

# **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	Иогурт
<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 <sub>12</sub>
<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	$\beta$ -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]; A --> C[Биохимические]; A --> D[Одосубстратные конверсии]; A --> E[Многосубстратные конверсии]; A --> F[Биоаналогичные];
```

## Биологические

Производство биомассы  
(белок одноклеточных)

## Биохимические

производство клеточных компонентов  
(ферменты, нуклеиновые кислоты)

## Одосубстратные 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

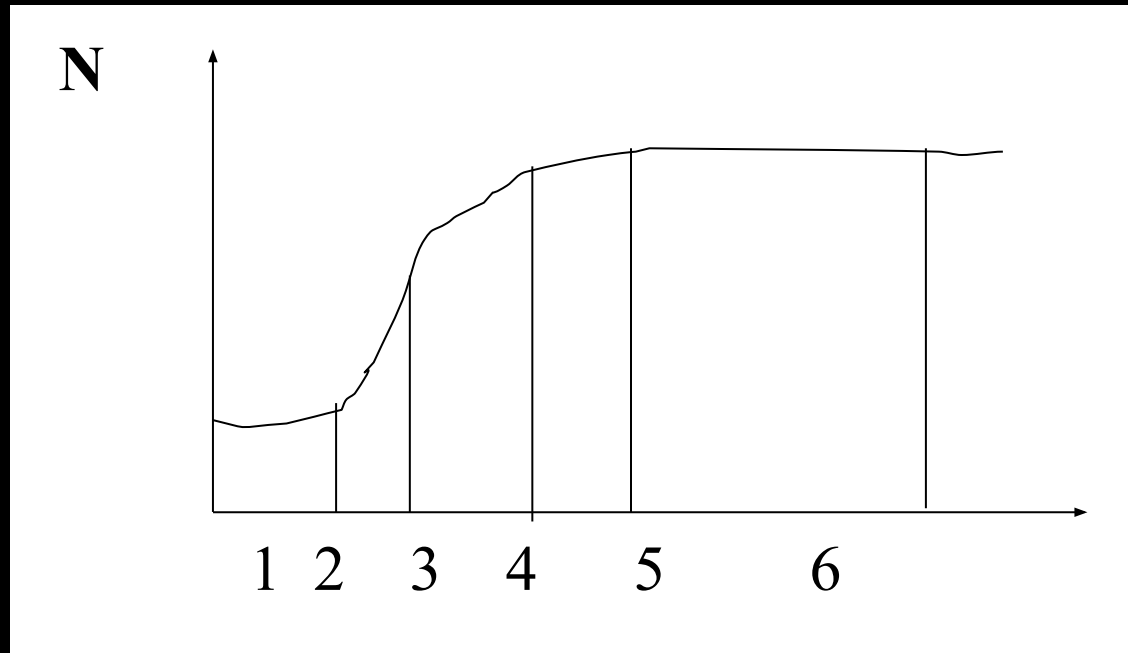
