

Занятие семинарского типа № 1

ТЕМА ЗАНЯТИЯ: Биотехнология витаминных препаратов как сфера производства

УЧЕБНЫЙ МАТЕРИАЛ

1. Классификация продуктов биотехнологических производств

Биотехнологические производства основаны на использовании жизнедеятельности микроорганизмов. Для того, чтобы управлять микробиологическим процессом, необходимо знать физиологию культур микроорганизмов. Это позволит контролировать процессы, протекающие в клетке, условия культивирования и влияние основных факторов окружающей среды на направленный биосинтез.

По отношению к процессам роста низкомолекулярные продукты метаболизма живых клеток классифицируют на первичные и вторичные метаболиты.

Первичные метаболиты – низкомолекулярные соединения (мол. м. менее 1500 Да), необходимые для роста микроорганизмов.

Одни из них являются строительными блоками макромолекул, другие участвуют в биосинтезе коферментов. Среди наиболее важных для промышленности первичных метаболитов выделяют: аминокислоты, органические кислоты, пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды, растворители и витамины.

Первичные метаболиты, как правило, накапливаются в логарифмической фазе роста микроорганизмов. Первичные метаболиты синтезируются природными микроорганизмами в количествах, необходимых лишь для удовлетворения их потребностей. В этой связи, задача промышленной биотехнологии состоит в создании мутантных форм микроорганизмов – сверхпродуцентов первичных метаболитов.

Вторичные метаболиты – низкомолекулярные соединения, не требующиеся для роста в чистой культуре. К ним относятся: антибиотики, алкалоиды, гормоны роста растений, токсины и др.

2. Механизмы регуляции биосинтеза первичных метаболитов

Микробные клетки, как и клетки других живых организмов, не производят избыточного количества первичных метаболитов, что было бы расточительно и уменьшало их способность к выживанию. Хотя созданы и создаются штаммы с нарушением регуляции биосинтеза этих метаболитов, которые и являются основой для биотехнологических производств.

Одним из важнейших путей интенсификации биотехнологического получения первичных метаболитов является совершенствование применяемого биообъекта.

Основными путями нарушения регуляции обменных процессов, протекающих в клетке, являются: изменения генетической программы организма и нарушения регуляторных систем организма.

Спонтанные изменения генетической природы продуцента основаны на рекомбинации генетического материала *in vivo*. Для выделения из природных популяций высокопродуктивных штаммов микроорганизмов применяют методы селекции.

Методы слепого многоступенчатого отбора случайных мутаций очень длительны. Для возникновения мутаций нужный ген должен удвоиться 10^6 – 10^8 раз. В этой связи, более эффективен метод искусственного повреждения генома, к которому относится индуцированный мутагенез. Несмотря на трудоемкость, в настоящее время методы селекции не утратили своей актуальности для создания высокопродуктивных штаммов продуцентов.

Достижения в области молекулярной биологии и генетики позволили биотехнологам, начиная с 70-х гг. XX в. перейти от слепого отбора штаммов мутантов к сознательному конструированию геномов, применяя технологию рекомбинантных ДНК (рДНК).

Каждое из веществ образуется в клетке в строго необходимом для ее роста количестве в результате ферментативных реакций. Координация химических превращений, обеспечивающая экономичность метаболизма, осуществляется у микроорганизмов в соответствии с тремя основными механизмами:

- ✓ регуляция активности ферментов, в том числе и путем ретроингибирования;
- ✓ регуляция объема синтеза ферментов (индукция и репрессия биосинтеза ферментов);
- ✓ катаболитная репрессия.

В процессе ретроингибирования (ингибирование по принципу обратной связи) активность фермента, стоящего в начале многоступенчатого превращения субстрата, тормозится конечным метаболитом. Таким путем низкомолекулярные метаболиты передают информацию об уровне своей концентрации и состоянии обмена веществ ключевым ферментам метаболизма. С помощью этого механизма конечные продукты саморегулируют свой биосинтез. Ретроингибирование – способ точного и быстрого регулирования образования продукта. На обмен веществ, аналогичный конечным метаболитам, оказывают эффект и их аналоги.

Среди многих тысяч ферментов, присущих микроорганизмам, одни (ферменты гликолиза) синтезируются постоянно и их образование не зависит от состава среды (конститутивные ферменты), а другие ферменты (адаптивные или индуцибельные) возникают только в ответ на появление в среде индукторов (субстратов или их структурных аналогов). Регуляция

объема биосинтеза ферментов осуществляется на оперонном уровне путем изменения количества иРНК, образующихся в процессе транскрипции. В процессе индукции низкомолекулярный метаболит-индуктор, соединяясь с репрессорным белком (продукт гена-регулятора), инактивирует его и препятствует взаимодействию белка-репрессора с зоной оператора, что обеспечивает возможность присоединения к промотору РНК-полимеразы и, следовательно, начало синтеза.

Изучение механизмов регуляции новообразования ряда аминокислот у микроорганизмов показало, что конечные продукты метаболических путей не только ингибируют активность ферментов первых стадий процесса, но и тормозят биосинтез ферментов последних стадий, т.е. помимо аминокислот у микроорганизмов регулируется новообразование многих первичных метаболитов. Обнаруженный феномен назван репрессией, а ферменты, биосинтез которых тормозится под влиянием низкомолекулярных метаболитов, переводящих репрессорный белок в активную форму, способную оккупировать зону первоначального связывания РНК-полимеразы (оператор), называется репрессибельным (глутаминсинтетаза, триптофансинтетаза, уреазы и др.). Проведенные исследования продемонстрировали, что репрессия биосинтеза ферментов обеспечивает более грубую, в сравнении с ретроингибированием, регуляцию образования анаболических ферментов. В случае, если концентрация конечного продукта уменьшается до определенного очень низкого уровня, то происходит депрессия фермента, т.е. скорость его биосинтеза возрастает до необходимой величины. Бактериальные клетки продуцируют большое разнообразие низкомолекулярных эффекторов в ответ на изменение факторов окружающей среды, каждый из которых, взаимодействуя по аллостерическому механизму с определенными регуляторными белками, моделирует промоторную специфичность РНК-полимеразы, запуская, экспрессию определенного набора генов.

В этой связи, ведущими механизмами, обеспечивающими экономичность образования продукта в клетках микроорганизмов, является ретроингибирование и репрессия, базирующиеся на принципе обратной связи.

Если в среде присутствуют несколько разных источников углерода, клетка вырабатывает ферменты для усвоения, лишь одного, наиболее предпочтительного субстрата. Данное явление получило название катаболитной репрессии. Оно заключается в подавлении биосинтеза ферментов, обеспечивающих метаболизм одного источника углерода другим. Экспрессия ферментов регулируется белком-репрессором, пространственно удаленным от гена-оператора. Белок-репрессор, будучи присоединен к гену-оператору, препятствует транскрипции структурных генов.

3. Характеристика витаминов и коферментов

Витамины (лат. *vita* – жизнь) – группа низкомолекулярных органических соединений относительно простого строения и разнообразной химической природы.

Витамины участвуют во множестве биохимических реакций, выполняя каталитическую функцию в составе активных центров большого числа разных ферментов, или выступая информационными регуляторными посредниками, выполняя сигнальные функции экзогенных прогормонов и гормонов. Они не являются для организма поставщиком энергии.

Витаминам отводится важнейшая роль в обмене веществ. Концентрация витаминов в тканях и суточная потребность в них невелики, но при недостаточном их поступлении в организм наступают характерные и опасные патологические изменения. Большинство витаминов не синтезируются в организме человека, поэтому они должны регулярно и в достаточном количестве поступать в организм с пищей или в виде витаминно-минеральных комплексов и пищевых добавок. Исключения составляют витамин К, достаточное количество которого в норме синтезируется в толстом кишечнике человека за счет деятельности бактерий, и витамин В₃, синтезируемый бактериями кишечника из триптофана.

С нарушением поступления витаминов в организм связаны 3 принципиальных патологических состояния: недостаток витамина – гиповитаминоз, отсутствие витамина – авитаминоз, избыток витамина – гипервитаминоз.

В настоящее время известно около полутора десятков витаминов. Исходя из растворимости, их классифицируют (табл. 1) на жирорастворимые (А, D, Е, К) и водорастворимые – все остальные (В, С и др.).

Классификация витаминов

Буквенное обозначение	Химическое название	Активная форма витаминна	Лечебный эффект
<i>Водорастворимые витамины</i>			
B ₁	Тиамин	Тиаминпирофосфат (ТПФ), кокарюоксилаза, тиаминтрифосфат (ТТФ)	Антиневритный
B ₂	Рибофлавин	ФМН, ФАД	Витамин роста
B ₃	Пантотеновая кислота	КоА-SH, дефосфоКоА, 4-фосфопантетеин	Антидерматитный
B ₅ (PP)	Ниацин	НАД ⁺ , НАДФ ⁺	Антипеллагрический
B ₆	Пиридоксин	Пиридоксальфосфат, пиридоксаминофосфат	Антидерматитный
B ₁₂	Кобаламин	Метилкобаламин, дезоксиаденозинкобаламин	Антианемический
C	Аскорбиновая кислота	Аскорбиновая и дегидроаскорбиновая кислоты	Регулятор метаболических процессов, иммуностимулятор
<i>Жирорастворимые витамины</i>			
A	Ретинол	Ретинол/ ретиналь	Антиксерофтальмический
D	Кальциферол	Эргокальциферол	Антирахитический
E	Токоферол	α -, β -, γ -, δ -токоферолы, токотриенолы	Антиоксидантный
K	Филлохинон	Дифарнезилнафтохинон	Антигеморрагический

Жирорастворимые витамины накапливаются в организме, причем их депо являются жировая ткань и печень.

