

## Занятие семинарского типа № 4

**ТЕМА ЗАНЯТИЯ:** Структура биотехнологического производства витаминных препаратов

### УЧЕБНЫЙ МАТЕРИАЛ

#### **1. Технологические особенности биосинтеза биологически активных веществ**

В основе технологии биосинтеза биологически активных веществ (БАВ) главными компонентами являются биологические объекты (продуценты): вирусы, грибы, растительные или животные клетки, биомолекулы, обладающие различными физиологическими свойствами.

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

#### **1.1. Принципы микробиологического синтеза биологически активных веществ**

Принципы микробиологического синтеза БАВ основываются на:

- ✓ принадлежности биологических объектов к надцарствам живых существ (акариот, прокариот, эукариот);
- ✓ функциональной активности биообъекта (биосинтез, биотрансформация, биodeградация);
- ✓ возможности вычленения отдельных этапов из биотехнологических схем производства в виде самостоятельных процессов (подготовка питательных сред и оборудования, ферментация, стерилизация сред и оборудования).

К основным преимуществам микробиотехнологии относятся:

- ✓ простота организации генома;
- ✓ легкая приспособляемость (лабильность) к среде обитания в естественных и искусственных условиях;
- ✓ достаточно высокие скорости протекания ферментативных реакций при низких температурах (20–60 °С) и нарастания клеточной массы;
- ✓ возможность использования недефицитного, доступного и экономичного сырья (отходы производства, сточные воды и т.п.).

К недостаткам технологии микробного синтеза БАВ относятся:

- ✓ многокомпонентность питательных сред;
- ✓ необходимость стерилизации питательных сред, оборудования и коммуникаций для удаления или разрушения контаминантов при сохранении качества питательной среды;
- ✓ трудности в управлении процессом биосинтеза и автоматизации.

Это связано с процессами саморегуляции биологических объектов (включая способность к мутации), которые могут привести к непредвиденному изменению биотехнологического процесса.

В процессе размножения и развития происходит постоянное изменение отдельных параметров, и в каждый момент времени клетки функционируют в новых условиях. В связи с этим, при управлении технологическим процессом биосинтеза БАВ следует учитывать индивидуальные особенности «поведенческих реакций» биологического объекта в конкретных условиях его культивирования: его чувствительность к воздействию физико-механических факторов при перемешивании, а также знание химической природы синтезируемого БАВ, характера биохимических процессов, осуществляемых биообъектами, специфику наследственных свойств данного вида.

## **1.2. Основные технологические показатели биосинтеза биологически активных веществ**

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

К параметрам контроля процесса культивирования биологических объектов, представляющим собой основные технологические показатели биосинтеза БАВ, относятся:

- ✓ температура;
- ✓ значение рН среды;
- ✓ количество биомассы клеток;
- ✓ скорость потребления источников питания;
- ✓ количество растворенного кислорода (в случае аэробных биообъектов);
- ✓ количество образующегося метаболита.

## **1.3. Технологические стадии биотехнологического производства биологически активных веществ**

К основным технологическим стадиям биосинтеза БАВ относятся:

- ✓ предферментационная стадия (подготовительные работы);
- ✓ ферментация (биосинтез целевого продукта);

✓ постферментационная стадия (выделение и химическая очистка целевого продукта).

## **Предферментационная стадия**

Предферментационная стадия включает в себя подготовительные стадии вплоть до биосинтеза БАВ (целевого продукта):

- 1) приготовление и подготовка питательной среды;
- 2) получение и подготовка посевного материала;
- 3) выбор и подготовка оборудования.

Одним из основных элементов в подготовке оборудования, питательных сред и посевного материала является их стерилизация. В частности, стерилизации подлежат пеногасители, жидкие добавки, коммуникации и датчики. Необходимость стерилизации обусловлена тем, что микроорганизмы-контаминанты не только могут подавить функциональное развитие биологического объекта в силу конкуренции и антибиоза, но и дезорганизовать отдельные ткани или среду выращивания. Кроме того, некоторые из них способны продуцировать токсичные вещества, которые могут попасть в целевой продукт.

В производственных условиях источниками микроорганизмов-контаминантов могут быть почва, вода, окружающий воздух и люди.

Наличие в воздухе частиц пыли или капелек влаги создает благоприятный условия для жизнедеятельности микроорганизмов.

По степени загрязненности воздуха микроорганизмами и механическими частицами из расчета на 1 м<sup>3</sup> производственного помещения, в которых производятся лекарственные препараты, классифицируют на четыре класса чистоты.

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

В лабораторных условиях стерилизацию питательных сред и других объектов осуществляют в автоклавах насыщенным паром при температуре  $120 \pm 2$  °С под давлением не менее 0,3 МПа или холодным способом.

Датчики измерительных приборов и регуляторов, как правило, не выдерживают воздействия высоких температур при стерилизации, поэтому к ним применяют холодные или химические способы стерилизации. С этой целью используют бактерицидные газы (этилен), растворы антисептиков (формалин и др.).

Сахаросодержащие материалы стерилизуют отдельно от других компонентов питательной среды в мягких (щадящих) условиях во избежание реакций меланоидирования, гумификации, карамелизации, реверсии, кислотного разложения.

Для контроля эффективности стерилизации вводится критерий стерильности – время выдержки или длительностью экспозиции. Под данным термином понимают интервал, в пределах которого погибают микроорганизмы.

Гибель последних спор в среде является случайным процессом, поэтому введено понятие «критерий стерильности» ( $N$ ), т.е. отношение числа операций стерилизации, в результате которых выжили по одной термостойкой споре к общему числу проведенных операций.

Для стерилизации питательных сред принимают критерий стерильности, равный  $0,01 \pm 0,001$ . В случае, если исходное количество спор в среде принять за  $N_0$ , то получим соотношение  $N/N_0$  – уровень стерильности или коэффициент выживания, означающий, что для достижения заданного критерия стерильности (например, 0,01) среда должна выдерживаться при температуре стерилизации строго определенное время для того, чтобы популяция спор уменьшилась от исходного значения  $N_0$  до  $N/N_0$  (например, до 10–16).

