

3. культивирование

Глубинная ферментация

периодическая

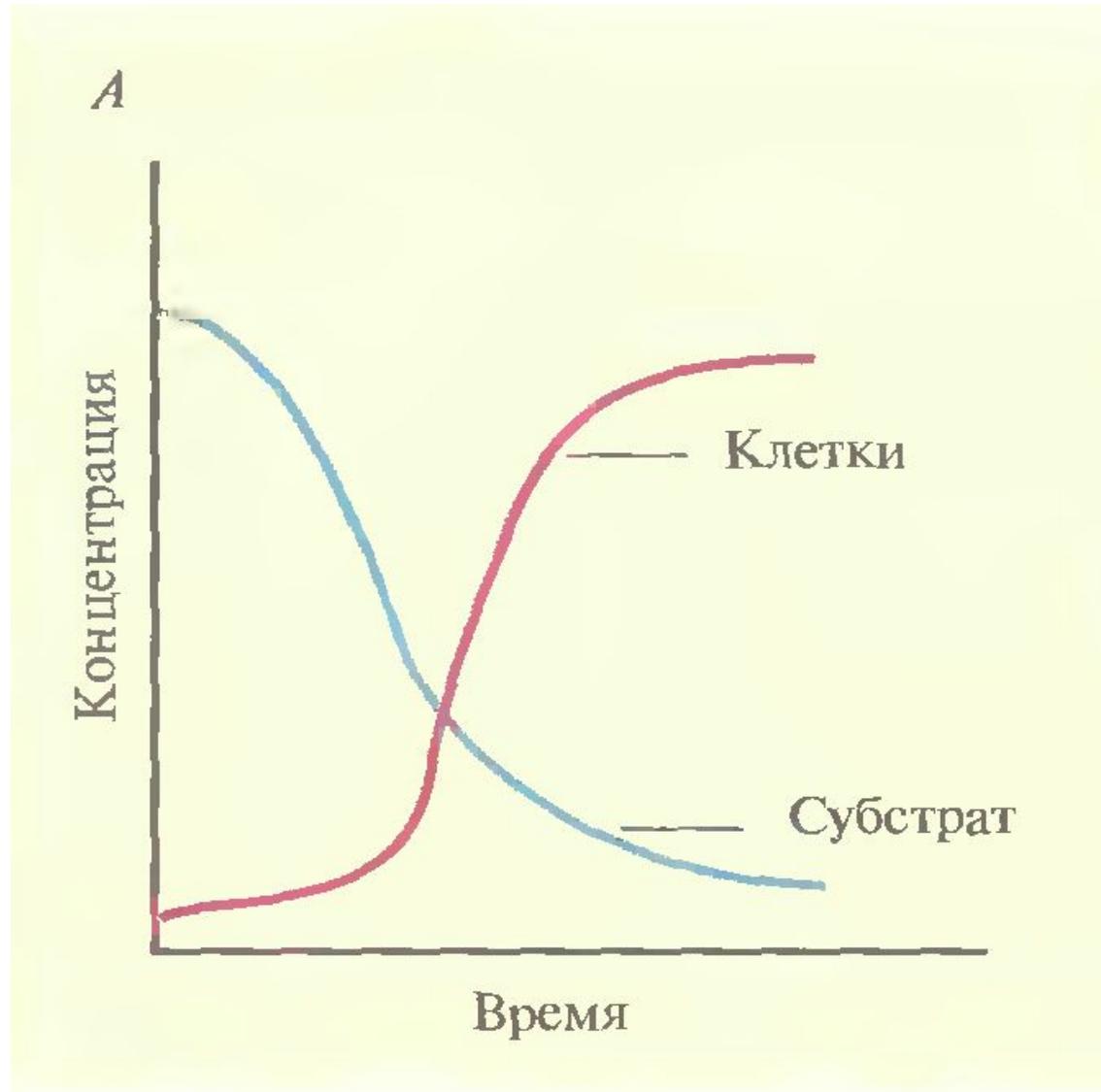
- без добавления питательного субстрата (ПС);
- с добавлением ПС

непрерывная

Кинетика периодического культивирования без добавления питательного субстрата

В ферментерах периодического действия:

- Состав культуральной среды, концентрация микроорганизмов (биомассы) изменчиво и зависит от фазы роста;
- Количество продукта изменчиво и зависит от фазы роста;
- используется только для культивирования микроорганизмов



ФАЗЫ РОСТА КУЛЬТУРЫ: периодическая ферментация БЕЗ добавления ПС.

