

## Лекція 4

### Тема: Етапи біотехнологічного процесу.

#### План

1. Підготовчий етап
2. Виробничий етап біотехнологічного процесу.
3. Заключний етап біотехнологічного процесу

#### I. Підготовчий етап

1. Постановка завдання, вибір стратегії його вирішення, підготовку технічної документації і технічних інструкцій.
2. Підбір, отримання або придбання продуцентів.
3. Підбір, виробництво або придбання біореакторів або промислових установок.
4. Підготування поживних середовищ і підготовка умов культивування.
5. Нарощування маточних культур або продуцентів.
6. Запуск виробництва.

#### Основні вимоги до продуцентів, що використовуються у біотехнології:

- високий стабільний вихід цільового продукту;
- невисока ціна середовищ;
- простота культивування;
- висока швидкість росту і вихід продукту за коротких час;
- зберігання характеристик при тривалому культивуванні;
- стійкість до можливих контамінантів (інших мікроорганізмів);
- цільовий продукт повинен відносно легко виділятися;
- безпечність для оточуючого середовища.

#### Відмінні (від хімічних) особливості біотехнологічних процесів ферментації:

- чутливість продуцентів до фізико-хімічних і механічних впливів;
- забезпечення масопередачі у багатофазних системах;
- тривалість періодичного культивування (8-12 діб);
- дотримання стерильності;
- піноутворення;
- багатокомпонентність живильних середовищ;
- складність механізмів регуляції росту і біосинтезу продуцентів.

## **II. Виробничий етап біотехнологічного процесу.**

**Виробничий етап** – це сукупність послідовних операцій від початку функціонування об'єкта до завершення процесів росту, біосинтезу або біотрансформації, які можуть бути обумовлені вичерпанням компонентів живильного середовища старінням культури, зміненням характеристики об'єкта тощо. Для цього в процесі виробництва необхідно контролювати десятки фізико-хімічних параметрів середовища культивування, кількість яких може варіювати залежно від завдання виробництва. Усі необхідні параметри контролюються автоматично і в динаміці. За необхідності, у разі відхилення від заданих характеристик проводиться їх корекція: внесення необхідних компонентів, або їх видалення.

### **Параметри середовища культивування, що контролюються:**

- рН середовища та окислювально-відновлювальний потенціал;
- тиск та температура у біореакторів;
- рівень і маса середовища культивування;
- рівень рідини та газів;
- швидкість обертання мішалок (для регуляції рівня піни);
- концентрація катіонів і аніонів;
- концентрація солей у живильному середовищі;
- концентрація газів у повітрі.

**Основна мета** на цьому етапі – забезпечення максимально сприятливих умов функціонування біооб'єкта (максимальне отримання цільового продукту при мінімальних затратах).

### **Основні завдання виробничого етапу.**

Серед завдань, які необхідно вирішувати на виробничому етапі, можна розділити наступні:

1. Підтримання і контроль асептичних (стерильних) умов.
2. Створення і контроль умов росту культур (температурний режим, масо- і газообмін, якості поживного середовища – зменшення поживних речовин і збільшення продуктів метаболізму).
3. Концентрація ферментів і білків у культуральній рідині.
4. Відсутність сторонньої мікрофлори.
5. Рівень піноутворення.

### **Особливості вирішення цих задач.**

#### **1. Підтримання і контроль асептичних (стерильних) умов**

У процесі виробничого етапу постійно відбувається газообмін із середовищем і культуральними середовищами, тому необхідно

дотримувати умов стерильності, що досить складно при великих об'ємах виробництва.

Рішення цієї проблеми полягає:

- у застосуванні попередньо очищеного від контамінантів (іншої мікрофлори) повітря за допомогою фільтрів;
- стерилізація поживних середовищ у процесі культивування;
- контроль стерильності умов виробництва.

## 2. *Створення і контроль умов росту культур*

**Температурний режим.** У процесі культивування постійно змінюється температурний режим, тому постійно потрібно або відводити тепло, або (навпаки) підігрівати середовище. Так, у аеробних умовах відбувається тепловиділення, причому чим вище інтенсивність росту культури, тим більша швидкість розігріву культуральної рідини.

