

Тағам биотехнологиясының заманауи тенденциялары

Дәріс №5

**Тақырып: Микроорганизмдерді культивирлеу
тәсілдері мен жүйелері**

Дәріс жоспары:

1. Микроорганизмдерді культивирлеу тәсілдері.
2. Микроорганизмдерді культивирлеу жүйелері.
3. Биотехнологиялық өндірісте қолданылатын әдістер.

5.1 Микроорганизмдерді культивирлеу тәсілдері

Биотехнологиялық процестер микроорганизмдерді өндірісінде периодтық немесе үздіксіз культивирлеу негізінде жүргізіледі.

Биореактор, ферментер немесе ферментатор - бұл жабық немесе ашық ыдыс, оның ішінде белгілі бір шарттарда (қысым, температура, құрғақ заттардың концентрациясы, рН деңгейі және т.б.) клеткалық немесе молекулалық деңгейде бақылауға алынған реакция өтеді, ол микроорганизмдер арқылы жүзеге асырылады.

Периодтық процесс келесі кезеңдерді қамтиды:

- а) ортаның, биореакторлардың және көмекші жабдықтардың стерилизациясы;
- б) аппаратты питательді ортамен жүктеу;
- в) тұқымдық материалды (клеткалар, споралар) енгізу;
- г) культураның өсуі, бұл процесс келесі кезеңмен сәйкес келуі мүмкін немесе оған дейін жүруі мүмкін;
- д) мақсатты өнімнің синтезі;
- е) дайын өнімді бөлу және тазарту. Бұл кезеңдердің уақытша ретімен өтетіндігі туралы сөз болып отыр, соңғы кезең аяқталғаннан кейін биореакторды жуып, жаңа циклға дайындау қажет.

Культураның өсу кезеңі бірнеше фазаларды қамтиды:

- а) лаг-фаза - жаңа ортаға үйренетін культураның салыстырмалы түрде баяу өсуі;
- б) экспоненциалды фаза - клеткалардың қарқынды бөлінуі, мәдениеттің теңдестірілген өсуі;
- в) баяуланған өсу фазасы - қоректік субстраттардың таусылуы және метаболизмнің токсикалық өнімдерінің жиналуы;
- г) стационарлы фаза - клеткалардың өсуі олардың жойылуына тең болады;
- д) өлім фазасы - тіршілік қабілеті бар клеткалардың санының біртіндеп төмендеуі.

Биотехнологиялық құнды өнімдер экспоненциалды фазада синтезделеді (нуклеотидтер, көптеген ферменттер, витаминдер - алғашқы метаболиттер деп аталатындар) немесе стационарлы өсу фазасында (антибиотиктер, бояғыш заттар және т.б. - екінші метаболиттер немесе идиолиттер деп аталатындар).

Периодтық культивирлеу кеңінен қолданылып, қосымша қоректік заттарды енгізу арқылы жүзеге асырылады: культураға қоректік субстрат енгізілгеннен кейін реакторға қоректік заттар белгілі бір аралықтармен порциялармен немесе үздіксіз "тамшылармен" қосылады. Кейде қосымша биообъект те енгізіледі.

Сонымен қатар, бөліну әдісі бар, онда биореактордан бір бөлік көлемі үнемі алынып тасталып, оған сәйкес көлемде орта қосылады. Бұл мәдениеттің қайта жасаруына және оның өлім фазасына өтуінің тежелуіне әкеледі. Мұндай культивирлеу режимі көбінесе үздіксіз процесс сияқты болып көрінеді, сондықтан оны жартылай үздіксіз культивирлеу деп те атайды.

Үздіксіз процестерде биообъект үнемі экспоненциалды өсу фазасында сақталады. Биореакторға жаңа қоректік ортаның үздіксіз келіп түсуі және одан культуралық сұйықтықтың, клеткалар мен олардың тіршілік өнімдерінің шығарылуы қамтамасыз етіледі. Үздіксіз процестердің негізгі принципі - клеткалардың бөлінуі арқылы биомасса өсуі мен жаңа ортамен сұйылту нәтижесінде олардың жоғалуы арасындағы теңдік. Үздіксіз культивирлеудің химостаттық және турбидостаттық режимдері ерекшеленеді.