## 1.1. Подготовка посевного материала (инокулята):

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



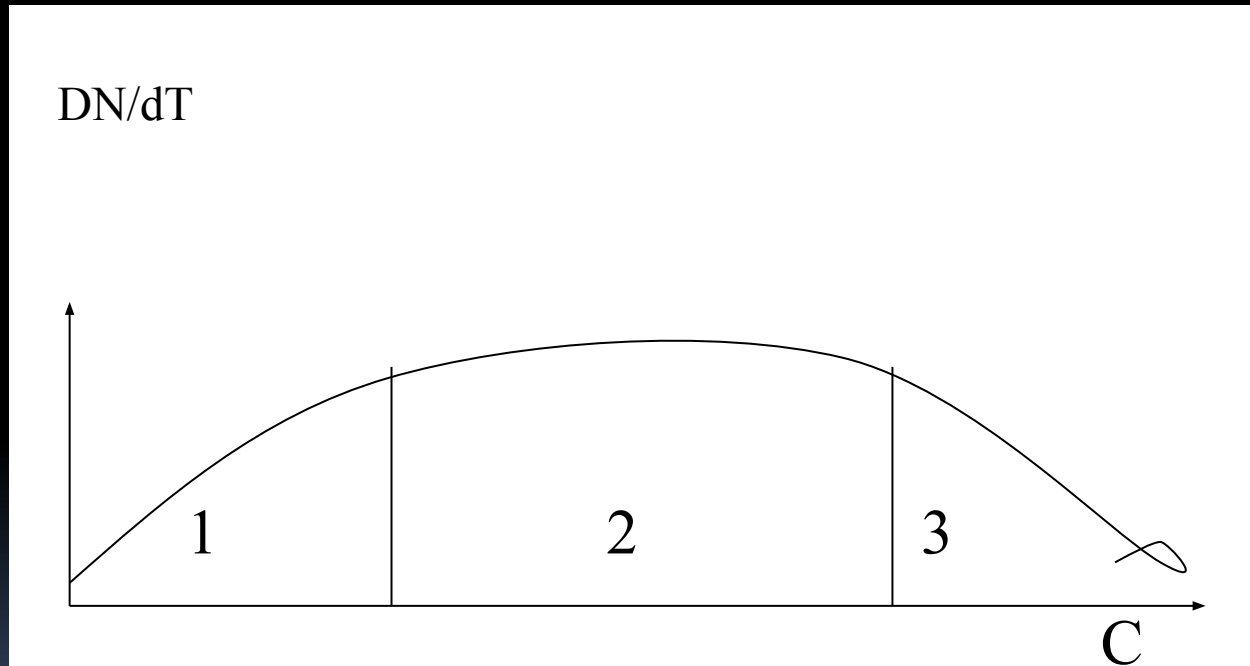
1. индукционный период (лаг-фаза)
2. фаза экспоненциального роста (накопление биомассы и продуктов биосинтеза)
3. фаза линейного роста (равномерный рост культуры)
4. фаза замедленного роста
5. стационарная фаза (постоянство жизнеспособных особей)
6. Фаза старения культуры (отмирания)

# 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.

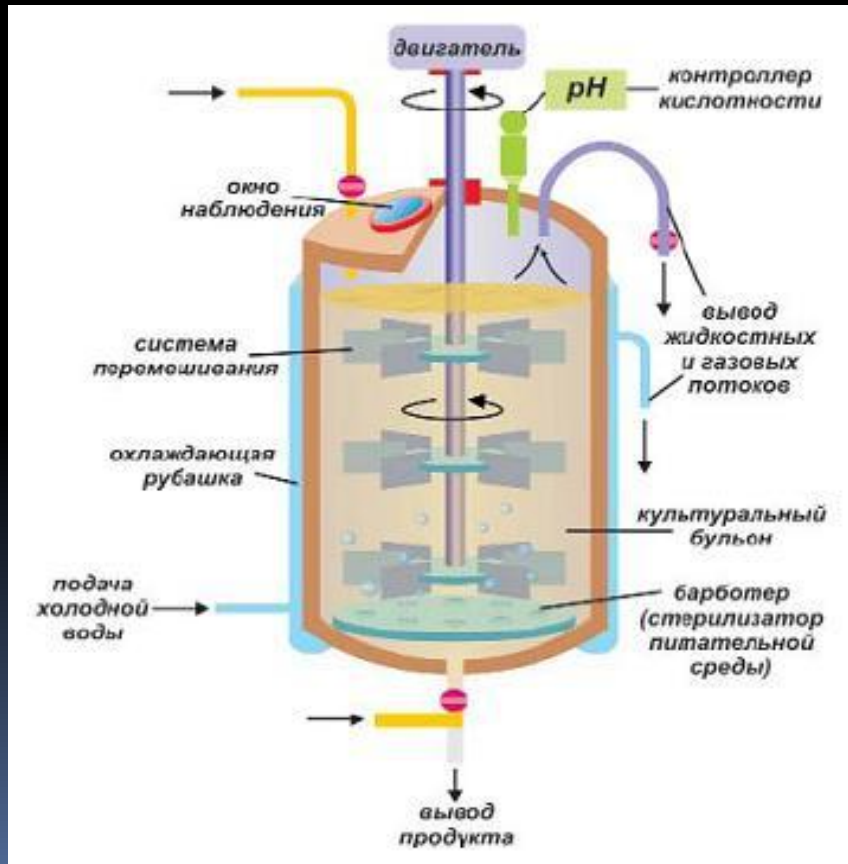
Эффективность выбранного режима стерилизации оценивают по константе скорости гибели микроорганизмов (берется из специальных таблиц) умноженная на продолжительность стерилизации.

