



**МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ  
ПРОДУКТОВ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ  
ПРОИЗВОДСТВ**

## **Основные группы продуктов биосинтеза:**



- ❖ - биопрепараты на основе инактивированной биомассы клеток и продуктов переработки (кормовые дрожжи, грибной мицелии и др.)
- ❖ - биопрепараты на основе очищенных продуктов метаболизма микроорганизмов (витамины, аминокислоты, ферменты, антибиотики)
- ❖ - биопрепараты на основе жизнеспособных микроорганизмов (пробиотики, пекарские дрожжи, средства защиты растений, бактериальные удобрения и др.)
- ❖ - ослабленная биомасса микроорганизмов (живые вакцины)
- ❖ - жидкость (осветленная), полученная после отделения биомассы (пиво, квас, вино)
- ❖ - среда ферментации (кефир, йогурт, хлеб)



Конечным продуктом стадии ферментации является **культуральная жидкость** – суспензия микроорганизмов, содержащая накопленный продукт микробиологического синтеза.

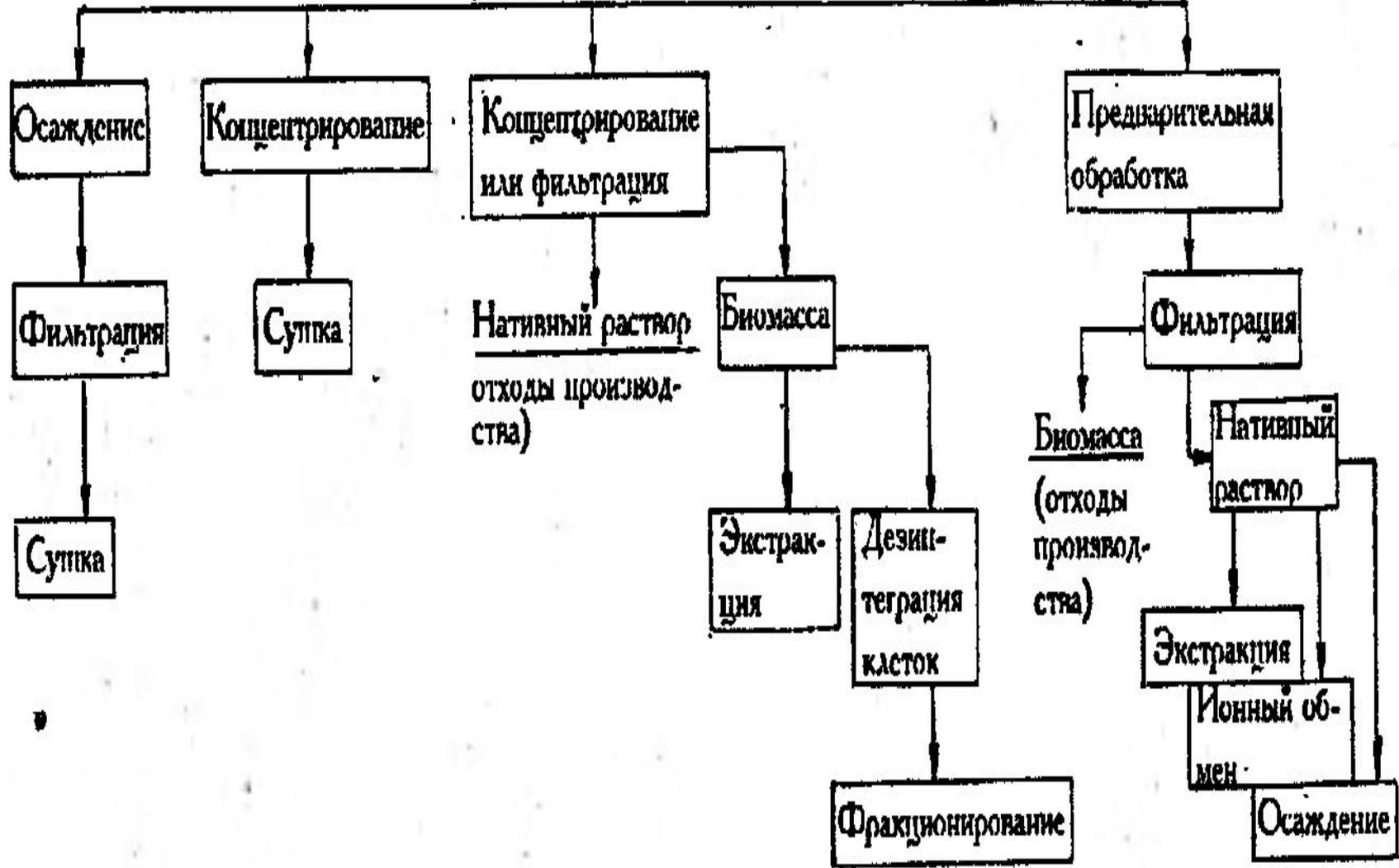
**Целевым продуктом** микробиологического синтеза может быть:

- ❖ сама **биомасса микроорганизмов** (инактивированная или живые клетки)
- ❖ **продукты метаболизма** (антибиотики, ферменты, витамины и т.п.), растворенные в культуральной жидкости или находящиеся внутри клеток.

**Эндометаболит** – целевой продукт находится внутри клетки (накапливается или входит в состав клеточных структур или оболочки)

**Экзометаболит** – целевой продукт выделяется клеткой в КЖ

# Культуральная жидкость





**Выделение препаратов *первой* группы:**

**I стадия** - концентрирование культуральной жидкости (или выделенной из нее биомассы)

**II стадия** - сушка

Выбор **технологии выделения продуктов *второй* группы** (на основе метаболитов ) зависит от **места основного накопления продукта:**

**– в культуральной жидкости**

- используются такие методы, как экстракция, ионный обмен, адсорбция, осаждение (кристаллизация)

**– внутриклеточно**

- используют экстракцию,

- или выделяют целевой продукт после **дезинтеграции (разрушения)** клеточной стенки



Процесс выделения продуктов биосинтеза из нативного раствора, как правило, сопровождается **концентрированием**.

КЖ после ферментации – 0,1-1% продукта

Нативный раствор после отделения биомассы – 0,1-2% продукта

После выделения продукта ~ 10% продукта

После очистки 50-80% продукта

Сушка



Выбор метода выделения определяется локализацией продукта и составом КЖ: реологическими и физико-хим. свойствами.

А также *свойствами целевого продукта:*

термолабильностью, значением рН, устойчивостью к хим. реагентам и т.д.

Учитываются требования, предъявляемые к готовой форме продукта:

- ❑ степень чистоты
- ❑ степень концентрирования



**Способы отделения мицелиальной массы  
от жидкой фазы.**

**Фильтрование и сепарирование культуральной жидкости**



**Первый этап** выделения большинства продуктов микробиологического синтеза — ***фракционирование культуральной жидкости***

— отделение биомассы продуцента от жидкой фазы.

- Фильтрация КЖ
- Сепарирование КЖ
- Седиментация
- Флотация



*Культуральные жидкости обычно являются сложными гетерогенными смесями большого числа компонентов.*

- **Дисперсная фаза:** мицелий или клетки микроорганизмов; твердые частицы питательных сред: мука, хлопья из кукурузного экстракта, мел и т.п.
- **Водная фаза:** растворенные минеральные соли, углеводы, белки, продукты лизиса микроорганизмов, *продукты биосинтеза*
- Пеногаситель

## Особенности фильтрации КЖ:



- необходимо фильтровать **большие** объемы разбавленных растворов (~0,1-2%);
- фильтрация должна проходить **максимально быстро**, т.к. продукты биосинтеза (антибиотики) в растворах **малоустойчивы**;
- фильтрация должна быть очень тщательной;
- присутствие в питательной среде **жира и др. несмешивающихся с водой веществ** ухудшает фильтруемость КЖ;
- фильтруемость КЖ затрудняется, если мицелиальная масса представляет собой сильно гидратированный белок (студенистые хлопья)
- «нити» мицелия забивают поры фильтра (**актиномицеты**).

(Скорость фильтрации не превышает 50 л/кв.м\*час)



Стадии фильтрования обычно предшествует **предварительная обработка КЖ**

**Цели обработки:**

1. обеспечить наиболее быструю фильтрацию КЖ (коагуляция клеток и примесей в более крупные и легко фильтруемые частицы);
2. обеспечить наиболее полный переход продукта в ту фазу, из которой его в дальнейшем удобно извлечь;
3. получить полупродукт, по качеству обеспечивающий следующие стадии выделения и очистки;

# Методы обработки КЖ с целью улучшения процесса фильтрации



## □ Коагуляция и флокуляция



### **1. Тепловая коагуляция белков**

Используется для термостабильных продуктов.