### **Технология подготовки питательных сред**

Понятие "питательная среда" или среда культивирования включает качественный и количественный состав исходных компонентов, необходимых для реализации процессов энергетического обмена в клетке.

В состав питательных сред для развития культуры продуцента и биосинтеза БАВ входят такие компоненты, как: углерод, азот, фосфор, микроэлементы, витамины, минеральные соли, ростовые вещества и т.п.

Процесс приготовления питательных сред включает выбор компонентов питания, необходимых продуцентам БАВ для их воспроизводства и биотрансформации. Подбор состава питательной среды осуществляется эмпирически, продолжителен по времени и требует определенных навыков.

В составе питательной среды, как правило, представлены: углерод, водород, кислород, азот, фосфор, сера, калий, кальций, магний, железо, микроэлементы. Кроме того, для развития некоторых продуцентов БАВ необходимы витамины и регуляторы роста.

Состав питательных сред подбирают, исходя из материального баланса с учетом трансформации разных элементов питания и расходуемой (выделяемой) энергии.

При этом следует соблюдать правило разработки оптимального состава питательных сред: для получения заданного количества биомассы компоненты питательной среды берутся в соотношениях, пропорциональных потребностям в них культур (1):

$$C_i/A_i = \dots C_2/A_2 = C_1/A_1 = S_0, \quad (1)$$

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

$A_i$  – коэффициент метаболизма культуры по  $i$ -му компоненту;

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

По своему назначению питательные среды классифицируют на диагностические и производственные.

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

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

*Среды обогащения* предназначены для преимущественного накопления одной группы микроорганизмов при одновременной задержке роста сопутствующих видов.

*Дифференциально-диагностические среды* предназначены для идентификации отдельных видов микроорганизмов.

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

*Натуральные среды* состоят из природных соединений, продуктов животного или растительного происхождения. Они содержат все необходимые компоненты для роста и развития микроорганизмов. Однако, вследствие сложности и неопределенности их химического состава трудно оценить влияние отдельных компонентов на механизм биосинтеза БАВ. В производстве натуральные среды используют для поддержания развития микроорганизмов, накопления биомассы, а также для диагностических целей.

*Синтетические среды* удобны для изучения обмена веществ.

Благодаря сложной ферментативной организации микроорганизмов из простых составляющих сред культивирования осуществляется биосинтез сложных БАВ.

Среди натуральных сред широкое применение нашли: меласса (отход свеклосахарного производства), кукурузный экстракт, отруби и др. в качестве источника углерода.

Жидкие питательные среды изготавливают в аппаратах, снабженных мешалкой, в которые загружают компоненты в определенной последовательности (согласно технологическому регламенту).

При биотехнологическом производстве витаминных препаратов для каждого продуцента разрабатывается оптимальная по составу питательная среда. При этом питательная среда должна соответствовать определенным требованиям:

- а) обеспечивать максимальный выход целевого продукта (витамина и т.п.);
- б) состоять из доступных и экономичных компонентов;
- в) иметь хорошую фильтрующую способность;

г) обеспечивать применение наиболее экономичных приемов выделения и очистки целевого продукта (витамина и т.п.).

Стерилизация питательных сред в условиях промышленного биотехнологического производства в основном осуществляется двумя методами: периодическим и непрерывным.

Периодический метод стерилизации применяется при использовании небольших объемов питательной среды и состоит в том, что среда нагревается до температуры 120–130 °С непосредственно в ферментерах или в специальных котлах-стерилизаторах, выдерживается при данной температуре в течение 30–60 мин (в зависимости от объема и состава среды), затем охлаждается до температуры 27–30 °С.

За период времени, затрачиваемый на нагрев питательной среды до температуры, необходимой для стерилизации, и ее охлаждение, в ней происходит уничтожение микроорганизмов. Известно, что для нагревания больших объемов среды до температуры стерилизации и затем ее охлаждения требуется больше времени, чем для небольших объемов, поэтому время, затрачиваемое на поддержание наиболее высокой стерилизующей температуры в больших объемах, может быть меньшим, чем для небольших объемов с тем же эффектом стерилизации.

Высокая эффективность стерилизации и сохранение термолабильных веществ в среде достигаются в том случае, если стерилизацию проводят при более высокой температуре в течение непродолжительного времени.

Непрерывный метод стерилизации целесообразно применять в случае больших объемов питательной среды. Приготовленная среда из специального реактора с помощью насоса направляется в стерилизационную колонку, через которую пропускают острый пар под давлением (505 Па). Пар подают сверху по внутренней трубе, имеющей щелевидные прорезы, благодаря чему он поступает в среду, быстро ее нагревая. Среда в колонку поступает снизу и движется по спирали вокруг внутренней трубы.

Среда, нагретая в колонке до необходимой для стерилизации температуры (около 130 °С), поступает в специальный аппарат, в котором она выдерживается в течение определенного времени при температуре 125–130 °С. При этом время выдерживания зависит от состава питательной среды и составляет около 5–10 мин. Затем стерильная среда подается в змеевиковый холодильник, охлаждается до температуры 30–35 °С (на выходе) и поступает в ферментер.

Непрерывный метод стерилизации отличается рядом преимуществ:

- ✓ возможностью автоматического регулирования процесса;
- ✓ быстрым и равномерным нагревом питательной среды;
- ✓ обеспечением более полной стерильности среды и др.

При применении в качестве отдельных компонентов питательного субстрата термолабильных веществ, как правило, их стерилизуют отдельно в условиях более мягкого режима.

## Технология подготовки посевного материала

Подготовка посевного материала состоит из лабораторного и производственного этапов.