Водорастворимые витамины в больших количествах не депонируются и при избытке выводятся с водой. Это объясняет то, что гиповитаминозы довольно часто встречаются относительно водорастворимых витаминов, а гипervитаминозы чаще наблюдаются относительно жирорастворимых витаминов.

Представители жирорастворимых витаминов, выполняя функцию индукторов биосинтеза белков, проявляют сходство со стероидными гормонами. Все жирорастворимые витамины являются структурными компонентами клеточных мембран, проявляя антиоксидантное действие.

Широкое распространение полигиповитаминозов, снижение резистентности организма к болезнетворным микроорганизмам, сопровождающееся вредными экологическими факторами – все это повышает роль витаминов к профилактической и лечебной работе врачей, поэтому в экономически развитых странах стали реализовываться государственные программы искусственной витаминизации пищевых продуктов.

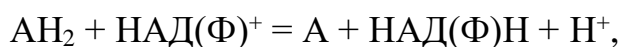
Коферменты – органические соединения небелковой природы, необходимые для осуществления каталитического действия многих ферментов.

Коферменты, соединяясь с белковой частью молекулы фермента (апоферментом), образуют каталитически активный комплекс (холофермент). Коферменты, прочно связанные с белками, называются простетическими группами. Многие коферменты легко отделяются от ферментного белка и служат переносчиками электронов, отдельных атомов или групп атомов субстрата, превращение которого катализирует данный фермент, т.е. функционируют в качестве промежуточных акцепторов. Они могут участвовать в активировании молекул субстратов, образуя с ними реакционноспособные соединения, которые затем подвергаются ферментативному превращению. Некоторые метаболиты, выступающие в ферментативных реакциях, как обычные субстраты, в определенных условиях могут выполнять роль коферментов. Многие коферменты являются производными витаминов, поэтому нарушение обмена веществ при витаминной недостаточности опосредовано через понижение активности определенных ферментов.

Коферменты, как правило, термостабильны, разнообразны по химическому строению и механизму действия. Наиболее распространенную группу составляют соединения нуклеотидной природы, а также коферменты, содержащие остатки фосфорной кислоты. Адениловые нуклеотиды, наряду с их ключевой ролью в обмене энергии, в качестве коферментов участвуют в реакциях переноса и активации орто- и пирогосфатных остатков, аминоксильных групп, остатков неорганических кислот. В группу адениловых нуклеотидов входят аденозинфосфорные кислоты – нуклеотиды, содержащие аденин, рибозу и остатки фосфорной кислоты (АДФ и АМФ). В качестве коферментов в подобных реакциях могут участвовать и производные инозин-5'-фосфорной и гуанозин-5'-фосфорной кислот. Гуаниловые рибонуклеотиды (гуанозин-5'-моно-, ди- и трифосфорные кислоты) выполняют роль коферментов в реакциях переноса сукцинильной группы, при биосинтезе рибонуклеопротеинов в микросомах, биосинтезе адениловой кислоты из инозиновой кислоты и др. Цитидиловые рибонуклеотиды (цитидил-5'-моно-, ди- и трифосфорные кислоты) играют роль коферментов при биосинтезе фосфолипидов, участвуя в переносе остатков, образующих полярные «головки» молекул фосфолипидов (0-фосфоэтанолхолина, 0-фосфоэтанолamina и др.). Уридилловые рибонуклеотиды (уридин-5'-моно-, ди- и трифосфорные кислоты) участвуют в качестве коферментов в процессах трансгликозилирования (переноса остатков простых сахаров и их производных) при биосинтезе ди- и полисахаридов, гликозаминогликанов и реакциях взаимопревращения сахаров.

К важнейшим коферментам нуклеотидной природы относятся никотинамидные коферменты – никотинамидадениндинуклеотид (НАД) и его фосфорилированное производное

никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФ). Никотинамидные коферменты входят в состав ряда дегидрогеназ – катализаторов ключевых окислительно-восстановительных реакций энергетического и пластического обмена. Молекула НАД – динуклеотид, построенный из аденинрибонуклеотида и никотинамидрибонуклеотида, связанных фосфоангидридным мостиком, а НАДФ имеет третий остаток фосфорной кислоты в положении 2' рибозы аденилового нуклеотида. Способность НАД и НАДФ переносить электроны и протоны от окисляемого субстрата к другому акцептору обеспечивает выполнение ими важной биологической функции в процессе клеточного дыхания. Окислительно-восстановительные реакции, протекающие с участием никотинамидных коферментов, могут быть изображены в виде общего уравнения:



где AH_2 – восстановленная форма субстрата;

A – окисленная форма субстрата.

Обнаружено около 350 НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ, специфичных в отношении НАД или НАДФ. Обычно связь никотинамидных и других нуклеотидных коферментов с белками легко диссоциирует. НАД-зависимые дегидрогеназы преимущественно участвуют в процессах катаболизма (в клеточном дыхании), в НАДФ-зависимые – главным образом, в анаболических процессах (восстановительных биосинтетических реакциях). Содержание никотинамидных коферментов, соотношение между их окисленными и восстановленными формами (НАДН и НАДФН), а также величине отношения НАД/НАДФ являются показателями активности метаболических процессов в ткани, характеризуют ее функциональное состояние. В организме НАД и НАДФ синтезируются из никотиновой кислоты (ниацина или витамина РР) или никотинамида. Определение этих коферментов производят обычно спектрофотометрически (по характерному поглощению окисленных форм при 260 нм восстановленных форм или при 340 нм), флуориметрически (длина волны возбуждения 340 нм, флуоресценции 480 нм) или потенциометрически.

Флавиновые нуклеотиды или флавиновые коферменты (флавинмононуклеотид (ФМН), флавинадениндинуклеотид (ФАД)), являются коферментами флавопротеинов – ферментов, широко распространенных в живых клетках, принимающих участие в обмене основных классов органических соединений и играющих важную роль в процессе биологического окисления. К флавиновым коферментам относится рибофлавин. В окисленном состоянии флавиновые коферменты имеют интенсивный желтый цвет, в восстановленном состоянии они бесцветны. ФМН и ФАД прочно связаны с соответствующими белками-апоферментами. Флавопротеины принадлежат к дыхательным ферментам класса

оксидоредуктаз. Механизм окислительно-восстановительных реакций, катализируемых ими, обусловлен последовательным окислением и восстановлением флавиновых коферментов. Определение флавиновых коферментов проводят спектрофотометрически или флюориметрически в характерных для них областях поглощения при определенных длинах волн.

Кофермент А (КоА, коэнзим А) – соединение аденозин-3',5'-фосфорной кислоты и β -меркаптоэтиламида пантотеновой кислоты, образующее с остатками органических кислот (R) тиоэфиры типа R-CO-SКоА. Кофермент играет роль в переносе и активировании кислотных остатков в реакциях ацилирования, конденсации, оксидоредукции или гидратации органических кислот. КоА участвует в клеточном дыхании, биосинтезе и окислении жирных кислот, синтезе стероидов. Для нормальной синтеза КоА необходимо адекватное поступление в организм пантотеновой кислоты, входящей в состав КоА.

Кофермент В₁₂ (КоВ₁₂, витамин В₁₂) – α -(5,6-диметилбензимидазолил)-кобаламинцианид является коферментом ферментов, участвующих в переносе одноуглеродных фрагментов, обмене метионина и др. Недостаток в рационе витамина В₁₂, вызывающий в организме дефицит кофермента В₁₂, клинически проявляется мегалобластной гиперхромной анемией, ее нутритивной В₁₂-дефицитной формой. Эндогенная недостаточность витамина В₁₂, вследствие нарушения его всасывания в кишечнике, приводит к дефициту кофермента В₁₂, клинически проявляющемуся одной из форм мегалобластной гиперхромной анемии – пернициозной (В₁₂-дефицитной) анемией или анемией Аддисона – Бирмера.

Пиридоксальфосфат и его производные являются простетическими группами ряда ферментов, участвующих в обмене аминокислот (реакции трансаминирования, декарбоксилирования и др.), а также фермента гликогенфосфорилазы. При недостаточном поступлении в организм пиридоксальфосфата (производного витамина В₆) нарушаются функции пиридоксальзависимых ферментов.

Дифосфотиамин является коферментом кетолаз и транскетолаз – ферментов, участвующих в декарбоксилировании α -кетокислот и расщеплении углеродной цепи фосфорилированных сахаров, представляет собой производное витамина В₁ (тиамина).

Менее распространены коферменты пептидной природы, важнейшим представителем которых является глутатион – *γ*-L-глутамил-L-цистеинил-L-глицин, принимающий активное участие во многих окислительно-восстановительных реакциях и обеспечивающий функционирование ряда SH-зависимых ферментов. Наиболее важной функциональной группой восстановленной формы глутатиона является сульфгидрильная группа (SH-), легко подвергающаяся ферментативному или неферментативному окислению с образованием дисульфидной (окисленной) формы глутатиона, состоящей из двух молекул восстановленного глутатиона (Г—S—S—Г). Глутатион функционирует как переносчик водорода. Он принимает прямое участие в некоторых реакциях цис-транс-изомеризации, является коферментом

системы глиоксилазы, формальдегид-дегидрогеназы, глутатионпероксидазы. С генетически обусловленным нарушением обмена глутатиона связан ряд наследственных заболеваний, в том числе и наследственные гемолитические анемии. Определение глутатиона осуществляют колориметрически и ферментативными методами с участием глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы.

Липоевая (тиоктовая) кислота – насыщенная серосодержащая жирная кислота, входящая в качестве одного из коферментов в состав мультиферментных комплексов, осуществляющих декарбоксилирование α -кетокислот (пировиноградной и α -кетоглутаровой кислот). Она выполняет роль промежуточного акцептора водорода и кислотных остатков за счет способности к обратимому восстановлению (переход $S-S \rightarrow SH$).