При температуре 70-80 °С нарушается нативная структура белков, они приобретают более жесткую структуру, образуют более крупные частички, и мицелий становится более проницаемым для воды.

### **2. Химическая коагуляция** (органические и неорганические кислоты,).

**Реагентная коагуляция** (соли алюминия, железа)

Применяется для химически стабильных продуктов (тетрациклины, аминогликозиды).

Химическая обработка с целью улучшения фильтруемости не должна идти в разрез с хим. обработкой с целью перевода АБ в наиболее удобную для его дальнейшего извлечения форму.



**3. Применение флокулянтов** – веществ, способных переводить в-ва коллоидной фракции белков в хлопьевидные осадки рыхлой структуры.

*«Мягкий метод», улучшает седиментационные и фильтрационные свойства суспензий, способствует **осветлению** жидкой фазы,*

В качестве флокулянтов используют жидкие иониты (высокомолекулярные полиэлектролиты):

- поли-(4-винил-N-бензилтриметиламмоний хлорид),
- полиакриламиды

## □ Применение наполнителей, улучшающих структуру осадка



Используют два способа:

- внесение наполнителей в КЖ
- образование наполнителей в КЖ в ходе химической реакции

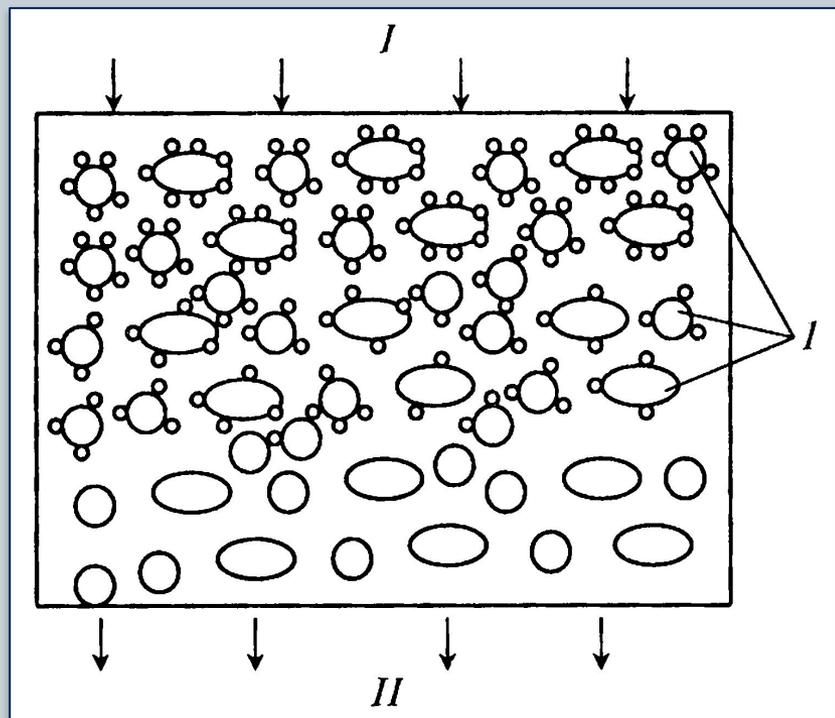
### ***Фильтровальные порошки - диатомит и перлит.***

***Диатомит*** (кизельгур) получают из инфузорной земли (осадочная порода, образованная из кремниевых панцирей древних диатомовых водорослей)

***Перлит*** - это вулканическое стекло (основная составляющая кремнезем -  $\text{SiO}_2$ )

Порошки загружают в количестве ~4-8% к объему КЖ. Взаимодействуют с твердой фазой, улучшают структуру осадка, уменьшают сопротивление фильтрации.

Для улучшения фильтруемости также можно использовать ***древесную муку***



*I* — гранулы фильтровального порошка с осажденными на них клетками микроорганизмов; *I* — культуральная жидкость; *II* — фильтрат

## ❑ Образование наполнителей в культуральной жидкости



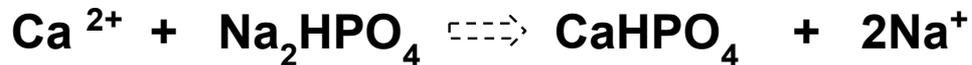
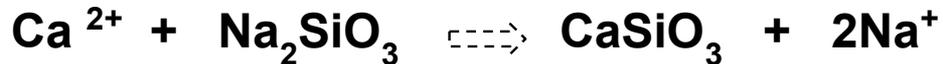
Эффективный способ коагуляции - вносят в КЖ соли или добавляют кислоту с целью образования **нерастворимых солей**.

Образующиеся частицы осадка «захватывают» клетки мицелия и предотвращают его слипание. «Комковатая масса» легко фильтруется.

**Например:**



на  $\text{CaCO}_3$  адсорбируются белковые примеси, и структура осадка улучшается.



Образующиеся частицы осадка захватывают клетки микроорганизмов и примеси.

**Выбор реагентов производят, учитывая свойства АБ.**

**Методы обработки КЖ, обеспечивающие улучшение проведения дальнейших операций выделения и очистки**  
(экстракции, сепарации, адсорбции)

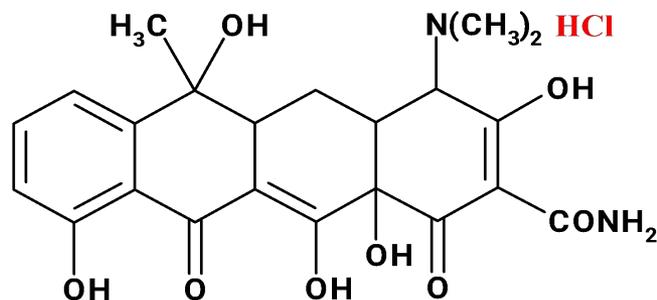




**Например,**

Тетрациклин адсорбирован на мицелиальной массе.

Предварительная обработка КЖ – **подкисление до pH 1,3 - 2,**  
при котором АБ переходит в раствор, образуя соль.



Дальнейшее выделение **осаждением.**

*При выделении продуктов методом ионообмена:*

Нативный раствор должен быть освобожден от конкурирующих с АБ ионов.

При сорбции на катионитах предварительно связывают:

ионы  $\text{Ca}^{+2}$  – щавелевой кислотой

ионы  $\text{Mg}^{+2}$  – триполифосфатом Na

ионы  $\text{Fe}^{+2}$  – желтой кровяной солью

*При выделении продуктов методом экстракции:*

**Необходимо** удалить вещества, кот. могут образовывать

1. осадки (ионы  $\text{Ca}^{+2}$ )
2. эмульсии (прежде всего белковые соединения)

**Проводят :**

1. термическую и химическую коагуляцию белков,
2. изменяют  $pH$ ,
3. добавляют дезэмульгаторы

**Производство эритромицина:**

обработка щавелевой кислотой связывает ионы  $\text{Ca}^{+2}$ , которые при экстракции осаждаются на деталях сепаратора.



Лучшие результаты достигаются при комбинировании методов.

***Производство пенициллинов:***

термообработка - нагревают до 70°C под вакуумом,

pH 5,8 - 6,0,

добавляют цетазол (0,01-0,1% к объему нативного раствора).

# Седиментация





**Отстаивание** – седиментация – осаждение под действием силы тяжести

Используют:

- для отделения животных и растительных клеток, мицелиальных грибов и **пивных дрожжей**,
- для отстаивания активного ила,
- для отделения нерастворимых компонентов среды (мука, дробина).

**Размер частиц от 2,3 мкм до 1 мм.**

Для успешного проведения процесса отстаивания не обязательно, чтобы сами микроорганизмы были крупными, они могут концентрироваться на хлопьях, агломератах.

Часто проводят предварительную **коагуляцию или флокуляцию**

Прикрепленные к длинным молекулам коагулянтов или флокулянтов несколько клеток создают основу агломерата, который в результате имеет больший вес и меньшую подвижность, что приводит к седиментации осадка.



***Недостатки метода:***

- большая продолжительность процесса (порядка нескольких часов),
- не очень хорошее разделение (в осадке концентрация биомассы не превышает 1—3 %).

