

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
СХІДНОУКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені ВОЛОДИМИРА ДАЛЯ

КОНСПЕКТ ЛЕКЦІЙ
з дисципліни
«ПРОМИСЛОВА БІОТЕХНОЛОГІЯ»
(для здобувачів вищої освіти спеціальності
226 «Фармація, промислова фармація»)
(Електронне видання)

ЗАТВЕРДЖЕНО
на засіданні кафедри ФВТ
Протокол № 7 від 16. 02. 2024 р.

Київ
2024

УДК 557.1.002-03.883-02

Конспект лекцій з дисципліни: «Промислова біотехнологія» (для здобувачів вищої освіти спеціальності 226 «Фармація, промислова фармація») (Електронне видання) / Уклад.: Л.Ф. Горбас, В.П. Шапкін, Н.І. Пономаренко. – Київ: вид-во СНУ ім. В. Даля, 2024. – 175 с.

Курс лекцій містить відомості щодо технологічних аспектів одержання біологічно активних речовин мікробіологічним синтезом, а також на основі клітин тварин і рослин.

Укладачі:

Л.Ф. Горбас, к.х.н., доц.

В.П. Шапкін, к.х.н., доц.

Н.І. Пономаренко, к.фарм.н., доц.

Рецензент:

В.Ю. Тарасов, д.т.н., проф.

ЗМІСТ

Вступ	5
1 Одержання біологічно-активних речовин мікробіологічним синтезом	6
1.1 Загальна технологія мікробіологічних виробництв	6
1.1.1 Періодичне культивування мікроорганізмів	8
1.1.2 Безперервне культивування мікроорганізмів	13
1.1.3 Системи безперервного культивування	14
1.1.4 Типова технологічна схема мікробіологічного виробництва	23
1.2 Передферментаційні процеси	25
1.2.1 Одержання посівного матеріалу	25
1.2.2 Підготовка сировини для живильних середовищ	28
1.2.3 Готування живильних середовищ	35
1.2.4 Підготовка й стерилізація повітря	40
1.3 Ферментація	45
1.3.1 Конструкція ферментаторів	45
1.3.2 Технологічні особливості процесів ферментації	46
1.3.3 Контроль процесу ферментації	54
1.3.4 Регулювання піноутворення	56
1.4 Виділення й очищення продуктів ферментації	62
1.4.1 Відділення біомаси від культуральної рідини	62
1.4.2 Дезінтеграція клітинних стінок мікроорганізмів	69
1.4.3 Виділення продуктів з культуральної рідини	70
1.4.4 Виділення інактивованої біомаси	79
1.4.5 Виділення життєздатних мікроорганізмів	84
1.5 Виробництво органічних кислот	84
1.5.1 Виробництво лимонної кислоти	85
1.5.2 Виробництво оцтової кислоти	93
1.5.3 Виробництво молочної кислоти	95
1.6 Одержання ферментних препаратів	98
1.6.1 Джерела ферментів	98
1.6.2 Одержання ферментних препаратів поверхневим способом	100
1.6.3 Одержання ферментних препаратів глибинним способом	104
1.6.4 Імобілізовані ферменти	106
1.7 Одержання вітамінів мікробіологічним методом	107
1.7.1 Промислове виробництво ергостерину	108
1.7.2 Промислове виробництво рибофлавіну	109
1.7.3 Промислове виробництво вітаміну В ₁₂ і його концентратів	110
1.8 Одержання бактерійних препаратів	111
1.8.1 Технологія одержання колібактерину	112
1.8.2 Промислове одержання біфідумбактерину	113
1.8.3 Промислове одержання лактобактерину	115

1.8.4	Технологія одержання біфіколу	117
1.8.5	Технологія одержання бактеріофагів	118
1.9	Біосинтез антибіотиків	121
1.9.1	Загальні відомості	121
1.9.2	Підготовка середовища для культивування продуцентів	122
1.9.3	Ферментація	125
1.9.4	Виділення й очищення антибіотиків	126
1.9.5	Контроль готової продукції	126
1.9.6	Промислове одержання калієвої солі бензилпеніциліну	127
1.9.7	Одержання похідних пеніциліну	129
2	Біотехнологія клітин тварин і людини	131
2.1	Клітинні субстрати	131
2.2	Живильні й і сольові розчини	135
2.3	Готування одношарових первинних культур	138
2.3.1	Вибір джерела й відбір тканини	138
2.3.2	Дезагрегація тканин	138
2.3.3	Вирощування одношарових первинних культур	140
2.4	Основні системи промислового культивування клітин тварин	140
2.4.1	Культивування клітин на щільних поверхнях	143
2.4.2	Культивування клітин у суспензії	144
2.5	Виробництво інтерферонів	145
2.5.1	Культури клітин продуцентів інтерферону	145
2.5.2	Промислове одержання людського лейкоцитарного інтерферону	145
2.6	Промислове одержання вакцин	149
2.6.1	Класифікація вакцин	149
2.6.2	Вимоги до вакцин	154
2.6.3	Технологія одержання живої грипозної алантоїсної вакцини для інтраназального застосування	154
2.6.4	Одержання живої поліомієлітної вакцини	156
2.6.5	Виробництво живої коревої вакцини	159
2.6.6	Технологія одержання гібридом і моноклональних антитіл	162
3	Одержання біологічно активних речовин із клітин рослин	165
3.1	Технологічні особливості культивування рослинних клітин	166
3.2	Промислове виробництво БАР з культури клітин рослин	167
3.2.1	Підготовка середовища для культивування продуцента й посівного матеріалу (перша стадія)	168
3.2.2	Біосинтез БАР (друга стадія)	169
3.2.3	Попередня обробка біомаси (третьа стадія)	170
3.2.4	Виділення й очищення БАР (четверта стадія)	171
3.2.5	Одержання готової продукції (п'ята стадія)	172
	Література	174

ВСТУП

У біологічному енциклопедичному словнику, виданому в 1986 р., біотехнологією називають використання живих організмів і біологічних процесів у виробництві. Європейська федерація біотехнології визначає сучасну біотехнологію як комплекс наук про природу (біології, хімії, фізики) і інженерних наук стосовно до біосистем у біоіндустрії, а Європейська комісія доповнює - для того, щоб забезпечити біологічне співтовариство необхідними продуктами й послугами.

Можна сказати, що біотехнологія вивчає методи одержання корисних для людини речовин і продуктів у керованих умовах, використовуючи мікроорганізми, клітки тварин і рослин або ізольовані із клітин біологічні структури. З'явилася можливість управляти біосинтезом клітин мікроорганізмів, але біотехнологія - поняття більше широке, чим мікробний синтез, оскільки використовуються не тільки мікроорганізми, але й культури рослинних і тваринних тканин, клітинні ферменти й будь-які біологічні системи, здатні до біосинтезу або конверсії.

Тісно пов'язана з біотехнологією біоінженерія. Її завдання - створення біореакторів, аеруючих пристроїв, устаткування для стерилізації живильних середовищ та повітря, розробка контрольної й виміральної апаратури, а також масштабування й моделювання біотехнологічних процесів. Біотехнологія пов'язана з такими науками, як фізіологія мікроорганізмів, рослин і тварин, біохімія, генетика, біофізика, молекулярна біологія. Біотехнологічні процеси використовуються в харчовій промисловості. З їхньою допомогою вдається збільшити продуктивність сільського господарства. З розвитком біотехнології піднялася на новий рівень фармацевтична промисловість, зростає роль біотехнології в захисті навколишнього середовища. Біотехнологія, виникла в процесі розвитку технічної мікробіології. Люди користувалися одноклітинними мікроорганізмами давно навіть не підозрюючи про їхнє існування, хоча таємничі процеси бродіння й неояснена ферментативна активність природних субстратів привертала увагу хіміків ще в XVIII ст.

Таким чином, біотехнологія це комплекс фундаментальних і прикладних знань, спрямованих на одержання й використання клітин мікроорганізмів, рослин, тварин, а також продуктів їхньої життєдіяльності.

Існує кілька напрямків біотехнологічних виробництв:

- виробництво препаратів на основі мікробіологічного синтезу;
- культивування клітин і тканин рослин;
- культивування клітин і тканин тварин і людини;
- ензимологія;
- гена інженерія.

1 ОДЕРЖАННЯ БІОЛОГІЧНО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН МІКРОБІОЛОГІЧНИМ СИНТЕЗОМ

1.1 Загальна технологія мікробіологічних виробництв

Мікробіологічний синтез - одержання корисних для людини речовин на основі культивування мікроорганізмів. У процесі свого росту деякі мікроорганізми здатні накопичувати у культуральному середовищі або усередині клітки різні класи сполук.

У мікробіологічній промисловості широко використовують дріжджі, що відносяться до одноклітинних грибів. Ряд виробництв базується на використанні міцеліальних грибів і бактерій. У меншому ступені застосовуються водорості й найпростіші. У цілому знаходять застосування кілька сотень мікроорганізмів.

Практична корисність мікроорганізмів-продуцентів оцінюється за багатьма показниками, основні з яких наступні:

- нешкідливість (як для споживача, так і в процесі виробництва);
- активність біосинтезу;
- споживане джерело вуглецю (доступність, ступінь використання);
- споживане джерело азоту;
- чутливість до умов культивування (аерація, температура, рН, потреба у факторах росту та ін.);
- стабільність і фагостійкість.

Активність продуцента, тобто здатність до утворення значних кількостей певних продуктів метаболізму, є найважливішою характеристикою мікроорганізму-продуцента.

Не менш важливі при промисловому виробництві доступність і економічність джерел вуглецю, а також максимальне використання вуглецю, відсутність потреби в додаткових факторах росту, низька чутливість до домішок.

З точки зору збереження стерильності особливо привабливі термофільні продуценти.

На основі мікробіологічного синтезу в цей час одержують наступні класи сполук: алкалоїди, амінокислоти, антибіотики, антиоксиданти, білки, вітаміни, гербіциди, інгібітори ферментів, інсектициди, іонофори, коферменти, ліпіди, нуклеїнові кислоти, органічні кислоти, пігменти, поверхнево-активні речовини, полісахариди, протипухлинні агенти, розчинники, ростові гормони рослин, цукру, стерини й стероїди, фактори транспорту заліза, ферменти, емульгатори.

Технологія мікробіологічного синтезу будується на знанні властивостей мікроорганізму-продуцента. Тільки при створенні оптимальних для даного виду мікроорганізмів умов можна одержати максимальний вихід того продукту, що він може синтезувати.

Для вирощування мікроорганізмів-продуцентів застосовують два способи культивування - поверхневий і глибинний.

Технологія вирощування мікроорганізмів поверхневим способом досить проста. Вона полягає у тому, що мікроорганізми культивують на поверхні живильних середовищ. У якості твердих живильних середовищ використовують агаризовані середовища або сипучі субстрати (пшоно, ячмінь, пшеничні відруби та ін.). Агаризовані живильні середовища стерильно розливають по пробірках, чашкам Петри, скляним флаконам або в матраці. Після засіву культури-продуцента на стерильне живильне середовище пробірки або чашки Петри поміщають у термостат, де при певній температурі відбувається ріст і розвиток мікроорганізмів. Сипучі субстрати рівномірно розподіляють шаром у спеціальні кювети, які після засіву посівного матеріалу поміщають у камери для росту. Вирощування мікроорганізмів при оптимальних умовах триває протягом кількох днів. Після завершення процесу вирощування мікроорганізмів виділяють кінцевий продукт. Процес вирощування мікроорганізмів поверхневим способом закінчується за певний період часу й тому є періодичним.

Вирощування мікроорганізмів глибинним способом відбувається у всьому обсязі рідкого живильного середовища в спеціальному апараті-ферментаторі. Вирощування мікроорганізмів глибинним способом може бути періодичним, напівперіодичним і безперервним.

При періодичному способі глибинного культивування у ферментатор завантажують відразу весь об'єм живильного середовища й вносять посівний матеріал. Вирощування мікроорганізмів проводять в оптимальних умовах протягом певного часу, після чого процес зупиняють, зливають вміст ферментатора й виділяють цільовий продукт.

Схема промислового періодичного процесу наведена на рис. 1.

Напівперіодичний процес відрізняється від строго періодичного тим, що в ньому речовини, необхідні для росту й розвитку мікроорганізмів, додають в апарат по ходу культивування. Апарат як і в попередньому випадку розвантажують одноразово. Додавання живильних речовин або інших компонентів у ході ферментації дозволяє створити сприятливі умови для життєдіяльності культури в різних фазах культивування. Слід зазначити, що в аеробних мікробіологічних процесах один із субстратів - атмосферний кисень - надходить безперервно. Так що чисто періодичним є тільки анаеробний процес.

При безперервному способі глибинного культивування живильне середовище безупинно подається у ферментатор, у якому створюють оптимальні умови для росту мікроорганізмів, а з ферментатора також безупинно витікає культуральна рідина разом з мікроорганізмами.

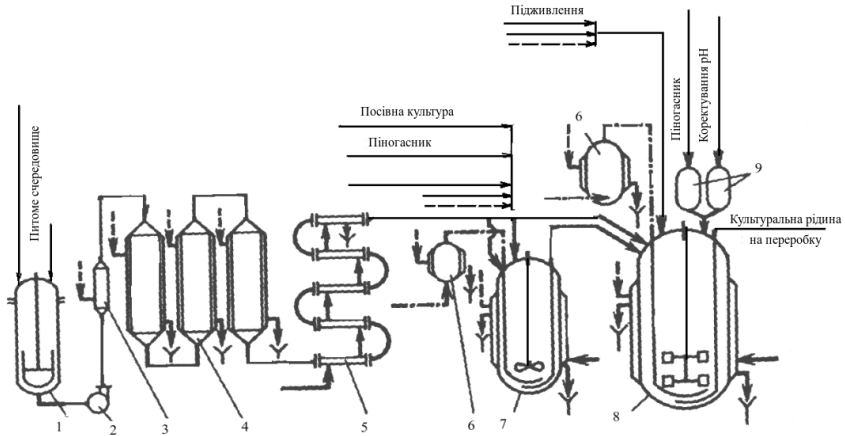


Рисунок 1 – Апаратурно-технологічна схема періодичного культивування мікроорганізмів у стерильних умовах

1 - реактор для готування живильного середовища 2 - насос; 3 - нагрівач середовища; 4 – стерилізаційна колонка; 4 - витримувач; 5 - охолоджувач середовища; 6 - індивідуальний фільтр повітря; 7 - посівний ферментатор; 8 - робочий ферментатор; 9 - мірник

Таким чином, умови для росту мікроорганізмів при періодичному й безперервному процесі різко різні. При періодичному процесі концентрація живильних речовин із часом у середовищі зменшується, а вміст продуктів метаболізму збільшується, що несприятливо впливає на життєдіяльність мікроорганізмів. При безперервному процесі ці два показники підтримують на постійному рівні, що створює найбільш сприятливі умови для росту мікроорганізмів.

1.1.1 Періодичне культивування мікроорганізмів

При одержанні посівного матеріалу найчастіше використовують періодичний спосіб культивування. Сутність його полягає у тому, що мікроорганізми вирощують у рідкому живильному середовищі в посудині, у яку за час культивування не надходять компоненти живильного середовища й не виводяться з нього. У цих умовах мікроорганізми ростуть і розмножуються, проходячи певний цикл розвитку, що виражається в зміні фаз або періодів. Послідовна зміна фаз може бути виражена графічно. Якщо з моменту засіву визначати число клітин у посудині, то кожному моменту часу буде відповідати певне число клітин, що дасть криву, яка графічно відображає процес розмноження мікроорганізмів (рис. 2). Цю криву росту мікроорганізмів розподіляють на кілька фаз або періодів. Перша фаза

називається лаг-фаза або фаза пристосування. Вона починається від моменту внесення мікроорганізмів у живильне середовище до початку їх розмноження. У цей період культура як би звикає (адаптується) до нового середовища перебування. Тривалість цієї фази залежить від фізіологічних особливостей мікроорганізму, складу посівного й виробничого середовищ і умов культивування. Чим менше ці розходження й чим більше посівна доза мікроорганізмів, тим коротше перша фаза росту. Незважаючи на відсутність очевидних змін, усередині клітки відбувається ряд біохімічних змін. У клітці збільшується число рибосом і вміст білків, активуються ферментні системи. У перший період чисельність популяції не збільшується, але об'єм клітин зростає.

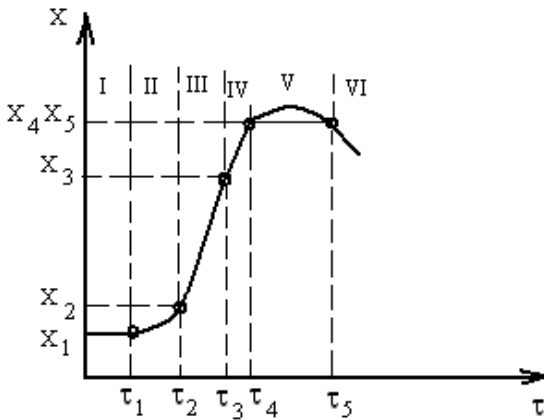


Рисунок 2 – Крива росту мікроорганізмів при періодичному культивуванні
 X - кількість біомаси (число клітин в 1 мол);
 τ - час, год; I - лаг-фаза; II - фаза прискорення росту; III - експоненціальна фаза; IV - фаза вповільненого росту; V - стаціонарна фаза; VI - фаза відмирання

Друга фаза називається фазою прискорення росту або перехідною. Вона характеризується початком ділення клітин. У клітках на цій стадії підвищується вміст нуклеїнових кислот (ДНК, РНК), білків, збільшується об'єм клітин. При досягненні певного співвідношення між поверхнею клітки і її об'ємом відбувається ділення клітки, внаслідок чого починає збільшуватися чисельність популяції й швидкість росту культури. Звичайно ця фаза нетривала.

Третя фаза – це фаза найбільш активного росту числа клітин. Вона називається експонентною або логарифмічною фазою росту. Ця фаза починається після того, як клітки повністю адаптуються до заданих умов і ріст культури не обмежується ні недовіком живильних речовин, ні надлишком продуктів обміну. Установлюється максимальна швидкість росту. При вивченні процесів росту культур мікроорганізмів варто розрізняти абсолютну й питому швидкості росту.

Абсолютна швидкість росту ν , г/год, дорівнює

$$v = \frac{dx}{dt}, \quad (1)$$

де x - кількість біомаси (або число клітин), г/дм³;

t - час, год.

Питома швидкість росту характеризує швидкість росту одиниці біомаси й розраховується за формулою

$$\mu = \frac{dx}{dt} \Delta \frac{1}{x}, \quad (2)$$

де μ - приріст біомаси в одиницю часу на одиницю біомаси, год⁻¹.

Питома швидкість росту культури мікроорганізмів являє собою одну з найбільш важливих характеристик як самого організму, так і умов культивування.

Між питомою швидкістю росту й концентрацією субстрату, що лімітує ріст культури, існує певна залежність, що Моно представив у вигляді рівняння

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{S + K_s}, \quad (3)$$

де μ_{\max} – максимальна питома швидкість;

S - концентрація субстрату;

K_s – константа насичення, чисельно рівна концентрації субстрату, при якій питома швидкість росту дорівнює половині максимальної.

Питома швидкість росту залежить також від продуктів, що виділяються із клітин у середовище в процесі обміну. Рівняння з урахуванням гальмуючої дії інгібіторів росту, відоме як рівняння Моно-Ієрусалимського, має такий вигляд

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{S + K_s + \frac{K_p}{P}}, \quad (4)$$

де P - концентрація продукту, що гальмує ріст клітин;

K_p – константа інгібування, чисельно рівна концентрації продукту, при якій питома швидкість уповільнюється вдвічі.

Експонентний ріст популяції описує рівняння

$$\frac{dx}{dt} = \mu x, \quad (5)$$

де x_0 – кількість біомаси або число клітин у початковий момент часу;
 e - основа натурального логарифма.

При логарифмуванні цього рівняння одержуємо

$$\ln x = \mu t, \quad (6)$$

тобто логарифм кількості біомаси або числа клітин збільшується з постійною швидкістю. Тому цю фазу й називають логарифмічною.

У результаті інтенсивного зростання й розмноження мікроорганізмів у середовищі з тією ж інтенсивністю витрачаються живильні речовини й накопичуються продукти життєдіяльності мікроорганізмів. Виникає й просторова обмеженість, клітки заважають одна одній, погіршується надходження живильних речовин у клітку й виділення метаболітів. Швидкість росту знижується, число ділень клітин скорочується й настає наступна фаза росту.

Четверта фаза - фаза уповільненого росту або зменшення швидкості росту. У цій фазі, на відміну від експонентної, клітки стають неоднорідними, тому що дія несприятливих факторів (зниження концентрації живильних речовин, нагромадження продуктів обміну та ін.) наростає. Все це приводить не тільки до вповільнення процесів росту, але може викликати відмирання й навіть лізис частини клітин.

П'ята фаза називається стаціонарною. У стаціонарній фазі приріст біомаси культури по суті припиняється

$$\frac{dx}{dt} = 0. \quad (7)$$

Однак слід зауважити, що протягом деякого часу й у цій фазі відбувається незначний приріст біомаси, що пояснюється тим, що в стаціонарній фазі окремі клітки усе ще продовжують розмножуватися. Але процес розмноження врівноважується процесом загибелі клітин і автолізом деяких з них.

У культурах, що досягли стаціонарної фази росту, накопичується максимальна кількість біомаси або максимальне число клітин. Ці максимальні величини прийнято називати врожаєм або виходом.

Значний інтерес із практичної точки зору представляє так званий економічний коефіцієнт. Цей показник дозволяє зіставити масу мікроорганізмів, що утворилися, з кількістю витраченого субстрату:

$$y = X/S \quad (8)$$

Для стаціонарної фази характерна усе більше наростаюча гетерогенність клітинної популяції, у якій поряд з окремими клітками, що розмножуються, є клітки, що ще живі, але вже втратили здатність до подальшого росту, а також мертві клітки та ін.

Шоста фаза називається фазою відмирання або фазою загибелі. Вона починається з моменту, коли число відмерлих клітин стає більше числа тих, що утворилися. Умови для життя клітки в цій фазі несприятливі, а запасні речовини клітин вичерпуються.

Періодичний спосіб вирощування мікроорганізмів використовується на стадії одержання посівного матеріалу для багатьох виробництв незалежно від того, безперервною чи періодичною буде головна стадія - ферментація.

Незважаючи на переваги безперервного культивування, багато промислових процесів продовжують носити періодичний характер через труднощі, пов'язані із властивостями мікроорганізмів-продуцентів, та ін. Тому знання стадій розвитку популяції має величезне значення для успішного проведення всього технологічного процесу. При періодичному культивуванні не використовується повною мірою здатність мікроорганізмів до максимального розмноження. Період самої активної життєдіяльності - логарифмічна фаза - займає лише невелику частину виробничого циклу, а значна частина часу йде на лаг-фазу й період уповільненого росту.

При періодичному культивуванні клітки увесь час перебувають у мінливих умовах. На початку в живильному середовищі в надлишку всі живильні речовини, а потім поступово настає недолік харчування й нагромадження продуктів життєдіяльності мікроорганізмів, що інгібує ріст клітин. Якщо ввести в живильне середовище відразу велику кількість живильних речовин, то відбувається інгібування росту культури, так звана катаболітна репресія мікроорганізмів. Поступовим введенням цієї кількості живильних речовин протягом усього процесу можна уникнути інгібування росту мікроорганізмів. Такий метод одержав назву культивування мікроорганізмів із подрібненим дозуванням субстрату або напівперіодичний.

При додаванні джерел харчування в ході культивування відбувається зміна об'єму живильного середовища. Щоб зберегти об'єм середовища постійним і знизити концентрацію продуктів життєдіяльності мікроорганізмів у середовищі, частину культуральної рідини можна через певні проміжки часу видаляти з апарата. Такий періодичний процес культивування називається «від'ємно-доливним». Відмінність його від попереднього методу полягає в тім, що частина культури періодично видаляється при поступовому надходженні свіжого середовища. У цьому випадку основні параметри процесу - об'єм, швидкість розведення, питома

швидкість росту - не є постійними, і культура перебуває у квазістаціонарному стані.

Ще одним методом здійснення періодичного культивування із подрібненим дозуванням субстрату є процес із регулюванням надходження субстрату, що лімітує, через діалізуючу мембрану. Якщо в апараті встановити мембрану, через яку можуть проникати тільки певні речовини, то концентрація їх у середовищі буде підтримуватися постійною завдяки дифузії розчинених речовин розчину, відділеного мембраною. Цей метод можна використовувати для росту продуцента, лімітованого субстрату або для концентрування біомаси. Періодичне культивування із подрібненим дозуванням субстрату дає можливість трохи збільшити час перебування популяції на одній з фаз розвитку. Однак стабілізувати фізіологічний стан клітин поза залежністю від часу і цим способом неможливо.

1.1.2 Безперервне культивування мікроорганізмів

Безперервне культивування полягає в безперервній подачі живильних речовин у ферментатор у такому кількісному і якісному співвідношенні, яке необхідно для підтримки мікроорганізмів в експонентній фазі розвитку. У цих умовах досягається рухливо-рівноважний стан, при якому клітки безупинно й однорідно розмножуються зі швидкістю, що відповідає надходженню живильних речовин. Одночасно частина культурального середовища разом зі зваженими в ній клітками з тією ж швидкістю безупинно витікає з ферментатора, однак кількість мікроорганізмів, що підтримує безперервний процес, залишається у ферментаторі постійним.

При безперервному культивуванні мікроорганізмів необхідно так відрегулювати швидкості надходження живильного середовища й витікання культуральної рідини, щоб запобігти вимиванню культури із системи, тобто забезпечити постійну концентрацію клітин.

Однією з важливих характеристик безперервного культивування є швидкість розведення, тобто швидкість обміну живильного середовища в ферментаторі. Швидкість розведення D , год⁻¹, дорівнює

$$D = F/V, \quad (9)$$

де V_3 - об'єм культиватора, дм³;

F - швидкість надходження середовища (швидкість протоки), дм³/год.

Питома швидкість росту мікроорганізмів дорівнює

$$\mu = \frac{1}{x} \Delta \frac{dx}{dt} \quad (10)$$

Звідси миттєвий приріст мікроорганізмів під час культивування дорівнює

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \quad (11)$$

В умовах безперервного культивування миттєвий приріст біомаси μx компенсується її віднесенням із середовищем Dx , тобто

$$\mu x - Dx = 0 \text{ або } (\mu - D) x = 0 \quad (12)$$

Отже

$$\mu = D \quad (13)$$

Це рівняння є основною умовою підтримки сталої рівноваги при безперервному культивуванні мікроорганізмів. У цьому випадку всі технологічні й фізіологічні показники зберігаються постійними.

1.1.3 Системи безперервного культивування

Метод безперервного культивування мікроорганізмів одержав у цей час не тільки глибоке теоретичне обґрунтування, але й широке практичне застосування. Найбільше доцільно системи безперервного культивування класифікувати по принципах їхньої дії (рис. 3).

Розрізняють відкриті й замкнуті системи безперервного культивування. У відкритих системах клітки постійно вимиваються середовищем, що витікає, зі швидкістю утворення в системі нових клітин; у цих умовах легко досягається їхня постійна концентрація.

У замкнутих системах клітки в деякій мірі затримуються в системі і їхня кількість все зростає. В цих умовах одні фактори, що лімітують, змінюють інші і нарешті більша частина клітин відмирає, і така система не в змозі досягти динамічної рівноваги. Практично процес протікає як подовжений періодичний. Із цієї причини замкнуті системи культивування не можна розглядати як безперервно проточні, що здатні функціонувати необмежений час. Змінити відкриту систему на замкнуту можна шляхом простої технічної зміни принципу роботи.

Головна різниця між відкритою й замкнутою системами полягає у тому, що відкрита система може існувати при сталому динамічному режимі, а замкнута ніколи не може досягти цього стану.

Безперервний процес може бути гомогенно-безперервним і гетерогенно-безперервним. При гомогенно-безперервному процесі у ферментаторі з інтенсивним перемішуванням всі параметри (концентрація живильних речовин, швидкість росту мікроорганізмів) постійні в часі.

При гетерогенно-безперервному процесі кілька ферментаторів з'єднують у батарею, і в кожному з них підтримують постійні умови культивування, але відмінні від умов в іншому ферментаторі. При такому способі не забезпечуються постійні умови росту клітин.

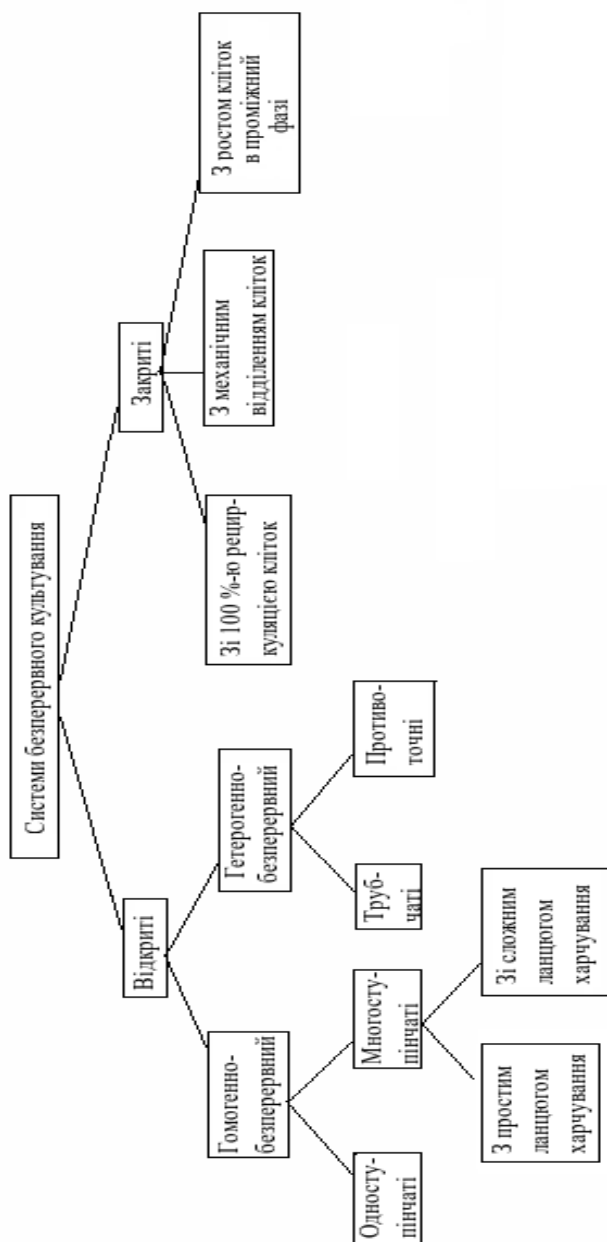


Рисунок 3 – Класифікація систем безперервного культивування

Відкритою одноступінчастою гомогенно-безпервною системою називається система, що складається з одного ферментатора з постійною подачею живильного середовища й відводом культуральної рідини. За рахунок інтенсивного перемішування состав середовища у всіх точках апарата підтримується гомогенним, завдяки чому мікробні клітки перебувають в однаковому фізіологічному стані. Основним апаратом є ферментатор, у якому середовище інтенсивно перемішується для досягнення однорідності (рисунок 4).

Свіже живильне середовище надходить у ферментатор з певною й постійною швидкістю. Культуральна рідина, включаючи клітки вирощених мікроорганізмів, витікає з ферментатора з тією ж швидкістю. Концентрація всіх компонентів - клітин, живильних речовин і продуктів метаболізму - однакова у всьому обсязі ферментатора.



Рисунок 4 – Відкрита одноступінчаста гомогенно-безпервна система

При гомогенно-безпервному культивуванні можна здійснити обмеження росту культури одним елементом харчування при нелімітованій кількості інших елементів. Таке безпервне культивування називається хемостатним (або хемостат), тому що ріст мікроорганізмів регулюють хімічні фактори середовища (рис. 5).

Хемостатна культура являє собою суспензію біомаси, що повністю перемішується, у яку з постійною швидкістю подається середовище й з якої з тією ж швидкістю відбирається культуральна рідина разом із клітками. Компоненти середовища підбирають таким чином, щоб один елемент харчування був у недоліку, тоді щільність популяції визначається його концентрацією. Всі інші елементи харчування даються в надлишку, а умови культивування (температура, рН, аерація) підтримуються оптимальними. Швидкість розведення в хемостаті заздалегідь задана й контролюється концентрацією компонента, що лімітує. Мікроорганізми залежно від цього самі підтримують власну концентрацію. Швидкість розведення D можна міняти в широких межах, але вона не повинна перевищувати $\mu_{\text{макс}}$.

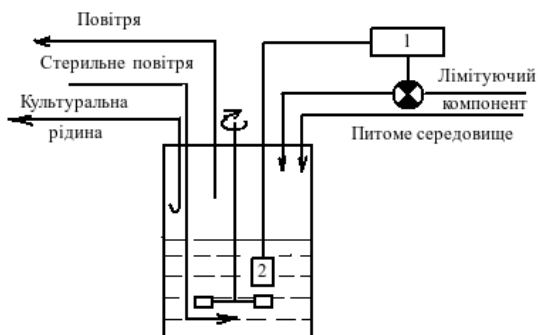


Рисунок 5 – Принципова схема роботи хемостата

1 – регулятор подачі компонента, що лімітує; 2 - датчик концентрації компонента, що лімітує.

Максимальна швидкість росту може бути досягнута при турбідостатному культивуванні (турбідостат), при якому контроль процесу здійснюється по концентрації мікроорганізмів (рис. 6).

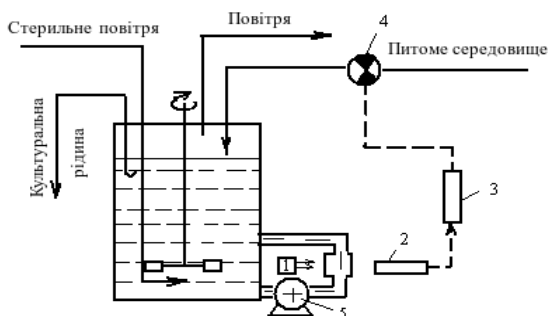


Рисунок 6 – Принципова схема роботи турбідостата

1 – джерело світла; 2 – фотоелемент; 3 – підсилювач сигналу фотоелемента; 4 – регулятор подачі живильного середовища; 5 – насос для циркуляції культуральної рідини

У турбідостаті задається постійна концентрація клітин, що контролюється безпосередньо в культиваторі за допомогою фізичних і фізико-хімічних методів, в основному з використанням системи фотоелементів. Швидкість надходження свіжого живильного середовища регулюється спеціальним пристроєм. При надлишку субстрату в турбідостаті відбувається

розмноження мікроорганізмів з максимальною швидкістю, і концентрація клітин швидко зростає. При перевищенні заданої концентрації клітин спрацьовує фотоеlement і включає подачу свіжого середовища, завдяки чому концентрація клітин знижується. Турбідостат працює найбільше ефективно при низькій концентрації клітин в області, близької до критичної швидкості розведення. При найменшій зміні швидкості розведення дуже швидко міняється концентрація клітин і чутливість приладу використовується повністю. Цей метод застосуємо для вирощування мікроорганізмів на прозорих середовищах.

Гомогенна безперервна відкрита система є основою для аналізу й оцінки всіх інших типів безперервних мікробіологічних процесів. Інші типи розглядають лише як особливі випадки цього основного типу.

При одержанні деяких продуктів процес безперервного культивування не може бути успішно реалізований в одному ферментаторі, одноступінчасто. У цьому випадку виникає необхідність застосування багатоступінчастої безперервної системи, що являє собою ряд послідовно з'єднаних ферментаторів (рис. 7).

У багатоступінчастих системах свіже живильне, середовище може подаватися тільки в перший ступінь. Така система називається однопотоковою або системою із простим ланцюгом харчування. Якщо живильне середовище подається як у перший ступінь, так і в кожний наступний, то така система називається багатопотоковою або системою зі складним ланцюгом харчування. Живильне середовище, що подається в різні ступені, може мати або однаковий, або різний состав. Якщо після останнього ферментатора частина клітин (відсепарованих) вертається в перший ферментатор, то така система називається системою із частковим поверненням (або рециркуляцією) клітин.

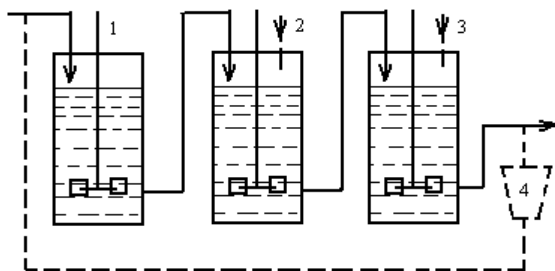


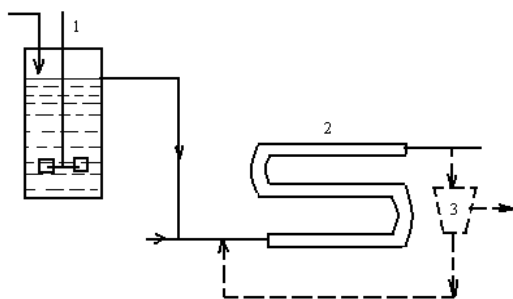
Рисунок 7 – Схема багатоступінчастої безперервної системи

1 – із простим ланцюгом живлення; 2,3 – зі складним ланцюгом харчування; 4 – із частковим поверненням відсепарованих клітин (рециркуляцією).

Багатоступінчасті безперервні системи дозволяють найбільш повно використовувати синтетичні можливості мікроорганізмів при максимальній утилізації субстрату.

У гетерогенно-безперервних системах у процесі вирощування культура не перемішується або перемішується не повністю. Живильне середовище протікає безперервно як однорідний струмінь через постійний об'єм ферментатора. Состав середовища змінюється уздовж потоку й залежить від швидкості потоку. Якщо умови потоку постійні, то состав середовища на певній ділянці ферментатора наближається до постійного і незалежного від часу значення. Отже, хоча кожний окремий компонент зазнає змін при безперервному русі через систему, сама система в цілому не змінюється в часі.

Типовим прикладом такої системи є трубчастий реактор, через який протікає з хемостата однорідний потік середовища, який не перемішується та не аерується. У трубчастому реакторі мікроорганізми ростуть зваженими в середовищі (рисуюнок 8).



Рисуюнок 8 – Схема гетерогенно-безперервної системи із трубчастим реактором

1 – хемостат; 2 – трубчастий реактор; 3 – сепаратор для відділення біомаси.

Гетерогенне культивування в трубчастому реакторі вимагає постійного засіву від попереднього безперервно працюючого ферментатора. разом із середовищем уздовж трубчастого реактора клітки, що просовуються, розмножуються, досягають максимальної чисельності, і можуть навіть відмирати, якщо реактор має достатню довжину. Отже, незважаючи на безперервність процесу, клітки проходять тут той же цикл розвитку, що й при періодичному способі культивування.

Трубчаста система у всіх випадках заміняє багатоступінчасте безперервне культивування. Перевагою трубчастої системи є також порівняно повне використання субстрату. Недолік її полягає в труднощі

аерації, тому вона переважно застосовується для анаеробних процесів або для процесів з мінімальним споживанням кисню. Зокрема, подібна система використовується для очищення стічних вод, де протікають анаеробні процеси й седиментація клітин є позитивним чинником.

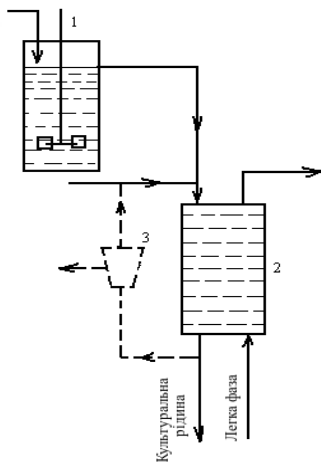


Рисунок 9 – Схема гетерогенно-безперервної протиточної системи

1 - хемостат; 2 - реактор; 3 - сепаратор для відділення біомаси

передбачена рециркуляція клітин. Протечійні системи можуть бути використані в нафтовій промисловості для обробки за допомогою мікроорганізмів деяких рідких або газоподібних вуглеводнів.

Переведення гомогенної або гетерогенної відкритої системи в замкнуту здійснюється шляхом повної рециркуляції клітин (рис. 10).

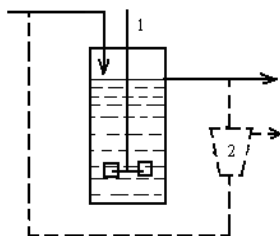


Рисунок 10 - Замкнута система з рециркуляцією клітин

1 - ферментатор; 2 - апарат для відділення клітин

Відкритими гетерогенно-безперервними системами є також протиточні системи, у яких дві фази, що не змішуються, протікають в протилежних напрямках (рисунок 9). Мікроорганізми спочатку вирощують у гомогенній системі – хемостаті 1, звідки вони надходять у реактор 2. Простір реактора звичайно розділено на яруси, які можна розміщувати різним чином. Живильне середовище (водна фаза) з активною суспензією клітин подається зверху у вертикальний реактор. Більш легка рідка або газова фаза, що не змішується з більш важкою рідкою фазою, тече в протилежному напрямку. У системі може бути

Мікроорганізми спочатку вирощуються в гомогенній системі - хемостаті 1, звідки надходять у реактор 2.

Існує два варіанти такої рециркуляції: або свіже середовище вводиться в культиватор, куди вноситься суспензія клітин після відділення їх від використаного середовища, або середовище разом із суспензією клітин безупинно циркулюють у системі.

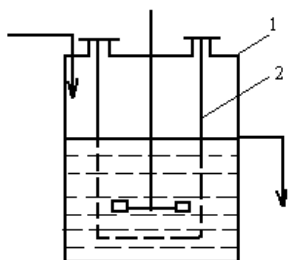


Рисунок 11 - Замкнута система з механічним відділенням клітин

1 - ферментатор; 2 - посудина з напівпроникними стінками

рідкої й газоподібної фаз, а свіже живильне середовище протікає уздовж шару культури. Повільно протікаюча рідина, на поверхні якої росте культура, не містить клітин або містить їх дуже мало. Такі системи застосовуються для мікроорганізмів, чутливих до перемішування, а також для культивування пліснявів, що продукують пеніцилін, лимонну кислоту або ферменти (рисунок 12 а).

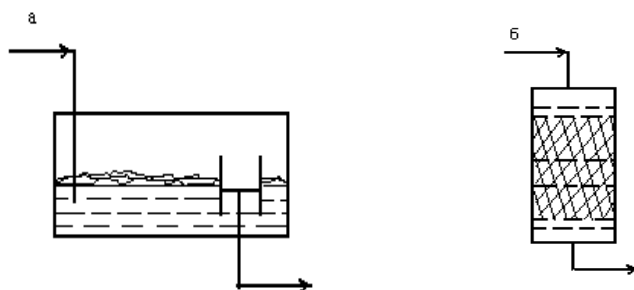


Рисунок 12 - Система вирощування мікроорганізмів у проміжній фазі а - рідина-газ (культура на рідині у вигляді плівки); б - рідина-тверде тіло (мікроорганізми закріплені на твердому носії).

Деякі види мікроорганізмів ростуть на границі рідкої й твердої фаз.

У замкнутих системах з механічним відділенням клітин культура вирощується в посудині з напівпроникними стінками, зануреному в протікаюче живильне середовище

(рис. 11). Через напівпроникні стінки відбувається обмін метаболітів і живильних речовин, а мікроорганізми залишаються в посудині. Цей метод зручний при вивченні утворення різних токсинів патогенними мікроорганізмами.

Деякі мікроорганізми добре розвиваються на границі рідкої й твердої фаз (рисунок 12).

Звичайно культура сама утворює

досить щільні плівки на границі

рідкої й газоподібної фаз, а свіже живильне середовище протікає уздовж шару культури.

Повільно протікаюча рідина, на поверхні якої росте культура, не містить клітин або містить їх дуже мало.

Такі системи застосовуються для мікроорганізмів, чутливих до перемішування, а також для культивування пліснявів, що продукують пеніцилін, лимонну кислоту або ферменти

Тверда фаза (стружка, целюлозні волокна, керамічні або скляні трубки та ін.), занурена в живильне середовище, що протікає, служить несучим елементом, на якому закріплена культура (рис. 12 б). Мікроорганізми ростуть на насадці, а субстрат циркулює в системі. Така система широко поширена у виробництві оцтової кислоти, органічних розчинників, кислот; застосовується вона й для очищення стічних вод.

1.1.4 Типова технологічна схема мікробіологічного виробництва

Технологічний процес мікробіологічного виробництва являє собою сукупність взаємозалежних технологічними потоками операцій, що забезпечують переробку вихідних матеріалів у готовий продукт. Сучасна мікробіологічна промисловість виробляє різноманітні біопрепарати й для кожного з них створена своя технологія. Однак всі виробництва, засновані на життєдіяльності мікроорганізмів, мають однакові стадії. Тому доцільно розглянути принципovu технологічну схему мікробіологічного синтезу (рис. 13), побудовану на загальних й обов'язкових для будь-якого мікробіологічного виробництва стадіях.

Основними стадіями мікробіологічного синтезу є:

- передферментаційні стадії (одержання посівного матеріалу, підготовка сировини, готування живильних, середовищ підготовка й стерилізація повітря);
- ферментація;
- постферментація (виділення цільового продукту).

Підготовлена сировина – речовини, що містять вуглець, і мінеральні солі поступають на стадію приготування живильного середовища. Частина живильного середовища подається в інокулятор для вирощування посівного матеріалу, а інший потік направляється в основний апарат мікробіологічного процесу - ферментатор. Підготовлене повітря й посівний матеріал також надходять на стадію ферментації, де в умовах аерації й перемішування відбувається інтенсивне зростання й розмноження мікроорганізмів. Потім культуральна рідина надходить на стадію відділення біомаси, де відбувається поділ культуральної рідини на біомасу й відпрацьовану культуральну рідину. У виробництвах, у яких немає необхідності відокремлювати біомасу, культуральна рідина з ферментатора направляється безпосередньо на стадію виділення кінцевого продукту.

Після відділення біомаси на стадію виділення кінцевого продукту направляється або біомаса, або культуральна рідина залежно від того, де перебуває цільовий продукт.

У кожному конкретному мікробіологічному виробництві є свої відмінні риси. Вони є практично на кожній стадії технологічного процесу. Так, залежно від джерела сировини в кожному виробництві на стадії підготовки передбачається своя схема його обробки, транспортування та ін. Залежно від фізіологічних особливостей мікроорганізмів-продуцентів

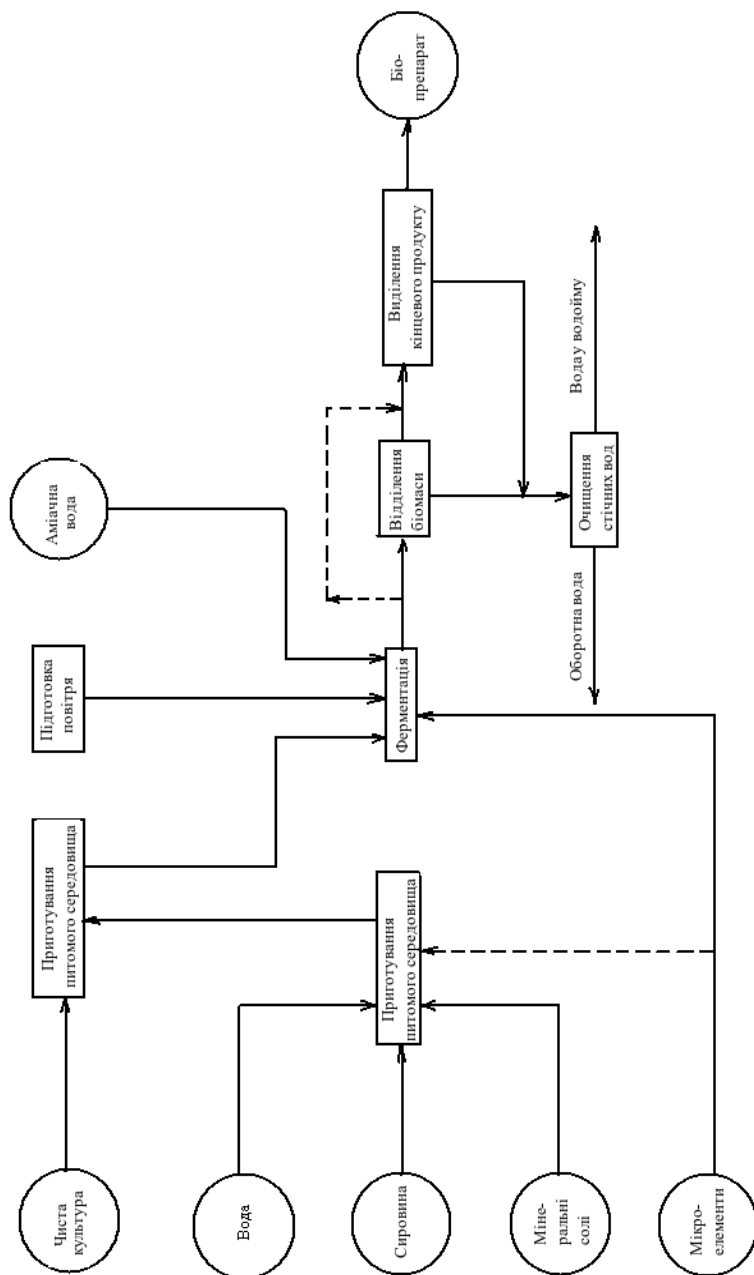


Рисунок 13 - Типова технологічна схема мікробіологічного виробництва

вибирають умови їхнього культивування (конструкція ферментатора, підготовка й подача повітря та ін.).

Більші відмінності в технологічних схемах різних мікробіологічних виробництв спостерігаються в «хвості» схеми - на стадії виділення кінцевого продукту. Якщо цільовим продуктом мікробіологічного синтезу є маса мікроорганізмів, то стадія виділення досить проста, вона полягає в концентруванні біомаси і її сушінні. Якщо ж кінцевим продуктом є метаболіти - продукти життєдіяльності мікроорганізмів, які можуть перебувати усередині клітки або в культуральній рідині, то кінцева стадія виділення складається з декількох досить складних операцій. Однак ці особливості не міняють загальну технологічну схему мікробіологічного виробництва.

Оскільки кінцевий результат мікробіологічного синтезу залежить від успішної роботи кожної стадії технологічної схеми, варто розглянути їх окремо.

1.2 Предферментаційні процеси

1.2.1 Одержання посівного матеріалу

Посівним матеріалом називають чисту культуру мікроорганізму-продуцента, «розмножену» до такої кількості (об'єму), яка необхідна для засіву промислових апаратів.

Для одержання посівного матеріалу використовують вихідну культуру продуцента, що зберігається в центральній заводській лабораторії (ЦЗЛ).

Кожна виробнича культура має паспорт, у якому зазначені її назва (рід, вид), колекційний номер, серія й дата випуску, середній рівень активності, строк придатності. У паспорті представлена характеристика середовища для вирощування й зберігання культури. Щоб властивості культури-продуцента залишалися без зміни, її треба зберігати у відповідних умовах. При тривалому зберіганні, особливо при частих пересіваннях, легко мінливими є насамперед фізіологічні ознаки культури, тобто ті, які становлять найбільший інтерес для одержання цільового продукту.

Способи тривалого зберігання культур засновані на властивостях мікроорганізмів обмежувати або навіть припиняти клітинний обмін речовин при зміні зовнішніх умов. Так при охолодженні процеси життєдіяльності клітин різко уповільнюються, а при заморожуванні й зневодненні клітки приходять у стан анабіозу й преданабіозу. Однак такі клітки зберігають життєздатність і при створенні нормальних умов повністю відновлюють властиві їм властивості.

Найпростіший спосіб зберігання – це зберігання в холодильнику. Готову культуру на агаризованому середовищі в пробірках поміщають у холодильник і зберігають при температурі від плюс 4 до мінус 4°C впродовж 1-2 місяців. Для більш тривалого зберігання культуру необхідно пересівати,

щоб зберегти її фізіолого-біохімічні властивості. Тривалі проміжки між пересіваннями неприпустимі, тому що мікроорганізми в процесі зберігання споживають із середовища живильні речовини й накопичують продукти обміну, що шкідливо впливають на їхні властивості. Крім того, у процесі зберігання середовище зневоднюється, що може привести не тільки до зміни властивостей культури, але й до її загибелі.

На твердих середовищах під шаром стерильного вазелінового масла або парафіну можна зберігати культуру кілька місяців. Товщина шару масла над поверхнею агар-агару повинна бути не менш 1 см, щоб зберегти середовище від висихання. При більшій товщині шару масла може відбутися загибель аеробної культури через недолік кисню. Культуру заливають стерильним маслом після того, як вона досягне повної фізіологічної зрілості.