1 – лаг-фаза

2 – фаза

ускорения. Скорость прироста клеток увеличивается

3 –

экспоненциальная

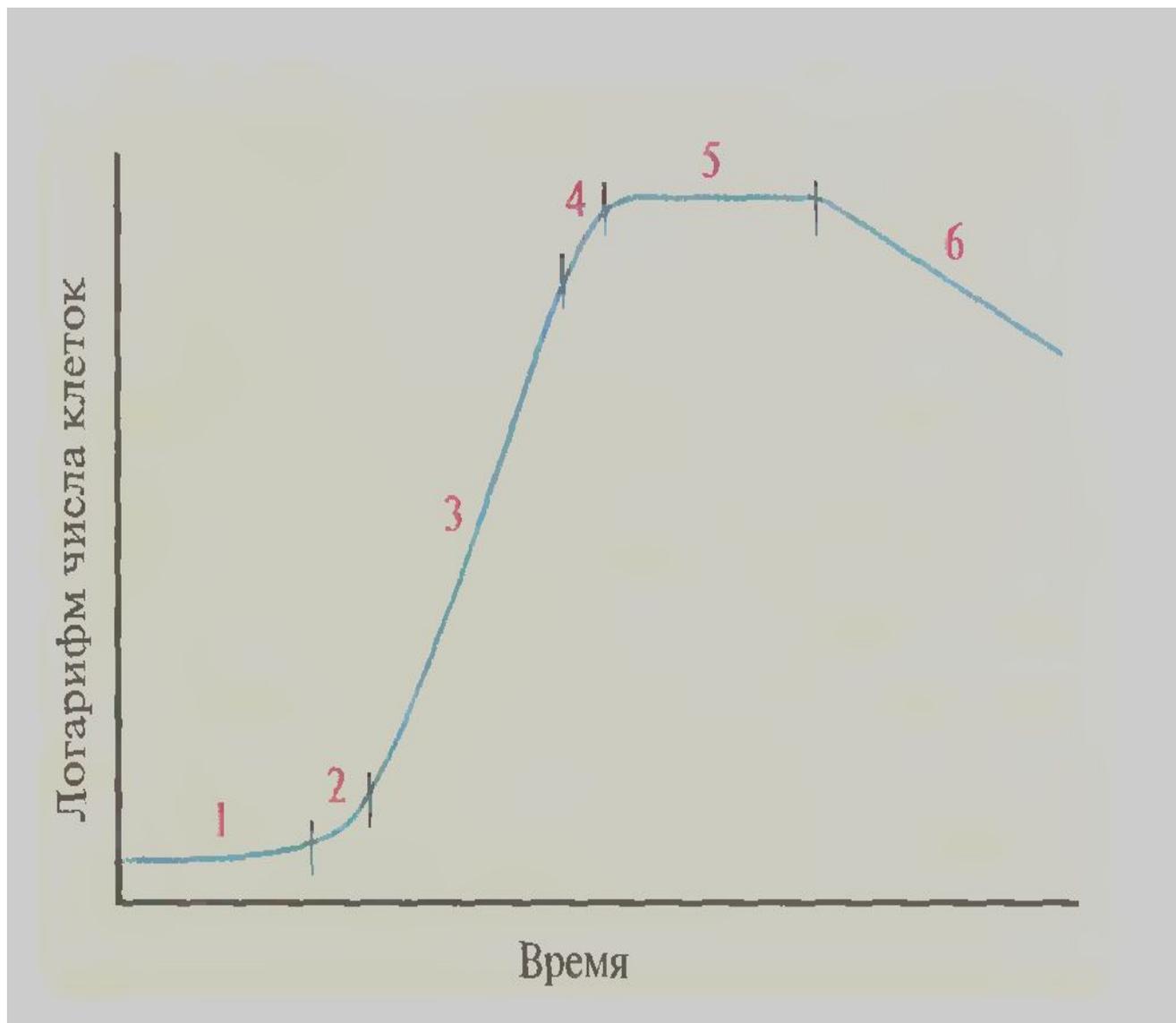
фаза. Скорость прироста стабилизируется

4 – фаза

замедления.

5 - стационарная

фаза. Прироста клеток нет, количество делений равно количеству отмираний клеток.



ферментация с добавлением субстрата

Осуществляется в ферментерах периодического действия.

- периодически вносят дополнительное количество ПС;
- культуральную среду не удаляют до окончания процесса;
- используют для культивирования клеток микроорг., млекопитающих и др.