***Седиментации*** с последующей ***декантацией*** надосадочной жидкости могут быть подвергнуты КЖ перед фильтрованием

# Фильтрация КЖ





**Фильтровальное оборудование** по *принципу работы* делят на фильтры непрерывного и периодического действия

По *характеру движущей силы* – на фильтры работающие под давлением, под вакуумом и фильтр-прессы

Выбор фильтра определяется его *поверхностью, требованиями предъявляемыми к фильтрату или осадку, свойствами суспензии*

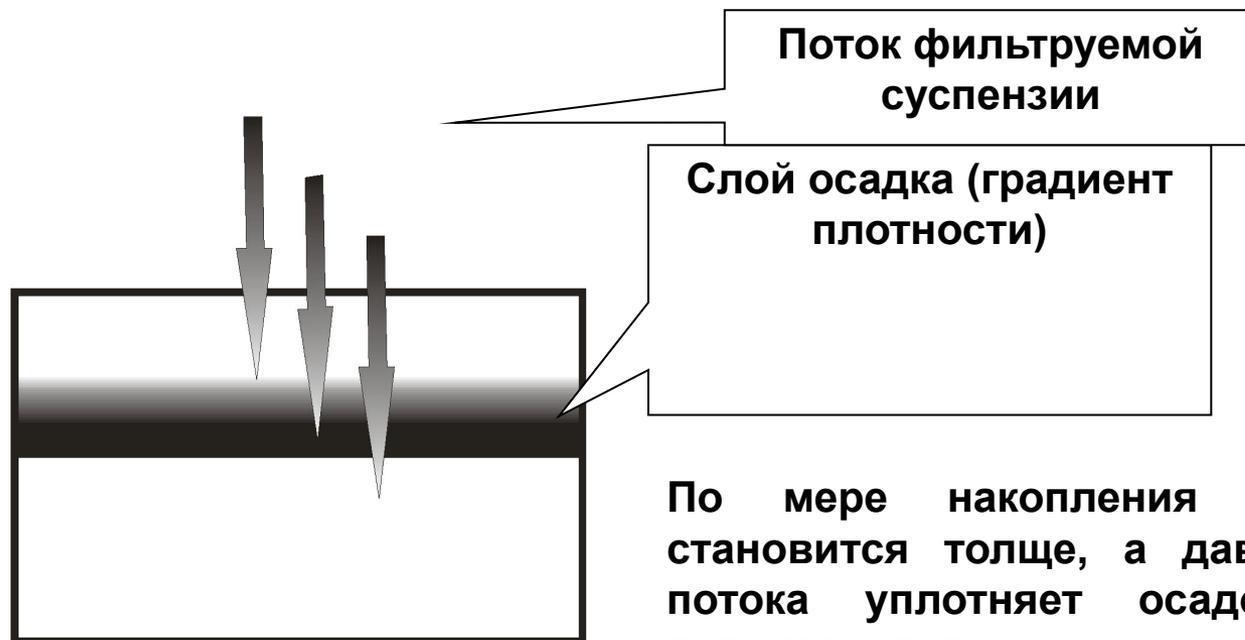
#### **Требования к фильтрату:**

допустимое остаточное содержание твердой фазы в фильтрате, ее дисперсность и допустимое разбавление фильтрата

#### **Требование к осадку:**

влажность, необходимость промывки, возможное внесение наполнителей

Одна из важнейших характеристик процесса – скорость фильтрования, т.е. кол-во фильтрата, получаемого с единицы фильтрующей поверхности в единицу времени



По мере накопления осадка слой его становится толще, а давление со стороны потока уплотняет осадок. Сопротивление потоку растет.

Наблюдается явление концентрационной поляризации фильтра. Наиболее сильно проблемы заметны, когда направление фильтрации перпендикулярно плоскости фильтра.

При фильтрации КЖ вся фильтрующая поверхность закрывается микроорганизмами. Постепенно увеличивается толщина осадка.

Осадки большинства микробных клеток относятся к разряду **сжимаемых**, то есть уплотняющихся, поэтому со временем скорость фильтрации будет заметно **уменьшаться**.

Для облегчения фильтрации микробных суспензий и уменьшения перепадов в скоростях фильтрации создают **грунтовый** или **намывной слой**.

Если КЖ содержит **небольшое кол-во осадка** (0,2-0,7%) (пенициллы, аспергиллы), на фильтровальную поверхность наносят **грунтовый слой** толщиной 1,5-3 мм. Скорость диффузии возрастает в 1,5-2 раза.

Если КЖ содержит **значительное кол-во мелкого осадка** (4-20% ) (актиномицеты), то наносится толстый **намывной слой** (100-150 мм) с постоянно обновляющейся поверхностью.

## Барабанный вакуум-фильтр





### Преимущества **барабанного вакуум фильтра:**

- непрерывное действие,
- механизация,
- удобны для фильтрации больших объемов,
- конструкции с намывным или грунтовым слоем и с постоянно обновляющейся фильтрующей поверхностью (для КЖ актиномицетов, дрожжей).

Используется **специальный нож с** микрометрической подачей для среза осадка.

С каждым оборотом барабана нож подается к центру, срезая нафильтрованный осадок вместе с тонким слоем дренажа, обновляя, таким образом, фильтрующую поверхность; поэтому скорость фильтрации не снижается.

Во время намывки микрометрический нож отключается.

По окончании намыва микрометрический нож остается на определенной глубине среза - около 0,5 мм.

Для создания намывного слоя используют диатомит, перлит, древесную муку

И грунтовой, и намывной слой наносят предварительной фильтрацией порошков (концентрация в воде 1-2%). Ф-ция занимает не более часа.

Производительность барабанного фильтра ~0,2 куб.м/кв.м\*час

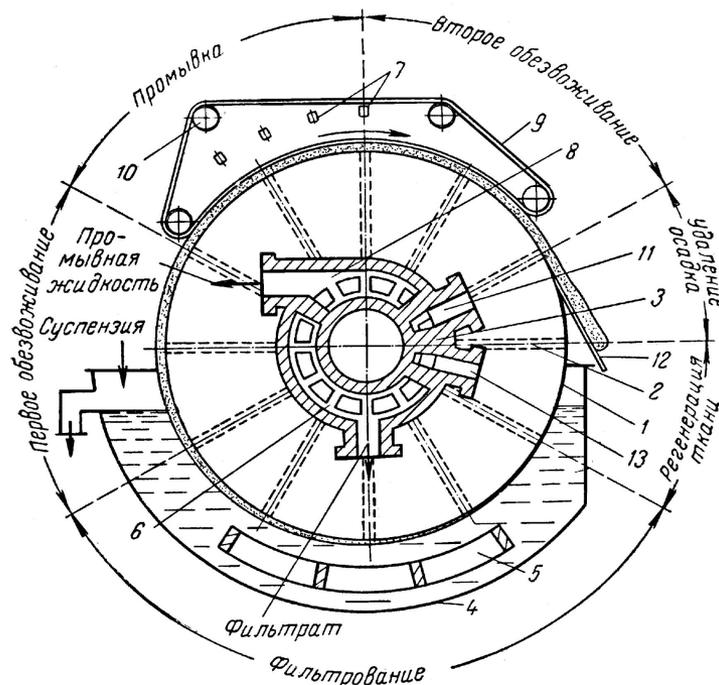


Рис. 2. Схема действия барабанного вакуум-фильтра с наружной поверхностью фильтрования:

1 — барабан; 2 — соединительная трубка; 3 — распределительное устройство; 4 — резервуар для суспензии; 5 — качающаяся мешалка; 6, 8 — полости распределительного устройства, сообщающиеся с источником вакуума; 7 — разбрызгивающее устройство; 9 — бесконечная лента; 10 — направляющий ролик; 11, 13 — полости распределительного устройства, сообщающиеся с источником сжатого воздуха; 12 — нож для съема осадка.

В корыто барабанного вакуум-фильтра подается КЖ и начинается основная фильтрация.