Зберігання культури в сипучих матеріалах полягає у тому, що суспензію мікроорганізмів або спор наносять на попередньо простерилізований сипучий матеріал (грунт, пісок, глину, зерно), висушують при кімнатній температурі й зберігають у скляному посуді, закритому ватяною пробкою. Щоб відновити культуру із сипучого матеріалу роблять змиви на чашки Петрі й висівають на живильний агар-агар. Строк зберігання культури залежно від виду мікроорганізмів може досягати декількох місяців.

При температурі нижче мінус 20 °С культура зберігається кілька місяців однак варто уникати багаторазових відтавань і заморожувань. Деякі культури можна зберігати в замороженому стані при температурі рідкого азоту. Культуру заморожують в 10% водяному розчині гліцерину й поміщають в ампули, які запаюють. Ампули зберігають у контейнері з рідким азотом. У цих умовах деякі мікроорганізми зберігають всі фізіолого-біохімічні властивості протягом декількох років.

У цей час найбільш перспективним способом тривалого зберігання мікроорганізмів вважається сублімаційна сушка. Спочатку в культуру мікроорганізмів додають захисне середовище (сахарозу, бульйон та ін.), що охороняє клітки від інактивациї, розливають у стерильні ампули й закривають стерильними ватяними тампонами. Потім проводять швидке заморожування при температурі від мінус 35 до мінус 78 °С. Ампули із замороженою культурою переносять у вакуум-сушильний апарат і піддають сублімаційному сушінню при кімнатній температурі й залишковому тиску 1-10 кПа протягом 26-30 год. Сублімаційно висушені культури можуть зберігатися 5-6 років без втрати фізіологічних особливостей і спроможності до швидкого росту. Цей спосіб називають також зберіганням культур у ліофілізованому стані.

У заводських умовах найчастіше використовують способи зберігання культури у холодильнику або під шаром вазелінового масла.

Готування посівного матеріалу залежно від виду продуцента, його фізіолого-біохімічних особливостей складається з декількох послідовних етапів.

Перша стадія вирощування посівного матеріалу здійснюється в заводській лабораторії. Вихідну культуру розмножують на скошеному агаризованому середовищі в пробірці в стерильних умовах при оптимальних складі живильного середовища й режимі вирощування (рН, температура, тривалість).

Вирощену культуру стерильно змивають водою з поверхні агаризованого середовища в колби Ерленмейера місткістю 750 мл, що містять 50-100 мл рідкого живильного середовища. Колби з культурою поміщають на качалку, що перебуває у приміщенні з постійною температурою (28-30) °С. Перемішування культури, що здійснюється струшуванням качалки (120-240 об./хв.), збільшує швидкість росту культури завдяки інтенсифікації масообміну. Тривалість вирощування культури в колбах на качалці становить 18-36 год. Цю стадію вирощування необхідно контролювати за морфологічними показниками мікроорганізму. Найкращі результати дає культура, що перебуває в стадії фізіологічної зрілості наприкінці логарифмічної фази росту.

На другій стадії вирощування посівного матеріалу готову культуру з колб стерильно переносять у посівний апарат (інокулятор), у який попередньо вносять парафіни й мінеральні солі в певних кількостях. Посівний апарат оснащений мішалкою, пристроєм для аерації, а також контрольно-вимірювальною апаратурою для регулювання температури, рН, рівня піни та ін. Об'єм живильного середовища в апараті не повинен перевищувати 60 % загального об'єму. Важливе значення має кількість внесеного в апарат посівного матеріалу. При малій кількості посівного матеріалу потрібен більш тривалий період інокуляції. Тому в посівний апарат вносять звичайно 10-12 % посівного матеріалу від об'єму живильного середовища.

Під час готування посівного матеріалу в апаратах необхідно підтримувати оптимальний режим культивування. Для контролю регулярно відбирають проби й проводять їх мікробіологічний і біохімічний аналіз. Звичайно процес закінчується за 12-14 год.

Третя стадія культивування посівного матеріалу здійснюється в посівному апараті об'ємом 3,2 м³. Для цього весь вміст малого інокулятора перекачується в апарат більшого об'єму, у якому перебуває простерилізоване живильне середовище. Процес вирощування триває 12-14 год.

Четверта стадія процесу здійснюється в апараті об'ємом 50 м³. Перед прийомом суспензії з попередньої стадії в апараті готують живильне середовище шляхом подачі парафіну, розчинів живильних солей і мікроелементів. Середовище доводять до оптимальних значень рН і температури, перекачують посівний матеріал з попередньої стадії й починають процес вирощування при безперервній аерації й перемішуванні. Процес триває 10-12 год. Потім суспензію можна подавати у виробничі ферментатори. Отриманий посівний матеріал піддають ретельному

мікробіологічному й біохімічному контролю, тому що від його активності й чистоти залежить подальший виробничий цикл.

1.2.2 Підготовка сировини

Живильні середовища повинні містити основні речовини, що забезпечують оптимальний ріст мікроорганізмів. Для здійснення біосинтезу, росту й розмноження клітка повинна одержувати ззовні в необхідних кількостях всі елементи, що входять до її складу .

Універсальних середовищ, придатних для культивування абсолютно всіх мікроорганізмів, немає. Состав живильних середовищ визначається особливостями й розмаїттю обміну речовин мікроорганізмів, що найчастіше проявляється в різному відношенні до джерел вуглецю й азоту, у той час як мінеральний фон коливається не так значно. Навіть для того самого мікроорганізму можуть бути використані різні середовища.

По фізичному стану середовища можна розділити на три групи: тверді (приготовлені на агар-агарі, желатині або кремнієвих пластинах), рідкі й сипучі (зволожені висівки, зерно).

По составу середовища можна розділити на дві основні групи: натуральні й синтетичні середовища.

Натуральними називають середовища невизначеного хімічного складу, які включають продукти тваринного або рослинного походження. Основою для натуральних середовищ є різні частини зелених рослин, тваринні тканини, солод, дріжджі, овочі, фрукти. Переважна більшість їх використовується у вигляді екстрактів і настоїв. На натуральних середовищах добре розвиваються продуценти, але вони не придатні для вивчення фізіології обміну речовин. На таких середовищах неможливо врахувати споживання окремих компонентів середовища, а також ідентифікувати продукти метаболізму через складність і невизначеність їхнього складу. Натуральні середовища непостійні по складу, тому що істотно залежать від сировини й умов готування. Їх використовують для підтримки культур мікроорганізмів, нагромадження біомаси й для діагностичних цілей.

Синтетичні середовища - це такі, до складу яких входять конкретні хімічно чисті сполуки, узяті в точно зазначених концентраціях.

Більшість мікроорганізмів як джерело вуглецю асимілюють органічні речовини. Незалежно від використовуваного джерела вуглецю мікроорганізми будують свої біополімери відповідно до складу, що передбачений їх видовими й фізіологічними особливостями, генним апаратом.

Вміст вуглецю в клітках мікроорганізмів становить у середньому 50 % (у перерахуванні на суху масу), тому джерела вуглецю займають основне місце серед речовин, що входять до складу живильних середовищ.

Кожний вид мікроорганізму вибірково ставиться насамперед до джерела вуглецю. Мікроорганізми-автотрофи можуть використовувати як єдине джерело вуглецю діоксид вуглецю. Для мікроорганізмів-гетеротрофів джерелом вуглецю служать різні органічні сполуки: вуглеводи, спирти, органічні кислоти, ліпіди, вуглеводні й інші вуглецевмісні речовини.

Азотне харчування мікроорганізмів за значенням наближається до вуглецевого, але поступається останньому по об'єму. Елементний аналіз показує, що азоту в складі мікроорганізмів в 5-6 разів більше, ніж вуглецю, тому що значна частина споживаного мікроорганізмами вуглецю витрачається на енергетичні цілі. Тому вміст джерел вуглецю в живильних середовищах має бути набагато більшим, ніж джерел азоту. Засвоєний мікроорганізмами азот, в основному, залишається в клітках, тоді як від засвоєного ними вуглецю в клітках утримується тільки невелика частина.

Джерелами азоту для більшості мікроорганізмів-продуцентів є складні органічні, а також неорганічні азотовмісні речовини. Засвоєння вільного азоту не описано ні для одного продуцента; цією здатністю володіє лише дуже обмежена група мікроорганізмів, так званих азотфіксаторів.

Навіть невеликий недолік азоту в живильному середовищі призводить до «ожиріння» клітин, тобто підвищення вмісту в них ліпідів за рахунок зменшення білкової й амінокислотної фракцій. Тому на виробництві постійно стежать за тим, щоб у середовищі не було недоліку азоту.

Фосфор є дуже важливим елементом живильного середовища. Він забезпечує нормальне протікання енергетичного обміну в клітці, а також найголовніших біосинтетичних процесів (синтез білків і нуклеїнових кислот, гліколіз). Від концентрації фосфору в середовищі залежить швидкість росту культури й вміст фосфору в клітках мікроорганізмів.

Джерела вітамінів, макро- і мікроелементів. Обмін речовин у клітці мікроорганізму не може протікати без вітамінів, макро- і мікроелементів. По потребі у вітамінах всі мікроорганізми діляться на два типи: аукоавтотрофи - здатні синтезувати вітаміни й не потребуючі їх введення в середовище, і аукогетеротрофи - не здатні синтезувати вітаміни й потребуючі введення їх до складу середовища. Багато мікроорганізмів-продуцентів, що використовуються в мікробіологічній промисловості, є аукогетеротрофами. Найчастіше для них необхідний комплекс вітамінів групи В, у який входять тіамін, ніотинова кислота, пантотенова кислота, піридоксин, інозит і біотин. Найбільший недолік у мікроорганізмів виявляється в біотині.

Потреба мікроорганізмів у вітамінах встановлюється експериментально для кожного штаму. Оскільки вітаміни входять в основному до складу ферментів, то кількість їх у середовищі звичайно досить незначна (тисячні частки мг в 1 л середовища). Вітаміни вносяться або із сировиною, у якій вони містяться, або окремо.

Живильні середовища обов'язково повинні містити макро- і мікроелементи, які входять до складу активних центрів ферментів, що

забезпечують обмін речовин мікроорганізмів, що активують процеси подиху, окислювально-відновні реакції й інші процеси життєдіяльності клітки.

Найбільше на ріст і розвиток мікроорганізмів впливають іони заліза, міді, марганцю, цинку, бору, молібдену, кобальту й ряду інших елементів. Мікроорганізми звичайно потребують незначні дози цих елементів, про що свідчить кількісний склад золи мікроорганізмів. Підвищена концентрація цих елементів гальмує ріст і розвиток мікроорганізмів.

Для забезпечення росту й розвитку мікроорганізмів живильне середовище має містити необхідну кількість джерел вуглецю, азоту, фосфору, вітамінів, макро- і мікроелементів, мати певні значення рН і окислювально-відновного потенціалу.

Всі види сировини для готування живильних середовищ повинні відповідати вимогам державного стандарту. Складні природні речовини або промислові продукти повинні пройти строгу біохімічну перевірку на придатність у якості сировини для готуванні живильних середовищ. Розглянемо основні види сировини.

Вода. Для приготування живильних середовищ воду беруть із водопроводу, артезіанських свердловин або відкритих водойм після відповідної обробки. Вода повинна бути біологічно чистою, безбарвною, без присмаку й запаху, не повинна давати осаду. Сухий залишок води не повинен перевищувати 1000 мг/л, загальна жорсткість не повинна бути біль 7 мг-екв/л. Занадто жорстка вода сповільнює ріст мікроорганізмів.

Вміст шкідливих домішок у воді не повинний перевищувати наступних значень, мг/л:

Свинець - 0,1;	Цинк - 5,0;
Миш'як - 0,05;	Мідь - 3,0;
Фтор - 1,5.	

Загальне число мікроорганізмів в 1 мл не повинне бути більше 100.

Джерела вуглецю. Глюкоза кристалічна може містити води не більше 9 %, золи - не більше 0,07 %. У сухій речовині повинно бути не менш 99,5 % речовин, що редукують.

Сахароза (бураковий цукор, тростинний цукор) технічна містить не менш 99,75 % сахарози, не більше 0,03 % золи. Вологість до 0,15 %.

Лактоза (молочний цукор), яку отримують з молочної сироватки, є відходом при виготовленні масла й сиру. Після згущення до концентрації цукрів 50 % і кристалізації одержують концентрат лактози. Лактозний цукор-сирець містить не менш 92 % цукру, не більше 3 % води, 2% золи й 1 % молочної кислоти. Кількість білка не регламентована, але звичайно вона не перевищує 3 %.

Крохмаль являє собою суміш полісахаридів. Одержують у промисловому масштабі з картоплі й кукурудзи. Під дією ферментів мікроорганізмів крохмаль гідролізується до глюкози. Залежно від сорту (вищий, I, II, III) вміст золи в крохмалі сягає 0,35-1,2 %.

Гідрол є нестандартним продуктом крахмалопатокове виробництва. Являє собою густий темний сироп з характерним запахом. Містить близько 50 % цукрів у перерахуванні на технічний продукт. Цукрі гідролу складаються в основному із глюкози. Крім глюкози близько 18 % від маси сухих речовин складають цукри, що є продуктами неповного розщеплення крохмалю й полімеризації глюкози; інші вуглеводи гідролу ще не ідентифіковані. Крім вуглеводів при гідролізі крохмалю утворюється деяка кількість органічних кислот. рН гідролу (активна кислотність) становить приблизно 4,0, зольність не більше 6 %. Основна частина золи - це хлорид натрію, фосфор, магній; залізо й інші елементи присутні в гідролі в мінімальних кількостях.

Меляса – побічний нестандартний продукт цукрової промисловості, що залишається після другого відділення кристалів цукру. Колір – темно-коричневий; густина 1,35-1,40 кг/дм³. Меляса містить 61-68 % сухих речовин, 40-55 % сахарози. У мелясі міститься 1,1-1,5 % азоту, причому третя частина його перебуває у формі бетаїну, використовувати який мікроорганізми не можуть. До складу меляси входять багато амінокислот (аспарагінова, глутамінова, лейцин, ізолейцин, тирозин) і вітаміни групи В (біотин, тіамін, рибофлавін, інозит, ніотинова й пантотенова кислоти). Особливо велике значення має біотин (його вміст - 80 мг/т).

У мелясній золі багато калію (30-40 %), мангану (1,5-4,5 %), кальцію (до 14%), заліза й інших елементів, але порівняно мало фосфору.

При зберіганні меляси можуть мати місце втрати цукру в результаті діяльності мікроорганізмів.

Кукурудзяне борошно. Состав кукурудзяного борошна може коливатися в значних межах залежно від сорту кукурудзи, умов її вирощування й зберігання. У середньому вона містить 67-70 % крохмалю, близько 10% інших вуглеводів (клітковини, пентозанів, декстринів, розчинних вуглеводів, близько 12 % білків. Вологість не повинна перевищувати 15 %. Вміст золи приблизно 0,9 %. Зола кукурудзяного борошна містить до 45 % фосфорного ангідриду, 30 % оксиду калію і 15 % магній(II) оксиду. Кукурудзяне борошно служить джерелом вуглецю в живильних середовищах для біосинтезу антибіотиків і ферментів. Вона є найдешевшим продуктом із всіх зернових і її ціна залежить від ступеня здрібнювання.

Мелясна барда є нестандартним продуктом, відходом спиртового виробництва. Вміст сухих речовин у натуральній барді 6-10 %. У складі барди крім дріжджової маси присутні амінокислоти, гліколева, молочна, бурштинова кислоти, солі кальцію, калію, натрію, марганцю, кобальту, міді й ряд вітамінів групи В.

Ацетонобутилова барда - нестандартний продукт, що є відходом мікробіологічного виробництва органічних розчинників - ацетону й бутилового спирту. Для мікробіологічного синтезу використовують барду

після відділення шламу. У складі барди є вуглеводи, клітковина, азотвмісні й зольні речовини.

Деревна сировина являє собою багаторічні рослинні тканини, що містять целюлозу, лігнін, пентозани та ін. Сировину піддають спеціальній обробці: подрібнюють і гідролізують при високих температурах. Полісахариди деревини в процесі гідролізу перетворюються в розчинні у воді моносахариди, які легко засвоюються мікроорганізмами.

Розчин, одержуваний у процесі гідролізу деревини, називають гідролізат, якість його як субстрату для вирощування мікроорганізмів оцінюється по вмісту моносахаридів. Вміст цукрів у гідролізаті залежить від породи деревини, способу гідролізу й інших факторів.

Крім відходів деревообробної й целюлозно-паперової промисловості джерелом сировини, що містить целюлозу, є рослинні сільськогосподарські відходи (бавовняна лушпайка, кукурудзяні качани, соняшникова лузга, рисова лушпайка, солома), а також деякі рослини (очерет, стебла бавовнику та ін.). Підготовка такої сировини для мікробіологічного синтезу полягає в гідролізі целюлози до розчинних цукрів.

Торф по хімічному складу близький до рослин, з яких він утворився. У торфі малого ступеня розкладання присутні до 50 % полісахаридів. Після кислотного гідролізу за певних умов торф може стати джерелом моносахаридів, що легко засвоюються мікроорганізмами. Торф містить також азот і фосфор у доступній для мікроорганізмів формі.

Мікроорганізми можуть засвоювати вуглець газоподібних вуглеводнів : метану, етану, пропану й бутану. Промислове значення має метан, що міститься в природному газі.

Метилловий спирт (метанол) це безбарвна рідина, по запаху подібна до етилового спирту. Добре розчиняється у воді, легко засвоюється багатьма мікроорганізмами. Перспектива використання метилового спирту багато в чому залежить від ефективності способу його одержання.

Етиловий спирт (етанол) є перспективною сировиною для вирощування мікроорганізмів. Етиловий спирт добре змішується з водою, нетоксичний, одержувана на ньому біомаса не вимагає спеціального очищення. Як джерело вуглецю можуть використовуватися всі марки етилового спирту як мікробіологічного, так і хімічного виробництва. В етиловому спирті допускається присутність незначних кількостей ізопропілового спирту, сполук сірки, органічних кислот, складних ефірів, діетилового ефіру, нерозчинних у воді речовин.

Оцтова кислота зі змістом основної речовини не менш 60 %, а формальдегіду й мурашиної кислоти - не більше 1 % може бути використана як джерело вуглецю.

Джерела азоту. У виробничих живильних середовищах джерелами азоту можуть служити білки, пептиди, вільні амінокислоти. Найчастіше в

промисловій ферментації використовують кукурудзяний екстракт, соєве борошно або гідролізати дріжджів.

З мінеральних азотовмісних речовин найбільш часто застосовують амонієві солі сульфатної, хлористоводневої або нітратної кислоти.

Вплив джерел азоту на біосинтез залежить не тільки від самого джерела азоту, але й від загального складу середовища. Істотне значення має співвідношення азоту й вуглецю в середовищі - певне для кожного штамму-продуцента.

Кукурудзяний екстракт по зовнішньому виду представляє собою густу рідину від ясно-жовтого до темно-коричневого кольору з пластівчастою суспензією, або майже однорідну густу масу. Хімічний склад екстракту залежить від сорту кукурудзи, умов її вирощування, зберігання й сушіння, а також умов процесу замочування кукурудзи й коливається в широких межах. Вміст сухих речовин в екстракті повинний бути не менш 48 %. Загальний вміст азотовмісних речовин у перерахунку на сухий екстракт - від 40 до 50 % (6,4-8 % загального азоту). У процесі замочування відбувається ферментативний гідроліз білків кукурудзи, внаслідок цього біля половини азотовмісних речовин екстракту являє собою суміш амінокислот, поліпептидів і білків.

Вміст золи не повинний перевищувати 24 %. Основними елементами золи є фосфор, калій, магній. Загальний вміст фосфору в екстракті може досягати 5 %, частина його перебуває в органічно зв'язаному стані у вигляді фітину. Крім того, екстракт містить вітаміни групи В (біотин), деякі ростові речовини й біостимулятори. Таким чином, цінність кукурудзяного екстракту, як компонента живильного середовища визначається наявністю джерел органічного азоту, вуглецю й мікроелементів, відсутністю баластових речовин.

Соєве борошно одержують при розмелюванні соєвого зерна, а також соєвої макухи й шроту, що утворюються після витягу соєвого масла. Залежно від використовуваної сировини соєве борошно підрозділяється на незнежирене, напівзнежирене й знежирене. Крім того, соєве борошно буває дезодороване (оброблене паром) і недезодороване. Дезодороване соєве борошно може зберігатися протягом року, тому що при пропарюванні відбувається інактивація ферментів, а недезодороване 1,5-3 місяці. З основних частин соєвого борошна особливе значення для процесу ферментації мають білки. Основним білком є гліцин, що містить майже всі амінокислоти, причому в найбільшій кількості глютамінову кислоту (20%). Соєве борошно містить до 25 % вуглеводів, тому воно досить часто використовується як джерело вуглецю, 4,5-6,5 % золи. До складу золи входить близько 45 % оксиду калію, 30 % фосфорного ангідриду й 7,0 % оксидів магнію й кальцію, а також ряд мікроелементів. Фосфор перебуває в органічно зв'язаному стані у вигляді фітину (близько 75 %).

Нітрат амонію (аміачна селітра) - безбарвні кристали, добре розчиняються у воді з поглинанням теплоти. Водяні розчини мають кислу реакцію. Використовується як джерело азоту й для підкислення середовища.

Сульфат амонію добре розчиняється у воді з поглинанням теплоти. Зміст азоту 20-21 %.

Карбамід (сечовина) - висококонцентроване (46,5% азоту) джерело азоту. При використанні варто враховувати, що карбамід при термічній стерилізації руйнується.

Аміачна вода (гідроксид амонію) - безбарвна рідина з різким специфічним запахом, легко випаровується, отруйна. Використовується як джерело азоту й регулятор рН середовища. Аміачна вода I сорту містить не менш 25 %, а II сорту - не менш 20 % азоту.

Джерела фосфору. Як джерело фосфору широко використовуються фосфати амонію, які отримують нейтралізацією фосфорної кислоти аміаком. Найчастіше застосовують амофос, що являє собою суміш моно- і діамонійфосфатів, а також нерозчинних домішок (шламу). Вміст шламу в амофосі (до складу якого входять фосфати заліза, гіпс та ін.) становить 6-7 % до маси сухої речовини. Вміст водорозчинного фосфорного ангідриду залежно від сорту амофосу досягає 36-48 %. Перед введенням до складу живильного середовища розчин амофосу необхідно фільтрувати. Амофос є джерелом не тільки фосфору, але й азоту.

Ортофосфорна (фосфорна) кислота використовується як джерело фосфору й для підкислення середовища. Вміст P_2O_5 - 50,7 %.

Джерела макро- і мікроелементів.

Карбонат калію містить основної речовини 97,5-98 % (I сорт) і 92,5-93 % (II сорт). Сіль дуже гігроскопічна.

Сульфат калію містить основної речовини в товарному продукті залежно від сорту 46-50 %. Як домішки містяться KCl , $MgSO_4$ і інші солі.

Хлорид калію є економічно вигідним джерелом калію. Залежно від методу одержання розрізняють марки К (отриманого кристалізацією з розчину) і Ф (отриманий флотацією). Вміст основної речовини залежно від сорту 95-98%.

Сульфат магнію. Застосовують епсоміт $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ і кізерит $MgSO_4 \cdot H_2O$. До складу епсоміту входить 5-12 % $NaCl$, 0,5-1,0 % $MgCl_2$ і ряд інших солей.

Сульфат мангану. У виробництві звичайно застосовується $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ з вмістом основної речовини 98 %.

Сульфат заліза кристалізується з водяних розчинів у формі кристалогідрату $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, що називають залізним купоросом. Стандартний сульфат заліза є високоочищеним продуктом і містить мінімальну кількість домішок. У процесі зберігання у водяному розчині двовалентне залізо Fe^{2+} окислюється до тривалентного Fe^{3+} , що випадає в

нерозчинний осад $\text{Fe}(\text{OH})_3$. Для запобігання випадання заліза в осад розчин підкислюють до рН 2-2,5. Вміст основної речовини в технічній солі 47-53 %.

Сульфат цинку кристалізується з водяних розчинів у вигляді безбарвних ромбічних кристалів $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ і називається цинковим купоросом. Вміст цинку в солі 36-39 %.

Крім основних компонентів живильних середовищ у процесах ферментації нерідко використовують додаткові види сировини – попередники, поверхнево-активні речовини (ПАР), антибактеріальні препарати та ін.

Для підкислення живильних середовищ використовують хлористоводневу й сульфатну кислоти. Для підлужування середовища застосовують їдкий натр, крейду.

Як дезінфікуючий засіб використовують формалін, антиформін.

Антибактеріальні препарати (фурадонін, фурацилін) іноді додають в культуральну рідину в невеликих кількостях для підтримки асептичних умов.

1.2.3 Готування живильних середовищ

Кожний конкретний мікробіологічний процес має свої особливості на стадії готування живильних середовищ. Це пов'язане із джерелом вуглецю, яке застосовується у даному виробництві. На рис. 14 наведена загальна технологічна схема готування живильного середовища.

Розчинні джерела вуглецю (наприклад, цукор) попередньо розчиняють у воді, доводячи розчини до певної концентрації, у невеликих відкритих реакторах з мішалками, а потім подають у закритий реактор-змішувач із плоским дном і барботажним пристроєм для уведення пари .

Нерозчинні джерела вуглецю ретельно суспендують у воді в реакторі з мішалкою й переводять суспензію в реактор-змішувач.

Сировину, що містить крохмаль, попередньо клейстеризують.

Мінеральні солі розчиняють у реакторі з мішалкою, а перед подачею в реактор-змішувач фільтрують для виділення шламу (гіпс і інші нерозчинні осад). Розчин мікроелементів звичайно готується окремо.

У реакторі-змішувачі всі подані в необхідних кількостях компоненти ретельно перемішуються, рН середовища доводиться до необхідного значення подачею аміачної води або кислоти.

Реактори для готування живильного середовища повинні мати досить потужні мішалки, а також перегородки, що не допускають завихрення. Залежно від складу використовуваного живильного середовища вибирають тип пристрою, що перемішує, як в апаратах для підготовки різних джерел вуглецю, так і в самому реакторі-змішувачі для готування живильного середовища.

Підготовлене в реакторі-змішувачі живильне середовище має бути стерилізоване. Для стерилізації живильних середовищ використовують два

витримки й охолодження для ферментаторів великого об'єму досягає декількох годин.

Тривала теплова стерилізація приводить до певних хімічних змін у складі живильного середовища. Деякі нестійкі до нагрівання сполуки розкладаються, що приводить до втрати необхідних для мікроорганізмів живильних речовин. Інші сполуки можуть вступати у взаємодію між собою з утворенням продуктів, що гальмують ріст мікроорганізмів. Більшість змін хімічних компонентів у складі живильного середовища можуть відбуватися при температурах, більш високих, чим температура стерилізації. Отже ефективна стерилізація при мінімальній зміні складу середовища може бути досягнута застосуванням більш високої температури, швидким нагріванням і охолодженням середовища. Тому в цей час циклічний метод застосовують для стерилізації середовища тільки в апаратах малого об'єму. Метод високотемпературної безперервної стерилізації, використовуваний на більшості заводів, дає можливість звести до мінімуму погіршення живильних якостей середовища без зниження ефективності самої стерилізації.

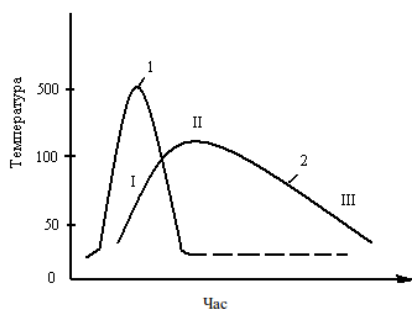


Рисунок 15 - Зміна температури елементарного об'єму рідини при безперервній (1) і періодичній (2) стерилізації

I - нагрівання; II - витримка;
III - охолодження.

На рисунку 15 показана зміна температури елементарного об'єму рідини при періодичній і безперервній стерилізації залежно від тривалості. Як видно з рисунка, при безперервній стерилізації можна значно скоротити час стерилізації, а отже, знизити витрати пари. Крім того, безперервна стерилізація легше піддається автоматизації.

На рисунку 16 представлена схема безперервної стерилізації в потоці. Приготовлене в окремій ємкості живильне середовище насосом прокачується через установку безперервної стерилізації в заздалегідь простерилізований ферментатор.

Застосування більш високих температур, чим при циклічній стерилізації, дозволяє різко скоротити тривалість витримування середовища при максимальній температурі, а періоди нагрівання й охолодження здійснити за кілька секунд (див. рис. 14).

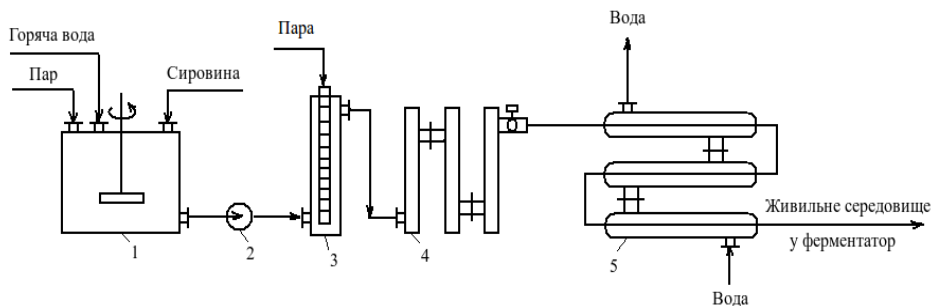


Рисунок 16 - Схема установки для стерилізації живильного середовища
1 - ємкість; 2 - насос; 3 - нагрівач; 4 - витримувач; 5 - холодильник.

Якщо живильне середовище не містить суспендованих часток, то температура 150-160 °С забезпечує миттєву стерилізацію. При наявності твердих часток у середовищі оптимальна для стерилізації температура повинна бути нижче, тому що потрібен більш тривалий час для прогрівання таких часток. У цьому випадку температура стерилізації становить 135 °С, а тривалість витримки – від 5 до 15 хв.

Установка безперервної стерилізації складається з послідовно з'єднаних апаратів: нагрівача, витримувача й холодильника.

Нагрівач - апарат призначений для швидкого нагрівання середовища до температури стерилізації при найменшій витраті пари. Конструкція нагрівача залежно від режиму роботи може бути різною. Найбільше поширення одержали нагрівачі у вигляді колони, парового інжектора, двотрубні (труба в трубі) і пластинчасті.

На рисунку 17 представлена схема нагрівальної колони для стерилізації живильного середовища. Зовнішня труба колони є корпусом, у яку поміщена внутрішня труба з прорізами у вигляді щілин. Пара подається зверху по внутрішній трубі й через щілинні прорізи надходить у середовище.

Живильне середовище подається знизу й рухається нагору по спіралі, завдяки наявності гвинтових напрямних. Час нагрівання середовища 10-15 с. Апарат відрізняється простотою, малими розмірами, але робота його супроводжується гідравлічними ударами при конденсації пари.

Витримувач - апарат для витримання живильного середовища при певній температурі стерилізації. Щоб кожний об'єм середовища перебував у витримувачі певний час, апарат повинен працювати за принципом повного витиснення. На рисунку 18 показаний трубчастий витримувач-стерилізатор. Він складається із трьох труб, з'єднаних послідовно перехідними штуцерами.

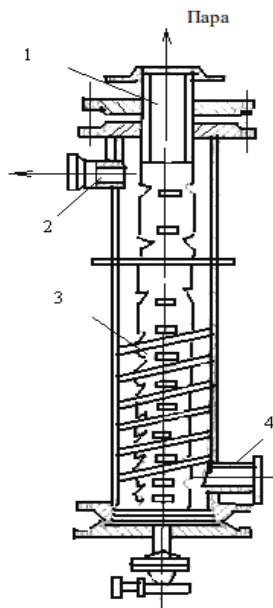


Рисунок 17 – Нагрівальна колона для стерилізації живильного середовища

1 – труба подачі пари; 2 – штуцер виводу нагрітого живильного середовища; 3 – гвинтові напрямні; 4 – штуцер подачі живильного середовища

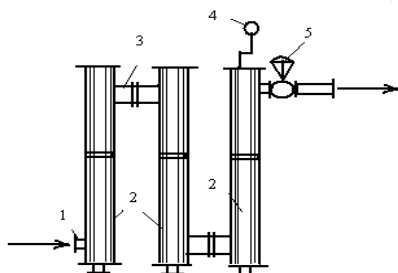


Рисунок 18 - Витримувач

1 - вхідний штуцер; 2 - труби; 3 - перехідний штуцер; 4 - манометр; 5 - автоматичний регулятор тиску

На вихідній трубці встановлений автоматичний регулятор тиску відповідно до температури стерилізації. Витримувач обладнаний манометром і термометрами.

Холодильник - апарат для охолодження живильного середовища після стерилізації.

Охолодження здійснюється за допомогою водопровідної води, що циркулює в сорочці. Застосовують холодильники пластинчастого типу або двухтрубні теплообмінники (типу труба в трубі). Теплообмінник повинен добре зберігати герметичність, тому що влучення води в стерильне середовище може викликати інфікування.

При культивуванні деяких мікроорганізмів іноді потрібно увести до складу живильного середовища компоненти, які через свою чутливість до нагрівання не можуть бути піддані тепловій стерилізації.

Ці компоненти стерилізують окремо, а потім асептично вносять у стерильне середовище. Для їхньої стерилізації застосовують опромінення або фільтрування через спеціальні фільтри.

1.2.4 Підготовка й стерилізація повітря

При вирощуванні аеробних мікроорганізмів у глибинних умовах потрібна безперервна подача повітря у ферментатори. Повітря, що подається у ферментатор, виконує кілька функцій: постачає мікроорганізми киснем; відводить газоподібні продукти обміну; відводить теплоту, виділену мікроорганізмами; створює однорідність суспензії маси мікроорганізмів; збільшує швидкість масопередачі й перемішування рідкого середовища.

Очищення повітря можна здійснити різними методами, заснованими на знищенні мікроорганізмів або на їхньому видаленні. Найефективніший метод стерилізації повітря - опромінення УФ-променями. Цей метод використовується для знезараження повітря в боксах.

Вітчизняний і закордонний досвід показує, що технологічно й економічно виправданим у промисловості є спосіб очищення повітря за допомогою волокнистих і пористих матеріалів. Таким шляхом вдається одержати повітря зі ступенем чистоти 99,999 %.

Принципова технологічна схема очищення й стерилізації повітря представлена на рисунку 19.

На першому етапі відбувається очищення атмосферного повітря від пилу і його стиск. Атмосферне повітря надходить через фільтр попереднього очищення 1 у компресор 2, де стискається до необхідного тиску (350-500 кПа). Для стиску повітря на підприємствах мікробіологічної промисловості найчастіше використовують турбокомпресори або поршневі компресори.

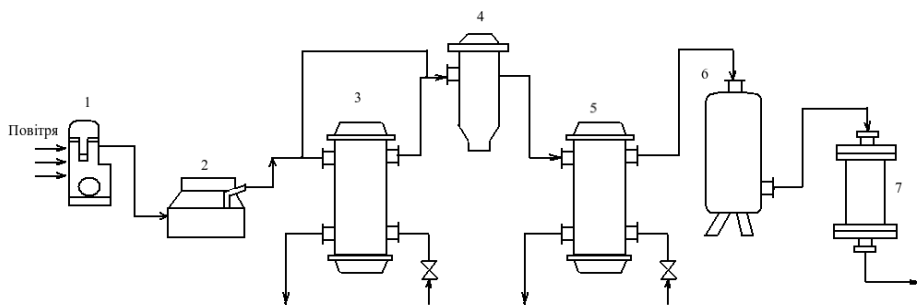


Рисунок 19 - Технологічна схема очищення й стерилізації повітря

1 - фільтр попереднього очищення повітря; 2 - турбокомпресор;
3 - теплообмінник-охолоджувач; 4 - вологовідділювач; 5 - теплообмінник-нагрівач; 6 - головний фільтр; 7 - індивідуальний фільтр

На другому етапі стиснене повітря необхідно підтримувати в оптимальному термодинамічному стані.

При стиску повітря нагрівається до 100-200 °С, тому його охолоджують у теплообміннику 3 до 25-30 °С. При охолодженні стисненого повітря конденсується наявна в атмосферному повітрі волога, яку відокремлюють у вологовідділювачі 4. Після відділення води повітря нагрівають до температури культивування мікроорганізмів у теплообміннику-нагрівачі 5. Далі повітря надходить у головний фільтр 6, де підтримується його оптимальна вологість і температура. У цьому фільтрі відбувається також і холодна стерилізація повітря, тому що разом із частками пилу відділяються й клітки мікроорганізмів.

На третьому етапі здійснюється остаточна стерилізація повітря в індивідуальному фільтрі тонкого очищення 7.

Фільтри попереднього очищення встановлюються на усмоктувальній лінії перед компресором. Принцип дії фільтра полягає в інерційному осадженні великих часток розміром більше 5 мкм. Між уловлювальними елементами фільтруючих матеріалів передбачаються більші проміжки для максимального зниження опору потоку повітря при високій швидкості фільтрування 1,5-3,0 м/с. Щоб сухі частки після осадження не виносилися з фільтра, шари його промаслюють. Тому такі фільтри називають масляними або вісциновими.

Фільтри попереднього очищення можуть бути періодичної й безперервної дії. До фільтрів періодичної дії відносять касетні відновлювальні масляні фільтри й касетні фільтри сухого типу.

Касетні відновлювальні масляні фільтри прості по конструкції, надійні в експлуатації, уловлюють мікроорганізми й частки пилу розміром більше 5 мкм. Такі фільтри затримують на поверхні насадки 92-99 % повітряного пилу. Тривалість їхньої експлуатації без регенерації залежить від ступеня забруднення повітря й становить від 80 до 800 год.

Касетні фільтри сухого типу складаються з 10-15 перфорованих металевих і вінілплатових шарів. Ефективність очищення повітря становить 70-85 %. У якості фільтруючих матеріалів в касетних фільтрах застосовують пінополіуретан, скляне або хімічне волокно, мати з нетканих матеріалів. У порівнянні з масляними в касетних фільтрах сухого типу немає віднесення масла, запаху.

Фільтри безперервної дії можуть бути трьох типів: масляні самоочисні, рулонні (котушкові) і волокнисті.

Самоочисні масляні фільтри складаються з безперервної фільтруючої стрічки, що при своєму русі проходить через ванну з маслом. При цьому забруднені ділянки стрічки відмиваються від пилу й промаслюються. Завдяки цьому повітря, що всмоктується у компресор, проходить через освіжену промаслену фільтруючу поверхню. Ступінь очищення повітря 90-98 %.

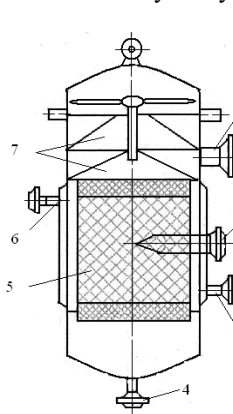
Рулонні (котушкові) фільтри являють собою просту конструкцію, у якій чистий фільтруючий матеріал з однієї котушки з певною швидкістю безупинно перемотується на іншу котушку.

Фільтруючим матеріалом служать пружні мати зі скляного або хімічного волокна. Строк безперервної роботи одного рулону 1 рік.

Волокнисті фільтри являють собою об'ємні мати з волокон полімерів, що промиваються водою з форсунок. У результаті електростатичного притягання на волокнах уловлюються дрібні частки пилу.

Фільтри грубого очищення (головні) застосовуються на другому етапі очищення й стерилізації повітря. Основне їхнє призначення - уловлювання забруднень, що залишилися після проходження фільтрів попереднього очищення, компресора й теплообмінників. Вони обслуговують декілька ферментаторів і називаються головними, тому, як правило, мають велику ємність.

Конструктивно головний фільтр являє собою вертикальну посудину з опорною решіткою біля днища (рис. 20). На решітку укладається шар скловати, потім шар гранульованого активного вугілля висотою 0,8-1,0 см і ще шар вати. Більш сучасну конструкцію й більшу продуктивність має



головний фільтр касетного типу.

Головні фільтри мають звичайно низький опір і високу пилеємність. На цих фільтрах віддаляється близько 98 % мікробів-контамінантів. Періодично (один раз на місяць) головні фільтри стерилізують гострою паровою випаровуванням за годину при тиску 0,12-0,15 кПа, а потім просушують сухим повітрям. Фільтруючий матеріал міняють через 6-8 місяців.

У головних фільтрах для грубого очищення використовують наступні фільтруючі матеріали:

- грубе базальтове волокно ВРВ (вертикальний роздув повітрям) з діаметром волокон 16 мкм і 26 мкм, товщина шару 1000 мм; волокно має високу паростійкість, не втрачає своїх властивостей при нагріванні до 1100°C, відрізняється механічною міцністю й високою пилеємністю;

- високооб'ємний нетканий фільтруючий матеріал, або тканина Каминської з діаметром волокон 16,9 мкм. Випускають у вигляді матів (шарів) товщиною 20-23 мм; особливістю цього матеріалу є те, що в прядильний розчин

Рисунок 20 - Головний аерозольний фільтр

1, 2 - штуцери виходу й входу повітря; 3 - штуцер виходу пари із сорочки; 4 - патрубок для зливу конденсату; 5 - обичайка фільтруючого елемента; 6 - штуцер для входу пари в сорочку; 7 - ущільнювальні плити.

при його виготовленні вводять антисептик гексахлорофен, тому фільтри, заповнені такою тканиною, не піддають стерилізації;

- склозрізи з діаметром волокна 6 мкм, товщиною шару 600 мм, термостійкістю 600 °С.

На фільтрах тонкого очищення здійснюється третій і останній етап очищення й стерилізації повітря на шляху до ферментатору, тому їхня робота повинна бути особливо надійною.

Конструктивно фільтри тонкого очищення багато в чому схожі на фільтри грубого очищення, тільки вони значно менше по розмірах і в них використовуються більш ефективні фільтруючі матеріали. Залежно від виду фільтруючого матеріалу застосовується касетна (фланцева) або патронна (гільзова) конструкція апарата (рисунок 21). У фільтрах касетної конструкції касети, у яких перебуває насадка з волокнистих матеріалів, стягаються болтами через отвори у фігурних фланцях.

У фільтрах патронної конструкції у якості матеріалу насадки застосовуються готові циліндричні фільтруючі елементи, які надіваються на порожній металевий перфорований вкладиш елемента фільтра. Елемент з'єднується зі штуцером, через який відводиться очищене повітря.

У касетних фільтрах тонкого очищення використовується готовий змінний фільтруючий елемент із базальтового супертонкого волокна. Найбільше поширення для тонкого очищення й стерилізації повітря знаходять конструкції, у яких використовуються швидко замінні готові стандартні фільтруючі патрони, у яких застосовують фільтруючі матеріали із фторопласта й металокераміки.

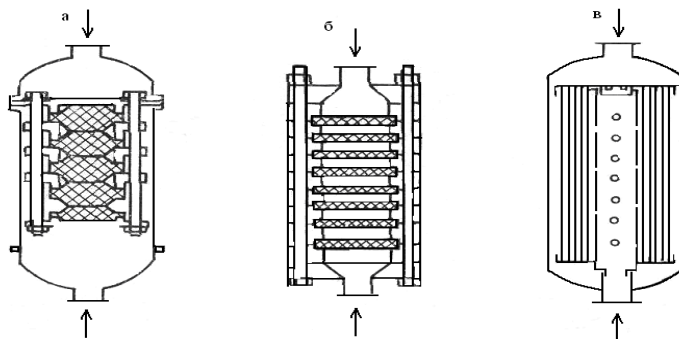


Рисунок 21 - Схеми аерозольних фільтрів, виготовлених з волокнистих матеріалів

а і б - фільтри касетної конструкції; в - фільтри патронної конструкції

Для стерилізації повітря рекомендують також мембранні фільтри з діаметром пор 0,45 мкм. Пористість мембран досягає 80 %. Видалення мікроорганізмів за допомогою мембран засновано на ситовому ефекті. Мембранам не потрібні високі перепади тиску, але для їхньої надійної роботи необхідно точне виконання умов стерилізації. Стерилізувати мембрани можна тільки насиченою водяною парою, від перегрітої пари в мембранах з'являються тріщини й вони виходять із ладу.

На рис. 22 представлена схема фільтра тонкого очищення ФТО-60, фільтруючим матеріалом у якому служить папір з базальтових супертонких волокон, гофрований базальтовий картон, фторопластові елементи й ін.

Якість фільтруючого матеріалу характеризує затримуюча здатність фільтрів S , %, яка визначається за формулою:

$$S = \frac{N_1 - N_2}{N_1} \cdot 100 \quad (14)$$

де N_1 – кількість мікроорганізмів у потоці атмосферного повітря, що подається на фільтр;

N_2 – те ж при виході з фільтра.

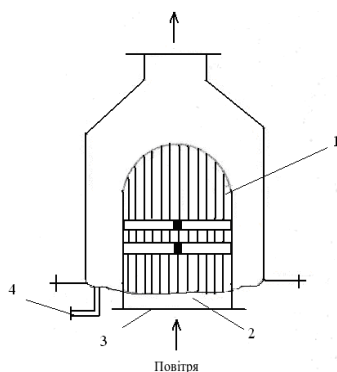


Рисунок 22 - Фільтр тонкого очищення ФТО-60

1 - фільтруючий елемент; 2 - кришка; 3 - фланець; 4 - патрубок для подачі пари на стерилізацію.

Якщо прилади реєструють відхилення температури на вході в головний фільтр 6, то спеціальні регулятори змінюють подачу пари в нагрівач 5 таким чином, щоб температура повітря відповідала заданій за регламентом.

Контроль ефективності дії фільтрів, особливо індивідуальних, записується аналізатором запиленості очищеного повітря. Прилад, який має високу чутливість (2-3 тис. часток розміром 0,3 мкм в 1 м³), дозволяє проводити контроль мікробіологічного забруднення повітря. Для стерилізації як фільтрів, так і повітряних трубопроводів застосовують гостру пару. Щоб знизити тиск пари на фільтруючі елементи, застосовують подачу пари у фільтр із двох сторін – на вході й виході повітряного трубопроводу. Пара повинна надходити чистою і сухою з температурою 120 °С при стабільному тиску.

На біотехнологічних заводах затримуюча здатність фільтрів повинна бути більше 99,99 %.

Стерилізацію фільтрів проводять гострою парою без витягування фільтруючих елементів з корпусу фільтра.

Фільтруючий матеріал в індивідуальних фільтрах міняють через 1-2 місяця.

Контроль процесу очищення повітря.

У системі очищення й стерилізації повітря для контролю й регулювання процесу встановлюються спеціальні прилади (рис. 22). Температура повітря контролюється на вході й виході холодильника 3, відносна вологість повітря й температура визначаються після нагрівача 5.

1.3 Ферментація

1.3.1 Технологічні особливості процесу ферментації

Під ферментацією розуміють процеси вирощування мікроорганізмів для різних цілей. Способи культивування мікроорганізмів відрізняються великою різноманітністю. Це пояснюється розходженням властивостей мікроорганізмів-продуцентів, які враховуються в першу чергу при створенні технології їхнього вирощування.

По технологічному оформленню розрізняють наступні мікробіологічні процеси:

- аеробне й анаеробне культивування;
- поверхнєве й глибинне культивування;
- періодичне й безперервне культивування.

Найбільше поширення в промисловості одержав процес глибинного культивування аеробних мікроорганізмів у рідкому живильному середовищі, на якому необхідно зупинитися докладніше.

Вирощування різних аеробних мікроорганізмів у глибинних умовах має ряд загальних особливостей.

Процес культивування протікає у складних багатофазних системах: газ-рідина-тверде тіло (клітини). У якості твердої фази може бути й нерозчинне у воді джерело вуглецю (наприклад, н-парафіни).

Життєдіяльність мікроорганізмів пов'язана з виділенням теплоти, тому в процесі культивування необхідно протягом тривалого часу підтримувати постійну температуру в повному об'ємі культуральної рідини.

Оскільки процес вирощування мікроорганізмів має потребу у великій кількості кисню, а він має низьку розчинність у культуральній рідині, необхідно забезпечувати безперервну подачу й відвід з апаратів великих об'ємів повітря.

У процесі ферментації, як правило, утворюється стабільна піна, що є небажаним, і її необхідно руйнувати.

У багатьох випадках протягом усього процесу ферментації неприпустиме попадання сторонньої мікрофлори в апарат, тобто необхідно тривалий час підтримувати стерильність процесу.

Зазначені загальні особливості мікробіологічних процесів, а також деякі інші, специфічні для конкретних культур мікроорганізмів, ураховуються при розробці конструкцій спеціальних апаратів для ферментації - ферментаторів.

1.3.2 Конструкції ферментаторів

Конструкція ферментатора повинна забезпечувати оптимальні умови для росту й життєдіяльності мікроорганізмів, які залежать від тепло- і масообміну.

Ферментатори являють собою закриті циліндричні посудини, постачені спеціальними пристроями: для подачі й диспергування повітря; для гомогенізації середовища; для піногасіння; для нагрівання й охолодження; запірною арматурою й контрольно-вимірювальними приладами.

Вибір конструкції ферментатора диктується як видом мікроорганізму-продуцента, так і кінцевим продуктом біосинтезу. За своїм призначенням ферментатори можуть бути лабораторними, напіввиробничими й промисловими. Принципово конструкції їх не різняться, але залежно від призначення ферментатори можуть мати різну місткість – від 0,001 м³ до декількох сотень кубічних метрів. Основний матеріал для виготовлення ферментаторів - легвана сталь. Лабораторні апарати можуть бути виготовлені зі скла.

Установки для поверхневого культивування мікроорганізмів.

При виробництві ферментів і органічних кислот дотепер широко застосовується культивування мікроорганізмів на поверхні рідких або сипучих середовищ. Культивування мікроорганізмів на сипучих середовищах (твердофазна ферментація) при виробництві ферментів здійснюється в кюветах, а також у різних механізованих установках. Схема однієї із сучасних установок для культивування в шарі сипучої сировини висотою 300-500 мм зображена на рис. 23.

Апарат являє собою вертикальну посудину циліндричної форми з конічним днищем, постачений сорочкою й змійовиками для охолодження культури; усередині розділений на кілька секцій горизонтальними перфорованими пластинами.

Субстрат перемішується за допомогою лопатевих мішалок, встановлених у кожній секції на вертикальному валу. Засіяне живильне середовище завантажують через верхній люк, а готову культуру вивантажують через нижній люк. Культура подається з верхніх секцій на нижні шляхом періодичного перекидання перфорованих пластин на 90° навколо горизонтальної осі. У кожен секцію під перфоровані пластини надходить стерильне повітря.

Перемішування сипучого субстрату в даному апараті дозволяє вести процес культивування в шарі субстрату 300-500 мм, (при вирощуванні в кюветах 20-30 мм). Це істотно підвищує питому продуктивність.

Барботажні апарати являють собою посудину, у нижній частині якої встановлений газорозподільний пристрій - барботер, призначений для подачі повітря для аерації. При необхідності апарат оснащують теплообмінним пристроєм у вигляді охолодної сорочки для охолодження. Барботер може бути виконаний у вигляді тонкостінної трубки або системи трубок, у стінках яких є отвори діаметром 0,3-2 мм. Найпоширеніші типи барботерів зображені на рисунку 24.

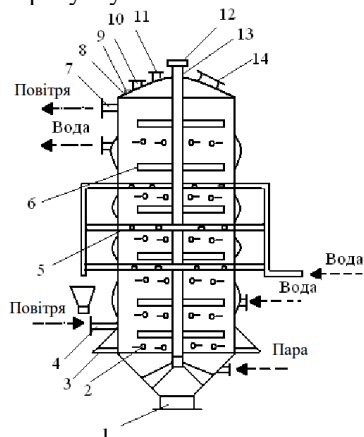


Рисунок 23 – Схема апарата для поверхневого вирощування мікроорганізмів:

1 - люк для вивантаження; 2 - валик секції; 3 - опора; 4 - колектор стерильного повітря; 5 - змійовик; 6 - лопата мішалки; 7 - колектор відпрацьованого повітря; 8 - кришка; 9 - бобишка манометра; 10 - штуцер; 11 - атмосферне повітря; 12 - шестірня привода вала; 13 - вал; 14 - люк для завантаження.

Основний недолік барботинних апаратів – низька швидкість сорбції кисню [1-2 кг/(м³·год)]. Цей недолік частково усувається при використанні апаратів колонного типу з великою висотою стовпа рідини. У них вище рушійна сила процесу масопередачі, збільшена інтенсивність мікро- і макроперемішування середовища пухирцями повітря, що приводить до зростання швидкості сорбції кисню.

Установки для глибинного культивування.

