

ЛЕКЦІЯ 3

Тема: Основні етапи біотехнологічного процесу

План

1. Підготовчий (передферментаційний) етап біотехнологічного процесу.
2. Виробничий (ферментаційний) етап біотехнологічного процесу.
3. Заключний (постферментаційний) етап біотехнологічного процесу.

Основні терміни і поняття: біотехнологічний процес, промислові культури, промислові штами, ферментація, цільовий продукт.

1.1. Підготовчий (передферментаційний) етап біотехнологічного процесу

Підготовчий (передферментаційний) етап біотехнологічного процесу включає в себе вирішення наступних завдань:

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. Приготування поживних середовищ і підготовка умов культивування.
5. Нарощування маточних культур або продуцентів.
6. Запуск виробництва.

При постановці завдання отримання цільового продукту необхідно виходити не тільки з можливостей біологічних систем виробляти той чи інший продукт, але й з потенційних витрат на виробництво цього продукту різними способами, тобто з його рентабельності. Постановка завдання не може бути успішною без всебічного аналізу стану цього питання.

Продуктивність виробничої системи характеризує кількість продукту, що отримують на одиницю об'єму біореактора за одиницю часу із субстрату, який використовується. Продуктивність біотехнологічної системи залежить від багатьох факторів, основними з яких є: активність продуцента; коефіцієнт виходу продукту із використаного субстрату; кількість активної біомаси в біореакторі (тобто, кількість біомаси, що приймає участь в отриманні цільового продукту).

Збільшення виходу продукту дозволяє знизити собівартість цільового продукту, адже значну частину в структурі собівартості складає ціна субстрату (сировини). Важливими показниками ефективності виробництва є такі показники як питомі енергозатрати та непродуктивні витрати субстрату та енергії у процесах біоконверсії.

На вихід продукту впливає організаційні фактори (тип біореактора, кваліфікація спеціалістів), генетичні і біохімічні особливості продуцента.

Основні вимоги до продуцентів, що використовуються в 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.

1.2. Виробничий (ферментаційний) 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 характеристик 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 в біореакторах;
- 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 витратах).

Основні завдання виробничого етапу

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

1. Підтримання і контроль асептичних (стерильних) умов.
2. Створення і контроль умов росту культур (температурний режим, масо- і газообмін, якість 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 задач виробничого етапу

1. Підтримання і контроль асептичних (стерильних) умов

У процесі виробничого етапу постійно відбувається газообмін між зовнішнім середовищем і культуральним, тому необхідно дотримуватись умов стерильності, що досить складно при великих об'ємах виробництва.

Рішення цієї проблеми полягає в наступному:

- застосування 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 (навіпаки) 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 зміювки, водяні сорочки тощо.

Дещо 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 в 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 в процесі метаболізму об'єкту, що культивується. Герметизація біореактора створює певні складності, бо утруднює перемішування і теплообмін.

Необхідний постійний контроль хімічного 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 нагромадженні 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 одне з найскладніших завдань виробничого етапу.

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

– при **періодичному культивуванні** до складу поживного середовища не вводять додаткові компоненти, а після завершення циклу культивування виділяють цільовий продукт (якщо цільовий продукт накопичується в процесі культивування);

– при **неперервному культивуванні** 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 контролюються такі параметри:

- температура;
- рН 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 – аутоелекції і контамінації:

- **аутоелекція** – самовільна селекція клітин у процесі тривалого культивування, основним фактором якого є спонтанні мутації, нестабільність генома в процесі інтенсивного культивування. У результаті можуть втрачатися вихідні властивості культури і промисловий штам може бути втрачено;
- **контамінація** – коли в «чисту культуру» потрапляє 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).

4.3. Заключний (постферментаційний) етап виробництва

Головним завданням завершального етапу біотехнологічного виробництва є **виділення** та **очистка** цільового продукту. Цей процес ускладнюється тим, що в 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 (висушування, 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.

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 і виділення цільового продукту

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

Використовують наступні способи концентрування:

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

Методи виділення цільового 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 коштовна) – «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).

Виділення цільового продукту з культурального середовища:

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

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 в промисловій мікробіології 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 для тварин, харчові продукти, медицина або подальша переробка);
- рентабельність.

Наприклад, хлібопекарські дріжджі – сахароміцети – отримують на основі вуглеводів, 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 біомаси дріжджів 80–90 % чистоти сепарацію необхідно проводити 2–3 рази.

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).

Застосовують декілька стадій очистки, що дозволяє отримати продукт у чистому вигляді. Кількість стадій і способи очистки індивідуальні для кожного продукту. Так, наприклад, при отриманні амінокислот, цільовий продукт можна виділити тільки шляхом кристалізації із розчинів, що попередньо очищують, використовуючи хроматографію (катионообмінну з підбором рН середовища). При отриманні ферментів (що містяться в культуральному середовищі) застосовують екстракцію, осаджування з розчину, вилуговування, ліофілізацію.

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

Досить часто в якості цільового продукту використовують **клітинні метаболіти** (гормони, інтерферон та інші БАР, які отримують біотехнологією рекомбінантних ДНК). Першим етапом у виділенні метаболітів клітин – порушення клітинних оболонок за допомогою детергентів (дезінтеграція біомаси). Для цього застосовують методи: механічні, хімічні, ферментативні, комбіновані.

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

Стабілізація і фасування цільового продукту

Як вже було зазначено, вимоги до цільового продукту залежать від області застосування. Так, у разі використання біомаси в тваринництві в якості вітамінно-білкової добавки, вона висушується і фасується в мішки.

Якщо цільовий продукт використовується в якості харчових добавок, то він повинен пройти мікробіологічний контроль, оцінку специфічної поживної цінності й обґрунтування термінів зберігання. Стабілізація цільового продукту повинна вирішувати декілька завдань:

- забезпечення стерильності;
- збереження стабільності;

- рентабельність і зручність під час транспортування.
- Найбільш поширеними способами стабілізації є:
- кристалізація;
 - висушування – використовуються розпилювальні та вакуумні системи висушування продукту;
 - заморожування з використанням кріопротекторів (гліцерину, глюкози, сахарози, лактози);
 - заморожування-висушування (сублімаційна сушка), використовується для стабілізації фармацевтичних препаратів, діагностичних реагентів, які характеризуються низькою термостабільністю.

Цей спосіб стабілізації має ряд переваг перед методом заморожування-танення:

- дозволяє забезпечити дуже низький вміст води і високу стабільність продукту;
- продукт знаходиться в контейнері у вакуумі або інертному газі, що зводить до мінімуму окислювальні процеси.

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

Питання для самоконтролю:

1. Сформулюйте основні завдання передферментаційного етапу мікробіологічного виробництва.
2. Які основні вимоги до продуцентів, що використовуються в мікробіологічних виробництвах?
3. Назвіть параметри, які контролюються в середовищі культивування.
4. Сформулюйте основні завдання ферментаційного етапу й особливості їх вирішення.
5. Назвіть причини втрати виробничої якості культур-продуцентів.
6. Сформулюйте основні завдання заключного етапу мікробіологічного виробництва.
7. Назвіть методи виділення цільового продукту.
8. Які способи концентрування культуральної рідини використовують у мікробіологічних виробництвах?
9. Назвіть групи методів виділення цільового продукту.
10. Охарактеризуйте групи методів очистки цільового продукту.
11. Які способи стабілізації є найбільш поширеними?