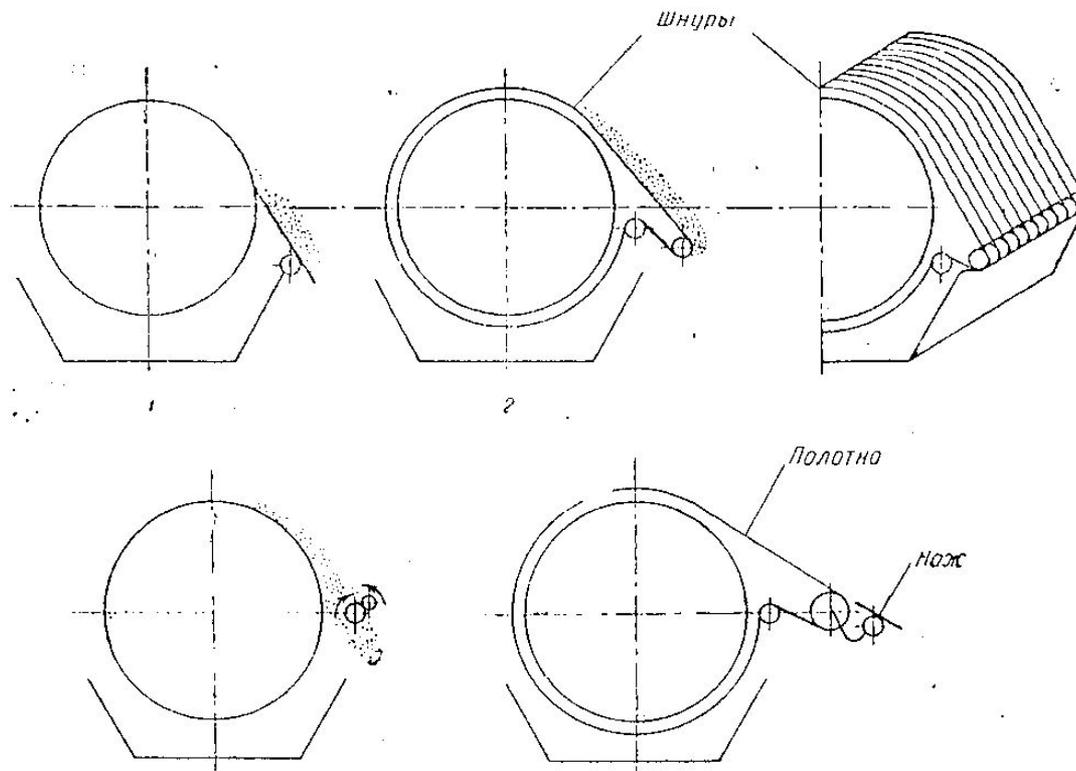
Фильтрацию ведут до тех пор, пока остаточная толщина вспомогательного фильтрующего материала не будет 5-8 мм.

Глубина погружения барабана в корыто зависит от х-ра осадка и требований к его промывке и обезвоживанию.

Создание зон фильтрации, сушки, промывки и отдувки осадка осуществляется с помощью неподвижной распределительной головки, разделенной на камеры, которые соответственно соединены с вакуум-приемником фильтрата, вакуум-приемником промывных вод и источником сжатого воздуха.

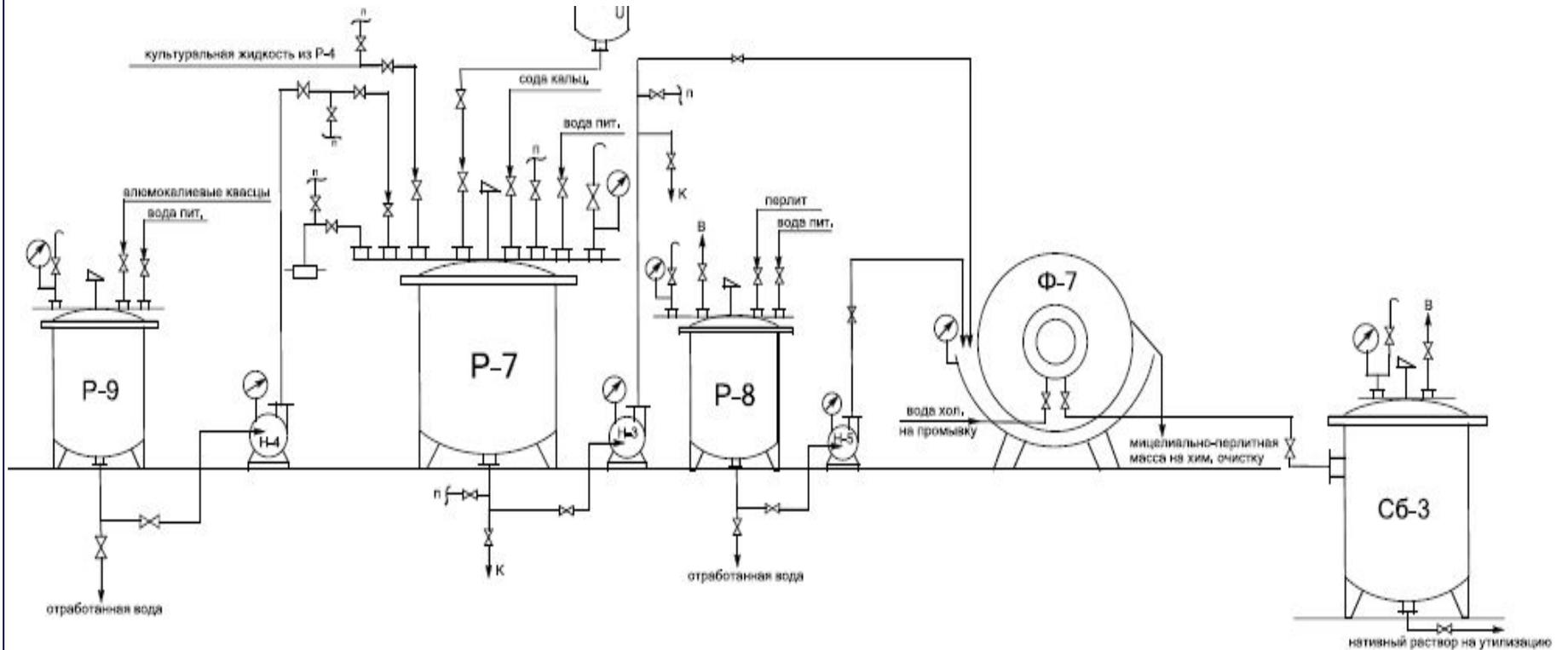
(Принцип работы см. Колунянц, стр. 151)

## Способы съема осадка



1. ножевой, 2. струнный, 3. съемный валик, 4. бесконечное полотно

# Схема аппаратного оформления фильтрации с намывным слоем



## Фильтр-прессы

### **Достоинства:**

- большая движущая сила
- большая площадь ф-ции (для улучшения фильтруемости на плиты намывают вспомогательные порошки)

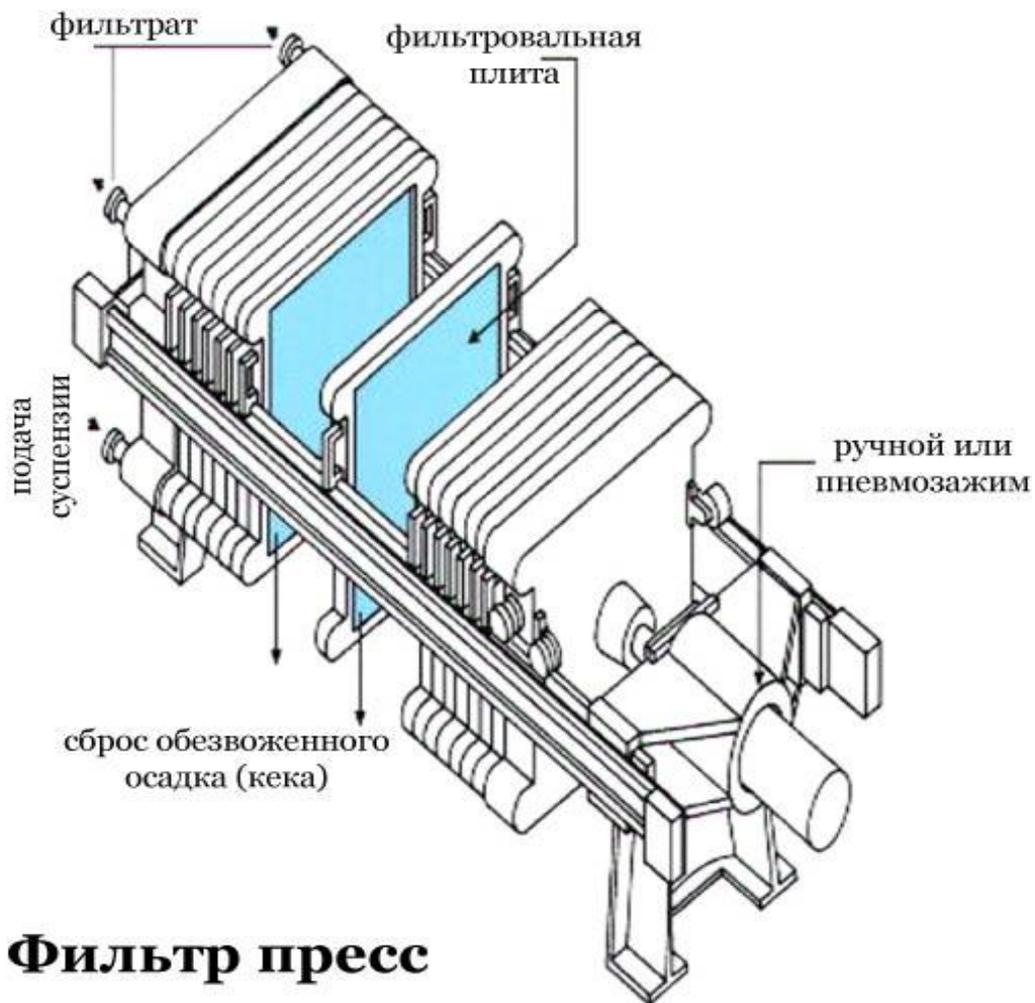
### **Недостатки:**

- поверхность не обновляется, следовательно скорость фильтрации снижается (средняя скорость не превышает 400-200 л/м\* час)
- большое число вспомогательных операций, непроизводительных затрат, тяжелые условия работы
- занимают много места