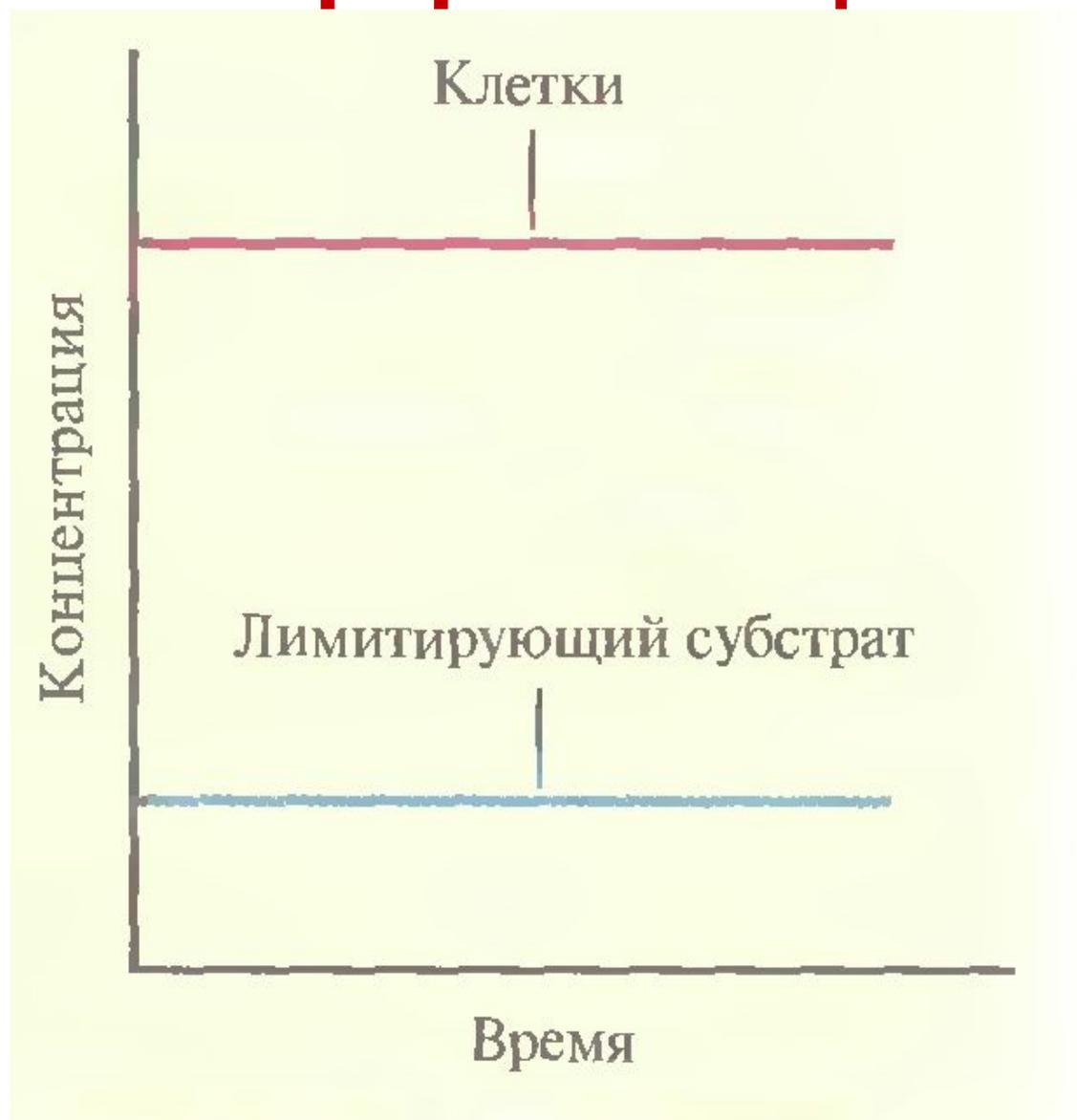
3. Непрерывная ферментация

В ферментерах непрерывного действия:

- свежая ПС поступает непрерывно;
- параллельно отводится такой же объем культуральной жидкости;
- продолжительность достигает 1000 часов;
- более экономична

Затруднения:

- ввиду большой длительности клетки могут терять рекДНК и выход целевого продукта снижается;
- поддержание стерильности в течение длительного времени проблематично

