

# **Непрерывное культивирование микроорганизмов**

## **непрерывное культивирование более перспективно**

**Сущность:**

- в ферментаторе поддерживаются постоянные условия среды,**
- микроорганизмы остаются в определенном физиологическом состоянии;**
- подается свежая питательная среда и удаляется избыток среды с продуктами метаболизма,**
- поддерживается фаза экспоненциального роста.**

Если для культивирования продуцента используется один ферментатор - **ГОМОГЕННО-непрерывный процесс.**

Если используется батарея ферментаторов - это **гетеро-непрерывный процесс**, так как в каждом ферментаторе, соединенном в батарею, поддерживаются постоянные условия.

**При непрерывном культивировании микроорганизмов отсутствует смена фаз развития культуры.**

**Скорость потока питательной среды и отвода культуральной жидкости из системы необходимо отрегулировать, чтобы концентрация клеток оставалась постоянной.**

**В стерильных условиях непрерывный метод обеспечивает сохранение культуры в физиологически активном состоянии длительное время.**

# Две разновидности непрерывных процессов

- тубулярные;

питательная среда и посевной материал непрерывно поступают в аппарат, в котором нет обратного смешения.

- хемотратные;

питательная среда и посевной материал поступают в аппарат, в котором происходит постоянное перемешивание.

# Тубулярный процесс

Жидкость на входе в аппарат смешивается с посевным материалом.

По мере их продвижения в аппарате одновременно осуществляются рост биомассы и процесс ферментации.

Движение может быть **горизонтальным** или **вертикальным** (аппарат башенного типа: движение жидкости снизу вверх) для анаэробных процессов.

# Тубулярный процесс

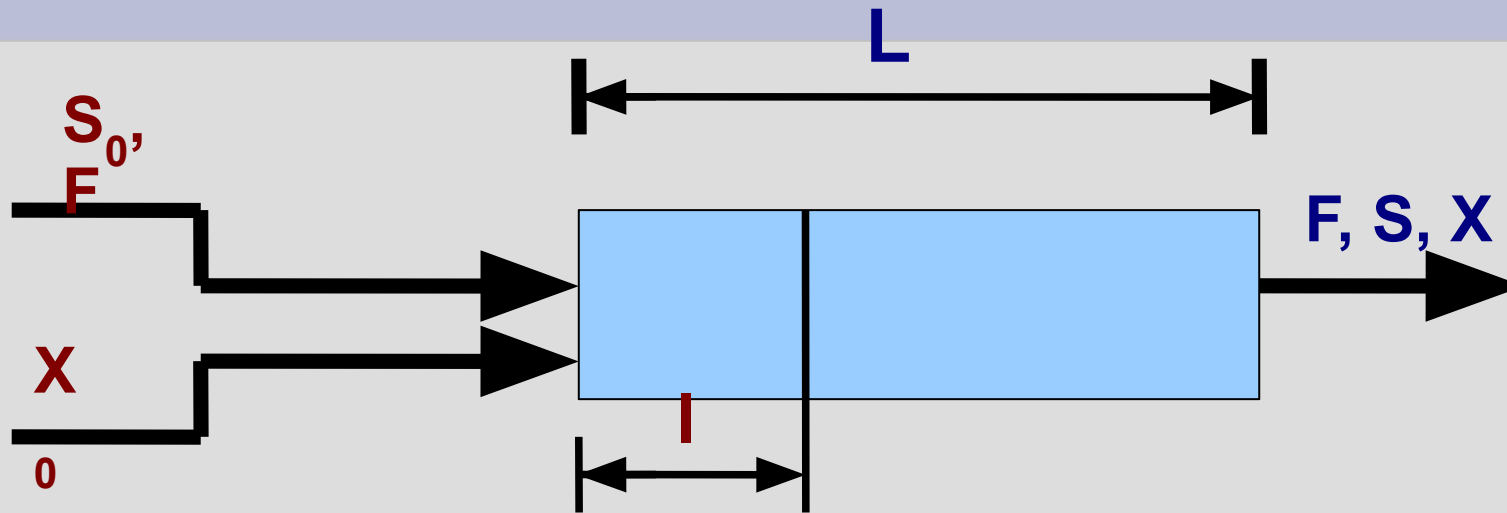


Схема тубулярного непрерывного процесса ферментации

# Тубулярный процесс

Время движения жидкости  $t_1$  от входа в аппарат до любого сечения по длине потока  $l$  можно рассчитать как

$$t_1 = l \cdot A / F,$$

где  $A$  – площадь сечения потока;  $F$  – объемный расход жидкости.

На выходе из аппарата (при  $l = L$ ) время пребывания жидкости составляет:

$$t_L = L \cdot A / F$$



# Тубулярный процесс

**Тубулярный процесс с учетом закономерностей протекания процесса ферментации полностью подобен периодическому.**

**Сложность: в непрерывной подаче посевного материала решается путем организации рециркуляции части потока с выхода аппарата на вход.**

# Тубулярный процесс



**Схема тубулярного непрерывного процесса с рециркуляцией посевного материала**

# Тубулярный процесс

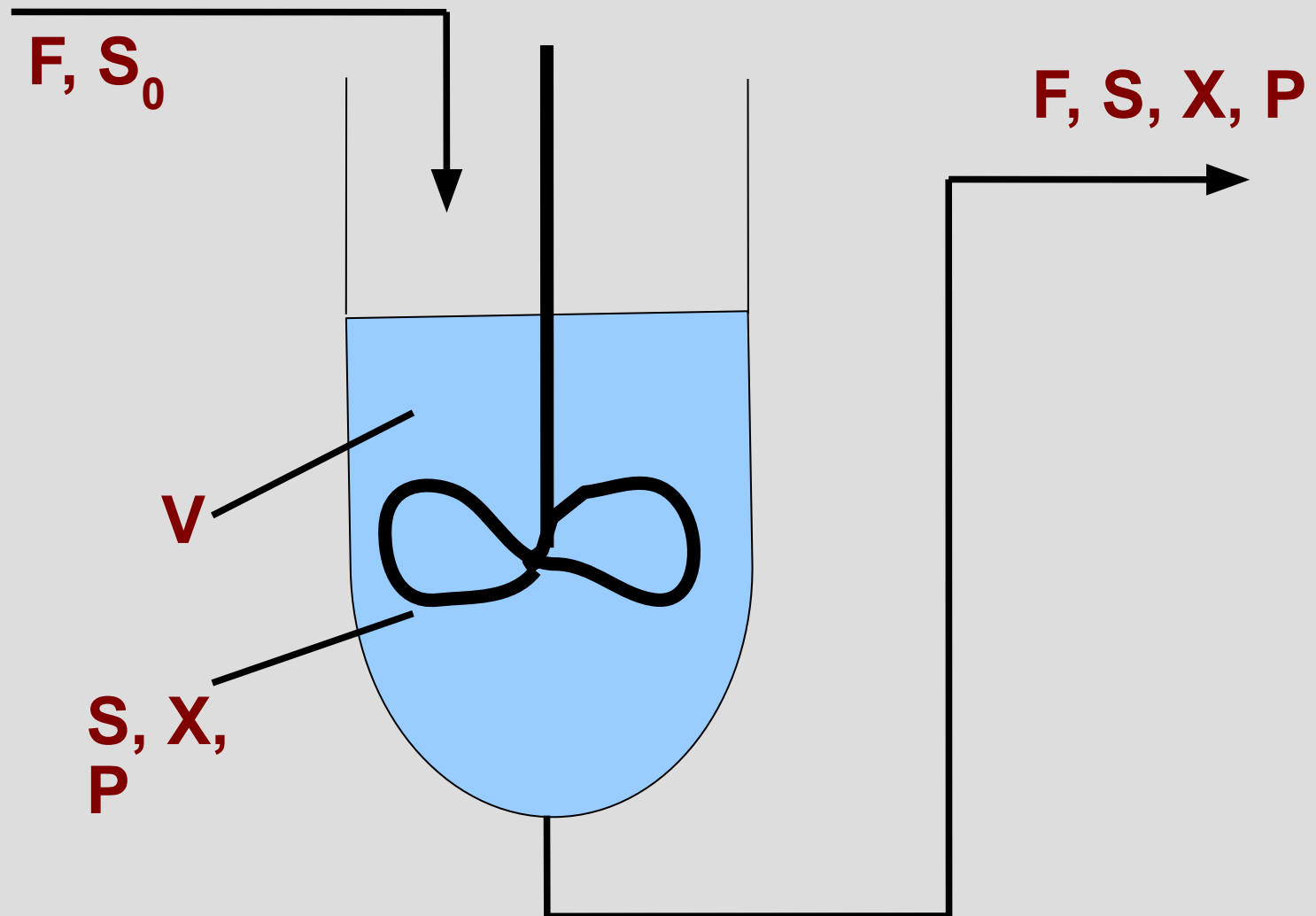
**Преимуществом** тубулярного процесса является возможность более полного исчерпания субстрата (как и в периодическом процессе).