Два типа – рамные и камерные

(Принцип работы см. Колунянц, Гапонов)





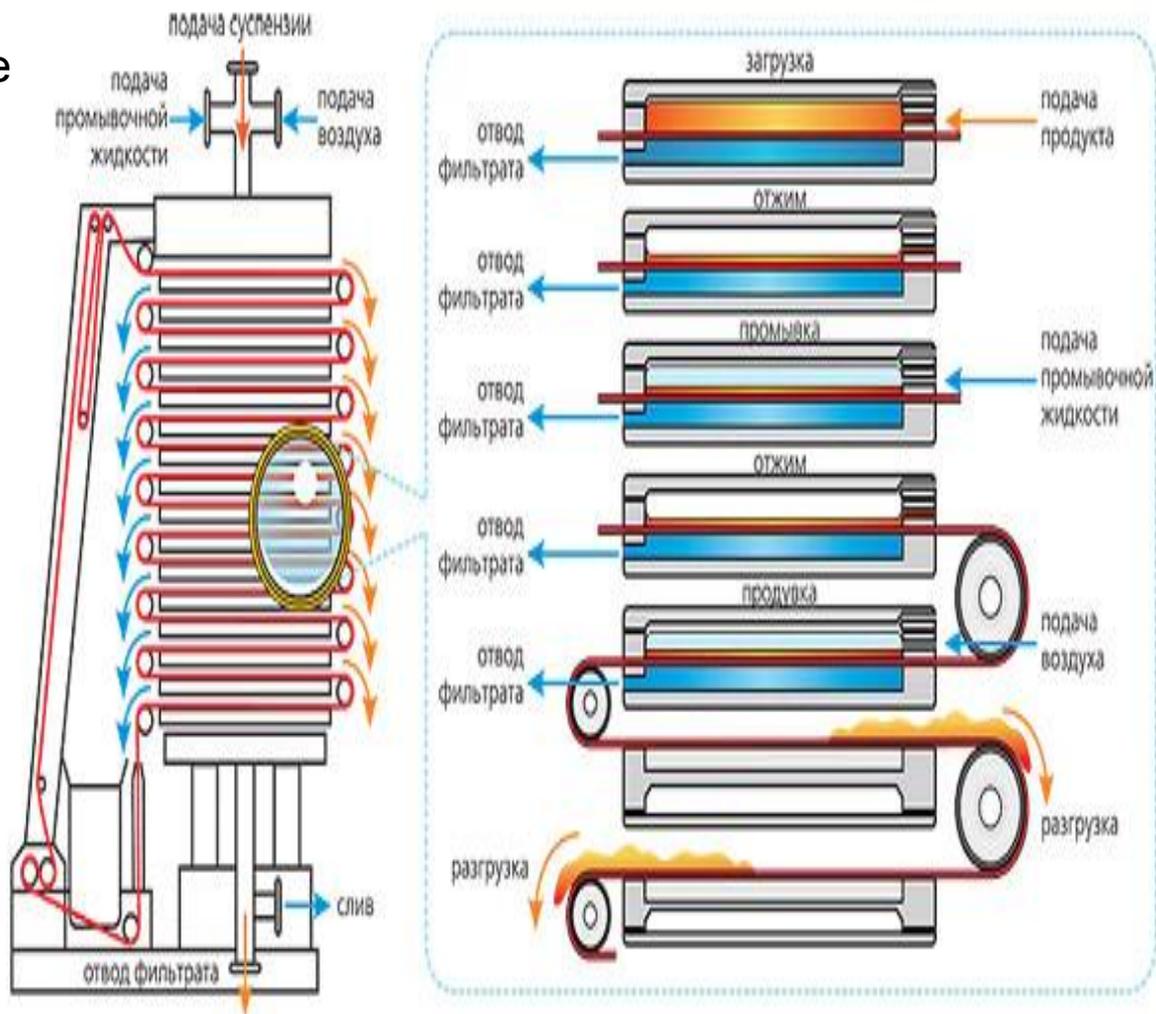
(Принцип работы см.  
Колунянц, Гапонов)

## Автоматические камерные фильтр-прессы ФПКАМ

В автоматической программе  
осуществляются следующие  
операции:

- фильтрация,
- промывка,
- прессование,
- сьем осадка,
- подъем и опускание  
фильтрующих плит

Развитая фильтрующая  
поверхность  
Занимают меньше площади



## Средние показатели работы фильтров

Показатели, определяющие метод фильтрации и выбор фильтра	Ленточный фильтр	Барабанный вакуум-фильтр	Фильтр-пресс ФПАКМ
Площадь поверхности фильтрации, м <sup>2</sup>	До 10	До 40	До 50
Удельная производительность по фильтрату при фильтрации различных суспензий, м <sup>3</sup> /(м <sup>2</sup> ·ч)			
с кристаллическими веществами	—	2—4	4—8
с кристаллическими и аморфными веществами	0,15—0,4	0,1—0,2	0,2—0,5
с бактериальными клетками или актиномицетами*	0,15—0,4	0,1—0,2	0,2—0,5
с мицелиальными грибами	0,5—2,0	0,5—1,0	1,0—4,0
Технико-экономические показатели работы при содержании твердой фазы в суспензии, г/л			
до 5*	Средние	Средние	Средние
» 10*	»	»	Высокие
» 150	Высокие	»	Средние
свыше 150	Средние	Высокие	Низкие*
Получение чистого фильтрата	Низкие	Средние	Высокие
Промывание осадка	Средние	Высокие	Средние
Выполнение узлов фильтров из кислотостойкой-стали или титана	»	»	Низкие
Гуммирование отдельных узлов	»	Средние	»

# Мембранные фильтр-прессы



# Сепарирование (центрифугирование) КЖ



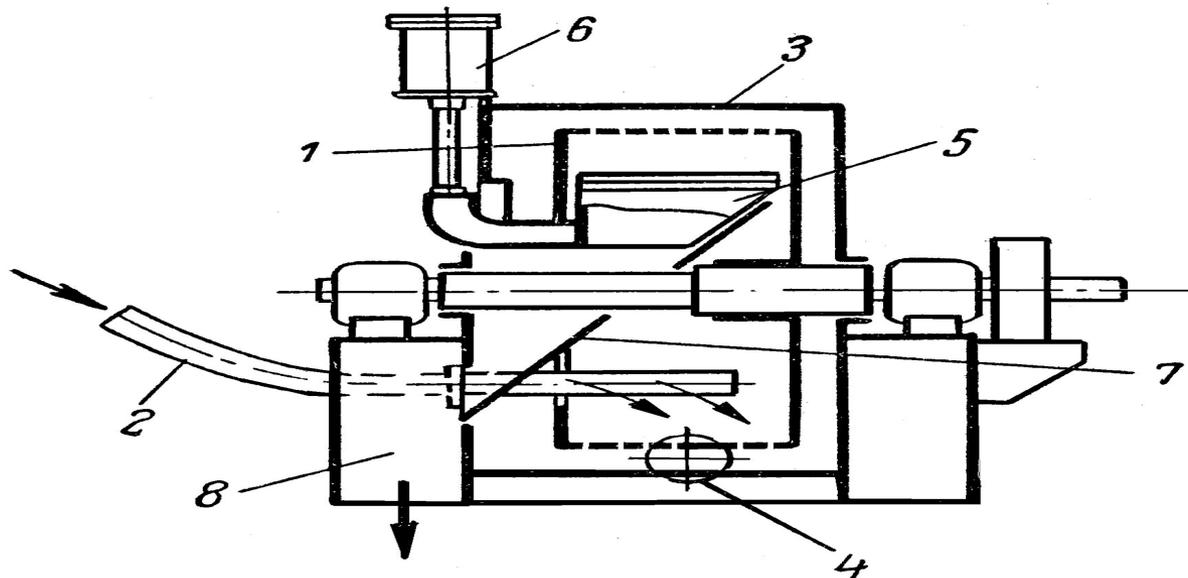


Метод целесообразен, если в КЖ содержится незначительное количество твердой фазы или **биомасса – целевой продукт**

Практически применяется для отделения:

