

Занятие семинарского типа № 3

ТЕМА ЗАНЯТИЯ: Регуляция биосинтеза биологически активных веществ в условиях биотехнологического производства

УЧЕБНЫЙ МАТЕРИАЛ

На протекание биосинтеза биологически активных веществ (БАВ) в условиях производства оказывает влияние ряд факторов, которые условно можно разделить на две группы: микробиологические и технологические. Для того, чтобы рассмотреть особенности регуляции процессов биосинтеза БАВ необходимо более подробно остановиться на изучении влияния вышеперечисленных факторов на данный процесс.

1. Микробиологические факторы

Основой современного биотехнологического производства является микробиологический синтез БАВ. Объекты растительного и животного происхождения (в сравнении с микроорганизмами) не нашли столь широкого практического применения вследствие их высокой требовательности к условиям культивирования, в значительной степени удорожающей биотехнологическое производство.

Независимо от природы биообъекта, начальным этапом исследований является получение чистых культур. Дальнейшие этапы манипуляции с этими культурами характеризуются многообразием подходов, основанных на классических методах микробиологии. В этом смысле культуры клеток и тканей растений и животных уподобляются культурам микроорганизмов. В этой связи, ключевой стадией биотехнологического процесса является правильный подбор штамма продуцента из широкого спектра биообъектов.

С целью решения этой задачи проводится выделение штамма продуцента БАВ. При этом отбирают пробы из мест, где обитание того или иного продуцента является наиболее вероятным. Образцы проб вносят в жидкие питательные среды специального состава (элективные среды), в которых за счет варьирования разных факторов создают избирательные условия для преимущественного развития нужного продуцента. К таким факторам относятся: источники энергии, углерода, азота, значение рН среды, температура, осмотическое давление и т.д. Так, для накопления продуцента холестериноксидазы используют среды с холестерином в качестве единственного источника углерода. Таким путем получают накопительные культуры микроорганизмов.

Следующим этапом является выделение чистых культур. С этой целью используют твердые питательные среды, на которые засевают образцы проб из накопительных культур. Отдельные клетки на твердых средах образуют изолированные колонии, при последующем пересеве которых получают чистые культуры продуцента, состоящие из популяций клеток одного вида.

Существует и другой путь получения необходимого штамма продуцента – из имеющихся коллекций штаммов микроорганизмов. При этом руководствуются опытом, накопленным в результате изучения физиологии и биохимии разных групп микроорганизмов. Так, продуценты антибиотиков чаще всего обнаруживают среди актиномицетов, гидролитических ферментов – среди грамположительных бактерий, а типичными продуцентами этанола являются дрожжи и т.д.

Главным критерием при отборе штаммов продуцентов является их способность синтезировать целевой продукт. Кроме того, биотехнологическое производство предъявляет к ним еще целый ряд требований, важных с точки зрения технологии производства. В частности, продуценты должны: обладать высокой скоростью роста, использовать для жизнедеятельности экономичные, доступные, как правило, непищевые субстраты и быть устой-

чивы к микробной контаминации. Выполнение данных требований позволяет значительно сократить затраты на биопроизводство целевого продукта.

Одноклеточные организмы, как правило, характеризуются более высокими скоростями биосинтеза, чем высшие формы живого. Так, корова массой 500 кг в течение суток синтезирует около 0,5 кг белка. Такое же количество белка за сутки можно получить с помощью 5 г дрожжей.

Такие высокие скорости роста характерны не для всех микроорганизмов. Существуют так называемые олиготрофные микроорганизмы, растущие очень медленно. Они мало изучены, но представляют большой интерес в качестве возможных продуцентов разных классов БАВ. В этой связи, исследование факторов, регулирующих рост культур, и оптимизация условий их выращивания имеют большое теоретическое и практическое значение в биотехнологии.

Особый интерес в качестве объектов биотехнологических разработок представляют фотосинтезирующие микроорганизмы, использующие для своей жизнедеятельности энергию света, синтезирующие разнообразные БАВ в результате восстановления углекислоты, сопряженного с окислением воды (цианобактерии, эукариоты), способные к усвоению атмосферного азота (прокариоты), т.е. обходящиеся самыми экономичными источниками энергии, углерода и азота. Преимущества таких бактерий в сравнении с традиционными биообъектами (микроорганизмами, энергетические и конструктивные потребности которых обеспечиваются органическими соединениями) очевидны. Фототрофные микроорганизмы перспективны в качестве продуцентов аммиака, водорода, белка и разных биопрепаратов. Большое будущее ожидает фотосинтезирующие бактерии как объекты биотехнологии на пути генетической инженерии в связи с созданием новых технологий микробиологического производства на основе биоконверсии солнечной энергии.

Выгодным объектом биотехнологии являются термофильные организмы, развивающиеся в условиях высоких температурах (60–80 °С, а отдельные представители при 110–115 °С и выше), что затрудняет развитие посторонней микрофлоры. Среди термофильных организмов обнаружены ценные продуценты спиртов, аминокислот, ферментов и молекулярного водорода. Применение термофилов позволяет снизить затраты на стерилизацию производственного оборудования. Кроме того, скорость роста и метаболическая активность у таких организмов в 1,5–2 раза выше, чем у мезофилов, температурный оптимум развития которых составляет 25–40 °С. Ферменты (протеазы) термофилов отличаются высокой устойчивостью к нагреванию, воздействию окислителей, детергентов, органических растворителей и другим неблагоприятным условиям. В то же время, они малоактивны при нормальных температурах. Так, активность протеазы при температуре 20 °С почти в 100 раз ниже, чем при 75 °С. Это свойство практически значимо, прежде всего, для пищевого производства. Еще одно преимущество термофильных организмов связано с отсутствием затрат на охлаждение биореакторов. Поскольку биореактор для культивирования термофилов функционирует при температуре, во много раз превышающей температуру окружающей среды, то значительный перепад температур способствует быстрой теплоотдаче. Это позволяет применять биореакторы без громоздких теплообменных устройств и, тем самым, упростить их конструкцию, облегчая аэрацию, перемешивание и пеногашение.

Таким образом, в любом биотехнологическом процессе ключевую роль играет культура микроорганизмов. Так, в биотехнологическом производстве широко используются плесневые грибы, дрожжи, актиномицеты, бактерии и водоросли в виде чистых или смешанных культур. В традиционных процессах ферментации предпочтение отдается смешанным культурам, а в большинстве современных ферментационных процессов – монокультурам. Большинство культур продуцентов БАВ выделено из природных источников, позже они были улучшены путем выращивания в условиях, характерных для данного процесса (для повышения выхода биомассы и первичных метаболитов) или с помощью мутагенеза с последующим отбором наиболее высокопродуктивных форм (при производстве вторичных метаболитов).

Для выращивания любой культуры продуцента БАВ необходимы: жизнеспособный посевной материал, источники углерода и энергии, содержание в среде компонентов, необходимых для накопления биомассы, отсутствие в ней ингибиторов роста, поддержание в культуральной жидкости необходимых физико-химических условий жизнедеятельности культуры.

Параметры роста. Основные факторы, влияющие на рост и развитие микроорганизмов, можно разделить на две группы: внутриклеточные, обусловленные структурой и специфическими особенностями организма, и внеклеточные, т.е. условия внешней среды клетки. К внутриклеточным факторам относятся: структура клетки, механизмы метаболизма и генетические характеристики, являющиеся прерогативой цитологических, биологических и генетических исследований. Основной целью исследований в биотехнологии являются внеклеточные (внешние) факторы.