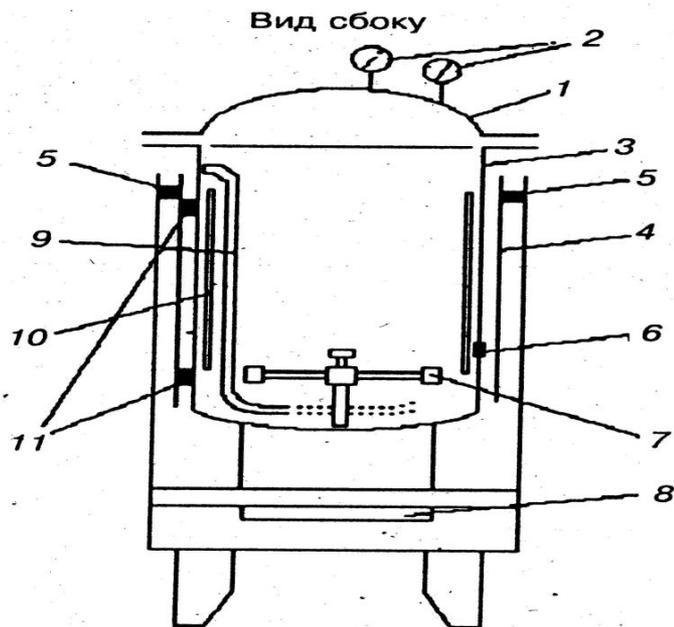


АППАРАТУРА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА

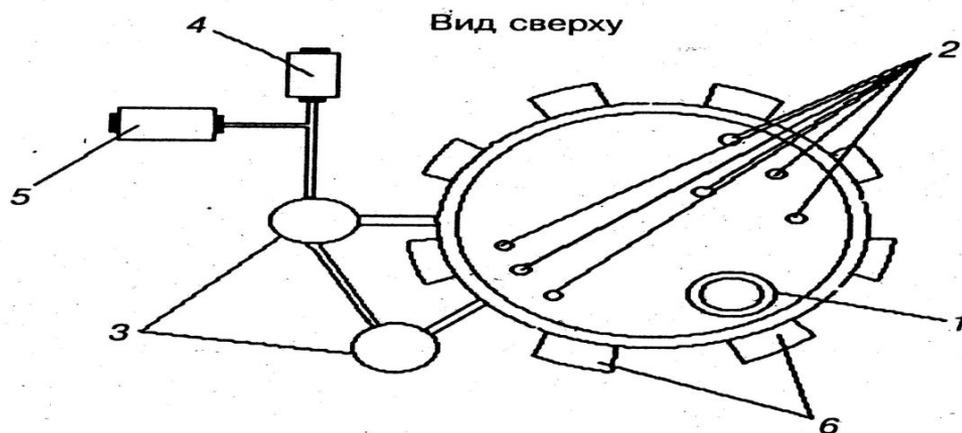


Ферментер-биореактор
Bio-Flo/Cell

СХЕМА БИОРЕАКТОРА



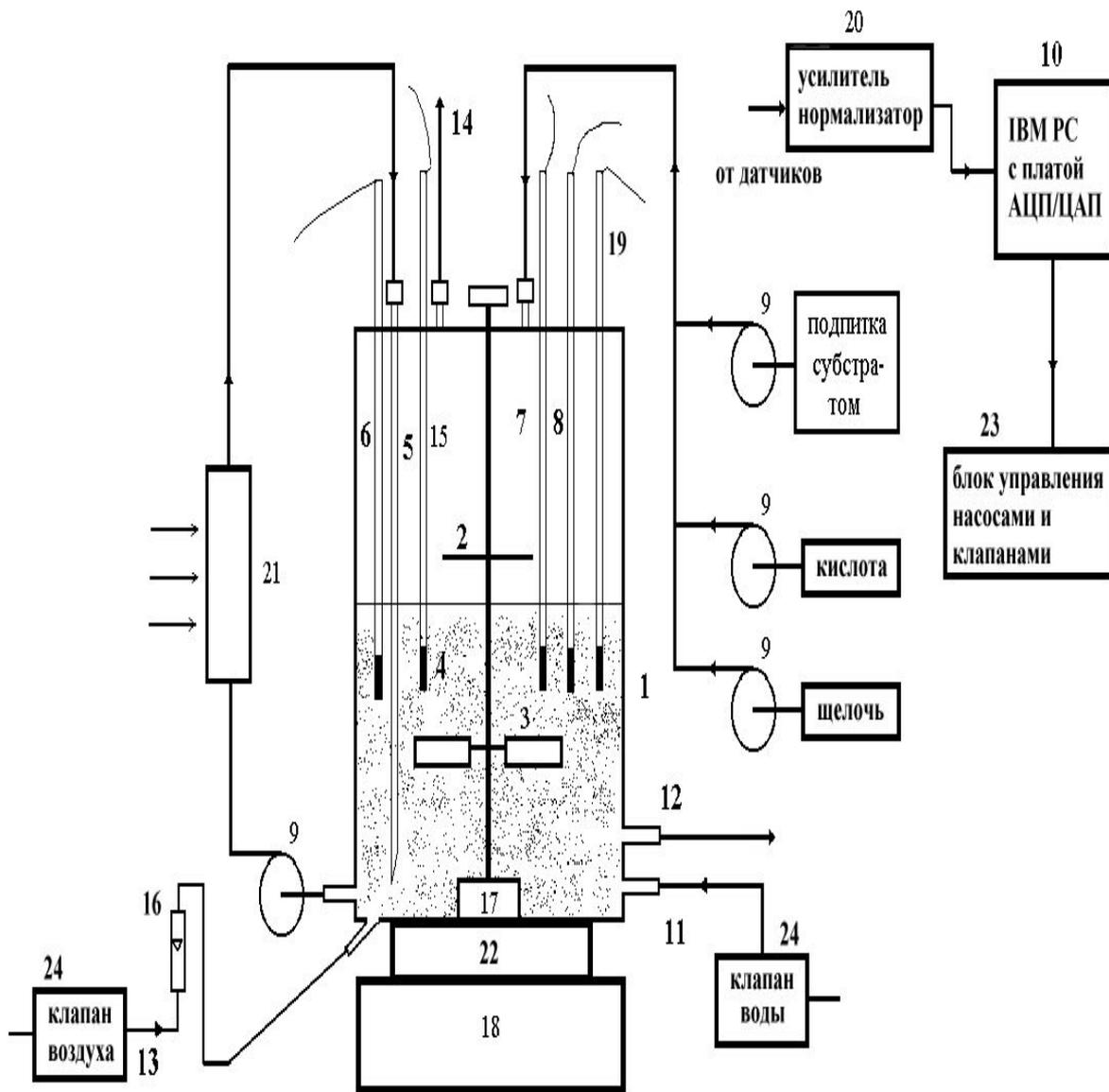
- 1 – крышка;
- 2 – манометры паровой и воздушный;
- 3 – сосуд;
- 4 – паровая рубашка;
- 5 – узел крепления и поворота биореактора;
- 6 – датчик температуры;
- 7 – турбинная лопастная мешалка;
- 8 – двигатель с магнитным приводом;
- 9 – газораспределительный барботер;
- 10 – отжатая перегородка (отбойники);
- 11 – вход и выход теплоносителей из паровой рубашки