Конструктивні розходження ферментаторів визначаються в основному способом підведення енергії й аерації середовища. По цьому принципу ферментатори можна розділити на три групи:

- ферментатори з підведенням енергії до газової фази;
- ферментатори з підведенням енергії до рідкої фази;
- ферментатори з комбінованим підведенням енергії.

Ферментатори із приводом енергії до газової фази.

Апарати для глибинного культивування мікроорганізмів з уведенням енергії аеруючим газом застосовуються дуже давно. Загальною рисою всіх апаратів цієї групи є відсутність елементів, що рухаються; культуральна рідина перемішується за рахунок енергії стисненого повітря, яке подають в апарат через барботер або інший пристрій. До ферментаторів з уведенням енергії газовою фазою відносять: барботинні, барботинно-ерліфтні, колонні й деякі інші.

Масообмінні характеристики барботинних апаратів істотно залежать від конструкції газорозподільного пристрою й властивостей ферментаційної рідини. З метою інтенсифікації масообмінних процесів барботажні ферментатори оснащують додатковими елементами: циркуляційними контурами, контактними пристроями й ін.

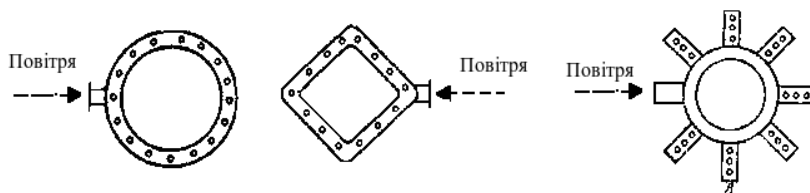


Рисунок 24 - Типи барботерів
а - кільцевий; б - квадратний; в - променеий

Барботинні апарати з контактними пристроями

Контактні пристрої являють собою нерухливі елементи різної форми (перегородки, тарілки та ін.). Вони призначені для збільшення поверхні контакту газової й рідкої фаз, отже, для підвищення швидкості масопередачі в системі газ - рідина й рідина - газ. Інтенсифікація процесу масопередачі в апаратах з контактними пристроями досягається за рахунок додаткового диспергування газових пухирців, формування раціональної структури потоків газорідинної емульсії, збільшення тривалості перебування пухирців газу в рідині й ін.

Апарати з дифузorzом (ерліфтним аератором).

Найбільш широко поширені з апаратів цієї конструкції дріжджерастильні апарати конструкції Лефрансу (рис. 25).

Ферментатор має внутрішній циліндр – дифузorz, що забезпечує циркуляцію рідини. Повітря по повітряпроводу подається через щілини кільцевого аератора, а живильне середовище в кювету, розташовану над аератором. Плівка рідини, переливаючись через край кювети, зустрічається з потоком повітря, що виходить із щілини аератора. У результаті утворюється пінна емульсія, щільність якої менше щільності рідини, і вона піднімається нагору по дифузorzі. Угорі частина повітря відділяється від емульсії пінни й виводиться з апарата. Рідина разом з піною, що залишилася, рухається униз по кільцевому просторі між корпусом апарата й дифузorzом. Відвід теплоти здійснюється охолодженням зовнішньої стінки. Перевагою конструкції є те, що у ферментаторі немає механічного перемішування й механічного піногасіння. До недоліків можна віднести досить високі витрати повітря.

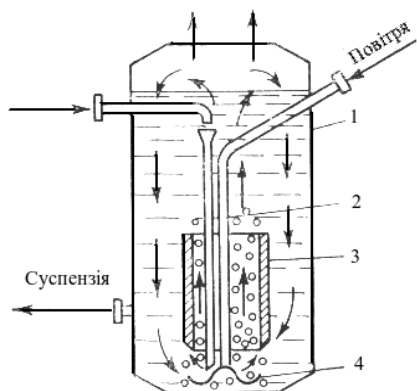


Рисунок 25 - Ферментатор системи Лефрансу

1 - корпус апарата; 2 - повітряпровід; 3 - дифузор; 4 - кювети.

Апарати даної групи широко експлуатуються в дріжджовому виробництві, а також у виробництві амінокислот і антибіотиків.

Трубчастий ферментатор (гідропневматичний) складається з реактора кожухотрубного типу й сепаратора, з'єднаних між собою циркуляційними трубами (рис. 26).

У нижній частині реактора є повітряна камера, куди подається стиснене повітря. З повітряної камери повітря надходить у трубки-барботери діаметром 4 мм і рухається з великою швидкістю нагору по трубах діаметром 56 мм разом з рідиною, що захоплюється їм. У верхній камері реактора частина повітря відділяється від рідини й виводиться з реактора, а рідина опускається униз по тим трубам, у які повітря знизу не надходить.

Піна з верхньої частини реактора надходить у сепаратор, де гаситься відцентровим піногасником. Рідина, що утворилася в результаті гасіння піни, проходячи через циркуляційні труби, вертається до низу реактора, де знову захоплюється повітрям і піднімається нагору. У результаті у ферментаторі створюються два контури циркуляції - зовнішній і внутрішній.

У міжтрубний простір реактора подається вода для охолодження.

Перевагою конструкції є відсутність застійних зон, однорідна турбулентність у всіх трубах, герметичність.

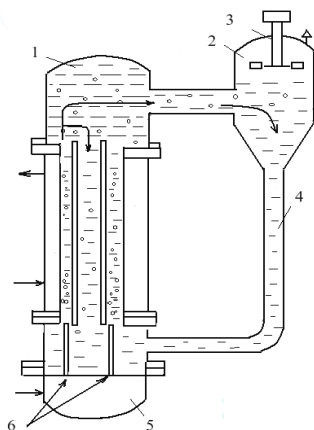


Рисунок 26 – Гідропневматичний ферментатор

1 - реактор кожухотрубний; 2 - сепаратор; 3 - механічний піногасник; 4 - циркуляційна труба; 5 - повітряна камера.

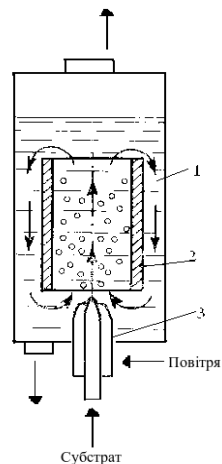


Рисунок 27 – Ферментатор з форсуночним розподілом повітря

1 - корпус апарата; 2 - дифузор; 3 - форсунка.

Ферментатор з форсуночним розподілом повітря.

Основна конструктивна особливість апаратів - це форсунки для подачі стисненого повітря. Форсунки кріпляться в днище апарата, а над форсункою встановлюється дифузор (рис. 27). Повітря, виходячи з форсунки з певною швидкістю, диспергується в культуральній рідині. Більш легка повітряно-рідинна емульсія піднімається нагору по дифузوری, де частина повітря відділяється від рідини, яка, маючи більшу щільність, опускається униз по просторі між стінками корпусу й дифуззором. За рахунок руху струменя повітря біля отворів форсунок створюється розрідження, що забезпечує підсмоктування свіжих порцій культурального середовища.

Різновидом таких апаратів є ферментатори з конічним днищем, що мають одне або кілька отворів для установки сопла або форсунки. Ці ферментатори одержали назву сопло-конусних. Стиснене повітря подається через сопло й диспергується в культуральній рідині. Біосинтез протікає в таких апаратах в основному в пінному шарі. Сопло-конусні ферментатори входять у комплект лабораторних установок для культивування мікроорганізмів.

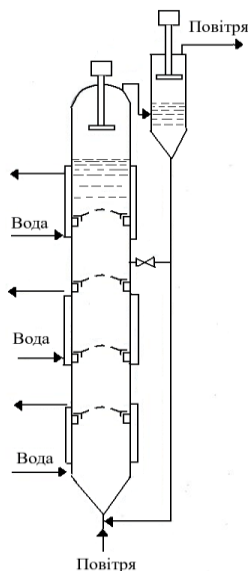


Рисунок 28 - Колонний ферментатор

Ферментатор колонного типу являє собою циліндричну колону, розділену горизонтальними перегородками на секції (рисунок 28). Кожна секція може мати самостійну систему охолодження, контролю. Основне розходження між ферментаторами такого типу полягає в конструкціях перегородок, які називають тарілками. Тарілки можуть бути плоскими або сегментними, сітчастими, ковпачковими, з радіальними щілинами та ін.

Повітря, що подається в низ колони, збирається під кожною тарілкою й барботує через шар рідини на тарілці. Культуральна рідина перетікає униз по кільцевій щілині між бортом тарілки й корпусом апарата. У такий спосіб створюється протиток руху повітря й рідини.

На кожній тарілці досягається відновлення поверхні контакту фаз.

Колонні апарати широко застосовуються для процесів безперервного культивування.

Ферментатор з добавками гранулята являє собою циліндричну посудину, яка заповнена гранулятом - твердими частками певного розміру (рисунок 29). Повітря під тиском подається знизу через круговий барботер.

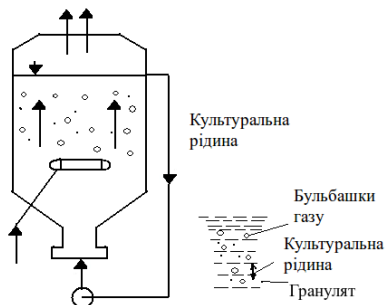


Рисунок 29 - Ферментатор з добавками гранулята

Живильне середовище і циркулююча культуральна рідина також подаються до низу апарата. Повітря, виходячи з барботера, захоплює за собою рідину й частки гранулята.

Пухирці повітря, зіштовхуючись із твердими частками гранулята, руйнуються, у результаті чого в цих мікрообластях спостерігається падіння швидкості плинину рідини, а мікроорганізми, що втримуються в них, постійно вступають у контакт зі свіжим живильним розчином.

Гранулят повинен бути хімічно інертним, мати певну щільність, ударостійкість та ін. У ферментаторах із гранулятом накопичується більше біомаси, чим у ферментаторах без добавок.

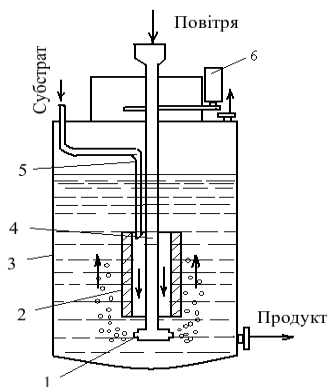


Рисунок 30 - Ферментатор із самоусмоктувальною системою аерації

1 - порожні лопати аератора; 2 - дифузор; 3 - корпус апарата; 4 - повітропровід; 5 - труба подачі субстрату; 6 - привод мішалки.

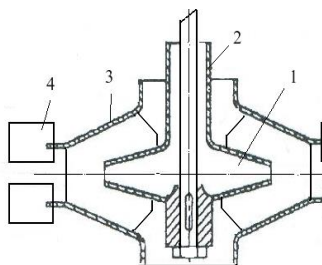


Рисунок 31 - Самоусмоктувальна мішалка

1 - повітряна порожнина; 2 - патрубок для підводу повітря; 3 - турбіна; 4 - лопатки.

Ферментатори з підведенням енергії до рідкої фази

Ферментатором цього типу є апарат із самоусмоктувальною турбіною.

У корпусі апарата встановлений циліндричний дифузор, а під ним з невеликим зазором мішалка у вигляді закритої турбінки з радіально розташованими порожніми лопатами (рис. 30). Турбіна (рис. 31) насаджена на порожній трубчастий вал, верхній кінець якого сполучається з повітряним простором над ферментатором. Завдяки обертанню усередині лопаток мішалки створюється розрідження, і повітря засмоктується через порожній вал з верхньої частини апарата або зовні.

Самоусмоктування достатньої кількості повітря досягається при глибині рідини не більше 1,5-2 м.

Самоусмоктувальний аератор одночасно перемішує рідину.

Рідина разом з піною відкидається до периферії й піднімається нагору між стінками дифузора й апарата й переливається через верхній край дифузора. Тепло відводиться охолоджувальною водою, що пропускається через установлені в апараті змійовики. Якщо в промислових апаратах висота рідини в апараті більше 2 м, то повітря подається примусово вентилятором або компресором.

Струминний ферментатор також можна віднести до апаратів з підведенням енергії до рідкої фази, тому що енергія витрачається на роботу насоса, що подає рідину у верх апарата.

Ферментатор являє собою колону, у корпусі якої розташовані одна над одною секції, з'єднані зливальними трубами (рис. 32). Культуральна рідина циркуляційними насосами подається у верхню секцію колони й по зливальних трубах стікає в нижче розташовану секцію. При русі струменя рідини створюється розрідження, за рахунок чого захоплюється повітря, що надходить через газоувідну трубу. Повітря разом зі стікаючою рідиною надходить у нижню секцію. Завдяки цьому досягається висока турбулентність, тонка дисперсія газу, тривале перебування газу в середовищі. Ферментатори такої конструкції можуть бути досить великого об'єму.

Апарати з комбінованим підведенням енергії

У ферментаторах цього типу енергія підводиться до рідкої фази за допомогою пристрою, що перемішує, і до газової фази шляхом примусової подачі повітря. Такі апарати мають гарні характеристики масообміну, і в них можна порівняно легко варіювати режим перемішування й масообміну. Вони найбільше широко застосовуються у виробництві продуктів мікробного метаболізму (амінокислот, ферментів, антибіотиків), рідко - у виробництві кормових дріжджів.

На рис. 33 зображений такий ферментатор об'ємом 100 м³.

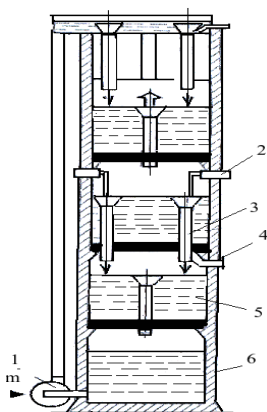


Рисунок 32 - Струминний ферментатор

1 - циркуляційний насос; 2 - газоувідна труба; 3 - зливальна труба; 4 - патрубок скидання повітря; 5 - секція; 6 - корпус колони.

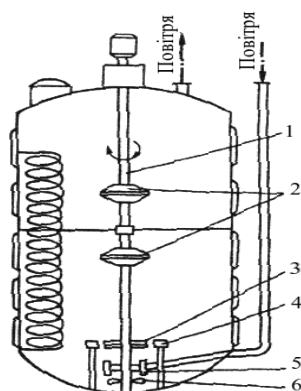


Рисунок 33 - Схема ферментатора з комбінованим підведенням енергії

1 - вал; 2,3,6 - мішалки; 4 - статор; 5 - барботер.

Це циліндрична посудина з розділеною на секції охолоджувальною сорочкою й змішувачами для відводу теплоти, що утвориться при рості мікроорганізмів. На кришці апарата встановлений електродвигун потужністю 120/180 кВт із редуктором. На валу встановлені чотири мішалки різних типів. Унизу, у самого днища ферментатора, розташована мішалка пропелерного типу, трохи вище - закрита турбінна мішалка із криволінійними лопатами й статором, а потім - дві закриті турбінні мішалки із прямими лопатами. Повітря подається в апарат примусово через трубчастий барботер знизу.

Ферментаційна рідина в такому апараті перемішується за допомогою мішалки й пухирців поступаючого через барботер повітря, що рухаються нагору.

Мішалки забезпечують також додаткове диспергування повітря, сприяючи збільшенню поверхні контакту фаз і коефіцієнта масопередачі. Змінюючи частоту обертання мішалки (у даному апараті 120 або 180 хв⁻¹) і витрати подаваного повітря, можна в досить широких межах варіювати швидкість масопередачі.

1.3.3 Контроль процесу ферментації

Основні показники, що характеризують ферментаційний процес, наступні.

Фізичні: температура, тиск, частота обертання мішалки, піноутворення, швидкість потоку газу, швидкість потоку середовища, в'язкість і ін.

Хімічні параметри: рН, окислювально-відновний потенціал, концентрація газових середовищ у іоносуспензії й склад газу на виході з біореактора, концентрація компонентів живильного середовища

Біологічні параметри: вміст цільового продукту, біохімічна активність культури (оцінка РНК, АТФ і ін.).

Для виміру фізичних параметрів є велика кількість промислових приладів, що забезпечують необхідну точність. Витрата вхідних і вихідних потоків контролюється, виходячи з рівняння матеріального балансу.

Хімічні параметри:

- водневий показник вимірюють за допомогою рН-метрів з надійністю 98 %;

- для аналізу вмісту розчиненого кисню звичайно використовують мембранні датчики, що містять два електроди в електроліті, відділеному від потоку біосуспензії мембраною із кополімеру етилену й пропілена; недолік такого датчика, як і будь-як мембранного, полягає в можливості механічного ушкодження й забруднення мембрани;

- мембранні датчики використовують також для виміру розчиненого CO₂;

- для визначення концентрації кисню в потоці газів, що відходять, застосовуються парамагнітні аналізатори. Мінімальна погрішність вимірів (3

%) досягається використанням двох парамагнітних датчиків, встановлених у термостатичній посудині; на один з датчиків подається потік еталонного газу;

- вміст CO_2 у потоці газів, що відходять, визначається по величині поглинання інфрачервоного світлового пучка й методами мас-спектроскопії.

Біологічні параметри найбільш важко піддаються виміру, оскільки вони, в основному, визначаються в ході складних біохімічних реакцій. Тому для оцінки біологічних параметрів використовуються непрямі характеристики: в'язкість біомаси, оптична щільність, мутність та ін.

Для визначення концентрації біомаси використовують капілярний віскозиметр із попереднім підігрівом і періодичним калібруванням еталонним розчином.

Для визначення концентрації одноклітинних організмів у культуральній рідині успішно використовуються оптичні пристрої, зокрема, датчик, що дозволяє робити безперервний вимір оптичної щільності біосуспензії в реальному масштабі часу. Відмінною рисою приладу є можливість автоматичного розведення біомаси за допомогою спеціальної циліндричної кювети, що містить прозору трубку з дистильованою водою. Для визначення діапазону вимірюваних концентрацій є набір знімних кювет. Такі датчики використовують для виміру концентрації лимонної кислоти.

Для виміру мутності біосуспензії у ферментаторі встановлюють дзеркало, на яке падає світловий пучок, переданий від джерела світла по світловому волокну. Відбитий світловий пучок надходить на фотоелемент. Для збільшення точності вимірів оцінка концентрації визначається по різницевому сигналу, отриманому при різних зсувах дзеркала.

Широке поширення одержали датчики концентрації біомаси, засновані на вимірі електричних властивостей біосуспензії. Принцип роботи заснований на вимірі провідності суспензії мікроорганізмів.

Недоліком зазначених датчиків є неможливість проведення виміру безпосередньо у біореакторі. Для усунення цього недоліку запропоновано використовувати датчик, що складається із двох поміщених у ферментер циліндрів, усередині яких є електроди.

Одним з найбільш перспективних напрямків в області розробки контрольної вимірювальної апаратури для керування біосинтезом є створення датчиків із чутливими елементами, що містять біологічно активну речовину, так званих біосенсорів і біозондів. Застосування для аналітичних цілей біосенсорів і біозондів на основі іммобілізованих ферментів, а також цілих клітин мікробного, рослинного й тваринного походження дозволяє істотно скоротити час аналізу й відкриває можливість повної автоматизації керування й контролю біотехнологічними процесами. Використання біосенсорів і біозондів найбільше ефективно у ферментативній технології, клінічній біохімії.

Принцип роботи біозондів заснований на специфічних реакціях, у яких бере участь біологічно активна речовина чутливого елемента (як

біологічно активну речовину використовують ферменти, багатоферментні системи, антитіла, органели, бактеріальні клітки, ділянки тканин), безпосередньо пов'язана з перетворювачем. У результаті реакцій змінюються якісь фізико-хімічні параметри: виділяються або поглинаються гази (O_2 , CO_2 , NH_3), виділяється тепло, змінюється електропровідність – і перетворювач виробляє відповідний електричний сигнал. Біосенсори можуть розроблятися на основі будь-якої ферментативної реакції, що супроводжується зміною рН, концентрації O_2 , CO_2 , виділенням тепла, випромінюванням світла й ін.

Проблема створення надійного контакту між біохімічно активним чутливим елементом і перетворювачем - одна з основних проблем в області створення біосенсорів. Звичайно біологічно активна речовина закріплюється на поверхні перетворювача хімічним шляхом або механічним за допомогою мембрани. При цьому залежно від товщини активного шару, проникності мембрани й інших факторів час відгуку перебуває в інтервалі 1-10 хв.

Залежно від способу передачі сигналу від перетворювача розрізняють потенціометричні, амперметричні, оптичні й інші біосенсори. Потенціометричні біосенсори містять газочутливий або іоночутливий електрод з іммобілізованим ферментом. Зокрема, широко використовуються електроди, що реагують на кисень. У цей час відомо більше 50 оксидаз, що беруть участь у реакціях з жирними кислотами, сахарами, амінокислотами, стероїдами, які проходять зі споживанням кисню.

Розроблено біосенсори, що реагують на глюкозу, вітамін B_1 , ністатин. Застосування в потенціометричних датчиках електродів, чутливих до зміни вмісту іонів, дозволило істотно розширити область застосування біосенсорів і використовувати їх для виміру концентрацій різних ферментів і коферментів.

Основний недолік розроблених біосенсорів - складність їхньої установки в потоці біомаси, що виключає використання біосенсорів у реальному масштабі часу, істотно обмежує їхнє використання в промислових умовах.

Інтенсивний розвиток засобів вимірювання і широке впровадження комп'ютерного керування технологічними процесами - один з найбільш перспективних напрямків біотехнології.

1.3.4 Регулювання піноутворювання

У процесі вирощування аеробних мікроорганізмів, що супроводжується подачею повітря у ферментатор і перемішуванням середовища, спостерігається сильне піноутворювання. Виникнення піни в процесі біосинтезу обумовлено введенням газової фази, а також вмістом у середовищі живильних субстратів, солей, продуктів метаболізму мікроорганізмів і поверхнево-активних речовин (ПАР).

Наявність піни у ферментаторі, з одного боку, прискорює розчинення кисню повітря за рахунок збільшення поверхні масообміну, а з іншого, різко знижує кисний об'єм апарата, приводить до викиду піни, збільшує

небезпеку зараження сторонньою мікрофлорою. Коефіцієнт заповнення ферментаторів становить 0,5-0,6. Вільний простір використовується для компенсації підвищення рівня середовища за рахунок збільшення вмісту газів, що звичайно не перевищує 10 % об'єму, і для регулювання рівня піни. Від ефективності способів піногасіння залежать такі технологічні показники, як вихід продукції з 1 м³ культуральної рідини і її собівартість. Боротьба з піноутворенням - одне з важливих завдань у мікробіологічному виробництві.

Якщо швидкість подачі газу у ферментаторі вище швидкості природного підйому пухирців в об'ємі рідини, то відбувається нагромадження газу в поверхневому шарі у вигляді піни. Стійкість пухирців піни в чистих рідинах дорівнює нулю внаслідок малої міцності рідкої плівки, що оточує пухирці. У культуральних же рідинах присутні мікроорганізми, різні розчинені речовини (компоненти харчування й продукти метаболізму), тому завжди утворюються порівняно міцні шари піни. Поверхня розділу рідини - газ має достатню міцність, і при безперервній аерації можливий перехід всієї культуральної рідини у стан піни.

Динамічна піна при безперервній ферментації являє собою сукупність безперервно протікаючих процесів виникнення й руйнування окремих пухирців, що становлять єдине ціле з живильним субстратом.

У цей час є різноманітні засоби як для руйнування піни, так і для попередження її утворення. Щоб попередити утворення піни в процесі культивування:

- можна видалити піноутворювачі з вихідного живильного середовища вводячи в нього адсорбенти (активне вугілля, іоніти), які зв'язують білкові піноутворювачі;

- при складанні живильного середовища доцільно вибирати такі компоненти, які мають меншу схильність до піноутворення; на піноутворення деяких живильних середовищ впливають не тільки состав, але й умови обробки: температура, тривалість стерилізації й кількість внесеного посівного матеріалу. Це необхідно враховувати при відпрацьовуванні технології біосинтезу. Однак повністю уникнути утворення піни в процесах мікробіологічного синтезу все-таки не вдається.

Для регулювання рівня піни у ферментаторах застосовуються різні способи - хімічні, механічні, фізичні й комбіновані.

Хімічний спосіб піногасіння полягає в додаванні в культуральні середовища ПАР, що послабляють поверхневі плівки піни. Основне призначення піногасника - поділ (руйнування) газорідної системи з утворенням двох фракцій: газу й рідини. Механізм дії хімічного піногасника полягає в тім, що він, будучи поверхнево-активною речовиною, витісняє піноутворювач із поверхневого шару пухирців піни.

Хімічні засоби піногасіння діляться на природні й синтетичні. Із природних в основному використовуються різні рослинні масла (соняшникове, соєве, кукурудзяне, арахісове, оліїнове) або тварини жири

(кашалотовий жир, кістковий жир, технічний жир). Ці речовини діють не тільки як піногасники, але й беруть участь в обміні речовин і стимулюванні життєдіяльності мікроорганізмів.

Найбільш істотні недоліки натуральних піногасників - їх порівняно більші витрати (0,5-2,0 % до об'єму середовища), висока вартість, а також негативні наслідки при виділенні цільових продуктів (погіршення фільтрування, екстракції та ін.

До синтетичних піногасників відносяться ПАР з гідрофільною групою, що визначає характер електролітичної дисоціації цих речовин у живильному середовищі. Застосовуються, наприклад, кремнійорганічні полімери (силоксани), чотиризамісні амонієві основи, алкіламіносальфонати, складні ефіри, спирти. Найбільш поширені поліорганосилоксани, які незважаючи на високу вартість мають ряд переваг перед іншими піногасниками: низький вміст в оброблюваному продукті, нелетучість, можливість застосування при високих температурах, хімічна інертність, стійкість до окислювання, відсутність токсичності. Добавка піногасників у живильне середовище в процесі культивування, як правило, супроводжується зниженням виходу продукту. Пояснюється це тим, що динамічна піна сприяє кращому розчиненню кисню в середовищі, а хімічні піногасники, зменшуючи піну, перешкоджають кисневому харчуванню аеробних мікроорганізмів. Однак відомі й інші результати. Так, добавка ПАР, приготовлених з поліпропілену, у середовище на основі вуглеводнів сприяє збільшенню швидкості абсорбції кисню культуральною рідиною й дозволяє на 15-20 % збільшити концентрацію вуглеводнів і тим самим підвищити продуктивність біотехнологічного процесу на 10-15 %.

Основним недоліком хімічного способу гасіння піни є адсорбція піногасника на пухирцях повітря, що подається на аерацію. Хімічні піногасники утрудняють як швидкість дифузії кисню в середовищі, так і швидкість виділення з неї розчинених газів. Крім того, застосування хімічних піногасників пов'язане з високими витратами, які становлять до 10 % від загальної собівартості.

Механічний спосіб піногасіння є після хімічного способу найбільш простим і досить ефективним.

Відомі різні типи механічних піногасників: циклони, рідинно-струминні, відцентрові тарілчасті, дискові, роторні. Механічні піногасники розділяються на активні, тобто ті, що мають обертовий (рухливий) робітничий орган, і пасивні - нерухливі.

В активних механічних піногасниках руйнування осередків піни відбувається за рахунок силового (ударного) впливу поверхонь робочого органа, поміщення піни в поле дії відцентрових сил, що виникають при обертанні робочого барабана.

У пасивних механічних піногасниках руйнування піни здійснюється за рахунок інерційних навантажень і перепадів тиску, що виникають у потоці

піни при її русі в каналах піногасника. Пасивні механічні піногасники (циклони, лабіринти, спірали) мають малу ефективність, призначаються для обробки малостійкої піни.

До числа найпростіших конструкцій активних механічних піногасників відноситься гладкий диск-ротатор, що швидко обертається. При його використанні витрачається мінімальна кількість електроенергії й знижується до мінімуму вторинне піноутворення. Поширене також застосування диска із прямими радіальними лопатками. Якщо на диск подавати насосом культуральну рідину, то виходить струминне піногасіння. При механічному способі руйнування піни швидкообертаючимися дисками або турбінами основними руйнівними силами прийнято вважати відцентрові, що зрізують і всмоктують. Ефективність руйнування піни залежить від частоти обертання механічного піногасника, його діаметра й, отже, від окружної швидкості.

Відцентровий тарілчастий піногасник являє собою конструкцію, виконану у вигляді посадженого на вал більшою основою униз усіченого конуса із вмонтованими всередині нього радіальними перегородками й пакетом конічних тарілок. При роботі механічних тарілчастих піногасників з відкритим пакетом руйнування піни відбувається за рахунок ударної дії у обертових поверхнях. Недоліком цих конструкцій є утворення дрібнодисперсної піни, яка взаємодіє з піною навколо піногасника і викликає вторинне піноутворення, що знижує продуктивність піногасника й приводить до «захлинання».

Руйнування піни під дією відцентрової сили відбувається в розділових насосах. Принцип роботи розділового насоса полягає в тім, що піна з ферментатора надходить на перший шабель насоса, де під дією відцентрової сили розділяється на рідину й газ. Рідина, маючи більшу щільність, розташовується по периферії робочого колеса й виводиться з насоса, а газ і непогашена піна від центральної частини робочого колеса йдуть на другий шабель насоса, де відбувається остаточний поділ пін на рідину й газ. Обов'язкова умова ефективної роботи насоса - рівномірне навантаження по піні, інакше порушується режим поділу.

Найкращий ефект піногасіння досягається при сполученні механічних і хімічних методів.

Піна з ферментатора по патрубку надходить у циклонний пристрій і сепарується в кільцеподібному лабіринті між корпусом і спеціальним вставним циліндром. Рідина, що утворилася, стікає в нижню конічну частину циклона й вертається у ферментатор. Непогашена в лабіринті піна гаситься усередині циліндра ротором, що приводиться в обертання електродвигуном. Піна, що залишилася, руйнується хімічним піногасником, що подається на обертовий диск, який сприяє його диспергуванню в пінній емульсії. Пристрій може бути приєднаний до ферментатора зовні, як показано на рис. 26, або вмонтований всередині нього.

Піногасіння за допомогою струменя рідини полягає в розбризкуванні ферментаційного середовища або свіжого живильного середовища над поверхнею пінного шару. Цей прийом до деякої міри сприяє піногасінню. Подача рідини здійснюється насосами, а розбризкування - через механічні форсунки різної конструкції.

Для завихрення пінних шарів іноді застосовують потік повітря. Піногасіння забезпечується струменем повітря, що утворює вир на поверхні рідини, у результаті чого піна увесь час підтримується на заданому рівні.

Різка зміна тиску у газорідинній системі в певних умовах може привести до часткового або повного руйнування пінних пухирців. Для цього в техніці застосовують вакуумування, камери перепаду тиску. Так, для дегазації застосовують труби, що мають спеціальні вузькі щілини, виконані перпендикулярно до осі труб. Швидкість руху піни через щілини більша, у результаті відбувається інтенсивна дегація, що підсилюється під дією великого перепаду тиску. Повторного піноутворення не спостерігається.

З фізичних методів піногасіння найбільше широко досліджені процеси, засновані на використанні ультразвуку, температурного перепаду, електричного розряду та ін.

Руйнування піни під дією ультразвуку відомо давно. Механізм ультразвукового руйнування піни можна пояснити періодичною руйнуючою дією хвиль, що поширюються, ненаправленим звуковим тиском, резонансною вібрацією й виникаючою турбулентністю під дією ультразвуку. Цей метод для гасіння великих кількостей піни, імовірно, виявиться економічно не вигідним.

Термічний ефект для піногасіння застосовується порівняно рідко. Піна, стикаючись із гарячою поверхнею, звичайно руйнується. Така дія обумовлена, очевидно, випаровуванням. Після того як достатня кількість рідини виділиться зі стінки пухирця, він руйнується. У промислових апаратах піна часто послабляється або взагалі не виникає, якщо над поверхнею рідини розміщується паровий змійовик. Але в цьому випадку розчинена речовина часто відкладається на поверхні, що гріє, що небажано. У мікробіологічній промисловості застосування термічних піногасників обмежується чутливістю багатьох мікроорганізмів до високої температури.

Електричне поле може послабляти або руйнувати піну. Запропоновано способи піногасіння, у яких використовують коронний розряд або обробку піни між двома електродами.

Розроблено методи руйнування піни за допомогою α -частинок. Однак вплив електричного поля й, особливо, α -частинок на мікроорганізми ще мало вивчено, тому застосування їх у мікробіологічній технології обмежено.

Автоматизація систематичного спостереження за рівнем піни й своєчасне використання засобів піногасіння дозволяє не тільки вести ритмічно процес біосинтезу, але й полегшити труд апаратників по обслуговуванню ферментаторів.

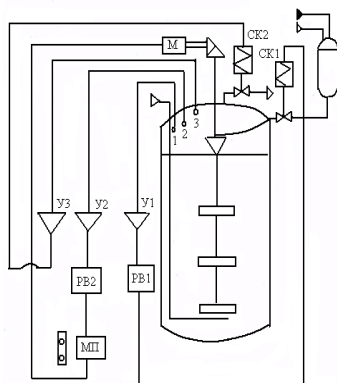


Рисунок 34 - Схема автоматичного піногасіння

1 - дозування хімічного піногасника; 2 - вимкнення мішалки; 3 - перекривання виходу повітря з ферментатора.

ферментатор подається доза піногасника.

Тривалість подачі піногасника регулює реле часу РВ1. Якщо піна продовжує рости й стикається із другим датчиком, то через підсилювач У2 вимикається електродвигун мішалки на запрограмований в реле РВ2 час. По закінченні цієї витримки мішалка включається в роботу, але якщо піна буде торкатися першого датчика, то повторно спрацює клапан СК1 і піногасник буде знову подаватися з мірника згідно реле часу РВ1. Реле часу РВ1 і РВ2 зв'язані таким чином, щоб вплив на піну подачею піногасника й вимкненням мішалки здійснювався по черзі.

У випадку підйому піни до рівня третього аварійного датчика через підсилювач У3 спрацює електромагнітний клапан СК2, що перекриває вихід повітря з ферментатора. У результаті стиску газу у ферментаторі й припинення барботажа піна опускається нижче рівня третього датчика, клапан СК2 відкривається й відновлюється аерація. У схему керування рівнем піни у ферментаторі може бути уведений і механічний піногасник, що включається відповідним датчиком на певний час. Якщо піна за цей проміжок часу не спадає, то спрацює датчик подачі хімічного піногасника.

Вибір схеми автоматичного керування рівнем піни у ферментаторі залежить від властивостей мікроорганізмів, складу живильного середовища і конструкції ферментатора, у якому проводять біосинтез.

Найпоширеніша схема автоматичного піногасіння наведена на рис. 34. Ця схема містить три датчики (1, 2, 3), установлених на різних рівнях. Принцип роботи датчика може бути заснований або на електричній провідності піни, або на зміні електричної ємності між датчиком і корпусом апарата в момент зіткнення датчика з піною. Принцип дії схем такого типу полягає в наступному. Коли піна торкається першого датчика, через підсилювач У1 включається електромагнітний клапан СК1, установлений на лінії подачі піногасника з мірника, і у фер-

1.4 Виділення й очищення продуктів ферментації

1.4.1 Відділення біомаси від культуральної рідини

Незалежно від типу біосинтезу (позаклітинне або внутрішньоклітинне розташування цільового продукту) першою стадією підготовки культуральної рідини для подальшої переробки є відділення зваженої фази - біомаси. На виробництві це пов'язане з переробкою великих об'ємів суспензій, тому що кількість біомаси культуральної рідини може бути до 30 г/л.

Способи відділення клітинної біомаси мікроорганізмів від культуральної рідини можна розділити на механічні (відстоювання, фільтрування, центрифугування) і термічні (сушіння). Залежно від препаративної форми, яку необхідно одержати, а також властивостей цільового продукту й культуральної рідини або твердофазної культури, що переробляється, використовують ті або інші методи концентрування й виділення продуктів мікробіологічного синтезу.

Фільтрування є менш енергоємним процесом. Фільтруванню піддаються далеко не всі культуральні рідини; багато які з них мають властивість швидко закривати (засмічувати) пори фільтруючого матеріалу. Іноді спеціально міняють культуру, щоб культуральна рідина піддавалася фракціонуванню фільтруванням.

Здатність до фільтрування культуральної рідини залежить від виду мікроорганізму-продуцента, якісного й кількісного складу живильного середовища, умов ферментації.

Продуценти відрізняються розмірами й структурою клітинних утворень. Наприклад, продуцент пеніциліну утворює довговолоконистий міцелій з «товстими» нитками діаметром 5-50 мкм, відділення якого від рідкої фази не представляє утруднень. Міцелій же актиноміцетів характеризується тонкими (0,2-1 мкм) гіллястими нитками з великим числом переплетень. До кінця ферментації спостерігається значний лізис клітин, у результаті якого в рідині утворюється тонкодисперсна фракція суспензії, що складається з обривків міцеліальних клітин. Міцелій має аморфний, слизуватий, липкий характер, швидко забиває пори фільтруючого матеріалу. Питомий опір осаду великий. Фільтрування цих культуральних рідин без попереднього поліпшення фільтруємості практично неможливо.

Великий вплив на фільтруємість культуральної рідини виявляють умови проведення ферментації: склад, якість і кількість сировини, вміст у рідині спожитих живильних речовин, наявність жирів, тривалість ферментації. Використання, наприклад, соєвого борошна замість кукурудзяного екстракту приводить до зменшення опору осаду, збільшенню швидкості фільтрування. Якщо в культуральній рідині присутні значні кількості неспожитих живильних речовин, фільтрування вповільнюється. Застосування жирів у якості піногасників наприкінці ферментації погіршує

фільтруємість. Збільшення тривалості ферментації також негативно позначається на процесі фільтрування.

Для поліпшення фільтруємісті культуральні рідини багатьох антибіотиків перед відділенням міцелію піддають спеціальній обробці. До способів поліпшення фільтруємісті культуральної рідини відносяться теплова коагуляція, кислотна коагуляція, обробка рідини електролітами й поліелектролітами, утворення наповнювача-коагулянту безпосередньо в рідині, застосування фільтрувальних порошків.

Теплова коагуляція використовується в основному для антибіотиків, які не руйнуються при нагріванні у водному середовищі. Заснована вона на денатурації білка при підвищеній температурі. При цьому швидкість фільтрування збільшується за рахунок згортання й коагуляції білків, що приводить до утворення ними твердих структур, що змінюють характер (структуру) осаду. Осад при цьому робиться менш липким, легко збездводнюється. Крім того, при підвищеній температурі (70-75 °С) значно зменшується в'язкість культуральної рідини. Однак теплова обробка звичайно несприятливо позначається на якості готового продукту.

Кислотна коагуляція широко застосовується у виробництві антибіотиків, які порівняно стійкі при низькому значенні рН розчину. Вибір кислоти для зниження рН визначається вимогами наступного хімічного очищення антибіотика. Однак кислотна коагуляція забезпечує гарну фільтруємість не для всіх культуральних рідин. Гарний ефект у деяких випадках дає спільна кислотна-теплова коагуляція.

Широко практикується для прискорення фільтрування культуральної рідини застосування фільтрувальних порошків. Найчастіше використовуються силікатні порошки (перліт, діатоміт і ін.) або деревне борошно. Порошок у вигляді водної суспензії подають на фільтр, наносячи на його поверхню ґрунтовий (намивний) шар товщиною 1-2 мм, через який потім фільтрують культуральну рідину. Завдяки високій проникності ґрунтового шару, швидкість фільтрування збільшується. Іноді порошки додають прямо в культуральну рідину перед фільтруванням, однак у цьому випадку швидкість фільтрування збільшується всього на 15-20 %, у той час як із ґрунтовим шаром вона вище в 1,5-2 рази.

Перераховані вище методи все-таки не є досить ефективними. Вони не дозволяють змінити структуру осаду таким чином, щоб можна було використовувати для його відділення фільтри без намивного шару.

Найбільш ефективним методом коагуляції, що поліпшує характер осаду й підвищує швидкість фільтрування, є метод утворення наповнювача безпосередньо в культуральній рідині при додаванні реагентів, що утворюють у ній нерозчинний осад. Такими реагентами служать солі Са, Ва, Fe, Al і ін., що утворюють у водному середовищі осади з аніонами сульфатної, фосфатної, щавлевої й інших кислот. Осади, що випадають у культуральній рідині, запобігають злипанню часток міцелію, сприяють утворенню гранул;

міцелій здобуває грудкувату структуру й утворює при фільтруванні проникний шар.

Для осадження біомаси перед фільтрацією іноді додають флокулянти різної природи.

До флокулянтів (високомолекулярних сполук, що сприяють дестабілізації дисперсних систем), які застосовується в біотехнології, пред'являються підвищені вимоги.

Флокулянти, які застосовуються для концентрування суспензій мікроорганізмів, повинні досить повно відокремлювати клітки від культуральної рідини, забезпечувати високий ступінь концентрування при малій витраті реагенту й високій швидкості відділення клітин, повинні бути ще й нетоксичними для клітин мікроорганізмів, нетоксичними стосовно тварин і людини при одержанні біотехнологічних продуктів з їхньою участю, бути доступними й економічно вигідними.

Широко застосовуються як флокулянти водорозчинні полімери як біологічного (природного) походження, так і синтетичні.

Серед синтетичних промислових флокулянтів провідне місце займає поліакриламід (ПАА). Це обумовлено його невисокою вартістю, низькою токсичністю, досить високою ефективністю в багатьох флокуляційних процесах і ін. Більше практичне значення має поліетиленоксид (ПЕО). Його перевага полягає у відсутності помітної залежності його здатності до флокуляції від рН розчину й знака заряду часток дисперсної фази.

До аніонних флокулянтів відносяться водорозчинні полімери, що містять карбоксильні, сульфатні й фосфатні групи, наприклад, поліакрилова, поліметакрилова, альгінова кислоти, поліетиленсульфокислота, полістиролсульфокислота, гепарин і ін.

До катіонних флокулянтів відносяться полімери, що містять у ланцюзі первинні, вторинні й третинні атоми азоту, здатні протонуватися у водяних розчинах: полівініламін, поліетиленамін, полівінілпіридини та ін.

Природні флокулянти одержують методами хімічної модифікації природних полімерів. Все зростаюче застосування знаходять флокулянти на основі крохмалю, похідні целюлози й інших полісахаридів, що обумовлено їх біодеградуемостю й нетоксичністю, наявністю економічних джерел сировини й простих методів модифікації. Найбільш доступними й широко використовуваними флокулянтами є похідні целюлози.

Для фільтрування застосовують фільтрпреси різної конструкції, барабанні вакуумні фільтри, стрічкові фільтрпреси й інші конструкції, наприклад, ФПАКМ 5,0 (площа поверхні фільтрації 5 м²), ФПАКМ 2,5 (2,5 м²).

Рамний фільтрпрес, схема якого зображена на малюнку 35 відноситься до апаратів періодичної дії, що працюють під тиском. Фільтрпрес складається із плит, що чергуються, 2 і рам 3 однакових розмірів, між якими затиснута фільтруюча тканина (серветки).

Плити й рами опираються бічними ручками на два паралельних круглих бруси 4. Плити й рами щільно притискаються до лобовини 1 за допомогою рухливої лобовини 5, на яку діє тиск плунжера гідравлічного пристрою 6

Плити мають по краях гладку поверхню, а в середині - рифлену з жолобками. Плити й рами мають припливи 7 з отворами, які при складанні утворюють канал для підведення фільтруючої рідини.

Процес фільтрування на рамному фільтр-пресі здійснюється в такий спосіб. Культуральна рідина під тиском подається в канал і з нього через отвори в стінці рами надходить у внутрішню порожнину (простір), обмежену двома фільтрувальними перегородками й внутрішньою поверхнею рами. Міцелій затримується в цьому просторі, а нативний розчин проходить через фільтруючі серветки, після чого по жолобах і каналах через крани стікає в лоток. Звичайно перші порції фільтрату бувають мутними, їх повертають у збірник культуральної рідини. Надалі на тканині накопичується шар осаду, через який здійснюється фільтрування. Фільтрат стає при цьому прозорим.

Після фільтрування здійснюють промивання міцелію. Ціль промивання - витиснути нативний розчин з осаду, щоб забезпечити більш повний перехід антибіотика з міцелію в нативний розчин.

По закінченні промивання міцелій на фільтрі продувають стисненим повітрям для витиснення промивних вод з пор осаду. Потім відсувають рухливу плиту, роз'єднують плити й рами й осад видаляють у бункер, а фільтруючі полотна промивають струменями води.

Проведення процесу фільтрування з поступовим підвищенням тиску від 0 до 0,2-0,3 МПа забезпечує більш високу продуктивність фільтра, чим у випадку фільтрування при постійному високому тиску. Високий тиск у початковий момент фільтрування викликає проникнення дрібних часток осаду в пори ґрунтового шару й фільтруючої тканини, що приводить до їхнього забивання й зниження швидкості фільтрування.

Недоліки рамного фільтрпресу полягають у великих витратах фізичної праці, важких у санітарному відношенні умовах роботи обслуговуючого персоналу й значному зниженні швидкості фільтрування в часі.

До переваг рамного фільтрпресу можна віднести більшу поверхню фільтрування на одиницю займаної фільтром площі приміщення, простоту конструкції, відсутність частин, що рухаються, а також можливість одержання прозорого фільтрату.

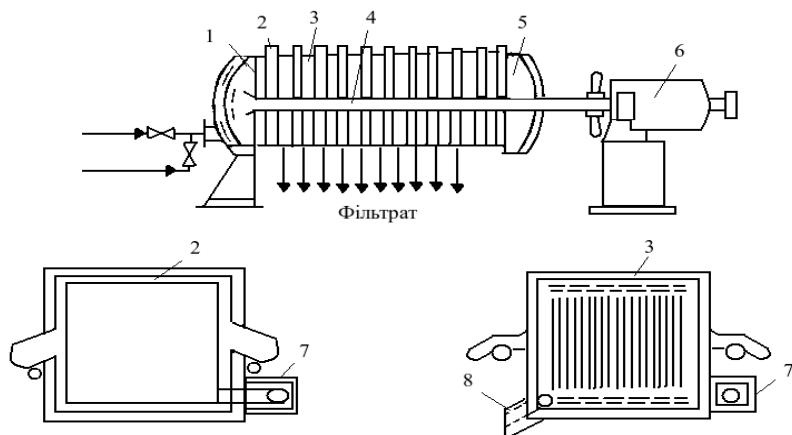


Рисунок 35 - Рамний фільтрпрес

1 - лобовина; 2 - рама; 3 - плита; 4 - брус; 5 - рухлива лобовина; 6 - гідравлічний пристрій; 7 - приплив; 8 - кран.

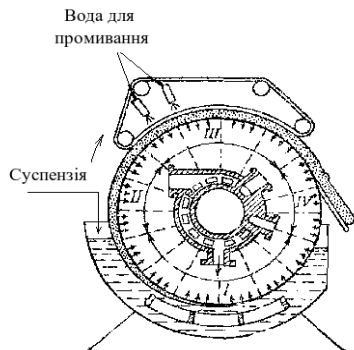


Рисунок 36 - Схема роботи барабанного вакуум-фільтра

I - фільтрування; II - просушка; III - промивання й просушка; IV - віддувка й регенерація тканини

Барабанний вакуум-фільтр являє собою фільтр безперервної дії, що працює під вакуумом. Фільтр має горизонтальний перфорований барабан, покритий зовні фільтруючою тканиною (рис. 36). Барабан повільно обертається навколо своєї осі, при цьому він на 0,3-0,4 поверхні занурений у ємність, у яку безупинно подається культуральна рідина. Поверхня фільтрування барабана розділена на ряд прямокутних осередків, ізольованих друг від друга. Осередки при русі по окружності присьднуються через розподільний пристрій у певній послідовності до джерел вакууму й стисненого повітря. Кожен осередок послідовно проходить зони фільтрування, першого зневоднювання, промивання, другого зневоднювання, видалення осаду й регенерації тканини.

У зоні фільтрування осередок стикається з культуральною рідиною, що перебуває в ємності, і з'єднується трубкою з порожниною, що сполучається із джерелом вакууму. При цьому фільтрат через трубку й порожнину йде в збірник, а на поверхні осередку утворюється осад.

У зоні першого зневодненні осад на фільтрі стикається з атмосферним повітрям, а осередок як і раніше сполучається із джерелом вакууму. Під дією вакууму рідина з пор осаду витісняється й приєднується до фільтрату. У зоні промивання на частково збезводнений осад із пристрою, що розприскує, подається вода, а осередок з'єднується з порожниною, що також сполучається із джерелом вакууму. Промивна рідина через трубку й порожнину йде в збірник.

У зоні другого зневоднення промитий осад стикається з атмосферним повітрям, а осередок залишається з'єднаним з тією же порожниною, тому промивна рідина витісняється з пор осаду й йде в збірник.

У зоні видалення осаду осередок, з'єднується трубою з порожниною, що сполучається із джерелом стисненого повітря. Під дією стисненого повітря, що подається в напрямку, протилежному напрямку руху фільтрату, осад розпушується й відділяється від тканини, після чого знімається ножем.

У зоні регенерації тканина продувається стисненим повітрям, що надходить в осередок по трубці з порожнини, що сполучається із джерелом стисненого повітря.

Фракціонування часто здійснюють шляхом сепарування, яке має ряд переваг перед фільтрацією й іншими способами а саме:

- немає необхідності в застосуванні фільтруючих добавок; крім технологічних зручностей і економії це дозволяє непотрібну для подальшої обробки фракцію використовувати в корм тваринам;

- сепарація як більш надійний, безперервний процес дає можливість обробити матеріал з найменшими втратами активної речовини;

- процес легше піддається автоматизації, агрегати займають менше приміщень, легше здійснити мийку устаткування.

Сепаратори діляться на 4 групи:

- осаджувальні, що складаються з горизонтального циліндра конічної форми, що обертається, з розташованим усередині шнеком, що обертається з меншою швидкістю. Оброблюваний матеріал уводиться в центрі, рідка фракція виводиться з кінця циліндра з більшим діаметром, густа - з іншого кінця, з меншим діаметром;

- класифікатори зі збільшеним об'ємом седиментаційного простору; густий продукт вивантажується під час зупинки машини;

- саморозвантажні з пакетом конічних тарілок і системою періодичного вивантаження густої фракції в процесі роботи;

- форсуночні, що також мають пакет конічних тарілок і систему безперервного вивантаження густої фракції через форсунки під час роботи.

Технологічні схеми, по яких працюють сепаратори, залежать від властивостей оброблюваного й цільового продукту й відрізняються розмаїттю; нерідко прибігають до послідовного включення сепараторів різних конструкцій. Сепарування застосовується при одержанні

хлібопекарських і кормових дріжджів (у тому числі з парафінів, метанолу, етанолу), медичних: антибіотиків, етилового спирту, продуктів із зелених водоростей, ферментів, амінокислот, вітаміну В₁₂, вакцин, стимуляторів росту і засобів захисту рослин і багатьох інших продуктів хіміко-фармацевтичної, медичної, мікробіологічної й харчової промисловості.

Основні проблеми сепарування - створення ефективних сепараторів для виділення бактерій і інших дрібних часток з визначальним розміром 0,5-1,0 мкм і менше, забезпечення безперервності операцій, включаючи мийку й настроювання форсунок і систем, що розвантажують, з урахуванням властивостей матеріалу. Обробка великих кількостей культуральних рідин (при виробництві кормового білка, кристалічних амінокислот і ін.). Процес ускладнюється й у випадках, коли переробці піддається й фугат, тобто коли необхідно його посвітління, а також при фракціонуванні міцеліальних культур. Для сепарування бактерій і посвітління рідин застосовуються спеціальні апарати з 3-й групи, з пакетом тарілок. Біомаса або тверді частки збираються в камері із зовнішньої сторони тарілок, звідки вони періодично евакуюються (із зупинкою машини або без зупинки). Міцеліальні культури найчастіше фільтруються.

Для концентрування мікробних суспензій застосовують флотацію. Отриману на стадії ферментації культуральну рідину спінюють, при цьому більша частина мікроорганізмів концентрується в пінній фракції. Відокремлюючи піну від основної маси рідини, одержують напівпродукт із вмістом біомаси в 2-4 разів вище, ніж у вихідній культуральній рідині.

Процес флотації здійснюється у спеціальних апаратах - флотаторах різної конструкції. Флотаційні апарати, які застосовують в мікробіологічній промисловості, виконуються в декількох варіантах; горизонтальні конічні, вертикальні циліндричні, одноступінчасті із внутрішнім стаканом й двоступінчасті. На рис. 37 представлений загальний вид найбільш простого одноступінчастого флотатора.

Флотатор складається із циліндричного корпусу із плоским днищем і внутрішнім стаканом, що є пінозбірником. Кільцевий простір між корпусом і пінозбірником розділено вертикальними перегородками на секції (I-V). Перегородки, не доходять до дна, крім перегородки між першою й останньою секціями. У секціях II-V установлені аератори.