Для количественной характеристики роста микроорганизмов оценивают основные параметры роста.

Удельная скорость роста. Увеличение концентрации биомассы X за промежуток времени dt , равное dX , пропорционально количеству биомассы и интервалу времени (1):

$$dX/dt = \mu X \quad (1),$$

где dX/dt – скорость роста;

μ – коэффициент пропорциональности (удельная скорость роста), $ч^{-1}$;

X – концентрация биомассы.

Если величина $\mu = \text{const}$, то интегрирование уравнения (1) позволяет:

$$\ln X = \ln X_0 + \mu \times t \quad (2),$$

где X_0 – концентрация биомассы при $t=0$.

Из уравнения (2) следует, что:

$$\ln (X/X_0) = \mu \times t \rightarrow X = X_0 \times e^{\mu \times t} \quad (3).$$

Рост, подчиняющийся уравнению (3), называется экспоненциальным.

Время удвоения биомассы. Зависимость между удельной скоростью роста и временем удвоения (t_d) можно получить, подставив в уравнение (3) значения:

$$X = 2 \times X, t = t_d \rightarrow t_d = \ln 2 / \mu = 0,693 / \mu \quad (4).$$

Степень размножения. Если биомасса претерпевает n удвоений (генераций), тогда:

$$X/X_0 = 2^n \rightarrow n = 3,32 \log(X/X_0) \quad (5).$$

Закон экспоненциального роста универсален для прокариот и эукариот в случае, если указанные выше условия выполняются.

Экономический коэффициент (выход биомассы) Y выражает количественные потребности организма в питательных веществах. Его определяют согласно уравнению (6):

$$Y_{x/s} = -dX/dS \quad (6),$$

где dX – прирост биомассы, соответствующий потреблению (уменьшению в среде) субстрата dS .

Знак «-» в формуле (6) означает, что рост X возможен только при уменьшении S .

Если X_0 и S_0 – начальные концентрации биомассы и субстрата, а X и S – текущие концентрации при росте X , то:

$$(X - X_0) = Y_{X/S} (S_0 - S) \quad (7).$$

Когда биомасса достигает максимума X_m , а концентрация лимитирующего субстрата $S \approx 0$:

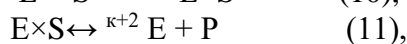
$$X_m - X_0 = Y \times S_0 \quad (8).$$

Метаболический коэффициент аналогичен ферментной активности и равен:

$$q = \mu/Y \quad (9).$$

Уравнение (9) используется для определения потребностей в субстрате, в том числе в кислороде, глюкозе, углероде и т.п.

Уравнение Михаэлиса-Ментен. Одной из наиболее распространенных моделей описания кинетики ферментативных реакций является модель Михаэлиса-Ментен. Реакция фермента с субстратом в этой модели описывается следующим образом:



где E – фермент;
 S – субстрат;
 $E \times S$ – фермент-субстратный комплекс;
 P – продукт;
 K_i – константа скоростей реакций.

Скорость образования продукта V в ферментативных реакциях (10, 11) может быть описана соотношением (12):

$$V = K_{+2} \times C = K_{+2} \times e \times S / [K_{+1} + K_{+2}/K_{+1}] + S = V \times S / [K_s + K_{+2}/K_{+1} + S] = V \times S / K_m + S \quad (12),$$

где e , S и C – общая концентрация фермента, субстрата и фермент-субстратного комплекса.

Уравнение (12) является уравнением Михаэлиса-Ментен, а K_m называется константой Михаэлиса-Ментен.

Влияние концентрации субстрата на скорость роста. Если кинетика потребления субстрата соответствует кинетике ферментативной реакции, тогда:

$$q = q_m \times S / (S + K_s) \quad (13),$$

где K_s – константа насыщения, эквивалентная константе Михаэлиса-Ментена.

Подставив в уравнение (13) значения $q = \mu/Y$ и $q_m = \mu_m/Y$, получим (14):

$$\mu = \mu_m \times S / (S + K_s) \quad (14).$$

Уравнение (14) называют соотношением Моно, которое описывает зависимость скорости роста микроорганизмов от концентрации субстрата. Следует отметить, что уравнение Моно аналогично уравнению Михаэлиса-Ментен.

Значение K_s обратно пропорционально степени родства микроорганизма субстрату. В этом случае:

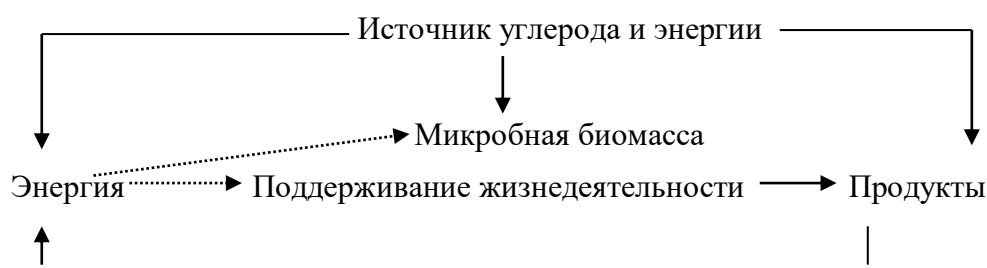
$$1/\mu = K_s/S \times \mu + 1/\mu_m \quad (15).$$

Продолжительность лаг-фазы (L) роста микроорганизмов определяется графическим построением зависимости концентрации микроорганизмов от времени. Уравнение для роста культуры имеет вид (16):

$$\ln x = \mu \times (t - L) + \ln x_0 \quad (16).$$

Контроль роста. Под термином «биомасса» подразумевается общая концентрация микроорганизмов на твердой или жидкой питательной среде при культивировании. Выбор метода ее измерения зависит от задач исследований в области культивирования, биохимической характеристики культуры, питательной среды и требуемой точности измерений. Наименее чувствительным является метод определения веса сухой биомассы, а наиболее чувствительным – метод подсчета клеток.

Потоки углерода и энергии при гетеротрофном росте микроорганизмов и образовании продукта



Условные обозначения:

—→ Поток углерода

.....→ Поток энергии

Для роста и развития любого микроорганизма необходимы источники углерода и энергии.

В случае гетеротрофных микроорганизмов (организмы, использующие в качестве источника углерода экзогенные органические вещества, которые одновременно служат для них и источниками энергии) – это одно или смесь углеродсодержащих соединений, удовлетворяющих обе эти потребности.

У автотрофных микроорганизмов (организмы, использующие для построения своего тела углекислый газ в качестве единственного источника углерода, обладающие системой ферментов для ассимиляции углекислого газа, и способные синтезировать все компоненты клетки) – углеродные и энергетические субстраты отличаются.

Для гетеротрофных микроорганизмов коэффициент выхода продукта зависит от распределения энергии и углерода между процессами анаболизма и катаболизма, природы и концентрации источников углерода и энергии и биохимических особенностей.

Скорость потребления определенного субстрата растущими культурами часто описывается уравнением (17):

$$-dS/dt = qX \quad (17),$$

где q – метаболический коэффициент.

$$dX/dS = \frac{\mu}{q} \Rightarrow q = \frac{\mu}{y_{x/s}} \quad (18).$$

Сродство к субстрату и рост микроорганизмов. Одним из важных микробиологических факторов, влияющих на биосинтез БАВ, является сродство к субстрату.