Витамины К – жирорастворимые соединения, производные нафтохинона, выполняющие роль коферментов в реакциях системы свертывания крови. Их водорастворимый аналог (викасол) применяют в качестве лекарственного средства.

Биотин (витамин Н) – водорастворимый витамин, выступающий в качестве кофермента в составе ряда ферментов, катализирующих реакции карбоксилирования – декарбоксилирования некоторых органических кислот, например, пируваткарбоксилазы и ацетил-КоА-карбоксилазы – ферментов начальных этапов глюконеогенеза и синтеза липидов, соответственно. В активном центре молекулы карбоксилаз биотин прочно связан амидной связью с ϵ -аминогруппой остатка лизина фермента.

4. Способы получения витаминов

Производство витаминов осуществляется следующими способами:

✓ Экстракция витаминов из растительного и животного сырья. С этого направления начиналась витаминная промышленность. Так, витамин В₁₂ получали из сырой печени крупного рогатого скота, каротин – из моркови. Однако, в настоящее время количество витаминов, получаемых данным способом, незначительно в виду очень низкого их содержания в природном сырье и ограниченности сырьевых ресурсов.

✓ Химический синтез витаминов. Производство синтетических витаминов занимает ведущее место в современной витаминной промышленности, т.к. основная номенклатура витаминов представлена веществами, полученными химическим синтезом из химического сырья или сочетанием химического синтеза с биосинтезом. Однако, такой способ производства витаминов представляет собой сложный, многоступенчатый процесс, сопряженный со значительными производственными затратами, что удорожает стоимость конечных продуктов.

✓ Биосинтез витаминов. Некоторые витамины, имеющие сложное строение, химический синтез которых в крупномасштабном производстве невозможен или экономически нецелесообразен, получают путем биосинтеза

с помощью микроорганизмов, способных к сверхсинтезу и накоплению определенных витаминов. Микробиологический синтез применяется и в производстве витаминных концентратов, предназначенных для сельского хозяйства, поскольку в данном случае обычно витамины не выделяют в индивидуальном чистом виде.

Следует отметить условность такой классификации способов получения витаминов. Производство некоторых витаминов (аскорбиновая кислота) включает химические стадии и стадии биотрансформации. Витамин рибофлавин получают синтетическим и микробиологическим путями. Некоторые витамины (витамин D₂) получают путем химической модификации провитаминов или витаминов, выделенных из растительных клеток или органов животных.

Применение витаминов в качестве добавок в корма животных требует их крупномасштабного производства, поэтому возникла необходимость в более доступных способах их получения. Таким способом оказался микробиологический синтез витаминов.

Микробиологическая промышленность России выпускает кормовые препараты витаминов B₂ и B₁₂. Кроме того, микробиологическим можно считать производство витамина D₂, образующегося из эргостерина при облучении УФ светом кормовых дрожжей.

Продукцию микроорганизмами отдельных витаминов можно увеличить, изменяя состав среды. Так, количество витамина B₁₂ в биомассе дрожжей зависит от интенсивности аэрации и содержания железа в среде. На содержание витаминов в клетках дрожжей заметное влияние оказывают микроэлементы. Так, небольшие добавки марганца способствуют накоплению в клетках дрожжей инозита, а повышенные дозы кобальта приводят к увеличению содержания витамина B₆.

1. Отличительные особенности биотехнологического производства

К характерным особенностям биотехнологического производства относятся:

1. процесс, как правило, реализуется в условиях строгой чистоты культуры, что достигается стерилизацией оборудования, а также всех компонентов, поступающих в биореактор;
2. культивирование проводится в гетерогенных многофазных системах, реологические свойства которых в ходе процесса часто изменяются;
3. многокомпонентность питательных сред;
4. сложность биохимических процессов регуляции роста биомассы и биосинтеза целевых продуктов (метаболитов);
5. автокаталитичность процесса (влияние продукта реакции на скорость процесса);
6. более высокая вариабельность биотехнологических процессов, в сравнении с химико-технологическими процессами;

7. относительно низкие скорости реакций, концентрации субстратов, получаемых продуктов, которые, как правило, еще не являются готовой продукцией;

8. обычно умеренная температура в пределах 20–40 °С и близкие к нейтральным значения рН среды;

9. различие условий, оптимальных для роста микроорганизмов и биосинтеза целевых продуктов;

10. культивирование микроорганизмов представляет собой сложный технологический процесс, требующий для своей реализации сложной аппаратуры.

6. Общая структура биотехнологического производства

Современное биотехнологическое производство представляет собой единую биотехнологическую систему, которая складывается из последовательных стадий и операций (рис. 1), количество и особенности которых зависят от вида производимой продукции и ее товарной формы.

Совершенствование биотехнологического процесса может привести к созданию новых структурных единиц и к ликвидации устаревших. Определяющими факторами в этом случае являются:

- ✓ биологический агент;
- ✓ субстрат, его биохимические и биофизические характеристики;
- ✓ аппаратное оформление, включая системы контроля и управления;
- ✓ соответствие технологических процессов, оборудования, помещений, качества продукции и ее упаковки международным требованиям GMP.



Рис. 1. Общая структура биотехнологического производства

Процесс биотехнологического производства фармацевтических препаратов состоит из определенного количества составляющих и характеризуется разной степенью сложности. Его сложность обусловлена слагаемыми конкретного биотехнологического процесса, которые варьируются в зависимости от продуцента (микроорганизм, растение, млекопитающее и др.), и зависит от целевого продукта. В случае, если целевым продуктом является биомасса, то технологическая линия короче, а, если это субстрат для производства высокоочищенных инъекционных препаратов, то схема производства гораздо сложнее. Если источником целевого продукта является микроорганизм (при производстве антибиотиков), то для его культивирования обязательны асептические условия, соответствующее оборудование и специальная подготовка к проведению процесса.

Свои особенности имеет биотехнологическое производство, основанное на использовании микроорганизмов-рекомбинантов, требующее усиленного контроля за стабильностью продуцента, а также тщательного соблюдения мер, предотвращающих возможность его попадания в окружающую среду. Такие меры предусматривают использование специального оборудования, и соблюдение определенных правил, относящихся непосредственно к технологическому режиму.

6.1. Технология приготовления питательной среды для биосинтеза БАВ

Всем живым организмам присущ постоянный обмен веществ с окружающей их средой. Для реализации процессов питания и размножения необходимы определенные условия и, в первую очередь, наличие питательных веществ, из которых микроорганизмы синтезируют составные части своего тела и получают энергию путем окисления различных веществ.

По типам питания бактерии подразделяют на: автотрофные (прототрофные) и гетеротрофные.

При выборе питательных сред для культивирования микроорганизмов следует учитывать множество факторов. Один из них связан со стехиометрией роста микроорганизмов и количеством биомассы, которое необходимо получить при культивировании. Основой для таких расчетов служит материальный баланс, связанный с превращением в процессе клеточного роста низкомолекулярных органических и неорганических соединений в биомассу. Для синтеза заданного количества биомассы в систему культивирования необходимо ввести достаточное количество питательных веществ, взятых в определенном соотношении.

Для удовлетворения потребностей микроорганизмов, культивируемых в промышленных масштабах, конструируют производственные среды. При этом соблюдают определенные принципы (рис. 2).



Рис. 2. Принципы конструирования производственных сред

Характеристика питательных сред

По происхождению питательные среды классифицируют на:

✓ естественные (натуральные) среды, имеющие неопределенный химический состав, т.к. в них входят компоненты растительного или животного происхождения, а также отходы разных производств. На таких средах хорошо развиваются большинство биообъектов, т.к. в них содержатся все компоненты, необходимые для роста и развития;

✓ искусственные (синтетические) среды – среды, в состав которых входят только определенные химические соединения, взятые в точно указанных концентрациях (мясопептонный бульон, мясопептонный желатин, мясопептонный агар и др.).

По физическому состоянию среды подразделяются на:

✓ жидкие среды используются для накопления биомассы или продуктов метаболизма;

✓ сыпучие среды (разваренное пшено, отруби, пропитанные питательным раствором) используют для получения некоторых БАВ (ферментов и др.);

✓ плотные среды готовят из жидких сред, добавляя агар-агар, желатин или селикагель. Взятые в определенной концентрации агар-агар (1,5–2%) и

желатин (10%), застывают в виде студня. Если к ним прибавить питательные вещества, то на их поверхности хорошо растут бактерии. Таким питательным веществом является мясной бульон, приготовляемый из мяса, в котором осаждены белковые вещества, добавлены пептон и поваренная соль.

При этом агар-агар не является питательным веществом, а желатин имеет определенную питательную ценность для бактерий, многие из которых способны его разжижать. При приготовлении сред из мясопептонного агар-агара или желатина их нагревают до растворения, фильтруют, разливают по пробиркам и стерилизуют. Следует иметь в виду, что агар-агар плавится при температуре, близкой к 100 °С, а желатин – в зависимости от его процентного состава в среде (чем выше его содержание в среде, тем выше температура плавления). Агар-агар застывает при температуре 40 °С.

Агар-агар и желатин как питательные среды характеризуются рядом преимуществ и недостатков. Желатин плавится при температуре чуть выше 20 °С, что не позволяет культивировать на нем микроорганизмы при оптимальной для них температуре 25–30 °С, а для ряда болезнетворных – 37 °С; отличается прозрачностью и разжижается рядом бактерий. Последнее свойство служит в качестве одного из диагностических признаков при определении вида бактерий. Агар-агар отличается меньшей прозрачностью, не разжижается бактериями, за исключением нескольких видов, и позволяет культивировать на нем микроорганизмы при оптимальной для них температуре.