Лабораторный этап заключается в приготовлении рабочего посевного материала. С этой целью исходный штамм микроорганизма, сохраняемый в состоянии анабиоза (путем высушивания на стерильной почве, песке, пшенице лиофилизации или сублимационной сушки) оживляют добавлением стерильной жидкой питательной среды, а затем высевают на уплотненную питательную среду и проверяют чистоту культуры. После оживления, т.е. перевода консервированной культуры на косяк, осуществляют пересев штамма на питательную среду возрастающих объемов, постепенно переходя от пробирок к колбам (емкостью 1 л) и бутылкам (емкостью 20 л). При этом следует соблюдать соотношение посевного и рабочего объемов – 1:10. Коэффициент заполнения емкостей не должен превышать 0,5–0,6.

Лиофилизация культур осуществляется путем быстрого замораживания (от -40 до -60 °С) суспензии клеток или спор микроорганизма, приготовленной на питательной среде, богатой белками (сыворотка крови), с последующим высушиванием под вакуумом до остаточной влажности (0,5–0,7%). После такой обработки ампулы со спорами и клетками лиофилизированного микроорганизма запаивают. Данный метод пригоден, как для спорообразующих, так и для бесспорных культур микроорганизмов. Лиофилизированные формы бактерий могут сохраняться в течение 16-18 лет, а споры грибов – в течение 10 лет, не теряя основных свойств.

Производственный этап. Дальнейшую подготовку посевного материала осуществляют в инокуляторах, в которых наращивают посевной материал. При этом одноклеточные культуры доводят до середины логарифмической фазы роста (когда клетки делятся синхронно). Рабочую культуру подают в инокулятор, заполненный стерильной питательной средой, из расчета 8–10% к объему среды.

Во избежание утечки посевного материала в инокуляторах и биореакторах следует поддерживать избыточное давление.

Инокуляторы должны отвечать следующим основным требованиям: конструктивная простота, удобство и надежность эксплуатации.

Посевные аппараты отечественного производства имеют объем 10, 5, 2 и 0,63 м<sup>3</sup>, диаметр от 0,9 до 2 м и частоту вращения мешалки от 180 до 270 об./мин.

Общий объем ферментатора заполняют инокулированной питательной средой на 70–80%, а 20–30% объема заполняют газами (инертным – для анаэробов, воздухом – для аэробов).

Микроорганизмы в виде суспензии определенной плотности подают из инокулятора(-ов) в промышленный биореактор (ферментер), в котором содержится стерильная жидкая питательная среда. При этом должно быть исключено попадание посторонней микрофлоры в питательную среду вместе с

продуцентом. В этой связи, все соединения системы должны быть герметично закрыты.

Для реализации процесса в асептических условиях необходимо введение дополнительных стадий, обеспечивающих стерилизацию питательных сред и воздуха, подаваемого в ферментер.

Стерильную среду засевают с соблюдением правил асептики через специальное устройство посевным материалом, выращенным в лаборатории, поддерживая оптимальный для развития культуры продуцента режим (температуру, аэрацию, перемешивание и т.п.).

После достижения нужной стадии развития и количества биомассы посевной материал перемещают с помощью стерильного сжатого воздуха по посевному коллектору в инокулятор большей вместимости.

На второй ступени выращивания посевного материала стремятся получить большее количество биомассы клеток для того, чтобы в ферментере можно было создать необходимую для данного штамма продуцента исходную плотность популяции. В случае, когда данное требование выполнимо без второй ступени, то ферментационную среду засевают непосредственно из инокулятора.

Все ферментаторы цеха соединены между собой несколькими коллекторами:

- посевным коллектором, благодаря которому можно засеивать питательную среду в любом ферментере из любого посевного аппарата;
- коллектором подачи стерильной питательной среды;
- коллектором подвода стерильного сжатого воздуха к индивидуальным фильтрам;
- коллектором отработанного воздуха, выходящего из ферментера;
- коллектором перекачивания культуральной жидкости из ферментера.

В случае проведения ферментаций в нестерильных условиях питательную среду и воздух для аэрации не стерилизуют, но посевной материал всегда выращивают на стерильных питательных средах в асептических условиях.

Требования к промышленным штаммам продуцентам БАВ:

- ✓ стабильность структурно-морфологических признаков и физиологической активности при длительном хранении и эксплуатации в производстве;
- ✓ повышенные скорости роста и биосинтеза целевых продуктов в лабораторных и производственных условиях;
- ✓ широкий диапазон устойчивости к воздействию неблагоприятных внешних факторов – изменению температуры, значения рН среды, аэрации, перемешиванию, вязкости среды;
- ✓ умеренная требовательность к ограниченному числу источников питания.

## **Ферментация**

Стадия ферментации реализуется в производственных биореакторах. В процессе ферментации необходимо использование стерильных питательных сред, воздуха и биореакторов, выбор которых обусловлен общими требованиями биологических объектов.

Ферментацию следует осуществлять в герметизированных биореакторах во избежание рассеивания биологического объекта во внешнюю среду.

К основным принципам технического оснащения биопроизводств относятся:

- ✓ конструкционное совершенство и универсальность биореакторов;
- ✓ инертность или коррозионная стойкость материалов биореакторов и другого технологического оборудования, вмещающих биообъект или продукты его метаболизма;
- ✓ эксплуатационная надежность технологического оборудования;
- ✓ доступность, эстетичность, легкость обслуживания, замены, смазки, чистки, обработки антисептиками.

## **Аппаратурное оформление биотехнологических производств**

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

К общим показателям биологических объектов в процессе биосинтеза БАВ относятся:

- ✓ уровень структурной организации;
- ✓ способность к размножению или репродукции;
- ✓ наличие или отсутствие собственного метаболизма при культивировании.

Бактерии и грибы выращивают в однотипных биореакторах, имеющих однотипную обвязку, включающую: ферментер, стерильный многокорпусный вентиль для подачи питательной среды, посевного материала, подпитки и пр., системы регулирования значения рН, температуры, подачи пеногасителя, системы контроля расхода воздуха, пробоотборник, электродвигатель.

