

Глава 3. Теоретические основы биосинтеза биологически активных веществ

3.1. Технологические особенности биосинтеза БАВ

В основе технологии биосинтеза БАВ главными компонентами являются **биообъекты**: вирус, гриб, растительные или животные клетки, биомолекулы, обладающие различными физиологическими свойствами.

Основная задача технологии биосинтеза БАВ – преобразование природного сырья или отходов с помощью биологического объекта (микроорганизмов, изолированных клеток, ферментов, клеточных органелл), поддержание и активизация путей обмена клеток, ведущих к накоплению БАВ в целевом продукте при заметном подавлении других реакций обмена у культивируемого организма, а также получение клеток или их составных частей (преимущественно ферментов) для направленного изменения сложных молекул.

В зависимости от биообъекта, используемого в технологическом процессе биосинтеза БАВ, эти процессы можно классифицировать согласно рис.19.

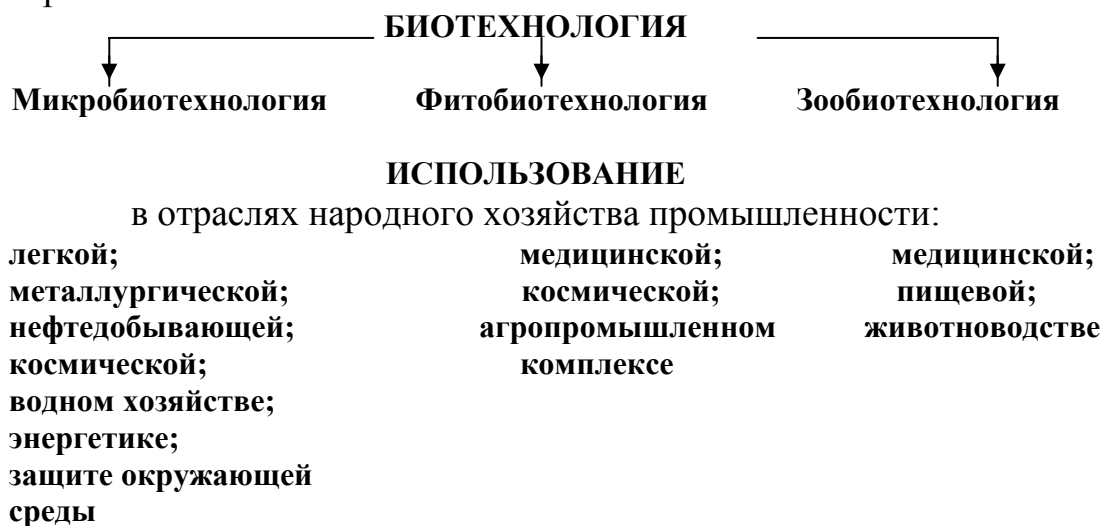


Рис.19. Классификация биотехнологических процессов

3.1.1. Принципы микробиологического синтеза БАВ основываются на принадлежности биообъектов к надцарствам живых существ (акариот, прокариот, эукариот); функциональной активности биообъекта (биосинтез, биотрансформация), (табл.2); возможности вычленения отдельных этапов из биотехнологических схем производства в виде самостоятельных процессов (подготовка питательных сред и оборудования, ферментация, стерилизация сред и оборудования).

Таблица 2. Процессы в промышленной микробиологии

Характеристика процесса	Целевые продукты	Название целевых продуктов
Биосинтез	Метаболиты	Аминокислоты, нуклеозиды, нуклеотиды
	Первичные	Нуклеиновые кислоты, ферменты
	Вторичные	Алкалоиды, антибиотики, гиббереллины, гликаны и гликонъюгаты, органические кислоты, спирты, липиды, аминокислоты, пептидные гормоны
	Клеточная масса	Пекарские и пищевые дрожжи, кормовой и пищевой белок, вакцины и антигенные вещества
Трансформация	Неорганические вещества	Обнаружение металлов, обогащение металлов
	Преимущественно органические вещества	Обнаружение металлов
		Обогащение металлов
		Компостирование отходов, получение биогаза
		Детоксикация, дезодорация и обезвреживание, например, поверхностно-активных веществ
		Определение (анализ) веществ по продуктам трансформации
		Кисломолочные продукты и сыры
		Хлебобулочные изделия
		Квашение и соление овощей
		Силосование кормов
		Мочка льна и джута
		Ферментация чая, табака, кофе, какао, маслин
		Пивоварение, виноделие, винокурение

Преимущества микробиотехнологии: простота организации генома; легкая приспособляемость (лабильность) к среде обитания в естественных и искусственных условиях; достаточно высокие скорости протекания ферментативных реакций при низких температурах (20-60°C) и нарастания клеточной массы; возможность использования недефицитного, дешевого сырья (отходы промышленности, сточные воды).