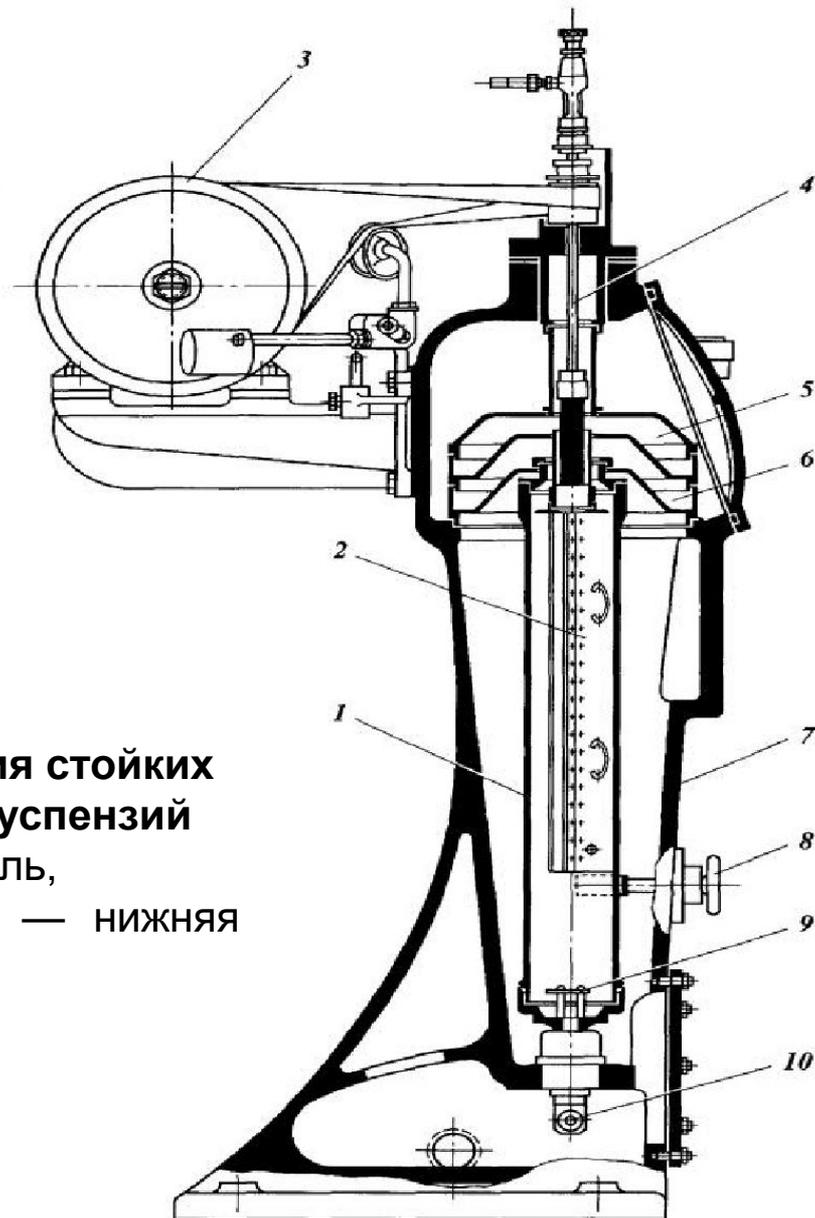
- кормовых и пекарских дрожжей, грибов;
- бактериальных культур (биоспорин);
- витамин В12

Сепарирование проводят одноступенчатое или многоступенчатое



**Рис. 4.** Горизонтальная центрифуга с ножевым устройством для удаления осадка:

*1* — перфорированный ротор; *2* — труба для подачи суспензии; *3* — кожух; *4* — штуцер для удаления фугата; *5* — нож; *6* — гидравлический цилиндр для подъема ножа; *7* — наклонный желоб; *8* — канал для удаления осадка.



**Трубчатые сверхцентрифуги для разделения стойких эмульсий и высокодисперсных твердых суспензий**

1 — ротор, 2 — крыльчатка, 3 — электродвигатель,  
4 — вал, 5 — верхняя сливная тарелка, 6 — нижняя  
сливная тарелка, 7 — станина, 8 — тормоз,  
9 — отбойный диск, 10 — питающая труба



Разные типы центрифуг оценивают по **фактору разделения**  $\Phi_p$ , показывающему, во сколько раз ускорение центробежного поля больше ускорения свободного падения

$$\Phi_p = \frac{\omega^2 R}{g}$$

У обычных центрифуг этот фактор составляет **до 3500**, а у суперцентрифуг выше — **5000 - 7000**.

Ультрацентрифуги могут иметь  $\Phi_p$  до **20 000**.

Скорость вращения барабана варьируется от **3000 до 30 000 об/мин**.



## Марки сепараторов для фракционирования КЖ

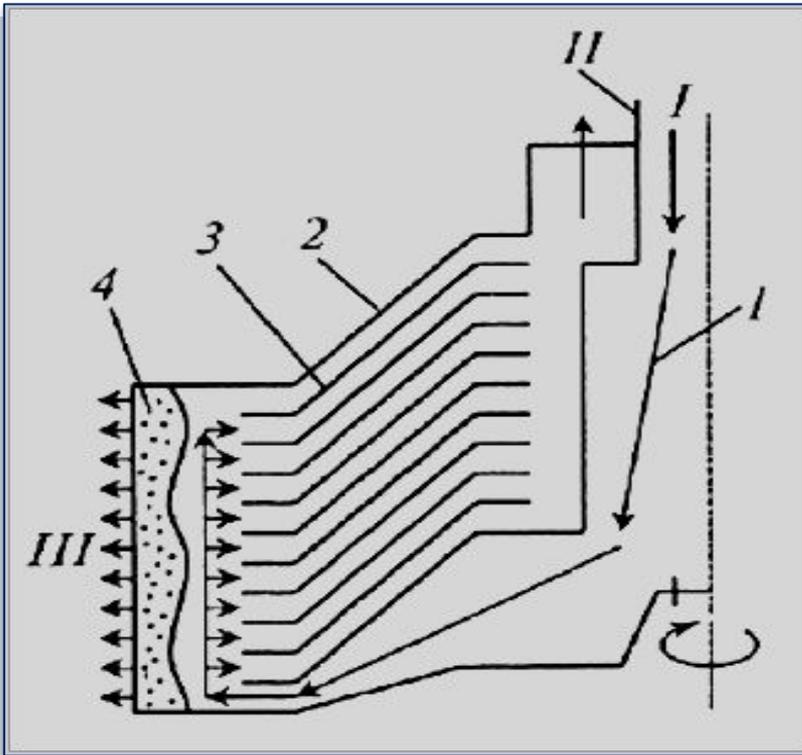
- ❑ ДСГ-35 (негерметизированный тарельчатый сепаратор-сгуститель с центробежной непрерывной выгрузкой осадка и свободным сливом жидкого компонента) – для дрожжей
- ❑ Центробежный сепаратор фирмы «Альфа-Лаваль» **АХ 215** с вертикальным ротором.
- ❑ Центробежные сепараторы фирмы «Вестфалия»:  
**КА 30** (производительность 15 м<sup>3</sup>/час),  
**ДА-30** (производительность 30 м<sup>3</sup>/час) - тарельчатый

### ***Преимущества:***

- высокая производительность
- высокая степень концентрирования

### ***Недостатки:***

- сложность конструкции
- энергоемкость



*I* — полый вал; *2* — корпус; *3* — коническая тарелка; *4* — слой осадка; *I* — вход жидкости; *II* — выход жидкости; *III* — выход сгущенной биомассы