Конструкции ферментеров для культивирования микроорганизмов – продуцентов БАВ можно разделить на два типа: без подводки стерильного воздуха (для анаэробов) и с подводкой стерильного воздуха (для анаэробов).

Размеры ферментеров определяются соотношением внешнего диаметра к высоте 1:2 до 1:6.

Ферментеры классифицируют по способу ввода в аппарат энергии для перемешивания:

- газовой фазой (ГФ);

- жидкой фазой (ФЖ);
- газовой и жидкой фазами (ФЖГ).

Ферментеры периодического действия из групп ФЖГ применяют с 1944 г. в промышленном производстве витаминов, антибиотиков и других ценных БАВ. Их конструкция обеспечивает стерильность ферментации в течение длительного времени (до нескольких суток) при оптимальных условиях для роста и жизнедеятельности культуры продуцента.

Ферментеры такой конструкции изготавливают на 1,25; 2,0; 2,5; 3,2; 4,0; 5,0; 6,3; 10,0; 16,0; 20,0; 32,0; 50,0; 63,0; 100,0 и 160,0 м<sup>3</sup>.

Данный тип ферментера представляет собой цилиндрический вертикальный аппарат со сферическим днищем, снабженный аэрирующим, перемешивающим и теплопередающим устройствами. Воздух для аэрации поступает в такой ферментер через барботер, установленный под нижним ярусом мешалки.

При использовании ферментера группы ФГ с эрлифтом проще поддерживать асептические условия без механического перемешивания. К недостаткам ферментеров данной группы относится низкая интенсивность массообмена по кислороду.

Воздух для аэрации среды подается по трубе, расположенной вертикально в ферментере. Аэратор, конструкция которого обеспечивает вихревое движение выходящего воздуха, расположен в нижней части диффузора и насыщает питательную среду воздухом. Газожидкостная смесь поднимается по диффузору и перемешивается через его верхние края. В этой же зоне часть воздуха уходит из аппарата, а более плотная среда опускается вниз в кольцевом пространстве между корпусом ферментера и диффузором. Так происходит многократная циркуляция среды в ферментере.

Для отвода биологического тепла внутри ферментера установлен змеевик, кроме того, аппарат снабжен секционной рубашкой.

Широкое распространение на биотехнологических предприятиях получили ферментеры с самовсасывающими мешалками группы ФЖ. В частности, для выращивания чистой культуры дрожжей созданы ферментеры вместимостью 0,32; 3,2 и 50 м<sup>3</sup>. Такой ферментер представляет собой вертикальный цилиндрический аппарат, снабженный циркуляционными, теплообменными и аэрирующими устройствами. В качестве циркуляционных устройств использованы системы направляющих диффузоров, разграничивающих восходящие и нисходящие потоки. Теплообменные устройства выполнены в виде трубок, установленных в трубных решетках диффузоров.

Вместимость такого ферментера составляет 800 м<sup>3</sup> (рабочий объем 320 м<sup>3</sup>). Данный аппарат разделен на 12 секций. При этом ферментационная среда последовательно проходит все секции, а из последней выходит культуральная жидкость с максимальной концентрацией биомассы. В каждой секции установлены перемешивающие и аэрирующие устройства и змеевики для отвода тепла.

В последние годы апробированы мембранные биореакторы, биореакторы с полыми волокнами и некоторые другие перспективные конструкции аппаратов.

При расчете и конструировании биореакторов следует учитывать время протекания разных биологических процессов у представителей различных групп организмов.

### **Управление технологическими процессами биосинтеза БАВ**

Биосинтез целевого продукта в ферментере происходит при заданных значениях температурного режима, аэрации, перемешивании и рН культуральной жидкости. При этом величину рН обычно регулируют периодической подачей аммиачной воды через барботер ферментера.

Аэрация жидкости способствует пенообразованию, снижающему качество ферментации, поэтому используют пеногашение механическое (установка в верхней части ферментера специальной дополнительной мешалки) или физико-химическое (использование ПАВ для снижения поверхностного натяжения на границе раздела фаз газ – жидкость).

Длительность ферментации зависит от природы используемых биологических объектов, особенностей их развития и строения.

Для поддержания постоянства концентраций отдельных компонентов питательной среды их подают в виде стерильных растворов по команде автоматизированной системы управления (АСУ) с определенной скоростью и периодичностью в ферментер из специальных аппаратов.

### **Постферментационная стадия**

После завершения стадии ферментации отделяют клетки (клеточную массу) или культуральную жидкость, в которой содержится целевой продукт – БАВ. В первом случае отходом является культуральная жидкость, во втором – плотная часть (биомасса).

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

Содержание биомассы в культуральной жидкости достигает 8–10%.

Концентрация целевого продукта чаще всего не превышает 1,5%, что составляет менее 10% сухого остатка.

#### **1.4. Отходы биотехнологических производств, их обезвреживание и утилизация**

Отходы биотехнологических производств относятся к типу разлагающихся в природных условиях под действием биологических, химических и физико-химических факторов.

К плотным отходам относятся: микробная биомасса, шламы, растительная биомасса после экстракции, тканевые культуры животных, осадок сточных вод (ил).

Все отходы биотехнологических производств подлежат анализу на содержание патогенной микрофлоры.

При этом нетоксичные сухие остатки используются в качестве кормовых добавок, для приготовления компоста, получения биогаза при метановом брожении. При метановом брожении почти все органические вещества (кроме лигнина) с помощью микроорганизмов трансформируются до метана и углекислоты. Метан используют в виде топлива, углекислоту – в виде сухого льда. Плотный осадок, оставшийся после брожения, представляет собой органическую субстанцию, содержащую гумусовые вещества, которые используют в качестве органического удобрения.

Жидкие отходы биотехнологических предприятий могут содержать как неорганические, так и органические примеси вследствие неполного использования продуцентами питательной среды. Данные отходы могут накапливаться на стадии подготовки сырья (мойка), и попадать в воду.