Найбільш простим способом відводу тепла є застосування оборотної води через змішувачі, водяні сорочки тощо.

Деяко простіше здійснювати контроль підвищення температури: існують різні системи підігріву – електричні, водяні.

**Масо- і газообмін.** Важливою особливістю біологічних об'єктів є їхня гетерогенність, тобто неоднорідність. Рідке середовище, у якому культивують мікроорганізми, теж є гетерогенним, бо в ньому є рідкі, тверді і газоподібні компоненти (фази). У процесі життєдіяльності клітини утилізують частину компонентів із середовища і постійно виділяють екзометаболіти, тобто вони самі створюють гетерогенність хімічного і газового складу. Таким чином сам об'єкт постійно створює відхилення від оптимальних для нього умов функціонування. Завдання біотехнолога забезпечити максимальну продуктивність об'єкта в штучних умовах шляхом усунення факторів «самознищення».

Забезпечення необхідного масо- і газообміну.

- перемішування культур – це складне завдання, тому, що інтенсивне перемішування призводить до активного піноутворення, яке є вкрай небажаним явищем. Використання піногасників призводить до проблем, пов'язаних з їх побічною дією і дотримання стерильності.

Забезпечення киснем (аеробних культур) – за рахунок гарної розчинності кисню у воді, або шляхом підвищення парціального тиску кисню у газі. (парціальний тиск – це тиск газу або пари у суміші, який мав би цей газ або пара, якщо він один займав увесь об'єм у суміші).

Забезпечення культивування анаеробів, яке не потребує аерації, пов'язано з вирішенням проблеми видалення кисню із середовища, що досягається введенням у реактор інертного газу або витіснення кисню вуглекислотою, яка виділяється у процесі метаболізму об'єкту, що

культивується. Герметизація біореактора створює певні складності, бо утруднює перемішування і теплообмін.

Необхідний постійний контроль складу, вмісту кисню, вуглекислого газу у середовищі культивування, а за необхідності регулюється інтенсивність перемішування.

### ***3. Склад і якість поживного середовища.***

Найважливішим фактором оптимального росту клітинної культури є склад і якість живильного середовища, які динамічно змінюються, що виражається у зменшенні вмісту корисних для клітин речовин і неперервному зростанні продуктів метаболізму (екзометаболітів). Крім того, компоненти, що входять до складу поживного середовища, можуть змінюватися з неоднаковою швидкістю, що призводить не тільки до збіднення складу, але й до змінення співвідношення між компонентами.

Контроль складу культурального середовища одна з найскладніших задач виробничого етапу.

Процес культивування поділяють на: періодичне культивування, неперервне культивування, напівнеперервне культивування:

- при періодичному культивування у склад поживного середовища не вводять додаткові компоненти, а після завершення циклу культивування виділяють цільовий продукт (коли цільовий продукт накопичується у процесі культивування);

- при неперервному культивування необхідна постійна підтримка заданого стаціонарного стану середовища (контролюється автоматично за допомогою комп'ютерних систем);

- напівперевний процес культивування - така система культивування при якій через певний інтервал часу відбирається частина біомаси і вноситься свіже поживне середовище, що значно збільшує термін культивування. Для цього застосовують автоматичні системи реєстрації і подачі необхідних компонентів у біореактор.

У середовищі культивування контролюють такі параметри:

- температура –

- pH середовища - за допомогою рН-електродів (скляний мембранний електрод);

- тиск – за допомогою мембранних манометрів, що дають пневматичний сигнал, який перетворюється в електричний);

- в'язкість середовища – оцінюють потужність, яка потребує мішалка за різної швидкості обертання;

- уміст кисню – за допомогою гальванічних (потенціометричних) або полярографічних (електрод Кларка) зондів (вимірюється парціальний тиск).

