{C}) f_4(\text{S})$$

$f_5(\text{P}) \dots$

где μ_m – максимальное, предельно возможное значение μ при самых благоприятных условиях; μ_m – кинетическая константа.

Эту функциональную зависимость можно дополнить функциями от некоторых других параметров, например, концентрации диоксида углерода, окислительно-восстановительного потенциала и пр.



ВЛИЯНИЕ ОСНОВНЫХ ПАРАМЕТРОВ ПРОЦЕССА НА УДЕЛЬНУЮ СКОРОСТЬ РОСТА

В реальных условиях культивирования удельная скорость роста μ всегда ниже своего максимально возможного значения μ_m , являющегося кинетической константой, определяемой экспериментально.

Это обусловлено тем, что она зависит от множества различных факторов.

$$\mu = \mu_m f_1(t) f_2(\text{pH}) f_3(\text{C}) f_4(\text{S}) f_5(\text{P}) \dots$$

Рассмотрим это выражение, исходя из принципа независимости, в соответствии с которым, удельная скорость роста не зависит от не изменяющихся (постоянных) параметров. То есть, если группу параметров, кроме одного, поддерживать на постоянном уровне, то удельная скорость роста будет зависеть только от этого одного переменного параметра.



ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА УДЕЛЬНУЮ СКОРОСТЬ РОСТА

$$\mu = \mu_m f_1(t) f_2(\text{pH}) f_3(\text{C}) f_4(\text{S}) f_5(\text{P}) \dots$$

$$f_2(\text{pH}) f_3(\text{C}) f_4(\text{S}) f_5(\text{P}) = \text{const}$$

$$\mu = \mu_{mt} f_1(t)$$

$$f_1(t) =$$

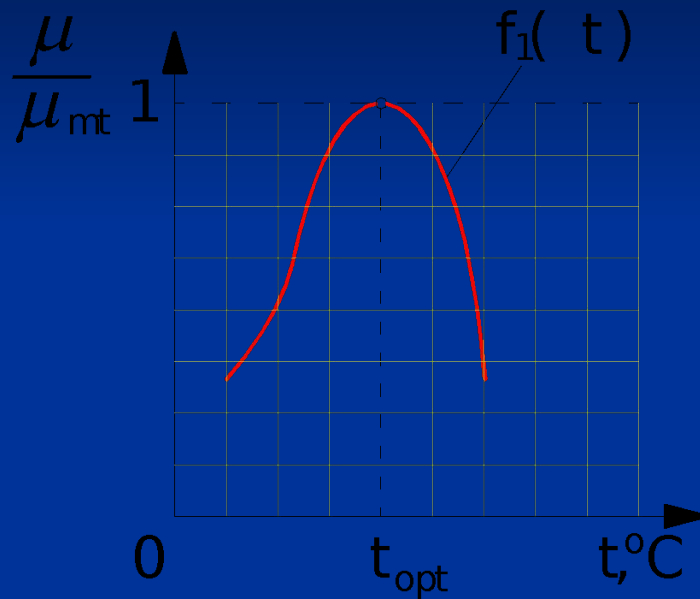
$$\mu / \mu_{mt}$$

где μ_{mt} – максимально возможное значение удельной скорости роста при постоянных pH, C, S, P и при самой благоприятной температуре.

Аналитическое выражение не установлено!



ГРАФИЧЕСКАЯ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ ФУНКЦИИ $f_1(t)$



$$f_1(t) =$$

μ/μ_{mt}
Функция $f_1(t)$ изменяется от 0 до 1 и носит экстремальный характер.

В процессе культивирования оптимальную температуру поддерживают с точностью $\pm 1^\circ\text{C}$ с помощью системы теплообмена биореактора. Для дрожжей, например, $t_{\text{опт}}$ составляет $29\dots 32^\circ\text{C}$.