Органические вещества жидких отходов обезвреживают с помощью микроорганизмов. Нитраты обезвреживают с помощью бактерий-нитрификаторов. Соли фосфора осаждают химическими реактивами.

Жидкие отходы подлежат очистке для сохранения равновесия в водоемах, так как они могут содержать масла и жиры, используемые для пеногашения, снижающие поступление кислорода в водоем. В свою очередь, нарушение кислородного баланса в природных водоемах приводит к конкуренции среди видов (подавление одного вида другими).

Газообразные отходы биотехнологических производств включают отработанный воздух, в котором могут присутствовать болезнетворные микроорганизмы, а также углекислый газ, образующийся при сбраживании углеводов и дыхании биологических объектов.

При этом углекислый газ улавливается и утилизируется в хладагент, который используется в пищевом производстве.

Отработанный воздух подвергается обязательной очистке.

## 2. Структура биотехнологического производства витаминных препаратов

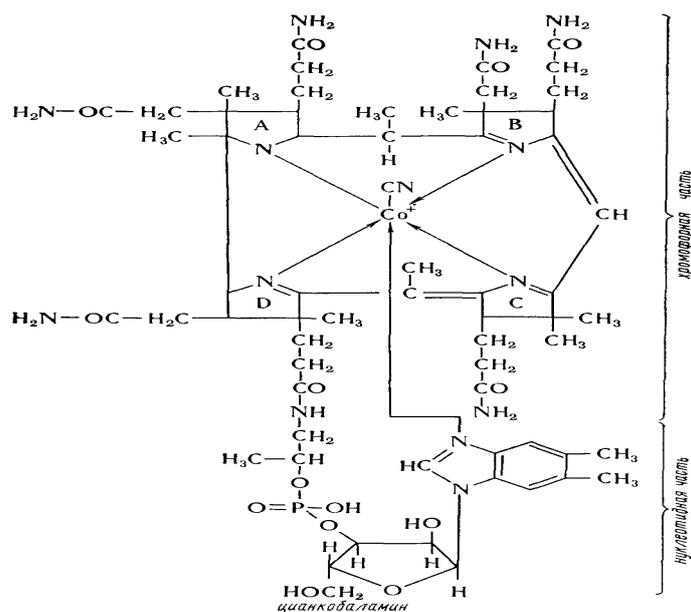
### Структура биотехнологического производства витамина В<sub>12</sub>

Витамин В<sub>12</sub> ( $\alpha$ -5,6-диметилбензимидазолцианкобаламин) представлен группой БАВ, содержащих в своем составе трехвалентный кобальт, аминные и цианистые группировки, которые могут быть замещены другими радикалами: –ОН-, Cl-, Br-.

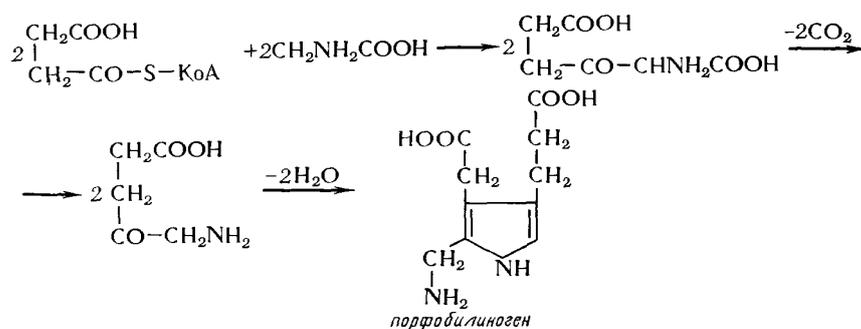
Витамин В<sub>12</sub> представляет собой полимер сложного строения, являющийся гематопоэтическим и ростовым фактором для многих животных и микроорганизмов.

Витамин В<sub>12</sub> открыт в 1948 г. одновременно в США и Англии.

В 1972 г. в Гарвардском университете осуществлен химический синтез корриноидного предшественника витамина В<sub>12</sub>. Химический синтез корнестерона – структурного элемента корринового кольца витамина В<sub>12</sub>, включающей 37 стадий, в крупных масштабах не воспроизведен из-за сложности технологического процесса.



Биосинтез цианкобаламина у микроорганизмов проходит в несколько этапов. Образование сходного с порфиринами гетероцикла начинается конденсацией глицина с производными образующейся в цикле Кребса янтарной кислоты – сукцинилкоферментом А. При этом образуется  $\alpha$ -амино- $\beta$ -кетoadипиновая кислота, которая, декарбоксилируясь, образует  $\delta$ -аминолевулиновую кислоту. При конденсации двух молекул данного соединения образуется производное пиррола – порфобилиноген.



Из порфирилиногена образуются гетероциклы витамина В<sub>12</sub>.

Донором метильных групп при образовании молекулы витамина В<sub>12</sub> является метионин.

Витамин В<sub>12</sub> хорошо растворим в воде, спиртах, низших органических кислотах жирного ряда и фенолах; не растворяется в бензоле, хлороформе и ацетоне. На свету он теряет свою активность, но в темноте может храниться долго и представляет собой очень устойчивое вещество.

Витамин В<sub>12</sub> оптически активен.

Витамин В<sub>12</sub> стимулирует образование крови в костном мозге, улучшает усвоение белков, участвует в биосинтезе аминокислот и азотистых оснований, регулирует углеводный и липидный обмен.

Витамин В<sub>12</sub> не содержится в продуктах растительного происхождения. Исключение составляют лишь несколько видов высших растений: горох, фасоль, побеги бамбука, причем его происхождение в этих растениях окончательно не установлено.

При недостатке витамина В<sub>12</sub> нарушается нормальное кроветворение в костном мозге, что приводит к злокачественной анемии, поэтому данный витамин называется антианемическим.

Кроме того, при его недостатке возможно возникновение и развитие дегенеративных изменений в нервной ткани.