При анализе роста культур в биотехнологических процессах необходимо учитывать:

- ✓ остаточную концентрацию питательных веществ (субстратов);
- ✓ конкурентоспособность микроорганизмов;
- ✓ особенности их роста на сжиженных углеродных энергетических субстратах.

Первый из этих факторов имеет два важных аспекта. Один из них экономический, – связан с полнотой использования субстрата, второй – с качеством продукта, его чистотой и нетоксичностью, поскольку остатки субстрата попадают в конечный продукт. Полнота использования субстрата, который является лимитирующим в периодической или непрерывной культуре, определяется сродством к нему данных микроорганизмов.

Стабильность культуры. Еще одним важным фактором, влияющим на эффективность биосинтеза БАВ, является стабильность культуры продуцента.

Пригодность выбранной культуры для ее использования в биотехнологическом производстве часто не оценивается, и подчас становится критическим параметром, когда дело доходит до ее практического применения. Одним из главных критериев является генетическая стабильность культуры продуцента.

Теплопередача и перенос веществ в биореакторе увеличиваются за счет диссипации (рассеивания) энергии в системе, как правило, в результате интенсивного механического перемешивания содержимого биореактора с помощью мешалок. Такие мешалки оказывают двоякое действие: с одной стороны они способствуют диспергированию мелких пузырьков воздуха в толще культуральной среды и обеспечивают перемешивание, необходимое для минимизации концентрационных градиентов, эффективного охлаждения и уменьшения выделения пузырьков воздуха, а с другой стороны, возникающие при этом гидродинамические силы, могут повреждать клетки.

Кроме того, биосинтез специфического продукта зависит и от морфологии культуры продуцента. Так, совершенно непригодны для использования в биопроизводстве штаммы, морфология которых значительно изменяется при изменении условий культивирования.

Ранее считалось, что вероятность повреждений бактериальных клеток определяется скоростью вращения лопастей мешалки. Однако, согласно современной гипотезе о механизме повреждения бактерий, они обусловлены кавитационными явлениями в вихревых потоках, возникающих сразу за лопастями мешалок. Хотя, окончательно вопрос о повреждении бактериальных клеток в интенсивно перемешиваемой культуре пока не решен.

Среди биообъектов можно отобрать наиболее выносливые культуры, пригодные для их использования в условиях интенсивных процессов. Так, культуры тканей, в частности культуры клеток млекопитающих, нуждаются в особых биореакторах, конструкция которых учитывает присущую им хрупкость. Наиболее пригодны для использования в производстве штаммы продуцентов с широкими диапазонами оптимумов рН, концентрации растворенного кислорода и температуры. Частично эти проблемы позволяют решить техническое усовершенствование установок и улучшение контроля за условиями в них.

2. Технологические факторы

В связи с тем, что на эффективность ферментации оказывает влияние ряд факторов, возникает проблема определения их оптимальных значений и управления ими. К таким факторам относятся: температура, значение рН ферментационной среды, давление, уровни культуральной жидкости и пены в ферментере. Температуру обычно регулируют путем изменения подачи охлаждающей воды в змеевик или рубашку ферментера, величину рН – подачей щелочи, аммиачной воды или кислоты. Давление поддерживают на определенном уровне при помощи клапана, установленного на линии выхода воздуха из ферментера.

Важной характеристикой является обеспеченность культуры растворенным кислородом. Этот параметр измеряют с помощью специального датчика. Воздействовать на не-

го можно тремя путями: изменяя скорость подачи воздуха в ферментер, частоту вращения мешалки или давление в ферментере. Для некоторых процессов важна концентрация растворенного углекислого газа в ферментере, которая управляется теми же воздействиями, что и концентрация растворенного кислорода.

Важную роль при ферментации играют текущие концентрации питательных веществ (углеводов, азота, фосфора и др.), изменяющиеся в ходе процесса. Их концентрацию можно поддерживать путем подачи в ферментер растворов, содержащих питательные вещества, или при необходимости уменьшения концентрации – добавлением стерильной воды.

Следует отметить, что незначительную роль в управлении процессом играет концентрация биомассы. Этот параметр характеризует результат процесса, а не условия его проведения. Учитывая, что изменяется он медленно, непосредственное его использование в контуре управления затруднительно. То же можно отметить и в отношении концентраций целевых продуктов метаболизма. Их целесообразно контролировать, учитывать, но не поддерживать на определенном уровне.

Если значения концентрации кислорода или углекислого газа в выходящем воздухе умножить на значение расхода воздуха через ферментер, то можно оценить интенсивность дыхания (выделения CO_2) и скорость потребления кислорода культурой микроорганизмов. Данные параметры быстро реагируют на многие управляющие воздействия, поэтому они могут быть использованы в качестве косвенных параметров управления процессом.

Простейшие схемы управления биотехнологическими процессами построены как совокупность контуров регулирования температуры, давления, расхода воздуха, значения рН, уровня жидкости и пены в ферментере и реже – концентраций растворенного кислорода и различных субстратов в среде.

Ключевыми факторами, влияющими на экономичность биотехнологического процесса, являются производительность и степень превращения, определяющиеся физическими параметрами, от которых зависит теплопередача и массоперенос. К ним относятся: гидродинамические свойства суспендированных микроорганизмов, реологические (деформационные) свойства культуральных сред, электрокинетические свойства микроорганизмов, давление, поверхностные и пристеночные эффекты, эффекты, возникающие на границе раздела фаз, эффекты, связанные с наличием нескольких фаз в потоке, флотационные, седиментационные и сегрегационные эффекты.

2.1. Классификация биореакторов и расчет их производительности

Биореактор (ферментер) – устройство (аппарат), предназначенное для промышленного культивирования биообъектов, в котором протекают биохимические реакции при участии живых микроорганизмов, клеточных экстрактов или ферментов.

Промышленные биореакторы могут работать в периодическом, периодическом режиме с доливом субстрата, полунепрерывном (полупериодическом) и непрерывном (проточном) режимах.

Исторически в промышленности утвердился периодический способ при осуществлении химических превращений, а полунепрерывный способ – при получении биомассы. Традиционно биореакторы, работающие в непрерывном режиме, использовались в промышленном масштабе только для аэробной переработки сточных вод и отходов.

Детальный анализ некоторых потенциальных режимов работы ферментеров указывает на превосходство проточного непрерывного режима в сравнении с периодическими режимами.

При работе биореактора в периодическом режиме в него загружают все необходимые компоненты, ведут процесс до конца и после собирают конечный (целевой) продукт.

Периодический режим с добавлением субстрата предусматривает периодическое или непрерывное введение субстрата без удаления конечного продукта, который собирают только после завершения процесса.

При полунепрерывном (полупериодическом) процессе после завершения начальной стадии, реализуемой в периодическом режиме, ферментер наполовину опорожняют, чтобы частично собрать продукт, а затем снова заполняют таким же объемом свежей среды, и доводят процесс до конца. Потом снова повторяют ту же последовательность операций. Подобный подход направлен на лучшее использование производственной установки.

Периодическое глубинное культивирование реализуется в закрытой системе, в которой скорость роста биомассы стремится к нулю вследствие истощения субстрата и накопления ингибиторов. Такие системы, как правило, находятся в неустойчивом состоянии.

Фазы роста. Кривая развития культуры продуцента при периодическом способе культивирования включает следующие фазы:

1. Лаг фаза (индукционный период) начинается после посева (инокуляции) микроорганизмов в питательную среду и является периодом их адаптации. Во время этой фазы происходит реорганизация микро- и макромолекулярных составных частей микробной культуры, синтез или подавление ферментов, или структурных компонентов клетки. Данная фаза в зависимости от внешних условий может быть короткой или продолжительной. В этот период клеточная масса может изменяться без изменения числа клеток.