ВЛИЯНИЕ pH НА УДЕЛЬНУЮ СКОРОСТЬ РОСТА

$$\mu = \mu_m f_1(t) f_2(\text{pH}) f_3(\text{C}) f_4(\text{S}) f_5(\text{P}) \dots$$

$$f_1(t) f_3(\text{C}) f_4(\text{S}) f_5(\text{P}) = \text{const}$$

$$\mu = \mu_{\text{mpH}} f_2(\text{pH})$$

$$f_2(\text{pH}) =$$

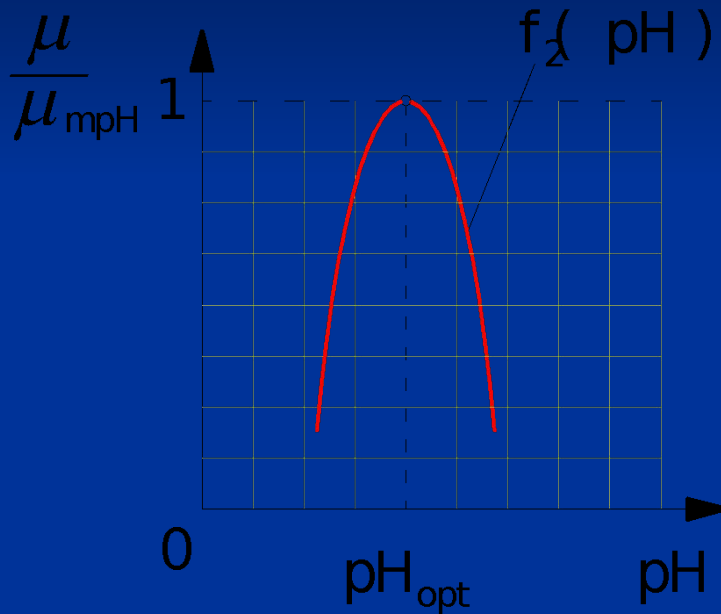
$$\mu / \mu_{\text{mpH}}$$

где μ_{mpH} – максимально возможное значение удельной скорости роста при постоянных t , C , S , P и при самом благоприятном значении pH .

Аналитическое выражение не установлено!



ГРАФИЧЕСКАЯ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ ФУНКЦИИ $f_2(\text{pH})$



$$f_2(\text{pH}) =$$

μ/μ_{pH}
Функция изменяется от 0 до 1 и носит экстремальный характер.

При культивировании дрожжей вида *Candida* $\text{pH}_{\text{opt}} \approx 4$.
Для большинства микроорганизмов $\text{pH}_{\text{opt}} \approx 5,5 \dots 7,5$.



ВЛИЯНИЕ АЭРАЦИИ НА УДЕЛЬНУЮ СКОРОСТЬ РОСТА

Кислород плохо растворим в жидкости. Например, равновесная концентрация растворенного кислорода в воде при нормальных условиях и при контакте ее с воздухом, в котором 21% O_2 (то есть при парциальном давлении 150 мм. рт. ст.), составляет около **7 г/м³**.

В культуральных жидкостях, представляющих солевые растворы, растворимость кислорода ниже и обычно лежит в пределах **4...6 г/м³**.

В то же время скорость потребления кислорода большинством микроорганизмов достаточно велика и составляет **0,2...0,3 г/(м³×с)**. При такой интенсивности дыхания растворенный кислород будет потреблен культурой за очень короткий промежуток времени.



ВЛИЯНИЕ АЭРАЦИИ НА УДЕЛЬНУЮ СКОРОСТЬ РОСТА

$$\mu = \mu_m f_1(t) f_2(\text{pH}) f_3(C) f_4(S) f_5(P) \dots$$

$$f_1(t) f_2(\text{pH}) f_4(S) f_5(P) = \text{const}$$

$$\mu = \mu_{mC} f_3(C)$$

где μ_{mC} – максимально возможное значение удельной скорости роста при постоянных t , pH , S , P и при самом благоприятном значении C .

$$f_3(C) = \mu / \mu_{mC} = C / (K_c +$$

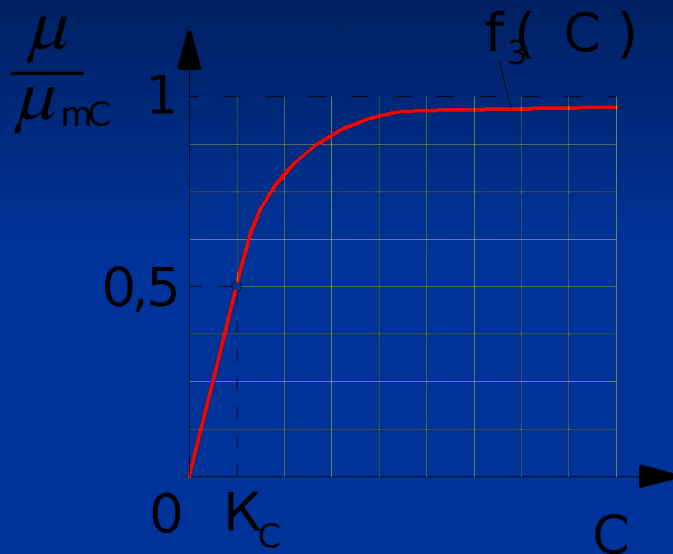
$C)$

$$\mu = \mu_{mC} C / (K_c +$$

$C)$



ГРАФИЧЕСКАЯ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ ФУНКЦИИ $f_3(C)$