К недостаткам технологии микробного синтеза БАВ можно отнести: многокомпонентность питательных сред; необходимость стерилизации питательных сред, оборудования и коммуникаций для удаления или разрушения контаминантов при сохранении качества среды, а также трудности в управлении процессом биосинтеза и автоматизации. Это связано с процессами саморегуляции биообъектов (включая способность к мутации), которые могут привести к непредвиденному изменению биотехнологического процесса. При размножении и развитии происходит постоянное изменение отдельных параметров, и в каждый момент времени клетки функционируют в иных условиях. В связи с этим при управлении технологическим процессом биосинтеза БАВ следует учитывать

индивидуальные особенности «поведенческих реакций» биообъекта в конкретных условиях культивирования, а именно: чувствительность биообъектов к воздействию физико-механических факторов при перемешивании, а также знание химической природы синтезируемого БАВ, характера биохимических процессов, осуществляемых биообъектами, специфику наследственных свойств данного вида.

3.1.2. Основные технологические показатели биосинтеза БАВ

Для нормального роста, размножения биообъекта в процессе биосинтеза БАВ необходимо поддерживать оптимальные условия его культивирования. При нарушении оптимальных условий нарушается обмен веществ, прекращается или ограничивается рост и размножение культуры, снижается выход и качество целевого продукта.

Параметры контроля процесса культивирования, относящиеся к основным технологическим показателям биосинтеза БАВ:

температура;

рН- среды;

количество биомассы клеток;

скорость потребления источников питания;

количество растворенного кислорода (в случае аэробных биообъектов);

количество образующегося метаболита.

3.1.3. Основные технологические стадии микробиологического синтеза БАВ (рис. 20):

предферментация (подготовительные работы);

ферментация (накопление и выделение целевого продукта).

Предферментация включает подготовительные стадии до биосинтеза: 1) приготовление и подготовка среды; 2) получение и подготовка посевного материала; 3) выбор и подготовка оборудования.

Основная стадия в подготовке оборудования, питательных сред, посевного материала заключается в стерилизации. Стерилизации подлежат пеногасители, жидкие добавки, коммуникации, датчики. Необходимость стерилизации вызвана тем, что микроорганизмы-контаминанты не только могут подавить функциональное развитие биообъекта в силу конкуренции и антибиоза, но и дезорганизовать какую-либо ткань или среду выращивания. Некоторые из них способны продуцировать токсичные вещества, которые могут попасть в целевой продукт.

В производственных условиях источниками микроорганизмов-контаминантов могут быть почва, вода, окружающий воздух, люди. Наличие в воздухе частиц пыли или капелек влаги создают благоприятную среду для жизнедеятельности микроорганизмов.



Рис.20. Примерная обобщенная схема биотехнологических процессов

По степени загрязненности воздуха микробами и механическими частицами в расчете на 1 м^3 производственного помещения, в которых изготавливаются лекарственные препараты, делятся на четыре класса чистоты (табл.3) [8].

Таблица 3. Оценка степени чистоты воздуха производственных помещений

Показатель качества воздуха	Класс чистоты				
	1	2	3		4
			А	Б	
Наличие микробов, количество клеток	Не должно быть	До 50	До 100	До 500	ГОСТ 12.1.005-86
Наличие механических частиц размером 0,5 мкм	3500	350000	3500000		
Наличие частиц размером 5мкм		2500	25000		

Защита биотехнологических процессов от микробов-контаминантов осуществляется с помощью фильтров.

В лабораторных условиях стерилизацию питательных сред и других объектов осуществляют в автоклавах паром ($t = 120-122^{\circ}\text{C}$) под давлением не менее 0,3 МПа (3 кгс/см²) или холодным способом. Наиболее универсальный метод – использование влажного тепла.