2. Фаза экспоненциального роста – период быстрого накопления биомассы и продуктов реакции. Она описывается экспоненциальной кривой.

3. Фаза линейного роста характеризуется сбалансированным ростом в установившемся состоянии, т.е. скорость роста остается постоянной на протяжении всего процесса культивирования, а химический состав культуральной жидкости изменяется, поскольку потребляются питательные вещества и вырабатываются продукты метаболизма. В результате среда, окружающая микроорганизмы, непрерывно изменяется, но скорость роста в широком диапазоне концентраций питательных веществ от них не зависит.

4. Фаза линейного роста сменяется периодом, в течение которого скорость роста культуры снижается до нуля – это фаза замедления роста.

5. Затем рост культуры переходит в устойчивую стационарную фазу. При этом скорость гибели микроорганизмов компенсируется скоростью прироста биомассы.

6. При полном истощении питательной среды и значительном накоплении продуктов, ингибирующих рост, происходят существенные физиологические изменения культуры (лизис) и наступает фаза отмирания культуры.

С точки зрения производительности биореактора, работающего в периодическом режиме, важен только период экспоненциального роста. Время, необходимое для завершения цикла t_γ можно представить как сумму продуктивного времени t и общего непродуктивного времени t_n :

$$t_\gamma = t + t_n \quad (19).$$

Учитывая, что для экспоненциального роста $\mu = \mu_m$, получаем (20):

$$T = \frac{1}{\mu_m} \ln \left(\frac{x}{x_o} \right) \quad (20).$$

Подставив выражение (20) в уравнение (19), получим:

$$t_\gamma = \frac{1}{\mu_m} \ln \left(\frac{x}{x_o} \right) + t_n \quad (21).$$

Для периодического процесса общая продуктивность равна суммарной продукции, деленной на полное время цикла:

$$(x - x_0) = Yx/s/s_0 \quad (22).$$

В этой связи, производительность периодического процесса, определяется из уравнения (23):

$$P_n = \frac{Yx/s \times S_0 \times \mu_m}{\ln\left(\frac{x}{x_0}\right) + t_n \mu_m} \quad (23).$$

К преимуществам периодической и полупериодической ферментации относятся:

- ✓ экономичность ферментера и системы управления;
- ✓ гибкость (возможность наработки в одном ферментере разных продуктов);
- ✓ возможность произвольного изменения времени ферментации;
- ✓ меньшая подверженность инфицированию и мутациям клеток вследствие отсутствия протока и притока, а также непродолжительности ферментации;
- ✓ удобство для получения небольших количеств продукта;
- ✓ возможность поддержания условий культивирования в оптимуме, как в фазе роста биомассы, так и в фазе биосинтеза продукта, причем оптимальные условия для биомассы и конечного продукта могут быть различны;
- ✓ удобство для реализации биосинтеза вторичных метаболитов.

К недостаткам периодической и полупериодической ферментации относятся:

- ✓ необходимость приготовления посевного материала;
- ✓ значительное непродуктивное время ферментации;
- ✓ в связи с необходимостью частой стерилизации, быстрее изнашиваются измерительные приборы, особенно датчики значения pH;
- ✓ производительность по биомассе и целевому продукту часто ниже, чем в непрерывном процессе;
- ✓ труднее поддерживать необходимые параметры из-за нестационарности периодического процесса;
- ✓ процесс более опасен для человека (аппарат чаще открывают, моют, что сопряжено с контактом человека с микроорганизмами и продуктами их жизнедеятельности).

Производительность реактора, работающего в непрерывном проточном режиме (24):

$$P_n = \Delta Y_{x/s} (s_0 - \hat{s}) \quad (24),$$

где $\Delta Y_{x/s}$ – коэффициент выхода биомассы;

s_0 – концентрация субстрата в свежей среде;

\hat{s} – остаточная концентрация лимитирующего субстрата.

В случае, если $\hat{s} \ll s_0$, следовательно, $P_n = D \times Y_{x/s} \times s_0$ (25).

В этой связи, эффективность непрерывного процесса, в сравнении с периодическим, оценивается исходя из уравнения (26):

$$\frac{P_n}{P_n} = \frac{D}{\mu_m} \left[\ln\left(\frac{x}{x_0}\right) + t_n \times \mu_m \right]. \quad (26)$$

В биореакторе, работающем в проточном непрерывном режиме с полным перемешиванием, максимальная скорость разбавления равна $D = \mu_m$, но для избежания неста-

бильности скорость разбавления поддерживают на уровне $0,8 \times \mu_m$, следовательно, выражение (26) видоизменится:

$$\frac{P_n}{P_n} = 0,8 \left[\ln \left(\frac{x}{x_o} \right) + t_n \times \mu_m \right] \quad (27).$$

Выделяют два типа аппаратов непрерывного проточного действия: биореакторы с идеальным перемешиванием и проточные биореакторы полного вытеснения (биореакторы поршневого типа). При этом биореакторы с идеальным перемешиванием могут работать в хемостатном или турбидостатном режимах.

2.2. Хемостатный и турбидостатный режимы культивирования

Хемостатное культивирование представляет собой процесс, при котором в культуру с постоянной скоростью непрерывно подается свежая питательная среда, а при этом объем культуры поддерживается на постоянном уровне путем непрерывного отлива части культуральной жидкости.

При хемостатном режиме культивирования в биореактор с постоянной контролируемой скоростью подают питательную среду, один из компонентов которой, чаще всего кислород, поступает в количестве, не достаточном для обеспечения максимальной скорости роста культуры. В этом случае реактор с биообъектом приобретает свойства саморегулирующейся системы, автоматически удовлетворяющей равенству (28):

$$\mu = D \quad (28),$$

где μ – удельная скорость роста клеток;

D – коэффициент разбавления (скорость уменьшения концентрации клеток).

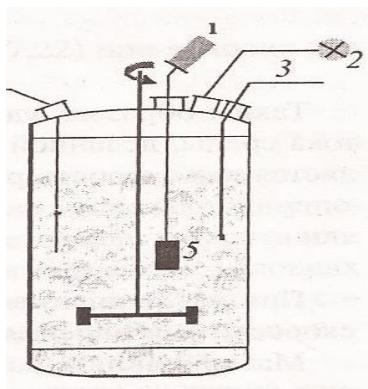


Рис. 1. Схема устройства хемостата

1 – регулятор подачи; 2 – лимитирующий компонент; 3 – питательная среда; 4 – культуральная жидкость; 5 – датчик концентрации

Если первоначально скорость разбавления и вымывания биомассы превышает скорость роста клеток, то происходит разбавление культуры свежей средой, что ведет к повышению концентрации компонента, ограничивающего рост клеток, вследствие этого скорость роста культуры увеличивается.

Как только $\mu > D$, в биореакторе начинает концентрироваться биомасса. При этом увеличивающаяся популяция клеток все активнее «выедает» субстрат, следовательно, его концентрация уменьшается, что ведет к торможению роста культуры.

В конечном итоге, после серии затухающих колебаний скорость роста культуры становится равной скорости разбавления (28).

Биореактор, работающий в хемостатном режиме, называют хемостатом (рис. 1). В его структуру входят: устройство для подачи среды, выпускное приспособление для оттока культуральной жидкости с биомассой и система контроля скорости потока.