Мікробна суспензія подається в спеціальну саму більшу секцію флотатора й послідовно проходить через всі секції, перетікаючи під вертикальними перегородками. Через барботери подається повітря і відбувається інтенсивне піноутворення й флотація мікроорганізмів. Піна, що утворилася, переливається через верхній край внутрішнього циліндра й попадає в зону дії пристрою механічного піногасіння (у необхідних випадках на його диск додатково подають воду або хімічний піногасник).

Зібрана у внутрішньому стакані згущена суспензія виводиться через штуцер і надходить на сепаратори для подальшого концентрування.

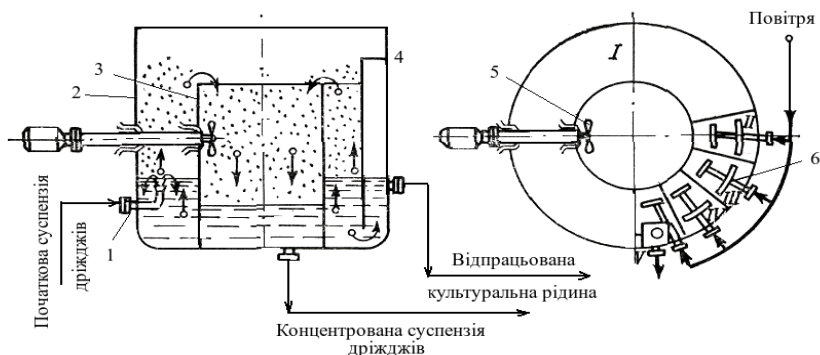


Рисунок 37 - Одноступінчастий флотатор

1 - патрубок для уведення дріжджової суспензії; 2 - корпус; 3 – внутрішній стакан; 4 - убудована кишень; 5 - механічний піногасник; 6 - аератори.

1.4.2 Дезінтеграція клітинних стінок мікроорганізмів

Для виділення внутрішньоклітинних БАР проводять дезінтеграцію клітинних оболонок. Дезінтеграція може бути здійснена хімічними, біологічними або фізичними способами.

Хімічні способи дезінтеграції засновані на дії хімічних реагентів, що приводить до деструкції впорядкованих структур клітинної стінки мікроорганізмів. Обробка суспензії мікроорганізмів лугом, сечовиною, гліцерином, аміаком або пероксидом водню підвищує проникність клітинних стінок, завдяки чому БАР виводяться із клітин у розчин.

Хімічні способи дезінтеграції поки не знайшли широкого поширення в мікробіологічній промисловості, тому що хімічні реагенти не тільки діють на клітинну оболонку, але й можуть вступати в реакції з компонентами клітки.

Біологічні способи руйнування клітинної оболонки засновані на дії ферментів. Автоліз (або розщеплення) клітинної стінки може відбуватися під дією або власних внутрішньоклітинних гідролітичних ферментів, або внесених ферментних препаратів. Процес протікає в кислому середовищі при температурі 30-35°C впродовж декількох годин. У результаті утворюється суміш продуктів гідролізу: амінокислоти, пептиди, поліпептиди та ін.

Ферментативна дезінтеграція є найбільш м'яким способом руйнування клітинної оболонки, однак вона поки не одержала широкого застосування через порівняно високу вартість ферментних препаратів.

Фізична дезінтеграція - це процес механічного впливу на клітку, що супроводжується швидким переміщенням матеріалу, що руйнується, у зоні

дії дезінтегруючих сил. Процес відбувається при високих швидкостях у безперервному режимі й може бути автоматизований.

Клітки мікроорганізмів можуть бути зруйновані також шляхом заморожування й відтавання, стирання, екструзії, впливу ультразвуку й ін. На основі цих процесів створені установки, які застосовуються при дезінтеграції різних видів мікроорганізмів.

У великомасштабному виробництві для руйнування клітин використовують гомогенізатори високого тиску, які проводять одно й двоступінчасту гомогенізацію й асептичну обробку напівпродукту. Гомогенізатори включають: трипоршневий насос високого тиску з убудованим пристроєм для гомогенізації. Принцип роботи гомогенізатора: концентрована клітинна суспензія перекачується під високим тиском через вузьке сопло. Різде падіння тиску супроводжується сильним прискоренням рідкої маси і викликає руйнування клітин. Короткий час шляху в зоні кавітації гарантує руйнування тільки стінок клітки.

Руйнування клітин також проводять у скляному або порцеляновому кульовому млинах.

У результаті дезінтеграції клітинної біомаси внутрішньоклітинні БАР виявляються в розчині, з якого їх виділяють тим або іншим способом, наприклад, екстракцією.

У більшості біотехнологічних процесів клітинні стінки відкидають як баласт, але можливо й промислове одержання компонентів клітинних стінок як цільового продукту.

1.4.3 Виділення продуктів з культуральної рідини

Виділенню цільового продукту з культуральної рідини (КР) передують відділення продуцента. Далі, залежно від характеристики фільтрату й властивостей продукту вибирають методи виділення, концентрування й очищення отриманої речовини. Витрати на ці операції можуть перевищувати витрати на готування середовищ і ферментацію. Так, у виробництві ферментів вартість виділення й очищення становить до 70 % загальних витрат, у виробництві етанолу не перевищує 15-20 %, у виробництві органічних кислот – 30-40 %.

Найбільше широко застосовувані в біотехнології методи виділення й очищення продуктів:

- дистиляція: перетворення продукту у пароподібний стан і виведення із системи з наступною конденсацією продукту;
- зневоднювання: випарювання, випарювання з наступним сушінням, сушіння;
- ліофілізація: заморожування розчину або суспензії клітин і подальша сублимація у вакуумі;
- виморожування: переведення води в кристалічний стан - лід, що потім відокремлюють механічним шляхом (фільтрація, центрифугування);

- осадження у вигляді нерозчинних солей шляхом додавання хімічного осаджувача в еквімолярних кількостях;
- кристалізація: після попередньої обробки КР і випарювання при охолодженні здійснюють кристалізацію;
- осадження: зміна розчинності речовини (наприклад, білка) шляхом додавання електролітів, органічних розчинників, специфічних флокулянтів і ін;
- сорбція: іонообмінна хроматографія, афінна хроматографія й ін.
- екстракція: додавання до розчину екстрагенту (розчинника), що поглинає продукт. Потім емульсію розділяють і виділяють цільову речовину;
- ультрафільтрація: обробка розчину на мембранних фільтрах з певними розмірами пор (тобто фракціонування речовин по розмірах їхніх молекул).

На рисунку 38 наведена технологічна схема фракціонування культуральної рідини й виділення екстрацелюлярного продукту.

Рідинна екстракція являє собою процес витягу речовини одною рідиною з іншої. З води речовину екстрагують органічними розчинниками (екстрагентом), а з органічного розчинника - водою. Звичайно використовують такий органічний розчинник, що не змішується з водою. Таким чином, у процесі екстракції беруть участь дві рідкі фази - екстрагент і вихідний розчин. Одержувані після екстракції фази називаються екстрактом і рафінатом (або відпрацьованим розчином). Метод екстракції дозволяє не тільки витягти цільовий компонент із культуральної рідини, але й відокремити його від значного числа супутніх домішок і сконцентрувати.

Осадження широко застосовується у ферментній промисловості. Осадженням називають процес, у якому додавання певних реагентів або зміна фізико-хімічних умов викликає випадання розчиненої речовини (найчастіше білка) в осад. Найбільш часто для осадження ферментів використовують нейтральні солі (у цьому випадку процес називають висалюванням) або органічні розчинники, а також методи, засновані на зміні температури або рН розчину, додаванні високомолекулярних полімерів і ін.

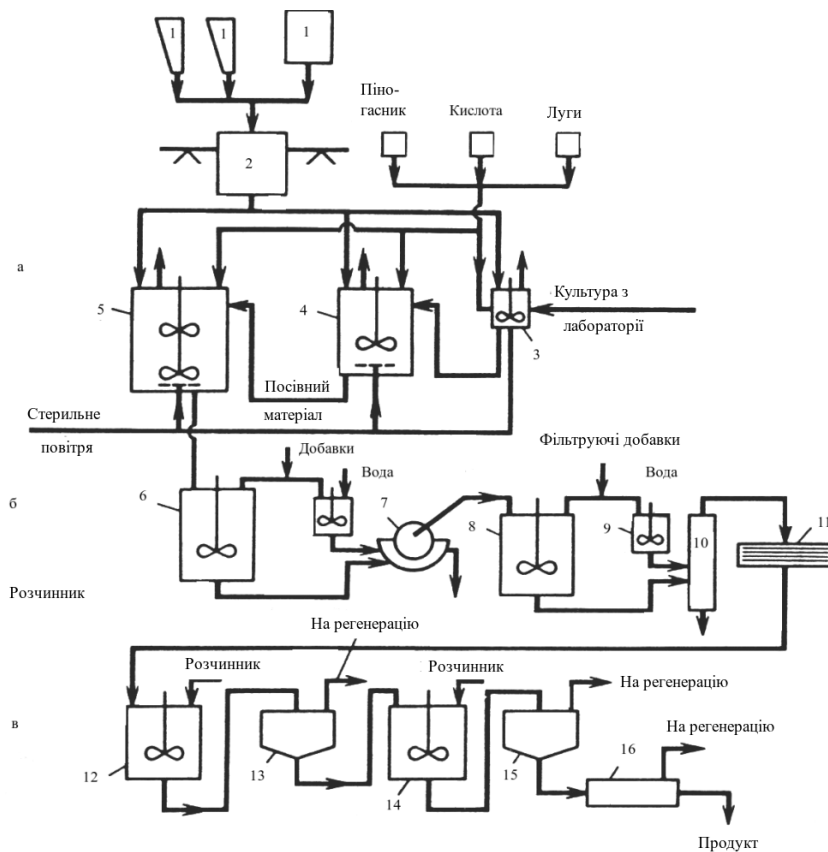


Рисунок 38 - Апаратурно-технологічна схема фракціонування культуральної рідини й виділення екстрацелюлярного продукту:

а - стадія ферментації: 1 - ємності для компонентів живильного середовища 2 - ваги; 3 - апарат для одержання посівного матеріалу; 4 - інокулятор; 5 - ферментатор

б - стадія фракціонування: 6 - апарат для попередньої обробки КР; 7 - перший фільтр; 8 - збірник першого фільтрату; 9 - апарат для підготовки розчину для додаткової фільтрації; 10 - додатковий фільтр; 11 - фільтр-стерилізатор;

в - стадія виділення й очищення продукту: 12 - апарат для коагуляції розчинником; 13 - установка для попереднього осадження; 14 - установка для промивання осада; 15 - апарат для вторинного осадження; 16 - сушарка.

Відомо, що розчинність білків у розчинах солей нижче, ніж у чистій воді. Додавання солі до розчину білка приводить до того, що при певній концентрації солі розчинність білка стає нижче його концентрації в розчині, і білок починає випадати в осад. Ступінь осадження білка залежить від його вихідної концентрації в розчині, концентрації солі й властивостей системи. На цьому явищі заснований процес висалювання білків. Він пов'язаний з посиленням орієнтації диполів води іонами солей, що приводить до руйнування гідратного шару навколо молекул білка і його коагуляції.

Найбільше часто для проведення висалювання використовують сульфат амонію (завдяки його високій розчинності у воді й низькій вартості), рідше - хлорид натрію. Концентрація солі, що додається у ферментний розчин, звичайно близька до концентрації насичення (для сульфату амонію становить 70-75 г на 100 см³ розчину). Сіль додають у сухому виді, невеликими порціями, при постійному перемішуванні. Після додавання розрахованої кількості солі осад утворюється не відразу, а протягом деякого часу - від 30 хвилин до декількох годин. Різні білки випадують в осад при різних концентраціях солі в розчині, у зв'язку із цим процес висалювання використовують не тільки для виділення ферментів, але й для їхнього очищення від небажаних домішок. Наприклад, осадження глюкоамілази сульфатом амонію в кількості 60 % насичення приводить до неповного виділення цільового продукту. Але зате при цьому фермент практично повністю звільняється від супутньої йому глікозилтрансферази, що осаджується при концентрації солі 90 % насичення.

В осадах, отриманих при висалюванні, утримується від 25 до 80 % солі, тому препарати харчового або медичного призначення необхідно піддавати додатковому очищенню (наприклад, за допомогою електродіалізу).

При додаванні до водного розчину ферменту органічного розчинника (етанолу, метанолу, ізопропанолу, ацетону та ін.) знижується діелектрична постійна середовища. При цьому, як при висалюванні, руйнується гідратна оболонка білка, і він випадє в осад. Концентрація розчинника, необхідна для осадження різних білків, природно, також різниться, що дозволяє проводити їхнє фракціонування. Так, при осадженні етанолом комплексу ферментів з екстракту поверхневої культури *Asp. oryzae* близько 70-80 % протеолітичних ферментів випадє у осад при концентрації спирту 50 %, а амілази майже не осаджуються. Після відділення отриманого осаду й додавання до надосадової рідини етанолу до концентрації 70-72 % одержують осад, що містить переважно амілази.

На процес осадження ферментів органічними розчинниками істотно впливає температура. У більшості випадків цей процес проводять при температурі від 0 до 5 °С; для цього водяний розчин ферменту охолоджують до 1-2 °С, а розчинник до - 10-15 °С з урахуванням того, що при змішуванні води зі спиртом суміш нагрівається. Підвищення температури приводить до

денатурації багатьох ферментів, тому що їх термолабільність при додаванні органічних розчинників сильно зростає.

Недолік процесу осадження органічними розчинниками полягає в тому, що застосовувані реагенти порівняно дорогі, вогнебезпечні й досить отруйні, тому потрібне виконання відповідних мір безпеки. Незважаючи на це, осадження органічними розчинниками досить широко застосовується у ферментній промисловості.

Звичайна фільтрація використовується для відділення від рідини досить великих часток твердої фази (50-100 мкм і більше). Для відділення більш дрібних часток (2-5 мкм), а також для поділу розчинів використовують мембранні методи. До них відноситься мікрофільтрація, діаліз, електродіаліз, зворотний осмос і ультрафільтрація. У всіх цих методах застосовуються напівпроникні мембрани.

Переваги мембранних методів поділу біологічних суспензій і розчинів наступні: відсутність температурних, механічних і хімічних впливів на продукт, що переробляється; простота апаратурного оформлення, відсутність деталей, що рухаються; низька енергоємність процесу; можливість забезпечення герметичності й асептики процесу.

Мікрофільтрація - це процес, близький до звичайної фільтрації. Мікрофільтрація здійснюється через пористі мембрани з діаметром пор від 0,1 до 10 мкм застосовується для відділення дрібних часток твердої фази, у тому числі мікроорганізмів (у цьому випадку її називають фільтрацією, що стерилізує). Завдяки великій кількості пор на одиниці поверхні мембрани (об'єм пор досягає 70-80 % загального об'єму мембрани) процес мікрофільтрації протікає з досить високою швидкістю. Однак у міру нагромадження затримуваних часток біля поверхні мембрани й закупорювання пор дрібними частками швидкість фільтрації падає. Щоб запобігти цьому, використовують різні способи турбулізації середовища біля поверхні мембрани, наприклад, механічне перемішування або вібрацію. Процес мікрофільтрації звичайно ведуть при різниці тисків 0,1-0,2 МПа.

Діаліз - процес очищення розчинів високомолекулярних речовин (наприклад, ферментів) від розчинених у них низкомолекулярних речовин за допомогою напівпроникної мембрани.

Схема процесу діалізу зображена на рис. 39 а.

З однієї сторони мембрани перебуває вихідний розчин, з іншого боку - чиста вода. Присутні в розчині низькомолекулярні речовини шляхом дифузії проходять через мембрану й виводяться разом з водою. Це так званий діаліз проти води. Білки або інші високомолекулярні речовини, молекули яких більше пор мембрани, залишаються в розчині, і, таким чином, їхній розчин очищається від низькомолекулярних домішок. Ступінь очищення залежить від співвідношення кількостей води й діалізуемого розчину, тривалості діалізу й коефіцієнта дифузії. Так, при діалізі ферментного розчину протягом 24 год і співвідношенні розчину й води 1:50

кількість домішок (вуглеводів, амінокислот, зольних елементів та ін.) зменшується в 3,5-4 рази, а активність ферменту на 1 г сухих речовин зростає в 2,7-3,0 рази. Мембрани для діалізу виготовляють із пергаменту, армованого целофану й інших матеріалів.

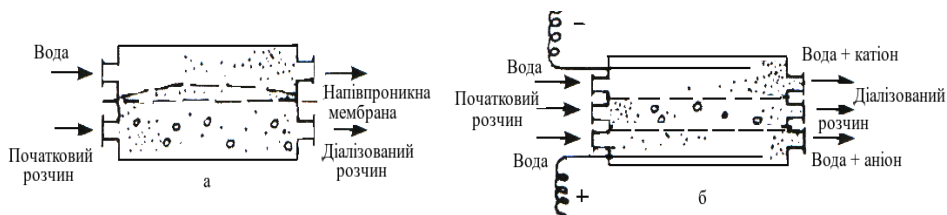


Рисунок 39 – Схеми діалізу (а), електродіалізу (б)

Швидкість процесу дифузійного переносу речовин при діалізі невелика. Вона значно вище тоді, коли домішки, що видаляються, заряджені. Для заряджених часток застосовують електродіаліз. Він полягає в пропусненні постійного електричного струму через розчин, що діалізують (рис. 39 б). При цьому позитивно заряджені іони рухаються через одну мембрану до катода, а негативні іони через іншу мембрану до анода. Щоб уникнути зворотної дифузії під час електродіалізу використовують селективні мембрани, проникні тільки або для аніонів, або для катіонів. Швидкість електродіалізу визначається в основному силою струму й змінюється в широких межах. Електродіаліз на відміну від звичайного діалізу широко застосовують не тільки в лабораторних, але й у промислових умовах, наприклад, для очищення ферментних розчинів після осадження ферментів методом висалювання.

Ультрафільтрація - це процес концентрування розчинів високомолекулярних сполук (наприклад, ферментів) з одночасним очищенням від низькомолекулярних домішок шляхом пропускання розчину через мембрану з порами розміром від 0,01 до 0,1 мкм. На відміну від мікрофільтрації або звичайної фільтрації, при якій затримуються окремі молекули розчиненої високомолекулярної речовини, при ультрафільтрації відбувається не поділ фаз, а перерозподіл розчинених у рідкій фазі речовин. Тим часом проблема забивання пор фільтруючого матеріалу, яка характерна для звичайної фільтрації, має не менше, а можливо, і більше значення.

Важливою характеристикою будь-якої ультрафільтраційної мембрани є її селективність, що визначає ступінь затримування розчиненої речовини, який залежить від розмірів і форми молекул розчиненої речовини.

Варто мати на увазі, що практично у всіх випадках існують молекули, які затримуються мембраною лише частково.

Для ультрафільтрації, як правило, використовують пористі полімерні мембрани на основі поліуретанів, складних ефірів целюлози, полівінілового

спирту й ін. Для забезпечення механічної міцності в умовах гідравлічного тиску основну тонку мембрану прикріплюють до більш грубої підкладки.

На практиці застосовують установки пластинчастого, трубчастого, рулонного типів, а також апарати з мембранами у вигляді порожнистих волокон. Вони забезпечують максимальну питому поверхню фільтрації, герметичні й прості для обслуговування. Схема апарата із трубчастим фільтруючим елементом зображена на рис. 40.

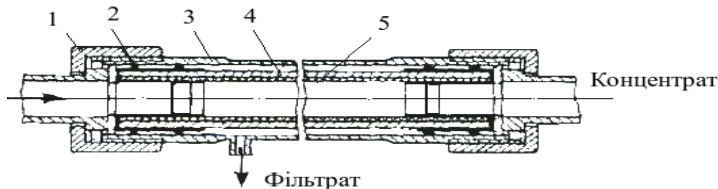


Рисунок 40 – Схема установки із трубчастим фільтруючим елементом

Процес зворотного осмосу принципово аналогічний ультрафільтрації й відрізняється лише тим, що для нього використовують мембрани з порами меншого розміру (до 0,01мкм) і більш високий тиск (7-8 мПа замість 0,3-1 мПа). За допомогою зворотного осмосу звичайно концентрують розчини низькомолекулярних речовин, що характеризуються високим осмотичним тиском.

Іонообмінний метод є одним з ефективних методів виділення біологічно активних речовин з культуральної рідини. Цей метод відрізняється рядом переваг перед іншими методами: простота апаратурного оформлення, багаторазове використання іонообмінних смол, можливість здійснення повної механізації й автоматизації технологічного процесу, виключення контакту працюючих із часто токсичними напівпродуктами, робота з водяними розчинами без застосування шкідливих органічних розчинників.

Іонообмінний метод заснований на здатності іонообмінних смол сорбувати біологічно активні речовини, завдяки еквівалентному обміну між іонами речовини, що перебуває в розчині, і іонами сорбенту.

Іонообмінний витяг може бути здійснено трьома способами: статичним, динамічним і хроматографічним. Статичний спосіб полягає в змішуванні й наступному розділенні іоніту й оброблюваного розчину. Процес проводиться в ємнісному апараті, з мішалкою для суспендування іоніту в розчині. По закінченні сорбції іоніт, що містить цільовий компонент, наприклад, антибіотик, відокремлюють від маткового розчину на фільтрі, промивають водою й повертають в апарат. В апараті проводять у такий же спосіб витяг (елюацію) антибіотика. Статичний спосіб застосовують головним чином у лабораторній практиці.

Найпоширенішим при іонообмінному виділенні антибіотиків став динамічний спосіб. Він полягає в пропущенні розчину через шар іоніту в одному напрямку. У міру руху розчин «збіднюється» іонами, що сорбуються, і контактує з активними (з точки зору іонообмінної здатності) шарами іоніту. При цьому розчин, що протікає, несе із собою продукти іонообмінної реакції, тобто витиснуті іони. Завдяки цьому досягається практично повний витяг антибіотика з розчину й поступове насичення шару іоніту. Виділення антибіотика із сорбенту (елюація) у динамічних умовах дозволяє досягти повної десорбції антибіотика й одержувати високоактивні (концентровані) і більш чисті елюати.

Іонообмінна хроматографія застосовується переважно в дослідницьких роботах для більш чіткого відділення антибіотика від інших сполук, що сорбуються іонітом.

Основним апаратом для здійснення динамічного іонного обміну є іонітовий фільтр, що представляє собою вертикальну циліндричну посудину, заповнену іонітом, через шар якого протікає оброблювана рідина. Фільтри виготовляються з вуглеводистої сталі, а також з вініпласту, скла, плексигласу. Оскільки висота фільтрів звичайно набагато більше їхнього діаметра, їх називають іонообмінними колонами. У виробництві антибіотиків зустрічаються два типи іонообмінних фільтрів: закритий (напірний) і відкритий (безнапірний). Закритий фільтр (рис. 41 а) являє собою герметичну конструкцію, розраховану на роботу під напором рідини, що протікає через нього, тобто на надлишковий внутрішній тиск. У днища усередині фільтра встановлюється диск із отворами, у які вгвинчуються ковпачки. На диск завантажуються іонообмінна смола. Ковпачки мають щільові прорізи шириною 0,2-0,3 мм. Рідина при русі до колони зверху вниз проходить крізь прорізи, а зерна іоніту, розміри яких більше, ніж ширина щілини, затримуються в колоні. У верхній частині фільтра є пристрій для розподілу рідини при русі її зверху й відводу рідини при промиванні, коли промивна рідина подається знизу. Розподільний пристрій являє собою хрестовину, що складається з вініластових трубок-променів з отворами, що забезпечують рівномірність надходження або відводу рідини.

Практика використання напірних фільтрів з верхньою подачею розчинів виявила наявність у їхній роботі ряду істотних недоліків, викликаних тим, що шар іоніту в такому фільтрі фактично нерухомий і стислий тиском рідини, що нагнітається.

Це приводить до злипання часток іоніту, утворенню каналів, через які проходить значна частина рідини. У такий спосіб не всі зерна й не вся поверхня окремих зерен беруть участь в іонообмінному процесі, що, природно, зменшує продуктивність колони й знижує повноту витягу. Крім того, виникає небезпека інфікування фільтрів мікрофлорою в застійних ділянках шару.

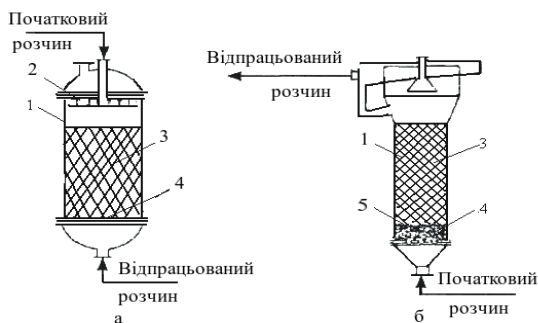


Рисунок 41 - Іонітові фільтри

а - закритий (напірний); б - відкритий (безнапірний); 1 - корпус фільтра; 2 - розподільний пристрій для рідини; 3 - іоніт; 4 - ковпачки; 5 - шар зернистого матеріалу.

Відкритий фільтр (рис. 41 б) не має цих недоліків. Нативний розчин подається в цьому фільтрі знизу зі швидкістю, при якій зерна іоніту підтримуються у зваженому в рідині стані (псевдозріджений, або «киплячий» шар). При цьому кожне зерно іоніту обмивається розчином з усіх боків і іоніт використовується більш ефективно. Відвід з колони рідини, що подається знизу, здійснюється через патрубок. Верхня, розширена частина колони призначена для осадження дрібних часток іоніту під дією сили ваги, тобто виконує функцію відстійника. Осіданню суспензії сприяє зменшення швидкості потоку при його розширенні під час руху через конічну частину осаджувача й зміна напрямку потоку при переливі рідини через борт у кільцеву кишеню. Частки іоніту, що осіли в кишені, повертаються в колону через переливний патрубок.

Як у відкритих, так і у закритих іонообмінних колонах у виробництві антибіотиків здійснюються процеси сорбції, а потім десорбції антибіотика. Робота колони протікає в такий спосіб. Через завантажений у колону іоніт безупинно з певною швидкістю пропускається нативний розчин. Відбувається поступове насичення іоніту антибіотиком. Відпрацьований розчин після очищення зливається в каналізацію. У міру насичення іоніту концентрація антибіотика у вихідному з колони розчині (остаточна активність), стає вище припустимого значення, тоді розчин направляють на додаткову сорбцію в іншу колону. Коли й ця колона перестає забезпечувати необхідну повноту витягу, підключають третю колону та ін. Таким чином, сорбція антибіотика здійснюється групою (батареєю) послідовно з'єднаних іонообмінних фільтрів. Після досить повного насичення антибіотиком іоніту в першому фільтрі його відключають і другий фільтр у такий спосіб стає

головним, а до «хвоста» батареї приєднується свіжий фільтр, так що число колон у системі залишається незмінним.

На відключеному фільтрі проводяться наступні технологічні операції іонообмінного циклу: витиснення нативного розчину, що заповнює колону, знесолоною водою; дезінфікування іоніту формаліном; елюація й потім регенерація іоніту. Елюат, що містить антибіотик, направляється на подальші операції по концентруванню й очищенню антибіотика. Як у закритих, так і у відкритих фільтрах одна із взаємодіючих фаз, а саме рідка фаза, пропускається через апарат безупинно, а зміни іншої фази - твердого іоніту – проходять як при періодичному процесі. Значний технологічний ефект може дати проведення іонообмінного процесу за безперервним принципом - з поділом апарата на зони сорбції, промивання, елюації, регенерації при зустрічному русі рідини й іоніту в кожній зоні. У цей час ведуться роботи зі створення нових іонообмінних апаратів безперервної дії, які дозволять інтенсифікувати й автоматизувати цей досить перспективний процес виділення й очищення антибіотиків.

1.4.4 Виділення інактивованої біомаси

У цей час багато біопрепаратів роблять у вигляді так званих мікробіологічних концентратів. Основна частина мікробіологічних концентратів використовується як збагачувальні добавки до кормів сільськогосподарських тварин (кормовий білок, кормові антибіотики, амінокислоти, ферменти).

Мікробіологічні концентрати являють собою висушені до певної вологості культуральні рідини. Отже, вони містять біомасу мікроорганізмів, продукти їхнього метаболізму, залишки компонентів живильних середовищ, піногасники та ін.

Одержання мікробіологічних концентратів у порівнянні з іншими біопрепаратами на стадії виділення кінцевого продукту відрізняється найбільш простою технологією. Основні технологічні операції при одержанні концентратів - це випарювання й сушіння.

Для одержання білкових препаратів, придатних до тривалого зберігання й транспортування, біомасу клітин необхідно висушити до вологості 8-10 %. У більш вологому стані маса мікроорганізмів швидко втрачає цінні біологічно активні речовини й починає розкладатися.

Клітинна суспензія після випарювання зі вмістом сухих речовин 24-26 % піддається сушінню в спеціальних сушильних установках. Вальцьові сушарки застосовуються на підприємствах малої потужності. Процес сушіння в таких апаратах відбувається в результаті контакту суспензії біомаси з гарячою поверхнею обертового барабана.

По конструкції ці сушарки бувають одно- і двохвальцові, незаглибні й заглибні.

Двовальцова сушарка незаглибного типу (рис. 42) складається із двох сталевих порожніх горизонтально розташованих барабанів. У барабани, які закриті з торців кришками, подається пара. Барабани монтуються строго паралельно. У торців барабанів зверху встановлюються клини, що утворюють між барабанами ванну, у яку безупинно надходить концентрат біомаси.

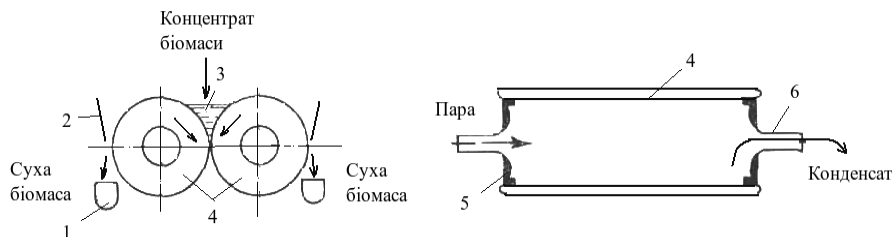


Рисунок 42 – Двовальцова парова сушарка незаглибного типу

1 – поздовжній шнек; 2 – ніж; 3 – клини; 4 – барабани; 5 – кришки; 6 – труба для виведення конденсату.

Концентрат біомаси нагрівається у ванні до температури близько 100 °С і частина води при цьому випаровується. При обертанні барабанів назустріч один одному клітинна біомаса намазується на їхню поверхню тонким шаром і висушується до вологості 8-10 %. Суха біомаса знімається з поверхні барабанів ножами й обсіпається в поздовжні шнеки, звідки подається на фасування.

Двовальцова сушарка заглибного типу відрізняється від описаної вище тим, що в ній сушильні барабани занурені у ванну із клітинною суспензією й працюють самостійно (рис. 43). Суспензія у ванні перемішується мішалкою, а перед подачею у ванну підігривається в теплообміннику.

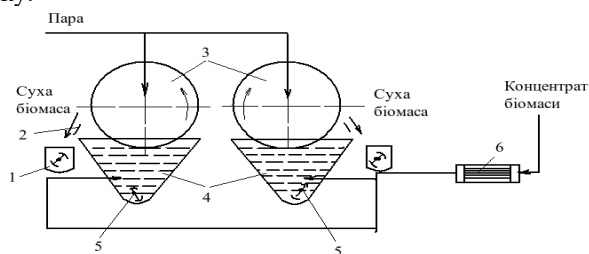


Рисунок 43 – Двовальцова парова сушарка заглибного типу

1 - шнек; 2 - ніж; 3 - барабани; 4 - ванни; 5 - мішалки; 6 - теплообмінник.

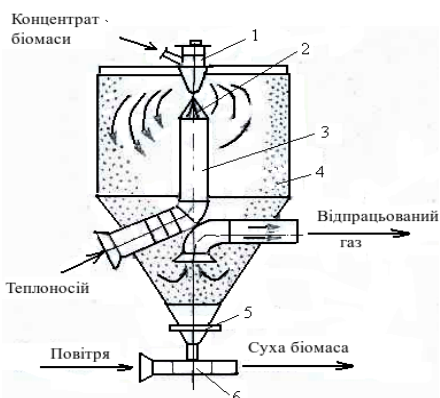


Рисунок 44 - Сушарка з відцентровим розпиленням

1 - відцентровий розпилювальний механізм; 2 - спрямовуючий апарат; 3 - газопровід для теплоносія; 4 - сушильна камера; 5 - затвор для збору продукту; 6 - труба пневмотранспорту.

Втрати білка на вальцових сушарках досягають 15 %.

Розпилювальні сушарки застосовуються у виробництві багатьох продуктів мікробіологічного синтезу. Вони різняться способом взаємодії матеріалу, що висушується, із сушильним агентом (прямоточні, протиточні або змішані), температурою й составом газу носія, розпилювальним механізмом та ін.

На рис. 44 представлена схема розпилювальної сушарки з відцентровим розпиленням і з нижнім підведенням сушильного агента.

Дріжджова суспензія безупинно подається під невеликим тиском у розпилювальний механізм, що являє собою диск із лопатами. Під дією відцентрової сили, що виникає при обертанні диска, розчин у вигляді плівки переміщується з безупинно зростаючою швидкістю до периферії диска й скидається у вигляді струмків, що розпадаються на дрібні краплі розміром 60-70 мкм.

Сушильний агент (нагріте повітря або димові гази, розведені повітрям) подається у сушильну камеру по газопроводу, що закінчується спрямовуючим апаратом. За допомогою спрямовуючого апарата створюється більша швидкість руху теплоносія на вході в сушильну камеру й одночасно надається спіралеподібний напрямок руху теплоносія. Початкова температура сушильного агента при сушінні кормових дріжджів досягає 300-350 °С. Розпилена дріжджова суспензія, вступаючи в контакт із теплоносієм, втрачає воду - висушується.

Випар води із дріжджової суспензії при високому ступені розпилення протікає практично миттєво, завдяки чому сушильний агент швидко охолоджується й температура його на виході із сушарки не

перевищує 90 °С. Висушені дріжджі також не прогриваються вище цієї температури.

Розпилювальні сушарки є досить складними й небезпечними пристроями в експлуатації, тому їхню роботу прагнуть автоматизувати.

Сушіння хлібопекарських дріжджів проводять у конвективних сушарках, у яких підведення теплоти й видалення пари води здійснюються за допомогою газоподібного сушильного агента – повітря, топкових газів, інертних газів та ін. Сушіння дріжджів відбувається у зваженому стані при температурі не вище 35 °С.

Застосовується контактне сушіння мікроорганізмів, при якому їх змішують із наповнювачами, що активно поглинають воду. Такий спосіб використовується, наприклад, при сушінні спор цвілевих грибів сухим активним вугіллям, яке змішують із спорами в співвідношенні 5:1. Контактним способом можна сушити дріжджі, змішуючи їх із крохмалем або борошном.

На вітчизняних фармацевтичних підприємствах добре зарекомендували себе роторні плівкові сушарки з жорстко закріпленими лопатами. Незважаючи на складність конструкції, роторні плівкові сушарки мають ряд переваг: сталість температури сушіння; відсутність зворотного перемішування матеріалу; високу інтенсивність видалення вологи й ощадливе використання тепла. Але головна перевага - це стерильні умови ведення сушіння й низькі втрати висушеного матеріалу.

1.4.5 Виділення життєздатних мікроорганізмів

До цієї групи відносяться біопрепарати, у яких потрібно зберегти життєздатність самих мікроорганізмів або високу біологічну активність їхніх метаболітів (наприклад, ферментів) до моменту їхнього застосування. До них відносяться хлібопекарські дріжджі, засоби захисту рослин, багато бактерій, віруси, антибіотики, ферменти та ін.

Одержання біопрепаратів, що містять життєздатні мікроорганізми, засновано на здатності мікроорганізмів при зневоднюванні припинити помітну життєдіяльність на тривалий час і відновляти її при наступному обводнюванні. Такий стан, коли метаболізм зворотно загальмований або припинений, називають анабіозом.

Мікроорганізми, виділені з культуральної рідини, необхідно висушити до певної вологості, у деяких випадках сполучити з наповнювачем або стабілізуючими добавками й розфасувати в зручну для зберігання й застосування тару.

Однак під час зневоднювання біомаси в клітках відбуваються істотні зміни. Ці зміни можуть привести до утворення нових небажаних сполук, до інактивації біологічно активних речовин і порушенню життєздатності клітин.

Вода в концентраті біомаси перебуває як у вільному, так і у зв'язаному стані. При сушінні видаляється позаклітинна й

внутрішньоклітинна вода. Причому, якщо видалення з біомаси позаклітинної води протікає порівняно легко, то для видалення води, зв'язаної з компонентами біомаси, потрібно значно більше енергії й необхідно підвищувати температуру сушіння, що обмежується термостійкістю мікроорганізмів.

Основна вимога до технології зневоднювання мікроорганізмів - це збереження їхньої життєздатності. Оскільки всі мікроорганізми є термолабільними, то їхнє сушіння варто проводити в м'якому режимі, тобто при невисокій температурі й невеликій тривалості.

Сублимаційне сушіння найбільш придатне для живих мікроорганізмів, деяких видів ферментів і інших термолабільних продуктів. У цьому випадку найменше інактивуються ферменти, добре зберігається життєздатність клітин.

Проведення сублимаційного сушіння під вакуумом (залишковий тиск 0,1-10 кПа) дає можливість значно знизити температуру процесу і тим самим зберегти клітинні структури в життєздатному стані.

Сублимаційне сушіння включає кілька послідовних етапів підготовки матеріалу: заморожування, сушіння сублимацією, упакування висушеного продукту.

Сублимаційному сушінню піддають концентрат суспензії мікроорганізмів, отриманий з культуральної рідини одним з механічних способів зневоднювання (фільтруванням, центрифугуванням та ін.). У концентровану суспензію мікроорганізмів додають у певній кількості так зване захисне середовище, що охороняє клітки від загибелі при заморожуванні й наступному висушуванні. Як захисні середовища використовують колоїдні й гідрофільні речовини (білки, амінокислоти, вуглеводи та ін.), які сповільнюють внутрішньоклітинне утворення льоду, зменшують концентрування електролітів і захищають клітки від глибокого незворотного зневоднювання. Підготовлена в такий спосіб клітинна суспензія надходить на заморожування.

Заморожування біомаси приводить до фізичних, біофізичних і біохімічних змін у клітці. У результаті кристалоутворення при заморожуванні відбувається ушкодження й руйнування клітинних мембран і інших структур клітки.

Щоб уникнути денатурації білків у процесі заморожування, варто підбирати оптимальні умови кристалізації води. Велике значення має швидкість заморожування. При повільному заморожуванні утворюються великі кристали льоду, що мають меншу поверхню випару, чим дрібні кристали, які утворюються при швидкому заморожуванні. Для одержання однорідної маси кристалів заморожування проводять швидко, підтримуючи температуру повітря в камері в інтервалі від мінус 20 до мінус 30 °С і забезпечуючи його інтенсивну циркуляцію.

Існує кілька способів заморожування біомаси: контактне заморожування на охолоджуваних полках, конвективне заморожування охолодженим газом, комбіноване заморожування (контакт і вентиляція), кондуктивне заморожування зануренням в охолоджену ванну. Вибір способу заморожування визначається властивостями мікроорганізмів, що піддаються сублімаційному сушінню.

Процес сублімаційного сушіння проводять періодичним способом у спеціальних апаратах - сублімаційних камерах, або субліматорах. Сублімаційні камери являють собою герметичні металеві горизонтальні апарати найчастіше у формі циліндра.

На рисунку 45 представлена принципова схема сублімаційної установки періодичної дії. Продукт, що висушується, розміщають на полках субліматора. Усередині полиць циркулює за допомогою насоса теплоносія, що прохолоджує полки при заморожуванні продукту або нагріває їх у період сушіння. Вакуум-насос створює необхідний вакуум і відкачує парогазову суміш із субліматора. Конденсація пар води відбувається в льодоконденсаторі 5, куди подається холодоагент від холодильної установки.

Процес сушіння методом сублімації льоду у вакуумі складається із двох періодів. У першому, коли видаляється вільна вода, сушіння протікає з постійною швидкістю, а в другому при видаленні зв'язаної води (10-15 %, що залишилися) швидкість сушіння падає. Перший період сушіння проводять при досить низьких температурах від мінус 8 до мінус 12 °С, а в другому періоді температуру поступово підвищують до температури навколишнього середовища. У деяких випадках для видалення останніх 2 % води продукт витримують при 60-70 °С, що вкрай негативно позначається на його якості.

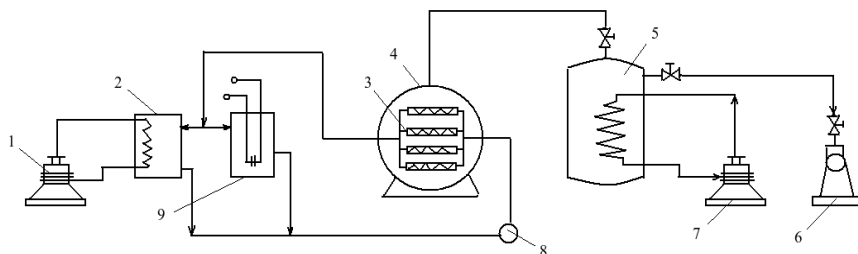


Рисунок 45 - Сублімаційна установка періодичної дії

1,7 - холодильні установки; 2 - бак для охолодження теплоносія; 3 - плити; 4 - субліматор; 5 - льодоконденсатор; 6 - вакуум-насос; 8 - насос; 9 - бак для нагрівання теплоносія.

1.5 Виробництво органічних кислот

Мікробіологічним синтезом можна одержати різні органічні кислоти - оцтову, молочну, бурштинову, ітаконову, гліконову та ін.

Вони застосовуються у фармацевтичній, хімічній, текстильній і інших галузях. Лимонна, оцтова й молочна кислоти, отримані мікробіологічним синтезом, застосовуються в харчовій промисловості (таблиця 1).

Таблиця 1 - Світове виробництво органічних кислот

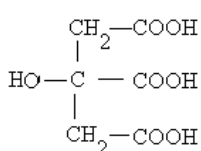
Кислота	Річний об'єм	Сировина	Вихід, %	Продуцент
Лимонна	400000 т	Меяса н-алкани	85 140	Aspergillus niger Candida lipolitika
Ітаконова	–	Глюкоза Сахароза	60	Aspergillus terreus
Молочна	30000 т	Глюкоза	90	Lactobacillus delbrueckii
Глюконова	30000 т	Глюкоза	95	Aspergillus niger
Оцтова (10 % розчин)	10 млн. т	Етанол	94	Acetobacter aceti
Пропіонова	–	Глюкоза	60	Propionibacterium shermanii

Нинішні масштаби виробництва стали можливі завдяки застосуванню різних джерел вуглецю.

1.5.1 Виробництво лимонної кислоти

Лимонна кислота є триосновною оксикислотою $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$, що кристалізується з водяних розчинів з одною молекулою води у вигляді безбарвних прозорих ромбічних призм.

Структурна формула лимонної кислоти:



Моногідратна лимонна кислота має молекулярну масу 210, щільність 1540 кг/м^3 і температуру плавлення $70-75 \text{ }^\circ\text{C}$.

Кристалізаційна вода втрачається при зберіганні й особливо при нагріванні до $40-45 \text{ }^\circ\text{C}$, при температурі $100 \text{ }^\circ\text{C}$ втрачається повністю.

Безводна лимонна кислота має молекулярну масу 192 і температуру плавлення $153 \text{ }^\circ\text{C}$. При нагріванні до $175 \text{ }^\circ\text{C}$ лимонна кислота розкладається.

Кристалічна лимонна кислота випускається трьох сортів: екстра, вищий і перший.

Завдяки своїм смаковим яkostям і фізико-хімічним властивостям лимонна кислота широко застосовується у фармацевтичній, харчовій,

хімічній, шкіряній, металургійній промисловості. Додавка в невеликих кількостях лимонної кислоти до овочів, фруктів, соків зберігає їхній натуральний колір, надає захисну дію аскорбіновій кислоті при виробництві ковбас, сирів, застосовується як антиокислювач для жирів і жироподібних речовин. Також лимонна кислота широко застосовується як допоміжна речовина при виробництві таблеток.

Технологія одержання лимонної кислоти способом глибинної ферментації включає наступні стадії:

- одержання посівного матеріалу;
- підготовка сировини;
- підготовка й стерилізація повітря;
- ферментація;
- відділення біомаси (міцелію);
- виділення з культуральної рідини лимонної кислоти й одержання її в кристалічному виді.

Технологічна схема одержання лимонної кислоти наведена на рис. 46.

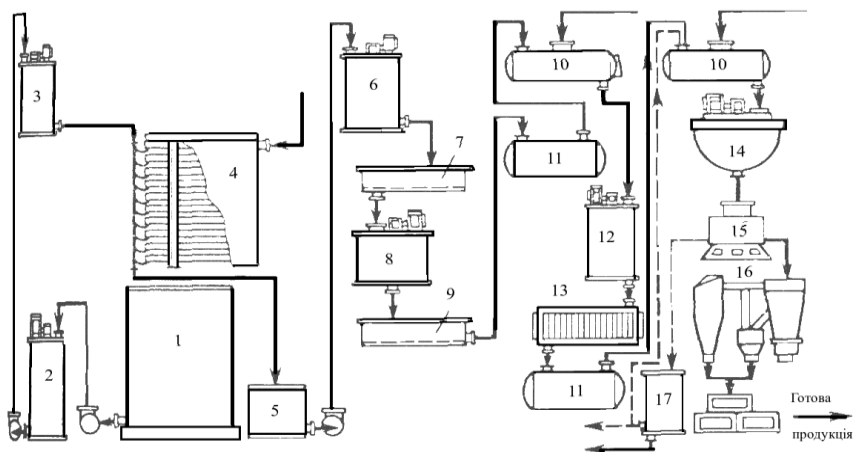


Рисунок 46 - Апаратурно-технологічна схема одержання лимонної кислоти

1 - сховище м'яса; 2 - резервуар для розчинення м'яса; 3 - стерилізатор; 4 - камера для зброження; 5 - збірник зброженої рідини; 6 - нейтралізатор; 7 і 9 - нутч-фільтри; 8 - реактор; 10 - вакуум-випарний апарат; 11 - збірники; 12 - повторний розчинник; 13 - фільтрпрес; 14 - кристалізатор; 15 - центрифуга; 16 - сушарка; 17 - збірник.

Одержання посівного матеріалу

Музейна культура спеціального штаму *Aspergillus niger* зберігається у вигляді сухих спор (конідій) у суміші з активованим вугіллям. Вихідну культуру розмножують на агаризованому середовищі, а потім у колбах і кюветках – на твердому живильному середовищі при температурі 32 °С і тривалості 2-7 доби на кожній стадії. На поверхні твердого живильного середовища розвивається щільна міцеліальна плівка, на якій утворюються конідії. Їх збирають за допомогою вакууму, змішують зі стерильним наповнювачем (тальк або активоване вугілля) і висушують при температурі 32 °С. Готовий посівний матеріал зберігають у банках або колбах (0,5-1 л) не більше 6 місяців.

Вирощування посівного міцелію роблять у посівних ферментаторах об'ємом 10 м³.

За 8-12 годин до засівби мелясного живильного розчину спори (конідії) гриба-продуцента в кількості 8 г замочують у стерильному живильному середовищі, яке містить в 1 л 50 г цукру, 2,5 г NH₄NO₃, 0,16 г KH₂PO₄ і 0,25 г MgSO₄·7H₂O. Спорову суспензію витримують при температурі 32 °С, періодично перемішуючи.

Приготовлену спорову суспензію через стерильний інокулятор, підключений до спеціального штуцера на кришці ферментатора, подають у готовий мелясний розчин з температурою 36-37 °С.

Після засіву ферментатора в нього відразу подають стерильне повітря й починають перемішування культурального розчину. Аерацію й перемішування повітрям ведуть протягом усього процесу вирощування міцелію при надлишковому тиску повітря у верхній частині ферментатора 0,02-0,03 МПа.

Через 10-12 годин, коли починається розгалуження міцелію, спостерігається сильне спінювання культурального розчину. Щоб уникнути викидів піни в розчин вводять невеликими порціями стерильний піногасник - олеїнову кислоту.

Вирощування міцелію ведуть при температурі 35-36 °С, регулювання температури проводять шляхом підігріву культурального розчину повітрям, що подається на аерацію, або охолодженням водою через сорочку ферментатора.

Основною сировиною для виробництва лимонної кислоти є меляса. Меляса багата вуглеводами й іншими органічними й мінеральними речовинами. Вона має складний і непостійний хімічний склад, що залежить від якості буряка й технології його переробки на цукрових заводах.

З метою визначення придатності меляси для виробництва лимонної кислоти її на початку піддають хімічному, біохімічному й мікробіологічному контролю. У мелясі визначають: вміст сухих речовин, вміст сахарози, інвертного цукру, доброякісність, величину рН, буферність, загальний зміст мінеральних речовин (золу), вміст кальцію, магнію, калію, фосфору, заліза,

летучих кислот і сірка(VI) оксиду, загального азоту й амінокислот, колоїдів, нафтопродуктів, кольоровість і здатність до піноутворення.

Меляса вважається придатною для глибинного способу ферментації, якщо в лабораторних умовах біохімічним шляхом при ферментації в поверхневих умовах протягом 7 діб штамом гриба-продуцента в 15%-му розчині по цукру в склянках з висотою шару 9 см і площею 0,42 дм², з лимонної кислоти утворюється не менш 1,8 кг/м² за добу.

Попередній мікробіологічний аналіз меляси дає уяву про кількість у ній мікрофлори. Меляси, що містять більше 20000 мікроорганізмів в 1 г, є непридатними для виробництва лимонної кислоти.

При зберіганні меляси в баках-сховищах виробничою лабораторією ретельно відпрацьовується режим її підготовки до ферментації, тобто визначаються оптимальні дозування шавлевої кислоти або кальцинованої соди, жовтої кров'яної солі, калію фосфорнокислого однозаміщеного, цинку сірчанокислого, амонію хлористого, амонію шавлевокислого, трилону Б, фурациліну й левоміцетину. Отримані дані передаються в цех глибинної ферментації й служать керівництвом для готування виробничих розчинів з меляси, що втримується в кожному баку.

3 баків-сховищ меляса шестерним насосом, установленим у варильному відділенні, подається в напірні ємності, розташовані над вагами.

Готування мелясного розчину для вирощування посівного міцелію

У варильний казан, що містить нагріту до кипіння воду в об'ємі 6,5 м³, завантажують при перемішуванні близько 400 кг меляси й розчин кип'ятять 10 хвилин. Процес кислотоутворення гальмують солі кальцію й заліза, які присутні в мелясі. При вмісті в ній окису кальцію 0,4 % і вище мелясні розчини необхідно обробляти шавлевокислим амонієм у кількості, еквівалентній вмісту кальцію для його повного осадження з розчину у вигляді шавлевокислого кальцію. Після введення шавлевокислого амонію розчин кип'ятять 5-10 хвилин, потім доводять рН розчину до величини 6,8-7,2 додаванням сірчаної або шавлевої кислоти, або кальцинованої соди й знову кип'ятять 10-20 хвилин. Для осадження солей заліза в розчин додають жовту кров'яну сіль і кип'ятять 5-10 хвилин.

Після цього в розчин вносять живильні солі: хлористий амоній, трилон Б і сірчанокислий магній, знову кип'ятять 5 хв і залишають на 1 годину для осадження солей, відключивши мішалку.

Потім мелясний розчин за допомогою відцентрового насоса направляють у стерилізаційну колону безперервної дії, де його стерилізують при температурі 110-115 °С. Стерильний розчин, минаючи теплообмінник, надходить у посівний ферментатор, де розчин стерилізується додатково протягом 40-60 хв.

Потім у сорочку посівного ферментатора подається вода. При охолодженні мелясного розчину до температури 70 °С у його при перемішуванні вводять розчин антисептика (фурацилін).

При охолодженні розчину до температури 35-36 °С у його вносять стерильні розчини живильних солей (однозаміщений фосфорнокислий калій або двозаміщений фосфорнокислий амоній, сірчаноокислий цинк) і розчин левоміцетину для підкріплення гриба. Величина рН готового розчину повинна бути в межах 6,5-6,8.

Готування живильного розчину для ферментації

Готування розчину для основних ферментаторів складається з наступних операцій:

- готування, стерилізація розчину живильних солей і завантаження їх у ферментатор;
- готування, стерилізація мелясного розчину й завантаження його у ферментатор.