Витамин В<sub>12</sub> применяется в медицине для лечения злокачественной анемии, железодефицитных анемий, апластических анемий, лучевой болезни, заболеваний печени, полиневрита, болезни Дауна, детского церебрального паралича и т.п.

Организм животных не способен к самостоятельному биосинтезу витамина. Его недостаток тормозит рост животных и приводит к серьезным заболеваниям. Добавление данного витамина к кормам для животных способствует более полноценному усвоению растительных белков и повышает продуктивность сельскохозяйственных животных на 10–15%. В частности, для целей животноводства отечественной промышленностью выпускается кормовой концентрат витамина В<sub>12</sub> (КМВ-12), который по своей эффективности не уступает кристаллическому препарату витамина, однако является более экономичным и доступным для широкого использования в области сельского хозяйства.

Учитывая важную роль витамина В<sub>12</sub> в организме человека, его мировое производство достигло 10 т в год, из которых 6,5 т расходуется на медицинские нужды, а 3,5 т – в животноводстве.

Для медицинских целей субстанцию витамина В<sub>12</sub> получают в виде кристаллического темно-красного порошка, содержащего не менее 99% основного вещества. Из данной субстанции готовят различные лекарственные формы, из которых наиболее широкое применение находят цианкобаламин в изотоническом растворе натрия хлорида для инъекций, а также таблетки, содержащие цианкобаламин и фолиевую кислоту.

Первоначально витамин В<sub>12</sub> получали исключительно из природного сырья, однако, например, из 1 т печени выделяли всего лишь 15 мг витамина. В этой связи, единственным способом крупнотоннажного производства цианкобаламина является микробиологический синтез.

Обнаружение витамина В<sub>12</sub> в качестве побочного продукта при биотехнологическом производстве антибиотиков стимулировало поиск микроорганизмов-продуцентов витамина В<sub>12</sub> и изучение путей его образования. Однако механизмы регуляции биосинтеза витамина В<sub>12</sub> до настоящего времени полностью не расшифрованы.

При высоких концентрациях витамин В<sub>12</sub> полностью репрессирует биосинтез ключевых ферментов своего новообразования.

Продуцентами витамина В<sub>12</sub> при его промышленном биотехнологическом производстве служат актиномицеты, метанобразующие и фотосинтезирующие бактерии, одноклеточные водоросли.

В 70-х гг. XX в. интерес ученых привлекли пропионовокислые бактерии, известные еще с 1906 г. и широко применяющиеся в технологии изготовления препаратов для животноводства и ветеринарии. В настоящее время выделено 14 видов пропионовокислых бактерий, продуцирующих витамин В<sub>12</sub>; их физиолого-биохимическая характеристика дана Л.И. Воробьёвой.

Природные штаммы пропионовокислых бактерий образуют 1–8,5 мг/л витамина В<sub>12</sub>, а искусственные мутанты *Propionibacterium shermani* М-82 и *Pseudomonas denitrificans* М-2436 продуцируют на жидкой питательной среде до 58–59 мг/л цианкобаламина.

Практический интерес для микробиологического синтеза витамина В<sub>12</sub> имеют представители актиномицетов и родственных им микроорганизмов.

Истинный витамин В<sub>12</sub> в значительных количествах синтезируют *Nocardia rugosa* (до 18 мг/л) и представители рода *Micromonospora*.

Высокой кобаламинсинтезирующей активностью обладают метаногенные бактерии (*Methanosarcina barkeri*, *Methanosarcina vacuolita*, отдельные штаммы галофильного вида *Methanococcus halophilus*, продуцирующие до 16 мг/л витамина).

Витамин В<sub>12</sub> синтезируют строго анаэробные бактерии из рода клостридий. В значительных количествах образуют витамин ацетогенные клостридии *C. thermoaceticum*, *C. formicoaceticum* и *Acetobacter woodi*, синтезирующие ацетат из диоксида углерода.

Известны активные продуценты витамина В<sub>12</sub> и среди псевдомонад. Некоторые штаммы *Pseudomonas denitrificans* нашли применение для промышленного биотехнологического получения цианкобаламина (фирма Merk, США).

Кроме того, интерес в качестве продуцентов витамина В<sub>12</sub> представляют термофильные бациллы, например, *Bacillus eirculans* и *Bacillus stearothermophilus*, которые растут при температурах, соответственно, 60 °С и 75 °С и в течение 18–24 культивирования без соблюдения стерильных условий обеспечивают высокие выходы целевого продукта – витамина В<sub>12</sub>.

В нашей стране в качестве основного продуцента витамина В<sub>12</sub>, получаемого для медицинских целей, применяют культуру *Propionibacterium shermani*, а для нужд животноводства – смешанную культуру, содержащую термофильные метанообразующие бактерии.

На большинстве зарубежных предприятий витамин В<sub>12</sub> выпускают в чистом кристаллическом виде и применяют в животноводстве большей частью в виде компонентов премиксов.

Таблица 1

Характеристика микробиологических процессов получения витамина В<sub>12</sub>

Микроорганизм	Основные компоненты среды	Выход витамина В <sub>12</sub> , мг/л	Примечание
<i>Bacillus megaterium</i>	Свекольная меласса, фосфат аммония, соли кобальта, неорганические соли	0,45	Аэробный процесс продолжительностью 18 ч
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	Кукурузный настой, кобальтовое производное глюкозы; значение рН поддерживается около 7,0 добавлением гидроксида аммония	19	Аэробная (3 сут.) и анаэробная (3 сут.) стадии
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	Кукурузный настой (или автолизат мицелия пенициллина), глюкоза, соли кобальта; значение рН поддерживается около 7,0 добавлением гидроксида аммония	8	Непрерывный двухстадийный процесс продолжительностью 33 ч

Микроорганизм	Основные компоненты среды	Выход витамина В <sub>12</sub> , мг/л	Примечание
<i>Propionibacterium shermani</i>	Кукурузный настой, глюкоза, соли кобальта; значение рН поддерживается около 7,0 добавлением гидроксида аммония	23	Периодический процесс: продолжительностью 7 сут., (анаэробная стадия – 3 сут., аэробная – 4 сут.)
<i>Streptomyces olivaceus</i>	Глюкоза, соевая мука, растворимые отходы спиртового производства, кобальтовые соли, неорганические соли	3,3	Продолжительность ферментации с аэрацией – 6 сут.
<i>Streptomyces sp.</i>	Соевая мука, глюкоза, кобальтовая соль, К <sub>2</sub> НРО <sub>4</sub>	5,7	Продолжительность ферментации с аэрацией – 6 сут.