- 1 – смотровое окно;
- 2 – штуцеры с заглушками для дробного введения ингредиентов;
- 3 – входной и выходной стерилизующие воздушные фильтры;
- 4 – клапан для выхода воздуха из биореактора;
- 5 – предохранительный клапан;
- 6 – запорные приспособления

Схема комплекса для культивирования микроорганизмов

1 – корпус ферментера; 2 – дискообразный пеногаситель; 3 – лопастная мешалка; 4 – среда культивирования; 5 – сливной патрубок; 6 – электрод сравнения; 7 – pH-электрод; 8 – pO_2 -электрод; 9 – перистальтические насосы; 10 – IBM PC с платой АЦП/ЦАП; 11, 12 – подача охлаждающей воды в теплообменник ферментера; 13 – подача воздуха; 14 – выход воздуха; 15 – термосопротивление; 16 – ротаметр; 17 – магнитный привод; 18 – привод двигателя; 19 – eH -электрод; 20 – усилитель-нормализатор; 21 – выносная кювета для измерения биомассы (оптической плотности ферментационной среды); 22 – нагревательный элемент; 23 – блок управления насосами и клапанами; 24 – клапаны.



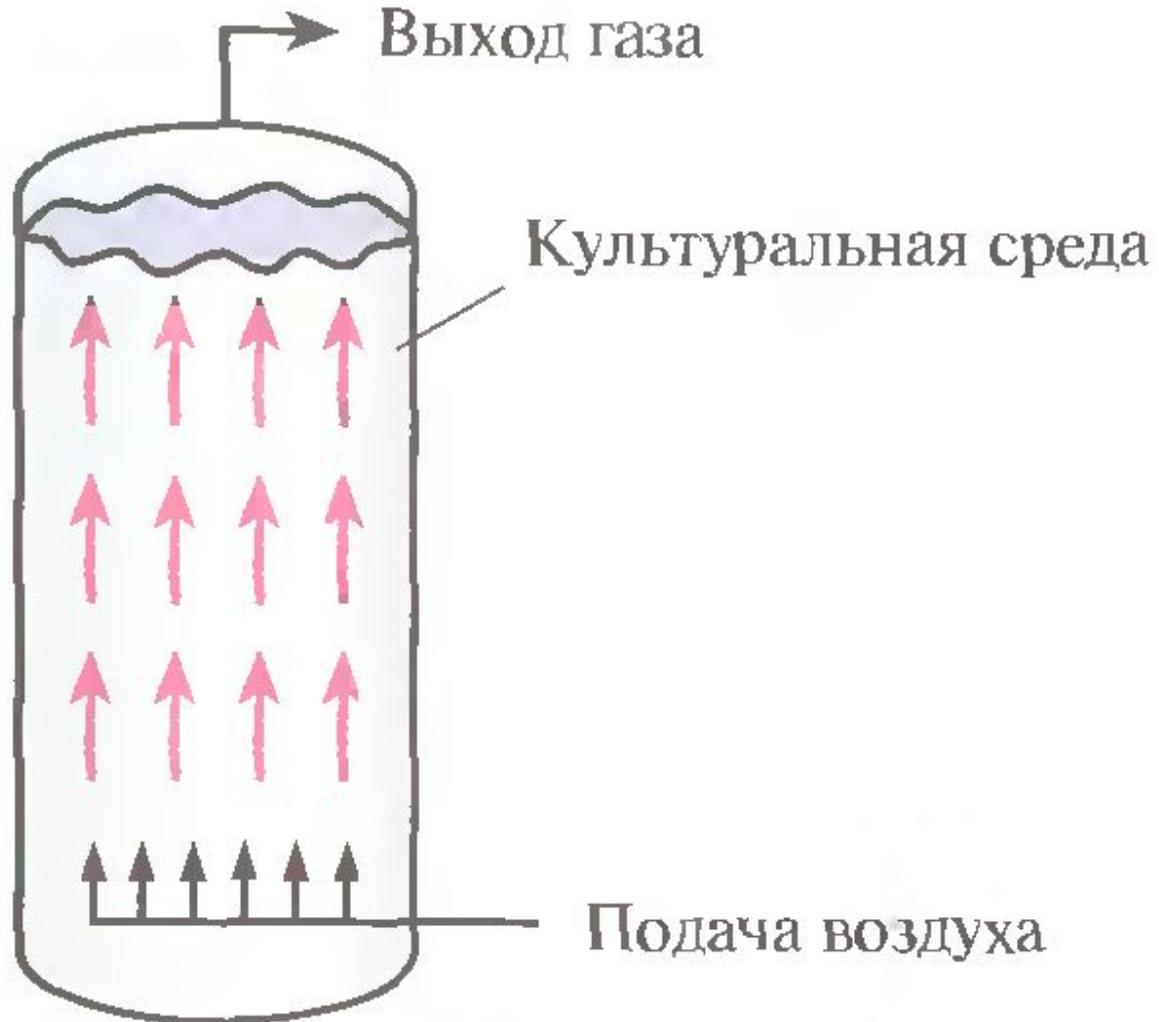
Реакторы с механическим перемешиванием

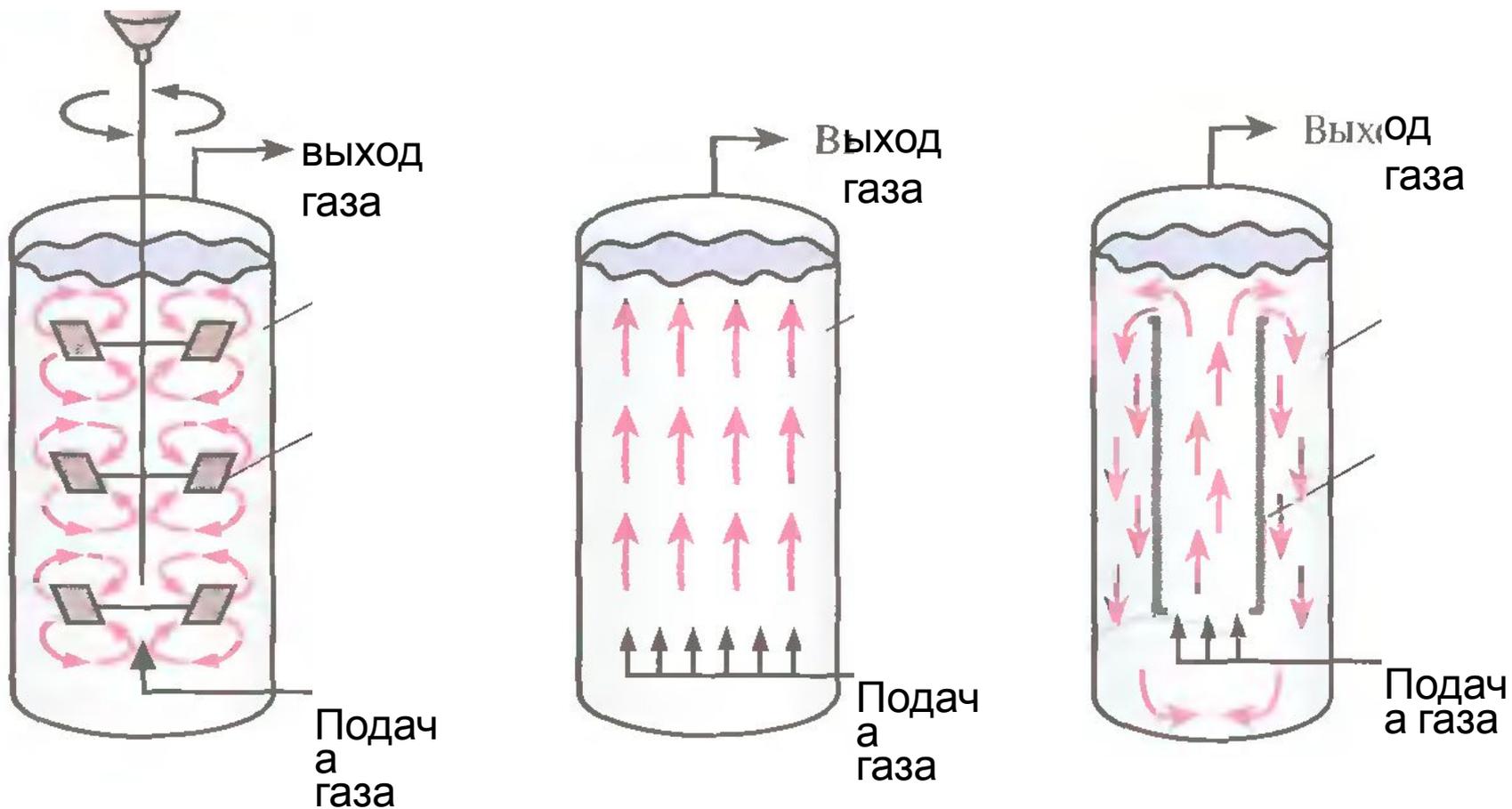
- Воздух подается через разбрызгиватель;
- мешалки диспергируют воздух;
- характерно вспенивание



Барботажные КОЛОННЫ

- Воздух подают **под давлением** через барботер в нижней части ферментера.
- Перемешивание происходит восходящим потоком воздуха равномерно по всему объему.
- Мешалка отсутствует, что уменьшает риск попадания посторонних м/о.
- Отсутствуют сильные сдвиги слоев культуральной жидкости, она более спокойна.
- Характерно пенообразование.