Готування сольового розчину полягає в наступному: у нагріту до кипіння воду при перемішуванні вводять солі хлористого амонію, калію фосфорнокислого однозаміщеного або амонію фосфорнокислого двозаміщеного, сірчаноокислого цинку. Отриманий розчин кип'ятять 5 хв, стерилізують у стерилізаційній колоні при температурі 120-125 °С і через теплообмінник переводять у ферментатор.

Мелясний розчин готують у вертикальному казані: у нагріту до кипіння воду завантажують при перемішуванні близько 4000 кг меляси й кип'ятять 5 хв. Після обробки щавлевокислим амонієм для осадження кальцію, рН розчину доводять до 6,8-7,2 додаванням сірчаної або щавлевої кислоти й знову кип'ятять 10 хв. Потім у розчин додають жовту кров'яну сіль для осадження заліза. Розчин кип'ятять і знову коректують рН, потім стерилізують у колоні при температурі 110-115 °С и через теплообмінник направляють у ферментатор.

Після заповнення ферментатора мелясним розчином останній при перемішуванні повітрям охолоджують водою через сорочку до температури 32-34 °С, потім з посівного ферментатора за допомогою стисненого повітря в мелясний розчин додають вирощений міцелій.

Біосинтез лимонної кислоти відбувається в основному ферментаторі об'ємом 100 м³.

Після заповнення основного ферментатора виробничим розчином його вміст при перемішуванні повітрям охолоджують до температури 33-34 °С через сорочку. Потім з посівного ферментатора по комунікаціях за допомогою стисненого повітря в розчин переводять підрослий міцелій.

Виробничий цикл починається з моменту засівби основного ферментатора. У перші 2-3 години після посіву у ферментатор подається повітря в кількості 350-400 м³/год. Потім подачу повітря поступово збільшують залежно від стану зануреного міцелію. При вспінюванні розчину

додають олеїнову кислоту. У процесі росту гриба й продукування лимонної кислоти температуру культурального розчину підтримують у межах 31-32 °С, для цього через сорочку ферментатора пропускають холодну воду.

Необхідно враховувати, що навіть при короткочасному впливі підвищеної температури розростається міцелій малоактивний до біосинтезу лимонної кислоти. Внаслідок утворення надлишкової біомаси й підвищення інтенсивності дихання зануреної культури зростає непродуктивна витрата сахарози. При низькій температурі (26 °С і нижче), навпаки, ріст і розвиток зануреного міцелію гальмується.

Таким чином, як при підвищенні, так і при зниженні температури, характер обміну речовин у гриба порушується, у результаті чого утворюється велика кількість побічних кислот.

Через 22-24 години після засіву починається інтенсивне продукування лимонної кислоти. У зв'язку з тим, що запас цукру в розчині зменшується, у ферментатор вводять стерильний мелясний розчин з 20-25 % вмістом цукру.

Час початку підживлення визначають по кислотності й по вмісту цукру в культуральному розчині. Підживлення доцільно починати при кислотності не нижче 1,5 % і концентрації цукру не менш 0,6-0,8%.

Підгодівля гриба мелясним розчином ведеться протягом 6-7 діб по 0,5 м³ три рази в зміну.

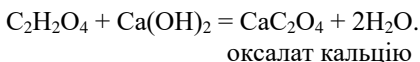
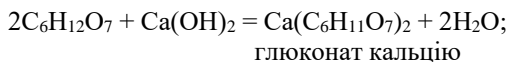
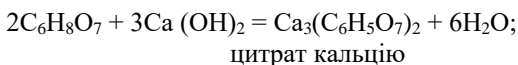
Закінчення виробничого циклу визначають по приросту кислотності в останню добу процесу й вмісту цукру у ферментованому розчині. Процес біосинтезу завершується, якщо кислотність у двох пробах, відібраних з ферментатора з інтервалом 4-8 годин, не наростає, і концентрація цукру знизилася до 0,2-0,3 %. При дотриманні цих показників процес ферментації зупиняють. Для цього випускають воду із сорочки ферментатора, припиняють подачу повітря, розчин нагрівають до 60 °С, а при наявності інфекції до 80 °С, витримують 1 годину. Після цього ферментований розчин тиском повітря переводиться в ємності нефільтрованого розчину, звідки відцентровим насосом його подають на барабанний вакуум-фільтр для відділення від міцелію.

Відфільтрований розчин надходить у ємність ферментованого розчину, що перебуває під вакуумом, а міцелій надходить у ємність для міцелію.

Ферментований розчин має кислотність 9-12 %, залишковий цукор 0,2 % і інші органічні й неорганічні домішки, що переходять із меляси. У цьому розчині перебуває лимонна кислота в кількості 82-86 %, а також побічні кислоти щавлева (4-8) % і глюконова (4-8) %.

Виділення лимонної кислоти з розчину засновано на реакції нейтралізації. Для цього розчин у нейтралізаторі підігрівають до температури 55-70 °С и нейтралізують вапняним молоком. При цьому утворюється

кальцієва сіль лимонної кислоти, а також у невеликих кількостях кальцієві солі глюконової і щавлевої кислот по наступних реакціях:



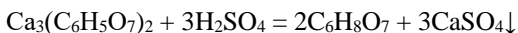
Кальцієві солі лимонної й щавлевої кислот випадають в осад. Кальцієва сіль глюконової кислоти, залишкові цукри, основна частина мінеральних і органічних речовин меляси залишаються в розчині, тому осадження лимонної кислоти контролюють за допомогою рН і універсального індикаторного паперу.

Осад цитрату кальцію відфільтровують. Після фільтрації цитрат кальцію ретельно промивають гарячої (не нижче 95 °С) водою, тому що розчинність цитрату кальцію збільшується зі зниженням температури.

Промитий цитрат кальцію має вологість 65-70%, забруднений крім оксалату кальцію домішками, що потрапили з вапна, а також органічними речовинами білкового характеру (спори гриба, частки міцелію).

Зберігання вологого цитрату кальцію тривалий час неприпустимо, тому що внаслідок розвитку мікробіологічних процесів губиться щодоби до 10 % лимонної кислоти.

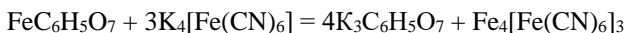
Відділення цитрату кальцію від оксалату кальцію проводять шляхом проведення реакції із сірчаною кислотою:



У результаті реакції в розчині утворюється лимонна кислота, а в осаді - сульфат кальцію (гіпс).

Оксалат кальцію залишається в осаді, тому що для його розщеплення в присутності вільної лимонної кислоти потрібен великий надлишок сірчаної кислоти.

Після закінчення розкладання цитрату кальцію проводять осадження розчинних солей заліза з розчинів лимонної кислоти. Для цього в реакційну масу додають жовту кров'яну сіль.



Гіпсовий шлам, що утворився, відокремлюють від розчину лимонної кислоти на стрічковому вакуум-фільтрі. При промиванні гіпсового шламу

необхідно прагнути до мінімально можливого розведення розчину лимонної кислоти промивною водою й максимальній повноті відмивання шламу.

Отриманий розчин лимонної кислоти випарюють у вакуум-випарних апаратах, виготовлених з нержавіючої сталі. Випарювання води приводить до підвищення концентрації розчиненого гіпсу й випаданню його в осад. Тому випарювання ведуть у два прийоми із проміжним звільненням розчину від осаду гіпсу.

Перше випарювання розчину лимонної кислоти проводять у вакуум-випарному апарату до густини 1260-1280 кг/м³. Така густина розчину відповідає концентрації лимонної кислоти 700 г/л, гіпс практично не розчинюється й цілком випадає з розчину в осад. Потім упарений розчин відцентровим насосом перекачується в напірну ємність для знебарвлення його активованим вугіллям.

Після перемішування знебарвленого розчину з вугіллям протягом 30-60 хвилин при температурі 70 °С його з напірної ємності самопливом подають на фільтр-прес для відділення гіпсу й відпрацьованого вугілля. Прозорий розчин лимонної кислоти надходить у збірник відфільтрованого основного розчину, звідки потім передається у вакуум-апарат для другого випарювання. Процес випарювання ведуть до концентрації лимонної кислоти 69-71 %, розраховуючи на безводну кислоту (1000-1050 г/л).

Концентрований розчин після пропущення через механічний фільтр (металева сітка + марля) направляється в кристалізатор. Заповнивши кристалізатор розчином лимонної кислоти, у сорочку подають холодну воду й включають мішалку, що безупинно працює до закінчення вивантаження утфеля (суміш кристалів і маткового розчину) у центрифугу. Затравку у вигляді кристалів лимонної кислоти розміром близько 0,25 мм у кількості 0,05 % (по масі розчину, що кристалізується) вносять при температурі близько 38 °С.

Процес кристалізації триває 18-24 години.

Кристали лимонної кислоти відокремлюють на центрифuzі доти, поки практично не припиняється відділення маткового розчину. Після цього кристали на ходу центрифуги промивають невеликою кількістю води (холодної), а потім вивантажують і направляють на сушіння. Після центрифугування кристали мають вологість 2-3 %.

Перші маткові розчини, отримані при центрифугуванні основних розчинів, надходять у корито, а потім відцентровим насосом у секцію перших маткових розчинів. Перший матковий розчин нагрівають, обробляють активованим вугіллям, потім фільтрують й подають на друге упарювання, кристалізацію, центрифугування.

Другі маткові розчини, що виходять при центрифугуванні перших маткових розчинів, надходять у секцію других маткових розчинів, де вони переробляються точно також, як і перші маткові розчини.

Треті маткові розчини, що виходять при центрифугуванні других маткових розчинів, надходять у секцію третіх маткових розчинів. Потім їх приєднують до слабо концентрованих ферментованих розчинів і нейтралізують по звичайному режиму.

Сушіння кристалів лимонної кислоти для видалення поверхневої вологи відбувається в сушильній установці барабанного типу. Температура повітря, що подається в барабан, дорівнює 70 °С.

Готова кислота надходить у бункер, що розділений перегородкою на 2 частині: для основної й маткової кислоти. З метою відділення грудок кристали лимонної кислоти просівають на віброситі. Добове вироблення складається з кислоти, отриманої з основних, перших і других маткових розчинів. Масова частка основної речовини не менш 99,5 % (на моногідрат).

1.5.2 Виробництво оцтової кислоти

Оцтова кислота CH_3COOH – безбарвна рідина з різким запахом. Випускають: столовий оцет (5-9 %); оцтову есенцію (70-80 %), безводну або крижану оцтову кислоту (98-99,8 %).

Бактерії роду *Acetobacter* здатні окисляти етиловий спирт в оцтову кислоту. Реакцію окислювання етилового спирту каталізує фермент алкогольоксидаза.



У промислових умовах мікробіологічний синтез оцтової кислоти проводять безперервним способом при глибинному культивуванні оцтовокислих бактерій у батареї послідовно з'єднаних ферментаторів. Схема виробництва наведена на рис. 47.

Технологічний процес виробництва оцтової кислоти включає наступні основні стадії:

- одержання посівного матеріалу;
- підготовка сировини;
- ферментація;
- освітлення й розлив готового продукту.

Для отримання посівного матеріалу у лабораторії вирощують оцтовокислі бактерії на рідкому живильному середовищі в колбах на качалках, а потім у лабораторному ферментаторі місткістю 30 л.

Сировиною для одержання оцтової кислоти є етиловий спирт ректифікат або сирець, очищений від сивушних масел.

Ферментацію проводять у батареї, що складається з п'яти послідовно з'єднаних ферментаторів обладнаних мішалкою, барботером і змієвковим теплообмінником. У перший ферментатор завантажують посівний матеріал і безупинно подають живильне середовище, в якому сумарна концентрація

етилового спирту й оцтової кислоти становить 6,4-6,7 %, а також стерильне повітря. При цьому створюються оптимальні умови для швидкого розмноження оцтовокислих бактерій. Перший ферментатор є генератором оцтовокислих бактерій для всіх наступних апаратів; у ньому також відбувається окислювання етилового спирту в оцтову кислоту.

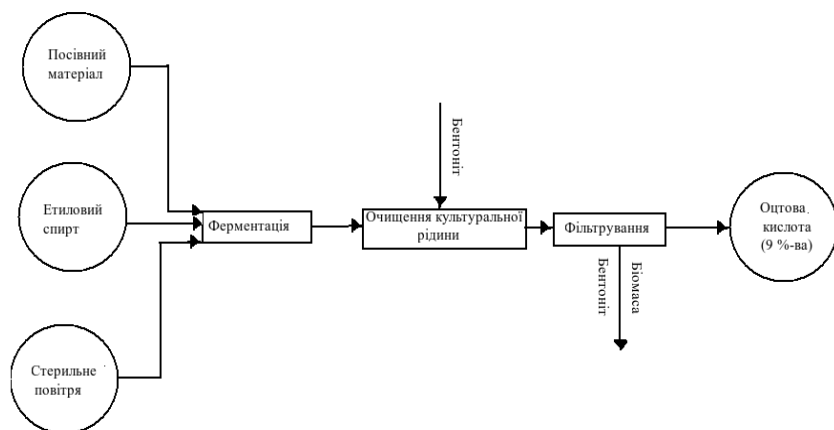


Рисунок 47 - Блок-схема виробництва оцтової кислоти

Культуральна рідина передається з ферментатора у ферментатор за рахунок тиску, створюваного повітрям. У кожному ферментаторі забезпечуються умови, що сприяють інтенсивному окислюванню етилового спирту в оцтову кислоту. Для підтримки потрібної концентрації спирту в другий, третій і четвертий апарати додають 40 % етиловий спирт. Температура й інтенсивність аерації від ферментатора до ферментатора знижуються: якщо в першому апараті температура дорівнює 28 °С, а інтенсивність аерації 0,35-0,40 м³/(м³·хв), то в останньому апараті, відповідно, 25 °С і 0,1-0,15 м³/(м³·хв).

Культуральна рідина виводиться з п'ятого ферментатора з концентрацією оцтової кислоти не нижче 9 і не вище 9,3 %. З 100 л безводного етилового спирту одержують 75-90 кг оцтової кислоти.

Для освітлення в розчин оцтової кислоти додають бентоніт і невелику кількість лимонної кислоти. Після перемішування освітлений розчин оцтової кислоти подають на фільтрпрес. Фільтрат, що являє собою 9 % оцтову кислоту (столовий оцет), подають у збірник готового продукту, з якого здійснюють розлив.

1.5.3 Виробництво молочної кислоти

Молочна кислота була виявлена вперше в скислому молоці, звідси й відбулася її назва. Молочна кислота $C_3H_6O_3$ являє собою органічну одноосновну кислоту. Гідроксильна група може перебувати у двох положеннях, тому розрізняють два ізомери молочної кислоти:



Молочна кислота може бути отримана як хімічним, так і мікробіологічним синтезом. Продуцентом молочної кислоти є бактерії *Bacterium delbrückii*, які є гомоферментативними термофільними бактеріями з оптимумом розвитку при температурі 48-50 °С. Сировиною для одержання молочної кислоти можуть бути різні вуглеводи. У промисловості кислоту одержують із таких видів сировини, у яких містяться глюкоза, сахароза й мальтоза.

Реакція утворення молочної кислоти:



Практичний вихід у процесі бродіння досягає 90-91 % до маси цукру.

Технологія виробництва молочної кислоти відрізняється тим, що процес протікає в анаеробних умовах (немає стадії підготовки повітря) і при підвищеній температурі (знижується небезпека зараження сторонньою мікрофлорою). Це виявилось можливим завдяки анаеробності й термофільності молочнокислих бактерій.

Процес виробництва молочної кислоти включає наступні основні стадії (схема на рис. 48):

- одержання посівного матеріалу;

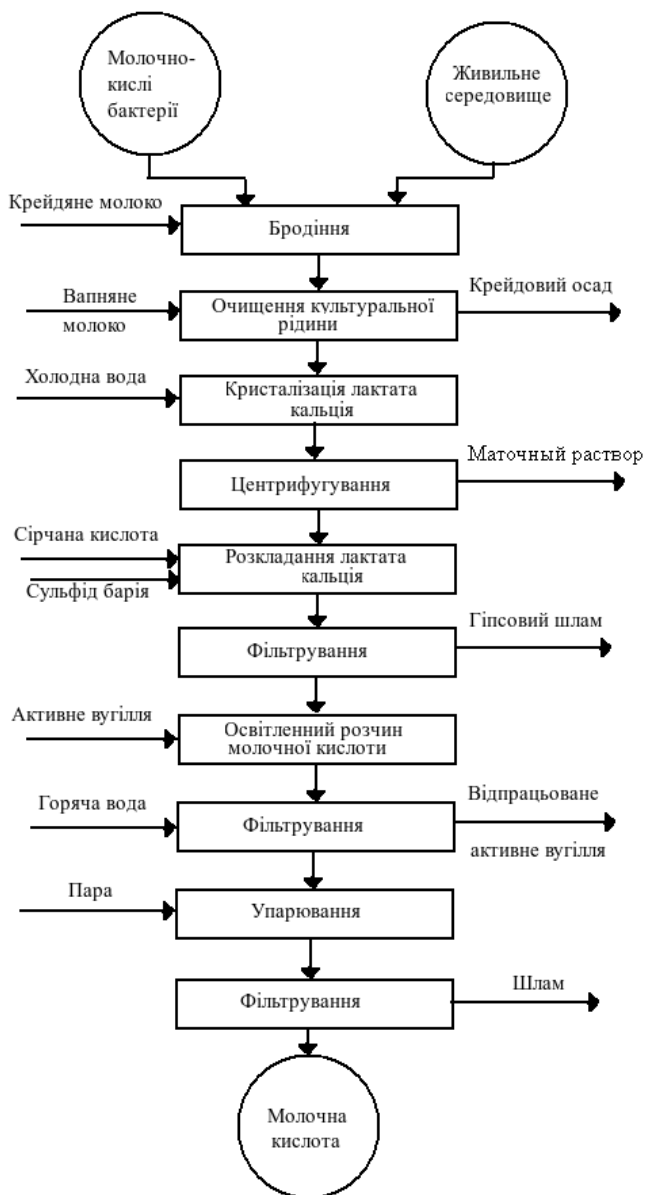


Рисунок 48 - Схема виробництва молочної кислоти

- готування живильного середовища

- молочнокисле бродіння;
- обробка зброженого розчину й фільтрування;
- розщеплення лактату кальцію;
- упарювання молочної кислоти.

Одержання посівного матеріалу

Вихідну культуру висівають із пробірки в три пробірки із живильним середовищем. Культуру із пробірок пересівають у колбу об'ємом 500 мл, потім у сулію об'ємом 10 л і, нарешті, у культиватор. Об'єм посівного матеріалу повинен становити не менш 30 % від об'єму бродильного апарата. Перші дві стадії проводять на живильному середовищі із солодового сусла, третю – на середовищі із суміші сусла й живильного середовища для виробничого культивування (1:1) і останню – на живильному середовищі для виробничого культивування. Температура культивування 48-50 °С, тривалість кожної стадії 20-24 год. Середовища повинні бути стерильними і містити стерильну крейду. На заводах чисту культуру готують тільки на початку виробництва. Надалі у якості посівного матеріалу використовують культуральну рідину з попереднього бродильного апарата.

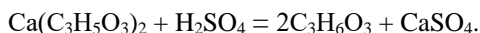
Молочнокисле бродіння проводять в апаратах (чанах) циліндричної форми зі сферичним дном місткістю 25-45 м³, виготовлених з алюмінію або нержавіючої сталі й постачених зміювиками, по яких циркулює гаряча вода. Живильне середовище готують безпосередньо в бродильному апараті. Меляса й рафінадна патока надходять в апарат по трубах самопливом, а цукор-сирець, попередньо розчинений у воді, зливають у бродильний апарат. Крейдове «молоко» готують в окремій ємності.

Апарат на 2/3 робочого об'єму заповнюють водою, розчиняють мелясу й рафінадну патоку, доводячи вміст цукру в розчині до 3-4 %. Розчин нагрівають до 70 °С і пастеризують при цій температурі протягом 1 години. Потім розчин охолоджують до 48-50 °С, додають у нього 15 % солодових паростків (до маси внесеного цукру) і вносять посівну культуру в об'ємі 20 % об'єму апарата. Через 6 год культивування живильне середовище розмішують періодичним барботуванням повітря. Коли кислотність досягає 0,5-0,6 %, розраховуючи на молочну кислоту, кожні 1,5-2 години додають невеликими порціями крейдове молоко. У результаті нейтралізації молочної кислоти утворюється лактат кальцію.

Збиток цукру у бродильному апараті компенсують, додаючи у кілька прийомів 50 % розчин цукру-сирцю і підтримуючи концентрацію цукру в середовищі 3-4 %. Уводять таку кількість цукру, щоб вміст лактату кальцію в культуральній рідині наприкінці бродіння був не більше 15 %, а вміст не зброженого цукру 0,2-0,5 %. Бродіння триває 6-8 діб. Після закінчення процесу культуральну рідину в бродильному апараті нагрівають до 70-80 °С і нейтралізують вапняним молоком до слаболужної реакції. При нейтралізації коагулюють білки, осаджується залізо й руйнуються сліди цукру, що залишився. Потім культуральну рідину відстоюють і направляють на

прогрітій парою фільтрпрес. Фільтрування проводять при температурі розчину лактату кальцію 70-80 °С, Отриманий фільтрат упарюють до концентрації 27-30 %, потім прохолоджують до 25-30 °С і витримують у кристалізаторі 36-48 годин. Кристалізацію закінчують при залишковій концентрації лактату кальцію в матковому розчині не більше 6 %.

Кристалічний лактат кальцію відокремлюють на центрифугі, промивають холодною водою й розплавляють. Розкладання лактату кальцію сульфатною кислотою з виділенням вільної молочної кислоти проводять при 60-70 °С. Реакція протікає відповідно по рівнянню:



Розчин молочної кислоти обробляють ГЦФК (гексаціанофератом (II) калію) для осадження сполук заліза, сульфатом натрію й сульфідом барію для осадження важких металів і миш'яку, активованим вугіллям для видалення барвників. Після обробки суміш фільтрують, а осад гіпсу на фільтрі промивають для витягу молочної кислоти, що залишилася. У результаті одержують розчин молочної кислоти з концентрацією 18-20 %. Для підвищення концентрації до 40 % розчин упарюють у вакуум-апаратах, потім ще раз освітлюють активним вугіллям і обробляють ГЦФК. Після освітлення активоване вугілля відокремлюють на фільтрпресі, а молочну кислоту зливають у збірник готової продукції.

Молочну кислоту одержують також і концентрації 70 %, для чого проводять повторне упарювання у вакуум-апаратах з наступним фільтруванням на фільтрпресах. 70 % молочна кислота випускається в рідкому вигляді або у вигляді пасти, що одержують додаванням до концентрованої кислоти невеликої кількості крейди.

1.6 Одержання ферментних препаратів

1.6.1 Джерела ферментів

Ферменти - біокатализатори, що утворюються в клітині і являють собою прості або складні білки. Багато ферментів складаються із двох компонентів: з білкового компонента (апоферменту) і пов'язаної з ним органічної сполуки небілкової природи (коферменту).

Ферменти не тільки забезпечують протікання багатьох складних біохімічних процесів у клітках рослин, тварин і мікроорганізмів, але й прискорюють їх у тисячі разів. Каталітична дія ферментів характеризується високою специфічністю. Найскладніші хімічні реакції під дією ферментів протікають у водяних розчинах при звичайній температурі й тиску протягом декількох секунд і навіть часток секунди. Виділені з біологічного матеріалу ферменти зберігають свою активність і можуть бути використані як біокатализатори багатьох біохімічних реакцій.

Основна частина вироблених ферментів використовується для виробництва миючих засобів (35 %), переробки крохмалю (30 %), для виробництва вина й соків (10 %).

Ферменти знаходять застосування в харчовій промисловості у виробництві хліба, сиру, у шкіряній промисловості для знезаражування шкіряної сировини й дуже багатьох інших галузях народного господарства. Високоочищені ферментні препарати широко використовуються в медицині. У цей час більше 50 ферментних препаратів застосовується в медицині і їхнє число з кожним роком збільшується.

Ферменти в медицині використовуються в наступних напрямках:

- для покриття ферментної недостатності в організмі;
- для видалення із крові шкідливих метаболітів;
- для боротьби із тромбозом;
- для боротьби з накопиченням ендотоксинів у процесі загоєння опіків і ран;
- в онкологічній практиці (для діагностичних цілей, клінічних аналізів);
- для одержання антибіотиків із широким спектром дії.

Основні джерела ферментів - тканини й органи тварин, рослини й мікроорганізми. Перевага мікроорганізмів як джерел ферментів у тім, що вони швидко ростуть на дешевих живильних середовищах і синтезують велику кількість різних ферментів. Виділені із природних джерел мікроорганізми синтезують одночасно комплекс різних ферментів, а мутантні штами здатні продукувати тільки який-небудь один промислово важливий фермент, причому в більших кількостях. Серед мікроорганізмів-продуцентів ферментів практичний інтерес представляють мікроскопічні гриби роду *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*, спороносні бактерії роду *Bacillus*, дріжджі роду *Saccharomyces* і ін.

Найменування ферментних препаратів складається зі скороченої назви основного ферменту й видової назви мікроорганізму-продуцента. Наприклад, найменування препарату «протосубтілін» містить назву протеолітичного ферменту («прото») і видову назву культури-продуцента *Bacillus subtilis*. Найменування препарату містить також інформацію про спосіб культивування мікроорганізмів. Якщо препарат отриманий при поверхневому культивуванні, то він позначається індексом «П», якщо при глибинному - індексом «Г».

Промислові препарати ферментів містять різні домішки - баластові речовини. Про ступінь концентрування й очищення ферментного препарату свідчить цифра в його найменуванні, що стоїть перед індексом «х». Індекс «2х» означає, що препарати ферментів отримані у вигляді концентрованих сиропів, звільнених від нерозчинних речовин. Сухі ферментні препарати мають у найменуванні індекс «3х». Ферментні препарати з індексами «2х» і «3х» є технічними.

Препарати ферментів, очищені різними методами, позначаються індексом «10х», а фракціоновані - «15х». Високоочищені, але не кристалічні ферментні препарати, які містять до 25 % баластових речовин і отримані методом концентрування на ультрафільтраційних установках з наступним сушінням у розпилювальних сушарках, залежно від ступеня очищення позначаються індексами «20х», «30х».

1.6.2 Одержання ферментних препаратів поверхневим способом

Виробництво ферментних препаратів засновано на вирощуванні мікроорганізмів і є типовим мікробіологічним виробництвом. Традиційно продуценти ферментів вирощували поверхневим способом на твердих субстратах. Зараз виробництво ферментів здійснюється головним чином глибинним методом в асептичних умовах у біохімічних реакторах з механічною мішалкою. Культивування продуцентів ферментів може проходити безперервним способом. Звичайно утворення ферментів не збігається з фазою інтенсивного зростання мікроорганізмів і починається лише в кінці експонентної фази розвитку культури, коли швидкість росту знижується.

Технологічний процес виробництва ферментних препаратів при поверхневому культивуванні складається з наступних стадій:

- отримання посівного матеріалу;
- приготування живильного середовища;
- вирощування мікроорганізму-продуценту;
- сушка культури або виділення із неї очищених препаратів ферментів.

Посівним матеріалом служить культура мікроскопічних грибів, вирощена на твердому живильному середовищі, а також спори (конідії) або міцеліальна маса продуцента, вирощена на рідкому живильному середовищі в глибинних умовах.

У якості твердого живильного середовища найчастіше використовують зволожені пшеничні відруби, у які додають 5-10 % тииси, щоб середовище було пухким. Після стерилізації живильне середовище засівають суспензією конідій (з розрахунку 500 тис. конідій в 1 мл на 10-15 г відрубів) і розкладають шаром товщиною 10-15 см по стерильних посівних кюветках. Закриті кюветки поміщують у вирощувальні камери, де підтримують певну вологість (у межах 55-95 %) і температуру (28-32 °С). Вирощування триває протягом 3 діб, після чого посівні кюветки витримують ще 3 доби при температурі 8-10 °С. Конідії в підсохлій культурі можуть зберігати здатність до проростання впродовж 15-20 діб.

Одержання посівного матеріалу культивуванням продуцента в глибинних умовах на рідкому живильному середовищі проводять у ферментаторах місткістю 8-10 л протягом 24-30 год при температурі 30 °С.

Отриманий посівний матеріал - глибинну культуру гриба - вносять у стерилізатор і змішують зі стерильними зволженими відрубками з розрахунку 1-2 % вихідного посівного матеріалу до маси відрубів. Після внесення посівної культури вологість повинна бути не нижче 58 %.

Основною сировиною для вирощування мікроорганізмів-продуцентів ферментів є відходи сільського господарства й підприємств харчової промисловості - пшеничні відрубай, зернові лушпайки, бурякові вижимки, картопляна мезга й ін. Для одержання пухкої структури до середовищ додають тирсу (5-10 %), солодові паростки (15-20 %), вівсяну лушпайку. Пшеничні відруби є найціннішою сировиною для живильних, середовищ тому що містять необхідні для росту й розвитку мікроорганізмів білки, крохмаль, жир, а також незамінні амінокислоти (метіонін, триптофан, лізин), мінеральні солі, мікроелементи й інші речовини.

Підготовка твердих живильних середовищ для вирощування мікроорганізмів полягає в наступному. Пшеничні відруби, солодові паростки й тирсу змішують у стерилізаторі, зволожують до 20-40 %-вої вологості й стерилізують при температурі від 104 до 140 °С и тиску 0,13 МПа.

У виробничих умовах вирощування мікроорганізмів-продуцентів на твердому живильному середовищі здійснюють в спеціальних вирощувальних камерах або на механізованих установках. Схема одержання технічних ферментних препаратів методом поверхневого культивування наведена на рисунку 49.

У стерильне живильне середовище, яке охолоджено до 40 °С, вносять при безперервному перемішуванні посівний матеріал і стерильну воду з таким розрахунком, щоб кінцева вологість була 58-60 %. Вміст води в середовищі істотно впливає на процес вирощування мікроорганізмів. При підвищенні вологості середовища погіршується аерація зростаючої культури, а при зниженні - уповільнюється ріст міцелію й знижується активність синтезованих ферментів. Живильне середовище, яке засіяно конідіями або глибинною посівною культурою, розкладають тонким шаром (2-3 см) на кювети, які розташовують на стелажах вирощувальної камери.

Ріст мікроорганізмів на поверхні твердих середовищ супроводжується споживанням кисню повітря. Потреба в кисні на різних стадіях росту культури помітно різниться. Тому кількість повітря, що подається в камеру, безупинно контролюють і регулюють залежно від стадії росту продуцента. Повітря подається не тільки для постачання культури киснем, але й для відводу теплоти й діоксиду вуглецю, що виділяються мікроорганізмами в навколишнє середовище. Повітря, що надходить на аерацію, стерилізується, підігрівається до 30 °С і зволожується парою у кондиціонерах до вологості, близької до 100%-ної. У ростильних камерах

створюється невеликий надлишковий тиск, щоб запобігти проникненню зовнішнього нестерильного повітря.

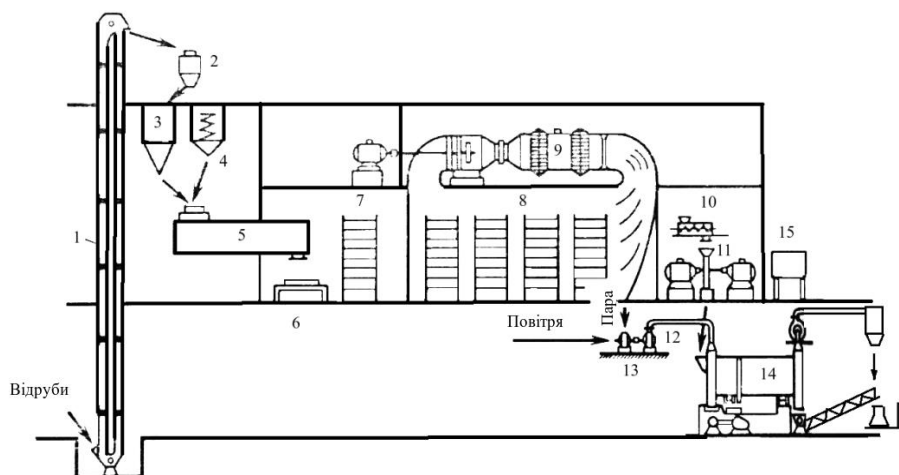


Рисунок 49 - Схема одержання технічних ферментних препаратів методом поверхневого культивування

1 - елеватор; 2,20 - ваги; 3 - бункер; 4 - ємність стерильної води; 5- стерилізатор; 6 - пульт розподілу субстрату; 7 - полки; 8 - камера; 9 - кондиціонер; 10 - дробарка; 11 - дезінтегратор; 12,16 - вентилятори; 13 - калорифер; 14 - сушарка; 15 - мийка для кювет; 17 - гвинтовий транспортер; 18 - стерилізатор кювет; 19 - циклони.

Температура, при якій вирощують мікроорганізми в рослинних камерах, індивідуальна для кожного виду продуцента й становить 24-32 °С. Температура в процесі вирощування може збільшуватися або зменшуватися на 3-5 °С у залежності від стадії росту продуцента.

Тривалість процесу вирощування мікроорганізмів також залежить від виду продуцента й становить у кожному конкретному випадку від 24 до 48 годин.

Готова культура являє собою брикет (корж) з вологістю 35-58 %, у якому частки живильного середовища (відруби, зернова лущайка) зв'язані міцелієм. Щоб уникнути інактивації ферментів, продукт повинен бути висушений до вологості 10-13 %. Перед сушінням брикети подрібнюють на різних дробарках або дезінтеграторах до часток розміром 2-3 мм.

Сушіння проводять у сушарках різної конструкції (стрічкових, шахтних, вібраційних та ін.). Щоб не знижувалася активність ферментів

при сушінні, необхідно, щоб час перебування культури в сушарці був мінімальним (5-8 хв), а температура не перевищувала 42°C. Висушену культуру фасують у крафт-мішки по 18-30 кг. Ферментний препарат по номенклатурі має індекс «Пх».

Для одержання технічних ферментних препаратів культуру продуцента, яка вирощена в поверхневих умовах, необхідно звільнити від нерозчинних баластових речовин (залишків твердого живильного середовища й міцелію). Цей процес здійснюють методом екстракції із твердої речовини. Оскільки ферменти є водорозчинними білками, то в якості екстрагента застосовують воду.

Екстракцію ферментів здійснюють у спеціальних дифузорах, з'єднаних у батарею (рис. 50). Дифузор являє собою вертикальний циліндр із відкидною кришкою, що герметично закривається, і конічним днищем. Дифузори з'єднані комунікаціями в батарею таким чином, що в кожний апарат можна подавати як свіжу воду, так і витяжку з попереднього дифузора. Будь-який апарат можна відключити, не порушуючи роботи всієї батареї. У процесі роботи вісім дифузорів заповнені культурою й у них відбувається екстракція, один з апаратів перебуває під розвантаженням, а другий - під завантаженням.

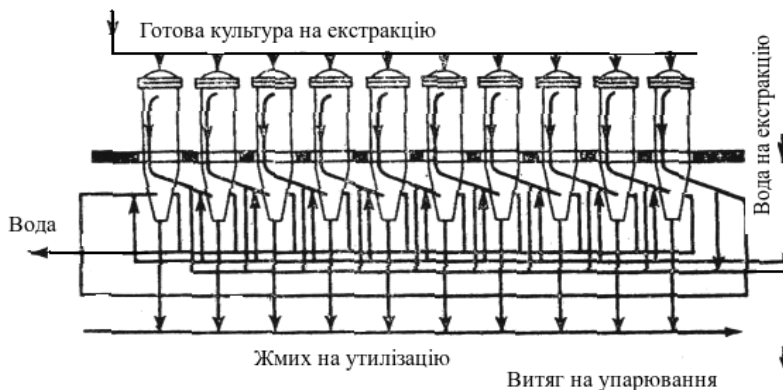


Рисунок 50 - Дифузійна батарея

У кожний дифузор місткістю 300 л завантажують 54-60 кг культури. Екстракцію проводять водою з невеликою кількістю антисептика, нагрітою до 25-27 °С, за принципом протитоку, тобто свіжа вода надходить у хвостовий дифузор, у якому культура найбільш виснажена. Після заповнення дифузора подачу води припиняють і витримують культуру протягом 30 хв. Потім відновлюють подачу води, і рідке

середовище витісняється в наступний дифузор, у якому також витримується 30 хв. Процес триває в такій послідовності до головного - восьмого дифузора, з якого витяжка збирається в збірник. Повнота витягу ферментів залежить від кількості води, поданої на екстракцію. В екстракт переходять вуглеводи (близько 29,5 %), мінеральні речовини (20 %) і азотовмісні сполуки (50 %); вміст ферментів в екстракті не перевищує 0,5 %.

Дифузійну витяжку направляють на вакуум-випарну установку плівкового типу. Для збереження активності ферментів температура випарювання не повинна перевищувати 32 °С. У отриманий у вигляді сиропу препарат додають поварену сіль, тому що вміст сухих речовин у препараті повинен бути не нижче 50 % і направляють на фасування. Препарат по номенклатурі має індекс «П2х».

Якщо дифузійну витяжку висушують у розпилювальній сушарці, то одержують сухий препарат у вигляді порошку. Сухий препарат стандартизують по активності повареною сіллю й фасують у крафт-мішки з поліетиленовими вкладишами. По номенклатурі такі препарати мають індекс «П3х».

Одержання ферментних препаратів більш високого ступеня чистоти відрізняється досить складною технологією на стадії виділення цільового продукту. Очищені ферментні препарати одержують із водяних розчинів ферментів. Основні труднощі процесу пов'язані з низькою концентрацією ферментів, їхньою лабільністю, а також складним складом домішок. Для очищення від баластових речовин застосовують різні методи: діаліз, осадження органічними розчинниками й солями, сорбцію та ін.

Ферментні осади, отримані осадженням органічними розчинниками або солями, розчиняють у воді, стандартизують до необхідної активності, а потім сушать у розпилювальних сушарках.

Високоочищені, але не кристалічні ферментні препарати, залежно від ступеня очищення мають по номенклатурі індекси «П20х», «П30х» та ін.

1.6.3 Одержання ферментних препаратів глибинним способом

Глибинний спосіб одержання ферментних препаратів має ряд переваг у порівнянні з поверхневим. Цей спосіб дозволяє одержати максимальний вихід ферментів завдяки можливості регулювати масообмін, змінювати склад живильного середовища та ін. Крім того процес глибинного культивування може бути повністю механізований і автоматизований.

Технологічний процес виробництва ферментних препаратів при глибинному культивуванні складається з наступних стадій:

- одержання посівного матеріалу;
- готування й стерилізація живильного середовища,;

- стерилізація повітря;
- вирощування мікроорганізмів-продуцентів у виробничих ферментаторах;
- виділення й очищення цільового продукту - ферментів.

Вихідну культуру мікроорганізму-продуцента пересівають у пробірки на скошене агаризоване живильне середовище й вирощують при температурі 28-32 °С. Вирощену в пробірках культуру заливають водою й у вигляді суспензії мікроорганізмів пересівають на рідке живильне середовище в колби місткістю 750 мл. Культивування проводять на качалці (180-200 об/хв) протягом 30-40 год при оптимальній для кожного продуцента температурі звичайно в межах 28-37 °С. Вирослу в колбах культуру розмножують спочатку в малому, а потім у великому інокуляторі. Культивування в цих апаратах проводять при безперервному перемішуванні й аерації стерильним повітрям. Кількість посівного матеріалу, яка необхідна для засіву виробничого ферментатора, залежить від фізіологічних властивостей мікроорганізму-продуцента. Якщо продуцент рясно утворює спори, то посівного матеріалу потрібно значно менше (близько 1 %), ніж для мікроорганізмів, що розмножуються вегетативно (5-20 %).

Склад живильних середовищ підбирають залежно від фізіолого-біохімічних особливостей мікроорганізму-продуцента. Основною сировиною в більшості виробництв ферментів служать кукурудзяне борошно, крохмаль пшеничний і картопляний, кукурудзяний екстракт, бурякові вижимки. При біосинтезі целюлозолітичних ферментів джерелом вуглецю в середовищі може бути целюлоза (деревина, бавовна, солома), при біосинтезі ліполітичних ферментів - ліпіди.

Джерелом азоту можуть бути різні мінеральні солі NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 і азот органічних сполук (гідролізати дріжджів, казеїну).

До складу живильних середовищ повинні входити також макро- і мікроелементи (фосфор, сірка, залізо, цинк, кальцій та ін.).

Готування й стерилізацію живильних середовищ для глибинного культивування мікроорганізмів-продуцентів ферментів проводять тими ж способами, що й підготовку середовищ для виробництва інших продуктів мікробіологічного синтезу (див. розділ 1.2).

Виробниче культивування мікроорганізмів-продуцентів ферментів здійснюють у ферментаторах різної конструкції періодичним способом. Найчастіше застосовують ферментатори, постачені пристроями, що перемішують, і аераторами для безперервної подачі стерильного повітря. Температуру, витрату повітря, середовища й тривалість процесу ферментації встановлюють залежно від властивостей кожного продуцента. Ці технологічні показники можуть мінятися й у процесі біосинтезу ферментів залежно від стадії росту даної культури.

Після закінчення процесу ферментації готова культуральна рідина перекачується з ферментатора в ємність, з якої надходить на виділення ферментного препарату.

Для одержання технічних препаратів культуральну рідину відокремлюють від біомаси, а потім концентрують до вмісту сухих речовин 50 % на вакуум-випарних установках при температурі 25-30 °С. Осад, що випав при упарюванні, відокремлюють сепаруванням. У концентрат ферментів додають певну кількість хлориду натрію. Отриманий стандартний сироп, що має за ступенем очищення в найменуванні індекс «Г2х», розливають у ємності по 40-50 кг.

Для одержання сухого препарату культуральну рідину після відділення біомаси концентрують до вмісту сухих речовин 10-12 %, додають хлорид натрію для стандартизації по вмісту сухих речовин, що повинне бути не нижче 50 %, і висушують у розпилюючій сушарці. Висушений препарат стандартизують по активності хлоридом натрію й фасують у крафт-мішки. Препарат має по номенклатурі індекс «Г3х».

Для одержання очищених ферментних препаратів з концентрату культуральної рідини, який надходить із вакуум-випарної установки, ферменти осаджують органічним розчинником (найчастіше етиловим спиртом). Осад ферментів, що випав, відокремлюють сепаруванням від водно-спиртового розчину. Ферментний осад розчиняють у воді, додають наповнювач (бентоніт або желатин) і направляють у розпилювальну сушарку. Висушений препарат має в найменуванні індекс «Г10х».

1.6.4 Імобілізовані ферменти

Ферментні препарати, які використовуються в наш час у промисловості, мають високу вартість, а використовуються вони у виробничому циклі через їхню розчинність однократно. Це обставина не дозволяє перевести періодичні процеси на безперервний технологічний режим, а також управляти ферментативними реакціями. Сучасні знання структури ферментних препаратів, складу їхніх активних центрів, значення функціональних груп у прояві каталітичної активності дозволили створити ферменти пролонгованої дії, або іммобілізовані ферментні препарати. Сутність іммобілізації ферментів - прикріплення їх в активній формі до нерозчинної основи.

Методи іммобілізації ферментів можна розділити на дві групи:

- включення в гель мікрокапсули (найбільш перспективний);
- зв'язування з носієм адсорбційним або ковалентним зв'язком.

Носієм може бути природний (нативний) або синтетичний матеріал. Для іммобілізації в промисловості широко застосовують целюлозу, або її похідні (кислу карбоксиметилцелюлозу, ацетилетилцелюлозу). Із синтетичних носіїв можна назвати кополімери метакрилової кислоти та ін.

Процес іммобілізації можна продемонструвати на прикладі зв'язування (стабілізації) глюкоамілази з носієм (ацетилетилцелюлозою). Носій спочатку витримують протягом доби в дистильованій воді для набрякання. Потім при перемішуванні до набряклої ацетилетилцелюлози додають спочатку натрій-ацетатний буфер (рН 5,5), потім – розчин очищеного ферменту. Після перемішування вносять глутаровий альдегід для поперечного зшивання. Останній утворює амідний зв'язок між аміногрупою носія й карбоксильною групою ферментного білка. Після декількох годин препарат промивають буферним розчином, розчином хлориду натрію для виділення сорбованого на носії білка. Іммобілізований у такий спосіб фермент зберігають під шаром води або буфера при 3-5 °С.

Іммобілізація завжди пов'язана із втратою частини активності ферменту, тому що при зв'язуванні молекули ферменту з носієм може бути порушений вільний доступ субстрату до активного центра. Незважаючи на це іммобілізовані ферменти мають більші технологічні переваги в порівнянні з незв'язаними.

Дуже важливо те, що іммобілізовані ферменти можна легко відокремити від продуктів реакції й використовувати багаторазово й що фермент не забруднює продукт. При іммобілізації представляється можливим міняти й цілеспрямовано модифікувати властивості ферменту.

Іммобілізація в більшості випадків приводить до стабілізації ферментів. У реакторах іммобілізовані ферменти використовують впродовж декількох тижнів і місяців, що безумовно дає великий економічний ефект у порівнянні з використанням розчинних форм ферментів. Так, при одержанні L-Метіоніну з рацемата з використанням іммобілізованої аміноацилази безперервним методом за 21 добу при 50°C каталізатор втрачав 35 % активності, але колона проробила 90 доби, і вихід продукту склав 90 % (при періодичному способі з використанням вільного ферменту за той же час роботи отримано в 10 разів менше продукту).

1.7 Одержання вітамінів мікробіологічним методом

Вітаміни широко застосовуються як лікарські препарати для лікування гіповітамінівних станів, а також ряду інших захворювань. У їхньому виробництві поряд з хімічним синтезом важлива роль приділяється й мікробіологічному синтезу.

Мікроорганізми можуть бути, свого роду, фабрикою вітамінів (дріжджі, бактерії, міцеліальні гриби, актиноміцети, метанові й інші види бактерій).

Мікробіологічна промисловість розширює виробництво вітамінів по декількох напрямках:

- одержання вітамінів і коферментів з використанням мікроорганізмів-продуцентів (в основному зверхсинтетиків) і спеціальних режимів культивування (вітаміни В₂, В₁₂, каротиноїди). Це можливо у зв'язку з

одержанням мутантів-надсинтетиків і доступністю вуглецевої сировини для їхнього культивування;

- одержання вітамінів і коферментів з біомаси мікроорганізмів, вирощеної на вуглецевих субстратах або використання її в якості комплексних вітамінних препаратів;

- застосування мікроорганізмів для здійснення окремих стадій процесу синтезу вітамінів;

- одержання вітамінів з рослинної сировини.

Багато вітамінів виробляють хімічним синтезом. Однак застосування мікробіологічного синтезу є важливим напрямком тому, що для деяких вітамінів і багатьох коферментів такий спосіб одержання залишається поки єдиним або найбільш ефективним.

У світі існує 40 великих промислових виробників вітамінів: 18 з них у США, 8 - у Японії, 14 - у Західній Європі. Провідне місце у виробництві вітамінів займає Швейцарія, що випускає 50-70 % всіх вітамінів.

1.7.1 Промислове виробництво ергостерина

Ергостерин – вихідний продукт виробництва вітаміну D₂, що має антирахітичну дію. Вітамін D₂ (ергокальциферол) утворюється при опроміненні ультрафіолетовим випромінюванням ергостерину. В організмі людини він регулює засвоєння кальцію й фосфору з їжі й накопичення їх у кістковій тканині.

Джерелами ергостерину є: фітопланктон, бурі й зелені водорості, але найбільша його кількість утримується в дріжджах і цвілевих грибах. Ці об'єкти й служать сировинною базою для його промислового одержання. Так, наприклад, у сухій біомасі дріжджів вміст ергостерину становить до 10 %. Найбільша кількість їх утримується в пекарських і пивних дріжджах. Ергостерини виявлені в міцелії грибів *Aspergillus* і *Penicillium*, вміст яких може досягати 1,2-1,4 % розраховуючи на сухий міцелій.

Найбільш високі якості стеринів синтезують штами *Saccharomyces carlsbergensis*. Їхня біомаса може містити більше 10% ергостерину.

Важливою умовою синтезу ергостерину дріжджами є аерація, при цьому в їхніх клітинах накопичується сквален - попередник ергостерину. Кисень індукує синтез стеринів. Максимум спостерігається при 2 % концентрації кисню в живильному середовищі. Крім цього важливо, щоб середовище містило більше вуглецю й менше азоту.

При дії на дріжджі рентгенівського випромінювання вміст ергостерину збільшується в 2-3 рази, що пояснюється гнобленням процесу амінування, що супроводжується підвищенням синтезу ліпідів.

Припускають, що утворення стеринів - це реакція детоксикації, що захищає організм від перепродукції жирних кислот.

У промисловості ергостерин одержують із дріжджів *Sacch. carlsbergensis*, а також з міцеліальних грибів. Культивування посівного

матеріалу ведуть при високій температурі й сильній аерації середовища, що містить більший надлишок джерела вуглецю стосовно джерел азоту.

Опромінення роблять ультрафіолетовими лампами з довжиною хвилі 280-300 нм (при більше короткохвильовому та більше довгохвильовому випромінюванні підвищується вихід інших сполук стерина природи). На вихід вітаміну D₂ впливають тривалість опромінення, температура, наявність домішок.

Для одержання кристалічного вітаміну D₂ дріжджі або міцелій грибів піддають гідролізу соляною кислотою при 110 °С, після чого масу обробляють спиртом (75-78 °С), охолоджують до 10-15 °С і фільтрують.

Фільтрат упарюють до вмісту в ньому 50 % сухих речовин і використовують як концентрат вітамінів групи В, а вітамін D₂ одержують із маси, що залишилася після фільтрації. Її промивають, сушать, подрібнюють і обробляють двічі трикратним об'ємом спирту при температурі 78 °С.

Після цього спиртові екстракти згущують до вмісту в них 70 % сухих речовин і одержують ліпідний концентрат. Його омилюють розчином NaOH, при цьому стерини залишаються в неомиленій фракції. Кристали ергостерина випадають із розчину при 0 °С. Їхнє очищення проводять методом перекристалізації послідовно 69 % спиртом, сумішшю спирту й бензолу (80:20) і повторною перекристалізацією. Отримані кристали сушать, розчиняють в ефірі, опромінують, ефір відганяють, а розчин вітаміну концентрують і кристалізують.

Для одержання масляного концентрату розчин вітаміну після фільтрації розбавляють маслом до стандартного рівня.

1.7.2 Промислове виробництво рибофлавіну

Вітамін В₂ (рибофлавін) входить у структуру багатьох ферментів. Бере участь у клітинному диханні, синтезі білків і жирів, регулюванні стану нервової системи, функції печінки та ін. При його недостатності різко вповільнюється ріст, порушується білковий обмін.

Продуцентами рибофлавіну в природі є вищі рослини, дріжджі, міцеліальні гриби й бактерії. Більшість мікроорганізмів утворюють власний рибофлавін і дві його коферментні форми.

У СНД рибофлавін одержують за допомогою гриба *Eremothecium ashbyii*.

Недолік культури *E.ashbyii* - її нестабільність. При зберіганні на твердих середовищах при кімнатній, низкій температурі й навіть у процесі ліофілізації грибок легко втрачає здатність до надсинтезу рибофлавіну.

Для збереження штаму *E.ashbyii* в активному стані впродовж тривалого часу (8-10 місяців) рекомендується робити систематичний розсів на тверді живильні середовища й відбирати найбільше інтенсивно забарвлені в жовтогарячий колір колонії. Яскраве забарвлення колоній свідчить про їх здатність до синтезу рибофлавіну.

Гриб пересівають послідовно за схемою:

- посів на скошене агаризоване середовище в пробірці;
- у рідке середовище;
- у колби;
- у сулїї;
- в інокулятор.

Середовище для пробірок: соєве борошно, буряковий цукор, агар, рН=6,8. Час вирощування 5-7 доби.

Середовище для колб і сулїї: соєве борошно, буряковий цукор. Час вирощування 8-48 годин.

Середовище в інокуляторі: кукурудзяний екстракт, буряковий цукор, технічний жир.

В інокуляторі культуру вирощують протягом 21-26 годин, потім переводять у ферментер з живильним середовищем (кукурудзяне борошно, соєве борошно, кукурудзяний екстракт, буряковий цукор, K_2HPO_4 , CaCO_3 , NaCl і технічний жир). Середовище стерилізують при 120-122 °С протягом години.

Культивування у ферментаторі здійснюється глибинним способом з постійною інтенсивністю аерації. Температура культивування 28-30 °С, тривалість 80-84 годин. Потім культуральну рідину під вакуумом упарюють до вмісту сухих речовин 30-40 %; упарений концентрат сушать у розпилювальній сушарці.

Вихід рибофлавіну близько 1200 мкг/мл.