**Недостатком** – невозможность организовать аэрацию во всех зонах по длине аппарата; большая склонность к инфицированию.

# Хемотростатный процесс непрерывного культивирования

- Ферментация протекает в аппарате с мешалкой;
- В аппарат с постоянной скоростью подается свежая питательная среда;
- Из аппарата с такой же скоростью отводится ферментационная среда, содержащая биомассу, продукт метаболизма и остатки субстрата.
- Предполагают, что в любой точке аппарата и на выходе из него концентрации  $S$ ,  $X$ ,  $P$  равны.

# схема хеомостатного непрерывного процесса ферментации



**Посевной материал на вход в аппарат не подают непрерывно.**

**Засев производится единовременно при запуске культуры от периодического процесса, биомасса непрерывно сохраняется в ферментере и специального подсева не нужно.**

**Закономерности хеостатного процесса описаны с помощью математической модели кинетики процесса**

## Допущения для математической модели:

- $\mu = \mu_m (S/K_S + S)$ ; (по Моно)
- $\underline{\mu} = 0$  (отсутствует диссимиляция биомассы),
- $Q_p = 0$  (нет образования продуктов метаболизма),
- $\bar{Q}_p = 0$  (нет инактивации продукта метаболизма),
- $m_s = 0$  (нет затрат на поддержание жизнедеятельности культуры).

# Выражение для материального баланса в ферментере

- $V \frac{dX}{dt} = \mu_m \frac{S}{(K_S + S)} \cdot XV - FX;$
- $V \frac{dS}{dt} = FS_0 - \frac{1}{Y_{XS}} \cdot \mu_m \frac{S}{(K_S + S)} \cdot XV - FS$
- **Приток**      **Расход на рост биомассы**      **Отток**
- Здесь  $V$ -объем ферментационной жидкости в аппарате, сохраняемый на постоянном уровне.
- Принимаем:  $D = F/V$ , где  $D$  – скорость разбавления,  $ч^{-1}$



- систему уравнений:
- $V \frac{dS}{dt} = FS_0 - \frac{1}{Y_{XS}} \cdot \mu_m \frac{S}{(K_S+S)} \cdot XV - FS;$
- $V \frac{dX}{dt} = \mu_m \frac{S}{(K_S+S)} \cdot XV - FX;$
- можно записать упрощенно:
  - $\frac{dS}{dt} = D (S_0 - S) - \frac{1}{Y_{XS}} \mu X;$
  - $\frac{dX}{dt} = \mu X - DX;$
- Введем в уравнение  $\frac{dX}{dt} = \mu X - DX;$  вместо  $\mu$  зависимость  $\mu(S)$ :
  - $\frac{dX}{dt} = \mu_m \frac{S}{(K_S+S)} - DX$
  - $\frac{dS}{dt} = D (S_0 - S) - \frac{1}{Y_{XS}} \mu X;$

- В непрерывном хемостатном процессе довольно быстро устанавливается **стационарное состояние**,
- при котором
- - скорость роста биомассы будет равна скорости ее вымывания из аппарата,
- - скорость притока субстрата за вычетом оттока остаточного субстрата равна скорости его расходования на рост микроорганизмов.
- при этом  $dX/dt = 0$ ,  $dS/dt = 0$

- Решая при этих условиях уравнение баланса биомассы, получаем:

- $\mu X - DX = 0$  и  $\mu = D$ ,

- в установившемся состоянии удельная скорость роста равна скорости разбавления  $D$  (параметр, задаваемый оператором).
- Если в установившемся состоянии в момент времени  $t_0$  по каким-либо причинам  $\mu \neq D$ , возникает переходный процесс по биомассе.

переходные процессы, возникающие в непрерывном хемостатном процессе при изменении скорости разбавления или удельной скорости роста биомассы



## В хемотрате осуществляется саморегулирование

Из уравнения  $dX/dt = \mu X - DX$  следует, что если  $\mu > D$ , то скорость роста биомассы в аппарате  $dX/dt > 0$  и биомасса возрастает.

При этом она потребляет из среды больше субстрата, концентрация его снижается, уменьшается и  $\mu$ .

Устанавливается новое равновесное состояние  $\mu = D$  при большей концентрации биомассы.

# в хемостате осуществляется саморегулирование

Если величина  $\mu < D$ , то  $dX/dt < 0$ , и концентрация биомассы начнет снижаться, соответственно будет возрастать концентрация субстрата.

При этом новое установившееся состояние будет при более низкой концентрации биомассы.

# Определение концентрации субстрата и биомассы в установившемся процессе в хемотрате

С учетом  $\mu X - DX = 0$  и  $\mu = D$ , можно

записать:  $\mu_m S / (K_S + S) = D$ ,

откуда  $S = K_S D / (\mu_m - D)$ ,

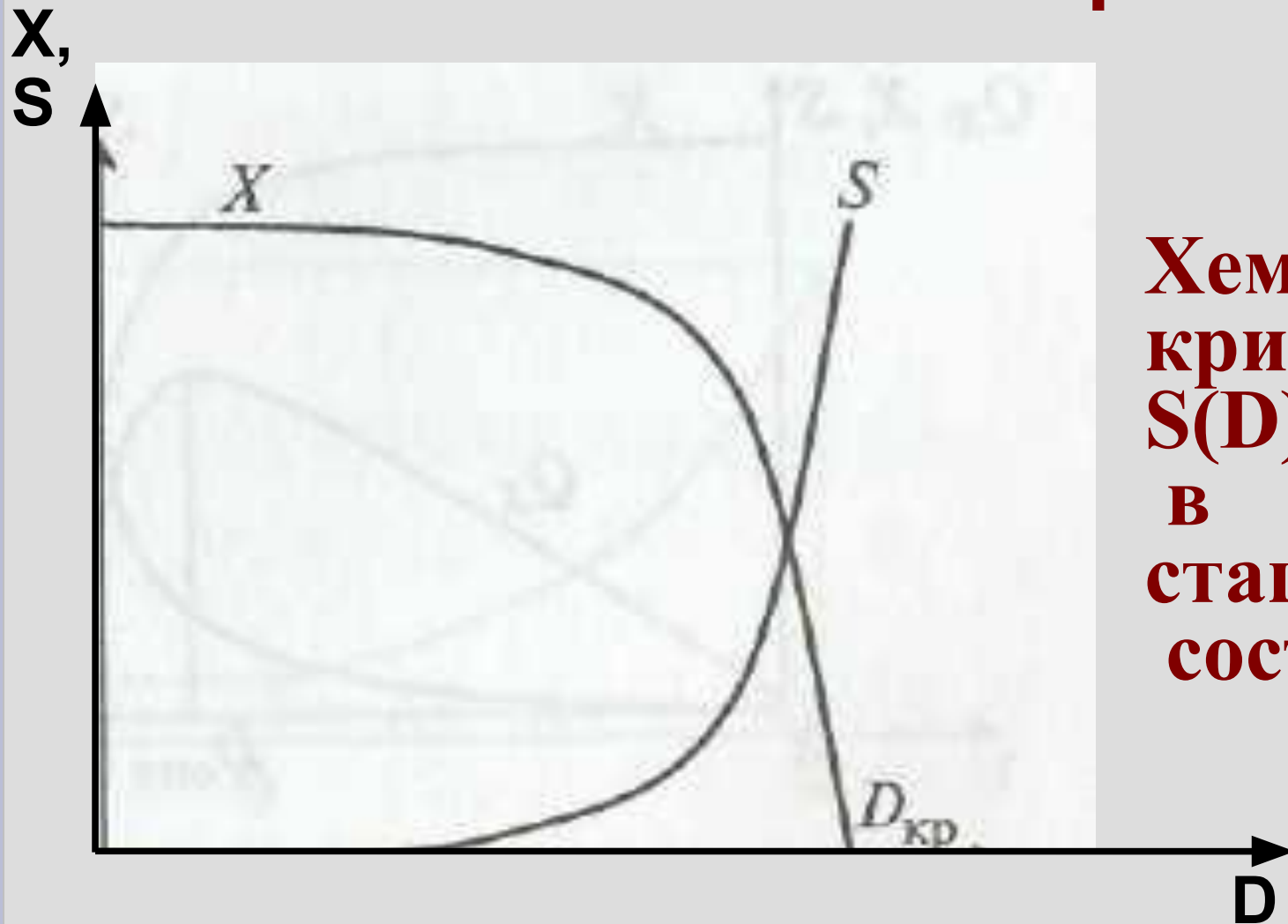
$D(S_0 - S) - 1/Y_{XS} \cdot \mu X = 0$ ,

поскольку  $\mu = D$ , получаем

$X = Y_{XS} (S_0 - S)$  или

$X = Y_{XS} [S_0 - K_S D / (\mu_m - D)]$

**Графические зависимости между установленными значениями  $X$  и  $S$  в хемотратном процессе и скоростью разбавления  $D$  называют хемотратными кривыми.**



**Хемотратные кривые  $X(D)$  и  $S(D)$  в стационарном состоянии**



Хемостатная кривая  $X(D)$  имеет особенность: концентрация биомассы снижается до нуля при повышении скорости разбавления до некоторого критического значения.