Ферменттердің өндірісіндегі терең әдіс

Терең культивирлеу әдісі микроорганизмдерді сұйық питательді ортада өсіруді білдіреді. Бұл әдіс техникалық тұрғыдан алғанда беткі әдістен жетілдірілген, себебі ол механизация мен автоматизацияға оңай бейімделеді.

Барлық процесс қатаң асептикалық жағдайларда жүргізілуі керек, бұл әдістің бір жағынан артықшылығы болса, екінші жағынан техникалық қиындық тудырады, себебі асептика бұзылуы ферменттің өндірілуінің тоқтауына әкеледі.

Терең культивирлеу кезінде ортадағы ферменттің концентрациясы әдетте беткі культуралық экстракттарға қарағанда айтарлықтай төмен болады. Культуралық сұйықтықтардың фильтраты 3%-дан аспайтын құрғақ заттарды қамтиды. Бұл ферменттерді бөліп алу үшін фильтраттарды алдын ала концентрлеуді қажет етеді.

Ферменттердің өндірісіндегі беткі әдіс

Культура қатты ылғалданған питательді ортада бетінде өседі. Мицелий қатты бөлшектерді толық жабады және оларды берік ұстайды, клеткалар осы ортадағы заттарды пайдаланып қоректенеді және тыныс алу үшін ауадағы оттегіні қолданады, сондықтан оттегімен қамтамасыз ету үшін құрылымы бос ортамен қатар биіктігі аз қабаттар қолданылады.

Әдістің кемшілігі - үлкен аландарды қажет етеді. Өндірістік мәдениетті өсіру әдетте асептикалық жағдайларда жүзеге аспайды. Алайда, орта мен кубиктер сенімді стерилизацияланған болуы керек. Жаңа жүктеу алдында өсіру камералары, сондай-ақ барлық ұсақ жабдықтар мен инвентарь дезинфекциялануы тиіс.

Беткі әдістің басты артықшылығы - орта көлеміне бірлік ферменттің жоғары концентрациясы. Мысалы, спирт өндіру үшін 100 кг крахмалды қанттандыру үшін 5 кг беткі мәдениетке немесе шамамен 100 кг культуралық сұйықтыққа қажетті. Беткі культураларды жылдам және оңай құрғатуға болады, оларды тауарлық түрге көшіру және тасымалдау жеңіл. Электр энергиясын терең әдіспен салыстырғанда аз қажет етеді.

5.2. Микроорганизмдерді өсіру жүйелері

Микроорганизмдерді өсіру ашық немесе жабық жүйеде жүзеге асырылуы мүмкін.

Жабық жүйе деп аталады, егер жүйенің ешбір құрамдас бөлігі процесс басталғаннан кейін биореакторға енгізілмесе және шығарылмаса. Периодикалық процесте ферменттерге барлық қоректік заттар, сұйық фаза және тұқымдық материалдар алғашында енгізіледі. Процесс микроорганизмдердің өсу қисығына сәйкес өтеді, оның соңғы реакцияның тоқталуы субстраттың жетіспеушілігі, токсикалық метаболиттердің жиналуы, физико-химиялық орта жағдайларының (рН,

температура, оттегінің парциалды қысымы, тұтқырлық) қолайсыз өзгеруі, микроорганизмдердің өлімі мен лизисі себепті болады. Өсіріп-өндіру барысында барлық параметрлер үздіксіз өзгеріп отырады.

Басқарылатын периодикалық процестердің дамуы көлемді жүйенің құрылуына әкелді: өсіру процесінде қоректік заттардың негізгі компоненттері бөлек-бөлек қосылып, субстраттық ингибирлеу жойылады. Ортадан ешқандай сұйық компоненттер алынбайды.