Очистка газа (воздуха) от микроорганизмов и аэрозольных частиц осуществляется как на ВХОДЕ (для предотвращения загрязнения содержимого биореактора), ТАК и на ВЫХОДЕ из биореактора (для предотвращения загрязнения ОС микроорганизмами, в т.ч. и рекомбинантными) через:

- фильтры предварительной очистки от частиц 5 мкм и более
- и фильтры тонкой очистки от частиц до 0,25 мкм.

Оценка ЭФФЕКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТАЦИИ

- *По плотности (концентрации) клеточной культуры.* Концентрация клеток в ПС называется биомассой. Измеряется в граммах сухого вещества клеток на 1 л среды.
- На эффективность ферментации влияет ряд факторов. Изменяя их в ту или иную сторону можно повышать эффективность ферментации.

На рост и развитие микроорганизмов и клеточных линий влияют

Внутриклеточные факторы:

- структура клетки
- механизмы метаболизма
- генетические характеристики

Внеклеточные (внешние) факторы:

- состав питательной среды,
- концентрация растворенного кислорода,
- рН среды
- температура,
- давление,
- режим перемешивания,
- время культивирования и т. д.

Являются основными регуляторными факторами биотехнологии.

КОНТРОЛЬ БИОМАССЫ в культуральной жидкости

Прямые методы:

- подсчет числа клеток *при помощи микроскопа*. При этом определяют линейные размеры или число жизнеспособных клеток методом окрашивания. Наиболее чувствительный метод.
- по объему осаждения клеток при центрифугировании культуральной жидкости;

Косвенные методы:

- по интенсивности дыхания (измерение концентрации CO_2 с помощью ИК газоанализатора),
 - по содержанию накопленного белка (бромсульфалеиновая проба, основанная на связывании бромсульфалеина основными группами белка);
- и т.д.

Основные стадии биотехнологического процесса

1. приготовление и стерилизация питательных сред
2. приготовление посевного материала
3. культивирование
- 4. ОБРАБОТКА КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ**
5. выделение и очистка биопрепарата
6. получение готовой продукции