физически это означает, что культура вымывается. выходит больше биомассы, чем может вырасти.

При каких значениях  $D_{кр}$  происходит вымывание?

$$X = Y_{XS} [S_0 - K_S D / (\mu_m - D)] = 0;$$

$$S_0 = K_S D_{кр} / (\mu_m - D_{кр}); D_{кр} = \mu_m S_0 / (K_S + S_0)$$

Отсюда следует, что вид хемотратной кривой зависит от  $S_0$ .

$$\text{При } D = 0, X = Y_{XS} S_0$$

Начальное положение хемотратной кривой и точка вымывания зависят от концентрации субстрата в свежей среде (подпитке)  $S_0$ .

Эта величина наряду со скоростью разбавления является параметром, с помощью которого можно управлять процессом.

Интересную особенность имеет зависимость стационарной (остаточной) концентрации субстрата от начальной (входной) концентрации.

В уравнении  $S = K_S D / (\mu_m - D)$  нет, ничего кроме  $D$  и кинетических констант  $K_S, \mu_m$ .

**парадоксальный вывод: при любом изменении концентрации субстрата во входящем потоке  $S_0$  в стационарном состоянии при заданной скорости разбавления устанавливается одна и та же остаточная концентрация субстрата  $S$ .**

**Именно это свойство хемостата дало ему название: концентрация субстрата (химического соединения) стабилизируется сама по себе независимо от колебаний на входе.**

# Что регулируется оператором?

- скорость разбавления; (поэтому процесс иногда называют «спидостат»).

**Возникает вопрос: к чему стремиться?**

производительность процесса  $Q_X$  (количество биомассы, образующейся в единицу времени единицей объема среды в аппарате) для непрерывного процесса:

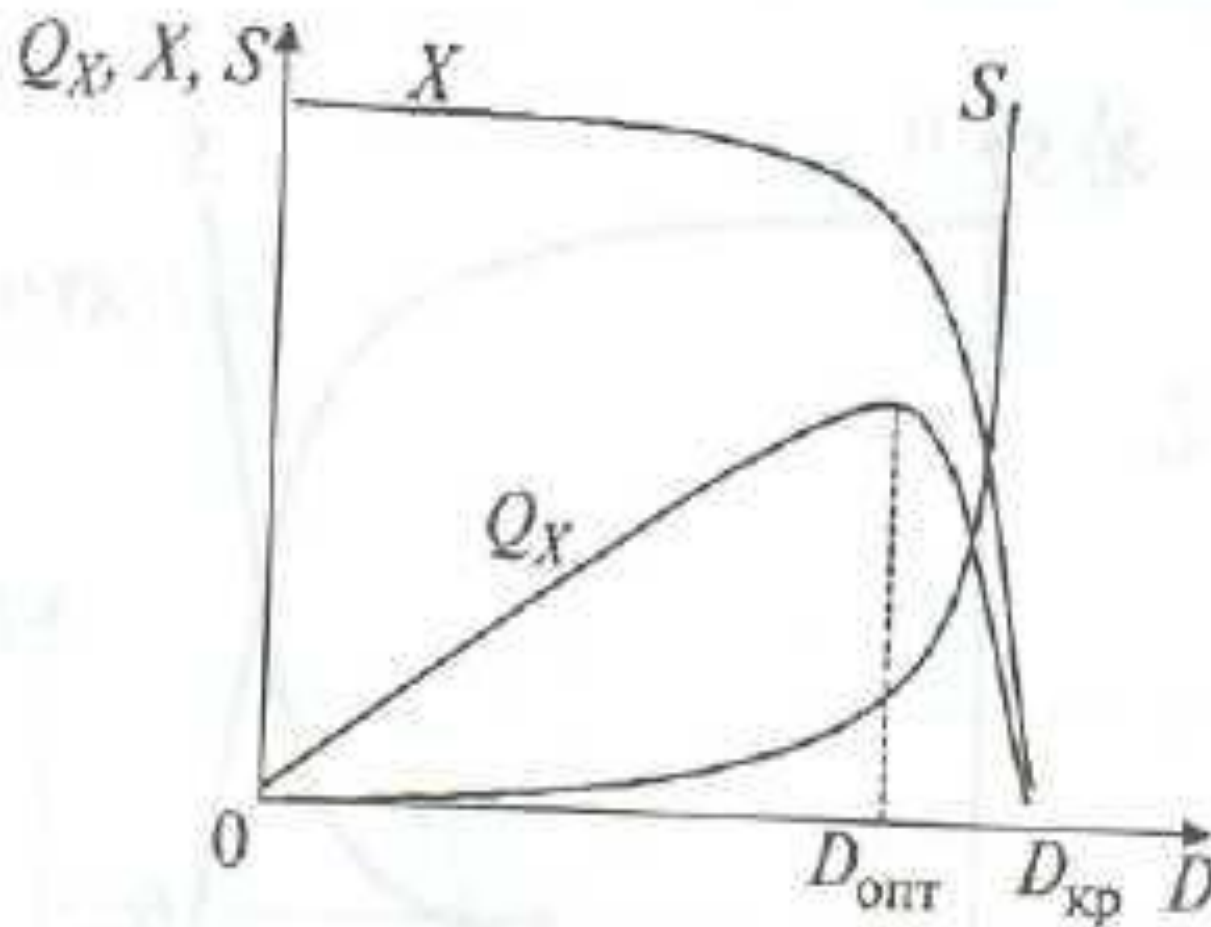
$$Q_X = DX, \text{ после подстановки выражения} \\ X = Y_{XS} [S_0 - K_S D / (\mu_m - D)]$$

$$Q_X = DY_{XS} [S_0 - K_S D / (\mu_m - D)]$$

**Практический интерес представляет определение условий (скорости разбавления) при которых величина будет оптимальной.**

производительность по биомассе в хемотратном процессе сначала возрастает до  $D_{opt}$ , а затем резко падает

Зависимость производительности по биомассе  $Q_x$ , концентрации биомассы  $X$  и остаточной концентрации субстрата  $S$  от скорости разбавления  $D$  в хемотратном процессе



# СРАВНЕНИЕ ПРОИЗВОДИТЕЛЬНОСТИ ПЕРИОДИЧЕСКОГО И НЕПРЕРЫВНОГО ПРОЦЕССОВ

Предположим, что после загрузки и до самого конца процесса биомасса растет с максимальной скоростью  $\mu = \mu_m$ . Однако рост начинается после подготовки аппарата, загрузки среды и посевного материала и лаг-фазы - с момента времени  $t_o$ .



## Рост биомассы описывается уравнением:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_m X \quad (\text{при } t > t_0);$$