Один из простейших вариантов хемостата включает насос, постоянно нагнетающий среду в биореактор, и выпускную трубу, по которой жидкость из него вытекает, как только ее уровень поднимается выше горловины.

Альтернативным вариантом является выпускная труба, которая входит в полость биореактора сверху, и нижний обрез ее горловины соответствует уровню, выше которого жидкость не должна подниматься. В случае, если этот уровень превышен, избыток культуральной среды с клетками отсасывается насосом, подсоединенным к выпускной трубе.

Более точный, но, в то же время, и более дорогостоящий метод контроля за уровнем жидкости в хемостате основан на его взвешивании с помощью специальной платформы. При этом превышение допустимой массы свидетельствует о подъеме жидкости выше разрешенного уровня, что приводит к автоматическому включению системы откачивания избыточной жидкости.

Кроме того, используют и радиоактивный контроль за уровнем жидкости в хемостате. С этой целью изотоп, помещенный на определенной высоте над дном аппарата, испускает радиоактивное излучение, которое в разной степени поглощается водной и воздушной средами. По интенсивности излучения, регистрируемого с помощью датчика, судят о высоте подъема жидкости.

В последнее время все большее применение находят фотоэлектронные устройства для контроля за уровнем жидкости в хемостате.

При культивировании микроорганизмов в турбидостатном режиме (рис. 2) концентрация биомассы поддерживается постоянной посредством регулирования оптической плотности культуры. При превышении установленной значения включается насос, подающий свежую среду.

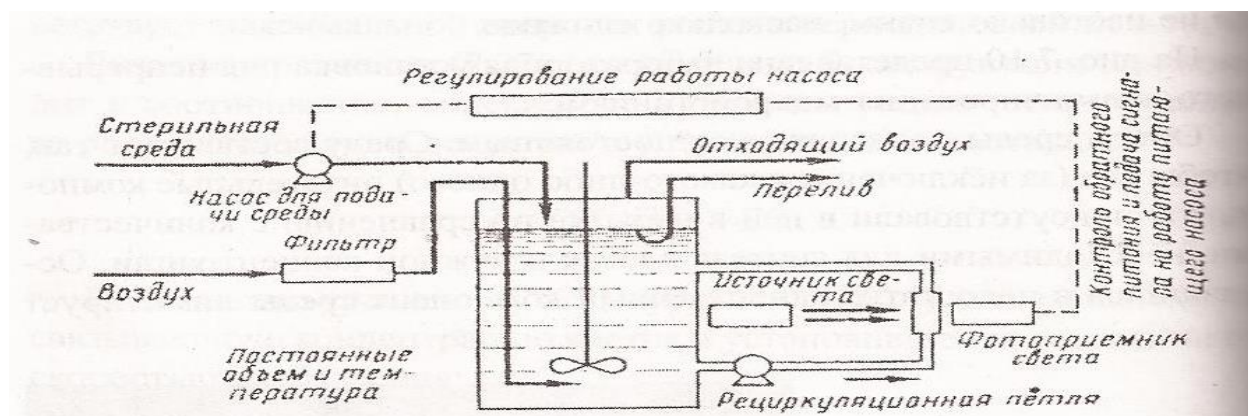


Рис. 2. Схема турбидостата

Поскольку объем культуральной жидкости поддерживается постоянным (с помощью устройства для контроля верхнего уровня) и производится тщательное перемешивание содержимого турбидостата, культура разбавляется, и некоторая ее часть удаляется из аппарата. Несмотря на кажущуюся простоту этой схемы, ее использование при исследованиях ограничивается трудностями адекватного регулирования концентрации клеток внутри емкости для культивирования.

Как турбидостат, так и хемостат, предполагают применение биореакторов, снабженных мешалками для постоянного и полного перемешивания всех элементов жидкости.

Установившегося состояния микробного роста также можно достичь в биореакторе идеального вытеснения. В данном случае, в отличие от биореактора смешения, концентрация клеток и питательных веществ изменяется в зависимости от местоположения каждой рассматриваемой точки. В биореакторе вытеснительного типа представляется возможность имитировать рост микроорганизмов при периодическом культивировании при

условии, что прохождение жидкостью определенного расстояния в этом аппарате позволит компенсировать цикл инкубации.

Теоретически биореактор поршневого типа непрерывного действия служит прекрасным средством для изучения явлений, происходящих при периодическом культивировании. Однако, трудности конструктивного оформления, связанные с необходимостью поддержания оптимального уровня аэрации, иногда ограничивают применение таких биореакторов в лабораториях.

Схема установки с использованием принципа идеального вытеснения приведена на рис. 3.

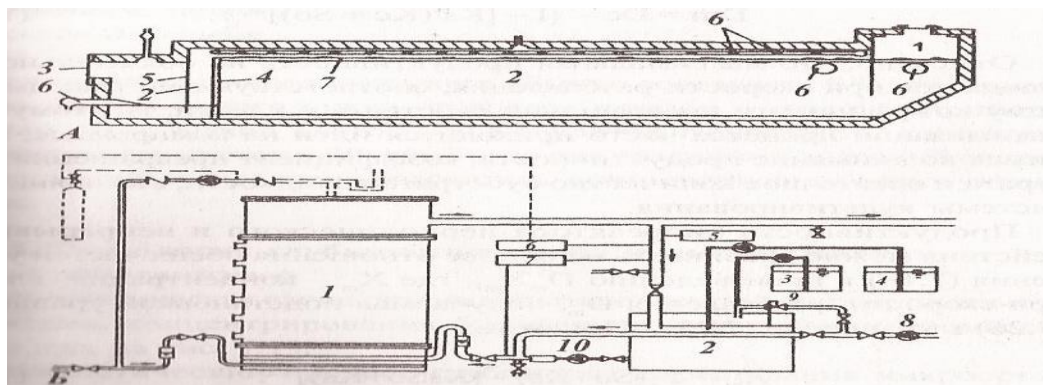


Рис. 3. Биореактор идеального вытеснения

А – анаэробный биореактор вытеснительного типа для обработки сточных вод и осадков:

1 – приемная камера; 2 – реакционные камеры; 3, 4 – перегородки; 5 – водный затвор; 6 – трубы.

Б – биореактор с твердым слоем для нитрофикации воды в полувзаводских условиях: 1 – реактор;

2 – контейнер; 3, 4 – щелочно-кислотные дозаторы; 5, 6, 7, 8 – контрольно-измерительная аппаратура;

9 – клапана; 10 – насос

По своей конструкции турбидостат отличается от хемостата системой контроля скорости потока.

Хемостаты и турбидостаты эффективно действуют при разных скоростях разбавления культуры. Хемостатный режим успешно применяется при малой скорости потока, когда концентрация клеток изменяется незначительно с изменением его скорости, что облегчает саморегулирование системы. Область функционирования турбидостата – высокие скорости разбавления, когда происходит быстрое и резкое изменение концентрации биомассы в ответ на изменение скорости протока, что обеспечивает своевременное срабатывание фотоэлемента или другого датчика, управляющего скоростью протока жидкости.

С технической точки зрения турбидостат, как правило, применяют в случае одноклеточных организмов. При длительном культивировании биообъекта в турбидостате возникает серьезная проблема, связанная с прилипанием клеток к фотоэлементу. При засеве смешанной культуры, в турбидостате автоматически отбирается наиболее быстрорастущий вид, что является преимуществом данного метода, в определенной степени предохраняющим культуру микроорганизма от заражения посторонней микрофлорой. Данный принцип использован для селекции антибиотикорезистентных организмов. В производстве, как правило, применяют биореакторы, работающие в режиме хемостата.