Удосконалення процесу виробництва рибофлавіну здійснюється в напрямках:

- селекція мутантних штамів;
- оптимізація складу й здешевлення середовищ;
- оптимізація умов культивування продуцента.

1.7.3 Промислове виробництво вітаміну B_{12} і його концентратів

Вітамін B_{12} є протианемічним вітаміном, кровотворним фактором і фактором дозрівання еритроцитів. Авітаміноз B_{12} проявляється в зниженні гемоглобіну, розладі шлунково-кишкового тракту і нервової системи.

Єдиним методом одержання вітаміну B_{12} у промислового масштабі є мікробіологічний синтез. При виробництві вітаміну B_{12} застосовують наступні штами мікроорганізмів:

- *Streptomyces olivaceus* – аеробний мікроб, добре росте на середовищах, що містять вуглеводи, мінеральні речовини й органічні азотомісні речовини, оптимальна температура зростання його 28-30 °С (при 41 °С зростання немає);

- *Propionibacterium freudenreichii* – пропіоновокислі бактерії – анаероби. Ферментація їх в анаеробних умовах при 30 °С за 192 години дає концентрацію вітаміну B_{12} у культуральній рідині від 0,54 до 1,4 мг/л;

- *Bacillus megatherium* – аероб, виділений зі зразків ґрунту "пташиного двору", який продукує кобаламін. У живильних середовищах, які містять сахарозу, глюкозу, мальтозу, зазначений штам може утворювати до 15 мг вітаміну В₁₂ на 1 кг сухих мікробних клітин. Оптимальними умовами для мікроорганізмів є рН 6,5-7,0 і температура 25 °С, а також інтенсивна аерація. Тривалість культивування становить 7 годин. Такий концентрат є вихідним продуктом для одержання кристалічного вітаміну В₁₂.

Технологічний процес біосинтезу полягає в наступному. Вихідну культуру вирощують на агаровому середовищі (косяки) при 28 °С у плин 4-6 днів. Спори з косяків переносять у колби, де при 28 °С вирощують культуру 48 годин. Потім її переводять в інокулятор. Живильне середовище готують в змішувачі, де її стерилізують при 120 °С протягом 60 хв. Склад живильного середовища: барди 4 %, глюкози 0,5 - 1,0 %, СаСО₃ – 0,5 % і СоСl₂ · 6Н₂О - 1,5-10 част./млн.; рН доводять гідроксидом натрію 6,5-7,0. Із змішувача-стерилізатора середовище подають у ферментатор, де його охолоджують водою до 22 °С. Із інокулятора туди ж вводять культуру і подають повітря тиском 0,25 МПа у кількості 0,1-0,5 л в 1 хв на 1 л середовища.

Після закінчення процесу ферментації концентрат відокремлюють, очищають водяний розчин гідроксидом цинку, а потім сумішшю крезолу із чотирехлористим вуглецем (1:1). Після цього проводять хроматографічне очищення на колонці з Аl₂О₃ водно-ацетонового розчину, елюацію 50 % водним ацетоном і кристалізацію з водно-ацетонового елюату.

Така технологія забезпечує вихід вітаміну В₁₂ у межах 67-70 % із чистотою кристалів 75-76 %.

1.8 Одержання бактерійних препаратів

Бактерійні препарати поширені в багатьох країнах. Їх призначають при порушеннях нормальної мікрофлори макроорганізму (дисбактеріозах).

Вітчизняна фармацевтична промисловість випускає наступні бактерійні препарати:

- Колібактерин (*Colibacterinum siccum*) - ліофілізована жива культура кишкової палички штаму М-17, розфасована в ампули, флакони або у вигляді таблеток; має вигляд пористої або кристалічної маси жовто-сірого кольору; таблетки препарату жовто-сірого кольору;

- Лактобактерин (*Lactobacterinum siccum*) являє собою ліофілізовану культуру молочнокислих бактерій, розфасовану в ампули або флакони, що має вид дрібнопористої маси темно-жовтого кольору. Діючим початком лактобактерину є живі бактерії штамів *Lb. fermenti* і *Lb. Plantarum*, що мають високу антагоністичну активність відносно збудників дизентерії, ентеропаатогенних кишкових паличок і умовно патогенних мікроорганізмів;

- Біфідумбактерин (*Bifidumbacterinum siccum*) являє собою ліофілізовану завісь біфідобактерій, розфасовану в ампули або флакони;

висушений препарат має вигляд пористої або злегка кристалізованої маси білувато-сірого або кремового кольору;

- Біфікол (*Bifidolum siccum*) - комплексний двохкомпонентний біологічний препарат з бактерій анаеробної і аеробної мікрофлори кишечника людини. Препарат являє собою ліофілізовану змішану культуру біфідобактерій і кишкової палички, розфасовану у флакони; має високу терапевтичну й сануючу активність.

1.8.1 Технологія одержання колібактерину

На початку виробничого циклу штам М-17 відновлюють зі стану анабіозу шляхом пасажів на рідкому й твердому живильному середовищах. Для накопичення біомаси застосовують живильні середовища на гідролізатах білкових субстратів, зокрема, на ферментативному гідролізаті казеїну з додаванням 1,25-2,0 % харчового желатину. При виготовленні неампульованих лікарських форм вводять у живильне середовище 1 % нерозчинного крохмалю.

Накопичення біомаси ведуть у реакторах з нержавіючої сталі при 37 °С, в умовах перемішування й аерації. Оптимальні значення рН середовища перебувають у межах 7,2-8,0, тривалість процесу вирощування культури становить 6-7 годин. Одержувана мікробна суспензія містить 35-40 млрд. живих бактерій в 1 мл. Суспензію перед заморожуванням розливають у скляні ампули по 3-5 доз, флакони по 3-100 доз або заморожують без попередньої фасування (для таблетування й готування інших неампульованих форм). При ліофілізації колібактерину в ампулах і флаконах у мікробну завісь перед заморожуванням додають 10 % сахарози, при одержанні напівфабрикату для готових лікарських форм - 5-7 % лактози, 0,5-1 % нерозчинного крохмалю. Заморожують.

Зневоднювання замороженого субстрату здійснюють у сублімаційних камерних установках будь-якої системи, що забезпечують високий вакуум (до $5 \cdot 10^{-3}$ мм рт.ст.) і залишкову вологість кінцевого продукту на рівні 2-4 %. Висушений препарат і напівфабрикат зберігають при температурі 2-6 °С у сухому темному приміщенні. Для таблетування й готування інших неампульованих форм до сухого напівфабрикату додають лактозу (2 %), аеросил (3 %) або тальк медичний (2 %), стеарат кальцію або магнію (1 %).

Контроль колібактерину здійснюють поетапно у процесі виробництва напівфабрикату й готової продукції. Оскільки діючим початком колібактерину є живі бактерії, основу контролю становлять визначення числа живих клітин, розраховуючи на одну дозу, й облік антагоністичної активності до тест-штамів збудників дизентерії Флекснера й Зонне. Крім названих основних тестів активності в схему контролю сухого колібактерину входить визначення залишкової вологості препарату, що не повинна

перевищувати 4-5 %, нешкідливості на лабораторних тваринах, а також контроль на відсутність сторонньої мікрофлори.

1.8.2 Промислове одержання біфідумбактерину

Для виробництва біфідобактерину застосовують штами *B.bifidum* I, які належать до роду *Bifidobacterium*.

Біфідобактерії - нерухливі, грам-позитивні палички, характерною ознакою яких є роздвоєння кінців. Палички часто утворюють скупчення, що нагадують китайські ієрогліфи або оленячі роги.

B.bifidum – анаероб, спори не утворює, не розріджує желатин, не утворює газу, не продукує каталазу. Штам ферментує лактозу, глюкозу, сахарозу, з утворенням молочної й оцтової кислоти, закислюючи живильне середовище до рН 4,1-3,8. При вирощуванні на напіврідких живильних середовищах викликає у першу добу нерівномірне помутніння, а іноді утворює пухкий осад, залишаючи прозору верхню частину середовища. Окремі колонії мікроба в напіврідких середовищах білого кольору мають форму дрібних грон або зерен, що утворюють при струшуванні крихкувату масу. Оптимальна температура для росту біфідобактерій 38 °С. Штам має антагоністичну активність стосовно патогенної й умовно патогенної мікрофлори.

Біологічну активність штаму біфідобактерій оцінюють по його антагоністичній активності по відношенню до шигел і деяких умовнопатогенних мікробів, а також по його активності кислотоутворення. Показники антагоністичної активності біфідобактерій, виражені в мм зон гноблення тест-культури, повинні бути не менш 10 мм.

Виробничий штам біфідобактерій повинен бути нешкідливим. При спостереженні протягом 3-х днів за мишами, яким вводили суспензію штаму *B.bifidum* по 1 дозі кожній в 0,5 мл ізотонічного розчину - усі миші повинні бути живі.

Виробничі штами контролюють кожний квартал, їхню антагоністичну активність - 1 разу на рік.

Кожна серія виробничого штаму повинна мати порядковий номер, позначений на кожному флаконі (ампулі) і на коробках, у які укладають висушену культуру.

Всі відомості й дані контролю з кожної серії штаму заносять у спеціальний журнал.

Процес виготовлення біфідумбактерину складається з наступних стадій:

- одержання маткової виробничої культури;
- одержання нативної мікробної суспензії й додавання до неї середовища висушування;
- розлив мікробної суспензії у флакони (ампули) і ліофільне сушіння препарату.
- контроль готового препарату;

- маркування й упакування.

Одержання маткової культури складається з наступних операцій:

- посів ліофілізованої культури штаму із флаконів (ампул) на печіночне середовище у флаконах;

- контроль чистоти посіяної культури у флаконах і пересівання її на печіночне середовище в сулії;

- контроль маткової культури на відсутність сторонньої мікрофлори.

Для одержання маткової культури ампулу або флакон з ліофілізованим штамом *B.bifidum* розкривають стерильно й пастерівською піпеткою вносять у них 5 мл середовища Блаурока*, піпеткою переносять стерильно у дві пробірки, що містять 0,3 л середовища Блаурока. Посіви термостатують при температурі 38 °С протягом 24 год (1 генерація).

Через добу вирослу маткову культуру переносять у флакони, що містять 200-250 мл середовища Блаурока (2 генерація). Флакони із засіяною матковою культурою поміщають на 24 години у термостат при температурі 38 °С. Роблять посів на вміст сторонніх мікроорганізмів.

Через 24 години культуру із флаконів засівають в апарати Боброва із середовищем Блаурока в кількості 500 мл. Вирощують 24-48 год при 38 °С (3 генерація).

Одержання нативної мікробної суспензії й додавання до неї середовища висушування.

Вирощену маткову культуру на середовищі Блаурокка стерильно переносять в 15 л балон із середовищем КД-5** у кількості 5-6 л, кількість посівного матеріалу становить 10-15% від об'єму, що засівається. Балони із засіяним середовищем КД-5 поміщають у термостат при температурі 38 °С и вирощують протягом 24-48 год, контролюючи два рази в день рН, який підтримують на рівні $6,0 \pm 0,2$, додаючи 10 % розчин аміаку. У сулії з мікробною масою додають стабілізуюче середовище висушування: концентроване цукро-желатинове середовище й обрат молока в такій кількості, щоб у кінцевій суспензії було сахарози від 5 % до 10 %, желатину від 1 % до 1,5 %, молока знежиреного від 12 % до 15 %. Перемішавши вміст сулії, відбирають проби для визначення стерильності й визначення кількості живих мікробних тіл в 1 мл.

Розлив мікробної суспензії у флакони (ампули) і ліофільне сушіння препарату складається з наступних операцій:

- розлив препарату у флакони;

- попереднє заморожування препарату;

*Екстракт печінки великої рогатої худоби з додаванням пептону Мартена, агар-агару, лактози, цистеїну, NaCl, луѓу.

** Казеїново-дріжджове середовище

- підготовка й завантаження сушильних апаратів;
- ліофільне сушіння препарату;
- розвантаження сушильних апаратів;
- закупорювання й закатування флаконів (запаювання ампул), відбраковування й реєстрація кількості флаконів.

Контроль готового препарату включає контроль препарату на виробництві й контроль в ВБК.

Контроль препарату на виробництві проводять за наступними показниками:

- фізичні властивості (зовнішній вигляд, розчинність);
- відсутність сторонньої мікрофлори;
- нешкідливість;
- кількість живих біфідобактерій в одній дозі препарату;
- активність кислотоутворення;
- залишкова вологість;
- наявність вакууму (для препаратів в ампулах);
- герметичність ампул.

Контроль препарату в ВБК проводять по тим же показникам.

1.8.3 Промислове одержання лактобактерину

Препарат випускають у вигляді біомаси, ліофілізованої у флаконах (ампулах). Препарат являє собою пористу масу різних відтінків бежевого кольору.

Одержання маткової культури для виробничого посіву.

Ампулу з ліофілізованим виробничим штамом розкривають стерильно, піпеткою вносять у неї 2 мл середовища МРС-1*. Отриману суспензію переносять стерильно в 1-2 пробірки з 10 мл середовища МРС-1. Вміст пробірок після посіву перемішують. Для контролю чистоти посіяної культури з кожної пробірки 1 мл отриманої суспензії засівають у пробірки на скошений живильний агар з 9% натрію хлориду. Інкують протягом 8 діб при 37 °С. Зазначеним контролем супроводжують всі пересівання штаму лактобацил.

Посіви першої генерації штаму витримують у термостаті при температурі 37 °С протягом 20-24 годин.

По закінченні інкубації посівів першої генерації переглядають ріст, отриманий у пробірках. При наявності характерного росту лактобацилл (рівномірна каламуть і гомогенний білий осад на дні пробірки) і відсутності росту в контрольних посівах, отриману культуру пересівають по 1 мл на 2-6 пробірок з 10 мл середовища МРС-2*. Посіви 2 генерації інкують у термостаті при температурі 37 °С протягом 20-24 годин.

* Мінеральне робоче середовище

По закінченні інкубації посіви переглядають і при наявності характерного росту лактобацил і відсутності росту в контрольних посівах отриману культуру другої генерації розсівають петлею на 5-6 чашок Петрі із середовищем МРС-4. Посіви витримують у термостаті при температурі 37 °С протягом 46-48 годин кришками до низу.

По закінченні 3-ї генерації штаму колонії *Lb. plantarum*, що вирости, переглядають під мікроскопом. По кілька колоній в S-формі з кожної чашки платиновою петлею переносять у пробірки із середовищем МРС-1 і МРС-2. Засівають по 10 пробірок кожного середовища. Інкують посіви при температурі 37 °С протягом 20-24 годин.

По закінченні інкубації й відповідного контролю роблять посів вирослої культури у флакони із середовищем МРС-1 (посівного матеріалу 10 %). 8 флаконів із середовищем МРС-1 засівають сумішню вирослої культури на середовищах МРС-1 і МРС-2.

Посіви інкують у термостаті при температурі 37 °С протягом 6-8 годин. По закінченні інкубації вирослу культуру пересівають піпеткою на 8 чвертей утримуючих по 0,6-0,8 л середовища МРС-1. Інкують посіви в термостаті при температурі 37 °С протягом 20-24 годин. По закінченні інкубації з кожної чверті відбирають у пробірку контрольну пробу. Одержують 8 чвертей з вирослою культурою.

Виробничий посів

У бокс вносять пляшку з вирослою мікробною суспензією. Із пляшки робиться виїмка в три пробірки (2 - на стерильність, 1 - на стандарт мутності) й у склянку для перевірки рН. Перед виїмкою пляшки добре збовтуються.

Після виїмки в пляшку додається по черзі 2 л об'єму молока й 1 л цукро-желатинового середовища. Суміш перемішують вручну й роблять посіви у пробірку з живильним агаром і 9% хлориду натрію й на чашку Петрі із середовищем Ендо. Крім того роблять виїмку в пробірку для перевірки кількості життєздатних лактобацил, а петлею робиться мазок для перевірки дійсності. Пляшку закривають гумовими пробками, покривають серветками з 3 % розчином перекису водню, паперовим ковпаком і обв'язують марлевою крайкою або шпагатом.

На пляшці кріплять етикетку, на якій указують найменування препарату, номер серії, дату розливу.

Контроль рідкого лактобактерину

У контрольній пробі рідкого лактобактерину, узятій до додавання середовища висушування, визначають:

- стерильність;
- густоту мікробної суспензії;
- рН ($6,0 \pm 0,2$).

У контрольній пробі рідкого лактобактерину після додавання середовища висушування визначають:

- стерильність - посів у пробірки з живильним агаром з 9 % хлориду натрію й на чашках Петрі із середовищем Ендо;
- кількість життєздатних лактобацил. Їх повинно бути не менш 4×10^9 ;
- у мазках, пофарбованих по Граму, повинні бути характерні для лактобацил грампозитивні палички.

Мікробну суспензію за допомогою дозатора розливають по 1-3 мл у стерильні вакуумні ампули ємністю 6 мл, або по 10-20 мл у флакони. Щоб забезпечити однакову густоту лактобактерину, перед розливом і в процесі розливу роблять кількаразове струшування мікробної суспензії.

Ампулу закривають за допомогою пінцета пухким стерильним ватним тампоном або касету з ампулами, заповненими препаратом, закривають стерильним бязевим ковпаком. Флакони закривають стерильними тришаровими марлевими серветками.

Контроль точності розливу роблять періодично в процесі розливу суспензії за допомогою стерильного шприца або стерильного мірного циліндра. Контроль стерильності роблять на початку, середині й кінці розливу шляхом посіву суспензії з ампул або флаконів на 9-10 % сольовий агар. Перед ліофілізацією препарату роблять посів для визначення кількості живих мікробних тіл в 1 мл препарату.

Далі препарат надходить на ліофільне сушіння.

Контроль сухого лактобактерину на виробництві й ВБК:

- зовнішній вигляд;
- наявність вакууму в ампулах;
- розчинність;
- відсутність сторонньої мікрофлори;
- нешкідливість для мишей;
- кількість живих паличок в 1 дозі препарату;
- антагоністична активність;
- специфічна аглютинабельність у реакції аглютинації;
- залишкова вологість;
- етикетування й упакування.

1.8.4 Технологія одержання біфіколу

Технологічний процес виготовлення біфіколу подібний до способу одержання монопрепаратів і полягає в підготовці виробничих штамів, що зберігаються в ліофілізованій формі, вирощуванні культур глибинним способом, фасуванні суспензії у флакони, заморожуванні й висушуванні. Для стабілізації препарату використовують цукро-желатинове, цукро-крахмальне захисні середовища в кількості 5-10 % від об'єму біомаси.

1.8.5 Технологія одержання бактеріофагів

Для лікування й профілактики ряду інфекцій поряд з іншими препаратами застосовують віруси бактерій - бактеріофаги, що мають високу специфічність до патогенних й умовно патогенних бактерій. Вибірковість їхньої дії значно вище, ніж антибіотиків і інших хіміотерапевтичних засобів. Бактеріофаги - віруси бактерій. Вони здатні специфічно вражати бактеріальну клітку, репродукуватися в ній і викликати її розчинення. Бактеріофаги не впливають на нормальну мікрофлору, оскільки самі відносяться до неї. Природним середовищем перебування багатьох фагів служать фекалії, річкові й стічні води, куди вони попадають разом з фекаліями й де відіграють роль одного з факторів самоочищення середовища.

Феномен бактеріофага вперше спостерігав в 1898 р. Н.Ф. Гамалія. Це був бактеріофаг, специфічний для палички дизентерії. В 1930-1940 роках бактеріофаги зайняли заслужене місце серед інших лікувально-профілактичних препаратів. Велику групу становлять бактеріофаги проти кишкових інфекцій: дизентерійний, брюшнотифозний, сальмонельозний груп АБСДС, коло-протейний. Широко поширені раневі бактеріофаги - стафілококовий, протейний, синегнійна паличка.

Технологічний процес виробництва рідких бактеріофагів складається з наступних стадій:

- підбір штамів для виробництва даного виду фагу;
- одержання маткових бактеріофагів;
- виготовлення серій рідкого бактеріофага;
- контроль готового препарату на стерильність, нешкідливість і літичну активність;
- етикетування й упакування препарату.

Схема технологічного процесу виробництва рідкого й сухого бактеріофага наведена на рисунку 51.

Відібрані для виробництва штами повинні перебувати в S- і O-формах, мати типові морфологічні, біохімічні й серологічні властивості. Для кращого збереження доцільно після перевірки властивостей культур ліофілізувати їх і зберігати в темному місці при температурі 4-6 °С.

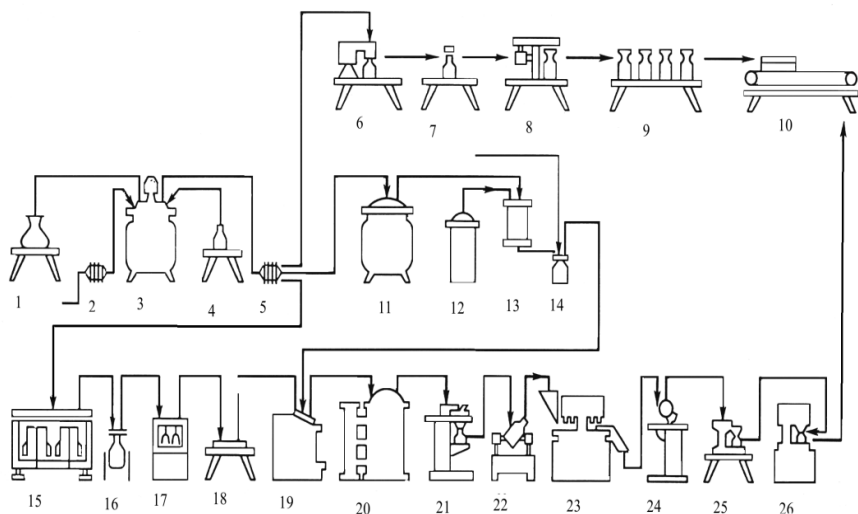


Рисунок 51 - Схема технологічного процесу виробництва рідкого й сухого бактеріофагу

1 - засів культури (складання нативної завісі); 2 - фільтр; 3 - реактор; 4 - сулія ємністю 1 л із сумішшю маткових фагів; 5 - фільтр (стерилізуючий); 6 - розлив препарату у флакони; 7 - закупорювання флаконів гумовою пробкою; 8 - закатування алюмінієвим ковпачком; 9 - зберігання продукції на період контролю; 10 - етикетування й фасування на конвеєрі; 11 - реактор розведення 1:2; 12 - елюент; 13 - колонки з ДЕАЕ-целюлозою; 14 - ємність (збір концентрату й додавання обрата молока 1:2); 15 - ванна осадження; 16 - бачок для звільнення від рідини; 17 - змішувач сирової маси; 18 - розфасовка маси в касети; 19 - ємність для попереднього заморожування; 20 - вакуум-сушильний апарат; 21 - гранулятор; 22 - змішувач сухої маси; 23 - таблеткова машина; 24 - установка для покриття таблеток; 25 - лічильно-фасувальна машина; 26 - закатувальна машина.

Для одержання маткових штамів бактеріофагів до проб річкових і стічних вод підсівають відповідну культуру бактерії й після інкубації при 37°C фільтрують через фільтри, що стерилізують. Літична активність фільтратів перевіряється титруванням у рідкому живильному середовищі з набором штамів даного виду. Найбільш активні фільтрати використовують для готування маткових фагів.

Серійний бактеріофаг готують у реакторах місткістю від 0,25 до 0,5 м³. Реактори мають сорочку для пари тиском 0,3 МПа, пропелерну мішалку, спусковий вентиль і систему труб для аерації середовища. Реактор і всі його частини виготовляються з нержавіючої сталі. До складу

живильних середовищ для одержання кишкових і раневих бактеріофагів входять білкові основи у вигляді кислотних або ферментативних гідролізатів казеїну, м'яса. Як джерело ростових факторів використовують м'ясні екстракти, частіше з додаванням глюкози, значення рН середовища встановлюють у межах 7,2-7,6 залежно від виду бактерій, для яких специфічний бактеріофаг.

У реактор з живильним середовищем (37 °С) засівають нативну завісь бактерій з розрахунку 50-150 млн. клітин на 1 см³ середовища. Матковий фаг додають у кількості 0,01-0,1 % від об'єму живильного середовища. Вміст ретельно перемішують повітрям. Повітря, що подається в реактор під тиском, надходить через стерильний ватно-вугільний фільтр. Лізис проходить при температурі 37 °С протягом 4-10 годин (залежно від виду бактеріофага). Повноту лізису визначають візуально (по повноті прозорості). По завершенні процесу додають хінозол як консервант (0,01 %). Через 1,5-2 год після додавання консерванту фаголізат фільтрують через пластини, що стерилізують, і розливають у стерильних умовах у флакони ємністю 100, 50 і 25 см³.

Для одержання сухого бактеріофагу перші три стадії аналогічні. Потім проводиться концентрація фагу, його висушування, таблетування, нанесення кислотостійкого покриття. Контроль сухого препарату проводиться на специфічну стерильність, на наявність сторонніх мікроорганізмів, нешкідливість, літичну активність, залишкову вологість, розчинність у штучному шлунковому соку. Бактеріофаг фасується подібно іншим таблетованим препаратам, етикетується й упакується. Крім таблетованої форми (за аналогією з іншими фармакопейними формами) бактеріофаг може готуватися на мазевій основі у вигляді ректальних свічок.

Концентрувати рідкий бактеріофаг можна шляхом висалювання сульфатом амонію, що додають у кількості 69 % від об'єму фагу. Висалювання триває 18 годин без наступного діалізу при температурі 2-4 °С і рН 6,9-7,0. До одержаної пастоподібної масі додають як стабілізатор глюконат кальцію (9 %). Якщо захисним покриттям служить пектин, його додають одночасно із глюконатом кальцію (3 % до маси). Масу наносять на касети (товщина шару 1 см) і висушують із замороженого стану під вакуумом в апаратах для ліофілізації до досягнення залишкової вологості 2-4%. Висушену масу подрібнюють у грануляторі, контролюють на специфічну стерильність, наявність сторонніх мікроорганізмів й літичну активність. З урахуванням літичної активності різних компонентів складається суміш для таблетування полівалентного бактеріофага й визначається маса однієї таблетки (у межах 0,11-0,25 г). Таблетки виробляють на спеціальних пресах з використанням пуансонів, що забезпечують одержання таблеток у формі чечевиці, без різких граней. Таблетки, отримані з маси, до якої для захисту корпускул фагу не додається пектин, покривають в обертовому дражировальному казані ацидорезистентною оболонкою з 5 %-го розчину

ацетофталату целюлози. Розчинником служить суміш ацетону з етиловим спиртом у співвідношенні 7:3. Наноситься покриття за допомогою спеціального розпилювача. Концентрування рідкого бактеріофага можна проводити методом іонообмінної хроматографії з використанням волокнистої ДЕАЕ-целюлози. При цьому профільований бактеріофаг розводять навпіл стерильною дистильованою водою й пропускають через хроматографічні колонки з ДЕАЕ-целюлозою. Потім проводять елюацію бактеріофагу 9,7-1,0 М розчином NaCl на 0,05 М фосфатному буфері (рН 7,0-7,4) з додаванням 1 % амоній сульфату. Концентрат стерильно збирають у емності, додають як стабілізатор 50 % об'єму молока й 2 % глюкози, а потім піддають ліофілізації.

У наш час бактеріофаги випускаються в різноманітному асортименті. Деякі з них: бактеріофаг дизентерійний (для профілактики й лікування дизентерії), бактеріофаг брюшнотифозний (для попередження захворювань черевним тифом контактуючих із хворим), бактеріофаг сальмонельозний груп АВСДН.

1.9 Біосинтез антибіотиків

1.9.1 Загальні відомості

Антибіотики (антибіотичні речовини) утворюються різними групами організмів (бактеріями, грибами, вищими рослинами, тваринами). Історія відкриття першого антибіотика, що знайшов широке застосування в медичній практиці, пов'язана з ім'ям шотландського мікробіолога А. Флемінга. У наукову літературу термін антибіотик (проти життя) був уведений Ваксманом в 1942 р.

Антибіотики - це специфічні біологічно активні речовини, що мають високу фізіологічну активність стосовно певних груп мікроорганізмів (бактерій, грибів, водоростей), вірусів або до злоякісних пухлин, затримують їхній ріст або повністю пригнічують їх розвиток. Вони є представниками різних класів хімічних сполук - від досить простих ациклічних сполук до досить складних структур - поліпептидів і актиноміцинів. Завдяки різноманітній хімічній будові антибіотичні речовини мають широкий механізм біологічної дії.

Антибіотики мають високу біологічну активність у порівнянні з іншими речовинами, що також пригнічують ріст окремих видів мікроорганізмів, а також вибірковість біологічної дії. Це означає, що не всі організми, які перебувають в контакті з антибіотиком, виявляються чутливими до його дії. У цьому зв'язку мікроорганізми діляться на дві групи: чутливі до певних антибіотиків і резистентні (стійкі) до них.

Одні антибіотики пригнічують ріст невеликого числа видів мікроорганізмів, інші ж гнітять ріст багатьох видів мікроорганізмів. Виходячи із цієї особливості антибіотиків, їх розділяють на дві групи: антибіотики вузького спектра дії й антибіотики широкого спектра біологічної

дії. До першої групи відносяться бензилпеніцилін, новобіоцин, гризеофульвін і інші антибіотики, що пригнічують ріст обмеженого й невеликого числа видів або навіть штамів чутливих мікроорганізмів. До другої групи антибіотиків, що мають широкий спектр дії, відносяться тетрацикліни, хлорамфенікол, трихотецин та ін. Антибіотики другої групи пригнічують розвиток багатьох видів бактерій і вірусів.

Залежно від біологічного впливу антибіотики поділяють на антибактеріальні, антифунгіцидні (протигрибкові) і протиракові. До антибактеріальних антибіотиків відносять: ті, що пригнічують ріст грампозитивних бактерій (пеніцилін, цефалоспорин, еритроміцин, олеандоміцин, карбоміцин); ті, що пригнічують ріст грамнегативних бактерій (тетрациклін, неоміцин, стрептоміцин, поліміксин, грамїцидин); ті, що мають протитуберкульозну дію (стрептоміцин, біоміцин, циклосерин). У групу протигрибкових антибіотиків входять ністатин, гризеофульвін, леворин, кандидин і амфотерицин В. До протиракових антибіотиків відносяться актиноміцини, мітоміцини С та ін.

До теперішнього часу відомо близько 6000 антибіотичних речовин, утворених у результаті хімічної модифікації основних структур ряду антибіотиків. Найбільше число антибіотиків (більше 3000) утворюється актиноміцетами.

1.9.2 Підготовка середовища для культивування продуцентів антибіотиків

При розробці (підборі) середовища для культивування необхідно приділяти велику увагу формам джерел азоту, вуглецю, фосфору й інших компонентів харчування, їхній концентрації й співвідношенню в середовищі, наявності в субстраті (якщо це необхідно) відповідних попередників біосинтезу молекули антибіотика, вітамінів, мікроелементів і інших речовин. Для багатьох мікроорганізмів-продуцентів антибіотичних речовин формами азоту, які легко засвоюються, служать амонійні солі й амінокислоти; останні впливають на метаболізм організмів. Зв'язано це з тим, що амінокислоти беруть безпосередню участь у синтезі білків (структурних і ферментативних), поліпептидів, в утворенні ряду антибіотиків. Крім цього, амінокислоти можуть впливати на ферментні системи: активувати або інгібувати їхню активність.

Однак ряд мікроорганізмів утворює антибіотики лише в тому випадку, якщо в середовищі присутній азот в окисленій формі (у вигляді нітратів). До таких організмів можна віднести продуценти аурантіна. Біосинтез пеніциліну йде набагато активніше, якщо в середовищі поряд з амонійним джерелом азоту присутній нітрат.

Джерела вуглецю впливають на метаболізм мікроорганізмів і утворення ними антибіотиків. Так, для виробництва пеніциліну культурою *Penicillium chrysogenum* кращим джерелом вуглецю є суміш глюкози й

лактози. Однак глюкоза може бути використана в цьому процесі як єдине джерело вуглецю, якщо вона буде вводиться в середовище невеликими порціями по мірі розвитку гриба.

Утворення грамїцидину С може відбуватися на відносно простому за складом синтетичному середовищі, до якого як джерело вуглецю входять гліцерин і бурштинова кислота (амонійна сіль).

Кращим джерелом вуглецю для розвитку продуцента стрептоміцину й утворення їм антибіотика вважається глюкоза. Деякі штами *Str. griseus* не здатні використовувати сахарозу й рафінозу.

Продуцент неоміцину *Str. fradiae* краще розвивається на синтетичному середовищі із глюкозою, чим на середовищі, що містить соєве борошно. Однак утворення антибіотика на синтетичному середовищі приблизно в 8 разів нижче, ніж при розвитку актиноміцету на середовищі із соєвим борошном.

Для кожного продуцента антибіотика з метою найкращого розвитку й високого рівня утворення антибіотика необхідно підбрати не тільки відповідні джерела вуглецю, але і їхню концентрацію в середовищі, правильні співвідношення азоту й вуглецю.

Наприклад, для продуцента тетрацикліну *Str. aureofaciens* концентрація глюкози в середовищі, рівна 50 мг/мл при вмісті 2,4 мг/мл азоту амонію, сприяє гарному росту актиноміцету й високому рівню біосинтезу антибіотика. Збільшення концентрації глюкози до 80-85 мг/мл гальмує ріст актиноміцету, а 26 мг/мл цукру не забезпечує нормальний ріст продуцента тетрацикліну.

Джерела фосфору. Величезне значення для росту мікроорганізмів і утворення ними антибіотиків має концентрація фосфору в середовищі.

Недолік або надлишок фосфору в середовищі різко позначається на обміні речовин мікроорганізмів і, отже, на процесі біосинтезу антибіотика. Це особливо помітно проявляється на утворенні таких антибіотиків, як тетрацикліни, макроліди й деякі інші, біосинтез яких пов'язаний з вуглецевим обміном.

Продуценти антибіотиків у зв'язку з їхньою чутливістю до концентрації фосфору в середовищі можна розділити на три групи:

- високочутливі організми (продуценти тетрациклінів, ністатину, флориміцину, ванкоміцину);
- організми середньої чутливості (продуценти стрептоміцину, еритроміцину, циклосерину, неоміцину);
- малочутливі організми (продуценти новобіоцину, грамїцидину С).

Впливають на біосинтез антибіотиків і інші компоненти середовища, у тому числі сірка, марганець, магній, залізо, цинк, кобальт.

У ході біосинтезу деяких антибіотиків велику роль у збільшенні їхнього виходу відіграють так звані попередники біосинтезу – органічні речовини субстрату, які в процесі утворення антибіотика тим або іншим

способом вбудовуються в його молекулу без попереднього розщеплення на окремі фрагменти й стимулюють біосинтез. Наприклад, при утворенні молекул пеніциліну попередниками виступають фенілоцтова кислота та її похідні.

Велике значення для процесу розвитку продуцента антибіотика має значення рН середовища. Для розвитку багатьох бактерій краща вихідна кислотність середовища (рН=7); актиноміцети краще розвиваються при початковому значенні (рН=6,7-7,5); більшість видів міцеліальних грибів розвивається при слабкокислої початковій реакції середовища (рН=4,5-5,0). Регулюють рН середовища внесенням або фізіологічно кислих (солі амонію) або фізіологічно лужних (солі органічних кислот і нітрати) сполук, а також крейди як нейтралізатора. Крейда реагує з кислотами, що виділяються в процесі метаболізму, з утворенням нейтральних солей і вуглекислого газу.

У промислових умовах звичайно використовують натуральні середовища невизначеного складу, тобто середовища, до складу яких поряд з відомими по хімічному складу компонентами (глюкоза, сірчанокислий амоній, NaCl та ін.) входять продукти рослинного походження, що мають невизначений й непостійний склад: соєве борошно, кукурудзяне борошно, пшеничне борошно, кукурудзяний екстракт, крохмаль, гідрол (густий темний сироп, що містить 65-70 % речовин, що редукують, або близько 50 % цукрів), макухи олійних культур.

Синтетичні середовища, тобто середовища, що містять цілком певні хімічно чисті речовини в строго відомих концентраціях, у промисловому одержанні антибіотиків не використовуються.

Процес розвитку мікроорганізмів – продуцентів антибіотичних речовин має, як правило, двофазний характер.

Перша фаза розвитку характеризується тим, що в культурі продуцента антибіотика відбувається швидке накопичення біомаси, що супроводжується інтенсивним споживанням основних компонентів субстрату (джерел вуглецю, азоту, фосфору та ін.), зниженням значення рН середовища в результаті утворення кислих продуктів. Біосинтез антибіотика в цей період не відбувається або здійснюється в незначній кількості.

Друга фаза характеризується зниженням загальної кількості біомаси. У період другої фази відбувається розвиток організму й утворення нових клітин, але в культурі починають переважати автолітичні процеси, що й приводить до зниження загальної кількості біомаси. Середовище збагачується продуктами обміну й продуктами автолізу клітин, трохи зростає значення рН, відбувається бурхливий процес біосинтезу антибіотика. Інтенсивне утворення антибіотика в культурі продуцента починає відбуватися в період, коли клітки мікроорганізму, що розвиваються, перебувають в умовах середовища, що не містить уже основних вихідних компонентів, але збагачено продуктами обміну організму й продуктами його автолізу.

Для кожного продуцента антибіотика розробляється своє оптимальне середовище, що повинно відповідати наступним вимогам:

- забезпечувати гарний ріст продуцентів і максимально можливе утворення антибіотика;
- містити доступні компоненти;
- мати гарну фільтруючу здатність;
- забезпечувати застосування ефективних прийомів виділення й очищення антибіотика.

Стерилізація живильних середовищ у промислових умовах здійснюється двома методами: періодичним безпосередньо у ферментаторах або казанах-стерилізаторах при температурі 120-130 °С протягом 30-60 хвилин і безперервним у стерилізаційних колонах при 130 °С.

Підготовка посівного матеріалу - одна з головних операцій у циклі біологічного методу одержання антибіотиків. Продуцент антибіотика вирощується на багатих по складу середовищах, здатних забезпечити високу фізіологічну активність мікроорганізму. Спочатку мікроорганізм попередньо вирощують на агаризованому середовищі в пробірці, потім із пробірки висівають у колби з рідким живильним середовищем і проводять дві генерації при глибинному вирощуванні. Із другої генерації культури (у колбі) роблять посів у невеликий інокулятор (10 л), а потім добре розвинену культуру переносять у великий інокулятор (100-500 л) і роблять посів в основний ферментер.

1.9.3 Ферментація

Безперервна ферментація не застосовується, хоча було багато експериментальних робіт. Це звичайно аеробний процес; кількість подаваного повітря 0,3-1,5 м³/(м³·хв). Процес ведуть у апаратах ємністю від 30 до 200 м³, які мають мішалку, систему охолодження й піногасіння.

Для боротьби з піною у ферментерах при антибіотикоутворенні використовують різні ПАР: рослинні масла (соєве, соняшникове), тваринний жир (кашалотовий жир), мінеральні масла (вазелінове, парафінове), спирти й вищі жирні кислоти, а також спеціально синтезовані речовини (силікони). Іноді використовуються механічні способи піногасіння (відсмоктування піни через спеціальні труби, руйнування пухирців піни сильними струменями рідини, пари або газу) і аеродинамічні.

Відділення нативного розчину від біомаси зважених часток проводять методами фільтрації або центрифугування. Для цього застосовують різні фільтруючі апарати: фільтрпрес, нутч-фільтр, друк-фільтр, центрифуги, сепаратори.

1.9.4 Виділення й очищення антибіотика

У процесі утворення антибіотика в культуральну рідину поряд із присутністю в ній різних невикористаних компонентів середовища виділяються й різноманітні продукти обміну.

Стадія виділення й хімічного очищення включає ряд процесів: від обробки нативного розчину до сушіння готового продукту очищеного препарату. Залежно від властивостей антибіотика, його хімічної будови й місця накопичення застосовують різні методи виділення й очищення. Як основні методи використовують екстракцію, осадження, сорбцію на іонообмінних матеріалах, упарювання, сушіння.

1.9.5 Контроль готової продукції

Антибіотики, призначені для ін'єкцій, повинні бути стерильними. Тому одержання таких препаратів здійснюється в асептичних умовах.

Після виділення й хімічного очищення антибіотик висушують від вільної й зв'язаної води. Оскільки більшість із них термолабільні, то необхідно застосовувати методи, що не приводять до втрати біологічної активності. Для цього використовують ліофільне, розпилювальне сушіння, вакуум-сушильні шафи, сушіння в зваженому шарі.

Готовий антибіотик піддається ретельному біологічному й фармакологічному контролю.

Біологічний контроль дозволяє визначити стерильність готового препарату. Для цього використовують, як правило, два методи.

Перший пов'язаний з інактивацією антибіотика й висівом його у відповідне живильне середовище. Наприклад, біологічний контроль бензилпеніциліну й напівсинтетичних препаратів, отриманих на його основі, здійснюється в такий спосіб. У пробірки, що містять тіогліколеве середовище, вносять фермент пеніциліназу в кількості, здатній повністю інактивувати пеніцилін. Пробірки з пеніциліназою витримують 2-3 доби при 37 °С для контролю стерильності ферменту, потім у них вносять розчин пеніциліну. Пробірки розділяють на дві групи, одну групу витримують при 37 °С, а другу при 24 °С протягом 5 діб. Щодня спостерігають за можливим ростом мікроорганізмів.

Другий метод визначення стерильності антибіотиків полягає в тім, що для більшості цих сполук немає біологічних інактиваторів їхньої біологічної активності. Тому у контрольованих препаратів виявляють наявність стійких до них форм мікроорганізмів, а також визначають можливу присутність чутливої мікрофлори. Для визначення можливої присутності в препаратах чутливих до них бактерій, розчин антибіотиків пропускають через мембранні фільтри (діаметр пор не більше 0,75 мк).

Необхідно відзначити, що стерильність готового антибіотика забезпечується дотриманням стерильних умов роботи на всіх стадіях процесу розвитку продуцента, виділення й очищення препарату.

Фармакологічний контроль.

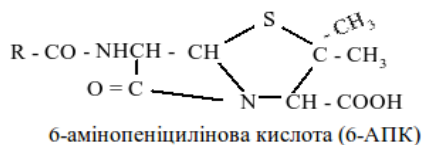
Кожний новий лікарський препарат, перш ніж він буде дозволений до практичного застосування, повинен пройти випробування на токсичність, пірогенність і інші життєво важливі функції для організму. Препарат вивчають на різних видах тварин у відношенні його гострої й хронічної токсичності (вплив на склад крові, центральну нервову систему, дихання). Показники гострої токсичності – один із критеріїв якості антибіотичної речовини. Встановлюють максимально переносиму дозу (МПД) антибіотика, дозу, смертельну для всіх тварин (LD_{50}). Тільки після ретельного вивчення препарат може бути рекомендований до практичного застосування.

Потім препарат фасують й пакують. Упакований антибіотик із вказівкою біологічної активності й дати випуску надходить у продаж.

1.9.6 Промислове одержання калієвої солі бензилпеніциліну

Першим антибіотиком мікробного походження, що почали виробляти промисловим шляхом, був пеніцилін. Назва «пеніциліни» об'єднує велику групу антибіотичних речовин, представлених як природними сполуками, так і їх біологічно активними аналогами, отриманими синтетичним і біологічним шляхом.

В основі структурної формули пеніциліну лежить конденсована система двох кілець - тiazолідонового й β -лактамного:



Як видно з формули, пеніциліни є N-Ацильними похідними 6-АПК, виділеної з культуральної рідини продуцента пеніциліну. Бічний ланцюг являє собою ацильний залишок органічної кислоти ($RCO-$), у якому R може бути різним, наприклад:

$CH_3(CH_2)_5 CH_2-$ гептилпеніцилін;

$C_6H_5CH_2-$ бензилпеніцилін.

Уперше в промислових масштабах пеніцилін був отриманий поверхневим методом культивування. У якості продуцентів пеніциліну широко використовують штами культури *Penicillium chrysogenum*.

У наш час в усьому світі пеніцилін одержують, як і багато інших антибіотиків, методом глибокого культивування.

Інтенсивний синтез пеніциліну починається при наявності великої кількості біомаси міцелію, при повному використанні глюкози й молочної кислоти в середовищі, при рН, близькому до нейтрального.

Для одержання пеніциліну спочатку розмножують спори; у промислових умовах – на пшоні у флаконах при 25-27 °С протягом 4-5 діб.

Висушений споровий матеріал можна зберігати при кімнатній температурі.

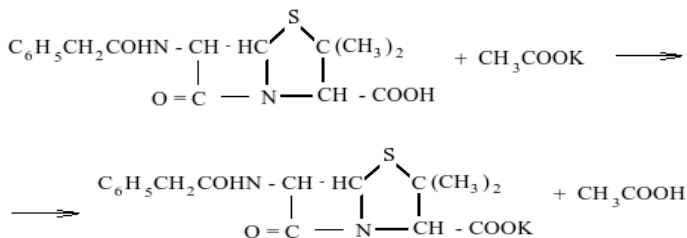
Отриманим матеріалом засівають інокулятори (де міцелій розмножують до 5-10 % об'єму посівних ферментаторів). Вирощування триває 12-18 годин.

Живильні середовища для вирощування міцелію й біосинтезу пеніциліну: кукурудзяний екстракт 2-3 %, лактоза 5 %, глюкоза 1,5 %, (NH₄)₂SO₄ + фосфати 0,5-1 %, попередники (похідні фенолоцтової або феноксіоцтової кислоти) – 0,3-0,6 %. Для стабілізації рН використовують крейду.

Ферментацію ведуть при 22-26 °С, рН від 5 до 7,5, аерації 1 м³ / (м³ хв). За 4 доби кількість пеніциліну досягає 10000 ум.од./мл. Ферментацію припиняють, міцелій відфільтровують і використовують у тваринництві як джерело білків і вітамінів. У фільтраті 3-6 % сухих речовин, 30-40 % яких - мінеральні, 15-30 % – пеніцилін, а також білок, який заважає виділенню пеніциліну. Для видалення білкових домішок застосовують осадження солями Al, Fe, Zn або денатурацію при температурі 65-70 °С і рН = 5,5-6,0. Втрати пеніциліну при цьому становлять 5-15 %. Потім пеніцилін екстрагують бутилацетатом, який не змішується з водою; рН повинен бути 1,9-2,0. Екстракт обробляють активованим вугіллям і охолоджують до – 5 °С за 20-30 хвилин, відфільтровують від кристалів льоду; таким чином бутилацетатний екстракт зневоднюється.

Виділення калієвої солі бензилпеніциліну з бутилацетатного екстракту проводять шляхом додавання розрахованої кількості насиченого розчину ацетату калію (розчин ацетату калію готують при нагріванні з розрахунку 3 кг ацетату калію на 1 л води).

Нижче наведена хімічна реакція:



В змішувач, що містить безводний екстракт, при перемішуванні додають трикратний надлишок насиченого розчину ацетату калію, вміст перемішують, а потім передають в охолоджувач. Відразу ж повинен почати виділятися кристалічний безбарвний осад калієвої солі бензилпеніциліну, що

не розчинна у бугілацетаті. Отриманий осад фільтрують і сушать у вакуум-сушильній шафі до постійної маси.

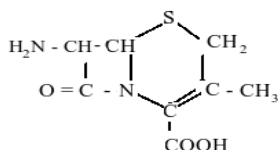
Визначення чистоти готового продукту проводять хроматографічним методом, ідентифікуючи отриманий зразок солі бензилпеніциліну порівнянням його з відомим еталоном.

Після одержання позитивних результатів аналізу проводять маркування й упакування готової продукції.

1.9.7 Одержання похідних пеніциліну

У наш час в усьому світі похідні пеніциліну одержують із 6-АПК шляхом хімічної модифікації. Процес перетворення пеніциліну в 6-АПК здійснюється при рН = 7,8-8,0, температури 35-40 °С.

Імобілізована пеніцилінамідаза використовується також і для одержання ряду нових антибіотиків із групи цефалоспоринів. Ключовою сполукою в цьому випадку є 7-амінодезацетоксіцефалоспоринова кислота.



З неї хімічною модифікацією одержують цефалотин, цефалогліцин, цефрадинтаїн.

Контрольні запитання

1. Поверхневий спосіб культивування мікроорганізмів.
2. Глибинний спосіб культивування мікроорганізмів.
3. Фази зростання культури при періодичному способі культивування.
4. Живильні середовища при поверхневому культивуванні мікроорганізмів.
5. Відкриті та закриті системи безперервного культивування.
6. Основні стадії мікробіологічного синтезу.
7. Етапи та технологічна схема очищення і стерилізації повітря.
8. Особливості технології вирощування аеробних мікроорганізмів в глибинних умовах.
9. Ферментатори з підведенням енергії до газової та рідкої фази.
10. Ферментатори колонного типу.
11. Ферментатори з комбінованим підведенням енергії.
12. Засоби піногасіння використовують в процесах ферментації.
13. Способи сушки суспензій мікроорганізмів, при яких зберігається їх життєздатність.

14. Способи відділення клітинної біомаси від культуральної рідини.
15. Методи руйнування кліток.
16. Мікрофільтрація і чим вона відрізняється від звичайної фільтрації?
17. Діаліз і електродіаліз
18. Ультрафільтрація
19. Зворотний осмос
20. Іонообмінний метод виділення біологічно активних речовин з культуральної рідини.
21. Метод отримання лимонної кислоти в промислових умовах.
21. Метод отримання оцтової кислоти в промислових умовах.
22. Джерела ферментів.
23. Отримання ферментних препаратів поверхневим способом. Стадії процесу.
24. Отримання ферментів глибинним способом. Стадії процесу.
25. Імобілізовані ферменти.
26. Промислове виробництво ергостерину.
27. Промислове виробництво рибофлавіну.
28. Промислове виробництво вітаміну В₁₂.
29. Двофазність отримання антибіотиків.
30. Середовище для культивування продуцентів антибіотиків.
31. Промислове виробництво бензилпеніциліну.
32. Технологія виробництва лактобактеріну.
33. Технологія виробництва колібактеріну.
34. Технологія виробництва біфідумбактеріну.
35. Технологія виробництва біфіколу.
36. Технологія виробництва бактеріофагу.
37. Що таке бактеріофаги? Їх особливості.

2 БІОТЕХНОЛОГІЯ КЛІТИН ТВАРИН І ЛЮДИНИ

2.1 Клітинні субстрати-продуценти біологічно активних речовин

У наш час культури клітин використовують для одержання різних біологічно активних речовин, таких як вірусні вакцини, інтерферон (альфа, бета, гама), інсулін, інтерлейкін-2, моноклональні антитіла та ін. Потреба в них постійно зростає.

Наприкінці 70-х років було доведено, що більшість біологічних продуктів, синтезованих клітками ссавців, може бути синтезовано й клітками прокаріотів і нижчих еукаріотів (дріжджові клітки) із застосуванням методів генної інженерії. Проте, у відношенні деяких біологічних речовин поки не відомо, чи можуть вони продукуватися в активному виді бактеріями або дріжджами. На відміну від них клітки ссавців мають здатність синтезувати й секретувати у навколишнє середовище комплексні білки, однак ростуть вони повільніше й вимагають для росту дорогі середовища. Наступне складне очищення продукту від сироваткових білків ще більше здорожує його виробництво. Існує думка, що принаймні для одержання шести категорій комплексних білкових препаратів будуть використані скоріше клітки ссавців, чим бактерій і дріжджів.

Культивування клітин тварин

Масове вирощування клітин тварин у культурі застосовується в першу чергу для виробництва противірусних препаратів.

Однак після 50-100 ділень клітинні культури гинуть (найкраще переносять культивування фібробласти)

У лабораторних умовах клітки тварин вирощували давно, але масове культивування налагодити виявилось не просто.

На початку клітки одержують від тварин механічною або ферментативною дезагрегацією. Потім їх поміщають у підходяще середовище (склад середовища залежить від типу клітин), де вони розвиваються в первинні культури з «нормальним» (диплоїдним) або «ненормальним» (трансформованим або похідним з пухлини) каріотипом.

Розрізняють первинні культури клітин і клітинні лінії.

Первинна культура – це культура, що походить від клітин тканин або органів, узятих безпосередньо з організму. Культура вважається первинною доти, поки вона не субкультивується, після чого стає клітинною лінією.

Постійна клітинна лінія – це клітки, здатні субкультивуватися поза організмом протягом необмеженого числа пасажів.

Первинні культури звичайно одержують трипсинізацією тканин курей, курячих ембріонів або тканин (найчастіше нирок), узятих від інших видів здорових тварин. Вік використовуваних ембріонів може значно різнитися й впливати на вихід і життєздатність клітин.