# 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.

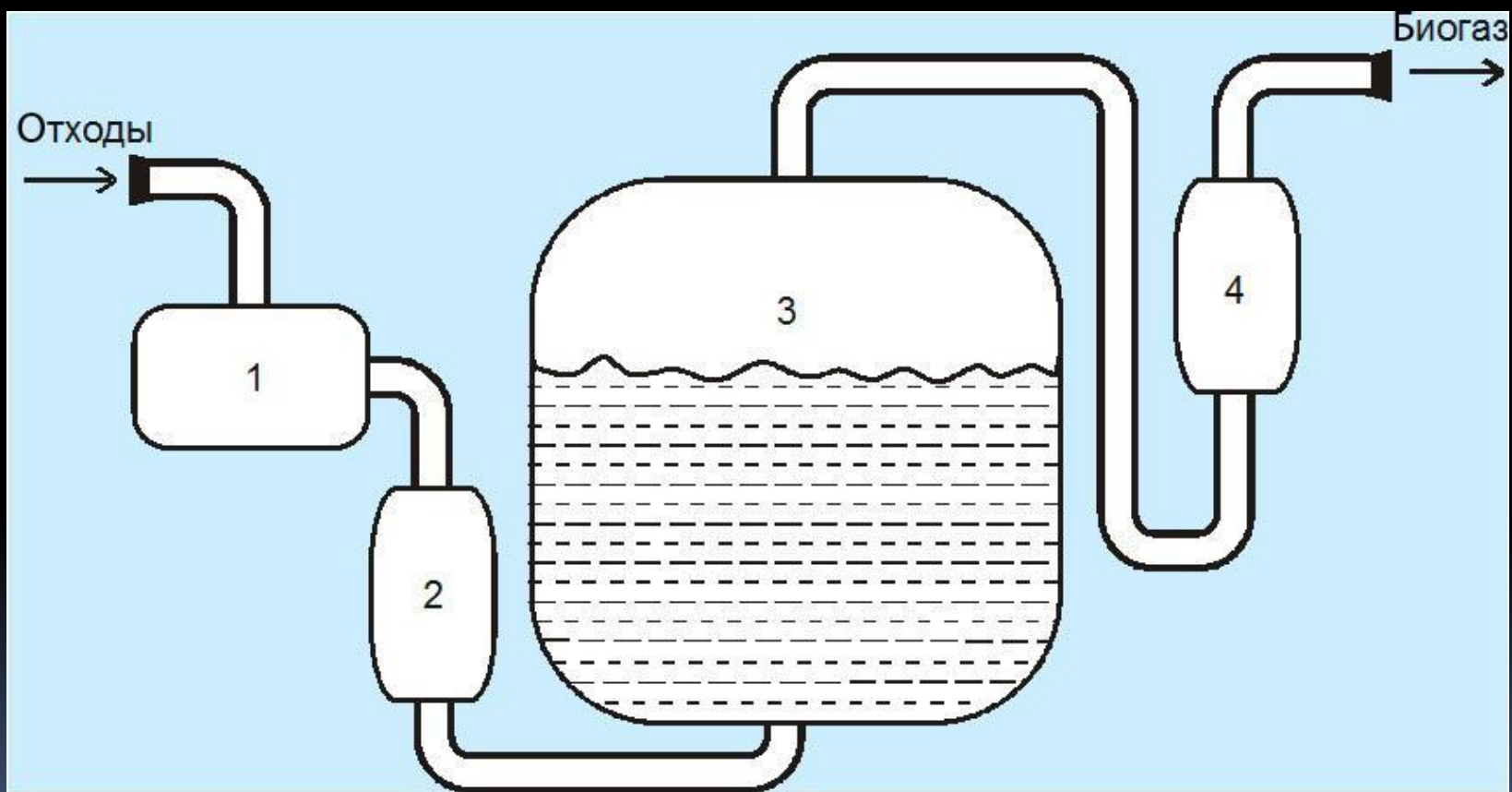


❖ БТ процессы можно разделить на две группы - **периодические** и **непрерывные**.