Ашық жүйе үздіксіз ағыста жұмыс істейді. Реакция процесінде өңделген қоректік орта биореактордан шығарылады және жаңа орта қосылады, бұл процесстің үздіксіздігін қамтамасыз етеді. Бір уақыт ішінде субстрат тек мәдениеттің өңдеу қабілетінен көп енгізілмейді. Үздіксіз өсіру кемінде бір шектейтін концентрациямен жүзеге асырылады. Биомассаны реттеу немесе өнім концентрациясын тұрақты деңгейде ұстап тұру арқылы субстрат концентрациясын өзгерту (турбидостат) немесе қатты шектелген қоректік заттардың концентрациясын қолдану (хемостат) арқылы жүзеге асырылады.

Микробтық ақуыздық препараттарды алу үшін көбінесе экономикалық тұрғыдан тиімді әрі бақылау оңай болып табылатын үздіксіз өсіру әдісі қолданылады. Қоректік заттардың концентрациясы клеткалардың айналасында рұқсат етілген аумақта болуға тиіс және өнімнің түзілуіне кедергі келтіретін жанама реакцияларды болдырмауы керек, бұл ферменттердің қабырғаларына тұнба түзілмеуі үшін маңызды.

5.3. Биотехнологиялық өндірісте қолданылатын әдістер

Тұқымдық материалды сақтау әдістері: Өнеркәсіптік мәдениетте клеткаларды биореакторларда өсіру барысында қолайсыз формалар болдырылмайды, сонымен қатар өнімділікті арттыратын формалар пайда болады. Бұл процесс автоселекция деп аталады. Осыған байланысты клеткаларды құнды қасиеттерін жоғалтпай ұзақ мерзімге сақтау мәселесі туындайды. Бұл клеткалардың барлық өмірлік процестерін күрт баяулату арқылы мүмкін болады. Сақтау әдістеріне мыналар жатады:

1. Лиофильді кептіру (тұздатудан кейін суды алып тастау $-40\sim-60^{\circ}\text{C}$ және төмен температурада). Бұл антибиотик өндірушілерге қолданылады. а) Стерильді ортада ауада кептіру (топырақта, қағазда, агар-агар дискілерінде және т.б.). б) Спораларды сақтау (*Bacillus* туысының споралары үшін жарамды). в) Криоконсервация - клеткаларды терең мұздату және сұйық азотта (-196°C) немесе азот буында (-155°C) сақтау.

Клеткаларды сақтау үшін стерильді орта, жабдық және ауаға жоғары талаптар қойылады. Бұл биореакторға бөгде микроорганизмдердің түсуін болдырмау үшін қажет.

Клеткалар өз қасиеттерін жақсы сақтайды, егер биореактордағы жағдайлар зертханалық культураға жақын болса.

2. Мақсатты өнімді алу: Бұл биотехнологиялық процестің соңғы кезеңі. Өнім клеткаларда жинақталуы мүмкін немесе культуралық сұйықтыққа бөлінуі мүмкін. Өнімді клеткаларда жинақтау ең қиын болып табылады. Бұл үшін клеткаларды культуралық сұйықтықтан бөліп, оларды бұзып, кейін мақсатты өнімді клеткалардың бұзылған массасынан тазарту керек.

Мақсатты өнімді тазарту жолындағы алғашқы қадам - биомассаны культуралық сұйықтықтан бөліп алу - сепарация.

Сепарация түрлері:

1. Флотация: Егер клеткалар биореакторда төмен сіңіргіштіктен себепті сұйықтықтың беткі қабатында жиналса, сұйықтықты көбікке айналдырады, содан кейін клеткаларды қамтыған жоғарғы қабатты бөліп алады. Әртүрлі құрылымдағы флотация аппараттары газ көпіршіктерімен жабылған клеткаларды сығады, сорып алады немесе қабыршақтайды. Флотация ашытқылы массаны бөліп алу үшін кеңінен қолданылады.