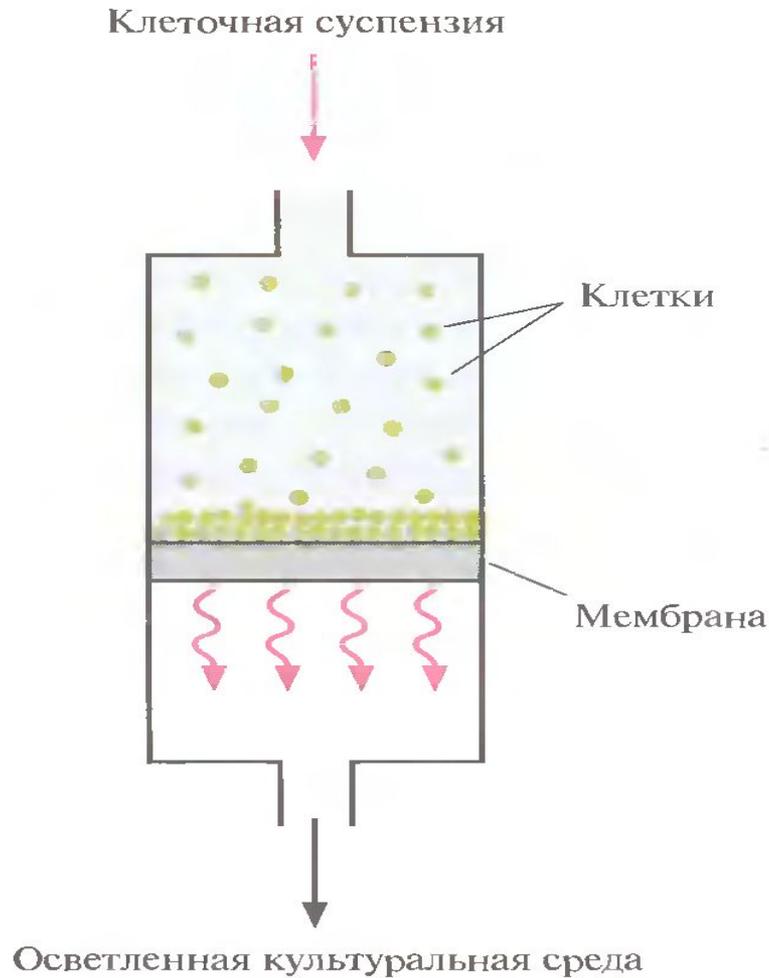
4. Обработка культуральной жидкости

СЕПАРАЦИЯ

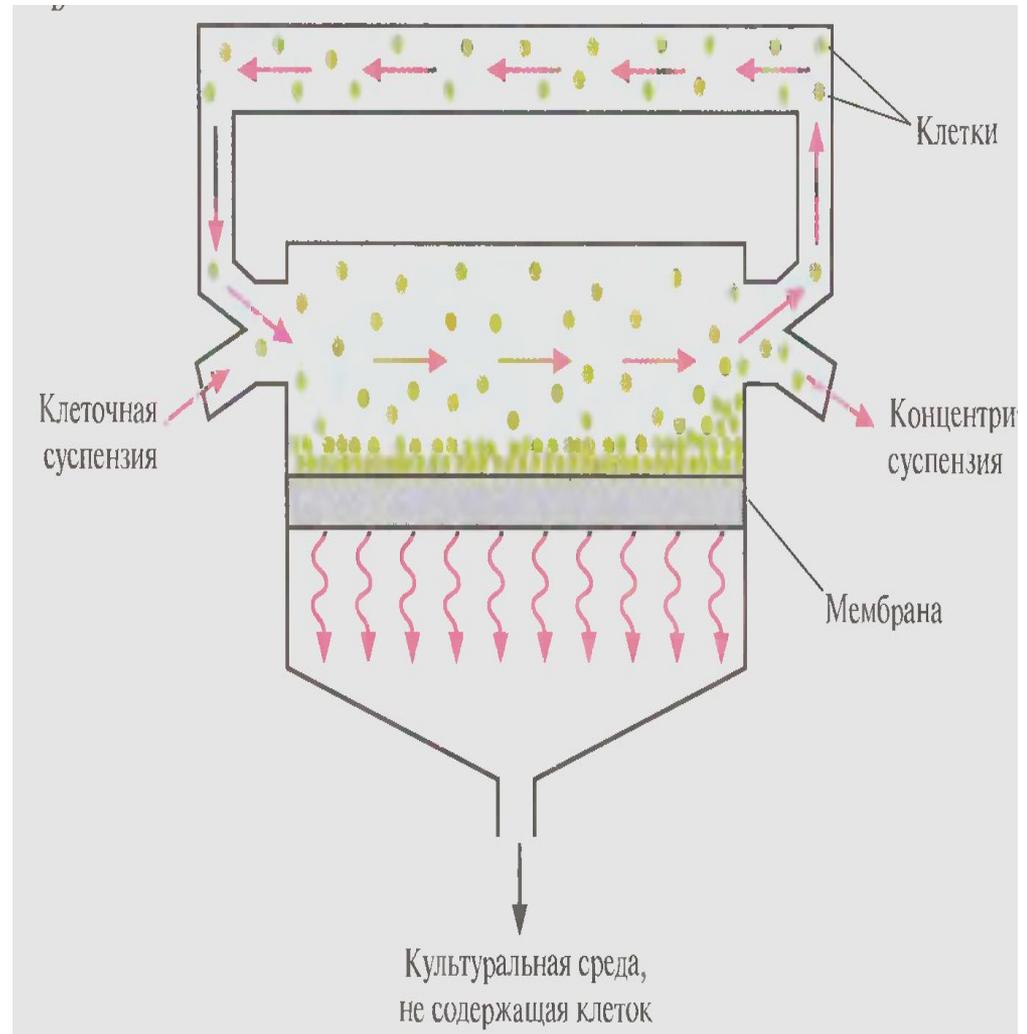
После культивирования и накопления биомассы клетки отделяют от культуральной жидкости

СПОСОБЫ ФИЛЬТРАЦИИ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ ДЛЯ СБОРА КЛЕТОК

ОБЫЧНАЯ ФИЛЬТРАЦИЯ ЧЕРЕЗ МЕМБРАНУ



ФИЛЬТРАЦИЯ С ПАРАЛЛЕЛЬНЫМ ПОТОКОМ КЛЕТОЧНОЙ СУСПЕНЗИИ



Сбор клеток осуществляют высокоскоростным центрифугированием

- Суспензию клеток непрерывно подают в барабан вращающейся центрифуги, в нем клетки концентрируются, а осветленная жидкость удаляется.
- Недостатки метода:
 - вероятна утечка м/о в ОС,
 - невозможность полного удаления клеток из культуральной среды.

Основные стадии биотехнологического процесса

1. приготовление и стерилизация питательных сред
2. приготовление посевного материала
3. культивирование
4. обработка культуральной жидкости
- 5. ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА БИОПРЕПАРАТА**
6. получение готовой продукции