## 2.1. Биотехнологическое получение кормового препарата витамина В<sub>12</sub>

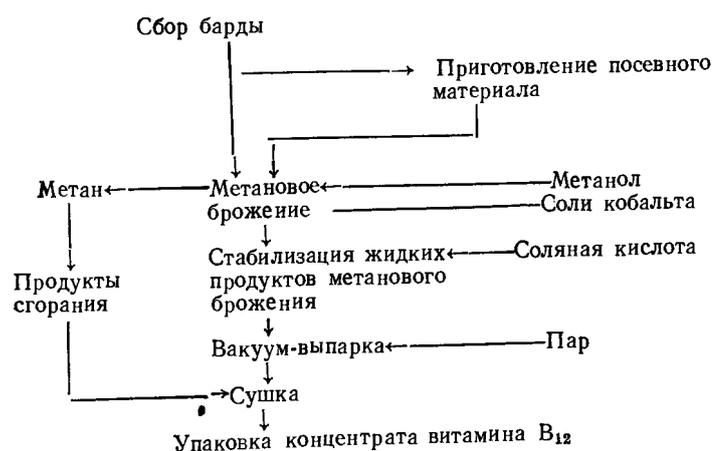
Типовой технологический процесс биотехнологического производства кормового концентрата витамина В<sub>12</sub>, принятый отечественной промышленностью, включает стадии:

1. Метановое брожение.
2. Стабилизация метановой бражки.
3. Концентрирование бражки.
4. Сушка кормового концентрата.
5. Фасовка и упаковка готового продукта.

Для промышленного получения кормовых препаратов витамина В<sub>12</sub> выращивается специально подобранный биоценоз микроорганизмов, осуществляющих термофильное метановое брожение, в который входят целлюлозоразлагающие, аммонифицирующие, углеводсбраживающие, сульфитвосстанавливающие и метанообразующие бактерии.

На первом этапе ферментации данных микроорганизмов (в течение 10–12 сут.) наблюдается бурное развитие термофильных аммонифицирующих и углеводсбраживающих бактерий, которое происходит в слабокислой среде (рН 5–7), при этом в слабокислой среде органические соединения превращаются в жирные кислоты и аммиак.

## Схема получения кормового концентрата витамина В<sub>12</sub>:



Другие группы бактерий данного биоценоза достигают интенсивного развития при переходе брожения в щелочную среду (рН 7–8,5), при этом они сбраживают продукты, образовавшиеся на первой стадии процесса, до метана и диоксида углерода. Преобладающими в данный период являются метанообразующие бактерии, которые синтезируют в 4–5 раз больше витамина В<sub>12</sub>, в сравнении с другими микроорганизмами биоценоза.

При этом главными субстратами для развития метанообразующих бактерий являются жирные кислоты и низшие спирты, поэтому их введение в питательную среду значительно увеличивает выход витамина В<sub>12</sub>.

Для приготовления питательной среды обычно используют барду ацетонобутилового производства или спиртовую барду (отход микробиологического производства ацетона и бутилового спирта), которая путем декантации очищается от твердых примесей, а также в нее вводят хлорид кобальта (4 г/м<sup>3</sup>) и 0,5% метанола.

Предварительно на меласно-спиртовой барде выращивают кормовые дрожжи. После сепарирования дрожжей получают культуральную жидкость, на которой выращивают метанообразующие бактерии (с 1 м<sup>3</sup> исходной барды получают 1,5–2 г витамина).

Кроме того, ацетонобутиловую барду получают в результате выращивания *Clostridium acetobutylicum*, сбраживающей паточно-мучные заторы.

Из барды отгонкой удаляют образовавшиеся растворители (ацетон, бутанол), добавляют хлорид кальция (из расчета 4 г/м<sup>3</sup>) и 0,5% метанола в качестве стимуляторов биосинтеза цианкобаламинов. Кроме того, в качестве стимуляторов вносят карбамид и диаммоний фосфат.

Таким образом, биотехнологическое производство кормового концентрата витамина В<sub>12</sub> реализуется в комплексе с производством бутанола, ацетона, этанола и других органических растворителей, получаемых в бродильных процессах. При этом продукты жизнедеятельности одной группы бактерий используются в качестве питательных веществ для другой группы микроор-

ганизмов и, в конечном итоге, органические вещества, составляющие основу питательных сред, разлагаются до углекислого газа и метана.

Непрерывное термофильное брожение смешанной культуры проводят в биореакторах в нестерильных условиях при температуре  $56 \pm 1$  °С.

В процессе промышленного культивирования бактерий вначале выращивают посевной материал (15–20 сут.) в аппаратах вместимостью  $250 \text{ м}^3$ . Затем посевной материал подают в железобетонные ферментеры вместимостью  $4200 \text{ м}^3$ , в которых происходит метановое брожение. Свежую барду подают в нижнюю часть ферментера в количестве 25–30% от его объема за сутки (скорость подачи барды регулируют так, чтобы время пребывания ее в биореакторе соответствовало продолжительности процесса брожения, которое обычно составляет 2–2,5 сут.). Отбор метановой бражки, содержащей витамин  $\text{B}_{12}$ , производится в верхней части ферментера.

В течение рабочего цикла в ферментере строго контролируют значение рН среды, концентрацию летучих жирных кислот, содержание аммонийного азота, поддерживают оптимальную температуру (55–57 °С).