В настоящее время биотехнология все больше ориентируется на разнообразные виды недорогого, доступного и возобновляемого сырья, наиболее важным видом, которого является растительная масса. При конверсии субстрата в биотехнологических процессах стремятся наладить безотходное производство, когда отходы одного процесса служат сырьем для следующего.

Составные компоненты питательной среды

Вода. Неотъемлемой частью питательной среды служит вода, т.к. все процессы жизнедеятельности протекают в водной среде. В большинстве случаев при приготовлении питательных сред используют воду очищенную, полученную с помощью дистилляции. Вода очищенная считается качественной, если не содержит аммиака, органических кислот и т.п. Значение рН воды допускается в пределах 5,0–6,8. В некоторых случаях, когда в среды добавляют перекристаллизованные реактивы в микроконцентрациях, применяют трижды очищенную воду. В случае, если из воды нужно удалить хлориды, соли тяжелых металлов или растворенные газы, то можно использовать обессоленную воду. Питательные вещества образуют в воде истинные и коллоидные растворы, а также растворы высокомолекулярных соединений (ВМС). Отдельные компоненты питательной среды могут находиться в твердом состоянии, при этом они могут всплывать на поверхность, равномерно распределяться по всему

объему в виде взвеси или образовывать придонный осадок. Жидкие углеводороды при внесении в воду формируют особую несмешивающуюся фазу. При твердофазном культивировании вода только увлажняет поверхность субстрата. Вещества для культивирования могут представлять собой газы, хорошо (аммиак, сероводород), умеренно (углекислый газ) или ограниченно (азот, кислород, водород, метан) растворимые в воде.

Углеродное питание. Наибольшее биогенное значение для любого живого организма имеет углерод, входящий в состав всех органических молекул, образующихся в клетке. На его долю приходится в среднем 50% клеточного вещества. По этой причине источники углерода занимают основное место среди компонентов питательных сред. Производители БАВ по отношению к источникам углерода являются, как правило, гетеротрофами, использующими в качестве углеродного питания углеводы (источники пластического материала и энергии). В промышленности микробного синтеза широко используются чистые углеводы, а также природные и технические продукты, богатые углеводами (глюкоза, сахароза, лактоза, крахмал, кукурузная мука, меласса, зеленая патока и др.).

Техническая глюкоза содержит не менее 99,5% редуцирующих веществ, практически представляет собой чистый углевод.

Сахароза (свекловичный или тростниковый сахар). Техническая сахароза содержит не менее 99,75% сахарозы.

Лактоза (молочный сахар) содержится в молоке. Ее получают из молочной сыворотки, образующейся при производстве сыров, творога и т.п.

Крахмал на 96–97% состоит из полисахаридов двух типов: амилазы (10–20%) и амилопектина (80–90%). Крахмал получают из картофеля или кукурузы. Под действием амилолитических ферментов крахмал расщепляется до глюкозы, которая утилизируется продуцентом по гликолитическому или пентозофосфатному пути.

Кукурузную муку получают при размалывании зерен кукурузы. Она является доступным и экономичным сырьем, в состав которого входят (%): крахмал (67–70), углеводы (10), белки (12) и золу (0,9). Среди зольных элементов в кукурузной муке в наибольшем количестве присутствуют ионы фосфора, калия и магния.

Меласса – отход сахарного производства, представляющий собой маточный раствор, образующийся при отделении кристаллов сахарозы на центрифуге после третьей кристаллизации. Меласса – густая вязкая жидкость темно-коричневого цвета, состав которой непостоянен и может варьироваться в зависимости от почвенных и климатических условий выращивания свеклы, технологии ее переработки, условий транспортировки и хранения. Меласса содержит (%): сухие вещества (75–82), сахарозу (45–50), общий азот (1,2–2,2) и золу (6–10). В мелассной золе присутствует б калия, магния, кальция, железа, но сравнительно мало фосфора. В мелассе содержится ряд аминокислот, витаминов группы В и органических кислот.

Зеленая патока – отход производства глюкозы из крахмала, содержащий не менее 76% редуцирующих веществ, 50% сухих веществ и 3,5% углеводов,

не более 3,5% золы. Основная часть ее зольных элементов представлена хлоридом натрия, образующимся при нейтрализации соляной кислоты содой.

Азотное питание микроорганизмов по своему значению приближается к углеродному, но уступает последнему по объему. Азот входит в состав клеточных компонентов, обеспечивающих жизнеспособность организмов. Источниками азотного питания для продуцентов БАВ служат разные азотсодержащие вещества неорганического (соли аммония и азотной кислоты) и органического происхождения (кукурузный экстракт, соевая мука).

Кукурузный экстракт – отход производства крахмала из кукурузы, представляющий собой густую жидкость темно-коричневого цвета с хлопьевидной взвесью или почти однородную. В его состав входят (%): азот общий (6–8), азот аммиачный (1–3), азот белковый (0,8–2), углеводы (0,1–10), органические кислоты (15–20), зола (24). Основными элементами золы являются фосфор, калий, магний. Кукурузный экстракт содержит витамины группы В, некоторые ростовые вещества, биостимуляторы.

Соевую муку получают при размалывании соевых бобов, соевого жмыха и шрота, образующихся после извлечения соевого масла. Соевая мука бывает необезжиренная, полуобезжиренная и обезжиренная. Кроме того, соевая мука бывает дезодорированная (обработанная паром) и недозодорированная. Обработка паром позволяет увеличить срок ее хранения. Так, дезодорированная мука может храниться в течение 1 года, а недозодорированная – 1,5–2 мес. Из основных компонентов соевой муки особое значение для ферментации имеют азотсодержащие вещества. Азот соевой муки находится в составе белков (40,5%). Кроме белков в ней содержатся (%): углеводы (до 25), органические кислоты (1,5), зола (4,5–6,5). В необезжиренной муке присутствует 19,5% жира. В состав золы входят ионы калия, магния, кальция и микроэлементы.

Минеральное питание играет важную роль в жизнедеятельности микроорганизмов. Содержание минеральных компонентов в клетке невелико, но функции очень важны. Они необходимы для регуляции осмотического давления, окислительно-восстановительных условий и значения рН; изменяют гидрофильность протоплазмы, а также играют пластическую роль, входя в состав конструктивного материала клеток. Минеральные элементы участвуют в формировании пространственной структуры биополимеров. Одной из основных функций минеральных элементов является участие в биокатализе. Минеральный состав среды формирует распределение электрических зарядов на поверхности клетки. Обычно клетки микроорганизмов имеют отрицательный заряд. При введении в среду электролитов он снижается и тем сильнее, чем выше валентность введенного противоиона. Изменение электрического потенциала клеток может изменить их физиологическую деятельность, воздействовать на селективность клеточной мембраны, вызывать флокуляцию и флотацию клеток.

Факторы роста необходимы микроорганизмам в малых дозах, они используются для биосинтеза физиологически активных веществ,

регулирующих внутриклеточный метаболизм. К ним относятся, помимо аминокислот, пуриновые и пиримидиновые основания, входящие в состав нуклеиновых кислот, а также витамины. В относительно больших количествах (10^{-5} – 10^{-4} М) необходимы углерод, кислород, азот, водород, фосфор, сера, калий, кальций, железо и магний. Содержание минеральных веществ в бактериальных клетках составляет 2–14% к их сухой массе. Для роста биомассы необходимы и микроэлементы (10^{-8} – 10^{-5} М): медь, цинк, кобальт, никель, хлор, натрий, кремний, молибден, марганец и др. Действие факторов роста многогранно. Они могут участвовать в обмене веществ. В большинстве случаев потребность микроорганизмов в факторах роста зависит от состава среды и их способности синтезировать витамины. В случае, если биосистема их не синтезирует, то фактор роста должен присутствовать в среде в готовом виде.

Технология приготовления питательных сред

Приготовление питательных сред осуществляется в специальных реакторах, снабженных мешалками. В зависимости от растворимости и совместимости компонентов сред могут быть использованы отдельные реакторы. Технология приготовления сред усложняется, если в их состав входят нерастворимые компоненты. В различных биотехнологических процессах применяют разные по происхождению и количеству субстраты, поэтому процесс их приготовления варьируется.

Дозирование компонентов среды осуществляется индивидуально на каждом производстве в соответствии с технологическим регламентом конкретного процесса. При этом в качестве дозирующего оборудования применяют весовые и объемные устройства, используемые в фармацевтической, химической и пищевой промышленности.

Транспорт веществ осуществляют с помощью насосов, ленточных и шнековых транспортеров. Сыпучие компоненты подают в ферментеры с помощью вакуумных насосов. Часто применяют принцип предварительных смесей, т.е. соли предварительно растворяют, а затем транспортируют по трубопроводам, дозируя их подачу по объему.

Стерилизация питательных сред

В производстве питательные среды в основном стерилизуют термическим способом. Устойчивость микроорганизмов к термическому воздействию определяется рядом факторов, в том числе и их видовой принадлежностью. При этом учитывают, что споры гораздо устойчивее к нагреванию, чем вегетативные клетки. На эффективность термической стерилизации влияет количество клеток в среде: чем их меньше, тем легче достигается стерилизующий эффект. Из этого следует, что перед стерилизацией необходимо снижать количество микробных клеток в среде.

Определяющее значение при термической стерилизации имеют температура и время ее поддержания: чем выше температура, тем быстрее достигается стерилизующий эффект. Для оценки эффективности стерилизации используют физические (по температуре и давлению пара), химические (по температуре плавления или изменению цвета), микробиологические (с высевом на стандартные среды), биоиндикаторные (с использованием *Bacillus stearotherophilus*) методы.