#### **4. Контроль стану культури в процесі виробництва**

Важливою проблемою є втрата виробничої якості культури, яка може бути з двох причин:

аутоелекція – самовільна селекція клітин у процесі тривалого культивування, основним фактором якого є спонтанні мутації, нестабільність генома у процесі інтенсивного культивування. В результаті можуть втрачатися висхідні властивості культури і промисловий штам може бути втрачено;

контамінація – коли у «чисту культуру» попадає культура грибів, або бактерій, що швидко розмножуються і ростуть. Вони можуть досить швидко інгібувати (гальмувати) ріст культури-продуцента.

Методи контролю стану культури:

- морфологічний метод контролю (визначення форми, розмірів структури клітин);
- генетичний метод контролю (функціональна нестабільність).

### **III. Заключний етап біотехнологічного виробництва**

*Головним завданням завершального етапу* біотехнологічного виробництва є *виділення та очистка* цільового продукту. Цей процес ускладнюється тим, що у біомасі знаходяться розбавлені розчини і складна суміш розчинних позаклітинних метаболітів, продуктів розкладу клітин, компонентів поживного середовища. При концентруванні цільового продукту в процесі виробництва відбувається інгібування росту продуцентів та їхня загибель.

У залежності від типу цільового продукту (біомаса або окремі метаболіти – ферменти, гормони, вітаміни) використовують різні типи концентрування та виділення. З огляду на те, що продукти мають біологічну природу (ферменти, гормони, вітаміни тощо), у чистому вигляді вони можуть втрачати свої властивості та активність. Тому для забезпечення їх збереження використовують різні способи стабілізації (сушіння, консервацію).

У процесі виробництва біологічні об'єкти не повністю використовують компоненти поживного середовища, крім того, вони утворюють велику кількість різних сполук, крім цільового продукту, тому виникає проблема їх утилізації.

*Отже завершальний етап біотехнологічного виробництва включає:*

- концентрування продукту;
- виділення і очистка продукту;
- стабілізація і фасування продукту;
- утилізація побічних продуктів.

**Цільовий продукт** – це очищена речовина, суміш речовин або біомаса клітин, що мають господарську цінність і отримуються як кінцевий продукт біотехнологічного виробництва.

**Концентрування** – збільшення вмісту продукту у об'ємі за рахунок зменшення вмісту води залежить від цільового продукту.

Використовують способи:

- упарювання і сушіння (якщо білково-вітамінний комплекс);
- седиментація – осадження часток у полі гравітаційних сил;
- декантація – зливання рідини (звіджування);
- фільтрація;
- флотація – прилипання часточок до бульбашок повітря (піна);
- центрифугування – розділення неоднорідних сумішей на компоненти за допомогою центробіжної сили;
- сепарація.

**Методи виділення продукту:**

- Екстракція – за допомогою органічних розчинників;
- Сорбція (адсорбція, абсорбція, хемосорбція, десорбція);
- Хроматографічний метод (газова і рідинна хроматографія; за формою колонкова, тонкошарова і паперова хроматографія; гель-фільтрація, іонообмінна хроматографія;  
*афінна хроматографія* – дуже дорога - («хроматографія по середству» - заснована на використанні високої специфічності зв'язування природних сполук: антитіла-антиген, лектин-рецептор, фермент-субстрат).

**Основні стадії концентрування і очистки цільового продукту:**

1. Видалення великих часток (центрифугування, сепарація);
2. Концентрування цільового продукту (екстракція, флотація, сорбція, осаджування);
3. очистка цільового продукту (хроматографія, мембранна фільтрація, електрофорез).

**Групи методів концентрування і очистки продукту:**

1. безреагентні методи (сепарація, центрифугування, фільтрація, хроматографія);
2. методи з використанням реагентів (коагуляція, флотація, флокуляція).

Безреагентні методи дозволяють отримати чистий продукт, але досить трудомісткі, енерговитратні, не завжди високоефективні.

Реагентні методи більш ефективні, але не завжди дозволяють отримати високоякісні і безпечні продукти (можуть бути токсичними).