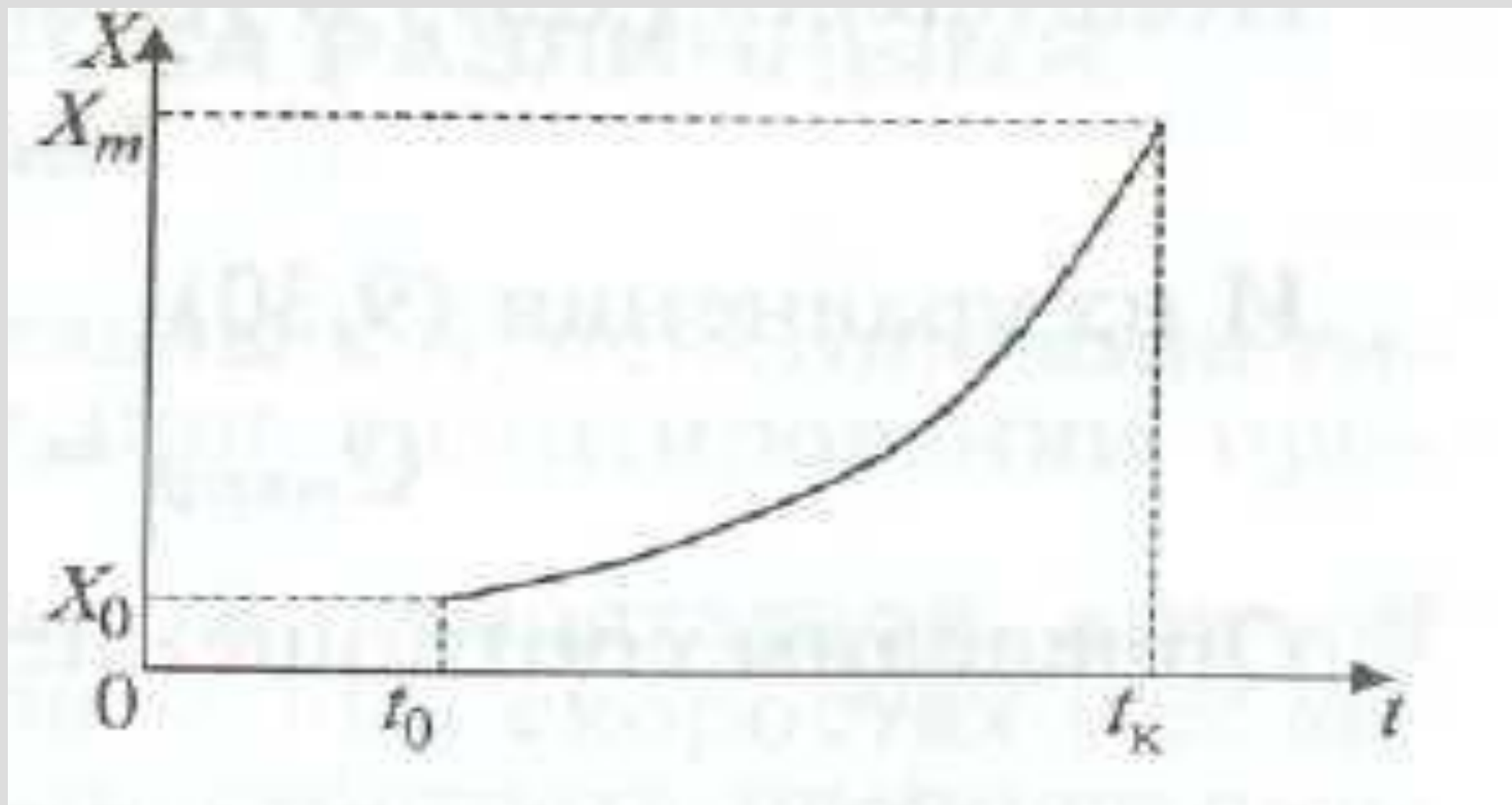
здесь

$$X = X_0 e^{\mu_m(t-t_0)};$$

$$\ln X = \ln X_0 + \mu_m(t-t_0).$$

Предположим, что рост идет до некой максимальной для данного аппарата концентрации биомассы  $X_m$  (концентрация биомассы не может возрасти до бесконечности, так как при этом возникают ограничения по массообменным возможностям аппарата; каждый аппарат имеет свой предел). Достижение этой концентрации происходит в момент времени  $t_K$  (для периодического процесса)

# картина роста биомассы при принятых допущениях



Подставляя  $X = X_m$  и  $t = t_k$  в уравнение

$$\ln X = \ln X_0 + \mu_m (t - t_0).$$

**получаем:**

$$\ln X_m = \ln X_0 + \mu_m (t_k - t_0).$$

Отсюда

$$t_k = \frac{1}{\mu_m} \ln \frac{X_m}{X_0} + t_0$$

и

$$Q_x = \frac{X_m}{t_k} = \frac{X_m \mu_m}{\ln \frac{X_m}{X_0} + t_0 \mu_m}.$$

**Для непрерывного процесса в том же аппарате производительность по биомассе определяется по другому.**

**Чтобы найти максимально возможную производительность непрерывного процесса в том же аппарате, в котором проводили и периодический процесс, надо проанализировать формулу для  $Q_{\text{Хопт.}}$**

**Из нее следует, что чем больше концентрация субстрата на входе в аппарат, тем больше - оптимальная концентрация биомассы.**

Но это возрастание также не может быть бесконечным, пределом выступают массообменные возможности аппарата. Работу можно проводить при концентрации биомассы не более  $X_m$ . Приблизительно:

$$D_{\text{опт}} \approx \mu_m, \text{ так как } K_S \ll S_0 \text{ и } K_S/S_0 \approx 0.$$

Тогда

$$\sqrt{\frac{K_S/S_0}{1+K_S/S_0}} \approx \sqrt{\frac{0}{1+0}} \approx 0.$$

**подставляя**

$$\sqrt{\frac{K_S/S_0}{1+K_S/S_0}} \approx \sqrt{\frac{0}{1+0}} \approx 0.$$

**в уравнение:**  $D_{\text{опт}} = \mu_m [1 - \sqrt{K_S/(S_0 + K_S)}]$ ,  
**получаем**  $D_{\text{опт}} \approx \mu_m$ .  
**из уравнения**

$$Q_{\text{опт}} = D_{\text{опт}} X_{\text{опт}} \approx D_{\text{опт}} Y_{XS} S_0,$$

**Определим соотношение  $Q_{\text{непр}}/Q_{\text{период}}$ :**

$$\frac{Q_{\text{непр}}}{Q_{\text{период}}} = \frac{X_m \mu_m}{X_m \mu_m / \left( \ln \frac{X_m}{X_0} + t_0 \mu_m \right)} = \ln \frac{X_m}{X_0} + t_0 \mu_m.$$

В начале процесса инокулят обычно составляет по объему около 5 % от объема среды, а концентрация биомассы в нем примерно такая же, как в конце ферментации -  $X_m$ . Отсюда

$$\frac{X_m}{X_0} \approx 20; \quad \ln \frac{X_m}{X_0} \approx 3.$$

**после подстановки в соотношение получаем:**

$$\frac{Q_{\text{непр}}}{Q_{\text{период}}} \approx 3 + t_0 \mu_m.$$



примем  $t_0 = 10$  часов (это время подготовки к следующей ферментации).

Для быстро растущих культур (бактерии, дрожжи)

$$Q_{\text{непр}} \frac{\mu_m}{Q_{\text{период}}} = 0,5 \text{ ч}^{-1};$$
$$\approx 8$$

Для медленно растущих культур (грибы, актиномицеты)

$$Q_{\text{непр}} \frac{\mu_m}{Q_{\text{период}}} = 0,05 \text{ ч}^{-1};$$
$$\approx 3,5$$