$$\mu = \mu_{mC} C / (K_c + C)$$

C) Функция изменяется от 0 до 1:
при $C \rightarrow \infty$, $\mu/\mu_m \rightarrow 1$.

Если $K_c = C$, то $\mu = 0,5\mu_{mC}$

K_c – концентрация O_2 , при которой $\mu = 0,5\mu_{mC}$.

Эта модель аналогична уравнению Михаэлиса-Ментен, описывающему кинетику ферментативных реакций:

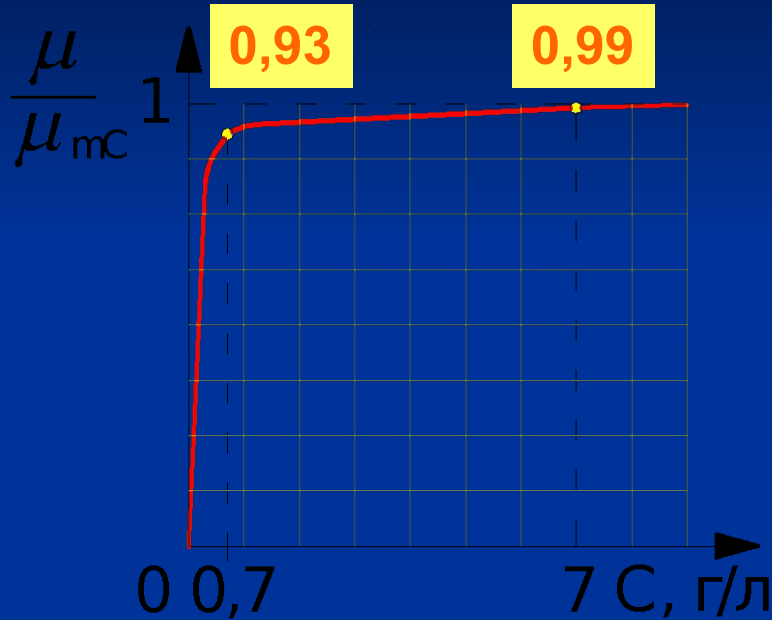
$$v = V_m S / (K_M + S)$$



Леонор Михаэлис
(1875-1949)



ВЛИЯНИЕ АЭРАЦИИ НА УДЕЛЬНУЮ СКОРОСТЬ РОСТА ДРОЖЖЕЙ



$$\mu = \mu_{mC} C / (K_c + C)$$

Для дрожжей $K_c = 5 \cdot 10^{-2} \text{ гО}_2/\text{м}^3$.

При $C = 7 \text{ гО}_2/\text{м}^3 \rightarrow \mu/\mu_m = 0,99$;
при $C = 0,7 \text{ гО}_2/\text{м}^3 \rightarrow \mu/\mu_m = 0,93$.

Нижний и верхний пределы концентрации растворенного кислорода C_n и C_v называют критическими. Типичные минимальные концентрации растворенного кислорода для большинства микроорганизмов составляют $0,06 \dots 2,6 \text{ г/м}^3$.



ВЛИЯНИЕ ЛИМИТИРУЮЩЕГО СУБСТРАТА НА УДЕЛЬНУЮ СКОРОСТЬ РОСТА

$$\mu = \mu_m f_1(t) f_2(\text{pH}) f_3(C) f_4(S) f_5(P) \dots$$

$$f_1(t) f_2(\text{pH}) f_3(c) f_5(P) = \text{const}$$

$$\mu = \mu_{ms} f_4(S)$$

где μ_{ms} – максимально возможное значение удельной скорости роста при постоянных t , pH , C , P и при самом благоприятном значении S .