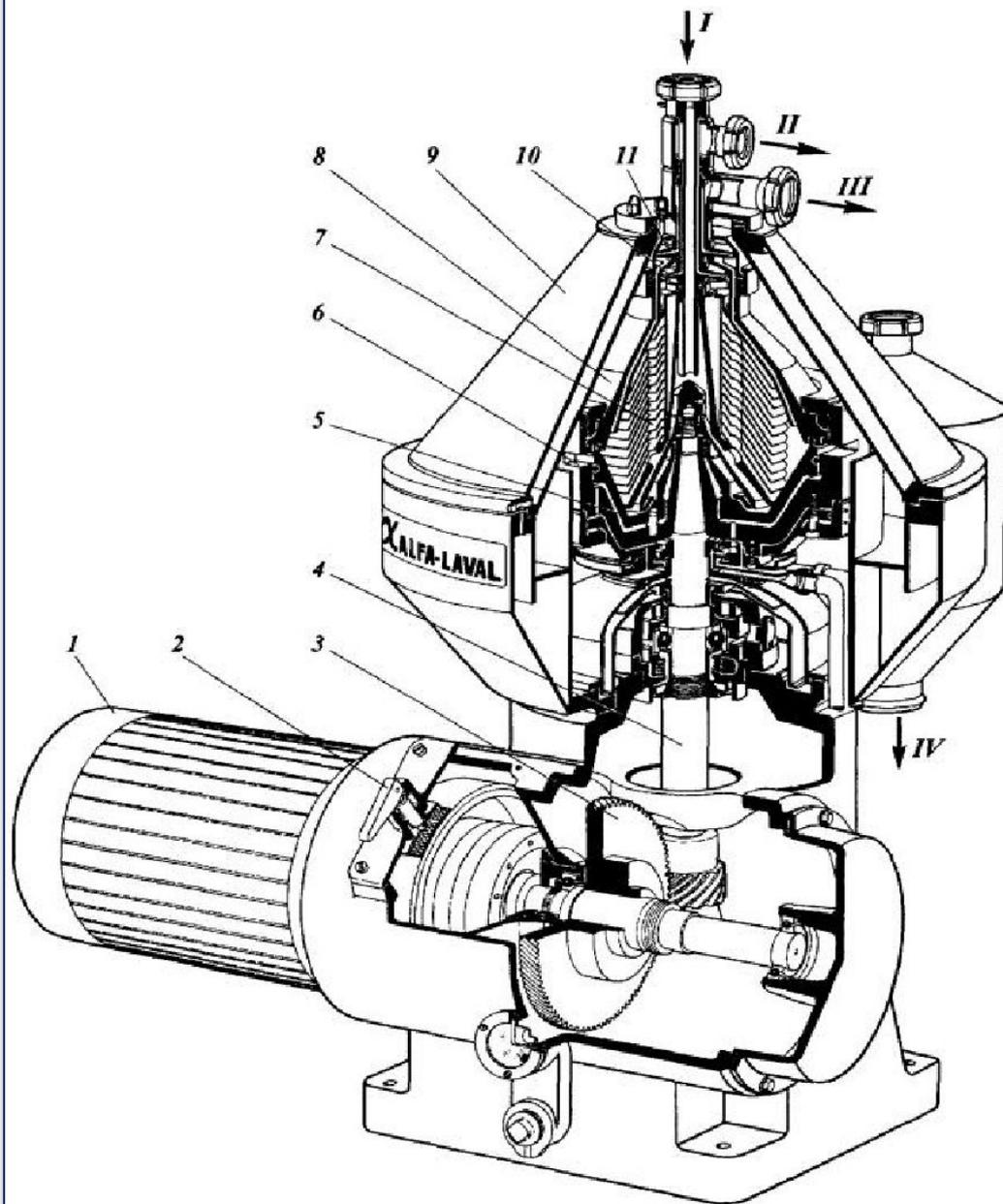
Тарельчатый сепаратор имеет полый вал, неподвижный корпус с размещенным в нем пакетом вращающихся с валом конических тарелок, находящихся одна над другой так, что образуется коническое пространство.

Жидкость входит по полому валу под нижней тарелкой и доходит до внешнего цилиндрического края корпуса. Далее она движется между коническими тарелками к центробежному коллектору, из которого осуществляется выход жидкости.

Частицы биомассы отбрасываются по направлению от центра вращения и сползают по коническим поверхностям тарелок к боковой стенке корпуса, создавая в конечном счете возле нее слой сгущенной биомассы.

## AX 215 (Альфа-Лаваль)



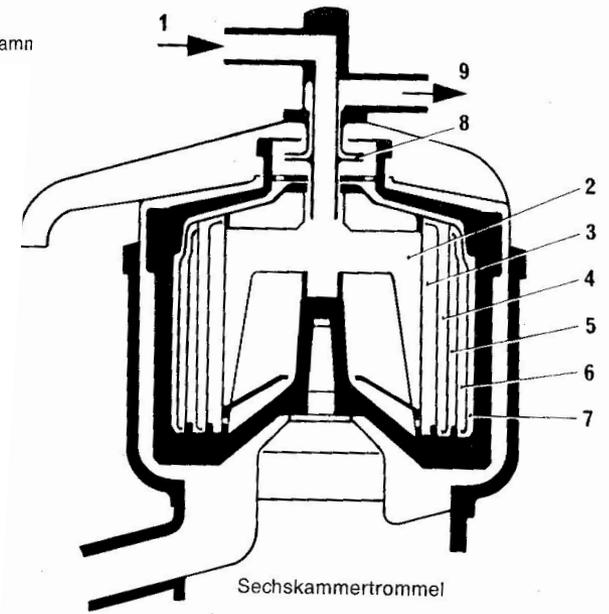
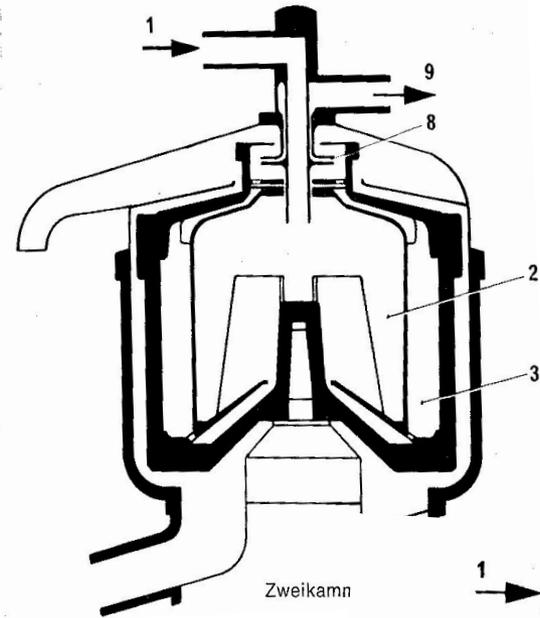
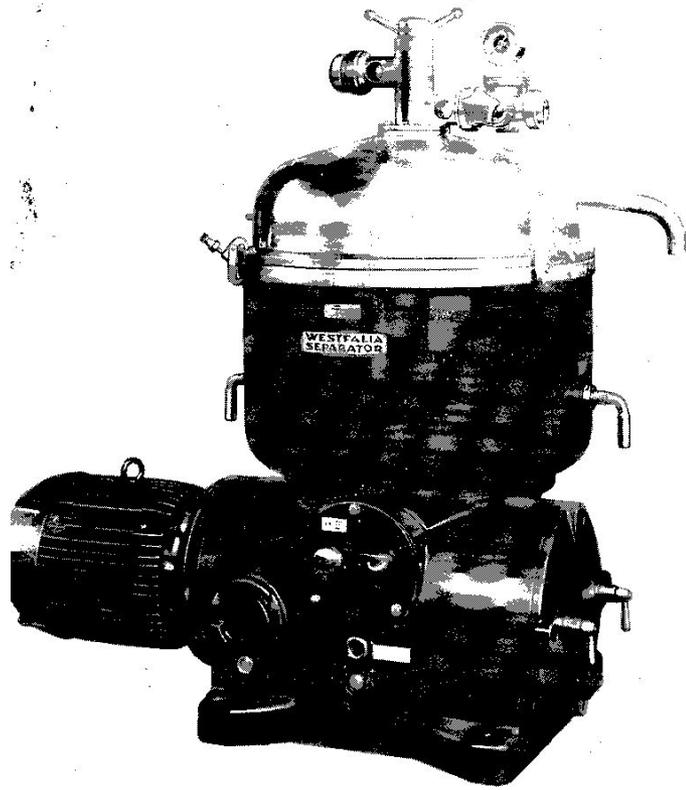


### Саморазгружающийся тарельчатый сепаратор фирмы: —Альфа-Лаваль:

1 – электродвигатель,  
 2 – тормоз, 3 - червячный редуктор, 4 – вал,  
 5 - подвижное днище,  
 6 - разгрузочные щели,  
 7 - пакет тарелок, 8 – ротор,  
 9 – кожух, 10 - напорный диск легкой жидкости,  
 11 - напорный диск тяжелой жидкости.