**вывод: непрерывный процесс имеет более высокую продуктивность по биомассе, чем периодический.**

# ОТКЛОНЕНИЯ ОТ ТЕОРИИ ХЕМОСТАТА ПРИ ЛИМИТИРОВАНИИ ПРОЦЕССА РАЗЛИЧНЫМИ СУБСТРАТАМИ

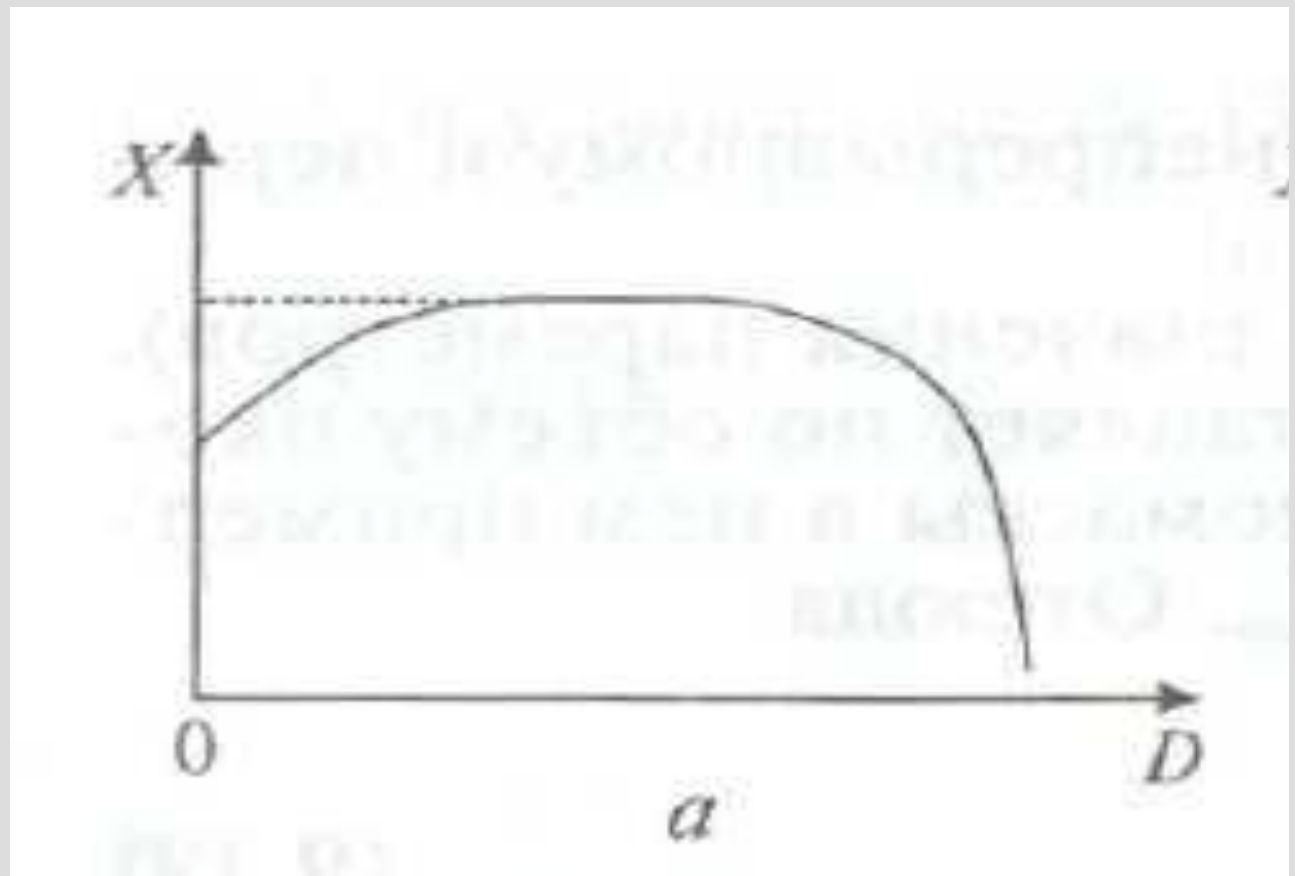
Хемостатные кривые  $X(D)$  чувствительны к изменению кинетических зависимостей при лимитировании процесса различными субстратами.

**Углерод.** Отклонение от классической хемостатной кривой (снижение концентрации биомассы при малых скоростях разбавления) связано с повышенным расходом субстрата на поддержание жизне-деятельности микроорганизмов при малых удельных скоростях роста биомассы.

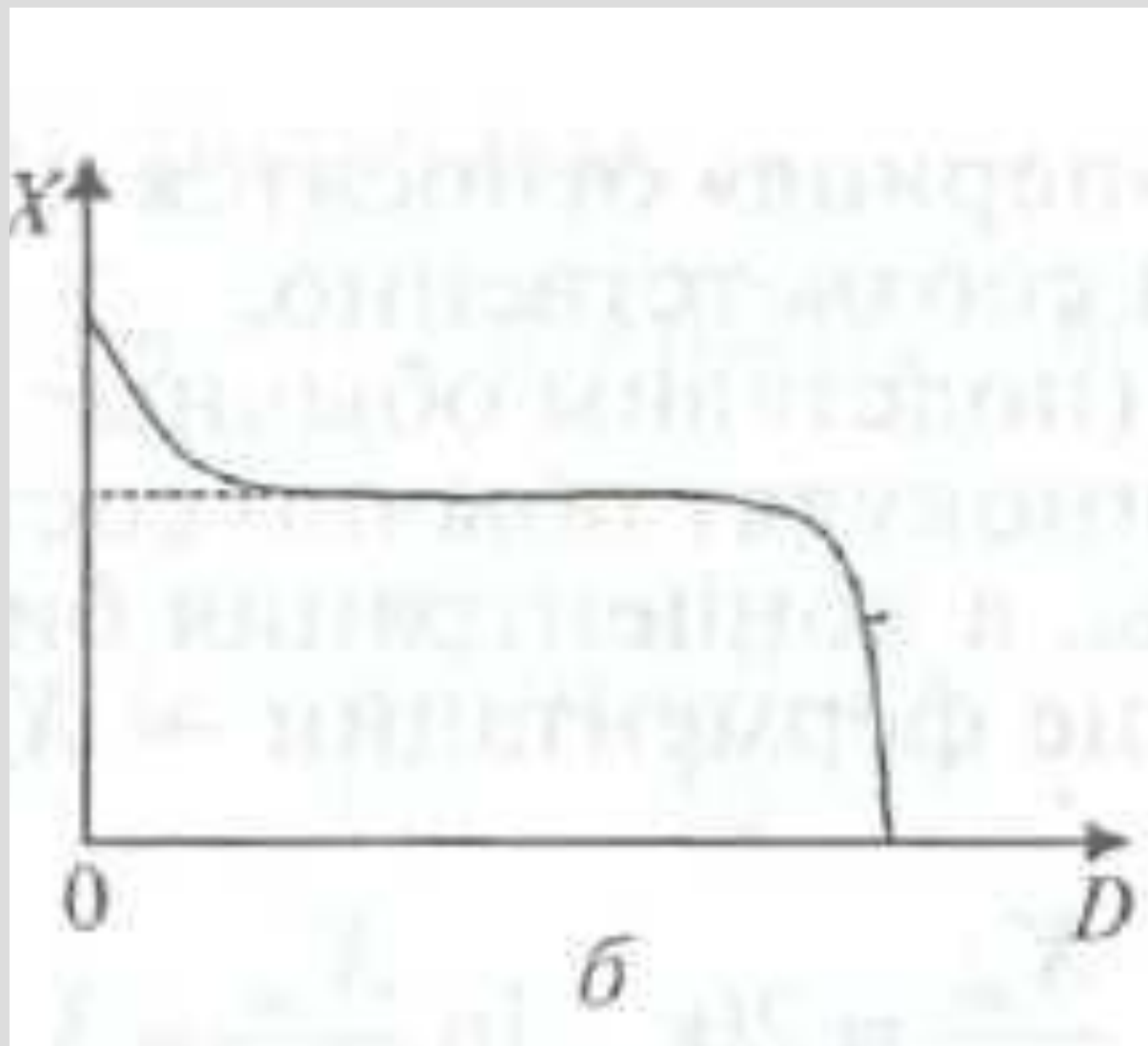
**Если решить систему уравнений:**

$$\begin{aligned}dX/dt &= \mu_m S/(K_S+S) - DX \\dS/dt &= D (S_0-S) - 1/Y_{XS} \mu X;\end{aligned}$$

**с учетом затрат на поддержание жизнедеятельности, получится хемостатная кривая**



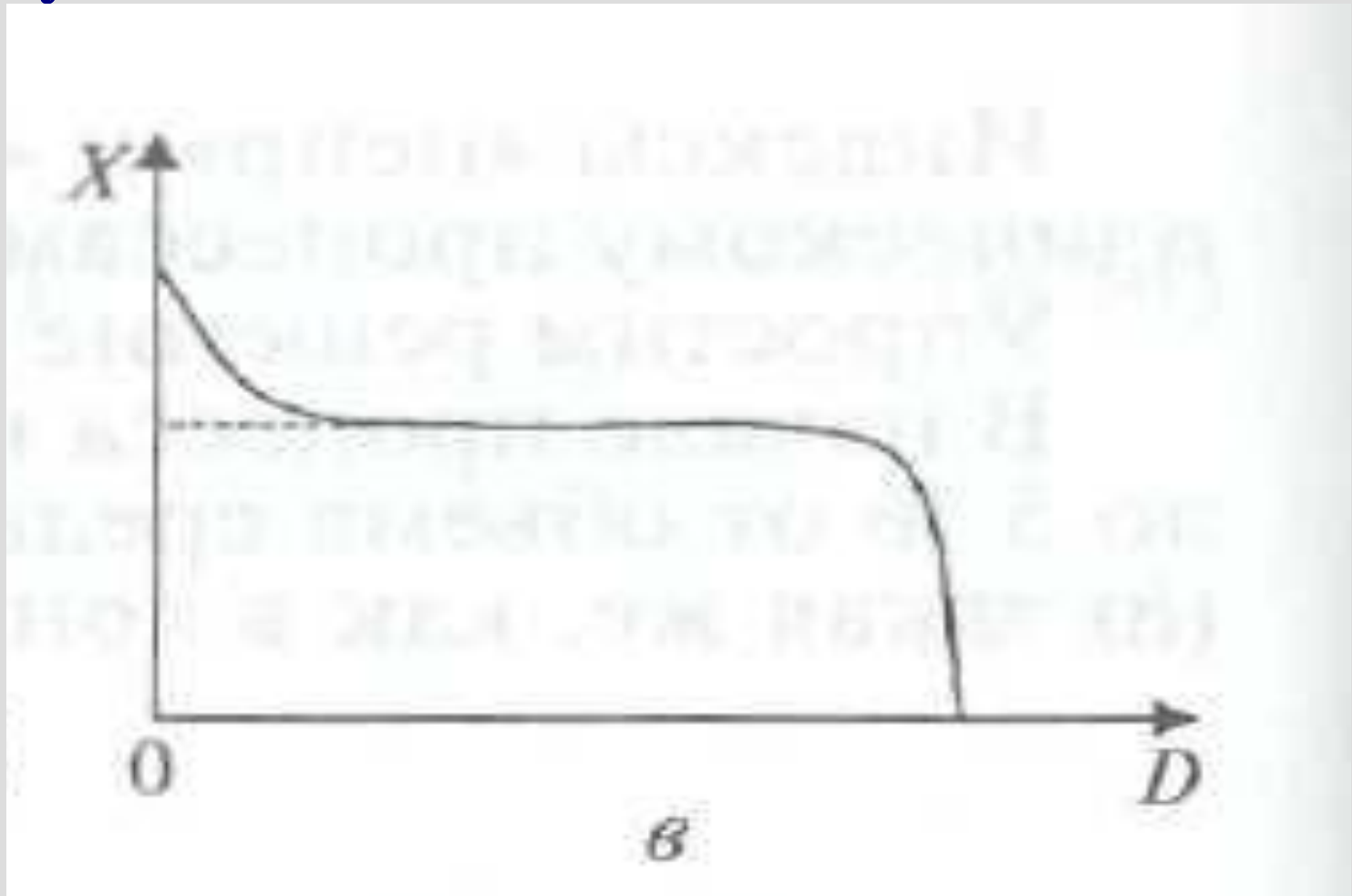
# вид хемостатной кривой при лимитировании азотом или серой