2. Фильтрация: Қуысты сүзгі қабатында биомассаны ұстап алу. Бір реттік немесе көп реттік қолданылатын сүзгілер: барабанды, дискілі, лента тәрізді, табақшалы, карусельді, вакуумды сүзгілер, сүзгі-престтер, мембраналық сүзгілер. Порлардың диаметрі клеткалардың өлшемінен үлкен болуы мүмкін. Кейде биомассаны сүзгі беткі қабатынан қысылған ауамен немесе арнайы пышақпен сүртіп алады.

3. Центрифугалау: Сұйықтықтағы қалқып жүрген бөлшектерді центробежді күшпен бөлу. Бұл фильтрацияға қарағанда қымбат жабдықты талап етеді. Сондықтан ол тиімді, егер: а) суспензия фильтрациялау баяу болса; б) культуралық сұйықтықты құрамында бөлшектері бар сүзгілеу мақсаты болса; в) фильтрлер тек кезең-кезеңмен әрекет етсе, үздіксіз сепарация процесі қажет болса.

Центрифугалау мен фильтрация кейде комбинацияда жүзеге асырылады, мысалы, фильтрациялық центрифугаларда. Биомассаны сепарациялау үшін перспективті жабдықтар - центрифуга-сепараторлар, онда биомасса айналмалы цилиндрдің қабырғаларында немесе арнайы табақшалы вставкаларда тұндырылады.

Клеткаларды бұзу: Бұл физикалық, химиялық және химико-ферментативті әдістермен жүзеге асырылады.

Физикалық бұзу әдістері: ультрадыбыспен, айналмалы қалақпен немесе вибраторлармен, шыны шариктермен шайқап, жоғары қысыммен тар тесік арқылы өткізу, мұздатылған массаны ұсақтау, үгіту, осмотикалық соққы, мұздату және еріту, қысу және қысымды тез төмендету арқылы жүзеге асырылады. Бұл әдістер клеткаларды дезинтеграциялауда нақты болмаса да, кейбір өнімдер үшін қолдануға болады.

Химиялық және химико-ферментативті бұзу әдістері белгілі бір таңдамалылықпен жүреді. Бұл әдістерді дрожжелік автолизаттарды және бірнеше ферменттерді өнеркәсіптік алу үшін клеткаларды толуолмен немесе бутанолмен өңдеу арқылы жүзеге асырады. Эффе́ктивті клетка лизисін полимиксиндер, тироцидиндер, новобиоциндер, нистатиндер және басқа антибиотиктер, сондай-ақ кейбір беткі белсенді заттар, мысалы, глицин шақырады.

Мақсатты өнімді культуралық сұйықтықтан немесе бұзылған гомогенаттан бөліп алу әдістері:

Құлақшалар: Ерітінді заттарды физикалық (жылыту, салқындату, ерітіндіні сұйылту немесе концентрлеу) немесе химиялық әдістермен бөлу. Мысалы, пенициллинді калий немесе натрий қосылыстарымен кристалды тұнбаға айналдыру. Белоктарды аммоний сульфаты немесе органикалық еріткіштермен (этанол, ацетон) тұндыру. Нуклеин қышқылдарын полиаминдермен тұндыру.

Экстракция: Өнімді қатты (қатты-сұйық) немесе сұйық (сұйық-сұйық) үлгіден шығару. Қатты-сұйық экстракцияда үлгіні суға батырып, ерітілген заттарды шығару, мысалы, метал тұздары немесе қатты субстраттардан ерітілген өнімдер алу. Органикалық еріткіштерді қолдану, мысалы, ацетонмен клеткалық массаны экстракциялау.

Сұйық-сұйық экстракциясында органикалық еріткіштер қосылып, культуралық сұйықтықтан антибиотиктер, витаминдер, каротиноидтар, липидтер және кейбір гидрофобты белоктар алынады. Витамин В12 фенолмен және оның туындыларымен (крезол, басқа алкилфенолдар, галогенидтер) экстракталанады. Фосфолипидтер хлороформмен экстракцияланады.