Первинні культури значно різняться залежно від тканини й умов вирощування. Деякі культури після посіву через кілька днів гинуть, тоді як інші можуть довгостроково зберігатися без помітних морфологічних і біохімічних змін. З моменту придбання такими культурами здатності рости при серійних пересіваннях і до загибелі в результаті втрати такої здатності проходить від декількох тижнів до декількох місяців. Клітки ембріонального походження звичайно зберігають життєздатність при культивуванні більш тривалий період.

Вимоги до факторів зовнішнього середовища.

Клітки теплокровних тварин є найбільш примхливими до умов зовнішнього середовища. Крім живильних речовин, для збереження життєздатності, росту й розмноження клітин у культурі, а також для виконання специфічних функцій потрібні певні фізичні й хімічні умови.

Температура є однією з головних умов нормальної життєдіяльності клітин. До коливань температури особливо чутливі клітки теплокровних тварин. Для нормальних життєвих процесів більшості клітин ссавців і птахів оптимальною є температура в межах 36-38 °С. Клітки ссавців на відміну від клітин холонокровних хребетних і комах, мають більш високий температурний оптимум і трохи гірше зберігаються при низьких позитивних температурах. Клітки ссавців виявили невелику здатність адаптуватися до підвищеної (42,5 °С) і зниженої (30 °С) температури. Клітки комах добре розмножуються при 25 °С і залежно від індивідуальних особливостей і попередньої адаптації їхній оптимум росту може бути при температурі 22-30 °С. Культури клітин холонокровних хребетних вирощують, як правило, при 20-25 °С.

Осмотичний тиск середовища також є важливим фактором, що обумовлює нормальну життєдіяльність клітин тварин у культурі. Визначається він числом моль осмотично активних часток (іонів і неіонізованих молекул), що містяться в 1 л розчину (осмолярність). У живильних середовищах, як і в рідинах тваринного організму, воно визначається головним чином концентрацією неорганічних солей і, у першу чергу, хлористого натрію. Однак, органічні речовини, особливо низькомолекулярні, (наприклад, глюкоза) також впливають на осмотичний тиск середовища). Для клітин ссавців нормальний осмотичний тиск при 38 °С дорівнює 0,76 МПа (відповідає точці замерзання приблизно – 0,63 °С). Клітки легко переносять коливання осмотичного тиску в межах $\pm 10\%$.

Концентрація водневих іонів відіграє виняткову роль у забезпеченні нормального метаболізму клітин. При культивуванні клітин ссавців і птахів прагнуть підтримувати рН середовища близьким до нейтрального (7,0-7,2), хоча клітини залишаються життєздатними тривалий період при рН 6,8-7,8. Найбільше стійкі до зміни рН одношарові культури клітин. Клітини, що ростуть у суспензії, досить чутливі до відхилення рН за межі границь оптимального росту. Це пояснюється, імовірно, тим, що в одношаровій

постійній культурі клітини створюють на своїй поверхні "мікроклімат", що трохи відрізняється від навколишнього живильного середовища в тому числі й по величині рН. У суспензії, що постійно переміщується, умови скрізь однакові: як навколо клітини, так і поза нею. Доведено, що оптимальний показник рН середовища неоднаковий для різних клітинних культур. Для максимального розмноження цілого ряду клітин, що пересіваються, оптимальний рН середовища є індивідуальним. У цілому клітини постійних ліній потребують менш лужний рН. Величину рН середовища при посіві клітин встановлюють із урахуванням концентрації клітин, активності їхнього метаболізму, складу живильного середовища й умов аерації.

Розчинений кисень має ключове значення в метаболізмі клітин. Кисень і вуглекислота, як і вода, вільно проникають у клітину і виходять з неї по градієнту концентрації. Інтенсивність дихання (споживання кисню на клітину в одиницю часу при певних температурах і тиску) залежить від виду клітинної культури. Оптимальний рівень розчиненого кисню для різних ліній клітин є неоднаковим і становить від 10 до 100 % насичення повітрям.

Низька розчинність кисню в живильному середовищі створює основні труднощі в постачанні культур киснем. Збільшенню насичення киснем живильного середовища сприяє перемішування культури, що особливо важливо для культур клітин, приготовлених у великих об'ємах, які часто використовуються при масовому культивуванні вірусів тварин.

Потреба в живильних речовинах. Клітини тварин у культурі зберігають ту ж потребу в живильних речовинах і ростових факторах, що й в організмі. Створення умов культивування, адекватних наявним в організмі, є важливим й у той же час важким завданням. Вимоги клітин до факторів середовища значною мірою залежать від типу й властивостей культури.

Розрізняють два основних компоненти живильних середовищ: низькомолекулярні сполуки й ростові фактори. У сироваткових середовищах джерелом ростових факторів є сироватка крові тварин.

Потреби клітин у неорганічних солях у культурі й в організмі практично збігаються. Головними іонами середовища є Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , HPO_4^{2-} . Неорганічні солі в основному забезпечують підтримку електролітичного балансу й осмотичної рівноваги середовища. Крім того, іони можуть діяти як регулятори росту або різних функцій клітин. Крім участі в обміні, кальцій, наприклад, відіграє певну роль у прикріпленні клітин до скла й інших цільних субстратів у процесі культивування на поверхнях. При культивуванні в суспензії з метою зменшення прикріплення клітин друг до друга й стінок культуральних посудин у середовище не включають солей кальцію, а потреба клітин у цьому іоні, імовірно, задовольняється за рахунок його присутності в сироватці. Бікарбонат звичайно включають у середовища не тільки як живильну речовину, але і як буфер. Урожай клітин і швидкість їхнього росту залежать від співвідношення різних іонів, особливо іонів натрію й калію. Іноді до складу живильних

середовищ включають мікроелементи. Такі елементи, як Fe, Cu, Zn, Co, Mo, протягом багатьох років входять до складу деяких середовищ. Серед інших корисних елементів відзначені Se, S, V, Cr, Al і As.

Всі середовища містять амінокислоти, але кількість їх і співвідношення варіює в широких межах. Амінокислоти необхідні як будівельні блоки білкового синтезу, а також як джерело енергії. Для росту й розмноження широкого спектра клітин ссавців потрібно щонайменше 13 амінокислот. Крім 8 амінокислот, необхідних організму (ізолейцин, лейцин, лізин, метіонін, фенілаланін, треонін, триптофан і валін), клітини ссавців для розмноження в культурі потребують ще п'ять амінокислот: аргінін, цистин, глутамін, гістидин й тірозин. Деякі необхідні амінокислоти можуть бути замінені відповідними кетокислотами, які за допомогою різних клітинних трансаміназ перетворюються в амінокислоти, подібно тому, як це відбувається в організмі.

Вміст вільних амінокислот у культивованих клітках перебуває в динамічній рівновазі з навколишнім середовищем. Середовища з високим збалансованим вмістом амінокислот застраховані від виснаження й збагачені в енергетичному відношенні. Однак занадто високі концентрації амінокислот можуть виявитися токсичними.

Для росту в культурі клітки мають потребу у вісьмох вітамінах групи В: нікотинамід, тіамін, пантотенат, піридоксал, рибофлавін, фолієва кислота, холін та інозитол. До складу багатьох сироваткових середовищ не входить біотин. Однак при культивуванні диплоїдних фібробластів людини його присутність у середовищі необхідна. Вітамін С, стабільний лише в кислих розчинах, включають у деякі середовища переважно для забезпечення окислювально-відновного потенціалу, наприклад, разом із глутатіоном і цистеїном. Жиророзчинні вітаміни останнім часом, як правило, не включають до складу живильних середовищ. Однак вітамін А і його аналоги мають важливе значення для диференціації клітин і стабільності мембран. Вітамін Є використовують, в основному, як антиоксидант.

При звичайних умовах вирощування клітини одержують енергію головним чином за рахунок гліколізу вуглеводів. У сироватці крові дорослих тварин основним вуглеводом є глюкоза, а ембріонів ссавців – фруктоза. Як енергетичний матеріал для культивування клітин найчастіше використовують глюкозу. Іншим основним джерелом енергії в більшості середовищ є глутамін. Глюкозу більш-менш ефективно можна замінити іншими вуглеводами (фруктозою, лактозою, галактозою, манозою і мальтозою).

При звичайних умовах культивування клітини містять невелику кількість ліпідів. Багато синтетичних середовищ не містять ліпідів, культивовані в них клітини забезпечують свою потребу головним чином за рахунок ліпідів сироватки. Білки сироватки, з одного боку, можуть звільняти в середовище корисні жирні кислоти, а з іншого боку - зв'язувати клітини,

що утворюються в культурі і інгібують зростання. Жирні кислоти можуть надходити у зв'язаній формі з бичачим сироватковим альбуміном (олеїнова кислота) або з діалізованою ембріональною сироваткою (лінолева кислота). З найбільшою швидкістю клітки споживають тригліцериди, трохи повільніше, але у великій кількості утилізують фосфоліпіди й холестерин. Холестерин, синтезований клітками з попередника, виділяється в середовище.

Всі клітини в культурі мають потребу в багатьох гормонах і ростових факторах, які забезпечують проходження клітинного циклу й синтетичних процесів. Для вирощування епітеліальних клітин у безсироватковій середовища включають інсулін, що виконує багато функцій, і кортизол (або його синтетичний аналог дексаметазон). Багато безсироваткових середовищ містять 10 факторів росту й гормонів, у тому числі трансферин, що зв'язує залізо, і крім того, бичачий сироватковий альбумін, що зв'язує жирні кислоти.

До ростових факторів відносять речовини, як правило, пептидної природи, що мають здатність стимулювати проліферацію клітин безпосередньо або в сукупності з іншими факторами. Факторами росту називають білки, які індують проліферацію, перебуваючи поза клітиною й взаємодіючи з її поверхнею. Прототипом цієї групи молекул є фактор росту із тромбоцитів. У неї також входять епідермальний фактор росту, фактор росту фібробластів, інсулін, соматомедина (інсуліноподібні фактори росту), трансферин та ін. Їхня дія має зворотній характер. Вони не мають специфічну мутагенну активність. У фізіологічних умовах синтезуються нормальними клітками. Наприклад, основним джерелом епідермального фактора росту є слинні залози.

2.2 Живильні середовища й сольові розчини

Живильні середовища для тканинних культур значно різняться між собою. Вони можуть складатися з компонентів, хімічний склад яких точно відомий. Такі середовища називають синтетичними. Однак, у більшості випадків застосовують синтетичні середовища не як такі, а в суміші із сироваткою, або іншими біологічними продуктами, хімічний склад яких невідомий. Основу будь-яких живильних середовищ складають розчини неорганічних солей. Живильні середовища різняться між собою не тільки по вмісту харчових субстратів, але й по вмісту неорганічних солей. В одних випадках вони забезпечують клональне зростання одиночних клітин, в других – масове розмноження клітин, у третіх – підтримку життєздатності вирослих клітин, що не діляться. Відповідно до такої класифікації живильних середовищ ступінь їхньої живильної цінності істотно міняється. Середовища для короткочасної підтримки життєздатності клітин (підтримуючі середовища) мають більш простий склад, чим для тривалого розмноження (ростові середовища). Їхній склад може також залежати від характеру культивуємих клітин і способу вирощування. Якість живильних середовищ визначають у першу чергу ступенем очищення води й стандартною окремих

компонентів. Висока якість води є найбільш важливою вимогою до компонентів живильного середовища. Для готування живильних середовищ питну воду обробляють у такий спосіб: очищають від органічних матеріалів ультрафільтрацією або зворотним осмосом; проводять демінералізацію іонообмінним способом або дистиляцією; зберігають при 80 °С для запобігання бактеріального росту. Середовища повинні бути приготовлені з реактивів найвищої чистоти.

По кількості компонентів всі живильні середовища можна розділити на прості й складні. Зменшення числа компонентів до мінімуму, необхідного для забезпечення росту клітин, привело до створення так званих мінімальних середовищ, до яких насамперед відноситься мінімальне середовище, запропоноване Іглом. Воно є найбільш простим, до його складу входять 13 амінокислот, 8 вітамінів, глюкоза й 6 неорганічних солей. Набір 13 амінокислот, що входить до складу середовища Ігла, вважається мінімальним для більшості культур клітин ссавців. Для масового культивування клітин часто застосовують середовище 199. До складу цього досить складного середовища входять майже всі амінокислоти, вітаміни, деякі попередники нуклеїнових кислот, додаткові фактори росту, джерела ліпідів і неорганічні солі. Доповнена сироваткою, вона може підтримувати ріст диплоїдних клітин тривалий період, а розмноження постійних клітинних ліній - необмежений час.

Сироватка містить більше 1000 різних білків і інших речовин. Вона є постачальником ряду незамінних низькомолекулярних живильних речовин, у тому числі пептидних факторів росту й гормонів, є носієм лабільних і водонерозчинних живильних речовин, факторів адгезії, інгібіторів протеаз і токсинів, підвищує буферність і в'язкість середовища. До недоліків сироватки відносять: варіабельність складу (окремі серії не мають достатню живильну цінність і навіть токсичні); часта контамінація вірусами, мікоплазмами, бактеріями й грибами; її присутність утрудняє оцінку живильної цінності середовища і очищення кінцевого продукту; висока вартість і періодична дефіцитність.

Для збагачення живильних середовищ використовують сироватки різного походження. Найбільше широко застосовують сироватку великої рогатої худоби.

Звичайно користуються нативними або інактивованими сироватками. Теплова інактивація (56 °С протягом 30 хвилин) знижує ростові якості сироватки, але підвищує її стабільність при зберіганні.

Крім сироватки, до числа природних інгредієнтів середовищ відносять різні білкові гідролізати, які є джерелом амінокислот і інших факторів росту клітин. Найбільш відомим і розповсюдженим з них є гідролізат лактальбуміну, який отримують при ферментативному гідролізі білка молока. Середовище, що складається із сольового розчину (Хенкса або Ерла), гідролізату лактальбуміну (звичайно 0,5 %) і сироватки крові (5-10 %)

успішно використовують для вирощування первинних культур різних тканин ссавців.

З метою мінімізації можливості контамінації клітинних культур і збереження максимального ростового потенціалу клітин при масовому культивуванні застосовують різні методи контролю.

Середовище, сироватка, розчини антибіотиків, трипсину, застосовувані добавки повинні бути перевірені на забруднення бактеріями, мікоплазмами й вірусами. Середовище й сироватку крім того перевіряють на осмолярність, пірогенність і ростові властивості. Бажано, щоб ростове середовище перед стерилізацією й зберіганням не включало сироватку й глютаміни. Ростове середовище зберігають на холоді до завершення контролю. Хорошим контролем стерильності ростового середовища є зберігання при кімнатній температурі без антибіотиків паралельно з перевіркою на ростові властивості й присутність мікоплазм. Ростове середовище на забруднення мікоплазмами звичайно перевіряють шляхом 4-х кратних пасажів контрольних клітин у новому середовищі, а потім клітки досліджують на наявність мікоплазм.

Для перевірки ростових властивостей середовища і сироватки використовують клітки, чутливі до якості живильного середовища; показниками є зростання і морфологія, причому особливу увагу звертають на появу ознак токсичної дії середовища. Ідентичність кривих зростання тест-культури на перевіреному і знов приготовленому середовищі свідчить про придатність останнього.

Токсичність антибіотиків і інших добавок визначають по кількості клітин в культурі через 48-72 годин вирощування в їх присутності в порівнянні з контролем.

Однією з найбільш відповідальних стадій в приготуванні середовищ є стерилізація. Термостабільні середовища стерилізують автоклавуванням. Цей метод дешевий і при дотриманні умов дуже ефективний. В результаті автоклавування середовище може декілька змінитися, але ці змінення не завжди викликають небажаний ефект. При стерилізації середовищ автоклавуванням відбувається часткове руйнування органічних компонентів. Проте, це може компенсуватися за рахунок утворення комплексів, корисних для зростання клітин. Термолабільні компоненти середовища (сироватку, бікарбонат натрію, глютамін та ін.) стерилізують фільтруванням через мембранні фільтри і додають перед використанням середовища.

Із-за обмежень при зберіганні рідких середовищ все більшу увагу привертають середовища, що виготовляються у вигляді сухих порошоків. В даний час сухі середовища готують змішуванням компонентів за допомогою кульових млинів. Після розчинення сухі порошоків середовища підтримують зростання клітинних культур не гірше, ніж середовища, приготовлені традиційним способом.

2.3 Приготування одношарових первинних культур клітин

Первинні культури клітин широко застосовують при виділенні і культивуванні вірусів, розробці засобів і методів діагностики і специфічної профілактики вірусних хвороб і отриманні біологічно активних речовин, а також у вивченні біології клітин.

Первинні культури з нормальних тканин безпечні в онкогенному відношенні і у ряді випадків мають вищу чутливість до вірусів в порівнянні з клітинними лініями. В даний час, не дивлячись на наявні недоліки (необхідність постійно мати джерела тканин, особливо для великомасштабного культивування, відносна трудність процесів приготування і можлива контамінація вірусними і іншими агентами), їх продовжують широко використовувати для отримання протівірусних препаратів і біологічно активних речовин в медицині і ветеринарії.

Приготування первинних культур клітин включає: отримання тканини, виділення клітин, вирощування одношарової культури.

2.3.1 Вибір джерела і відбір тканини

Для отримання первинних культур клітин використовують різні тканини ембріонів і тварин постнатального періоду. Найчастіше це тканини і органи ембріонів або молодих тварин. Ембріональні тканини мають ряд переваг перед тканинами дорослих тварин: ризик контамінації культур клітин вірусами і іншими агентами зведений до мінімуму; вони легше піддаються дезінтеграції, а клітки краще прикріплюються до субстрату і мають високу потенцію до розмноження і за оптимальних умов починають ділитися вже в першу добу, швидко формують моношар, тоді як багато тканин дорослих тварин ростуть в цих умовах більш поволі.

Для приготування первинних культур у вірусологічній практиці частіше використовують тканини нирок і рідше – інших органів. Крім того, широке застосування отримали первинні культури клітин курячих ембріонів.

Витягнуті з організму органи і тканини поміщають в стерильні судини з охолодженими (4-10 °С) сольовими розчинами, що містять антибіотики (200 од/мл пеніциліну, 200 мкг/мл стрептоміцину, 100 мкг/мл гентаміцину, або 100 мкг/мл канаміцину), в деяких випадках додають препарати фунгіцидів (ністатин, фунгізон).

2.3.2 Дезагрегація тканин

Перед дезагрегацією тканини механічно подрібнюють. Період часу між узяттям тканини і її дезагрегацією повинен бути мінімальним. При необхідності подрібнену тканину можна зберігати в охолоджену сольовому розчині або живильному середовищі, проте при цьому вихід життєздатних клітин істотно знижується: через добу – на 10-21 %, через 2-3 – на 30-50 %.

Для виділення клітин (зазвичай використовують трипсин і рідше – інші ферменти.

1. Трипсин (0,1-0,3 %) – протеолітичний фермент підшлункової залози. Найбільшу активність проявляє при рН 8,0 Порошковий комерційний препарат трипсину, вживаний для виділення клітин у вигляді розчинів, є фактично сумішшю протеаз, нуклеаз, ліпаз і полісахаридів. Робочий розчин готують, розчиняючи трипсин в збалансованому сольовому розчині при рН 7,2-7,6. Розчини трипсину або інших ферментів стерилізують фільтруванням, використовуючи з цією метою мембранні фільтри (діаметр пір 0,2-0,45 мкм).

При використанні високих концентрацій і тривалої експозиції з тканинами трипсин ушкоджує мембрани і руйнує клітини. Для припинення дії ферменту на дисоційовану тканину застосовують сироватку крові. Вона містить інгібітори трипсину, які швидко його нейтралізують.

2. Колагеназа (0,01-0,15 %) – специфічний фермент, здатний руйнувати колаген. Зокрема, одна з колагеназ мікробного походження гідролізує в колагені зв'язки між проліном і іншими амінокислотами і діє перш за все на міжклітинний матрикс і менше – на клітинну мембрану.

3. Проназа (0,25-0,5 %) – комерційний препарат, що містить групу ферментів *Streptomyces griseus*. Вона в порівнянні з будь-якою з протеаз володіє ширшою субстратною специфічністю, діючи швидше, і краще розділяє тканини на окремі клітки, чим трипсин.

Для дезагрегації тканин іноді застосовують різні поєднання ферментів: суміш трипсину і колагенази, трипсину і пронази.

Хелатні агенти, (версен, цитрат натрію, гліцерофосфат та ін.) – речовини, що зв'язують двовалентні катіони і тим самим руйнують міжклітинні зв'язки, застосовують для виділення клітин з тканин. Дія їх в порівнянні з протеолітичними ферментами менш ефективна. Проте хелатні речовини є перспективними, оскільки мають стандартний склад і активність, не містять біологічних контамінантів. На відміну від протеолітичних ферментів ці речовини не інактивуються сироваткою.

Механічну дезагрегацію тканин застосовують рідко. Їх можна дезагрегувати за допомогою ріжучих інструментів гомогенізатора, вібраційної установки або продавлюванням через механічну сітку. Перемішування подрібненої тканини в процесі дезагрегації також значно прискорює виділення клітин.

Не дивлячись на застосування різних способів і ферментів для дисоціації тканин, трипсинізація залишається загальноприйнятим методом, хоч і має ряд негативних властивостей (слабке і недостатньо повне переварення тканини, часте утворення слизуватого осаду).

Метод теплової трипсинізації

До подрібненої і промитої тканини додають 0,25 % розчин трипсину (рН=7,2-7,6) в співвідношенні 1:3-1:10 і перемішують на магнітній мішалці. Температура використовуваного розчину трипсину може варіювати від

кімнатної до 37 °С. Швидкість перемішування тканини підбирають так, щоб не було спінювання і розбризкування тканини рідини. Кожені 10-30 хв розчин трипсину з клітинами зливають, а до тканини, що залишилася, додають свіжу порцію трипсину. Цикли трипсинізації повторюють кілька разів до повного виснаження тканини (дрібний метод).

Перший злив розчину трипсину зазвичай не використовують, оскільки в ньому міститься велика кількість пошкоджених клітин і еритроцити. Отриману суспензію клітин (другого і подальших зборів) центрифугують 10 хвилин, заздалегідь додавши 2-4 % сироватки для нейтралізації трипсину.

Надосадову рідину видаляють, а до осаду клітин додають ростове середовище, перемішують і фільтрують через 2-4 шари марлі. Після фільтрації визначають концентрацію клітин, розбавляють суспензію до необхідної концентрації ростового середовища і розсівають в культуральні судини.

З метою поліпшення виходу і якості клітин цей метод модифікують. Для цього тканину, призначену для дезагрегації, занурюють в розчин трипсину і витримують на холоді протягом 18-24 год. При температурі 4 °С трипсин практично не активний, але дифундує в тканину, проникаючи в міжклітинні простори. Якщо після цього розчин трипсину з тканиною нагрівати до 37 °С, ферментативний гідроліз міжклітинної речовини проходитиме швидко і рівномірно у всій тканині.

Метод холодової трипсинізації полягає в тому, що після першої екстракції клітин до тканини додають свіжу порцію розчину трипсину, охолодженого до 4 °С, і перемішують на магнітній мішалці протягом ночі при температурі 4-8 °С. В результаті такої обробки відбувається практично повна дезагрегація тканин.

На життєздатність клітин *in vitro* впливають багато чинників. Промивання, ресуспендування, струшування, центрифугування можуть викликати більші пошкодження клітин, чим тривала дія ферментів або підвищення їх концентрації.

2.3.3 Вирощування одношарових первинних культур

Культури клітин вирощують зазвичай в спеціальному культуральному скляному або пластиковому посуді, призначеному для зростання клітин в моношарі. На початку спостерігається період спокою, протягом якого клітини прикріплюються до субстрату, адаптуються до умов існування і готуються до ділення. Потім починається фаза розмноження клітин (фаза логарифмічного зростання). Розмножуючись, клітини розміщуються в один шар на поверхні субстрату і при повному покритті його контактують між собою і припиняють ділення (стаціонарна фаза). Клітини моношару можуть зберігати життєздатність до 20 діб і більш (залежно від виду клітин і складу живильного середовища). Потім настає старіння і

загибель клітин. Швидкість розмноження клітин в культурі залежить від виду початкової тканини, віку тварини, якості і рН середовища, кількості клітин, температури культивування, а також від ступеня пошкодження у момент виділення з тканини.

Одношарові культури можна отримати тільки при посіві певної кількості клітин на одиницю поверхні судини. Недостатня і надмірна кількість клітин гальмує зростання культури. Для культур клітин з різних тканин оптимальна посівна концентрація клітин знаходиться в межах $2\text{-}5 \cdot 10^5/\text{мл}$.

2.4 Основні системи промислового культивування клітин тварин

Системи масового культивування клітин тварин раніше технологічно застосовувалися лише у виробництві вакцин (в першу чергу протиящурних) і інтерферону. Істотні зміни технології масового культивування клітин тепер обумовлені широким впровадженням постійних ліній клітин (зокрема з клонованою ДНК) в біотехнологічних процесах. Тип клітин-продуцентів і вимоги, що пред'являються до кінцевого продукту, є головними чинниками при виборі промислової технології.

З інженерної точки зору культури, в яких клітини оточені рідким середовищем, вважають глибинними. Принципи техніки глибинного культивування зазвичай застосовні до типів клітин тварин, які ростуть на поверхні твердого субстрату і в суспензії.

Розрізняють статичні і динамічні системи глибинного культивування. Перші характеризуються відсутністю переміщення культуральних судин і їх вмісту в процесі культивування (пробірки, флакони, матраци, багатоярусні піддони, статичні суспензії). Під другим мають на увазі рух культуральних судин (пробірки, що обертаються, бутлі, «колони» з скляними трубками, багатопластинчасті культиватори) або живильного середовища в процесі вирощування (багатопластинчасті культиватори, культиватори з різними наповнювачами: буси, мембрани, диски, мікроносії та перемішувані суспензії). Системи статичного глибинного культивування застосовують при невеликих об'ємах культуральних судин.

При промисловому культивуванні клітин тварин розрізняють багатоелементні процеси і процеси в одиничному устаткуванні. Перша назва відноситься до систем, збільшення продуктивності яких досягається шляхом простого збільшення числа культуральних судин. Розширення масштабів виробництва за рахунок культивування в одиничному устаткуванні досягається збільшенням розмірів культуральних судин (культиваторів) без помітного приросту їх кількості. При цьому геометрична подібність культуральних судин, як правило, змінюється.

Розширення масштабу виробництва шляхом збільшення кількості однотипних культуральних судин є практичним методом багатократного повторення, тоді як масштабування, що супроводжується зміною розмірів

установок, вважається технологічним методом. Якнайкращою системою для масштабування і оптимізації умов культивування є суспензійна культура.

Клітки, зростання яких залежить від прикріплення до поверхні щільного субстрату, можна вирощувати в трьох типах одиничного устаткування, відтворюючого в своїй основі загальноприйняте багатоелементне устаткування:

- система статичних плоскостінних судин, що еволюціонує в установки, що містять безліч пластин, розташованих паралельно (рис 48). Ці платини можуть бути статичними або рухомими;

- система бутлів, що обертаються, яка перетворилася в ряд культиваторів, що містять масу трубок і що функціонують аналогічно початковій системі одиничного устаткування (бутлі, що обертаються);

- система, основана на вирощуванні клітин в культиваторах на пластиковий плівках.

Крім того, відомо ще дві додаткові системи. Одна з них припускає вирощування клітин на зовнішній або внутрішній поверхні синтетичних мікрокапілярів – порожнистих волокон (зовнішній діаметр 300 мкм), укладених у вигляді паралельних орієнтованих шарів (рис. 52). Інша є культиватором, заповненим елементами (скляні намиста, кільця, губки, та ін.) насадок, розмір і форма яких широко варіюється.

Розрізняють замкнуті (циклічні) і відкриті системи культивування. У замкнутих системах концентрація живильних речовин у міру культивування знижується, і накопичуються продукти метаболізму. Відкриття характеризуються безперервним або періодичним оновленням середовища.

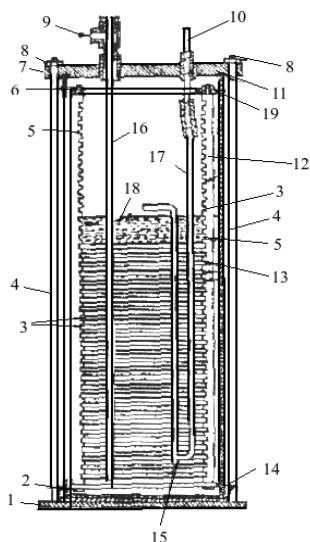


Рисунок 52 – Схема багатошарового культиватора

1 – основа; 2 – дно; 3 – жолобки; 4 – стягуючий стрижень; 5 – опорна стійка; 6 – гайка опорної стійки; 7 – кришка; 8 – гайка; 9 – отвір для відведення газової суміші; 10 – отвір для подачі газової суміші; 11 – кільцева прокладка; 12 – циліндрова судина; 13 – скляні пластини; 14 – амортизатор; 15 – повітряний насос; 16 – трубка для подачі зразків; 17 – трубка для подачі повітря; 18 – культуральне середовище; 19 – кришка опорної стійки.

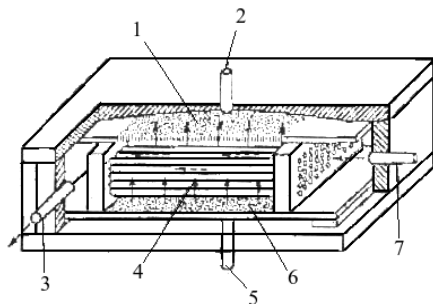


Рисунок 49 – Проточний реактор з подушкою з пористих трубочок

1 – верхній мікропористий фільтр; 2 – відтік повітря; 3 – відтік повітря і вуглекислого газу; 4 – подушка з трубочок; 5 – притока свіжій середовища; 6 – нижній мікропористий фільтр; 7 – приток повітря.

2.4.1 Культивування клітин на щільних поверхнях

Для зростання більшості культур клітин необхідна тверда поверхня, де клітки прикріплюються і розмножуються. Такі клітки прийнято називати поверхнево- або субстрат-залежними. До них відносять первинні культури клітин, лінії диплоїдних клітин і більшість постійних клітинних ліній.

Для підтримки зростання клітин як щільний субстрат використовують різні речовини, зокрема скло, сталь, титан, різні пластики (полістирол, меланекс, полікарбонати), вуглеводні полімери (целофан, сефадекс) та ін. Багато з них перед застосуванням покривають сироваткою, білком або полімерами.

Зростання поверхнево-залежних клітин в будь-яких культуральних системах відбувається тільки після їх прикріплення до твердого субстрата. Процес прикріплення багатоступінчатий і включає: адсорбцію чинників прикріплення на культуральній поверхні, контакт з нею клітин, прикріплення і розпластування клітин на культуральній поверхні. Прикріплення клітин пов'язане з двовалентними катіонами і глікопротеїнами, адсорбованими на культуральній поверхні, яка повинна бути гідрофільною. Якщо білок і двовалентні катіони відсутні, клітки прикріплюються до культуральної поверхні неміцно, тільки за рахунок неспецифічної адсорбції.

Найбільш оптимальним методом культивування клітин на твердих поверхнях, є культивування з використанням мікроносіїв. Гранули мікроносія роблять з природного полімеру глюкози – декстрану або якого-небудь синтетичного полімеру. Діаметр їх – від 50 мкм до декількох сотень мікрометрів.

Мікроносії суспендують в живильному середовищі. Потім додають клітки, які прикріплюються до мікроносія, розмножуються і покривають всю поверхню гранул. Оскільки клітини ростуть на поверхні гранул, зважених в товщі рідкого живильного середовища, система на мікроносіях, по суті, є суспензійною культурою.

Цей метод найповніше відповідає вимогам великомасштабного культивування поверхнево-залежних клітин, забезпечує рівномірні умови, культивування, контроль основних параметрів середовища, візуальне спостереження за зростанням клітин і високу продуктивність.

Основні вимоги, що пред'являються до мікроносіїв: поверхня їх повинна нести помірно позитивний заряд; у різних партіях мікроносія не повинно бути коливань в щільності заряду; щільність речовини з якого виготовлені мікрогранули, повинна бути в межах 1,02-1,04 г/см³ (в цьому випадку вони легко підтримуються в суспензії при невеликій швидкості перемішування).

При великомасштабному виробництві важливим моментом є швидкість перемішування. Перемішування повинне бути достатнє енергійним, щоб кульки носія не злипалися, і в той же час, щоб не було обдирання клітин з носія. Зазвичай використовують велику мішалку з швидкістю не більше 50 об/хв.

Для того, щоб зняти клітки, що вирости, з мікрогранул з метою подальшого пасивування або використання, застосовують протеолітичні ферменти (трипсин, проназу, колагеназу), механічні способи або поєднують обидва методи. Іноді використовують знижену температуру, гіпотонічні розчини або тимчасове збільшення швидкості перемішування суспензії. Останній метод заснований на тому, що клітки, які знаходяться у стадії митоза, слабо пов'язані з субстратом і при збільшенні швидкості перемішування легко відділяються від мікроносія.

Клітки, що вирости на мікроносіях добре зберігаються на мікрогранулах в замороженому стані при температурі рідкого азоту. Після відтавання вони залишаються прикріпленими, що полегшує адаптацію до нормальним умов при розмноженні.

Вибір культуральних судин залежить від масштабу культивування:

- для лабораторних цілей використовують бутлі з магнітними мішалками, що обертаються, і лабораторні культиватори;
- для великомасштабного виробництва використовуються культиватори місткістю до декількох сотень дм³.

2.4.2 Культивування клітин в суспензії

У суспензійній культурі здатні розмножуватися тільки постійні клітинні лінії, і те, як правило, після адаптації до умов культивування. Більшість з них відноситься до «ненормального» типу клітин.

Суспензійні культури готують з одношарових у фазі логарифмічного зростання. Клітини обережно відокремлюють від скла за допомогою диспергуючих розчинів або механічним способом.

З метою запобігання агрегації клітин і прикріплення їх до скла на верхній межі рідини, що приводить до загибелі культури, в середовище додають кристалічний трипсин в концентрації 10-50 мкг/л.

Після адаптації клітинної лінії до зростання в суспензії і дотриманні стандартних умов вирощування клітини розмножуються практично з постійною швидкістю.

2.5 Виробництво інтерферону

2.5.1 Культури клітин – продуценти інтерферону

Здатність до біосинтезу інтерферону мають клітки всіх хребетних тварин. Розрізняють три класи інтерферонів: лейкоцитарний або α -інтерферон, одержуваний у культурі лейкоцитів, які для цієї мети виділяють із крові донорів; фібробластний, або β -інтерферон, для одержання якого використовують культуру курячих фібробластів, імунний, або γ -інтерферон, біосинтез якого здійснюється в сенсibiliзованих Т-лімфоцитах при повторному контакті з мітогенами, бактеріальними й вірусними антигенами, антисироватками проти поверхневих детермінант лімфоцитів.

Всі ці класи відрізняються один від іншого в антигенному відношенні, а кожний підрозділяється на безліч видів, наприклад, відомо 18 видів інтерферону. Інтерферони мають антивірусну, імуномодулюючу і антипроліферативну дію. Установлено, що γ -інтерферон має значно більше виражену імуномодулюючу і антипроліферативну дію, чим α і β -інтерферон.

У наш час інтерферони успішно одержують із застосуванням генно-інженерних штамів *E. coli* і дріжджів. Методи генної інженерії дають можливість виробляти інтерферон у бактеріальних клітках.

2.5.2 Промислове одержання людського лейкоцитарного інтерферону

Людський лейкоцитарний інтерферон є видоспецифічним глікопротеїдом, синтезованим донорськими лейкоцитами у відповідь на вплив інтерферогену.

Специфічність препарату визначається наступними ознаками:

- противірусною активністю; у розведенні, що відповідає титру активності, препарат повинен захищати культуру людських клітин від цитопатичної дії індикаторного вірусу, узятого в дозі 100 ТЦД₅₀;
- стійкою активністю до дії нуклеаз, РНК-ази й ДНК-ази;
- чутливістю активності до дії трипсину – при концентрації ферменту 300 мкг/мл протягом 1 години при 37°C препарат повністю інактивується;
- чутливістю активності до дії специфічної антисироватки - антиінтерферонова сироватка в розведенні, що відповідає титру, повинна знижувати захисну дію інтерферону, узятого в кількості 10 од. у реакції нейтралізації.

Препарат повинен бути вірусологічно стерильним, нетоксичним і нешкідливим.

У розведенні, що відповідає титру активності, препарат повинен захищати культуру людських клітин від цитопатичної дії індикаторного вірусу.

Сухий препарат – пористий порошок сірувато-коричневого кольору, легкорозчинний у воді. Залишкова вологість не повинна перевищувати 2 %.

Розчин препарату повинен мати різні відтінки червоного кольору й жовтуватої відтінки.

Технологія одержання спеціальних видів сировини й напівфабрикату

Кров заготовлюють на станціях переливання крові відповідно до інструкцій у стерильні багатокамерні мішки або флакони, заповнені розчином, що консервує.

Пластикові мішки центрифугують 4 хв при 4 °С і з них вичавлюють послідовно – плазму, а потім 40 мл верхнього шару з поверхні клітинної фракції (еритромаса) або 40 мл верхнього шару клітинної фракції, які використовують надалі як джерело лейкоцитів (лейкомаса) для біосинтезу препарату.

Зразок крові, плазми, еритромаси або лейкомаси від кожного донора повинен контролюватися на відсутність інфікування сифілісом, гепатитом, СНІД відповідно до діючих інструкцій. При негативних результатах контролю еритромаси й лейкомаси можуть використовуватися для виробництва інтерферону не пізніше, ніж через добу після забору крові від донора. Зберігання їх допускається при температурі не вище 4 °С.

Плазма або сироватка донорської крові входять до складу культуральної суміші на стадіях біосинтезу інтерферону.

Характеристика й контроль виробничих штамів вірусів

У виробництві інтерферону в якості інтерферогена використовується штам "Н" вірусу хвороби Ньюкасла. Вірус легко репродукується в курячих ембріонах і в культурі курячих фібробластів, виявляючи цитопатичну дію. Вірус не небезпечний для людини, однак може викликати запальні явища при випадковому влученні масивної дози в око.

Індикаторним вірусом служить штам "Індіана" вірусу везикулярного стоматиту. Вірус добре репродукується в курячих ембріонах, а також у культурах курячих і людських фібробластів, виявляючи цитопатичну дію.

Вірус хвороби Ньюкасла культивують в 10-денних курячих ембріонах. Ембріони переглядають через овоскоп, вмерлі відбраковують, а в життєздатних олівцем обводять границі повітряної порожнини.

При вихідному титрі вірусу 10^8 - 10^9 ТЦД₅₀/мл доза, що заражає, становить 0,2 мл розведення 10^{-4} . Ця доза вводиться в ембріон шприцом через повітряну порожнину з дотриманням умов стерильності. Місце проколу в шкарлупі заливається парафіном і ембріони інкубуються 2 доби при 37 °С.

Після інкубації ембріони охолоджують при 4 °С протягом 3-4 годин, потім у строго стерильних умовах розкривають із боку повітряної порожнини й візуально оцінюють їхню життєздатність. Полеглі – відбраковують, а з інших пастерівською піпеткою (за допомогою вакууму або груші) відбирають алантоїсну рідину, що і служить надалі джерелом вірусу.

Алантаїсну рідину, що містить вірус, контролюють на бактеріологічну стерильність. Визначають інфекційний титр у культурі курячих фібробластів і титр гемаглютининів.

Контроль на стерильність здійснюють висівом 1 мл алантаїсної рідини з кожного флакону на живильні середовища - цукровий бульйон і середовище Сабуро. Посіви інкубують протягом 7 діб на цукровому бульйоні при 37 °С, а на середовищі Сабуро – при кімнатній температурі.

Інфекційний титр визначають у культурі фібробластів. В тридобову культуру із моношаром клітин, що сформувався, вводяться різні розведення від 10^{-7} до 10^{-10} алантаїсної рідини. Культури інкубують 3 доби при 37 °С і потім переглядають під мікроскопом. Максимальні розведення, що виявляють у культурі цитопатичну дію, приймаються за ТЦД вірусу (титр цитопатичної дії).

У виробництві допускається використання тільки бактеріологічно стерильного вірусу з інфекційним титром 10^8 - 10^9 1 мл ТЦД₅₀.

Вірус хвороби Ньюкасла являє велику цінність для виробництва, тому повинні бути вжиті заходи, щоб зберегти його чистоту й інтерференогенні властивості. Категорично забороняється безперервне використання пасирування вірусу: як вихідний матеріал при зараженні використовують кращу партію вірусу, що після контролю розливають по 1 мл в ампули й ліофілізують. Після ліофілізації ця партія надалі вважається робочим стандартом вірусу.

Одержання первинно-трипсинізованих культур шкірно-м'язової тканини курячих і людських ембріонів здійснюють стандартними методами, що базуються на дезінтеграції тканини ембріона трипсином.

Стадії процесу одержання лейкоцитарного інтерферону

Стадія 1. Виділення лейкоцитів

Біосинтез інтерферону проводять із використанням лейкоцитів, звільнених від домішки еритроцитів. Якщо домішка еритроцитів перевищує 100 клітин на 1 лейкоцит, для їхнього відділення застосовують фракціонування з наступним гемолізом лейкоцит-утримуючої фракції. Фракціонування проводять у стерильних скляних колбах грушоподібної форми з верхнім і нижнім відводами, що герметично закриваються, ємністю 5 л, куди заливають 2 л стабілізуючого розчину, який містить: апірогенну дистильовану воду – 1 л, глюкозу фармацевтичну – 20 г, аскорбінову кислоту – 0,25 г, хлористий кальцій – 5 г, цитрат натрію тризаміщений – 15 г.

У відстійник зі стабілізуючим розчином вводять рівний об'єм клітинної фракції. Суспензію ретельно перемішують і додають розчин еритроцитів у кількості 1/10 від сумарного об'єму суспензії (400 мл).

Для осаджування використовують декстран фармацевтичний, полівініловий спирт фармацевтичний, розчини яких стерилізують автоклавуванням або фільтрацією й зберігають при температурі 4 °С. Під дією осаджувателів відбувається агрегація еритроцитів, що прискорює їхню

осадження із суспензії. У результаті відбувається розшарування суспензії на 2 фракції – темнозабарвлену нижню фракцію еритроцитів і світлу верхню фракцію лейкоцитів. Через нижній відвід відстійника фракцію еритроцитів зливають. Потім зливають і фракцію лейкоцитів. Клітки відокремлюють центрифугуванням. Надосадову рідину відкидають, а осад клітин ресуспендують у живильному середовищі, що містить 0,5 % етилендіамінотетраоцтової кислоти (ЕДТА).

Гемоліз залишкових еритроцитів У клітинну суспензію заливають 10 об'ємів гемолітику, (0,83 % розчин хлористого амонію в апірогенній дистильованій воді), витримують протягом 10 хвилин при 4 °С, а потім клітки відокремлюють центрифугуванням. Осад клітин суспендують у живильному середовищі 199 або мінімальному "Ігла", що містить 3 од./мл гепарину, 5% донорської плазми або сироватки, 0,1 трилону Б і 5 од./мл мономіцину.

Відбирають 0,5 мл ретельно перемішаної суспензії й поєднують її з 0,5 мл розчину еозинату. Витримують суміш 30 с при кімнатній температурі й розводять фізрозчином в 100 разів. Розчин уводять у рахункову камеру Горяєва й рахують кількість забарвлених і незабарвлених клітин під мікроскопом зі збільшенням 100^x у всій камері.

Кількість нежиттєздатних (забарвлених клітин) не повинна перевищувати 3 % від загального числа клітин у суспензії.

Стадія II. Стимуляція інтерферогенезу – праймінг

На цій стадії переслідують дві мети: активізувати метаболізм лейкоцита (для цього в культуральне середовище вводять нативну плазму й інсулін) і стимулювати інтерферогенез дією інтерферону. Праймінг забезпечує підвищення виходу активності не менш чим в 4 рази.

Лейкоцити, звільнені від домішки еритроцитів, суспендують з розрахунку 10-20 млн. клітин в 1 мл середовища № 1, у яке доданий інсулін і нативний інтерферон. Суспензію переливають у плоскодонні колби ємністю 5 л, заповнюючи тільки половину об'єму. У колбу поміщають стрижень із м'якого заліза з некорозійним покриттям, що попередньо стерилізують автоклавуванням або пропалюванням у полум'ї пальника.

Колби із клітинною суспензією перекивають стерильною алюмінієвою фольгою й інкубують не менш 2-х годин на водяній лазні при 37 °С (при необхідності – до 12 годин).

Стадія III. Індукція інтерферону

Для індукції використовують бактеріологічно стерильний вірус хвороби Ньюкасла з інфекційним титром не нижче 10⁸ мл ТЦД₅₀ у культурі курячих фібробластів. Вірус попередньо підігривають до 37,5 °С.

Культуральні колби розкривають під полум'ям пальника й алантоїсну рідину, що містить вірус, переливають у суспензію з розрахунку 10⁻¹⁰⁰ ТЦД₅₀ на 1 лейкоцит (при вмісті лейкоцитів 25 млрд. додають 250 млн. вірусу з інтерферогенним титром 10⁹ ТЦД₅₀). Колбу перекивають алюмінієвою

фольгою з дотриманням умов стерильності й інкубують протягом 1 години при 37,5 °С.

Стадія IV. Відділення індукованих лейкоцитів

Суспензію індукованих лейкоцитів центрифугують 15 хв при 4 °С, або сепарують в умовах стерильності. Надосадову рідину відбирають в окрему ємність для знезаражування, а осад клітин суспендують у живильному середовищі, яке містить: середовище 199 або мінімальне середовище "Ігла", 3 од./мг гепарину, 5% плазми або сироватки донорської крові, мономіцин 50 од./мл, рН 7,2-7,4 (середовище № 2).

Стадія V. Біосинтез

Стаціонарне культивування індукованих лейкоцитів проводять у матрацах, куди зі строгим дотриманням стерильності заливають розраховану кількість середовища № 2 і вводять необхідну кількість лейкоцитів. Перекривають матраци стерильними пробками, суспензію клітин ретельно перемішують і встановлюють матраци у відповідне положення (норма "ребро") на стелажі термального приміщення з температурою 37 °С. Культивування продовжують 18-20 годин. Допускається ролерне культивування лейкоцитів.

Після завершення синтезу культуральне середовище, що містить інтерферон, центрифугують або сепарують з дотриманням умов стерильності для відділення відпрацьованих клітин.

Надосадову рідину збирають у стерильні сулії ємністю 5-10 л. Потім, для інактивації вірусу-інтерфероногена в кожній сулії доводять величину рН до 2,5 додаванням 20 %-го розчину соляної кислоти. З кожної сулії відбирають зразок (10 мл) для проведення контролів, сулію закривають стерильною гумовою пробкою й запечатують.

В ампули й флакони ємністю 5-10 мл препарат розливають по 2 мл. У флакони ємністю 500 мл – по 50 мл.

Ліофілізацію проводять у вакуум-сушильних апаратах будь-якої системи. Препарат зберігають у сухому, захищеному від світла місці при температурі від 4 до 10 °С, строк придатності препарату 1,5 року з моменту виготовлення.

2.6 Промислове одержання вакцин

2.6.1 Класифікація вакцин

Назва вакцини поєднує препарати, що сприяють створенню активного імунітету в людей і тварин. Вакцини одержують як з патогенних мікроорганізмів, так із продуктів їхньої життєдіяльності.

Застосування вакцин викликає імунологічну реакцію, що формує специфічну несприйнятливність до зараження відповідним збудником і стимулює захисні сили організму.

Перша вакцина отримана в 1768 р. Едвардом Дженнером, що запропонував щеплення проти віспи змістом віспяних капсул теляти.

Теоретично обґрунтував це відкриття Луї Пастер через 100 років. Він установив факт ослаблення вірулентності мікроорганізмів під впливом змін зовнішніх умов і створив вчення про активну імунізацію за допомогою ослаблених збудників інфекційних хвороб – бактерій і вірусів.

Вакцини можна розділити на наступні групи:

- живі вакцини;
- убиті вакцини;
- анатоксини (знешкоджені токсини);
- хімічні вакцини, що являють собою антигенні складові мікробної клітки, яка ізолюється хімічним шляхом .

Живі вакцини

Основним принципом одержання живих (атенуйованих) вакцин є зниження вірулентності мікроорганізму при збереженні вихідної антигенності й імуногенності.

При цьому для живих вакцин критерієм профілактичної ефективності є "залишкова вірулентність", що означає здатність приживатися в організмі, викликати локальні зміни специфічного характеру з боку клітин і тканин, алергізувати і імунізувати організм.

Таким чином, в основу способу одержання живих вакцин закладене спрямоване культивування на живильних середовищах і пасирування на лабораторних тваринах або в культурі тканин, у результаті якого мікроорганізм повинен послабити й генетично закріпити знижену вірулентність.

Однак, і культивування, і пасирування мають свої особливості - вони спрямовані на позбавлення мікроорганізму оптимальних умов для фізіологічної відтворюваності.

При культивуванні це може досягатися:

- додаванням у живильне середовище інгібуючих речовин;
- додаванням у живильне середовище антибіотиків й антисептиків у суббактеріостатичних концентраціях;
- використанням "голодних" середовищ, що не відповідають по якісному складу культивуємому мікроорганізму;
- зміною оптимального температурного режиму;
- використанням для пересівань "старих" культур;
- тривалим культивуванням мікроорганізму на живильних середовищах.

При пасируванні на лабораторних тваринах неодмінною умовою одержання живої вакцини є використання слабосприйнятливої або несприйнятливої тварини, коли мікроорганізми не здатні виявити свою вірулентність, а отже, хвороботворність.

Класичний приклад – жива вакцина проти сказу, отримана багаторазовим пасируванням вірусу вуличного сказу через мозок кролика.

Живі ослаблені вакцини, модулюючи імунну відповідь, адекватну перенесеному захворюванню, мають істотні переваги перед іншими вакцинами по цьому показнику. Однак їм властиві недоліки, які обмежують застосування цього способу одержання вакцин:

- можливість реверсії вакцинного штаму в патогенну форму;
- гетерогенність мікробної популяції, серед якої можуть зустрічатися вірулентні особини;
- складності в стандартизації вакцини по антигенному й імуногенному потенціалу через присутність особин, що перебувають на різних стадіях розмноження – від клітин у стадії логарифмічного розмноження до загиблих, що не мають заданої імуногенності;
- залежність від імунного статусу, наявності супутніх захворювань або протипоказання для застосування живої вакцини.

Убиті вакцини

Даний спосіб одержання вакцин розрахований на знешкоджуючий ефект фізичних і хімічних факторів, при якому загибель мікробної клітки не спричиняє втрати імуногенних і антигенних властивостей. Звідси витікає необхідність дозованої дії знешкоджуючого фактора і його спрямованість на хімічні компоненти структури мікробної клітки, що не володіють властивістю протективного антигену.

До вбитих вакцин відносяться також аутовакцини, що відрізняються індивідуальним призначенням, і анатоксини.

Найпоширенішим фізичним методом одержання вбитих вакцин є гріті вакцини, які одержують впливом на мікробну клітку температурного фактора. Імуноген - це білок, що являє собою термолабільний комплекс, що повинно обмежувати значення температури не вище 56 °С. Однак, повний антиген перебуває в клітинній оболонці або цитоплазмі мікробної клітки, тобто "прикритий" від термічного ефекту хімічними компонентами іншої природи. Тому абсолютна температура, яку використовують при одержанні грітих вакцин, як правило, становить 80 °С.

Гріті вакцини можна одержати не із всіх мікроорганізмів. Цей спосіб поширюється лише на ті з них, повний антиген яких має білкову структуру.

Іншим, також розповсюдженим методом одержання вбитих вакцин, є знешкодження ультрафіолетовим випромінюванням. УФ - вакцини можливо одержати при строгому дотриманні дозування опромінення, тому що деструктивний потенціал цих променів у відношенні основних хімічних компонентів структури досить значний.

У літературі описаний спосіб одержання озвучених вакцин. Спосіб базується на знешкоджуючій дії на мікроорганізми ультразвуку певної довжини хвилі.

Для одержання вбитих вакцин поряд з фізичними, використовуються хімічні фактори. Так одержав поширення спосіб одержання формал-вакцин, заснований на підборі мінімально діючої концентрації й температурного

режиму, які забезпечують загибель мікроорганізму при збереженні протективного антигену. Цей спосіб набув широкого застосування для знешкодження токсинів і є основним для виготовлення анатоксинів. До мікробних клітин додають 0,3-0,4 % формаліну й витримують при 39-40 °С протягом 3-4 тижнів.