Потоки: I - исходная жидкость, II - легкая жидкость,  
 III - тяжелая жидкость,  
 IV - осадок





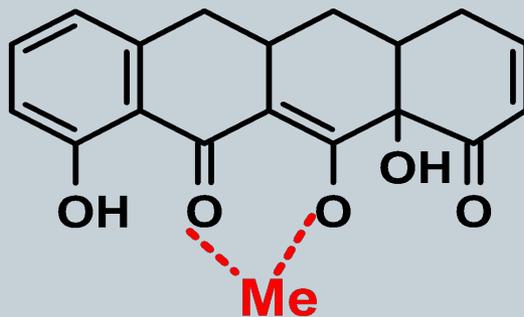
- KA 30-86-076 (mit Zweikammertrommel)
- KA 30-06-076 (mit Sechskammertrommel)
- KA 30-...-576 (Ausführung für explosionsgefährdete Räume)

# Выделение антибиотиков из нативного раствора методом осаждения

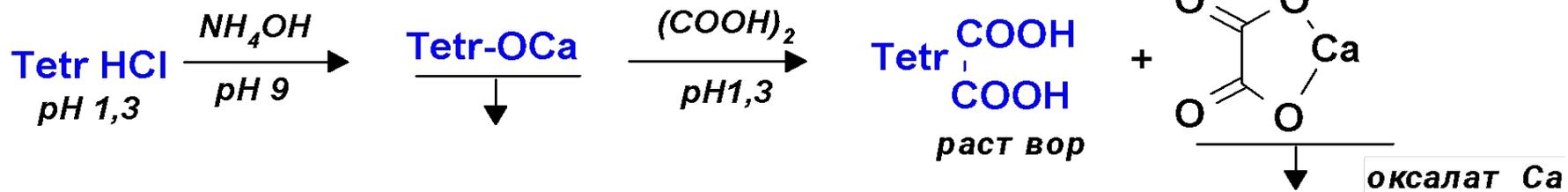
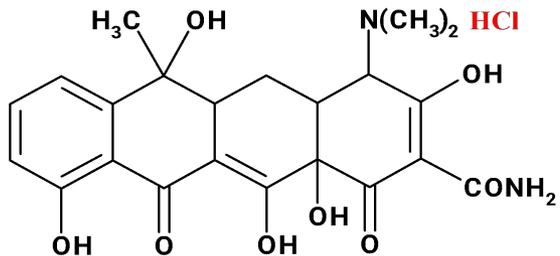


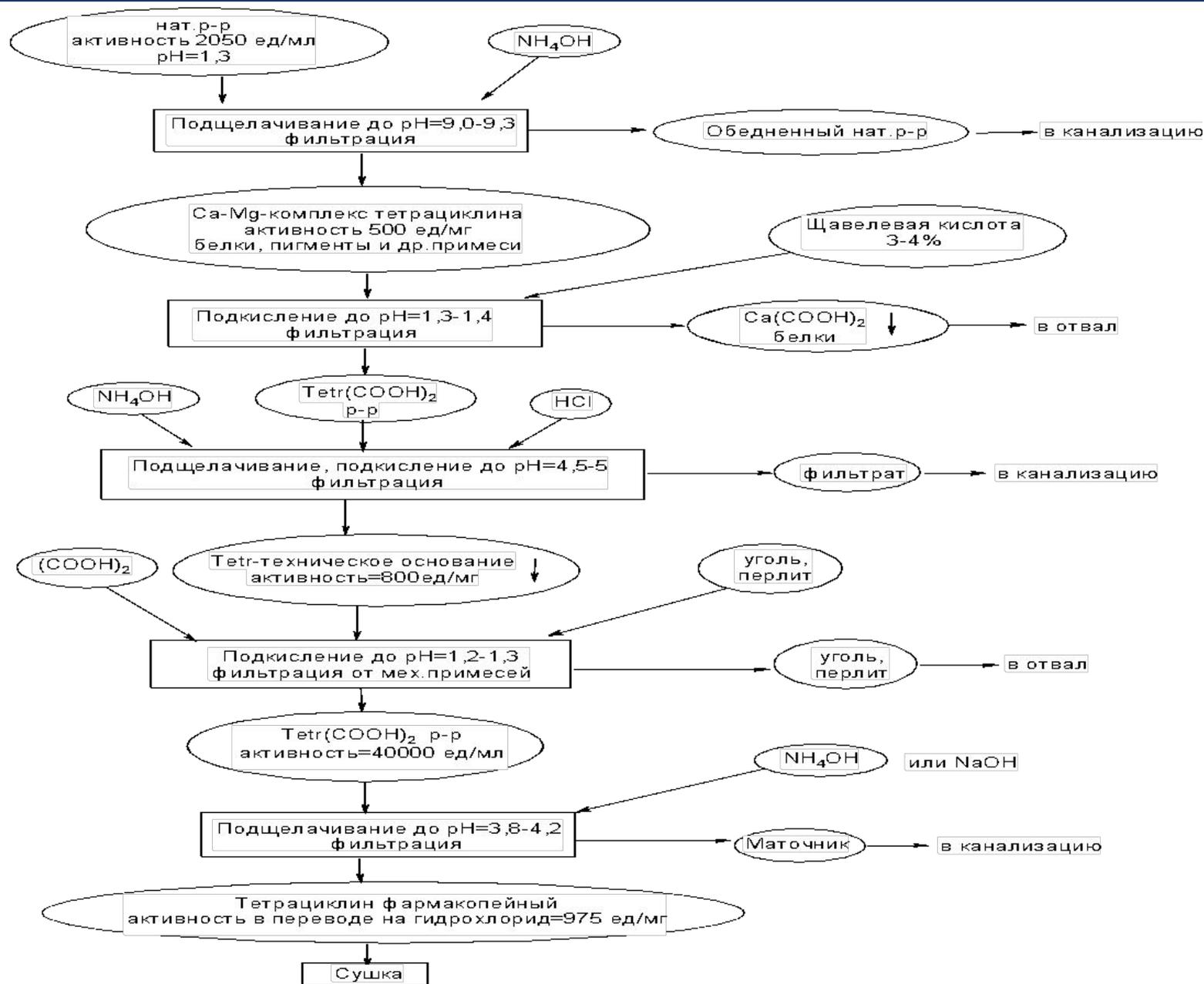
В промышленности метод осаждения применяют для антибиотиков тетрациклинового ряда (тетрациклин, окситетрациклин)

Эти антибиотики дают комплексы с ионами 2-х валентных металлов:



Выделяют в виде трудно растворимой Ca-соли.



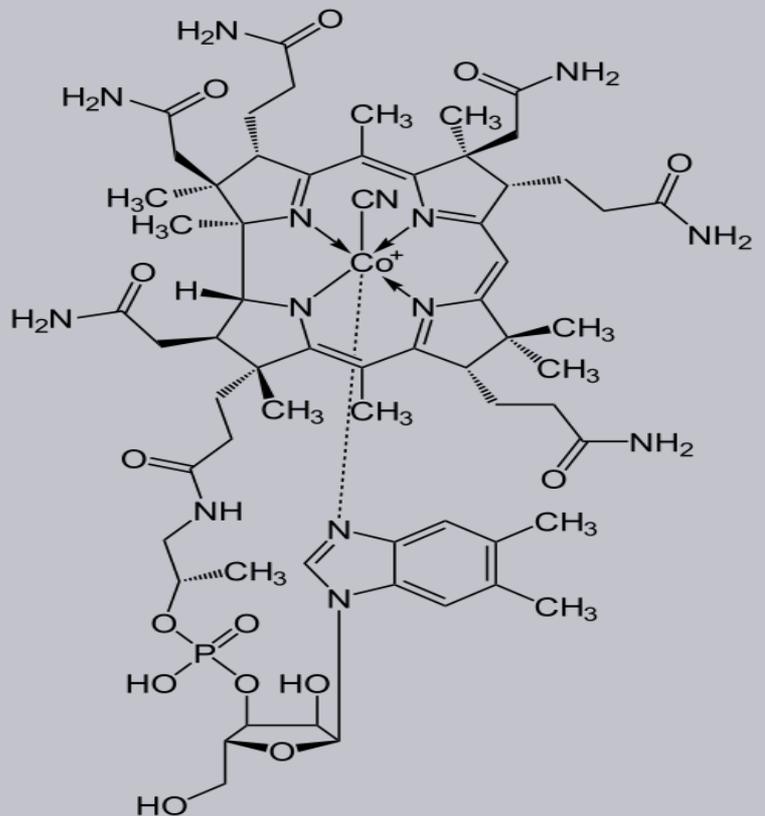




1. методом осаждения достигается быстрое концентрирование антибиотика при комнатной температуре;
2. в методе отсутствуют органические растворители ;
3. метод огне-, пожаробезопасен ;
4. метод прост в аппаратном оформлении.

**Недостаток:** плохая избирательность процесса,  
продукт менее чистый, чем при других методах выделения

## Химическая очистка витамина В<sub>12</sub> методом осаждения



Для химической очистки витамина В<sub>12</sub> используются его способность образовывать **аддукты (комплексы) с фенолом, резорцином или крезолами.**

Для этого водный концентрат витамина обрабатывают водным раствором фенола, отделяют фильтрованием выделившийся комплекс, затем его разлагают путем обработки водным ацетоном. Витамин при этом отделяется в виде осадка, а фенол и примеси уходят с водно-ацетоновыми маточными растворами.

Для окончательной очистки препарата осуществляют **одно- или двукратное переосаждение цианокобаламина из водного раствора ацетоном.**