При термической стерилизации помимо гибели контаминирующих микроорганизмов могут разрушаться термолабильные компоненты среды: витамины, ферменты, некоторые аминокислоты. С этим явлением, ухудшающим качество сред, борются, повышая температуру и уменьшая время стерилизации.

Термическая стерилизация жидкостей осуществляется двумя способами: периодическим и непрерывным.

При периодическом способе стерилизация происходит в ферментере. При этом одновременно нагревается весь объем среды до температуры стерилизации, которая выдерживается определенное время, а после снижается до заданного значения. Данный способ прост и, как правило, применяется в случае небольших аппаратов. К его недостаткам относятся: значительный градиент температуры по объему и «недостерилизация» в «тупиках».

При непрерывном способе (более прогрессивном и производительном) стерилизация осуществляется в специальных установках. В результате температуру можно увеличить до 130–150 °С, при этом время стерилизации уменьшается до 3–10 мин., что положительно сказывается на качестве среды. Недостатком этого способа является увеличение протяженности трубопроводов, что повышает вероятность вторичной контаминации.

Одной из основных проблем получения стерильных сред является сохранение их биологической полноценности, т.е. сохранение термолабильных компонентов, исключение процессов образования ингибиторов (продуктов разложения углеводов).

Холодная стерилизация (фильтрация) применяется для термолабильных объектов, в том числе и для питательных сред. В последние годы наиболее широкое применение нашли безасбестовые целлюлозные и мембранные фильтрующие элементы. Данные фильтры изготавливают с размером пор от 12 до 0,01 мкм, толщиной около 80–150 мкм, хотя могут выпускать и с размером пор 5 нм. Такая стерилизация включает в себя ультрафильтрацию, фильтрацию через мембранные фильтры и т.п. Мембраны изготавливают из полипропилена, целлюлозы, пористой нержавеющей стали, спеченной ткани и проволочной сетки, микроволокна, нейлона, импрегнированной эпоксидной смолой целлюлозы и др.

Действие всех стерилизующих агентов основано на инактивации важнейших внутриклеточных веществ, необходимых для роста и репродукции клеток. Многие белки, особенно ферменты, которые сложными путями включаются во все фазы клеточного развития и пролиферации,

денатурируют под воздействием тепла. Они чувствительны и к молекулярным изменениям, вызываемым ионизирующей радиацией или токсическими химическими агентами, воздействующими на генетический материал клеток.

6.2. Технология приготовления посевного материала

Каждая производственная культура, используемая в качестве продуцента целевого продукта, должна иметь свой паспорт, в котором указаны: ее название, род (вид), коллекционный номер, средний уровень активности, серия, дата выпуска, срок годности, характеристика среды для выращивания и хранения.

Процесс подготовки посевного материала является многоступенчатым. Сначала исходная культура выращивается на агаризованной среде в пробирке. На этом этапе при высевании исходной культуры на агаризованную среду можно исследовать ее морфологию с целью определения чистоты культуры. Далее выращивание ведется в колбах в жидкой среде на качалке. На этой стадии включается процесс аэрации и происходит перемешивание исходной культуры с жидкой средой при определенной температуре. Затем исходную культуру, перемешанную с жидкой средой, переносят в посевной аппарат (инокулятор) в количестве 10–25% объема инокулятора, в котором также осуществляются перемешивание и аэрация. Иногда посевной аппарат называют маленьким ферментером, а производственный аппарат – большим, функциональные различия между ними отсутствуют.

При подготовке посевного материала происходит ступенчатое увеличение биомассы. В этой связи, могут использоваться один или несколько посевных аппаратов, возрастающие по объему (выращивание посевного материала осуществляется примерно до 5–10% объема основного ферментера). У инокулятора есть устройство подачи и фильтрации воздуха. Этот ферментер, как и основной, снабжен технологическими окнами, датчиками, отбойниками и т.д. В посевном аппарате питательная среда стабильна. В ферментере, по мере накопления целевого продукта, с течением времени состав среды изменяется, поэтому микроорганизмы начинают испытывать дефицит питания, их ответом на такое воздействие является выработка целевого продукта (антибиотика и т.п.).

6.3. Ферментация

Ферментация является основной стадией в биотехнологическом процессе, т.к. в ходе нее происходит взаимодействие продуцента с субстратом и образование целевых продуктов. Эта стадия осуществляется в биотехнологическом реакторе (ферментере). Она может быть организована разными способами в зависимости от особенностей продуцента, а также требований к типу и качеству конечного продукта.

Промышленная ферментация – особый специализированный процесс получения различных веществ в химической и родственных отраслях промышленности с помощью микроорганизмов, включая процесс их размножения. С помощью данного процесса можно получить клеточный белок, дрожжи, ферменты, алкогольные напитки, органические кислоты, антибиотики, витамины и др.

В качестве микроорганизмов-продуцентов используют штаммы бактерий, в том числе актиномицеты, дрожжи, нитевидные грибы. В качестве субстратов используют углеводороды: тростниковый или свекловичный сахар, мелассу, глюкозу, крахмал и др. Кроме того, ферментацию можно проводить на жидких углеводородных фракциях, метане, метаноле и уксусной кислоте. Для проведения ферментации необходимы азот, источником которого является химическое соединение, животное или растительное сырье, а также фосфор, калий и др.

Как отмечалось выше, ферментация осуществляется в биореакторе (ферментере). Ферментер представляет собой реакционную емкость, в которой обеспечивается питательное и физиологическое окружение культуры, необходимое для ее роста или получения целевых продуктов метаболизма.

Принципы оснащения биопроизводств:

1. конструкционное совершенство и относительная универсальность биореакторов;
2. инертность и коррозионная стойкость материалов биореакторов, а также другого технологического оборудования, влияющих на биообъект или контактирующих с ним или продуктами его метаболизма;
3. эксплуатационная надежность технологического оборудования;
4. доступность, эстетичность и легкость обслуживания, замены, очистки, обработки антисептиками и дезинфектантами узлов и соответствующих частей оборудования.

Согласно первому принципу, следует конструировать биореакторы, которые можно использовать для реализации биотехнологических процессов, основанных на использовании разных биообъектов (бактерий, грибов, клеток растений и животных).

Учитывая инертность материалов биореакторов, при выборе конструкционных материалов используют нержавеющую сталь, стекло, керамику, титан, чугун и т.п. Хром, никель, молибден как лигирующие элементы повышают жаростойкость и химическую стойкость чугуна. Полиэтилен и другие полимерные материалы также используют в биотехнологическом процессе.

Эксплуатационная надежность технологического оборудования обеспечивается соответствием аппаратов, приборов и другого оборудования целевому назначению, в частности по конструкционному совершенству, полностью обеспечивающему оптимальные условия для протекания

технологического процесса и контроля за ним с учетом требований по технике безопасности.

Интенсивность работы оборудования может быть увеличена за счет автоматизации и замены периодических процессов непрерывными, снижения энергоемкости аппарата, благодаря уменьшению расхода энергии на единицу сырья и конечного продукта.

Любой аппарат, легко доступный для сборки и разборки, загрузки материалами, средами и выгрузки для чистки, мойки, смазки, ремонта и пр., оценивается выше, чем оборудование с усложненным доступом к его частям.

Техническую вооруженность биотехнологического производства целесообразно условно ограничить его аппаратным оформлением, базирующимся на культивировании: бактерий и грибов, клеток и тканей растений, клеток и тканей животных и человека. Такое подразделение обусловлено тем, что бактерии и грибы в большинстве своем выращивают в однотипных биореакторах, имеющих почти однотипную обвязку, в которую входят: ферментер, многокорпусный вентиль стерильный (для подачи среды, посевного материала и пр.), система регулирования значений рН, температуры, подачи пеногасителя, система контроля расхода воздуха, пробоотборник и электродвигатель. Растительные клетки, имеющие клеточные стенки, растут, размножаются и развиваются гораздо дольше, чем большинство бактерий и грибов, что вносит определенные коррективы в аппаратное оформление соответствующих биотехнологических процессов. Культуры клеток животных и человека, не имеющие клеточных стенок, являются более требовательными к условиям своего существования, чем другие, поэтому оборудование для них можно отнести к разряду «тихоходного», обеспечивающего щадящее обращение с биообъектами.

В связи с этим, биореакторы классифицируют на:

- ✓ аппараты для выращивания посевного материала – инокуляторы;
- ✓ аппараты для культивирования микроорганизмов – культиваторы, ферментаторы, ферментеры больших объемов;
- ✓ аппарат для выращивания растительных клеток – фитатрей (мембранный контейнер для выращивания растительных клеточных культур);
- ✓ биореакторы для выращивания животных клеток относительно небольшого объема (до 10 л) с вибромешалками или тихоходными пропеллерными мешалками.

Биореакторы классифицируют в зависимости от конструктивных особенностей:

1) По способу потребления энергии для диспергирования и перемешивания стерильного воздуха:

а) энергия расходуется на механическое движение внутренних устройств;

б) энергия расходуется на работу внешнего насоса, обеспечивающего рециркуляцию жидкости и/или газа;

в) энергия расходуется на сжатие и подачу газа в культуральную жидкость.

2) По способу смешения газожидкостных фаз: барботажные, эрлифтные, барботажно-эрлифтные, перемещающе-барботажные, барботажные с циркуляционным перемешиванием, с роторным перемешиванием и аэрацией и т.п.

3) По способу ввода энергии для перемешивания:

а) с подводом энергии газовой фазой (барботажный, эрлифтный, форсуночный);

б) с подводом энергии жидкой фазой (эжекционный, с всасывающей мешалкой);

в) комбинированные (барботажный с механическим перемешиванием).