$$f_4(S) = \mu / \mu_{ms} = S / (K_s + S)$$

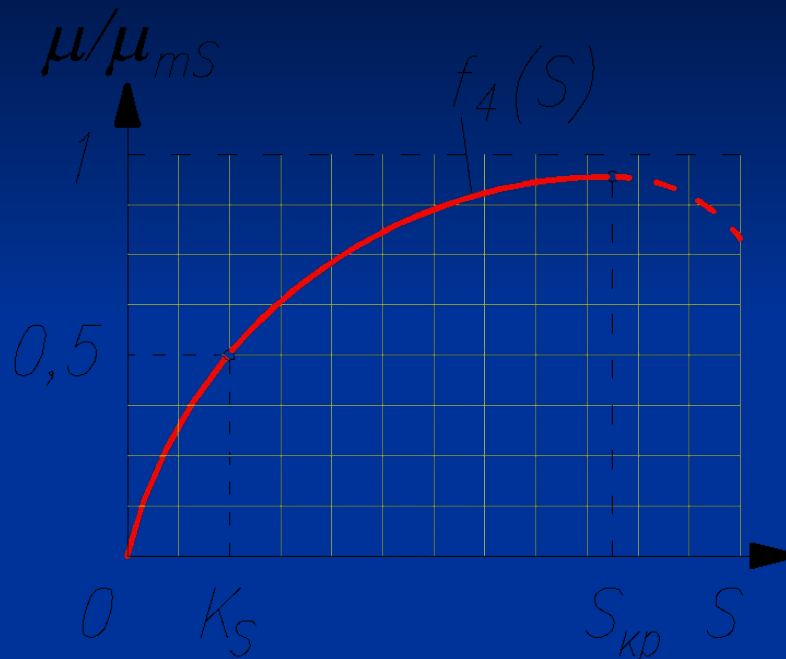
$$\mu = \mu_{ms} S / (K_s + S)$$



Жак Люсьен Моно
(1910-1976)



ГРАФИЧЕСКАЯ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ ФУНКЦИИ $f_4(S)$



$$\mu = \mu_{mS} S / (K_s +$$

$S)$
Если $K_s = S$, то $\mu = 0,5\mu_{mS}$

Функция изменяется от 0 до 1.

Эта модель аналогична уравнению Михаэлиса-Ментен, описывающему кинетику ферментативных реакций.

Величина K_s – чаще всего лежит в пределах 1...20 кг/м³.

Как и недостаток, переизбыток субстрата в культуральной среде также нежелателен, поскольку препятствует проникновению к культуре кислорода, а в некоторых случаях его повышенные концентрации могут оказывать ингибирующее воздействие на рост биомассы.



ВЛИЯНИЕ ПРОДУКТОВ МЕТАБОЛИЗМА НА УДЕЛЬНУЮ СКОРОСТЬ РОСТА

$$\mu = \mu_m f_1(t) f_2(\text{pH}) f_3(\text{C}) f_4(\text{S}) f_5(\text{P}) \dots$$

$$f_1(t) f_2(\text{pH}) f_3(\text{c}) f_4(\text{S}) = \text{const}$$

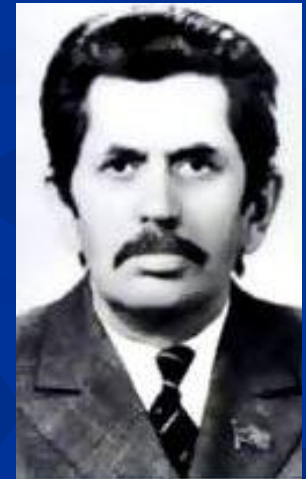
$$\mu = \mu_{mP} f_5(\text{P})$$

где μ_{mP} – максимально возможное значение удельной скорости роста при постоянных t , pH , C , S и при самом благоприятном значении P .