Для описания поведения потока в проточном биореакторе непрерывного действия удобнее всего использовать распределение частиц, проходящих через биореактор, во времени их пребывания в нем. В этом случае все элементы жидкости проходят через него строго упорядоченно: любой данный элемент ни как не перемешивается с элементами, поступающими в биореактор до или после него (отсутствует осевое перемешивание), следовательно, для стационарного состояния проточного биореактора с полным вытеснением все поступающие порции жидкости находятся в нем одинаковое время.

Среднее время пребывания:

$$T = \frac{V}{F} = \frac{1}{D} \quad (29),$$

где V – объем биореактора;

F – объемный поток жидкости, поступающий в реактор и вытекающий из него.

Содержимое проточного биореактора непрерывного действия с идеальным перемешиванием является полностью однородным, потому его состав идентичен составу, вытекающему из аппарата. Питательные вещества, поступающие в биореактор, немедленно перемешиваются с его содержимым и находятся в реакторе разное время, но среднее время пребывания определяется соотношением (29).

Если биореактор работает в стационарном режиме, то его производительность по биомассе определяется по формуле (30):

$$P_n = D \times (1 - \alpha \times g) / (1 - \alpha) \quad (30),$$

где α – доля содержимого, вытекающего из биореактора, использующаяся повторно;

g – увеличение концентрации биомассы;

D – скорость разбавления.

В случае проточного биореактора, работающего в режиме полного вытеснения, в каждом малом элементе жидкости dV , проходящем через него, преобладает в основном экспоненциальный рост ($\mu = \mu_m$). Рост биомассы в таком биореакторе без рецикла описывается уравнением (31):

$$\ln x = \ln x_0 + \mu_m \times t \quad (31),$$

где x_0 – концентрация биомассы в среде, поступающей в биореактор;

x – концентрация в момент времени t ;

g – увеличение концентрации биомассы.

Самым лучшим приближением к биореактору с полным вытеснением является каскад последовательно расположенных реакторов с идеальным перемешиванием без дополнительных поступлений питательных веществ. Однако, при этом число биореакторов, составляющих данный каскад, должно быть бесконечным. Неидеальный поток с полным вытеснением можно получить лишь тогда, когда работает более 6 последовательно расположенных биореакторов.

2.3. Системы биореактора

Биотехнологические процессы принципиально не отличаются от процессов химического синтеза. Для них характерны такие этапы, как загрузка субстратов, превращения субстратов, выделение и очистка целевого продукта. Эти процессы могут быть реализованы по периодической или непрерывной схеме.

Система перемешивания. В биотехнологических процессах нередко используют реакторы для химического синтеза, что, однако, порождает серьезные проблемы. Нередко терпят неудачу попытки применить в области биотехнологии уравнения для расчета параметров процесса, разработанные для химической технологии. Специфика биотехнологических процессов состоит в том, что в них принимают участие живые клетки, субклеточные структуры, ферменты, выделенные из клеток, или их комплексы, оказывающие значительное влияние на процессы массопередачи и теплообмена. В этой связи, важной составной частью биореактора является система перемешивания, необходимая для обеспечения однородности условий в аппарате, эффективной массопередачи между водной фазой и пузырьками газа или частицами твердого субстрата, между культуральной жидко-

стью и культивируемыми клетками, а также в пределах жидкости между разными ее слоями.

Расчет системы перемешивания требует ясного понимания особых свойств культуральной среды в биореакторе. Клетки, часто соединенные в длинные цепочки, особенно гифы грибов или актиномицетов, значительно увеличивают вязкость среды. Кроме того, жидкость, содержащая нитевидные образования, как бы приобретает «жесткую арматуру». Усилия ниже пороговой величины, приложенные в такой жидкости не вызывают ее перемешивания. Подобные свойства не характерны для жидких сред, не содержащих биообъект, поэтому в биотехнологии предъявляются особые требования к системе перемешивания, в частности, приходится резко повышать мощность мешалки. Повышение мощности и, соответственно, ускорение вращения мешалки создают другую проблему. Приложение значительных усилий к жидкости может повлечь за собой угнетение роста биообъекта, снижение эффективности синтеза целевого продукта, повреждение и гибель клеток.

Существенные различия между биотехнологическими и химико-технологическими процессами касаются массопередачи между газовой и жидкой фазами в биореакторе. Многие биотехнологические процессы относятся к числу аэробных, следовательно, требуют для своей реализации аэрации. Для аэрации культуральной среды используют воздух или воздух, обогащенный кислородом, реже чистый кислород. Процессы, протекающие без доступа кислорода (анаэробные), нередко зависят от газообразных субстратов или требуют отвода газообразных продуктов жизнедеятельности биообъектов. Системы газоснабжения и газоотведения должны функционировать эффективно, надежно и, в то же время, экономично. Биотехнологу приходится балансировать между угрозой перерасхода кислорода, без необходимости пропускаемого через жидкость, уже насыщенную этим газом, и риском исчерпания кислорода в культуральной среде, особенно если клетки активно потребляют кислород для дыхания. Кислород плохо растворим в воде, в то же время, он относится к числу быстро расходуемых газов, поэтому его запас в жидкости без подпитки исчерпывается за несколько секунд. Все это обуславливает необходимость слаженной работы систем аэрации и перемешивания и постоянного контроля за ними. Во многих случаях потребность в кислороде изменяется по мере развития культуры. Аэратор должен все время реагировать на эти изменения, увеличивая или уменьшая подачу кислорода. В некоторых производственных процессах концентрацию кислорода в среде поддерживают на уровне, не обеспечивающем максимальное потребление клетками, и тогда необходима точная регулировка скорости его подачи в биореактор.

Фундаментальной характеристикой процесса массопередачи между газом и жидкостью служит объемный коэффициент массопередачи соответствующего газа, показывающий какова скорость переноса молекул газа из газовой фазы в жидкую среду при заданной разности концентраций газа между двумя фазами. Данный коэффициент зависит от характеристики среды культивирования и аппарата. Он существенно изменяется при внесении в среду биообъекта, обычно в сторону увеличения, что объясняется активным поглощением кислорода клетками, а это способствует поступлению новых его порций в жидкость из газовой фазы. Увеличение объемного коэффициента массопередачи характерно для современных биотехнологических процессов, т.к. применение концентрированных популяций клеток и их компонентов, иммобилизованных на инертных носителях, приводит к активации поглощения кислорода из культуральной среды. Коэффициент массопередачи представляет важнейшую характеристику биотехнологического процесса, исходя из которой проводят расчет, оптимизацию и масштабирование уровня аэрации для культивирования биообъекта. Оценка данного показателя, проводимая по скорости поглощения кислорода с сульфитом (сульфитный метод) или с глюкозой при участии глюкозооксидазы (глюкозооксидазный метод) в отсутствие биообъекта, часто дает ошибочные результаты. В этой связи, учет влияния растущей популяции клеток на коэффициент массопередачи кислорода для корректных инженерно-технических расчетов, достигается с помощью прямых ме-

тодов регистрации динамики поступления и расхода кислорода, в первую очередь, с использованием кислородных датчиков.

Система теплообмена. Теплообмен также является важной составной частью процессов, протекающих в биореакторе, поскольку жизнедеятельность и метаболическая активность биообъекта во многом зависит от температуры. Узкий температурный диапазон, оптимальный для биотехнологического процесса, диктуется: резким уменьшением активности ферментов по мере снижения температуры, а также необратимой инактивацией (денатурацией) биологических макромолекул (белков, нуклеиновых кислот и др.) при повышении температуры до определенного уровня.