Вбиті вакцини отримують також знешкодженням їх антибіотиками, антисептиками, дезінфектантами. Ці способи практично позначені тільки в методології сучасної вакцинної справи, тому що більшість сучасних збудників інфекційних захворювань характеризуються високою стійкістю до цих препаратів.

Обов'язковою умовою для контролю вбитих вакцин є перевірка їхньої стерильності, спрямована на виявлення хоча б однієї мікробної клітини, що зберігає життєздатність.

На відміну від живих, убиті вакцини піддаються стандартизації по кількісному вмісту мікробних тіл у певному об'ємі, антигенності й імуногенності.

Анатоксини

Анатоксин – препарат, що зберігає антигенні й імуногенні властивості й повністю позбавлений токсичності. Приклад: правцевий анатоксин. Збудник правця – спороутворюючий анаероб, утворює сильний екзотоксин, що має нейротропну дію. У наш час застосовується очищений правцевий анатоксин, адсорбований на гідроксиді алюмінію. Це білувата або жовтувата гомогенна суспензія. Основний діючий початок – очищений токсин правцевої палички, знешкоджений формаліном і сорбований на гідроксиді алюмінію.

Хімічні вакцини

Хімічні вакцини – термін, що поєднує імуногенні препарати, які являють собою хімічні компоненти, виділені зі структури мікробної клітки. Матеріально хімічні вакцини, залежно від заряду імуногенності, можуть бути представлені ізольованими зі структури мікробної клітини нуклеїновими кислотами (ДНК або РНК), рибосомами, білками, ліпополісахаридами, г्लюцидоліпопротеїдними комплексами, цитоплазматичною субстанцією й обривками оболонки мікробної клітини.

Як і при інших способах, хімічні вакцини одержують використанням фізико-хімічних факторів впливу. Однак, якщо живі й убиті вакцини засновані на збереженні структури мікробної клітки, то хімічні вакцини одержують зі зруйнованої мікробної клітини.

При використанні фізико-хімічних методів одержання хімічних вакцин найбільш часто застосовують деструктивне озвучування мікроорганізму з наступною седиментацією необхідного компонента, ультрацентрифугуванням із заданою швидкістю, поділом методами електрофорезу або колончатою хроматографії.

При використанні хімічного методу в основу одержання закладена екстракція зі структури мікробної клітки необхідного компонента з використанням органічних розчинників, ефекту гідролізу та ін. Класичним прикладом є метод Буавена, заснований на застосуванні трихлороцтової кислоти, що дозволяє виділити протективний антиген грамнегативних бактерій.

Хімічні вакцини мають безсумнівні переваги перед живими й убитими. Вони менш реактогенні, характеризуються імуногенною направленістю, являються очищеними бактерійними препаратами і, як правило, не викликають при імунізації побічних імунологічних ефектів.

Останнім часом використання нових технологій дозволило створити вакцини другої генерації:

Кон'юговані вакцини

Деякі бактерії, що викликають такі захворювання як менінгіти або пневмонію, мають антигени, які важко розпізнаються незрілою імунною системою новонароджених і грудних дітей. У кон'югованих вакцинах використовується принцип зв'язування таких антигенів із протеїнами або анатоксинами іншого типу мікроорганізмів які добре розпізнаються імунною системою дитини. Таким чином, організмом дитини проти кон'югованих антигенів виробляється імунітет.

Субодиничні вакцини

Субодиничні вакцини складаються із фрагментів антигену, здатних забезпечити адекватну імунну відповідь. Ці вакцини можуть бути представлені як частками мікробів, так і отримані методом генно-інженерної технології. Прикладами субодиничних вакцин, у яких використовуються фрагменти мікроорганізмів, є вакцини проти стафілококів і менінгококів. Рекombінантні субодиничні вакцини (на прикладі вакцини проти гепатиту В) одержують шляхом введення частини генетичного матеріалу вірусу гепатиту В у клітки пекарських дріжджів. Відбувається наробинок антигенного матеріалу, що потім очищається й зв'язується з ад'ювантом. У результаті виходить ефективний і безпечний препарат.

Рекombінантні (векторні) вакцини

Вектор, або носій - це ослаблені віруси або бактерії, усередину яких поміщений генетичний матеріал від іншого мікроорганізму, який є значимим для розвитку захворювання, до якого необхідно створення імунітету. Так вірус коров'ячої віспи використовується для створення вакцин проти ВІЛ-інфекції. Подібні дослідження проводяться з ослабленими мікроорганізмами, зокрема, сальмонелами, як носіями часток вірусу гепатиту В. У наш час широкого застосування векторні вакцини не знайшли.

Нові можливості одержання вакцин відкриває метод генної інженерії. Щоб організм не перевантажувати й не вводити в нього небажані речовини, можливо за допомогою рекombінантних мікроорганізмів продукувати тільки один необхідний антиген.

Створення генно-інженерних вакцин ведуть у два прийоми:

- одержання антигенів з рекомбінантних мікроорганізмів або культур клітин, у які уведений певний ген збудника захворювання; цим методом отриманий матеріал для вакцинації проти гепатиту В, грипу А, малярії, ящура, сказу, паравірусу свиней та ін.;

- одержання матеріалу для вакцинації включенням гена патогенного вірусу, що не викликає захворювання, до складу вірусу осповакцини; таким шляхом створений матеріал для вакцинації проти гепатиту В, вірусу сказу, вірусу СНІДу та ін.;

Генна інженерія дала можливість також одержати вакцини проти паразитарних (одноклітинних) інфекцій. Вакцина, що індукє імунітет проти малярії, також створена шляхом клонування генів поверхневих білків малярійного плазмодія в бактеріальних клітках. Якщо врахувати, що у світі близько 200 млн. чоловік хворіють на малярію, стає зрозумілою важливість цього досягнення.

2.6.2 Вимоги до вакцин

Всі вакцини незалежно від їхнього походження повинні відповідати основним вимогам (інакше їх не можна застосовувати для активної імунізації):

- специфічна стерильність (вакцини повинні містити в живому або вбитому виді тільки ті мікроорганізми, які відповідають назві даної вакцини);
 - нешкідливість (визначається, перш ніж вакцина надійде для застосування);

- стандартність (однакова кількість вакцини й однакові або дуже близькі антигенність і імуногенність);

- помірна реактогенність;

- антигенність і імуногенність.

Поняттю «ідеальна вакцина» відповідає:

- висока ефективність;

- безпека;

- стабільні результати;

- мінімальне число імунізуючих доз;

- найпростіший метод введення (пероральний);

- низька ціна;

- стабільність при зберіганні;

- створення тривалого імунітету (бажано довічного).

2.6.3 Технологія одержання живої грипозної алантоїсної вакцини для інтраназального застосування

Основним діючим початком вакцини є ослаблений вірус, вирощений в алантоїсній порожнині курячих ембріонів, що розвиваються, інкубуємих при оптимальній температурі.

Жива грипозна інтраназальна вакцина (*Vaccinum griposum vivum allantoic intranasa*) застосовується для профілактики епідемічного грипу в людей старше 16 років. Випускається вакцина у вигляді монопрепарату типу А або В. Доза на одну вакцинацію становить 0,2 мл вакцини (по 0,1 мл вакцини кожного типу). Вакцину вводять інтраназально з розпилювача рідких препаратів з регульованою дисперсністю.

Концентрація й очищення вакцини не робиться. Консерванту й сорбенту вакцина не містить, кількість білка в ній не регламентується. Вакцина випускається в сухому виді, в ампулах по 2 мл. Препарат являє собою пористу, легко розчинну таблетку світло-жовтого кольору. Строк придатності вакцини 1 рік з моменту висушування. Вакцину розчиняють в об'ємі, рівному вихідній кількості вакцини, узятій до сушіння. Як розчинник використовують дистильовану або охолоджену кип'ячену воду. Вакцина може містити антибіотики: не більше 500 мкг мономіцину й 4 мкг ністатину в 1 мл готового препарату.

Вакцинні штами, що використовуються для виробництва грипознай інтраназальної вакцини, повинні відповідати наступним вимогам:

- пройти не менш 5 пасажів у курячому ембріоні;
- бути специфічними й відповідати за антигенною структурою циркулюючим вірусам грипу;
- мати біологічну активність, визначену на курячих ембріонах;
- бути бактеріологічно стерильними, вільними від мікоплазм, мікобактерій туберкульозу, сторонніх вірусів;
- бути нешкідливими для мишей при підшкірному введенні.

Вакцинний штамп може викликати підйом температури вище 37,5 °С не більш ніж в 2 % щеплених. Штамп повинен приживатися на слизуватій оболонці носоглотки не менш чим в 70 % щеплених. Щорічно контролюється антигенність і реактогенність не менш 4 серій вакцини на дорослих добровольцях.

Технологія виготовлення вакцини

Технологічний процес по готуванню живої грипознай інтраназальної вакцини здійснюється в такий спосіб.

У господарстві, звідки надходять яйця курей для інкубації, не повинні реєструватися спалахи інфекційних захворювань, викликаних сальмонелами, мікобактеріями туберкульозу, мікоплазмами, а також збудниками віспи птахів, інфекційного бронхіту й інших агентів, патогенними для курячих ембріонів. Курячі ембріони 10-11 денного віку масою 45-50 г, отримані із благополучного по інфекційних захворюваннях господарства, надходять у відділення по виробництву вакцини. Після спеціальної обробки (випал спиртом, обробка йодом) курячі ембріони надходять у бокс зараження на спеціальних металевих лотках. За допомогою шприца в кожний життєздатний ембріон вводять вірус грипу. Через 48-72 год інкубації при 33-35 °С інфіковані ембріони переглядають, відбираючи

життєздатні, і прохолоджують протягом 18-24 год при 4 °С. Інфіковану алантоїсну рідину збирають у флакони за допомогою вакуумної системи. Після необхідних контролів (стерильність, біологічна активність) інфіковану алантоїсну рідину з'єднують зі стабілізатором (10 % розчином пептону) у рівних об'ємах, розливають в ампули по 2 мл, висушують на сушильних установках. Технологічний режим сушіння для кожної установки встановлюють експериментальним шляхом з урахуванням вимог до готового препарату. Ампули з висушеною вакциною запаюють у струмі інертного газу. Після висушування вакцину контролюють на стерильність, біологічну активність, вологість, фізичні властивості. Випускають препарат у коробках по 10 ампул моновакцини типу А і В.

Грипозну інтраназальну вакцину на різних етапах виготовлення контролюють у виробничому відділенні й ВБК на бактеріологічну стерильність, відсутність мікоплазм і сторонніх вірусів, біологічну активність, специфічність і нешкідливість.

Готову вакцину контролюють шляхом посіву 4 ампул. Вакцину вважають стерильною лише в тому випадку, якщо при посівах на живильні середовища не виявлено росту.

Біологічну активність визначають на курячих ембріонах шляхом зараження їх послідовними розведеннями вірусу (від 10^{-3} до 10^{-7}) вакцинного штаму або вакцини (по 4 ембріони на кожне розведення). Нешкідливість перевіряють на 3 мишах при підшкірному введенні 0,5 мл вакцинного штаму або вакцини. Усі миші протягом 3 діб після ін'єкції повинні вижити. Відсутність у вакцинному штамі мікоплазм, мікобактерій туберкульозу, сторонніх вірусів перевіряють відповідно до стандартних методик.

Специфічність вакцини визначають за стандартною методикою, реактогенність – на щеплених людях, з огляду на температурні реакції й загальний стан протягом 4 діб після вакцинації, антигенність вакцинного штаму й вакцини – шляхом порівняння титрів антитіл у парних сироватках щеплених, перед вакцинацією й через 4-6 тижнів після її закінчення.

2.6.4 Одержання живої поліомієлітної вакцини

Жива поліомієлітна вакцина являє собою препарат з атенуйованих (ослаблених) штамів вірусу поліомієліту людини (*Poliovirus hominis*) трьох імунологічних типів селекційних Sabin. Жива поліомієлітна пероральна вакцина *Vaccinum Poliomyelitidis vivum per orale* зі штамів Sabin I, II і III типів (одного або суміші двох, трьох типів, що містяться в готовому препараті) призначена для профілактики поліомієліту. Вона готується в рідкій формі й у формі цукерок-драже (антиполіодраже). Антиполіодраже принципово не відрізняється від рідкої вакцини, являючи собою тільки особливу форму розфасовки.

Основним діючим початком вакцини є повністю нешкідливі для людини атенуйовані штами вірусу поліомієліту. Вакцинні штами, додатково

очищені від сторонніх вірусних агентів вирощуються в первинних культурах ниркових клітин африканських зелених мавп.

Технологія виготовлення препарату

Мавп, призначених для узяття нирок і готування з них культур клітин, витримують у карантині 6 тижнів. Протягом карантинного періоду мавп утримують ізольовано по 1-2 у спеціальних клітках – витяжних шафах. Останні підключають до системи окремої припливно-витяжної вентиляції, що забезпечує 8-10 кратний обмін повітря й виключає попадання його із клітки в кімнату. У кімнатах з мавпами в період карантину забороняється внос тварин і підсадження нових. В 1-й тиждень карантину в питну воду для мавп додають антибіотики. Випадки смерті й захворювання мавп під час карантину в кожній секції реєструють окремо й аналізують для ухвалення рішення про використання всієї партії тварин у даній секції. Партію вважають благополучною, якщо неспецифічне вибракування тварин у секції не перевищує 5 % протягом місяця.

Кімнати, у яких містять мавп, обладнують вентиляцією. У приміщеннях підтримують температуру 20 °С і відносну вологість не вище 40 %. Прибирання приміщень роблять із застосуванням дезінфікуючих розчинів, наприклад, хлораміну.

У день забою в мавп беруть кров з метою дослідження сироваток на антитіла до аденовірусів і реовірусів.

Трипсинізацію ниркової тканини проводять 0,25 % розчином трипсину, приготовленим на фосфатному буфері.

Для вирощування культур клітин нирок мавп можна використовувати багато живильних середовищ, в тому числі середовище з 0,5 % ензиматичного гідролізату лактальбуміну на розчині Хенкса, середовище Ігла або середовище 199. Всі середовища вимагають додавання від 5 до 10 % коров'ячої (краще телячої) сироватки.

Для розмноження вірусу використовують те ж середовище, що й для вирощування клітин, але без сироватки й з додаванням подвійного об'єму бікарбонату натрію.

Для одержання культур нирок зелених мавп останніх убивають під гексеналовим наркозом. Кожну пару витягнутих нирок обробляють індивідуально; при цьому номер мавпи є номером партії отриманих з її культур клітин. Для одержання гарної якості культур клітин в одну півторалітрову матрацну колбу з робочою площею 300 см² вводять до 35 млн. клітин в 300 мл середовища. Матрацні колби інкубують при 37 °С. Формування клітинного моношару, прийняттого для зараження вакцинними штамми вірусу поліомієліту, звичайно відбувається до 8-го дня після посадки клітин. З метою виявлення ознак дегенерації моношару або мікробної контамінації за культурами клітин спостерігають протягом усього строку вирощування. Для подальшого виробничого процесу вважають придатними тільки ті партії культур клітин, у яких не реєструвалося ніяких

ознак дегенерації моношару клітин або мікробної контамінації. Загальне число відбракованих по неспецифічних причинах культур використовуваної партії не повинне перевищувати 10 %. Для визначення контамінації сторонніми вірусними агентами залишають незараженими від 10 до 25 % культур клітин від кожної партії. При цьому за контрольними культурами спостерігають протягом 14 днів з моменту зараження посівним вірусом основної частини виробничої партії клітин.

Перед зараженням культури клітин відмивають розчином Ерла від сироваткових компонентів середовища росту. Потім уводять у матрацні колби підтримуюче середовище, у яке попередньо додають вакцинний штам. При цьому в півторалітрову матрацну колбу наливають 350 мл зазначеного середовища. Для розмноження вірусу культури клітин інкубують строго при 34 °С. Всі заражені матрацні колби переглядають макроскопічно й вибірково – під мікроскопом. Культури з повною дегенерацією клітин відбирають для збору вірусотримуючої рідини (звичайно на 4-й день після зараження). Вірусотримуючу рідину збирають окремо для кожної партії клітин у п'ятилітрові сулії. Відбирають проби для контролю стерильності, титру вірусу й визначення контамінації сторонніми вірусами. Сулії отриманого первинного збору вірусу зберігають при мінус 20 °С до завершення всіх видів контролю.

Первинні збори вірусу одного типу, що пройшли всі необхідні контролю, зводять в об'єднаний збір об'ємом 150-200 л. Після перемішування зведеної вірусотримуючої рідини з бака беруть проби для контролю бактеріальної й грибової стерильності, титру вірусу й визначення контамінації мікобактеріями туберкульозу. З метою підвищення термостабільності вакцини до обробки на сепараторі або після фільтрації до вірусотримуючої рідини може бути доданий кристалічний хімічно чистий хлористий магній до одномолярної кінцевої концентрації. Потім вірусотримуючу рідину освітлюють за допомогою пластинчастого сепаратора. При цьому видаляється грубий тканевий детрит, що перешкоджає фільтрації. Оптимальний режим роботи сепаратора – пропущення рідини зі швидкістю 25-30 л/год. Далі здійснюють фільтрацію об'єданого збору спочатку через освітлюючі фільтри, а потім через стерилізуючі. У якості освітлюючих фільтрів використовують азбестові прокладки. У якості стерилізуючих фільтрів використовують пластини типу «Міллпор» з діаметром пор 220-450 нм.

Профільтровану вірусотримуючу рідину збирають у стерильний прийомний бак з нержавіючої сталі. Після закінчення фільтрації відбирають проби для визначення титру вірусу, контролю нейротропної активності на мавпах і визначення бактеріальної й грибової стерильності. Фільтрат після ретельного розмішування розливають у стерильні сулії з термостійкого скла. Якщо до вакцини був доданий розчин хлориду магнію, то сулії витримують при 34 °С протягом 36 год для стабілізації вакцинного вірусу й потім

зберігають при температурі від мінус 20 до мінус 30 °С до закінчення всіх контролів. Вакцину розфасовують у рідкому виді в інсулінові флакони по 10, 25 і 50 доз або використовують для виготовлення цукерок-драже. Готову форму розфасованої вакцини контролюють на титр вірусу, а також на бактеріальну й грибкову стерильність і потім розподіляють для імунізації населення.

Рідку живу поліомієлітну вакцину можна зберігати при мінус 20 °С 2 роки від дня її випуску, при 4-8° С – 6 міс. Антиполіодраже зберігається при мінус 20° С 6 місяців, при 4-8° С – 3 міс. Після закінчення зазначеного строку зберігання препарат підлягає переконтролю для визначення активності вірусу.

Технологія багатосерійного виробництва живої пероральної поліомієлітної вакцини є одним із самих складних процесів виготовлення живих противірусних препаратів. Ця обставина пов'язана з тим, що не тільки жива вакцина повинна мати певний титр і бути стерильною, але також вакцинний штам повинен зберегти вихідний рівень залишкової нейровірулентності авторських поліовірусів, а вакцина не повинна містити ніяких сторонніх вірусних і інших агентів. Штами Sabin адаптовані до розмноження (при температурі 34 °С). У випадку підвищення температури при їхньому культивуванні може відбутися реверсія поліовірусів у бік вірулентного фенотипу, тому досить важливо зберігати температуру інкубування заражених культур клітин на строго певному рівні. Ниркова тканина мавпи може бути контамінована сторонніми агентами, небезпечними для людини, тому необхідно застосовувати всі новітні методи дослідження культур клітин і вакцин дня їхніх індикацій. У зв'язку із цим одним із самих відповідальних етапів виробництва живої поліомієлітної вакцини є біологічний контроль препарату. Тільки багатоступінчастий і ретельний контроль на стадії виробництва й готового продукту забезпечує випуск високоякісної безпечної вакцини.

2.6.5 Виробництво живої коревої вакцини

Наукові дослідження, проведені з метою одержання коревих вакцин, мають багаторічну історію. З метою атенуації вірусу кору використовували пасажі на тваринах, курячих ембріонах і різних клітинних культурах. Останній напрямок виявився найбільш успішним. Вдалося отримати атенуовані штамми вірусу кору і розробити сучасну технологію виробництва живої коревої вакцини.

У 1954 р. Enders і Peebbs виділили штам вірусу кору з крові хворої дитини в культурі клітин нирок людини. Виділений штам по імені дитини був названий Едмонстон і став родоначальником групи вакцинних штамів Едмонстон А і В.

Найбільш поширеним клітинним субстратом для приготування вакцин є культури клітин ембріонів безлейкозних птахів – кур і японських

перепелів. У ряді країн застосовують також первинні культури молодих тварин: нирок собак, телят і морських свинок. У колишньому СРСР, і декілька пізніше в Румунії була показана можливість використання для приготування корової вакцини диплоїдних клітин людини.

Жива корева вакцина (*Vaccinum morbilorum vivum*) випускається в сухому вигляді і має жовтувато-рожевий колір сухої маси. Початком, що діє, у вакцині є атенуйований штам вірусу кору «Ленінград 16». Штам Л-16 виділений в 1960 р. в Ленінградському інституті експериментальної медицини імені Пастера з крові хворої на кір дитини. Він був ізольований і атенуйований в культурі клітин нирок новонароджених морських свинок.

Живу кореву вакцину використовують для профілактики кори у дітей у від 10 місяців до 14 років. В результаті одноразової вакцинації більш ніж у 90 % щеплених дітей утворюються антитіла і формується резистентність до інфекції. Поствакцинальний коревий імунітет зберігається більше 14 років (термін спостереження).

Технологія виготовлення вакцини

Основною сировиною для виробництва вакцини є первинні клітинні культури, приготовані з ембріонів безлейкозних японських перепелів. Ембріони для приготування культур клітин повинні поступати із стада, вільного від вірусів групи лейкозу птахів. У стаді не повинні реєструватися спалахи інфекційних захворювань, викликаних сальмонеллами, мікобактеріями туберкульозу, мікоплазмами, а також збудниками віспи птахів, чуми птахів, інфекційного бронхіту і іншими агентами, патогенними для курей і перепелів, що повинне підтверджуватися свідоцтвом ветеринарного нагляду.

Для приготування клітинних культур використовують ембріони 9-10 денного віку. Напередодні або в день трипсинізації тканини яйця переглядають за допомогою овоскопа в затемненому приміщенні і відбирають придатні для виробництва на підставі відсутності зовнішніх пошкоджень, наявності ембріона і добре розвиненої судинної системи. Партія тканинної культури може бути отримана шляхом одночасної трипсинізації не більше 200 ембріонів.

Для виробництва живої корової вакцини в культурі клітин ембріонів перепелів (ЕП) використовують високо атенуйований штам вірусу, який пройшов 21 пасаж в культурі клітин ПМС і потім 2 пасажі в культурі клітин ЕП. Допускається пасивування вірусу в первинних тканинних культурах з таким розрахунком, щоб вакцина містила вірус, що пройшов не більше 10 пасажів від авторського вакцинного штаму.

Для виробництва в стандартних умовах з вакцинного штаму виготовляють виробничий штам, який служить джерелом для серій посівного вірусу протягом тривалого періоду. Виробничий штам вірусу кору повинен бути стерильним, не містити мікоплазм, сторонніх вірусів, мікобактерій туберкульозу; не володіти нейровірулентністю, не викликати у дітей

місцевих і загальних реакцій після підшкірного введення протягом 5 днів; бути специфічним (при введенні сприйнятливим до кору дітям повинен стимулювати вироблення антигемаглютинуючих антитіл не менше, чим у 90% щеплених). Ліофілізований виробничий штам зберігають при температурі не вище 20 °С.

При виготовленні вакцини застосовують систему посівних серій вірусу. Посівний вірус повинен повністю відповідати вимогам, що пред'являються до виробничого штаму. Посівний вірус в рідкому вигляді зберігають при 4 °С протягом 10 діб, в замороженому вигляді при мінус 20 °С – 6 місяців і при мінус 40 °С протягом 1 року.

Об'єм клітинної суспензії, доводять до необхідного стандарту, використовуючи ростове середовище. Суспензію розливають в матраци або флакони з розрахунку 800000 клітин в 1 мл, вносять посівний вірус і інкубують в ролерних апаратах при 22 об/год і температурі 35 °С. Через 2-5 діб клітинний шар ретельно відмивають середовищем 199 або сольовим розчином з таким розрахунком, щоб сироватка тварин містилася в розведенні не менше 1:10000000, і вносять підтримуюче середовище. Останнє не повинно містити компонентів, не дозволених для парентерального застосування. Не менше 10-25 % матраців з тканинною культурою залишають незараженими для контролю тканини на наявність сторонніх вірусів. Через 7-8 діб після зараження і потім кожні 2-3 доби вірусотримуючу рідину зливають у флакони (індивідуальні вірусні збори). У матраци додають свіже середовище в кількості, рівній об'єму знятої вірусотримуючої рідини. З кожного флакона беруть проби для контролю. Збір вірусотримуючої рідини і заміну її свіжим середовищем, проводять 3-5 разів до тих пір, поки на поверхні скла зберігається 50 % клітин.

Всі стерильні індивідуальні вірусні збори після осадження клітин поміщають в шар сухого льоду для заморожування осаду. Надосадову рідину з флаконів об'єднують в бутель. До рідкого напівфабрикату додають стабілізатор (5 % сорбіту і 5 % желатози) і беруть пробу для контролю. Рідкий напівфабрикат зберігають до розливу при 4 °С не більше 25 діб, а при мінус 40 °С не більше 1 року.

Напівфабрикат розливають в спеціальні флакони або ампули по 0,1-0,5 мл, гарантуючи необхідний вміст вірусу в прищепній дозі. Флакони або ампули з напівфабрикатом розміщують в металеві секторні касети і поміщають в холодильну камеру при температурі не вище мінус 40 °С) на термін не менше 6 г. Заморожений матеріал завантажують у вакуум-сушильну камеру, заздалегідь охолоджену до мінус 10 °С.

В процесі сушки необхідно підтримувати тиск залишкового повітря в межах 100-150 мкм ртутного стовпа з подальшим зменшенням в процесі сушки до 25-70 мкм. Режим і тривалість процесу висушування визначаються конструкцією вакуум-сушильного апарату. Після закінчення ліофілізації

вивантажений з апарату матеріал розміщують в ексикатори, повітря з яких відкачують до залишкового тиску 100-150 мкм.

Відаювання ампул проводять під вакуумом. Флакони закривають в умовах вакууму безпосередньо в сушильній камері.

Методи контролю

Готова вакцина повинна бути стерильною, вільною від мікоплазм, мікобактерій туберкульозу і сторонніх вірусів, повинна бути специфічною, нешкідливою і містити в одній прищепній дозі не менше 1000 ТЦД₅₀ вірусу, залишкова вологість у вакцині не повинна перевищувати 4 %, при масовому застосуванні викликати не більше 4 % сильних реакцій (температура вище 38,5 °С).

Вакцину випускають розфасованою по 1-5 доз. Термін придатності препарату 1 рік з моменту випуску. До кожної коробки з вакциною прикладається коробка з розчинником. Розчинник, збалансований ізотонічний розчин Хенкса, з рН=7,0-7,2 повинен бути безбарвним, прозорим, не містити зважених часток і осаду, бути стерильним, нешкідливим і апірогенним. Готова вакцина повинна зберігатися в холодильниках-складах на окремих стелажах.

2.6.6 Технологія отримання гібридом моноклональних антитіл

Справжній переворот в гібридизації клітин зробили роботи Г. Келлера і Ц. Мильштейна, які створили метод отримання однорідних антитіл. Такі гібриди називають гібридомами. У широкому сенсі гібридомою є "безсмертні" гібридні клітки, отримані злиттям ракових клітин з клітками, що продукують цінні речовини. Гібридомну техніку можна широко застосовувати в царстві рослин і тварин.

Найбільші успіхи досягнуті при створенні гібридом, що синтезують моноклональні антитіла, тобто антитіла, здатні реагувати лише з одним антигеном.

Культивування тваринних клітин в суспензії схоже із звичайним глибинним культивуванням мікроорганізмів, проте має свою специфічність, яку можна бачити на прикладі отримання моноклональних антитіл.

Широке застосування моноклональних антитіл в медицині і при очищенні біопрепаратів привело до необхідності збільшення цього виробництва.

Щоб отримати 1 кг моноклональних антитіл, потрібно близько 20 тис. мишей, а методом глибинної ферментації така ж кількість антитіл може бути отримана за допомогою гібридомних клітин за 10 діб в апараті місткістю 7 м³. Методи глибинного культивування гібридомних клітин мають ряд переваг, зокрема, міняючи місткість реакторів, можна забезпечити отримання будь-яких кількостей моноклональних антитіл, причому економічно це вигідніше, ніж при використанні тварин.

Для культивування гібридомних клітин застосовують синтетичні середовища спеціального складу. Середовища і повітря стерилізують при фільтрації. Апаратура для культивування клітин гібридами в принципі така ж, як і для мікроорганізмів. Проте в цих умовах механічне перемішування небажане - краще використовувати ерліфтну систему аерації. Гібридомні клітки добре розвиваються при ступені насичення середовища розчиненим киснем від 8 до 100 % від повного насичення. Бажано, щоб реактор був виготовлений з скла або гладкої нержавіючої сталі. Процес ферментації тривалий, близько 1-2 тижнів, тому дуже важливо забезпечити умови, що виключають можливість контамінації. Концентрація клітин після ферментації досягає більше 1 млн. на 1 см³ середовища.

Фірма "Селтек" реалізувала процес культивування гібридомних клітин в ерліфтному біореакторі місткістю 1 м³.

Інокулянт розмножують в реакторі місткістю спочатку 0,01 м³, потім 0,1 м³, і закінчують процес в реакторі місткістю 1 м³. Біосинтез антитіл спочатку йде паралельно із зростанням культури і досягає максимуму в стаціонарній фазі і фазі відмирання клітин. У ферментаторі місткістю 1 м³ за 250-400 годин культивується 150 г антитіл. Річне виробництво моноклональних антитіл в такій системі складає 3-5 кг. Після закінчення ферментації клітинну біомасу відокремлюють фільтруванням або центрифугуванням. Супернатант (фільтрат) концентрують ультрафільтрацією до концентрації антитіл 1 г/дм³ рідини. Подальше очищення препарату досягається методами осадження, інообмінної хроматографії і афінної обробки.

Моноклональні антитіла використовуються в практичній діагностиці таких бактерійних інфекцій, як збудник холери, лепри, а також захворювань, викликаних патогенними простішими. Моноклональні антитіла грають вирішальну роль в діагностиці вірусних захворювань, в числі яких знаходяться збудники злоякісних пухлин у людини і тварин.

Контрольні запитання

1. Первинна культура клітин. Її недоліки з точки зору промислового виробництва.
2. Постійна клітинна лінія. Відмінність і перевага перед первинною культурою.
3. Живильні середовища для вирощування клітин.
4. Дезагрегація тканин тварин.
5. Методи тріпсинізації.
6. Вирощування одношарових первинних культур.
7. Культивування кліток на щільних поверхнях.
8. Культивування клітин тварин в суспензії.
9. Види інтерферонів.

10. Людський інтерферону.
11. Сировиною при здобутті людського лейкоцитарного інтерферону.
12. Стадії процесу отримання лейкоцитарного інтерферону.
13. Вакцини. Джерела здобуття вакцин.
14. Класифікація вакцин.
15. Живі вакцини. Принцип отримання.
16. Убиті вакцини. Методи отримання.
17. Анатоксини.
18. Хімічні вакцини. Переваги хімічних вакцин.
19. Субдиничні вакцини.
20. Рекombінантні вакцини.
21. Суть методу штучних антигенів і вакцин.
22. Жива грипозна алантоїсна вакцина. Вимоги до вакцинних штамів
23. Технологія отримання живої грипозної інтраназальної вакцини.
24. Технологія отримання живої поліомієлітної вакцини.
25. Виробництво живої корової вакцини.
26. Вимоги до вакцин.
27. Кон'юговані вакцини.

3 ОТРИМАННЯ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН З КЛІТИН РОСЛИН

3.1 Технологічні особливості культивування рослинних клітин

Культивування клітин і тканин рослин – порівняно молода галузь біотехнології. Початок практичного культивування тканинних культур рослинного походження можна віднести до 1955 р. Як відомо, в природних умовах клітки рослин знаходяться в тканинах і органах і захищені від механічних дій зовнішнього середовища. Крім того, ці клітки потребують безлічі компонентів мінеральної і органічної природи для метаболізму і зростання. Для рослинних клітин важливе значення мають солі азоту, калію, магнію, фосфору і ряд мікроелементів. З органічних речовин, крім вуглеводів, важливі окремі амінокислоти, вітаміни і фітогормони (індолілоцтова кислота, кінетин), ауксини, цитокініни, гібберелинова кислота та ін.).

В даний час рослинні клітки культивують, як правило, у вигляді каллуса. Калусні клітки отримують з фрагментів тканин різних органів вищих рослин, поміщаючи шматочки такої тканини в живильне середовище (пробірки, колби, чашки Петрі). У природних умовах каллусна тканина утворюється в травмованих місцях для анатомічної регенерації постраждалого органу. Від інфекції калусну тканину в природних умовах захищають імунні механізми організму. У штучних умовах необхідно дотримувати стерильність всіма доступними засобами. Зазвичай експлантат обробляють дезінфікуючими розчинами і промивають очищеною водою. Потім його поміщають в розчин, що містить ферменти, що руйнують клітинні стінки, при цьому утворюються тисячі одиночних «голих» клітин, протопластів, що не мають клітинних стінок. У живильному розчині протопласти утворюють нові клітинні стінки, клітки починають ділитися.

Для дотримання стерильності середовище, посуд і апаратуру стерилізують традиційними засобами (автоклавування, ультрафільтрація, опромінювання). Щоб забезпечити розвиток калусних клітин в живильних середовищах, що містять необхідні для зростання речовини, клітки тканин витримують на середовищі без гормонів протягом 3-6 діб до інкубації.

Через 4-6 тижнів культивування трансплантата виникає первинний каллус, який необхідно перенести на свіже живильне середовище. При культивуванні агаризованого середовища (твердофазний спосіб культивування) шматочок каллуса повинен мати масу 60-100 мг на 30-40 мл свіжого середовища. Калусна тканина, що виросла на поверхні твердого живильного середовища, має аморфну структуру, що є масою тонкостінних паренхімних клітин. Калусні тканини, що мають спочатку білу, жовтувату, зелену або червону пігментацію, можуть втрачати забарвлення, а структура тканини стає більш рихлою. Хімічний склад калусної тканини зазвичай відрізняється від складу відповідного органу рослини.

Калусні клітки після ряду ділень переходять на звичайний для даної рослини цикл розвитку, тобто починається диференціація. Цей процес регулюють гормони.

Культивування клітин рослин на твердих середовищах здійснюють також в різних механізованих установках, конструкції яких аналогічні жививанню в мікробіологічному синтезі (див., наприклад, рис. 23).

Процес отримання культури клітин твердофазним способом вимагає використання дуже великої площі, не гарантує стерильності і дає низький вихід продукту.

Перспективнішим є глибинне суспензійне культивування. Для глибинного культивування необхідно отримати лінії клітин, створюючих невеликі агрегати (по 5-10 клітин). Придатніші рихлі калусні тканини. Трансплантат бажано обробляти пектиназою. Рекомендується використовувати середовища, що містять 2,4-дихлорфеноксицтову кислоту і не містять іони Са. У таких середовищах агрегати клітин не утворюються. Перед пересіванням первинну культуру фільтрують через два шари марлі або через сита (нейлонові, металеві), щоб відокремити крупні агрегати калусної тканини і залишки трансплантата. На утворення клітинних агрегатів також впливає інтенсивність перемішування середовища, оскільки клітки надзвичайно чутливі і швидко лізуються. Більшість клітин гинуть.

Глибинне культивування можна здійснювати в колбах на гойдалках при частоті обертання 100-120 об/хв.

На 60-100 мл середовища використовують 2-3 г свіжої калусної тканини. Для культивування рослинних клітин використовують також спеціальні металеві або скляні ферментатори різної конструкції (з мішалками або барботинного типу). Режим ферментації періодичний або безперервний, головним чином хемостатний.

Біосинтез проводять у ферментаторах об'ємом від 0,1 до 63 м³ і більш, забезпечених пристроями для перемішування і аерації. При управлінні процесом вирощування клітин важливо мати гомогенну систему.

Аерацію культуральної біомаси здійснюють стерильним повітрям через барботер. Повітря стерилізують, як правило, шляхом фільтрації на двох-трьох послідовно встановлених фільтрах. В ході культивування клітин рослин регулюють температуру (25-37 °C), рН і окислювально-відновний потенціал. Процес культивування ведуть до тих пір, поки йде інтенсивний синтез цільового продукту і в середовищі не будуть вичерпані живильні речовини. При визначенні кінця культивування необхідно враховувати дані мікроскопічного контролю стану культури, відсутність сторонньої мікрофлори, концентрацію основних живильних речовин, біомаси, цільового продукту, рН.

Необхідно відзначити, що рослинні клітки ростуть і розмножуються значно повільніше, ніж клітки мікроорганізмів. Час їх подвоєння 1-3 діб.

Процес культивування рослинних клітин займає 2-3 тижні, що підвищує вимоги до забезпечення асептичних умов.

В даний час методом культивування клітин в промислових умовах отримують речовини вторинного метаболізму. Практичний інтерес представляють алкалоїди, глікозиди, полісахариди, терпеноїди, поліфеноли, ефірні масла, пігменти та ін. Деякі вторинні метаболіти, що отримуються при культивуванні рослинних клітин, наведені в таблиці 2.

Таблиця 2 – Продукти вторинного метаболізму, що отримуються при культивуванні рослинних клітин

Продукт	Застосування
Вінбластін або вінкристин	Лікування лейкемії
Дігитін	Лікування серцево-судинних захворювань
Хінін	Лікування малярії
Кодеїн	Аналептик
Аймалін	Протиаритмічне

Як в будь-якому біотехнологічному процесі, при отриманні метаболітів за допомогою клітин рослинного походження, важливе значення має активність продуцента. Останні досягнення клітинної інженерії показали, що у ряді випадків метаболіти, активно продукуючі рослинні клітки, можна отримати методом злиття протопластів двох початкових рослинних клітин. При цьому гібридні клітки продукують не тільки метаболіти початкових рослин, але і абсолютно інші. Гібридизацію рослинних протопластів успішно здійснюють методом електростимуляції злиття клітин або прямим мікроін'єктуванням ДНК однієї клітки в іншу. Ямомото отримав таким чином гібридні клітки з *Cortus japonica* і *Euphorbia millii*, які активно продукували алкалоїд берберин – антибактеріальну речовину.

3.2 Промислове виробництво БАР з культури клітин рослин

У основі промислового виробництва БАР з культури клітин рослин лежить ряд послідовних стадій і операцій: отримання високопродуктивних продуцентів, розробка найбільш сприятливих умов культивування продуцента БАР з максимальним біосинтезом цієї речовини, підбір і впровадження в практику відповідних методів виділення і очищення БАР, створення готових препаратів і контроль якості.

3.2.1 Підготовка середовища для культивування продуцента і посівного матеріалу (перша стадія)

Підготовка середовища. Для кожного продуцента БАР, для кожного знов утворюваного каллуса і суспензійної культури рослин розробляється своє оптимальне середовище, яке повинне відповідати наступним основним вимогам:

- забезпечувати хороше зростання біомаси і максимально можливе утворення БАР (алкалоїди, глікозиди, полісахариди, терпеноїди та ін.);
- містити доступні за вартістю компоненти;
- забезпечувати застосування найбільш економічних і ефективних прийомів виділення і очищення БАР.

Компоненти середовища для вирощування каллусних і суспензійних культур можна розділити на шість груп, що зазвичай відображає порядок приготування концентрованих початкових розчинів:

- основні неорганічні живильні речовини (макроелементи);
- мікроелементи;
- джерела заліза;
- органічні добавки (вітаміни);
- джерела вуглецю;
- регулятори зростання рослин.

У реактор з мішалкою за допомогою вакууму вносять по черзі приготовані розчини, дотримуючи наступний порядок:

- розчин макросолей;
- агаризований розчин;
- розчин хелату заліза;
- розчин мікроелементів;
- розчин кальцію нітрату;
- розчин цукру.

Суміш ретельно перемішують протягом 15 хвилин, потім 1-2 хвилини ведуть вертикальне перемішування шляхом барботажа при включеній мішалці. Обов'язково відбирають контрольні проби для визначення рН середовища (рН повинне бути в межах 5,6-6,2, температура розчину $152 \pm 2,5$ °C).

Стерилізація живильних середовищ в промислових умовах здійснюється двома основними методами: періодичним і безперервним.

Періодичний метод стерилізації застосовують при використанні невеликих об'ємів середовища і здійснюють безпосередньо у ферментаторах або в спеціальних парових стерилізаторах; середовище витримується при температурі 120-125 °C протягом 30-60 хвилин (залежно від об'єму середовища або від його складу), після чого охолоджується до 27-30 °C.

Безперервний метод стерилізації застосовують при використанні великих об'ємів середовища і здійснюють в колоні стерилізації, через яку

пропускається гостра пара (тиск пари близько 0,5 МПа), при температурі близько 125 °С протягом 5-10 хвилин (див. розділ 1.2.3).

Підготовка посівного матеріалу – одна з відповідальних операцій в циклі біологічного методу отримання БАР з культури тканин.

Культуру тканини (колекцію культури) заводу отримують з академій і університетів. Кожна культура має паспорт з докладним описом морфології, фізіології, характеристики середовища для культивування і зберігання.

Для твердофазного методу культуру тканини вирощують на агаризованому стерильному живильному середовищі в колбах місткістю 0,25 л в термостатованому приміщенні або термостаті з температурою 27 ± 1 °С. На 38-46 добу зростання тканини материнської культури ріжуть так, щоб інокулом складався з вертикального стовпа (верхній шар, середній і частина нижнього шару без агаризованого середовища). Не можна допускати дії на культуру дезінфікуючих засобів, бактерцидних ламп, оскільки це приводить до інактивації зростання. З однієї материнської культури пересаджують 7-9 дочірніх культур і через 38-46 дів зростання в термостатуємому приміщенні відбирають колби з культурами тканин кращих ростових ознак. Для таких культур характерні швидке зростання, максимальне використання живильного середовища, колір тканини від ясно-жовтого до молочного, відсутність некротичних включень.

Для глибинного (суспензійного) методу культуру тканини заздалегідь вирощують на агаризованому стерильному середовищі в пробірці, потім з пробірок висівають в колби з рідким живильним середовищем і проводять дві генерації глибинного вирощування на гойдалках протягом 38-46 дів для кожної генерації. З другої генерації культури (у колбі) роблять посів в невеликій (10 л) інокулятор, а потім культуру, що добре розвивається, переносять в основний ферментатор. Для посіву в основному ферментаторі використовують від 5 до 10 об'ємних відсотків посівного матеріалу (інокуляту).

3.2.2 Біосинтез БАР (друга стадія)

Стадія біосинтезу – основна біологічна стадія процесу отримання БАР з культури тканин.

Завдання цієї стадії – забезпечення для продуцента БАР таких умов розвитку, які б сприяли максимальному рівню біосинтезу БАР. Ефективність стадії біосинтезу залежить від рівня утворення БАР з культури тканини і визначається генетичними особливостями організму, складом живильного середовища, режимом розвитку продуцента. Вона також залежить від часу максимального утворення БАР, вартості компонентів середовища, піногасників і енергетичних витрат, пов'язаних з процесом розвитку організму-продуцента БАР.

В даний час виробництво БАР з культури тканин здійснюють двома способами ферментації: культивування на поверхні твердого середовища (твердофазна ферментація) і занурене глибинне культивування (суспензійне).

Процес розвитку організму-продуцента БАР у ферментаторах проходить при строгому контролі всіх стадій, дуже точному виконанні розробленого регламенту умов накопичення БАР. Велика увага приділяється підтримці заданої температури культивування, активної кислотності середовища, рН, ступеню аерації і швидкості роботи мішалки. Враховуючи споживання організмом основних живильних компонентів субстрата (джерел вуглеводу, азоту, калію, магнію, фосфору, амінокислот, вітамінів), контролюється утворення БАР.

При продуванні повітря через організм-продуцент БАР часто відбувається рясне утворення піни, яка істотно порушує протікання всього процесу розвитку штаму-продуцента БАР у ферментаторі. Основна причина появи великої кількості піни – висока в'язкість живильного середовища, обумовлена рясним накопиченням біомаси.

Для боротьби з піною у ферментаторах при отриманні біомаси використовують різні поверхнево-активні речовини: рослинні масла (соєве, соняшникове), мінеральні масла (вазелинове, парафінове), спирти, жирні кислоти і деякі синтетичні піногасники (силікони і інші сполуки).

Вирощування тканини проводять протягом 70 діб. В період ростового циклу здійснюють мікробіологічний, біохімічний і візуальний контроль. Візуальний контроль проводять не рідше за раз на 10 днів – відбраковують інфіковані тканини.

3.2.3 Попередня обробка біомаси (третя стадія)

В процесі розвитку організму-продуцента БАР ці речовини майже повністю виділяються з клітин в навколишнє середовище. Проте в деяких випадках лише частина БАР виділяється в культуральне середовище, а інша частина зберігається усередині клітин. У ряду продуцентів БАР вони майже повністю містяться в клітках організму.

Залежно від того, де цільова речовина зосереджена, застосовують відповідні методи його виділення.

При твердофазному способі культивування з колби місткістю 0,25 л з культурою тканини, що добре виросла, спочатку проводять знімання сирій біомаси, потім проводять сушку біомаси на деках при температурі 58 ± 2 °С.

Суха маса повинна бути від жовтого до коричневого кольору, рихла, така, що легко розсипається при продавлюванні між пальцями. Залишкова вологість біомаси після сушки не більше 12 %. Потім суху біомасу подають на стадію виділення і очищення БАР з аналітичним паспортом на вміст БАР.

При глибинному культивуванні, якщо БАР знаходиться в культуральній рідині, його виділяють методами екстракції розчинниками, які

не змішуються з рідкою фазою, або осаджують у вигляді нерозчинного з'єднання, або сорбують іонообмінними смолами.

Виділення БАР з клітин організму-продуцента здійснюють за допомогою екстракції органічними розчинниками. Якщо БАР міститься в культуральній рідині і в клітках продуцента, спочатку його переводять у фазу, з якої найдоцільніше його ізолювати. Для цього БАР, що міститься в культуральній рідині і в клітинах продуцента, переводять в осад, а потім його екстрагують.

Виділення нативного розчину від біомаси і зважених часток проводять методами фільтрації або центрифугування.

Для процесу фільтрації застосовують різні фільтруючі апарати: фільтрпрес, нутч-, друк-фільтри, центрифуги, сепаратори.

Фільтр-преси застосовують для обробки великих об'ємів культуральної рідини. Процес фільтрації здійснюється під тиском.

Для фільтрації невеликих об'ємів культуральної рідини зазвичай використовують нутч-, друк-фільтри. Перший апарат працює під вакуумом, другий – в умовах підвищеного тиску над рідиною, що фільтрується.

Для отримання рідини, звільненої від зважених часток, широке розповсюдження знайшов метод центрифугування. Добрі результати досягаються при правильному виборі швидкості подачі рідини (кращий варіант – 250 c^{-1}). Виділення міцелію або інших зважених часток може також відбуватися в сепараторах. При швидкості обертання барабана, рівній 125 c^{-1} , завдяки відцентровій силі, тверді частки спрямовуються до стінок барабана, де і осідають, а відсепарована рідина прагне до центру барабана і піднімається в спеціальні камери.

3.2.4 Виділення й очищення БАР (четверта стадія)

У процесі утворення БАР у біомасі (твердофазний спосіб культивування) і в культуральній рідині (глибинний спосіб культивування) поряд із присутністю в них різних невикористаних компонентів середовища виділяються й різноманітні продукти обміну, продукти автолізу клітин. Видалення домішок – перша й досить важлива стадія хімічного очищення БАР.

Стадія виділення й хімічного очищення включає ряд процесів: від обробки нативного розчину до сушіння готового очищеного препарату. На цій стадії, залежно від властивостей БАР, його хімічної будови й місця основного нагромадження застосовують різні методи виділення й очищення. Як основні методи використовують екстракцію в системах рідина-рідина, екстракцію, осадження, сорбцію на різних матеріалах, мембранні методи очищення, кристалізацію, упарювання, сушіння.

Однією з особливостей стадії виділення й очищення є те, що при виділенні БАР доводиться працювати з досить невисокими концентраціями виділеної речовини (не перевищуючими 2 %). Наприкінці стадії очищення

вже мають справу з більш високими концентраціями БАР, що досягають 20-30 %.

Ціль очищення – витяг БАР з нативної рідини або із клітин продуцента, концентрація його й звільнення (властиво очищення) від супутніх домішок і в остаточному підсумку одержання високоочищеного препарату, придатного для відповідного застосування.

БАР рослинного походження під впливом несприятливих зовнішніх факторів (підвищена температура, висока кислотність або лужність та ін.) у ряді випадків втрачають свої властивості, інактивуються. Тому при їхньому виділенні й очищенні необхідний максимум обережності.

3.2.5 Одержання готової продукції (п'ята стадія)

Відомо, що до БАР біотехнологічного походження, використовуваним у медичній практиці, пред'являються дуже високі вимоги:

- високий ступінь очищення;
- фармакологічна активність;
- стерильність.

Тому на даній стадії роботи, а також при хімічному очищенні препарату необхідно дотримувати високого ступеня чистоти на всіх стадіях і операціях - підтримувати у винятковій чистоті не тільки використовуване устаткування, але й приміщення, де воно використовується.

Після виділення й хімічного очищення БАР його необхідно висушити - видалити із препарату вільну й зв'язану воду. Оскільки деякі БАР, отримані за цією технологією, у тім або іншому ступені термолабільні, для їхнього висушування необхідно застосовувати методи, що не приводять до втрати біологічної активності й не змінюють колір препарату.

На сучасному етапі одержання БАР використовують різні методи зневоднювання препарату. Крім звичайних методів сушіння, поширене ліофільне сушіння, що проводиться при порівняно низьких температурах (мінус 8, мінус 12 °С).

Прогресивним методом при роботі з великою кількістю розчину, що містить БАР, є висушування із застосуванням розпилювальних сушарок. Розчин БАР пневматично розпоршується до дрібних крапель у камері потоком нагрітого повітря. Процес висушування протікає протягом декількох секунд. При цьому навіть термолабільні речовини не міняють властивостей.

Порошки фасують в основному в ємності жовтогогарячого скла.

Готовий порошок піддається ретельному аналітичному, біологічному й фармакологічному контролю.

Контрольні запитання

1. Технологічні особливості культивування рослинних клітин.
2. Продукти вторинного метаболізму, що отримуються при культивуванні рослинних клітин та їх застосування.
3. Підготовка середовища для культивування продуцента і посівного матеріалу (перша стадія).
4. Біосинтез БАР (друга стадія).
5. Попередня обробка біомаси (третя стадія).
6. Виділення й очищення БАР (четверта стадія).
7. Одержання готової продукції (п'ята стадія).

ЛІТЕРАТУРА

1. Чуешов В.И. Промышленная биотехнология: Учеб. пособие для студентов вузов. – Х.: Изд-во НФАУ: Золотые страницы, 2004. – 112 с.
2. Чуешов В.И., и др. Промышленная биотехнология. Учебное пособие к лабораторным занятиям. – Х.: Изд-во НФАУ, 2001. – 93 с.
3. И.Л Дикий., И.Ю Холуняк., и т.д., Н.Е. Шевелева, М.Ю. Стегний. Микробиология: – Прапор Изд-во Укр. ФА, 1999. – 416 с.
4. Чуешов В.И. И др. Промышленная технология лекарств: Том 2 - Х.: Основа; Изд-во Укр. ФА, 1999. – 704 с.
5. Сергеев В.А., Собко Ю.А. Культуры клеток в ветеринарии и биотехнологии. – К.: Урожай, 1990. – 152 с.

Навчальне видання

КОНСПЕКТ ЛЕКЦІЙ
з дисципліни
«ПРОМИСЛОВА БІОТЕХНОЛОГІЯ»
(для здобувачів вищої освіти спеціальності 226
«Фармація, промислова фармація» освітнього ступеню бакалавр)
(Електронне видання)

Укладачі ШАПКІН Володимир Петрович
 ГОРБАС Лариса Федорівна
 ПОНОМАРЕНКО Надія Іванівна

Оригінал-макет В.П. Шапкін

Підписано до друку _____
Формат 60x84 1/8. Папір типограф. Гарнітура Times
Друк офсетний. Умов.друк.арк._____.Облік.видавн.арк._____
Тираж ___екз. Вид.№____Замовл.____Ціна договірна

Видавництво Східноукраїнського національного університету імені
Володимира Даля

Адреса видавництва: м. Київ, вул. Іоанна Павла II, 17.

Телефон: +38 (050) 218 04 78, факс (06452) 4-03-42