$$f_5(\text{P}) = \mu / \mu_{mP} = K_P / (K_P + \text{P})$$

$$\mu = \mu_{mP} K_P / (K_P + \text{P})$$

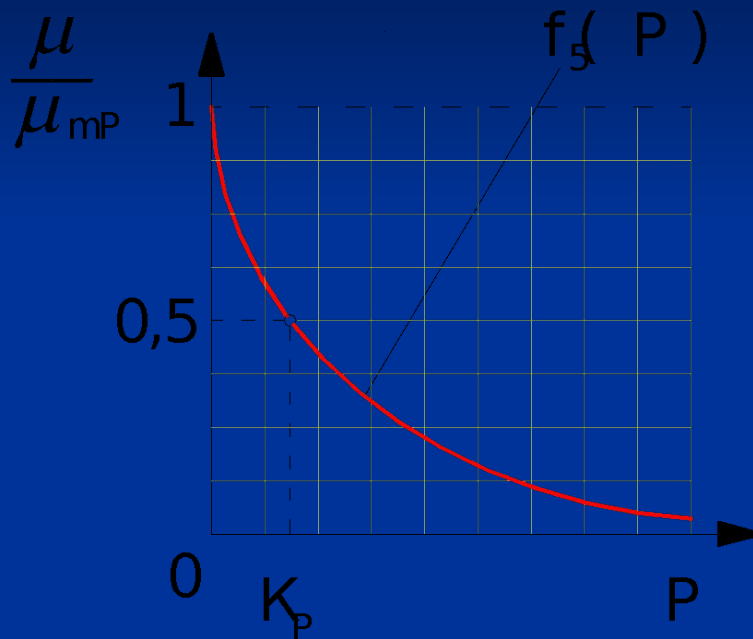
© проф. Федоренко Борис Николаевич



Академик
Иерусалимский Н.Д.
(1901-1967)



ГРАФИЧЕСКАЯ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ ФУНКЦИИ $f_5(P)$



$$\mu = \mu_{mP} \frac{K_p}{K_p + P}$$

Если $K_p \gg P$, то $f_5(P) \approx 1$ и в этом случае концентрация ингибирующего продукта не оказывает существующего влияния на рост популяции, поэтому этим фактором можно пренебречь.



ОСНОВНОЕ УРАВНЕНИЕ МИКРОКИНЕТИКИ РОСТА МИКРООРГАНИЗМОВ

$$\mu = \mu_m f_1(t) f_2(\text{pH}) f_3(\text{C}) f_4(\text{S}) f_5(\text{P})$$

$$\mu = \mu_m \frac{S}{K_s + S} \times \frac{K_p}{K_p + P}$$

Уравнение Моно-Иерусалимского

Оно не учитывает влияния концентрации растворенного кислорода, температуры и pH, поскольку этими параметрами можно управлять и, следовательно, поддерживать на оптимальных уровнях, вследствие чего каждая из функций $f_1(t)$, $f_2(\text{pH})$ и $f_3(\text{C})$ приближается к единице.



ОСНОВНОЕ УРАВНЕНИЕ МИКРОКИНЕТИКИ РОСТА МИКРООРГАНИЗМОВ

$$\mu = \mu_m \frac{S}{(K_s + S)} \times \frac{K_p}{(K_p + P)}$$

S - ? P - ?

$$P = A(S_o - S)$$

A - коэффициент пропорциональности - константа, представляющая экономический показатель продуктообразования относительно потребления субстрата, кг/кг;

$$K_{ps} = K_p / A$$

K_{ps} – концентрация субстрата, которая будучи переработанной, приводит к выделению такого количества продуктов обмена, при котором μ становится равной половине максимально возможного значения.



ОСНОВНОЕ УРАВНЕНИЕ МИКРОКИНЕТИКИ РОСТА МИКРООРГАНИЗМОВ

$$\mu = \mu_m \frac{S}{(K_s + S)} \times K_{ps} / (K_{ps} + S_o - S)$$

S - ?

Уравнение с одной неизвестной – справедливо для периодического и непрерывного процессов культивирования микроорганизмов.

Точность уравнения составляет $\pm 10...15\%$.



РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА К ИЗУЧАЕМОЙ ТЕМЕ

ГОСУДАРСТВЕННОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
“МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ПИЩЕВЫХ ПРОИЗВОДСТВ
МИНИСТЕРСТВА ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ”

Б. Н. Федоренко

ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОРУДОВАНИЕ
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ
ПРОИЗВОДСТВ

Часть 1. БИОРЕАКТОРЫ

УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ

МОСКВА 2006

Федоренко Б.Н. Технологическое оборудование микробиологических производств. Часть 1. Биореакторы. – М.: МГУПП, 2006. – 66 с.



ФЕДОРЕНКО

Борис Николаевич

доктор технических наук, профессор

Кафедра “Эксплуатационное
оборудование АПК”

Московского государственного
университета пищевых производств

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!