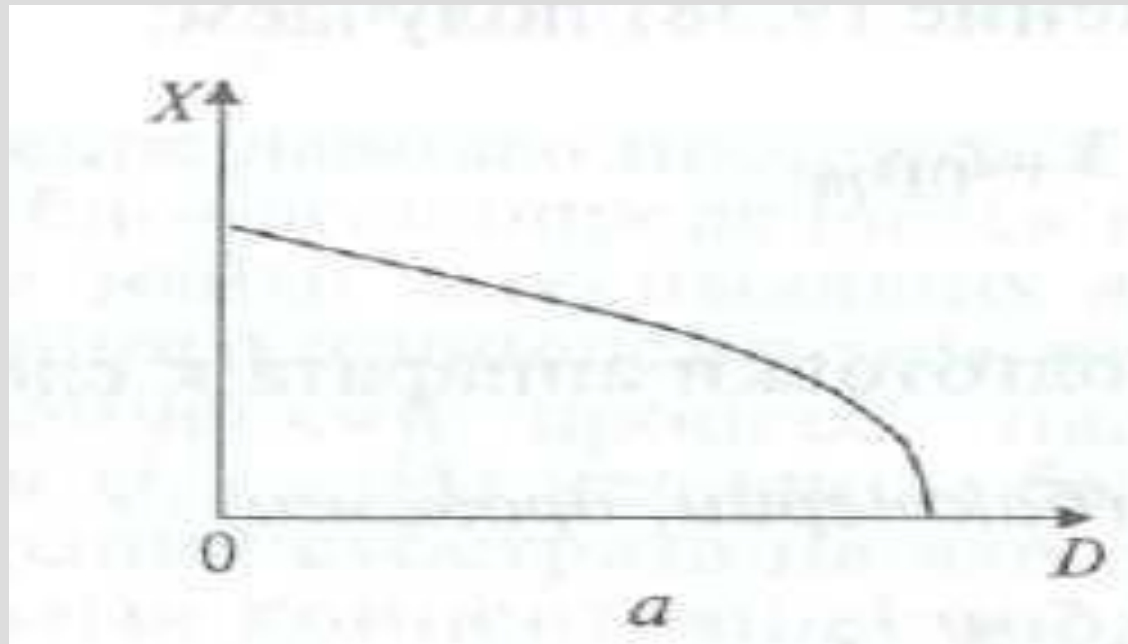
**Азот или сера.** Наблюдаемые отклонения отражают превышение концентрации биомассы при малых скоростях разбавления по сравнению с идеальным хемотратом. Клетки при малой скорости роста накапливают резервные соединения (полисахариды, полиоксибутират, липиды), и по массе их как бы становится больше.

Такой режим лимитирования в обиходе называют «жировым». Если выразить концентрацию биомассы не в г/л, а в числе клеток на литр, получается обычная форма графика.

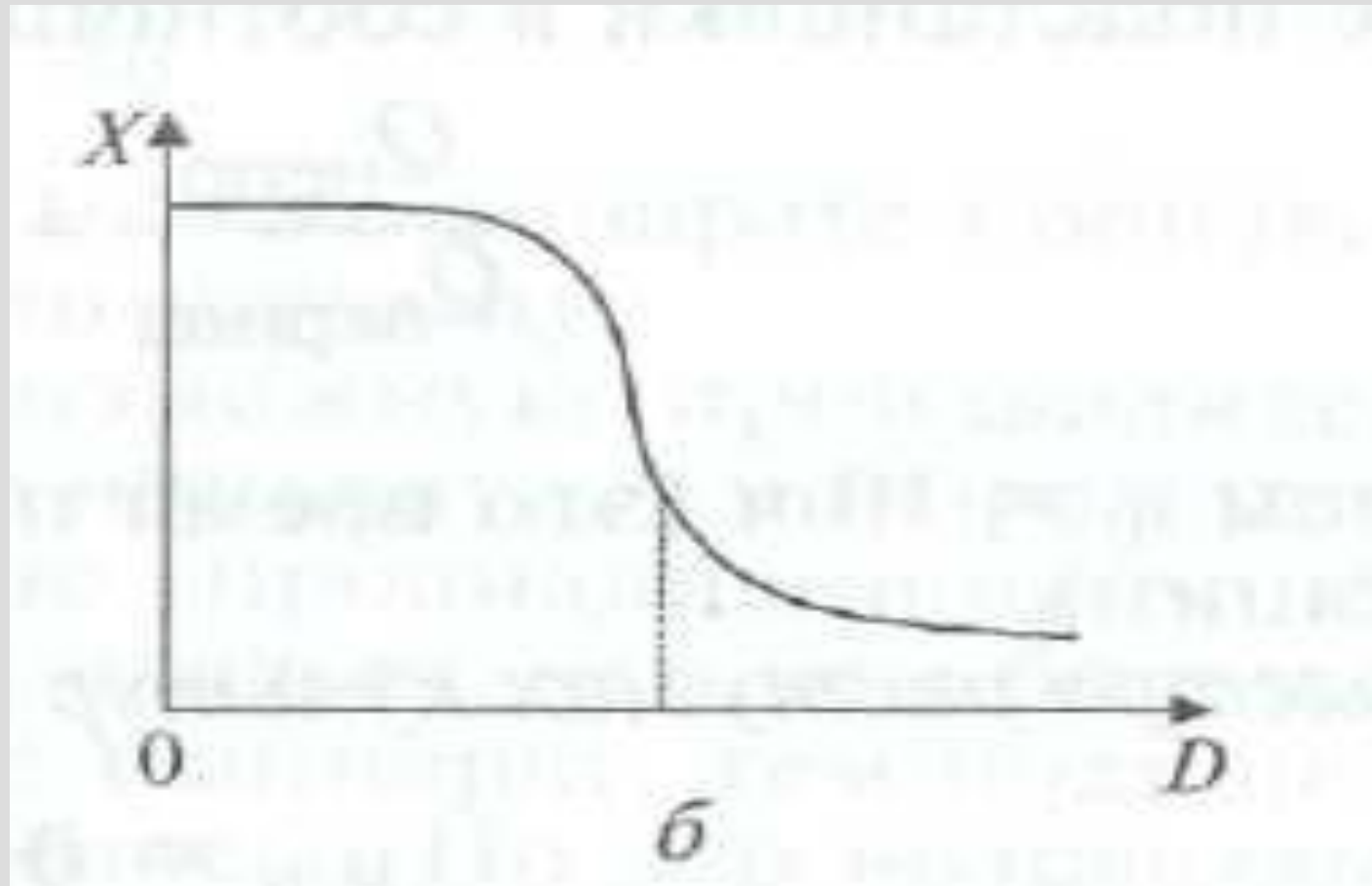
**Магний, фосфор, калий.** По виду хемостатная кривая похожа на кривую для азота, но причина подобного отклонения здесь другая: клетки, растущие медленно, требуют меньше РНК, чем быстрорастущие.