Температурный оптимум варьируется от организма к организму, от процесса к процессу. Большинство биотехнологических процессов протекает при температурах 30–50 °С (мезофильные условия), что имеет свои преимущества, т.к. для поддержания оптимума температуры лишь в редких случаях приходится прибегать к специальному нагреву. Серьезной проблемой является удаление избыточного количества тепла, выделяемого в процессе жизнедеятельности клеток, поэтому биореактор должен быть снабжен системой теплообмена. Расчет и оптимизация системы теплообмена усложняется наличием в биореакторе большого количества контактирующих поверхностей. Теплообмен происходит между клеткой и средой, между средой, стенкой и охлаждающей жидкостью рубашки биореактора, между этой жидкостью и внешней стенкой рубашки, между рубашкой и наружной поверхностью. Данная теплообмена должна чутко реагировать на изменение теплопродукции, проходящее в ходе культивирования биообъекта, поддерживать температуру на постоянном уровне (режим термостатирования) или контролировать ее изменения по заданной программе. Так, на первых этапах роста культуры биореактор прогревают, а далее встает задача отвода избыточного количества тепла, выделяемого в процессе ее жизнедеятельности. Основным параметром теплообмена является коэффициент теплопередачи, соответствующий количеству теплоты, передаваемой в единицу времени через единичную поверхность при разности температур в 1 °С.

Увеличить эффективность работы системы теплообмена можно путем повышения коэффициента теплопередачи, увеличения поверхности теплообмена или разности температур. Первые два пути связаны с инженерно-конструкторскими разработками. Коррозия стенок биореактора или их загрязнение снижают коэффициент теплопередачи. Отсюда вытекает необходимость изготовления аппаратов из неподверженных коррозии материалов и поддержания его в чистоте.

Система пеногашения. Серьезной проблемой при аэробной ферментации является вспенивание культуральной среды. Пенообразование связано с наличием в среде поверхностно-активных веществ (ПАВ), к числу которых относятся продукты распада жиров и белков. Белковые вещества содержатся в среде как питательные субстраты (белки соевой, кукурузной муки и т.д.) или представляют собой продукты жизнедеятельности биообъектов. ПАВ, как правило, включают, полярные и неполярные группы. Заряженные группы имеют сродство к воде и локализуются в водной фазе, а нейтральные выталкиваются из нее в воздушную фазу, что придает ПАВ ориентацию на границе раздела фаз вода/воздух. ПАВ, встраиваясь в стенки газовых пузырей, удлиняют время их жизни.

Пенный слой в биореакторе имеет двоякое значение. С одной стороны, пена способствует росту многих аэробных микроорганизмов (наибольший прирост в пенном слое дают дрожжи), т.к. представляет собой своеобразный «кислородный коктейль». Внедряясь в границу раздела фаз вода/воздух, пенообразующие ПАВ стимулируют массопередачу между фазами, снижая затраты на перемешивание и аэрацию. Нежелательные последствия вызывает избыточное пенообразование, приводящее к сокращению полезного объема биореактора, создающего угрозу заражения культуры посторонней микрофлорой. В этой связи необходимой составной частью биореактора служит система пеногашения.

Система стерилизации. На практике стремятся вообще не допустить в биореактор постороннюю микрофлору, создав в нем соответствующие условия. Система стерилиза-

ции представляет собой специфический элемент биореактора, не имеющий аналогов в аппаратах химической технологии. Устранение посторонней микрофлоры из биореактора до введения в него штамма продуцента, поддержание чистоты культуры на всем протяжении биотехнологического процесса, надежная стерилизация питательных сред, добавочных компонентов, пеногасителей, воздуха, подаваемого в биореактор – все это составные элементы принципа асептики в биотехнологическом производстве.

Все более широкое применение в биотехнологии находит принцип дифференцированных режимов культивирования: разные этапы одного процесса целесообразно осуществлять при различных условиях, варьируя такие параметры, как температура, значение рН среды, давление, концентрация компонентов питательной среды и т.д.

Нередко повышению эффективности биотехнологического процесса способствует разобщение роста культуры продуцента и биосинтеза целевого продукта. Показательным примером служит технологический способ стабилизации генно-инженерных мутантов. Полученные путем плазмидного переноса сверхпродуценты тех или иных БАВ, как правило, отстают в росте от представителей дикого типа, более экономно расходующих материальные и энергетические ресурсы клетки. Для того, чтобы избежать вытеснения сверхпродуцента диким штаммом, плазмиду, отвечающую за сверхпродукцию, ставят под контроль термолабильного репрессора. Генно-инженерный штамм выращивают при пониженной температуре, при которой репрессор подавляет синтез целевого продукта. Плазмидный штамм не расходует материал на его синтез и растет с нормальной скоростью. После накопления достаточного количества клеток температуру в биореакторе повышают до уровня, при котором наступает инактивация репрессора, и вся биомасса клеток с активно функционирующими плазмидами «выстреливает» целевой продукт.

2.4. Лабораторные, пилотные и промышленные биореакторы: проблемы масштабирования

Технология производственного процесса отрабатывается поэтапно в лабораторных, пилотных (опытно-промышленных) и промышленных биореакторах. На практике чаще встречаются следующие объемы аппаратов: 0,5–100 л для лабораторных, 100 л – 5 м³ для пилотных и 5–1000 м³ и более для промышленных биореакторов.

Обычно в аппаратах разного масштаба используют одинаковые культуры продуцента и одинаковый состав питательных сред. В этой связи, можно было ожидать, что в пересчете на единицу объема количество получаемого продукта будет одинаковым или почти одинаковым в аппаратах разного масштаба. Однако, действительность не оправдывает таких прогнозов. Наоборот, очень часто в аппаратах разного масштаба и конструкции результаты процесса различаются, иногда в несколько раз. В связи с этим, в производственной практике возникает проблема масштабирования.

Масштабирование – воспроизведение результатов, полученных на оборудовании одного размера (или одной конструкции), при проведении того же процесса в аппаратах другого (обычно большего) размера или другой конструкции.

Изучение влияния аэрации и перемешивания, массо- и теплообмена на эффективность биосинтеза БАВ при глубинном культивировании непосредственно связаны с проблемой масштабирования.

Определение условий, при которых возможен непосредственный перенос экспериментальных данных, полученных для данной системы глубинного культивирования с одного биореактора на другой (масштабирование), включает следующие этапы:

- ✓ выбор посевного материала и питательной среды по основным биотехнологическим показателям;
- ✓ сравнительная оценка ростовых свойств штамма продуцента в лабораторной посуде (колба, пробирка и т.п.);

- ✓ оценка термодинамических, гидродинамических параметров процесса культивирования и их оптимизация в условиях лабораторной установки (1–10 л), снабженной системами автоматического контроля и управления;
- ✓ перенос полученного оптимального режима культивирования в промышленные объемы (собственно масштабирование).

Следует отметить, что последний этап имеет важную особенность, поскольку необходимо предварительно осуществить масштабирование гидродинамических условий, а, следовательно, массо- и теплообменных характеристик промышленного биореактора, при которых можно осуществить перенос оптимальных режимов глубинного культивирования, достигнутых на пилотной установке.