Датчики измерительных приборов и регуляторов не выдерживают высоких температур при стерилизации, поэтому к ним применяют холодные или химические способы стерилизации. Для этих целей используются бактерицидные газы (этилен), растворы антисептиков (формалин и др.).

Сахаросодержащие материалы стерилизуют отдельно от других компонентов питательной среды в мягких условиях для избежания реакций меланоидирования, гумификации, карамелизации, реверсии, кислотного разложения.

Для контроля процесса стерилизации вводится критерий стерильности, называемый временем выдержки, или длительностью экспозиции.

Длительность экспозиции, или **время выдержки** – это тот интервал, в пределах которого погибают микроорганизмы. Гибель последних спор в среде является случайным процессом, поэтому введено понятие «критерий стерильности» (N) – отношение числа операций стерилизации, в результате которых выжили по одной термостойкой споре к общему числу проведенных операций. Для стерилизации сред принимают критерий стерильности, равный $0,01+0,001$. Если исходное количество спор в среде принять N_0 , то получим соотношение N/N_0 – уровень стерильности, или коэффициент выживания, который означает, что для достижения заданного критерия стерильности (например, 0,01) среда должна выдерживаться при температуре стерилизации строго определенное время, чтобы популяция спор снизилась от исходного значения N_0 до N/N_0 (например, до 10^{-16}).

Технология подготовки питательных сред

Понятие "питательная среда", или среда культивирования включает качественный и количественный состав исходных компонентов, необходимых для энергетического обмена, то есть биологически активных (азот, фосфор, углерод, микроэлементы, витамины, минеральные соли, ростовые вещества), и физико-химические факторы (температура, аэрация).

Процесс приготовления питательных сред включает выбор элементов питания, необходимых продуцентам БАВ для их воспроизводства и биотрансформации.

Подбор компонентов таких сред осуществляется эмпирически и требует много времени и навыков при оценке того или иного компонента субстрата.

В элементарный состав питательной среды входят: углерод, водород, кислород, азот, фосфор, сера, калий, кальций, магний, железо, микроэлементы. Некоторым продуцентам БАВ в процессе биосинтеза требуются витамины и регуляторы роста.

Состав питательных сред подбирают на основании материального баланса с учетом трансформации того или иного элемента питания и расходуемой (выделяемой) энергии.

При этом необходимо соблюдать **правило разработки оптимального состава питательных сред**: для получения заданного количества биомассы компоненты питательной среды берутся в соотношениях, пропорциональных потребностям их культур [6]:

$$\frac{C_i}{|A_i|} = \dots \frac{C_2}{|A_2|} = \frac{C_1}{|A_1|} = S_0,$$

где – C_i – концентрация i -го компонента в сбалансированной питательной среде;

A_i – коэффициент метаболизма культуры по i -му компоненту;

S_0 – заданный запас субстрата в среде, выраженный в единицах концентрации биомассы.

По своему назначению питательные среды делятся на диагностические и производственные.

Диагностические питательные среды предназначены для обнаружения, выделения и идентификации патогенных микроорганизмов по морфологическим и физиологическим признакам. Они подразделяются на *элективные* среды, среды для консервирования, среды обогащения и дифференциально-диагностические.

Элективные среды служат для посева тест-штамма для получения чистой культуры.

Среды обогащения – накопление одной группы микроорганизмов при одновременной задержке роста сопутствующих микроорганизмов.

Дифференциально-диагностические среды предназначены для идентификации отдельных видов микроорганизмов в целях их получения.

Производственные среды по составу можно разделить на две группы: натуральные среды (неопределенного состава) и синтетические.

Натуральные среды состоят из природных соединений, продуктов животного или растительного происхождения. В них имеются все необходимые компоненты для роста и развития микроорганизмов. Однако из-за сложного неопределенного химического состава трудно оценить влияние отдельных компонентов на механизм биосинтеза БАВ. В промышленности натуральные среды используют для поддержания организмов, накопления биомассы, диагностических целей.

Синтетические среды удобны для изучения обмена веществ. Благодаря сложной ферментативной организации микроорганизмов из простых составляющих осуществляется биосинтез сложных БАВ.

Среди натуральных сред широкое применение нашли: меласса – отход свеклосахарного производства, применяется как основной источник *углерода*, кукурузный экстракт, отруби и др.

Жидкие питательные среды приготавливают в аппаратах-смесителях с мешалкой, куда загружают компоненты в определенной

последовательности по регламенту (рис.21). Изменение одного из этих факторов влечет изменение другого.