**Сложная среда.** На неопределенных по составу питательных средах происходит при различных скоростях разбавления изменение лимитирования (переход с лимитирования одним субстратом на лимитирование другим). Хемостатная кривая не имеет участка плато, а все время снижается с повышением скорости разбавления. При этом изменяется и биохимический состав биомассы.



**Пристеночный рост биомассы.** Хемостатная кривая в этом случае имеет аномально длинный «хвост», рост биомассы возможен даже при  $D > \mu_m$  (так как растущая на стенках биомасса не вымывается).





# ХЕМОСТАТНЫЙ ПРОЦЕСС КУЛЬТИВИРОВАНИЯ, ЛИМИТИРОВАННЫЙ КИСЛОРОДОМ

Кинетика роста аэробных культур микроорганизмов зависит от двух субстратов. Вторым является кислород. Общая зависимость представлена в виде альтернативного уравнения.

$$\mu = \min \left\{ \frac{\mu_m S}{K_S + S}, \frac{\mu_m C}{K_C + C} \right\}$$

**Если ферментационное оборудование недостаточно интенсивное, эта зависимость вырождается в однофакторную зависимость от концентрации растворенного кислорода  $C$ :**

$$\mu = \frac{\mu_m C}{K_C + C}.$$

**Уравнение баланса биомассы в непрерывном процессе с лимитированием кислородом такое же, как при лимитировании обычным субстратом, только вместо концентрации не газообразного субстрата  $S$  в уравнении использована концентрация растворенного кислорода  $C$ :**

$$\frac{dX}{dt} = \frac{\mu_m CX}{K_C + C} - DX.$$

**Из условия стационарности  $dX/dt = 0$  можно найти значение установившейся концентрации растворенного кислорода:**

$$C = \frac{DK_C}{\mu_m - D}.$$

уравнение материального баланса для субстрата дополняется поступлением кислорода за счет массопередачи в жидкую фазу:

$$\frac{dC}{dt} = K_L a (C^* - C) - \frac{1}{Y_{XC}} \frac{\mu_m C X}{K_C + C} + D (C_0 - C).$$

Растворение
Потребление
Поступление и отвод со средой

Последним членом уравнения в связи с низкой растворимостью кислорода в жидкости можно пренебречь. Для стационарного состояния ( $dC/dt = 0$ ) можно записать:

$$K_L a (C^* - C) = \frac{1}{Y_{XC}} D X.$$

отсюда

$$X = \frac{K_L a Y_{XC}}{D} \left( C^* - \frac{DK_C}{\mu_m - D} \right).$$

концентрация негазообразного субстрата  $S$ , хотя и не лимитирует процесс, также зависит от  $D$

$$S = S_0 - X/Y_{XS},$$

ИЛИ

$$S = S_0 - \frac{K_L a}{D} \left( C^* - \frac{DK_C}{\mu_m - D} \right) \frac{Y_{XC}}{Y_{XS}}.$$

производительность хемостата определяется формулой:

$$Q_X = DX = K_L a Y_{XC} \left( C^* - \frac{DK_C}{\mu_m - D} \right).$$

производительность существенно зависит от величин  $K_L$  и  $C^*$ .

Критическая скорость разбавления определяется по выражению:

$$D_{кр} = \frac{\mu_m C^*}{K_C + C^*} \quad (\text{при этом } X = 0).$$

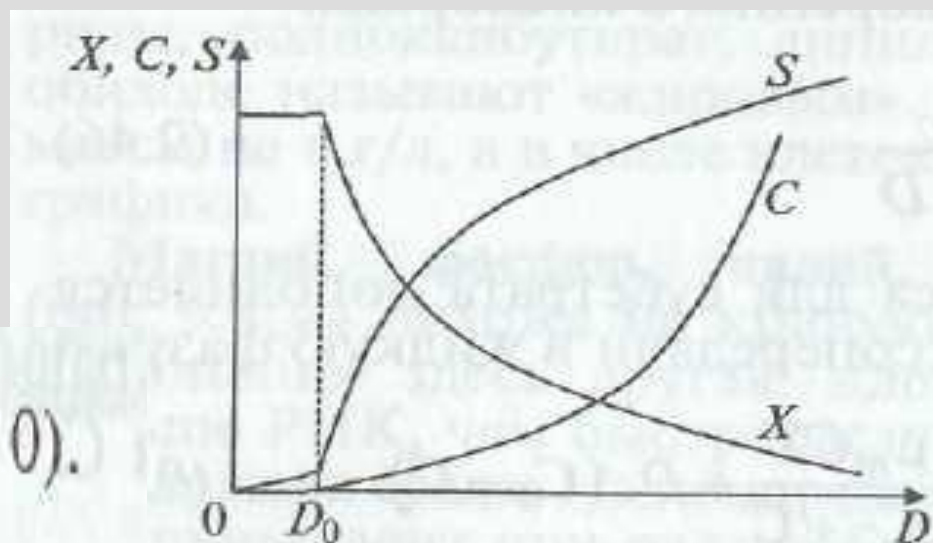
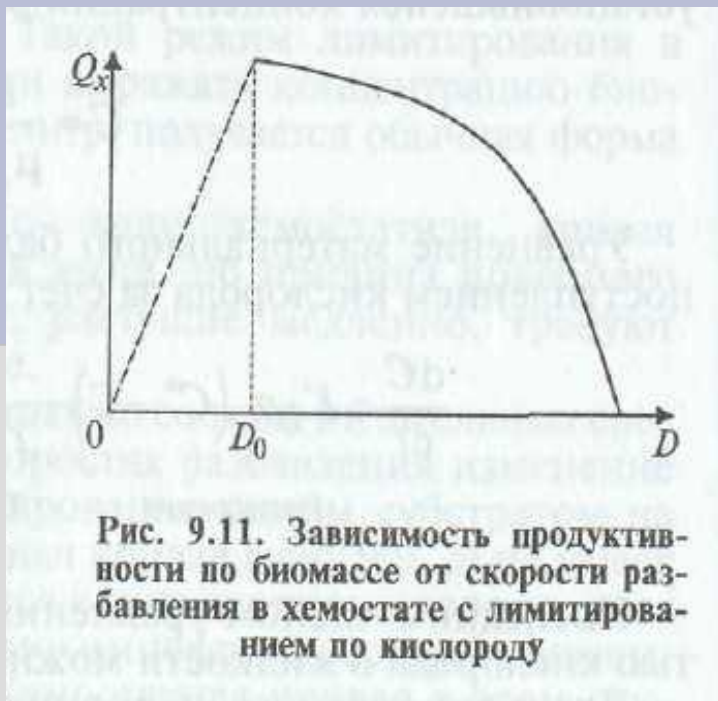


Рис. 9.10. Зависимость стационарных концентраций биомассы  $X$ , растворенного кислорода  $C$  и нелимитирующего негазообразного субстрата  $S$  от скорости разбавления в хемостате при лимитировании кислородом;  $D_0$  — скорость разбавления, при которой происходит переход от лимитирования негазообразным субстратом к лимитированию кислородом



с возрастанием коэффициента разбавления продуктивность все время снижается, так как снижается скорость сорбции кислорода.

При некотором достаточно малом значении скорости разбавления концентрация негазообразного субстрата снижается настолько, что начинает лимитировать рост биомассы.

При этом зависимость  $Q_x(D)$  приобретает вид, характерный для хемостата. Этот участок изображен пунктирной линией.

**В ЭТОМ случае оптимальной скоростью разбавления является точка переключения лимитирования с растворенного в жидкости субстрата  $S$  на кислород.**

**Повышение величины  $K_L a$  (т. е. массообменных возможностей аппарата) позволяет сдвинуть эту точку вправо и получить более высокую производительность процесса по биомассе.**