В результате брожения образуется газовая смесь (до  $20 \text{ м}^3$  газов на  $1 \text{ м}^3$  барды), состоящая, главным образом, из метана (65%) и диоксида углерода (30%), которая может быть использована в качестве источника тепла.

Следует учитывать, что интенсивное газообразование вызывает обильное пенообразование, а это требует введения в систему пеногасителей.

Готовая культуральная жидкость, образующаяся как продукт ферментации, обычно содержит 2–2,5% сухих веществ и 1,1–1,7 мг/л витамина  $\text{B}_{12}$ , а также витамины  $\text{B}_1$ ,  $\text{B}_2$ ,  $\text{B}_6$ , пантотеновую кислоту, фолиевую кислоту, биотин, незаменимые аминокислоты.

Для предотвращения разрушения витамина  $\text{B}_{12}$  в процессе сушки культуральную жидкость подкисляют соляной или фосфорной кислотой до значения рН 6,3–6,5 и в нее добавляют 0,2–0,25% сульфита натрия для стабилизации кобаламидов во время выпаривания и сушки.

Полученная культуральная жидкость дегазируется, упаривается на вакуум-выпарной установке (бражку сгущают в четырехкорпусных выпарных аппаратах до 20% содержания сухих веществ), полученный концентрат высушивают в распылительной сушилке до содержания сухих веществ не менее 94%. В качестве теплоносителя в распылительной сушилке применяют топочные газы, полученные при сжигании газов, выделяющихся в процессе метанового брожения.

Сухой кормовой концентрат витамина  $\text{B}_{12}$  (КМБ-12) представляет собой коричневый мелкодисперсный порошок, содержащий не менее 100 мкг/г витамина  $\text{B}_{12}$ .

Сухой концентрат очень гигроскопичен, поэтому его герметически упаковывают в полиэтиленовые мешки не более чем по 15 кг, для исключения длительного хранения продукта после вскрытия упаковки.

## 2.2. Биотехнологическое получение высокоочищенного (кристаллического) препарата витамина В<sub>12</sub>

Высокоочищенный препарат витамина В<sub>12</sub> получают микробиологическим способом с помощью стрептомицетов, продуцирующих антибиотики, пропионовокислых или метанобразующих бактерий.

Впервые витамин В<sub>12</sub> был синтезирован в 1972 г. Р.Б. Вудвордом.

Витамин В<sub>12</sub> получают путем культивирования *Propionobacterium shermanii* в анаэробных условиях, в периодическом режиме, в стерильных условиях.

Питательная среда для получения высокоочищенного кристаллического витамина В<sub>12</sub> содержит в своем составе: глюкозу, кукурузный экстракт, соли кобальта, сульфат аммония. Значение рН питательной среды составляет около 7,0, что достигается добавлением гидроксида аммония.

При этом следует учитывать, что данные бактерии плохо переносят перемешивание.

В процессе ферментации выделяются органические кислоты, которые нейтрализуют раствором щелочи, которая непрерывно поступает в ферментер.

Процесс культивирования длителен (продолжительность ферментации составляет 6 сут.). Спустя 72 ч после начала культивирования в ферментер вносят 5,6-диметилбензимидазол (ДМБ) – предшественник витамина В<sub>12</sub>, в качестве затравки, т.к. без введения предшественника бактерии синтезируют не имеющий клинического значения псевдовитамин В<sub>12</sub>, в котором азотистым основанием служит аденин. После введения предшественника процесс ферментации ведут еще в течение 72 ч до содержания витамина В<sub>12</sub> в биомассе не менее 250 мкг/г.

Цианкобаламин накапливается в клетках бактерий, поэтому по окончании ферментации биомассу отделяют от культуральной жидкости с помощью фильтрации или сепарации.

Витамин В<sub>12</sub> экстрагируют из биомассы водой, подкисленной до величины рН 4,5–5 при температуре 85–90 °С. Процесс экстракции длится приблизительно 1 ч; в воду для экстракции вводят стабилизатор – 0,25% раствор нитрита натрия для предотвращения уменьшения активности витамина.

Затем полученный раствор охлаждают, нейтрализуют до значения рН 6,8–7, добавляя гидроксид натрия; вводят сульфат алюминия и хлорид железа в качестве коагулянтов белков. После полученный раствор фильтруют с помощью фильтр-пресса, образующийся при этом фильтрат содержит витамин В<sub>12</sub>. Витамин В<sub>12</sub> очищают с помощью ионообменных смол (СГ-1) и после промывки элюируют с ионообменной смолы водным раствором аммиака.

Для обеспечения более глубокой очистки проводят экстракцию витамина В<sub>12</sub> органическими растворителями. Затем полученный экстракт концентрируют, снова очищают на колонке, заполненной хроматографическим оксидом алюминия (при этом витамин сорбируется на окиси алюминия, а примеси удаляются с маточными растворами), элюируют водным ацетоном. К

полученному вводно-ацетоновому элюату добавляют безводный ацетон до помутнения раствора, и смесь выдерживают в течение 1–2 суток при температуре 3–4 °С в результате выпадают кристаллы витамина В<sub>12</sub>, их отфильтровывают на холоде, промывают безводным ацетоном, эфиром и сушат в вакууме.

Для химической очистки витамина В<sub>12</sub> применяют его способность образовывать аддукаты (комплексы) с резорцином, фенолом или крезолами, которые легко разлагаются на составные компоненты. Для этого водный концентрат витамина обрабатывают водным раствором фенола, отделяют фильтрованием выделившийся комплекс, затем его разлагают путем обработки водным ацетоном. При этом витамин отделяется в виде осадка, а фенол и примеси уходят с вводно-ацетоновыми маточными растворами.

Для окончательной очистки препарата витамина В<sub>12</sub> осуществляют одно- или двукратное переосаждение цианкобаламина из водного раствора ацетоном.

Многочисленными опытами на животных установлена высокая биологическая эффективность как кристаллического препарата витамина В<sub>12</sub>, так и его кормовых концентратов.