Қатты субстрат және культуралық сұйықтықтың арасындағы айырмашылықты жою үшін күймалау экстракциясы (криоэкстракция) қолданылады. Бұл әдіс заттарды мұздатылған күйде экстракциялау үшін, төмен температураларда буланатын еріткіштерді қолдану арқылы жүзеге асырылады. Бұл әдіс клеткаларды терең мұздату үшін де қолданылуы мүмкін. Клеткалар ұзақ уақыт бойы қасиеттерін жоғалтпай терең мұздатылған жағдайда сақталады.

Адсорбция: Бұл экстракцияның ерекше түрі, мұнда экстракциялау агенті сұйық немесе газ фазасынан қатты дене болып табылады. Жақсы адсорбенттер - ағаш көмірі, дамыған порозды беті бар балшықтар. Адсорбция арқылы антибиотиктер мен витаминдер культуралық сұйықтықтан алынады. Қазіргі әдістер экстракция мен адсорбция принциптеріне негізделген хроматография, электрофорез, изотахофорез, электрофокусировка сияқты әдістерді қамтиды.

5.4. Өнімді концентрациялау, кептіру, модификациялау және тұрақтандыру

Өнімнің концентрациясын кері осмос, ультрафилтрация, буландыру әдістерімен жүргізеді.

Егер мембрана су өтетін болса, бірақ еріген заттарды ұстаса, бұл осмос болып табылады.

Ультрафилтрация - заттарды мембраналық сүзгілермен бөлу.

Ең ескі әдіс - **буландыру**. Оның кемшілігі - қажетті жылытуды қамтуы.

Бұл процесс вакуумды буландыру аппараттарында жүзеге асырылады. Жылытатын агент ретінде көбінесе су буы пайдаланылады, бірақ сұйық жылу тасымалдағыш немесе электр жылытқышты қолдану мүмкін. Буландырудың жоғары жылу конденсациясы және процессті басқарудың оңайлығы сипатталады.

Өнімді кептіру - кептіру науаларында, лента конвейерлерінде, газ тәрізді жылытқыш агенттермен (ауа, CO₂, түтін немесе пештің газдары және т.б.) құрғату, вакуумды кептіру шкафтарында, барабанды немесе шашыратқыш кептіргіштерде жүргізіледі.

Өнімді модификациялау - адамға қажетті арнайы қасиеттерді беру үшін жануар, өсімдік немесе микроорганизмдерден алынған қосылыстарды қайта құрылымдау. Химиялық модификация қажет болғанда, биотехнологиялық процесс тек «дайын өнім» береді.

Модификациялау - ферменттер, гормондар, медициналық препараттар алу үшін қажет кезең. Мысалы, сиыр инсулині аминокислоталық қалдықтардан «құтылып», адам гормонына сәйкес келеді.

Өнімді тұрақтандыру - өнімнің қасиеттерін сақтау үшін сақтаудың және тұтынушыға қолданудың кезеңдерінде жүзеге асырылады (қосымша толтырғыштарды қосу, модификациялау және т.б.). Бұл физико-химиялық әсерлерді қамтиды. Кептіру өнімнің сыртқы әсерлерге төзімділігін арттырады. Ферменттерді кептіру олардың жылуға төзімділігін арттырады.

Өнімдердің, соның ішінде жемдік микробтық ақуыздың тұрақтылығын арттыруға толтырғыштарды, мысалы, саңырауқұлақ мицелийін, бидай қабықшаларын, жүгері ұнын қосу арқылы қол жеткізіледі.

Өзін-өзі тексеру сұрақтары:

- 1) Биореактор дегеніміз не?
- 2) Микроорганизмдерді өсірудің қандай тәсілдері бар?
- 3) Ашық және жабық өсіру жүйелері дегеніміз не?