Обычно масштабирование осуществляют «снизу вверх» («Scale-up»). Результат, полученный в лабораторных условиях, переносят на аппарат большего размера, стараясь воспроизвести в нем все те критерии, которые выбраны для масштабирования. Это не всегда приводит к успешным результатам, поскольку обычно в промышленном аппарате невозможно создать условия гидродинамики и массопередачи, идентичные условиям в аппаратах малого масштаба.

Наиболее реально использовать масштабирование «сверху вниз» («Scale-down»). При этом сразу ориентируются на аппараты, непосредственно использующиеся в производстве. Их изучают с учетом массообменных характеристик и других критериев масштабирования, и уже лабораторные условия подгоняют под критерии, имеющиеся в производственных аппаратах. В колбах, соответственно, процесс изучают сразу при нужном значении K_{La} (при определенном объеме среды). Хотя на такой установке обычно результаты хуже по технико-экономическим показателям, чем можно было бы получить, стремясь достичь максимума, на лабораторном оборудовании, все же так работать выгоднее, поскольку менее вероятно возникновение трудностей при переходе на промышленное оборудование. Полученные результаты без труда переносятся на промышленные ферментеры. При этом конечные показатели технологического процесса в производстве не хуже, а часто лучше, чем при масштабировании типа «Scale-up».

Этапы масштабирования

На каждом из этапов наращивания масштаба биотехнологического процесса – масштабного перехода, масштабирования процесса – решаются свои задачи налаживания производства и его оптимизации.

Лабораторные аппараты, как правило, напоминают промышленные по форме и устройству систем аэрации и перемешивания. Они подразделяются на те же типы, что и промышленные биореакторы. Обычно в лабораторных масштабах используются аппараты с механическим перемешиванием и барботажем. Тип лабораторного биореактора не обязательно должен соответствовать типу проектируемого промышленного аппарата для того же процесса. Для успеха масштабирования важно не сохранение принципа конструкции, а соответствие важнейших технологических характеристик процесса.

По способу теплообмена и стерилизации лабораторные аппараты подразделяют на две категории. К первой группе относятся аппараты, лишенные собственных систем теплообмена и стерилизации. Такие «несамостоятельные» биореакторы помещают на водяные бани с постоянной температурой, а их стерилизацию осуществляют в автоклаве. Аппараты второй категории снабжены системами теплообмена и стерилизации, устройство которых принципиально сходно с промышленными биореакторами.

Относительно низкие расходы на установку и ее эксплуатацию позволяют широко применять лабораторные биореакторы для решения следующих задач:

- ✓ кинетических: измеряют скорость роста клеток, утилизации субстратов и биосинтеза целевого продукта;

✓ массообменных: рассчитывают коэффициенты массопередачи, скорость поступления в среду кислорода и других газов, скорость освобождения среды от газообразных продуктов жизнедеятельности;

✓ стехиометрических: устанавливают коэффициенты в брутто-уравнениях химических реакций, связывающих потребление субстрата и кислорода с получением целевых и побочных продуктов.

Опытно-промышленные биореакторы называют также пилотными, что подчеркивает характер разработки – пионерский, поисковый, указывающий путь. На данном этапе масштабирования, в общих чертах, можно дублировать конструкционные детали промышленного биореактора и исследовать макрокинетический процесс – динамику потоков жидкости, газа, тепла. На этом этапе выбирают тип аппарата, который далее применяют в промышленном масштабе. Реализация биотехнологического процесса в промышленных масштабах требует значительных капиталовложений и текущих затрат, в том числе к работе необходимо привлечь обслуживающий персонал, поэтому предварительно следует убедиться, что процесс «пойдет» не только в лабораторных аппаратах, но и после масштабного перехода к большим установкам. Масштабная модель создается путем перехода от лабораторных биореакторов к пилотным установкам. Для облегчения конструирования пилотных биореакторов и апробирования их различных вариантов, создают специальные наборы стандартных унифицированных деталей, которые можно соединять и компоновать в разных сочетаниях. Переход к унификации деталей пилотных и промышленных биореакторов – важная тенденция современной биотехнологии.

На этапе промышленного биореактора производят синтез кинетических и стехиометрических характеристик, полученных на лабораторном аппарате, с гидродинамическими, массо- и теплообменными закономерностями процесса, выявленными на пилотном биореакторе. При масштабировании параметры биотехнологического процесса не могут сохраниться в неизменном виде. Наиболее существенно то, что при одной и той же среде культивирования и конструкции биореактора, при совпадающих температурах, значениях pH среды и скорости перемешивания, уровень и скорость биосинтеза целевого продукта могут существенно различаться.

В лабораторных биореакторах, особенно, в так называемых «мини»-аппаратах (менее 1 л), процесс может протекать без перемешивания. По мере увеличения объема биореактора даже при интенсивном перемешивании в аппарате появляются зоны неоднородности, недостаточной аэрации, массообменные характеристики различаются по зонам реактора. Промышленный биореактор можно уподобить лабораторной установке, состоящей из двух сообщающихся биореакторов малого объема, из которых перемешивается и аэрируется только один, а другой соответствует зоне слабого перемешивания и аэрации. Важно подчеркнуть, что если изготовить точную миникопию промышленной конструкции, то такой лабораторный реактор будет характеризоваться высокой однородностью среды и аэрации. Этот пример показывает, что для сохранения параметров процесса при изменении объема аппарата нередко требуется менять его конструкцию, жертвовать второстепенными характеристиками ради сохранения основных.

Лабораторные, пилотные и промышленные биореакторы отличаются по условиям теплообмена. В лабораторных аппаратах одним из основных «генераторов тепла» является механическая мешалка, а вклад метаболических процессов в разогрев среды незначителен. При разности температур между окружающей средой и охлаждающим агентом около 5 °С для эффективного теплообмена достаточно теплообменной рубашки по всей высоте биореактора. Лабораторный биореактор можно также поместить на водяную баню. В пилотном биореакторе соотношение между поверхностью и объемом аппарата снижается, что затрудняет теплообмен через стенки аппарата. При переходе к промышленному биореактору данное соотношение уменьшается еще значительно, так, что внешней теплообменной рубашки часто оказывается недостаточно для эффективного отвода тепла, прихо-

дится вводить внутренние теплообменные элементы. По мере увеличения объема аппарата резко возрастает теплопродукция в ходе диспергирования газа в жидкости. что объясняется увеличением толщины слоя жидкости, через который проходят пузыри газа на пути от аэратора к поверхности среды культивирования. Из отмеченного выше следует, что при переходе от лабораторного биореактора к пилотной установке и далее к промышленному аппарату необходимо наряду с объемом изменять конструкцию и режим работы аппарата. Сложная и дискуссионная проблема, – какие характеристики процесса, непосредственно определяющие его успех, необходимо сохранить? Так, наряду со сложными параметрами, математическое выражение которых включает сочетание ряда характеристик процесса и оборудования, рекомендуют сохранить неизменным объемный коэффициент массопередачи кислорода. Однако, следует отметить, что этот коэффициент не всегда является надежным критерием успеха масштабирования, особенно, при получении пенициллина. Не менее сложным является выбор критериев оценки гидродинамического режима, теплообмена и пеногашения.

Следует отметить, что при масштабировании обостряется проблема брызгоуноса (унос потоком прошедшего через аппарат газа капель среды, образующихся при разрушении пенных пузырей пеногасителями).

В этой связи, основными этапами масштабного перехода служат лабораторные, пилотные и промышленные аппараты. В данном случае центральной проблемой является выбор надежных критериев масштабирования с целью высокоэффективного и экономического биосинтеза целевого продукта в производственных условиях.