По типу целевого продукта в биосинтезе выделяют биомассу, высокомолекулярное индивидуальное вещество (ферменты и т.п.), низкомолекулярные первичные и вторичные метаболиты.

Ферментация может проходить, как в строго асептических условиях (защищенная ферментация), так и без соблюдения условий асептики (незащищенная ферментация); в аэробных или анаэробных условиях; на поверхности среды (поверхностная ферментация) или в ее глубине (глубинная ферментация). Кроме того, различают периодическую и непрерывную ферментацию.

При поверхностной ферментации биообъект растет только на поверхности среды. Целевой продукт (если он водорастворим) распределяется по всему объему среды, а биомасса продуцента располагается в виде поверхностной пленки в любого рода емкостях, включая микробиологические матрасы, колбы, бутылки или ферментер при условии, что не работают мешалка и барботажное устройство, т.е. массообмен и аэрация отсутствуют. В данном случае биомассы оказывается очень мало и, соответственно, образуется небольшое количество целевого продукта.

При глубинной ферментации, несмотря на различия конструкций ферментеров, клетки продуцента распределяются во всем объеме среды вследствие работы мешалки или турбинного перемешивания, а также в результате пропускания воздуха под давлением через всю толщу среды. Все это делает процесс высокоэкономичным. В ферментере создаются условия для накопления большого количества активно функционирующей биомассы продуцента и, соответственно, целевого продукта.

В ходе периодической ферментации выращиваемая культура проходит ряд последовательных стадий: лаг-фазу, экспоненциальную фазу, фазу замедления роста, стационарную фазу и фазу отмирания. При этом происходят существенные изменения физиологического состояния биообъекта и ряда параметров среды. Целевые продукты образуются в экспоненциальной (первичные метаболиты) и стационарной (вторичные метаболиты) фазах, поэтому в зависимости от целей биотехнологического процесса в современных технологических процессах применяют принцип

дифференцированных режимов культивирования. В результате этого создаются условия для максимального получения того или иного целевого продукта. Периодический способ прост и широко применяется на практике, хотя его нельзя считать оптимальным. При периодическом процессе в ферментер одновременно загружают все компоненты среды и посевной материал, после включаются все элементы его обвязки и осуществляется полный цикл ферментации. После его завершения культуральная жидкость (вместе с мицелием) сливается и направляется в цех очистки для выделения и очистки целевого продукта. В этой связи, какой-либо коррекции условий биосинтеза во время ферментационного цикла не выполняется: нет ни постоянного поддержания оптимального соотношения источников углерода, азота, фосфора, ни добавления в нужный момент предшественников целевого продукта, ни сохранения оптимального значения pH и т.п. Все это сказывается на продуктивности ферментации. Выход целевого продукта, как правило, снижается.

Полупериодическая (регулируемая) ферментация, в сравнении с периодическим процессом, более прогрессивна. В данном случае улучшаются рост продуцента и биосинтез целевого продукта, появляется возможность коррекции процесса при его отклонениях от оптимальных условий.

Непрерывная ферментация заключается в том, что из ферментера непрерывно отбирают небольшие порции культуральной жидкости и одновременно в него вносят такой же объем свежей среды. При этом система оказывается проточной. Использование непрерывного процесса целесообразно в том случае, если целевым продуктом является биомасса выращиваемого продуцента. Непрерывная ферментация реализуется в условиях установившегося режима, когда микробная популяция и ее продукты наиболее однородны. Применение непрерывного способа создает условия для эффективного регулирования и управления процессами биосинтеза.

Системы непрерывной ферментации могут быть организованы по принципу полного вытеснения или полного смешения. В первом случае – это тубулярная культура. При этом ферментация осуществляется в длинной трубе, в которую с одного конца непрерывно поступают питательные компоненты и инокулят, а с другой – с той же скоростью вытекает культуральная жидкость. Такая система проточной ферментации является гетерогенной и реализуется без перемешивания. При непрерывной ферментации в ферментерах полного смешения (гомогенно-проточный метод) во всем объеме аппарата создаются одинаковые условия. Применение таких систем позволяет эффективно управлять отдельными стадиями, биотехнологическим процессом в целом, а также стабилизировать продуцент практически в любом нужном биотехнологу состоянии. При непрерывной ферментации рост продуцента поддерживается в экспоненциальной фазе.

Различают два способа непрерывной ферментации: хемостатный и турбидостатный.

При хемотратном способе в биореактор с постоянной контролируемой скоростью подается питательная среда, один из компонентов которой поступает в количестве недостаточном для обеспечения максимальной скорости роста культуры, поэтому такой аппарат приобретает свойства саморегулирующейся системы. Составными частями хемотрата являются: устройство для подачи среды, выпускное приспособление для оттока культуральной жидкости и система контроля скорости потока.

Турбидостатный режим культивирования основан на прямом контроле концентрации биомассы и полученного метаболита.

К преимуществам и недостаткам периодической и непрерывной ферментации относятся: непрерывный способ позволяет получать большее количество биомассы, но при периодическом способе концентрация целевого продукта выше. Кроме того, при непрерывном способе требуется более сложное и дорогостоящее оборудование, чем при периодическом. Еще одним недостатком непрерывного способа является обрастание труб и стенок ферментера, и как следствие, потеря штаммами продуцентов своих полезных свойств. При периодическом культивировании необходимы дополнительные затраты рабочей силы.

Отъемно-доливная ферментация представляет собой промежуточный процесс между периодическим и непрерывным культивированием. В данном случае культуральная жидкость отбирается более большими порциями, чем в непрерывном процессе.

Многоциклический процесс является еще одним вариантом периодической ферментации. После завершения цикла ферментации при сливе культуральной жидкости, в аппарате ее оставляют примерно 10%, затем вносят 90% (объемн.) свежей среды, и реализуют новый ферментационный цикл. Для осуществления данного процесса не требуются ни выращивание нового посевного материала, ни подготовка и стерилизация ферментера и трубопроводов, и одновременно экономятся время и средства.

В любом ферментере присутствуют следующие основные системы:

- 1) перемешивания и аэрации;
- 2) теплообмена;
- 3) пеногашения;
- 4) стерилизации.

Система перемешивания и аэрации. По способу перемешивания и аэрации ферментеры классифицируют на аппараты с механическим, пневматическим и циркуляционным перемешиванием.

Аппараты с механическим перемешиванием имеют механическую мешалку, состоящую из центрального вала и 6–8 лопастей разной формы (прямых или изогнутых). Эффективное перемешивание жидкости в больших объемах обеспечивается только в том случае, если мешалки многоярусны. В систему перемешивания также входят отражательные перегородки (узкие металлические пластины, прикрепленные к внутренним стенкам биореактора), предотвращающие возникновение водоворота вокруг

вращающейся мешалки, переводя круговое движение жидкости в вихревое, равномерно распределенное по всему объему. В таких аппаратах аэрация может осуществляться путем барботаж. Разбрызгиванию воздуха в виде мелких пузырьков способствует механический вибратор, установленный в непосредственной близости от барботера. Существуют аппараты, в которых вибратор, совершающий вертикальные колебания с амплитудой 0,1–3 мм и частотой 50 Гц, служит единственным устройством для перемешивания жидкости. Такая система обеспечивает высокий уровень асептики, низкие энергозатраты и сравнительно низкий уровень травмируемости культивируемых клеток. В некоторых аппаратах используется полая мешалка. В данном случае воздух поступает в среду культивирования через нижний конец ее вала и полые лопасти. Вращение мешалки способствует диспергированию воздуха в жидкости. В таких аппаратах часто непосредственно над лопастями аэрирующей мешалки устанавливают диффузор (открытый сверху и снизу цилиндр, который делит объем биореактора на два отсека – внутренний и внешний по отношению к его стенкам), усиливающий разряжение, создаваемое при вращении мешалки в верхней части аппарата, в которой поверхность жидкости приобретает вид глубоко вогнутого мениска, и тем самым, способствует дополнительному подосу воздуха сверху и циркуляции жидкости в вертикальной плоскости аппарата. Аппараты с механическим перемешиванием являются наиболее распространенной конструкцией в современном биотехнологическом производстве. Перспективы их дальнейшего применения связаны с высокой скоростью массопередачи кислорода и значительной экономии мощности.

Аппараты с пневматическим перемешиванием. В таких аппаратах мешалка отсутствует, а перемешивание жидкости осуществляется с помощью пузырьков газа. Простейший аппарат данного типа представляет собой барботажную камеру, в которой воздух, распыленный барботером, поднимаясь снизу вверх, перемешивает культивационную среду. Скорость массопередачи между газом и жидкостью в таком аппарате намного ниже, чем в аппаратах с механическим перемешиванием. Для устранения этого недостатка вводятся разные модификации. Перемешивание и аэрация усиливаются с помощью вращающихся дисков с отверстиями, установленных вблизи барботера или с помощью придонных пропеллеров.

На пневматическом перемешивании основан принцип действия многих биореакторов колонного типа, разделенных перфорированными горизонтальными перегородками на секции. Основное назначение перегородок состоит в интенсификации процессов аэрации и перемешивания. Кроме того, они позволяют бороться с укрупнением газовых пузырей по мере их продвижения вверх, поэтому перегородки приобретают особое значение для аппаратов большой высоты. Таким путем уменьшается угроза избыточного пенообразования в биореакторе. Пневматические биореакторы, характеризующиеся плавным (щадящим) перемешиванием жидкости, хорошо зарекомендовали себя при культивировании клеток животных и растений. Так, в условиях таких «тихоходных» установок в культурах

растительных клеток пробуждаются биосинтетические способности, свойственные целым растениям. Пневматические аппараты привлекают также простотой конструкции и малыми энергозатратами. Хотя, в то же время, их «тихоходность» становится серьезным недостатком при реализации биотехнологических процессов, требующих интенсивного перемешивания или в биореакторах с вязкими средами. Преодоление «тихоходности» возможно в соплоконусных биореакторах, в которых мощная струя воздуха врывается в культуральную среду через отверстия (сопла, форсунки) в центре дна аппарата, имеющего форму конуса. В этом случае биосинтез целевого продукта происходит преимущественно в пенном слое.