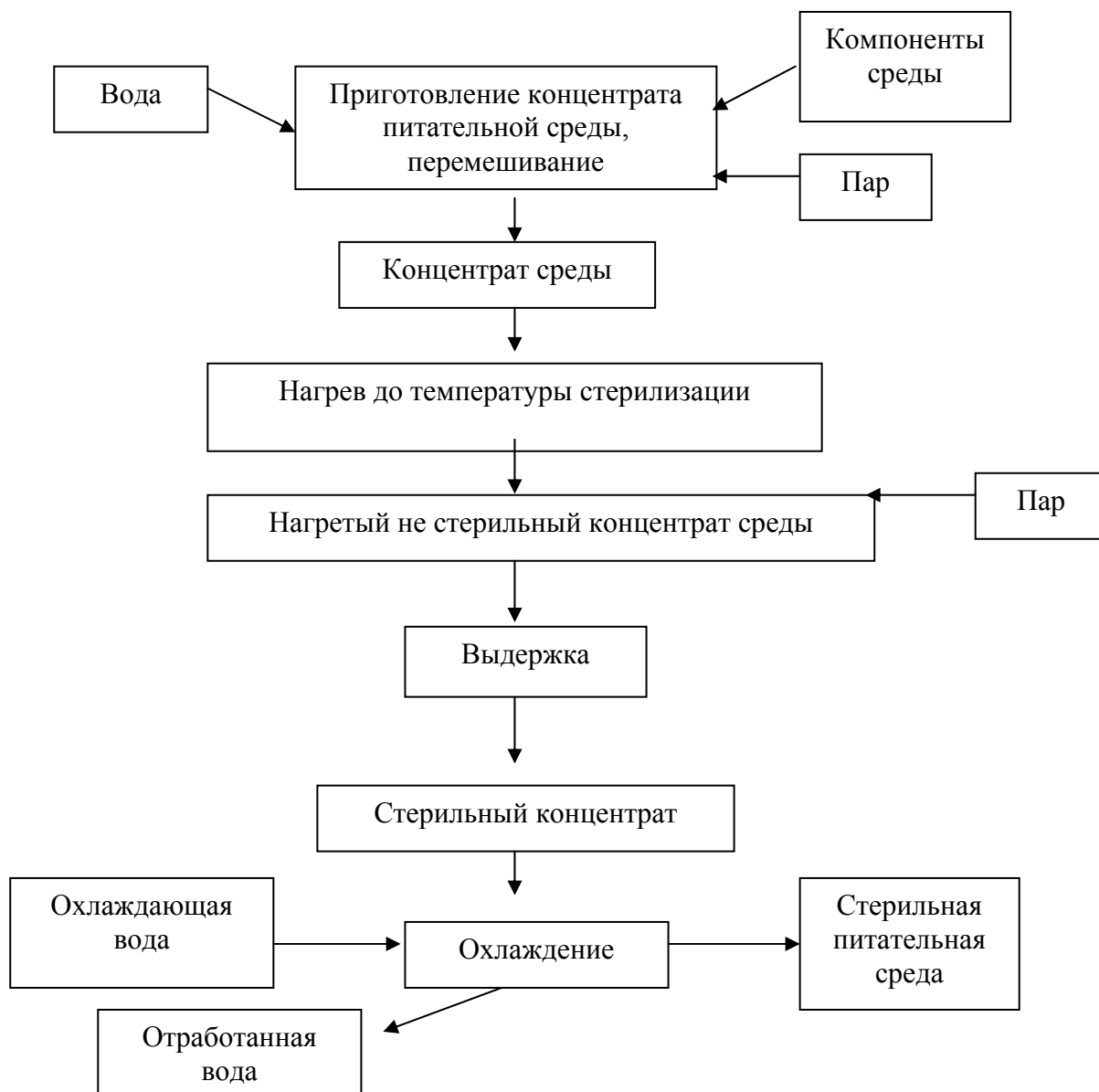


Рис.21. Принципиальная схема процесса приготовления и тепловой стерилизации питательной среды

Технология подготовки посевного материала

Подготовка посевного материала состоит из лабораторного и производственного этапов.