## Очистка цільового продукту

Цільові продукти досить різноманітні: клітини, очищені молекули тощо. Вони представлені двома різновидами:

- біомасою клітин;
- виділеними метаболітами (екзометаболітами).

Для отримання біомаси клітин необхідно відділити клітини від культуральної рідини (сепарація, центрифугування, фільтрація). Культуральна рідина у випадку виділення екзометаболітів обробляється (за схемою) і з неї отримують цільові продукти у вигляді екзометаболітів. У разі, якщо культуральне середовище не використовується, воно є побічним продуктом.

**Вибір способу очистки клітинної біомаси залежить** від:

- характеристики клітин (розмір, маса, концентрація);
- характеристики культурального середовища (в'язкість, компоненти середовища та їх концентрація);
- область застосування (корм тваринам, харчові продукти, медицина або подальша переробка);
- рентабельність.

**Приклад:** хлібопекарські дріжджі – сахароміцети - отримують на основі вуглеводнів, концентрують флотацією, після чого клітини збирають фільтруванням на барабанних вакуум-фільтрах. Біомасу збирають з фільтру, пресують і отримують живу біомасу клітин, які здатні зброджуватися.

У разі необхідності очищення біомаси дріжджів, яку вирощують на метанолі, першим етапом очистки є сепарація. Клітини розрізняються за розмірами і масою, тому для отримання очистки на 80-90 % необхідно проводити 2-3 ступені сепарації.

Очистка є досить складною якщо необхідно виділити дрібні клітини або спори бактерій. У цьому випадку вміст реактора упарюють за умов, що забезпечують біологічне збереження клітин (низька температура і вакуум).

**Виділення цільового продукту з культурального середовища:**

- відділення клітин-продуцентів (сепарація, фільтрація або флотація);
- виділення цільового продукту методом осаджування (спирти, органічні розчинники, висалювання з додаванням сульфату натрію або інші солі) або хроматографії.

Застосовують декілька стадій очистки, що дозволяє отримати продукт у чистому вигляді. Кількість стадій і способи очистки індивідуальні для кожного продукту.

**Приклад:** При отримання амінокислот, цільовий продукт можна отримати тільки шляхом кристалізації із розчинів, що попередньо очищують, використовуючи хроматографію (катіонообмінну з підбором рН середовища).

При отриманні ферментів (що містяться у культуральному середовищі) застосовують екстракцію, осаджування з розчину, ліофілізацію.

Останнім часом частіше застосовують послідовну ультрафільтрацію крізь мембрани з необхідним розміром пор.

Досить часто у якості цільового продукту використовують клітинні метаболіти (гормони, інтерферон інші БАР, які отримують біотехнологією рекомбінантних ДНК).

Першим етапом у виділенні метаболітів клітин – порушення клітинних оболонок (дезінтеграція біомаси). Для цього застосовують методи: механічні, хімічні, ферментативні, комбіновані.

- механічні – гомогенізація, ультразвукова обробка, заморожування-танення;
- хімічні – застосування різних розчинників –детергентів,

### **Стабілізація і фасування цільового продукту**

Найбільш поширені способи стабілізації є:

- кристалізація ;
- сушка - розпилювальні та вакуумні системи висушування продукту;
- заморожування з використанням кріопротекторів (гліцерин, глюкоза, сахароза, лактоза);
- заморожування-висушування (сублімаційна сушка), використовується для стабілізації фармацевтичних препаратів, діагностичних реагентів, які характеризуються низькою термостабільністю.

Процес упаковки готової продукції повинен забезпечити збереження стерильності, стабільності, надійності, зручності при транспортуванні.

### **Стадії очистки і виділення продукту**

<b>Культура клітин</b>	
<b>Відокремлення клітин</b>	<b>Культуральна рідина</b>
<b>Біомаса</b>	<b>Відокремлення екзометаболітів</b>
<b>Цільовий продукт</b>	<b>Переосадження</b>
	<b>Очистка цільового продукту (хроматографія)</b>
	<b>Сушка, фасування цільового продукту</b>