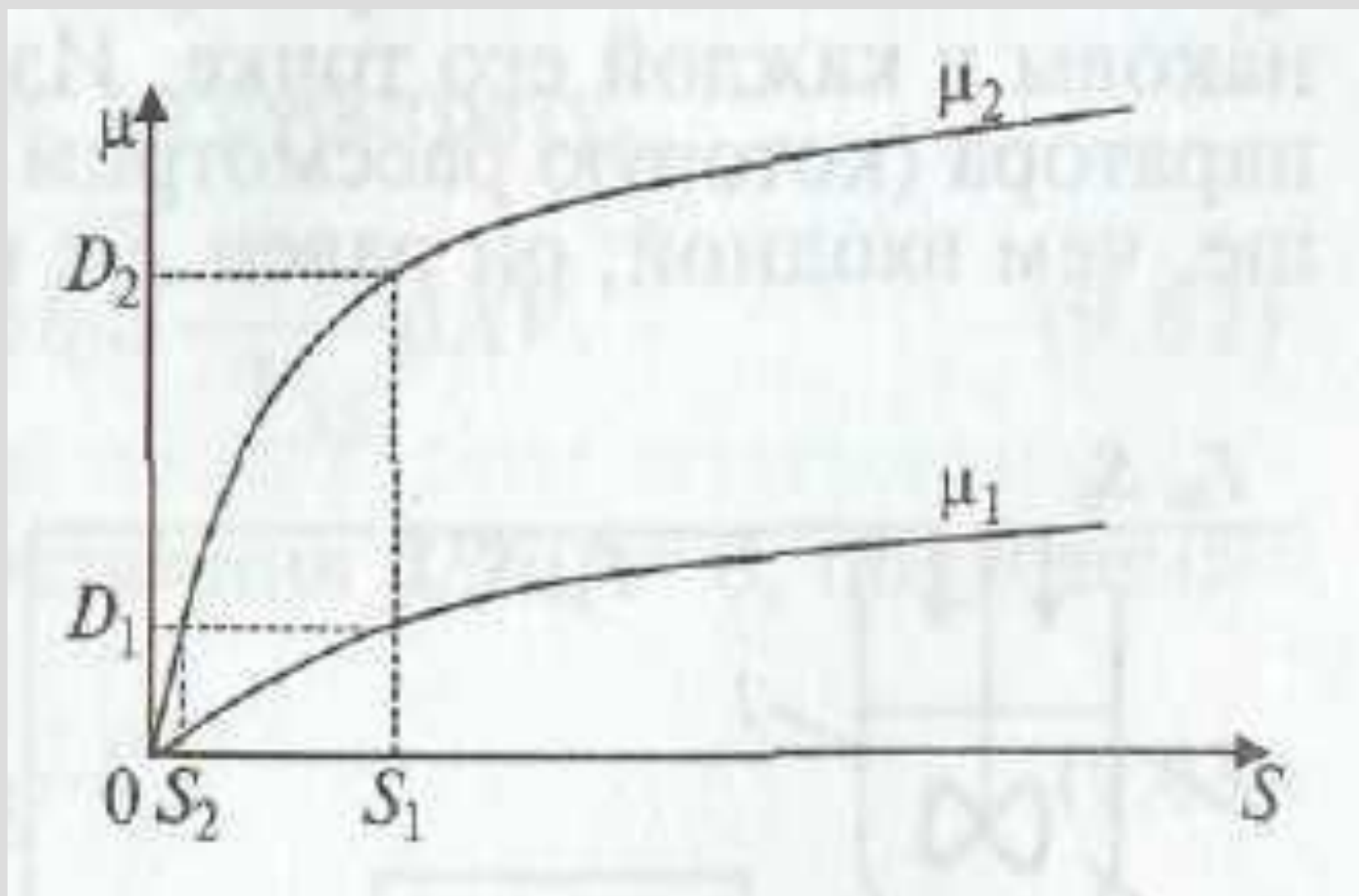


# АВТОСЕЛЕКЦИЯ В НЕПРЕРЫВНОМ ПРОЦЕССЕ

**В** ходе процесса культивирования под воздействием космических лучей и различных мутагенных факторов в культуре происходят изменения, в результате которых может появиться штамм, имеющий более высокую удельную скорость роста, чем исходный.

**С** этого момента оба штамма начинают конкурировать за субстрат.

**изменение концентрации  
остаточного субстрата в  
непрерывном процессе при  
замещении штамма 1 штаммом 2**



Если процесс протекает при скорости разбавления  $D_1$  то исходный штамм обеспечивает саморегулирование процесса при концентрации  $S_1$ .

Если вначале процесс стабилизирован на уровне  $S_1$  то для штамма-мутанта  $\mu_2(S_1) = D_2$  значительно больше  $D_1$ .

Следовательно, концентрация биомассы этого штамма растёт:

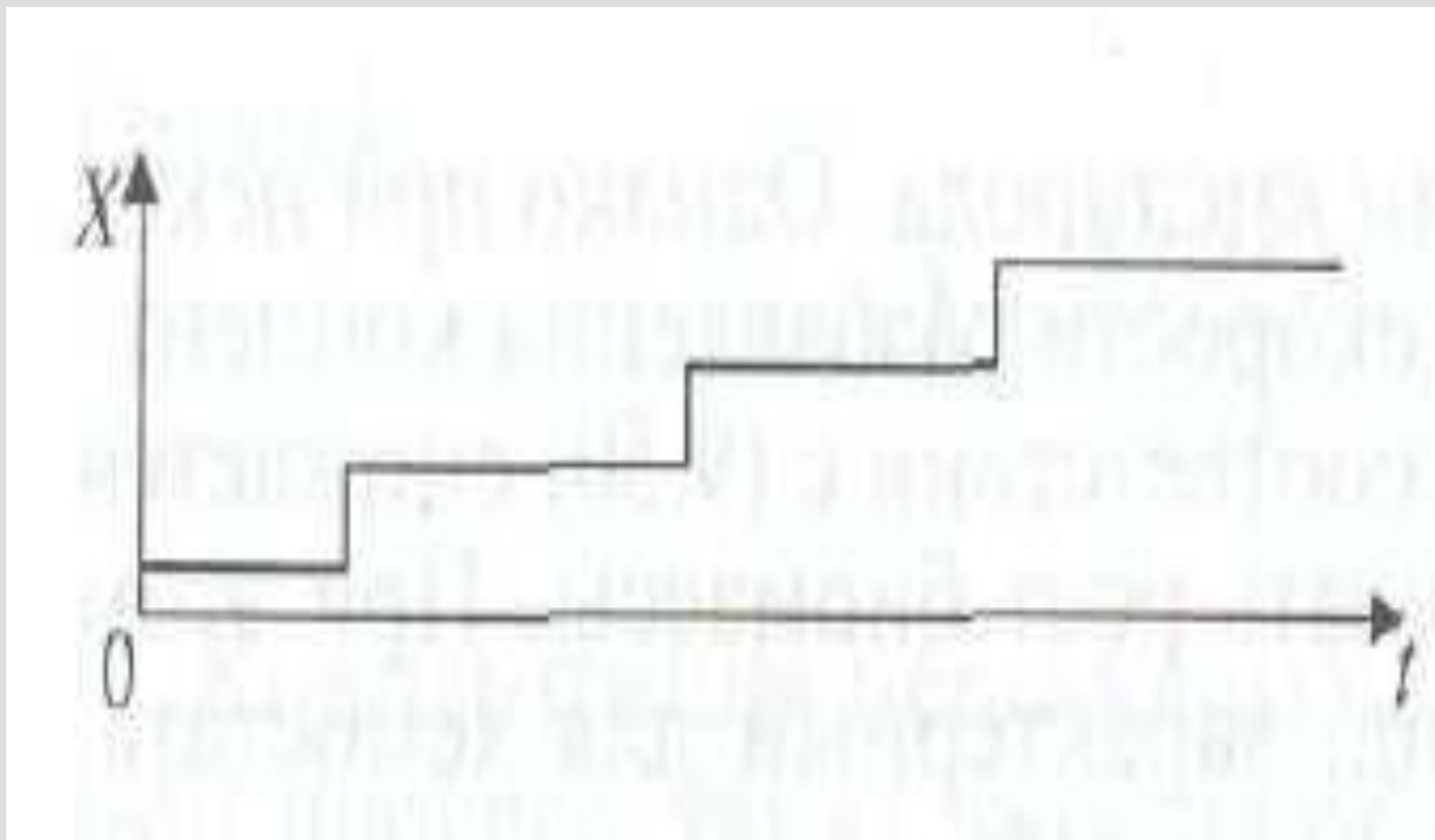
$$\frac{dX_2}{dt} = [\mu_2(S_1) - D_1] X > 0.$$

Рост происходит до тех пор, пока концентрация субстрата не снизится до  $S_2$ . При этом исходный штамм станет вымываться из аппарата, поскольку  $\mu_1(S_2) \leq D_1$ , и тогда

$$\frac{dX_1}{dt} = [\mu_1(S_2) - D_1] X < 0.$$

**Если наблюдать за концентрацией биомассы в непрерывном процессе культивирования, то можно заметить скачкообразное повышение концентрации, свидетельствующее о самопроизвольной селекции (автоселекции) новых штаммов.**

# внешнее проявление автоселекции в непрерывном процессе



**длительный непрерывный процесс культивирования используют для отбора штаммов, обеспечивающих более высокую скорость роста биомассы микроорганизмов.**

**улучшение их роста не всегда полезно. При этом иногда происходит ухудшение качества белка и других компонентов клетки, а также снижение ее способности к биосинтезу полезных метаболитов.**