- 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



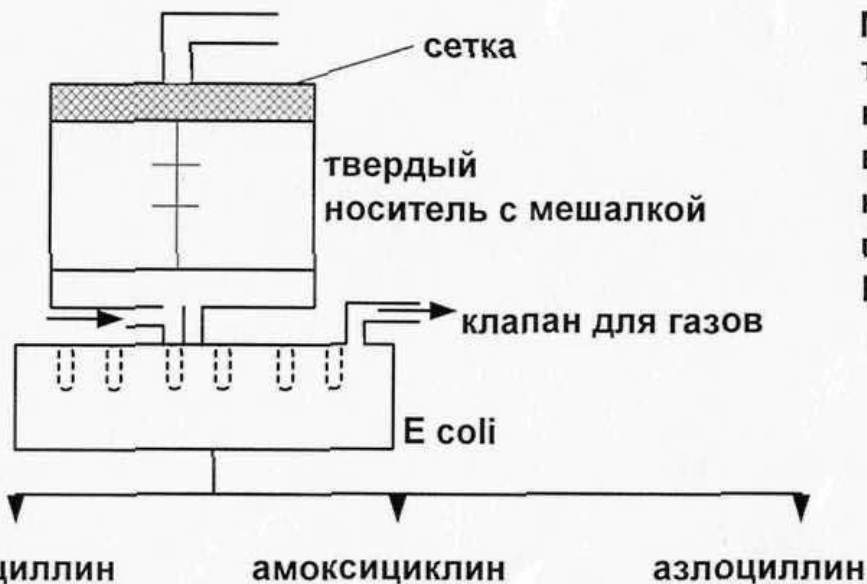
## Типы биореакторов.

### 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:

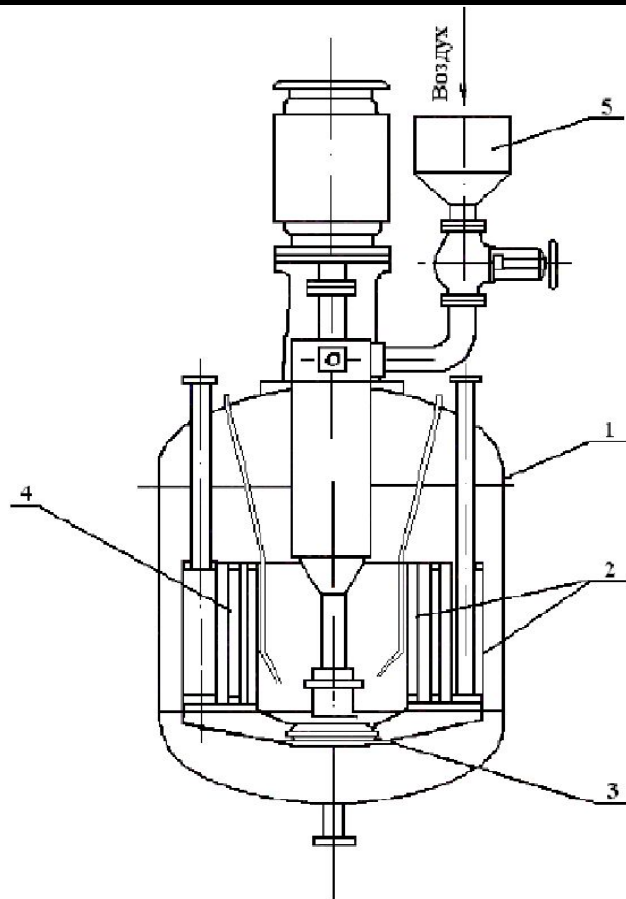


Рис.27. Ферментатор с самовсасывающей мешалкой непрерывного действия:  
1- корпус, 2 – диффузор, 3 – самовсасывающая мешалка, 4 – теплообменник,  
5 – фильтр

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

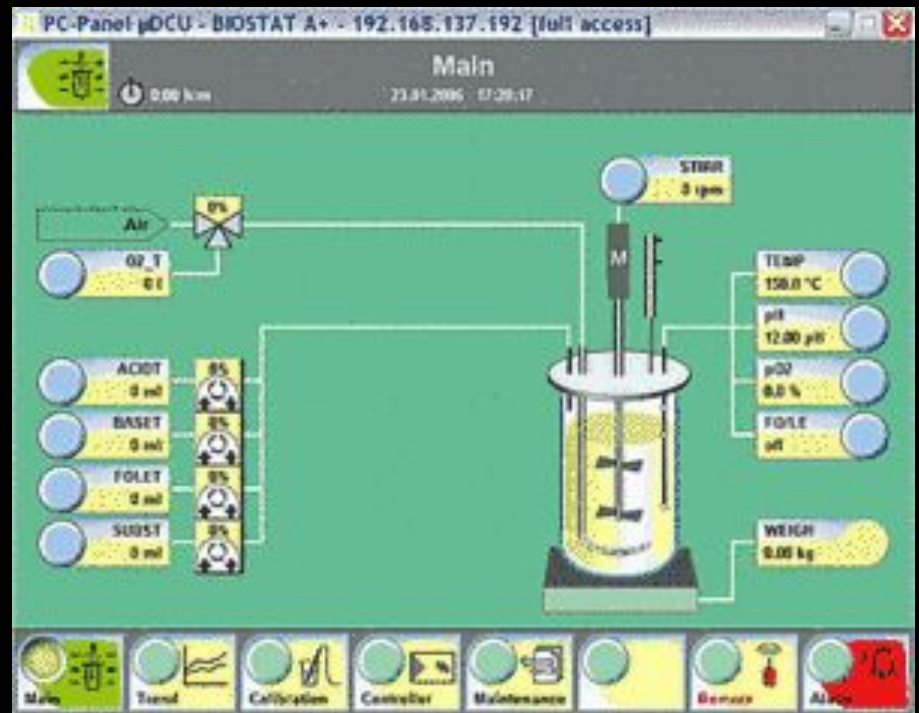


Лабораторный  
газовихревой



Производственный