Аппараты с циркуляционным перемешиванием содержат устройства (насосы, эжекторы), создающие направленный ток жидкости по замкнутому контуру. Жидкость увлекает за собой пузырьки газа. Насос для циркуляции культуральной жидкости может соседствовать с барботером.

В аппаратах типа «падающей струи» культуральная жидкость по трубе, соединяющей дно биореактора с его верхней частью, подается с помощью насоса в сопла на крышке аппарата. Пузырьки воздуха захватываются жидкостью, струящейся сверху вниз в полости биореактора.

В аппаратах типа «погружной струи» насос перекачивает культуральную жидкость сверху вниз по внешней трубе, она врывается внутрь биореактора через сопло в дне аппарата. Воздух подсасывается через эжекторы в стенках внешней трубы.

Многие циркуляционные биореакторы, подобно пневматическим, разделены перфорированными перегородками на горизонтальные секции. Такая конструкция предпочтительна для анаэробных процессов. Перспективность аппаратов данного типа связана с их высокой надежностью и простотой. Поскольку жидкость и воздух часто подаются независимо в каждую из секций аппарата, он по существу эквивалентен целой системе биореакторов, поставленных друг на друга, что позволяет экономить производственные площади и обеспечивает возможность проведения многоэтапного процесса.

Аппараты циркуляционного типа часто заполняют твердыми частицами (насадкой) с целью улучшения перемешивания, а при длительном непрерывном культивировании они препятствуют обрастанию его стенок и способствуют диспергированию воздуха в жидкости.

Аэрация. В настоящее время разрабатываются новые способы аэрации. Так, предложен способ, при котором воздух подается через специальные полипропиленовые мембраны. Такой способ позволяет избежать пенообразования и хорошо себя зарекомендовал в биореакторах для культивирования клеток эукариот.

Эффективность аэрации может быть повышена с помощью переносчиков кислорода, добавляемых в среду культивирования. Механизм действия переносчиков кислорода различен:

а) переносчик принимает кислород при контакте с газовой фазой и отдает его в жидкую фазу;

б) переносчик принимает кислород из газовой фазы и отдает его непосредственно клетке;

в) переносчик принимает кислород в жидкой фазе и отдает его при контакте с клеткой.

Система теплообмена. Микроорганизмы могут эффективно расти в определенных температурных условиях, поэтому необходимо создать во всем объеме биореактора оптимальную температуру с помощью специальных устройств (специальных труб, по которым подается охлаждающий или нагревающий агент, оплетающих ферментер в виде рубашки или устанавливаемых внутри ферментеров в виде змеевика). Для охлаждения используют артезианскую воду или воду, пропущенную через охлаждающие агенты (фреоны и т.п.). В качестве нагревательных агентов используют пар и горячую воду.

Система пеногашения представляет собой специфическую аппаратную систему, характерную для биотехнологических процессов, т.к. их реализация сопровождается вспениванием культуральной жидкости в результате перемешивания. В некоторых случаях пенный слой благоприятен для культивирования, т.к. в этом случае он играет роль кислородного коктейля. Неблагоприятным явлением является избыточное пенообразование, т.к. при этом возможна микробная контаминация среды. В этой связи, пеногашение является средством борьбы с избыточным пенообразованием. Различают химический, механический, акустический и другие способы пеногашения.

Химические пеногасители – чаще всего ПАВ, которые, внедряясь в стенки пузырей воздуха, становятся центрами их неустойчивости. Пеногасящие вещества различаются по своей эффективности, которую можно оценить по уменьшению слоя пены при заданной концентрации пеногасителя. Остатки пенного слоя устраняются с большим трудом и требуют большого расхода пеногасителя, а это экономически невыгодно, тем более, что до известного предела пенообразование стимулирует рост культур. Пеногасители используют в небольшом количестве для обеспечения частичного гашения пены. В качестве химических пеногасителей используют: растительные масла, животные жиры, минеральные жиры. Однако, «коварство» пеногасителей этой группы заключается в том, что продукты их утилизации микробной культурой сами способствуют пенообразованию. Преимущество жиров состоит в совмещении ими двух функций: гашение пены и одновременно они являются ценными субстратами. Данные пеногасители довольно дорогие, поэтому на практике чаще используют синтетические пеногасители: силиконовые масла, полимерные многоатомные спирты, полиэферы.

Механические пеногасители – механические устройства разного типа (лопасти, диски и т.п.), сбивающие пену, которые обычно располагают по периметру в верхней части ферментера. К более сложным приспособлениям относятся сепараторы пены, использующиеся также при сборе биомассы, содержащейся в пенном слое. Применение таких устройств связано с дополнительными энергозатратами. В интересах их минимизации часто прибегают к совместному использованию механических и химических пеногасителей.

Система стерилизации – специфическая система, характерная для биотехнологических процессов. Различают следующие способы стерилизации: термический, химический, фильтрационный, радиационный.

Наибольшее значение имеют термический метод для стерилизации оборудования и сред, а также фильтрационный – для удаления микроорганизмов из поступающего в биореактор воздуха или другого газа. Для стерилизации сред и оборудования, как правило, используют влажную термическую обработку, обеспечивающую больший эффект по сравнению с нагреванием сухого биореактора. Чаще всего используют стерилизацию перегретым паром, вводимым под давлением в аппарат или генерируемым в биореакторе. Однако, если в состав питательной среды входят белоксодержащие компоненты, то она может пригорать к электронагревателю, размещенному в биореакторе, поэтому в этом случае аппарат следует стерилизовать с нагретой водой, а среду – отдельно.

Эффективность и быстрота уничтожения микрофлоры возрастают по мере повышения температуры. Высокая температура нагревающего агента обеспечивает быструю гибель термоустойчивых бактериальных спор. В то же время, по мере повышения температуры, ощутимо возрастают энергозатраты на стерилизацию, усиливается отрицательное влияние нагревания на качество сред. В этой связи, необходимо найти оптимальную температуру, при которой достигается высокая надежность стерилизации, и сводятся до минимума энергозатраты и порча стерилизуемого материала. Применение пара, подаваемого через змеевики без прямого контакта со средой, ограничивает эффективность стерилизации. Этот метод, как правило, используется при стерилизации неводных сред.

Нагревание вызывает химические превращения компонентов питательных сред. При 100 °С и выше карбонильные группы углеводов вступают во взаимодействие с ионами аммония или с аминогруппами аминокислот и белков. При этом образуются продукты, не утилизируемые клетками. Этот пример свидетельствует о необходимости в некоторых случаях отдельной стерилизации компонентов среды. Разложение ряда БАВ (витаминов и т.п.) вынуждает ограничивать время и температуру термической стерилизации соответствующих сред, а иногда и вовсе от нее отказаться. В этом случае применяют химические дезинфицирующие средства или фильтрационный метод. Хотя, следует учитывать, что фильтры быстро забиваются клетками микроорганизмов и другими взвешенными

частицами. Иногда химические изменения субстратов в процессе термической стерилизации положительно влияют на качество питательных сред.

Фильтрация воздуха или другого газа обычно обходится без частой смены фильтров, поскольку в них содержание взвешенных частиц меньше, чем в жидких средах. Из фильтров разных типов наиболее перспективны мембранные фильтры из тефлона с диаметром пор около 0,2 мкм. Такие фильтры эффективно задерживают частицы с размерами в 100 раз меньшими указанного диаметра пор, что связано в основном с броуновским движением частиц в воздухе, отклоняющим их от прямолинейной траектории, а это обуславливает высокую вероятность столкновения частиц со стенками пор и их адсорбцию на них. Вследствие этого фильтрация приводит к освобождению воздуха не только от бактерий и их спор, но и от бактериофагов и других вирусов.

3.4. Постферментационная стадия

Завершающей стадией любого биотехнологического процесса является выделение и очистка целевого продукта. Эта стадия существенно различается в зависимости от места накопления целевого продукта: в микроорганизме, на его поверхности или в культуральной жидкости.

В культуральной жидкости после окончания ферментации содержатся микроорганизмы, продукты их жизнедеятельности, остатки питательной среды, пеногаситель, растворимые и нерастворимые вещества.

Целевым продуктом биосинтеза могут быть непосредственно сами микроорганизмы, их метаболиты, растворенные в культуральной жидкости или находящиеся внутри клеток.

Во всех случаях для получения целевого продукта необходимо отделить взвешенную фазу (биомассу) от культуральной жидкости. Содержание микроорганизмов в культуральной жидкости, как правило, очень низкое. В 1 л содержится обычно 5–10 г сухой биомассы. Отделение такого количества взвешенной фазы является трудной технологической задачей, которую приходится решать путем концентрирования биомассы разными способами. При выборе схемы концентрирования и извлечения биомассы проводят предварительную экономическую оценку товарной формы биопрепаратов, концентрации микроорганизмов в культуральной жидкости и др. Часто выделить целевой продукт с помощью одного метода практически невозможно, поэтому, как правило, применяют комбинацию нескольких методов.

Операции выделения и очистки целевого продукта по технологическим признакам:

- ✓ отделение нерастворимых веществ;
- ✓ дезинтеграция микроорганизмов;
- ✓ выделение продуктов метаболического синтеза;
- ✓ первичная очистка;

- ✓ вторичная очистка и концентрирование;
- ✓ кристаллизация и стабилизация.