Лабораторный этап заключается в приготовлении *рабочего* посевного материала. Для этого исходный штамм микроорганизма, сохраняемый в состоянии анабиоза (высушенный на стерильной почве, песке, пшене путем лиофилизации или сублимационной сушки) оживляют добавлением стерильной жидкой питательной среды, а затем высевают на уплотненную питательную среду и проверяют на чистоту культуры. После оживления, то есть перевода консервированной культуры на косяк,

проводят пересев штамма на среду возрастающих объемов, переходя постепенно от пробирок к колбам (емкостью 1 л), бутылкам (емкостью 20 л). При этом следует соблюдать соотношение посевного и рабочего объема 1:10. Коэффициент заполнения емкостей не должен превышать 0,5 - 0,6.

Культура называется чистой, если родительские и дочерние клетки в ней практически неразличимы и между ними нельзя установить родственные связи.

Лиофилизация культур осуществляется путем быстрого замораживания (от -40 до -60°C) суспензии клеток или спор микроорганизма, приготовленной на среде, богатой белками (кровяная сыворотка), с последующим высушиванием под вакуумом до остаточной влажности (0,5 - 0,7%). После такой обработки ампулы со спорами и клетками лиофилизированного микроба запаивают. Метод пригоден как для спорообразующих, так и бесспорных культур микроорганизмов.

Лиофилизированные формы бактерий могут сохраняться в течение 16-18 лет, а споры грибов – в течение 10 лет, не теряя основных свойств.

Производственный этап. Дальнейшую подготовку посевного материала осуществляют в ферментаторах-инокуляторах, в которых наращивают посевной материал (рис.22). При этом одноклеточные культуры доводят до середины Log-фазы (когда клетки делятся синхронно). Рабочую культуру подают в инокулятор, заполненный стерильной питательной средой, из расчета 8-10% к объему питательной среды. Во избежание утечки посевного материала в инокуляторах и биореакторах следует поддерживать избыточное давление.

Инокуляторы должны отвечать следующим основным требованиям: конструктивные простота, удобство и надежность эксплуатации. Посевные аппараты отечественного производства имеют объем 10, 5, 2 и 0,63 м³, диаметр от 0,9 до 2 м и частоту вращения мешалки от 180 до 270 об/мин. Общий объем ферментатора заполняют инокулированной средой на 70-80%, 20-30% объема заполняют газами (инертным – для анаэробов, воздухом – для аэробов).

Микроорганизм в виде суспензии определенной плотности подают из инокулятора(-ов) в промышленный биореактор, или ферментатор, в котором содержится стерильная жидкая питательная среда. При этом не должно произойти попадания каких-либо посторонних микробов в питательную среду вместе с продуцентом. Все соединения системы должны быть герметично закрытыми.

Для проведения процесса в асептических условиях необходимо введение дополнительных стадий, обеспечивающих стерилизацию питательных сред и подаваемого в ферментаторы воздуха. Стерильную питательную среду засевают с соблюдением правил асептики через специальное устройство (рис.23) посевным материалом, выращенным в лаборатории, поддерживая оптимальный режим в аппарате (температуру, аэрацию и перемешивание) для развития культуры.

кг/см², открывают клапан 3 и посевной материал переводят в ферментатор, после чего отключают инокулятор-ферментатор от системы подачи пара, закрыв клапаны 3 и 6; открывают клапаны 7 и 8, спускают пар и конденсат при частично открытых клапанах 4 и 5.

При достижении требуемых стадий развития и количества биомассы посевной материал перекачивают стерильным сжатым воздухом по посевному коллектору в посевной аппарат большей вместимости.

На второй ступени выращивания посевного материала стремятся получать больше биомассы клеток, чтобы в ферментаторе можно было создать необходимую для данного штамма продуцента исходную плотность популяции. Если это требование выполнимо без второй ступени, то ферментационную среду засевают непосредственно из инокулятора.

Все ферментаторы цеха соединены между собой несколькими коллекторами: посевным, благодаря которому можно засеивать среду в любом ферментаторе из любого посевного аппарата; коллектором подачи стерильной питательной среды; коллектором подвода стерильного сжатого воздуха к индивидуальным фильтрам; коллектором отработанного воздуха, выходящего из ферментатора; коллектором перекачивания культуральной жидкости из ферментатора. В случае проведения ферментаций в заведомо нестерильных условиях питательную среду и воздух для аэрации не стерилизуют, но посевной материал всегда выращивают на стерильных питательных средах в асептических условиях.