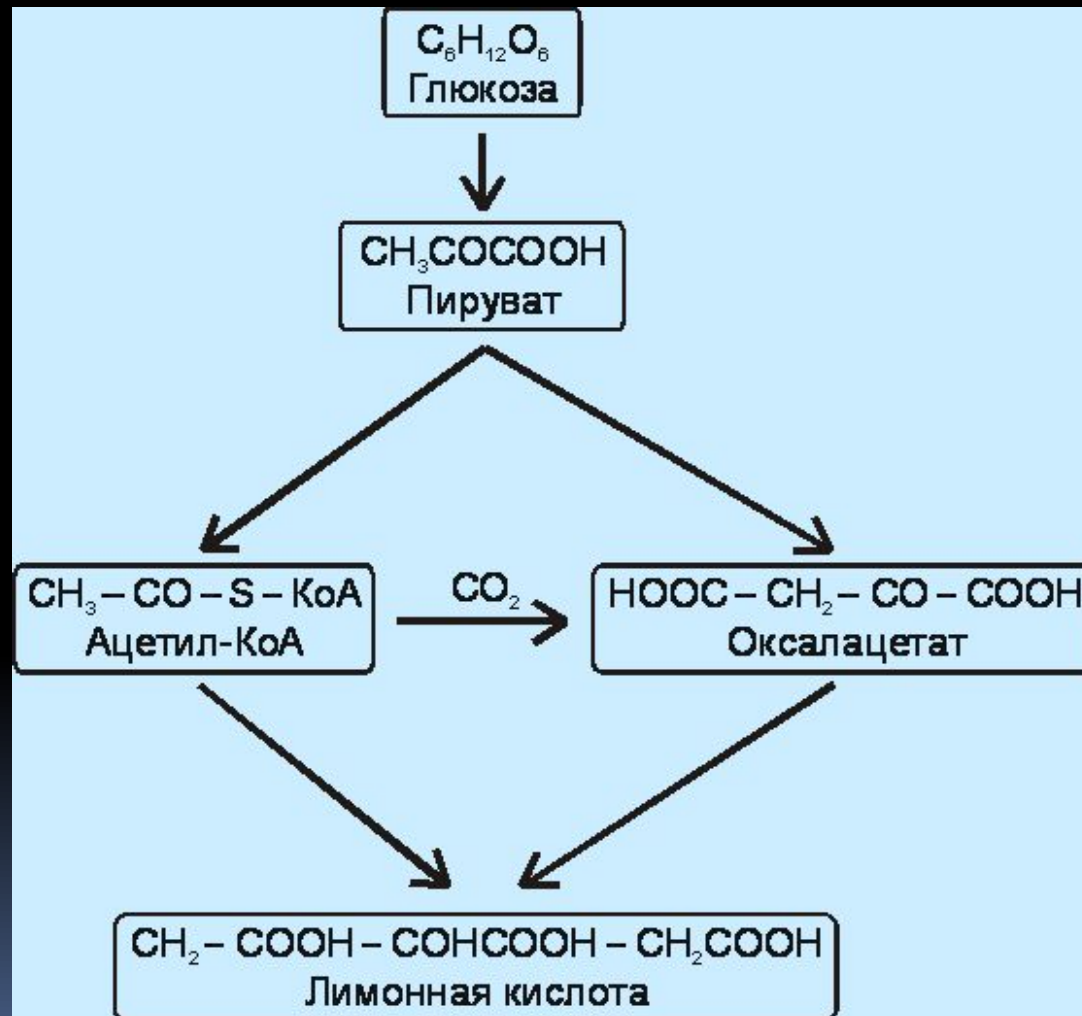


**Biostat A plus - автоклавируемый ферментер со сменными сосудами (рабочий объем 1,2 и 5 л) для культивирования микроорганизмов и культур клеток и является полностью масштабируемым при переходе к большим объемам.**

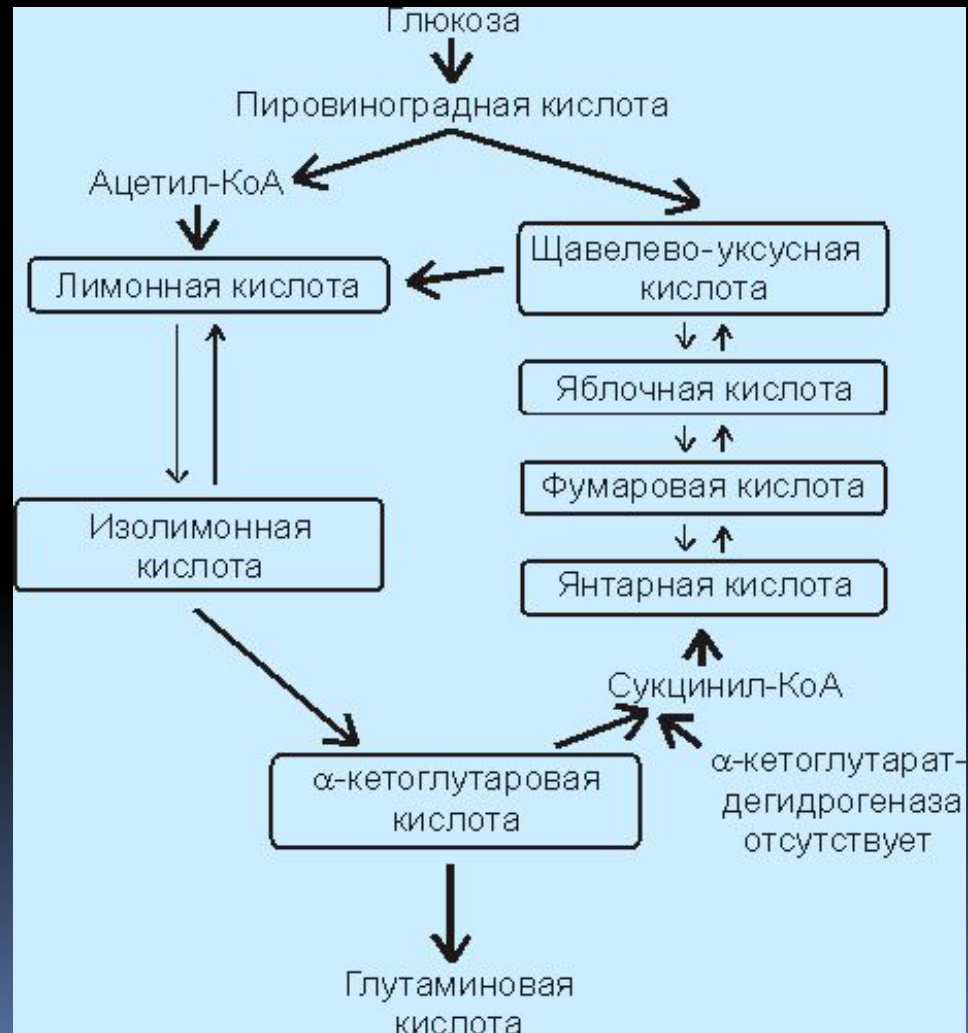
**Единый корпус с интегрированным оборудованием измерения и управления, насосами, системой температурного контроля, подачи газа и мотором**

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

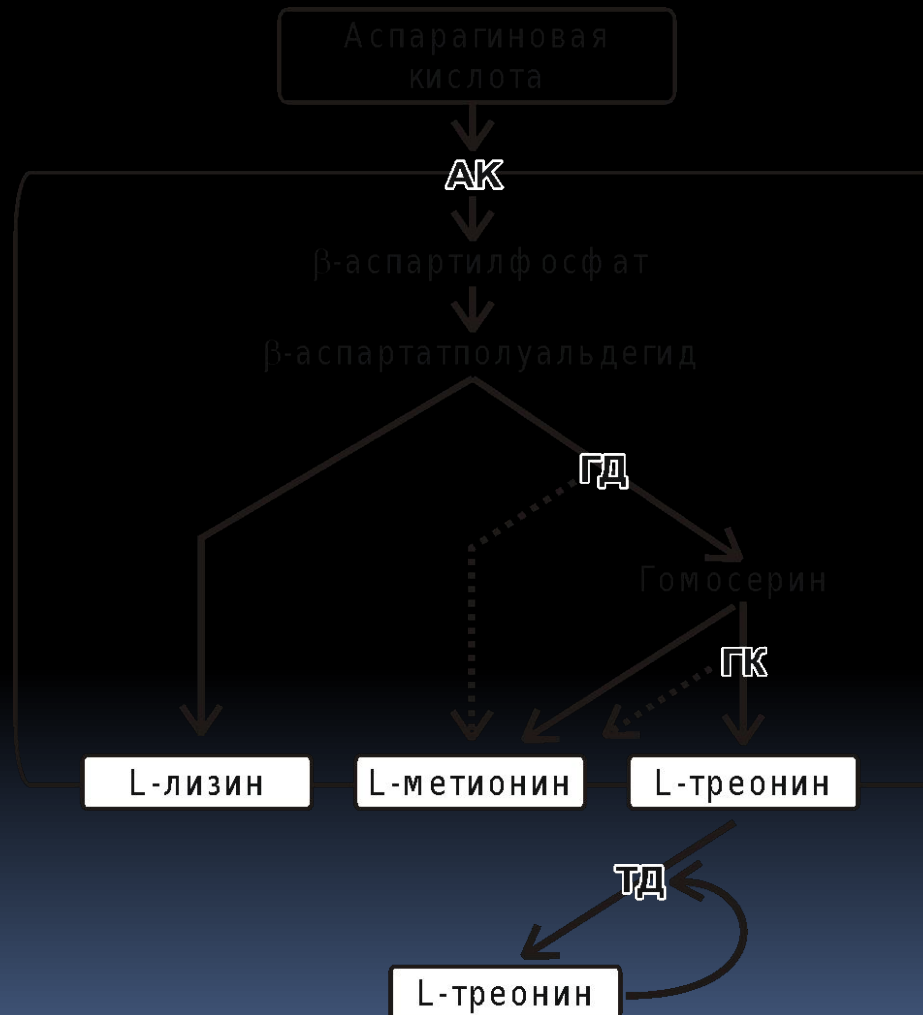
# Получение лимонной кислоты



# 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

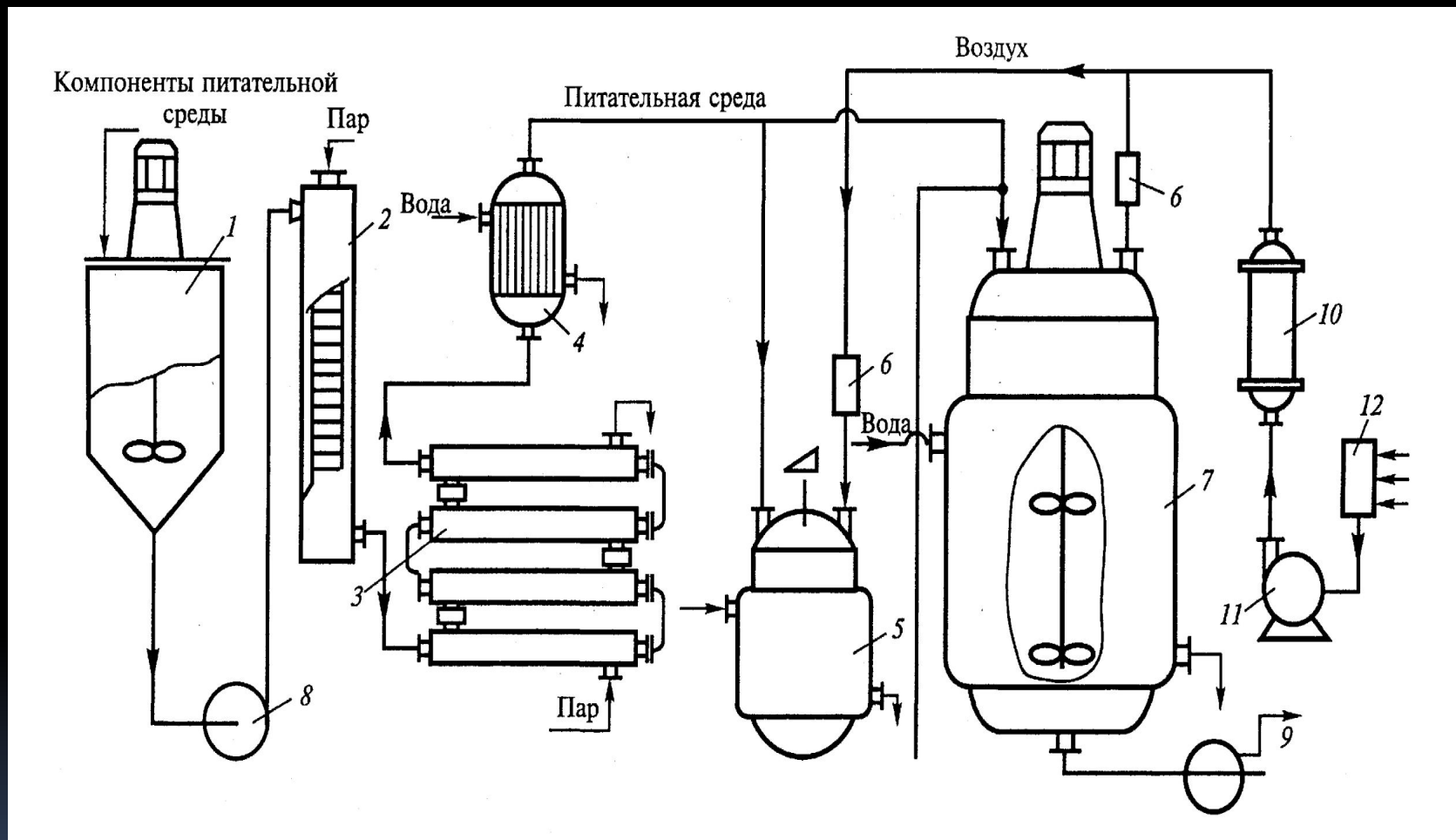
2.1. Стадия биосинтеза, где в максимальной степени используются возможности биообъекта для получения лекарственного продукта (накапливается внутри клетки или секретруется в культуральную среду).

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/м<sup>3</sup> ч)            Удельная скорость роста, <math>\mu</math> (ч<sup>-1</sup>)            Удельная скорость потребления субстрата, <math>q_s</math> (кг/кг·ч)</p>
<p>Концентрации важнейших внутриклеточных компонентов (ферменты метаболизма углерода, ключевые метаболиты, АТФ, НАДФ и др.)</p> <p>Концентрация биомасс</p> <p>Состав микрофлоры в культуре.</p> <p>Концентрация растворенных O<sub>2</sub> и CO<sub>2</sub> в культуральной среде</p> <p>Уровень и состояние пены</p> <p>Концентрация целевого продукта</p>	<p>Удельная скорость образования продукта, <math>q_p</math> (кг/кг·ч)</p> <p>Экономический коэффициент, <math>Y_p, Y_x</math> (кг/кг)</p> <p>Объемный коэффициент массопередачи по кислороду, <math>K_{vO_2}</math> (ч<sup>-1</sup>)</p> <p>Энергетический выход биосинтеза, <math>\eta</math></p> <p>Теплопродукция</p> <p>Суммарный удельный расход сырья</p>

# Критерии для оценки эффективности БТ

Скорость роста продуцента

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

где  $dX/dt$  – скорость роста,  $X$  – биомасса,  
 $\mu$  – 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 прилипанию 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