В большинстве случаев культуральная жидкость не может быть использована без дальнейшей обработки. Накопленный в ней целевой продукт необходимо сконцентрировать и выделить.

Количество ценных продуктов биосинтеза нестабильно и подвержено влиянию разных факторов. Так, ферменты чувствительны к нагреванию, изменениям значения рН, а также к другим физическим и химическим воздействиям. При получении биомассы (при производстве вакцин) одним из важнейших требований является максимально возможное сохранение числа клеток. В этой связи, при выборе метода выделения и очистки микроорганизмов и целевого продукта микробного синтеза необходимо учитывать следующие факторы:

- ✓ свойства культуральной жидкости (вязкость, значение рН, температура и др.);
- ✓ свойства выделяемого продукта (термолабильность, стабильность к различным химическим реагентам и др.);
- ✓ требования к конечной форме продукта (общая и биологическая концентрация, лекарственная форма, степень чистоты, степень концентрирования);
- ✓ технологические и технико-экономические показатели (выход продукта, производительность оборудования, необходимость дальнейшей обработки продукта, др.).

Все методы выделения и очистки микроорганизмов и продуктов биосинтеза подразделяют на 2 группы (в зависимости от того, находится выделяемое вещество в растворе или в виде твердой фазы).

I. Для целевого продукта в виде твердой фазы используют: осаждение, флотацию, фильтрование (микрофильтрацию, ультрафильтрацию), центрифугирование, сепарирование.

II. Для целевого продукта в растворенном виде используют: экстракцию, адсорбцию, кристаллизацию, диализ (обратный осмос), упаривание.

Часто невозможно выделить целевой продукт с помощью одного метода. В этом случае применяют комбинацию нескольких методов и в процессе выделения переводят продукт из растворимой формы в нерастворимую (или наоборот), иногда несколько раз.

Основные элементы постферментационной стадии выделения и очистки внутриклеточного продукта биотехнологического производства:

1. Отделение биомассы от культуральной жидкости (сепарация). Различают несколько способов сепарации: флотация (применяется в том случае, если клетки продуцента накапливаются в верхних слоях

биореактора), фильтрование с помощью фильтров разных конструкций) и центрифугирование.

2. Дезинтеграция. Разрушение клеток можно осуществлять физическими, химическими или физико-химическим методами. К физическим методам относятся: разрушение ультразвуком, вращающимися лопастями или вибраторами, встряхиванием со стеклянными бусами, продавливанием через узкое отверстие под давлением, размораживанием замороженной биомассы, растиранием в ступке, осмотическим шоком, попеременным замораживанием и оттаиванием, сжатием клеточной суспензии с резким уменьшением давлением (компрессия – декомпрессия). Для физических методов дезинтеграции характерна высокая экономичность. Химическая дезинтеграция связана с разрушением клетки под действием таких веществ, как ферменты, ПАВ (ЭДТА и др.), бутанол, толуол. При этом следует отметить, что в сравнении со спиртами более эффективное дезинтегрирующее воздействие оказывают ферменты. Кроме того, клеточная стенка может быть разрушена за счет ее обработки антибиотиками.

3. Отделение клеточной стенки от гомогената производится путем центрифугирования или фильтрования.

4. Отделение и очистка целевого продукта проводится после отделения клеточной стенки. Культуральная жидкость или гомогенат (в зависимости от места локализации целевого продукта) направляют на очистку с целью получения целевого продукта. При этом очистка может осуществляться следующими способами: осаждением (перевод целевого продукта в малорастворимое или нерастворимое состояние), экстракцией (твердо-жидкофазная и жидко-жидкофазная) или адсорбцией (электрофорез, электрофокусировка, хроматография).

5. Концентрирование целевого продукта. Необходимость проведения данной стадии обусловлена тем, что целевой продукт после очистки находится в сильно разбавленном состоянии. Основными способами его концентрирования являются: обратный осмос, ультрафильтрация или выпаривание.

6. Обезвоживание (сушка) целевого продукта. В связи со значительным разнообразием методов сушки, выбор наиболее оптимального (в каждом конкретном случае) зависит физико-химических свойств целевого продукта: вязкости, термической устойчивости и др. На практике наиболее часто применяют следующие способы сушки: сушка на подносах, сушка с помощью сушилок (ленточных, барабанных и др.) и т.п.

7. Хранение целевого продукта. Высушенному целевому продукту придают необходимые товарные качества (в том числе при необходимости производят его химическую модификацию) и направляют на хранение.

8. Стабилизация целевого продукта направлена на сохранение его ценных свойств в период хранения или при использовании. Выделяют разные способы стабилизации: лиофильную сушку, высушивание на воздухе (на активированном угле, агар-агаре, шерстяных нитках и др.), хранение в виде спор (для спорообразующих микроорганизмов), криоконсервация

(замораживание осуществляют жидким азотом, хранение – в криобанках при температуре $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$, при этом за счет резкого охлаждения затормаживаются все биохимические процессы, т.е. наступает состояние близкое к анабиозу) и комбинированные методы хранения.

7. Контроль биотехнологических процессов

Важной составляющей любого биотехнологического производства является осуществление строгого контроля за реализацией каждого этапа получения целевого продукта. В этой связи, контроль осуществляется, начиная с этапа приготовления и стерилизации питательной среды и подготовки культуры продуцента, и заканчивая стабилизацией и хранением готового продукта. При этом проводится постоянный контроль свойств штамма продуцента, его роста и развития на соответствующей питательной среде, а также контроль за условиями хранения целевого продукта. Для проведения контроля на каждом этапе биотехнологического производства используется современное эффективное аналитическое оборудование.

Важнейшими элементами любого биотехнологического процесса являются автоматическое измерение, контроль и регулирование основных параметров. Чем больше количество измеряемых параметров, тем обширнее информация об изучаемых процессах. В масштабах производства, где требуется наивысшая скорость образования целевого высококачественного продукта, необходимо использовать точные и надежные системы контроля и регулирования, поддерживающие условия ведения процессов в диапазонах, максимально близких к оптимальным. Основные параметры биотехнологических процессов представлены в табл. 2.

Параметры биотехнологического процесса

Физические параметры	Биофизические параметры
Температура (t , °C)	Концентрация водородных ионов (pH)
Давление (P , атм.)	Окислительно-восстановительный потенциал (eH, мв)
Вакуум (V , мм рт. ст.)	Концентрация кислорода в газе (O_2 , %)
Мощность (N , кВт)	Концентрация углекислого газа в газе (CO_2 , %)
Скорость вращения мешалки (n , об./мин.)	Парциальное давление кислорода в жидкости (pO_2 , мм рт. ст.)
Скорость расхода (потока) газа ($Gг$, л/мин.)	Парциальное давление углекислого газа в жидкости (pCO_2 , мм рт. ст.)
Скорость расхода (потока) жидкости ($Gж$, л/мин.)	Концентрация углеводов (глюкозы) (Гл, мл/л)
Скорость расхода твердого вещества ($Gф$, кг/мин.)	Содержание общего азота (N_2 , мг/%)
Вязкость жидкости (μ , Пуаз)	Содержание амминного азота (AN_2 , мг/%)
Плотность жидкости (ρ , кг/м ³)	Содержание аминокислот (АА, мг/%)
Объем биореактора (V , м ³)	Концентрация микроорганизмов (С, млрд./мл)
Высота жидкости в аппарате (H_0 , м)	Интенсивность пенообразования (Пе)
Оптическая плотность жидкости ($D_{опт}$, кл)	
Относительная влажность (ϕ , %)	

Основные параметры контроля и регулирования по линиям и стадиям биотехнологических процессов приведены в табл. 3.

Таблица 3

Параметры контроля и регулирования технологических линий производства биопрепаратов

Технологическая линия, стадия, этап	Параметры контроля и регулирования																				
	t °С	P	GГ	GЖ	Gт	pH	eH	H	n	pO ₂	pCO ₂	O ₂	CO ₂	Пе	Гл	С	*М	ц	*П	с	
Очистка и стерилизация воздуха	+	+	+																+	+	
Приготовление питательных сред	+	+		+		+	+	+	+												
Культивирование микроорганизмов	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
Очистка, разделение, эмульгирование, осаждение, инактивация	+	+		+				+	+												
Культивирование клеток и вирусов	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				+
Производство адьюванта (ГОА)	+	+	+	+	+	+	+	+	+											+	
Производство сывороток	+	+		+					+												
Производство глобулинов	+	+		+		+		+													
Консервирование биопрепаратов	+	+																			

Условные обозначения: * - разрабатываемые технические средства автоматизации; + - необходимость контроля и регулирования

Для того, чтобы процесс ферментации сделать управляемым, оператор должен постоянно получать информацию о развитии биообъекта и динамике изменения среды культивирования. Важнейшими показателями процесса ферментации являются содержание биомассы, субстрата, продукта и отсутствие посторонней микрофлоры. Физическое состояние продуцента характеризуют: удельная скорость роста, его морфологическое состояние и ряд биохимических показателей.

Большинство химических показателей определяют в периодически отобранной пробе, физические показатели – непрерывно при помощи вмонтированных в ферментер датчиков. Для определения величины рН и растворенного кислорода применяют стерилизуемые электроды, вмонтированные в ферментер. Для определения растворенного кислорода чаще всего применяют амперметрические, серебряно-свинцовые или серебряно-золотые электроды.

Современный биотехнологический процесс немислим без применения компьютеров для управления процессом ферментации: поддержание оптимального значения рН, температуры, степени пенообразования, частоты

вращения мешалки, количества растворимого кислорода, скорости подачи субстрата и т.п.