Требования к промышленным штаммам:

стабильность структурно-морфологических признаков и физиологической активности при длительном хранении и эксплуатации в производстве;

повышенные скорости роста и биосинтеза целевых продуктов в лабораторных и производственных условиях;

широкий диапазон устойчивости к воздействию неблагоприятных внешних факторов - колебанию температуры, pH среды, аэрации, перемешиванию, вязкости среды; умеренная требовательность к ограниченному числу источников питания.

Ферментация проводится в производственных биореакторах. По биохимической сущности она во многом имитирует *предферментацию*. В процессе ферментации также необходимо использование стерильных питательных сред, воздуха и биореакторов, выбор которых обусловлен общими требованиями биообъектов.

Ферментацию следует осуществлять в герметизированных биореакторах во избежание рассеивания биообъекта во внешнюю среду, так как некоторые из них выделяют экзотоксины.

Технология выделения и очистки конечных продуктов ферментации

После завершения ферментации отделяют либо клетки (клеточную массу), либо жидкость, в которой содержится БАВ. В первом случае

отходом является культуральная жидкость, во втором – плотная часть (клетки). Наиболее общая схема выделения конечных продуктов ферментации представлена на рис.24.

Культуральная жидкость, образующаяся в процессе ферментации, представляет собой сложную многокомпонентную систему. В водной фазе содержатся клетки продуцента, продукты их жизнедеятельности, непотребленные компоненты питательной среды, мельчайшие капельки жира, пузырьки воздуха, мел. В свою очередь водная фаза культуральной жидкости (нативный раствор) включает большое число органических и неорганических веществ, коллоидных фракций белков, сухой остаток культуральной жидкости – до 17% и более.

Содержание биомассы в культуральной жидкости достигает 8-10%. Концентрация целевого продукта чаще всего не превышает 1,5%, что составляет менее 10% сухого остатка.

В зависимости от целевого назначения конечного продукта (для здравоохранения, технических целей, сельского хозяйства и т.д.) используются схемы производства различной степени сложности, при этом учитывают и место накопления БАВ – внутриклеточного или внеклеточного.



Рис.24 . Возможные способы выделения целевого продукта

Выбор метода отделения или разделения целевых продуктов зависит от размера частиц (включая микроклетки) образовавшегося продукта (табл.4).

Крупные частицы от мелких отделяют седиментацией при использовании тканевых волокнистых фильтров, сит, сетчатых фильтров, фракционирования в пене и пузырьках. Низкомолекулярные нерастворимые частицы отделяют диализом, электродиализом, ионным обменом, экстракцией, обратным осмосом.

Таблица 4. Классификация частиц по размеру

Название	Диаметр частиц, мм
Крупные	От 0,1 до 1,0
Мелкие	От 0,01 до 0,1
Инфрамелкие	От 0,0001 до 0,01
Высокомолекулярные	От 10^{-5} до 10^{-3}
Низкомолекулярные	От 10^{-7} до 10^{-5}

Контрольные вопросы для самостоятельной проверки

1. Каковы задачи биосинтеза?
2. Какие принципы лежат в основе биосинтеза БАВ?
3. В чем состоит отличие синтеза и биосинтеза БАВ?
4. По каким технологическим показателям осуществляют контроль биосинтеза БАВ?
5. Из каких стадий состоит технология биосинтеза БАВ?
6. В чем заключаются особенности этапа предферментации?
7. Какой критерий используют при выборе состава питательной среды?
8. В чем заключаются особенности подготовки посевного материала?

Глава 4. Теоретические основы оснащения биопроизводств

4.1. Принципы технического оснащения биопроизводств

Конструкционное совершенство и универсальность биореакторов.

Инертность или коррозионная стойкость материалов биореакторов и другого технологического оборудования, вмещающих биообъект или продукты его метаболизма.

Эксплуатационная надежность технологического оборудования.

Доступность, эстетичность, легкость обслуживания, замены, смазки, чистки, обработки антисептиками.

4.2. Аппаратурное оформление микробиологических производств

В связи с тем что в технологии биосинтеза БАВ много общего, то знание этих общих закономерностей облегчает выбор биореактора, сепарирующего оборудования, сушилок и т.д.

Общие показатели биообъектов в процессе биосинтеза БАВ: