

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ		SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»		044/48-11
Фармацевтическая биотехнология»		1стр.из144

ЛЕКЦИОННЫЙ КОМПЛЕКС

Дисциплина:	«Фармацевтическая биотехнология с основами микробиологии»
Код дисциплины:	FVMN 3204
Шифр и наименование ОП:	6B07201 – «Технология фармацевтического производства»
Объем учебных часов /кредитов:	120 часов /(4 кредита)
Курс и семестр изучения:	3 курс, 5 семестр
Объем лекции:	10 часов

Шымкент, 2024г.

Лекционный комплекс разработан в соответствии с рабочей учебной программой дисциплины (силлабусом) «Фармацевтическая биотехнология с основами микробиологии» и обсуждены на заседании кафедры «Технологии фармацевтического производства»

Протокол № 19 «06» 05 2024 г.

Зав. кафедрой, к.техн.н., и.о. проф.



Арыстанбаев К.Е.

Лекция №1

I. Тема: Введение в биотехнологию. Краткая историческая справка. Современное состояние и перспективы развития биотехнологического производства целевых продуктов. Экономические и коммерческие аспекты биотехнологии.

II. Цель: Ознакомить студентов с историей возникновения биотехнологических способов производства продуктов, с современным состоянием и перспективами развития биотехнологического производства, раскрыть экономические и коммерческие аспекты биотехнологии.

III. Тезисы лекции:

Биотехнология как самостоятельная наука сформировалась в 80-е годы XX столетия благодаря ряду важнейших открытий в различных областях науки, в том числе в молекулярной биологии, геной инженерии, биохимии, биоэлектрохимии и др. Впервые термин «биотехнология» был официально зарегистрирован в 1984 году после основания Европейской Федерации Биотехнологии (ЕФБ).

Первыми продуктами биотехнологии являются продукты, полученные из зерна и других злаков: хлеб, пшеничный и ячменный солод, пиво; из молока: кисломолочные продукты, сыры и др. Позже, не зная об участии микроорганизмов в сложных процессах ферментации, люди научились извлекать цветные металлы из руд, производить натуральный шелк, обрабатывать кожу и дерево, получать вино, уксус и др.

В настоящее время в биотехнологии используются термины Древней Греции и Древнего Рима, которыми обозначают «рабочие» белки: «энзим» - (греч.) – поднимать; «фермент» - (лат.) – брожение, кипение.

Основоположником биотехнологии можно считать Луи Пастера, который в 1872-76 г.г. положил начало микробиологии как самостоятельной науки. Он теоретически обосновал процесс брожения, указав на ведущую в нем роль микроорганизмов, и показал, что другие микроорганизмы участвуют в преобразовании других продуктов.

По определению ЕФБ, «Биотехнология – это интегрированное использование биохимии, микробиологии и инженерных наук с целью промышленного применения способности микроорганизмов, культуры тканей и клеток, а также их частей создавать продукты с заданными свойствами».

Предмет и задачи биотехнологии

В настоящий момент вряд ли у кого-нибудь может возникнуть сомнение в том, что современная биология представляет собой наиболее разнообразную область естественных наук. Действительно, она включает казалось бы совершенно не связанные и 1084 между собой разделы научных знаний: микробиологию, анатомию растений и животных, биохимию, иммунологию, клеточную биологию, физиологию растений и животных, различные систематики, экологию, генетику, биофизику, математику и много других областей естествознания.

Постоянно увеличивающееся разнообразие современной биологии началось после окончания второй мировой войны, когда в биологию внедрились другие естественнонаучные дисциплины, такие как физика, химия и математика, которые сделали возможным описание жизненных процессов на новом качественном уровне – на уровне клетки и молекулярных взаимодействий.

Именно существенные успехи в фундаментальных исследованиях в области биохимии, молекулярной генетики и молекулярной биологии, достигнутые во второй половине текущего столетия, создали реальные предпосылки управления различными (пусть,

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144

возможно и не самыми главными) механизмами жизнедеятельности клетки. Сложившаяся благоприятная

ситуация в биологии явилась мощным толчком в развитии современной биотехнологии, весьма важной области практического приложения результатов фундаментальных наук. Можно с уверенностью утверждать, что биотехнология является наиболее разительным примером того, как результаты, казалось бы "чистой науки", находят применение в практической деятельности человека.

Основой, обеспечивающей благоприятную ситуацию для бурного развития биотехнологии, явились революционизирующие открытия и разработки:

- доказательства роли нуклеиновых кислот в хранении и передаче наследственной информации в биологических системах (имеются в виду индивидуальные клетки и отдельные организмы, а не их популяции);
- расшифровка универсального для всех живых организмов генетического кода;
- раскрытие механизмов регуляции функционирования генов в процессе жизни одного поколения организмов;
- совершенствование существовавших и разработка новых технологий культивирования микроорганизмов, клеток растений и животных;
- как логическое следствие из вышесказанного, явилось создание (возникновение) и бурное развитие методов генетической и клеточной инженерии, с помощью которых искусственно создаются новые высокопродуктивные формы организмов, пригодные для использования в промышленных масштабах.

Абсолютно новым направлением является так называемая инженерная энзимология, возникшая вследствие развития современных методов изучения структуры и синтеза белков-ферментов и выяснения механизмов функционирования и регуляции активности этих соединений (важных элементов клетки). Достижения в этой области позволяют направленно модифицировать белки различной сложности и специфичности функционирования, разрабатывать создание мощных катализаторов промышленно ценных реакций с помощью высоко стабилизированных иммобилизованных ферментов.

Все эти достижения вывели биотехнологию на новый уровень ее развития, позволяющий сознательно и целенаправленно управлять сложными клеточными процессами. Данная новая область биологических знаний и ее последние достижения уже стали крайне важными для здоровья и благополучия человека.

И все же, что ожидает биотехнологию, в случае реализации всех надежд, которые на нее возлагаются? И наконец, что же такое биотехнология и каковы ее направления деятельности?

Термин «биотехнология» был введен в 1917 г. венгерским инженером Карлом Эреки при описании процесса крупномасштабного выращивания свиней с использованием в качестве корма сахарной свеклы. По определению Эреки, **биотехнология – это «все виды работ, при которых из сырьевых материалов с помощью живых организмов производятся те или иные продукты».**

Однако этот термин в те годы не получил широкого распространения. Только в 1961 г. к нему вновь вернулись после того как шведский микробиолог Карл ГеренХеден порекомендовал изменить название научного журнала "Journal of Microbiological and Biochemical Engineering and Technology" (Журнал

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA АКАДЕМИАСЫ «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144

микробиологической и химической инженерии и технологии), специализирующегося на публикации работ по прикладной микробиологии и промышленной ферментации, на "BiotechnologyandBioengineering" (Биотехнология и биоинженерия). С этого момента биотехнология оказалась четко и

необратимо связана с исследованиями в области **«промышленного производства товаров и услуг при участии живых организмов, биологических систем и процессов».**

Понятие биотехнология может быть представлено многими определениями:

- использование биологических объектов, систем или процессов для производства необходимых продуктов или для нужд сервисной индустрии;
- комплексное применение биохимических, микробиологических и инженерных знаний с целью промышленного использования потенциальных возможностей микроорганизмов, культур клеток и отдельных их компонентов или систем;
- технологическое использование биологических явлений для воспроизводства и получения (изготовления) различных типов полезных продуктов;
- приложение научных и инженерных принципов для обработки материалов биологическими агентами с целью получения необходимых продуктов или создания сервисных технологий.

Биотехнология на самом деле не что иное, как название, данное набору технических приемов (подходов) и процессов, основанных на использовании для этих целей биологических объектов.

Термин биотехнология включает составляющие «биос», «техне», «логос» греческого происхождения (от греч. «биос» – жизнь, «техне» – искусство, мастерство, умение и «логос» – понятие, учение). Таким образом, как это явствует из приведенных определений, биотехнология по существу сводится к использованию микроорганизмов, животных и растительных клеток или же их ферментов для синтеза, разрушения или трансформации (превращения) различных материалов с целью получения полезных продуктов для различных нужд человека.

Биотехнологические направления имеют своей целью создание и практическое внедрение (т. е. практическое использование):

- новых биологически активных веществ и лекарственных препаратов, используемых в здравоохранении для диагностики, профилактики и лечения различных заболеваний;
- биологических средств защиты сельскохозяйственных растений от возбудителей заболеваний и вредителей, бактериальных удобрений и регуляторов роста растений и животных; новых сортов растений, устойчивых к разного рода неблагоприятным воздействиям (факторам внешней среды); новых пород животных с полезными свойствами (трансгенные животные);
- ценных кормовых добавок для повышения продуктивности сельскохозяйственных животных (кормового белка, аминокислот, витаминов, ферментов, способствующих повышению усвояемости кормов, и т. п.);
- новых биоинженерных методов для получения высокоэффективных препаратов различного назначения, используемых в сельском хозяйстве и ветеринарии;
- новых технологий создания и получения хозяйственно ценных продуктов для пищевой, химической и микробиологической промышленности;

- эффективных технологий переработки сельскохозяйственных, промышленных и бытовых отходов для получения продуктов, которые могут использоваться в других отраслях хозяйственной деятельности человека (например, биогаза, удобрений, топлива для автомобилей и т. п.).

Само собой разумеется, что такие комплексные задачи требуют интеграции различных отраслей научных и технических знаний и характеризуют биотехнологию как ряд

перспективных технологий, которые найдут применение в самых разнообразных индустриальных направлениях. Интеграция биологии, химии и инженерных приемов в биотехнологии осуществляется таким путем, чтобы обеспечить максимальное использование потенциальных возможностей всех входящих в нее областей знаний. И все же, несмотря на комплексность биотехнологии, ее нельзя рассматривать как нечто единое целое, наподобие микроэлектроники. Скорее она должна рассматриваться как ряд перспективных технологий, сочетания которых будут постоянно варьировать в зависимости от конкретных практических задач.

Биотехнология – междисциплинарная область научно-технического прогресса, возникшая на стыке биологических, химических и технических знаний и призванная к созданию новых биотехнологических процессов, которые в большинстве случаев будут осуществляться при низких температурах, требовать небольшого (меньшего) количества энергии и будут базироваться преимущественно на дешевых субстратах, используемых в качестве первичного сырья.

Однако следует отдавать себе отчет в том, что биотехнология не является чем-то новым, ранее не известным, а представляет собой развитие и расширение набора технологических приемов, корни которых появились тысячи лет тому назад.

Биотехнология включает многие традиционные процессы, давно известные и давно используемые человеком. Это пивоварение, хлебопечение, изготовление вина, производство сыра, приготовление многих восточных пряных соусов, а также разнообразные способы утилизации отходов. Во всех перечисленных процессах использовались биологические объекты (пусть даже без достаточных знаний о них) и все эти процессы на протяжении многих лет совершенствовались, правда, эмпирически.

Начало этого этапа биотехнологии теряется в глубине веков и он продолжался примерно до конца XIX в.

Работы великого французского ученого Луи Пастера (1822–1895) заложили фундамент практического использования достижений микробиологии и биохимии в традиционных биотехнологиях (пивоварение, виноделие, производство уксуса) и ознаменовали начало нового, научного периода развития биотехнологии. Для этого периода характерно развитие промышленной биотехнологии, в особенности ферментационных процессов в промышленных масштабах. Были разработаны стерильные процессы производства путем ферментации ацетона, глицерина. Интенсивно изучаются основные группы микроорганизмов – возбудителей процессов брожения, исследуются биохимические особенности данных процессов. После открытия Александром Флемингом пенициллина разрабатываются процессы и аппараты для глубинного культивирования продуцентов, что резко удешевило производство данного антибиотика, и он стал доступным для широкого использования в клинической практике во время второй мировой войны.

После войны быстрыми темпами развивались процессы ферментации для производства антибиотиков, стероидных гормонов, а в 1961 г. возник журнал «Биотехнология и биоинженерия» и снова термин «биотехнология» стал применяться для обозначения процессов, которые относили к области промышленной микробиологии.

Однако термин «биотехнология» в большей степени стал ассоциироваться с новым этапом развития этой науки, начало которому положено в 1973 г., когда Стэнли Коэн и Герберт Бойер получили рекомбинантные плазмиды и произвели трансформацию ими клеток *E.coli*. В течение четырех лет после открытия рекомбинантных ДНК-технологий появились штаммы бактерий, продуцирующие инсулин и человеческий гормон роста. Это привело к притоку инвестиций в новые компании. В настоящее время в США только микробная (основанная на культивировании генетически модифицированных микроорганизмов) биотехнология представлена 1300 компаниями, насчитывающими 153 000 служащих, с годовым доходом 19,6 млрд долл. и с продажами 13,4 млрд долл. В Канаде 282 компании с годовым доходом 1,1 млрд долл., В Японии с годовым доходом 10,0 млрд долл., в Европе 1178 компаний (45 000 служащих) с годовым доходом 3,7 млрд долл. Основные продукты, получаемые с помощью микроорганизмов и рекомбинантных ДНК-технологий – животные пептиды, такие как гормоны, факторы роста, ферменты, антитела и биологические модификаторы иммунного ответа.

По приблизительной оценке, общемировая рыночная стоимость растениеводческой продукции, полученной на основании ДНК-технологий, достигнет к 2010 г. 30–40 млрд. долларов. Мировой рынок биотехнологической продукции составляет ежегодно около 150 млрд. долл.

Во многих странах мира приняты национальные программы по биотехнологии. Так, например, в США ежегодные затраты на биотехнологию составляют 2-3 млрд. долл. В Германии на 2001 год выделено около 2 млрд. марок на новую программу по биотехнологии.

В табл. 1 приведены основные факты, характеризующие развитие биотехнологии. Вполне обоснованно предполагать, что скорость практического использования биотехнологических достижений в меньшей степени будет определяться научными и техническими условиями, а больше будет зависеть от таких факторов, как капиталовложения заинтересованных отраслей промышленности, улучшение технологических схем, рыночных ситуаций и экономичности новых методов по сравнению с недавно внедренными технологиями иного типа.

Отрасли промышленности, с которыми будет конкурировать биотехнология, включают изготовление пищи для людей и животных, создание и производство новых материалов, призванных заменить изготавливаемые с помощью нефтехимии, создание альтернативных источников энергии, разработку технологии безотходных производств, контроль и устранение загрязнений и сельское хозяйство. Конечно, биотехнология революционизирует и многие разделы медицины, ветеринарии и фармацевтической промышленности.

Вышеизложенное однозначно предполагает рассмотрение биотехнологии как межотраслевой дисциплины, основанной на применении многопрофильной стратегии (различных подходов) для решения различных проблем.

Таблица 1 История развития молекулярной биотехнологии

Дата	Событие
1917	<i>Карл Эреки ввел термин «биотехнология»</i>

1943	<i>Произведен пенициллин и1074 в промышленном масштабе</i>
1944	<i>Эвери, Мак Леод и Мак Карти показали, что генетический материал представлен ДНК</i>
1953	<i>Уотсон и Крик определили структуру молекулы ДНК</i>
1961	<i>Учрежден журнал "Biotechnology and Bioengineering"</i>
1961-1966	<i>Расшифрован генетический код</i>
1970	<i>Выделена первая рестрицирующая эндонуклеаза</i>
1972	<i>Корана и др. синтезировали полноразмерный ген тРНК</i>
1973	<i>Бойер и Коэн положили начало технологии рекомбинантных ДНК</i>
1975	<i>Колер и Мильштейн описали получение моноклональных антител</i>
1976	<i>Изданы первые руководства, регламентирующие работы с рекомбинантными ДНК</i>
1976	<i>Разработаны методы определения нуклеотидной последовательности ДНК</i>
1978	<i>Фирма Genentech выпустила человеческий инсулин, полученный с помощью E. Coli</i>
1982	<i>Разрешена к применению в Европе первая вакцина для животных, полученная по технологии рекомбинантных ДНК</i>
1983	<i>Для трансформации растений применены гибридные Ti-плазмиды</i>
1988	<i>Создан метод полимеразной цепной реакции (ПЦР)</i>
1990	<i>В США утвержден план испытаний генной терапии с использованием соматических клеток человека</i>
1990	<i>Официально начаты работы над проектом «Геном человека»</i>
1994-1995	<i>Опубликованы подробные генетические и физические карты хромосом человека</i>
1996	<i>Ежегодный объем продаж первого рекомбинантного белка (эритропоэтина) превысил 1 млрд. долларов</i>
1997	<i>Клонировано млекопитающее из дифференцированной соматической клетки</i>

IV. Иллюстративный материал: прилагается

V. Литература:

основная:

1. Егорова Т.А., Клунова С.М., Живухина Е.А. Основы биотехнологии. – М.: Изд. центр «Академия», - 2008. – 208 с.
2. Евтушенков А.Н., Фомичев Ю.К. Введение в биотехнологию: Курс лекций. – Минск.: БГУ, 2002. - 105 с.
3. Сазыкин Ю.О., Орехов С.Н., Чакалева И.И. Биотехнология: Учебное пособие. – М.: Изд. Центр «Академия». – 2006. – 256 с.
4. Орехов С.Н. Фармацевтическая биотехнология. Руководство к практическим занятиям. – Учебное пособие. – Под ред. акад. РАМН В.А. Быкова, проф. А.В Катлинского. – М. : ГЭОТАР-Медиа 2009. – 384 с.
5. Елинов Н.П. Химическая микробиология. - Учебник. - М.: Высшая школа. - 1989, 448 с
6. Воробьева Л.И. Промышленная микробиология. - Учебное пособие. - М.: Изд-во МГУ. - 1989, 294 с.
7. Биотехнология. Принципы и применение. Пер. с англ. / Под ред. И. Хиггинса, Д. Беста, Дж. Джонса. - М.: Мир. - 1988, 480 с.
8. Чуешов В.И., Зайцев А.И., Шебанова С.Г. Промышленная технология лекарств. Том 2. Харьков, 2002.
9. Биотехнология микробного синтеза (Под ред. Бекера М.Е.) – Рига – 1980.
10. Биотехнология. (Отв. редактор А.А. Баев). - М.: Наука. - 1984, 310 с.

11. Перт С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов. М., - 1979 г.
12. Промышленная микробиология (Под ред. Егорова Н.С.) – М., 1989 г.
13. Процессы и аппараты химической технологии (Под ред. П.Г. Романкова). – Л. – 1981.

дополнительная:

1. Березов Т.Т. , Коровкина Б.Ф. – Биологическая химия (Под ред. И.М. Ивановой) – М., Медицина – 1981 г.
2. Никитин Г.А. – Биохимические основы микробиологических производств – Киев, 1981.
3. Бриттон Г. – Биохимия природных пигментов. М., Мир – 1986 г.
4. Попова Т.В. – Развитие биотехнологии в СССР – М., Наука - 1988 г.
5. Популяционные аспекты биотехнологии – Печуркин Н.С., Брильков А.В., Маркенкова Т.В. – Новосибирск: - Наука – 1990 г.
6. Специальные журналы: «Биотехнология», «Фармация Казахстана», «Фармацевтический бюллетень» и др.

VI. Контрольные вопросы (обратная связь):

1. Краткая история о формировании биотехнологии.
2. Какими определениями может быть представлено понятие биотехнология?
3. Назовите основные направления биотехнологии?
4. Какие открытия и разработки обеспечивают развитие биотехнологии?

Лекция № 2

I. Тема: Достижения биотехнологии в молекулярной биологии, медицине, фармации, ветеринарии, пищевой промышленности, энергетической отрасли, металлургии и др. Мониторинг окружающей среды с помощью микроорганизмов. Безотходная технология и перспективы ее внедрения.

II. Цель: Ознакомить студентов с достижениями биотехнологии в смежных отраслях науки, с принципами мониторинга окружающей среды с помощью живых организмов, биотехнологических способов производства продуктов, с современным состоянием внедрения безотходной технологии.

III. Тезисы лекции:

Биотехнология применяет методы, заимствованные из химии, микробиологии, биохимии, молекулярной биологии, химической технологии и компьютерной техники с целью создания новых разработок, развития и оптимального использования процессов, в которых каталитические реакции играют фундаментальную и незаменимую роль.

Любой биотехнолог должен стремиться к достижению тесного кооперирования со специалистами других смежных (близких) дисциплин, таких, как медицина, пищевая промышленность, фармацевтика и химическая индустрия, защита окружающей среды и процессы переработки продуктов, представляющих собой отходы различных производств.

Главная причина успехов биотехнологии кроется в разительных успехах и быстром прогрессе молекулярной биологии, в частности в разработке технологии рекомбинантных молекул ДНК. С помощью этой технологии оказалось возможным непосредственно манипулировать с наследственным материалом клеток, получая новые сочетания полезных признаков и способностей. Возможности этих технических приемов, которые впервые были разработаны в лабораториях, вскоре оказались вполне приемлемыми в промышленных условиях. Однако, несмотря на определенные, а порой и весьма значительные выгоды, которые несет технология рекомбинантных молекул, постоянно следует учитывать возможные опасности, связанные с вмешательством человека в природу.

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA АКАДЕМИАСЫ «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144

В настоящее время развитие биотехнологии осуществляется со скоростью, напоминающей таковую при становлении микроэлектронной промышленности в середине 70-х годов.

Ни для кого уже не является секретом, что ископаемое топливо (хотя и добываемое в настоящее время с большим избытком), а также другие не восполняемые ресурсы, в один прекрасный день станут крайне ограниченными. И совершенно естественно, что данное обстоятельство уже сейчас заставляет искать новые, более дешевые и лучше сохраняемые источники энергии и питания, которые могли бы восполняться биотехнологическим путем. В этой ситуации страны с климатом, позволяющим ежегодно производить большие количества биомассы, будут находиться в более выгодных условиях по сравнению со странами с менее благоприятными климатическими условиями. В частности, тропические области земного шара в этом отношении имеют существенное преимущество над другими регионами.

Следующим фактором, способствующим росту интереса к биотехнологии, является современный мировой спад в химических и инженерных направлениях, обусловленный частичным истощением источников энергии. В силу этого биотехнология рассматривается в качестве одного из важнейших средств рестимуляции (обновления) экономики на основе новых методов, новой технологии и новых сырьевых материалов. Фактически, индустриальный бум 1950-х и 1960-х годов был обусловлен дешевой нефтью, так же как успехи в информационной технологии обусловили в 1970-х и 1980-х годах развитие микроэлектроники. И есть основания полагать, что 2000-е годы станут эрой биотехнологии. Во всяком случае, в мире отмечается существенный подъем исследований в области молекулярной биологии, возникновение новых биотехнологических компаний, увеличение инвестиций в биотехнологические отрасли промышленности (как национальными компаниями, так и отдельными лицами), а также рост фундаментальных знаний, увеличение количества источников информации и средств информатики.

Многие биотехнологические процессы могут рассматриваться как имеющие три главных стержневых компонента: первая часть состоит в получении наиболее оптимальных катализаторов специфических процессов, вторая часть сводится к обеспечению по возможности оптимальных условий для осуществления требуемого каталитического процесса и третья – связана с отделением и очисткой целевого продукта или продуктов из ферментационной смеси.

В большинстве случаев наиболее эффективной, стабильной и удобной формой для катализа биотехнологических процессов являются цельные организмы, вследствие чего в биотехнологии широко используются микробиологические процессы. Конечно, это не исключает использование и высших организмов (в частности, культур растительных и животных клеток), которые, несомненно, в будущем будут играть важную роль в биотехнологии.

Микроорганизмы обладают огромным генетическим пулом (фондом), позволяющим им осуществлять практически неограниченную биосинтетическую деятельность и потенциал деградации. Кроме того, микроорганизмам присущ исключительно быстрый рост, скорость которого намного превышает скорость роста высших организмов (растений и животных). Указанное свойство позволяет за короткий промежуток времени осуществить синтез больших количеств, требуемого продукта в строго контролируемых условиях.

Существенным моментом первого компонента биотехнологии является селекция и улучшение объекта с помощью различных генетических методов, а в последнее время с

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA АКАДЕМИАСЫ «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144

использованием высокоэффективных приемов молекулярной биологии, которые, как уже упоминалось, способны обеспечить конструирование организмов с новыми биохимическими возможностями.

Во многих случаях катализатор используется в изолированной форме в виде очищенного фермента, для получения которого в настоящее время разработаны эффективные методы выделения и очистки, а также методы стабилизации.

Второй компонент биотехнологии связан с изготовлением систем, обеспечивающих оптимальное функционирование организмов-продуцентов или чистых ферментов. Сюда относятся специальные знания о химии процессов, а также сведения об инженерном обеспечении конструирования и изготовления этих систем.

Наконец, третий компонент представляет собой довольно сложную и дорогую процедуру биотехнологического процесса – выделение и очистку целевого продукта. Этот компонент существенно увеличивает стоимость всего процесса и может составлять до 70% стоимости готового коммерческого препарата.

Многоэтапность биотехнологических процессов определяет необходимость привлечения к их осуществлению специалистов самого различного профиля: генетиков и молекулярных биологов, биохимиков, вирусологов, микробиологов и клеточных физиологов, инженеров-технологов, конструкторов биотехнологического оборудования и т. п.

Сказанное позволяет утверждать, что чистых специалистов-биотехнологов в природе не существует, да такого специалиста нельзя себе и представить. Поэтому в биотехнологии с равным успехом работают и микробиологи, и генетики, и биохимики, и клеточные и генетические инженеры, и конструкторы, и т.д. и т.п., от деятельности которых зависит прогресс и успех данной отрасли. Однако необходимо отдавать себе отчет в том, что на развитие биотехнологии существенное влияние могут оказывать деятельность различных политических и экономических сил.

В медицине, фармацевтической технологии, ветеринарии и косметологии уже достаточно широко применяются продукты биотехнологического производства: ферменты микробиологического синтеза, моноклональные антитела, антибиотики, стероидные препараты, полисахариды, рекомбинантные ДНК, биополимеры, липиды, полисахариды, человеческий интерферон, различные белковые препараты.

Преимущества биотехнологического способа производства получения продуктов с заданными свойствами:

- специфичность получаемых продуктов;
- легкость контроля технологического процесса;
- работа при низких температурах и без участия агрессивных химических сред, токсических растворителей и др.;
- простота выделения целевых продуктов;
- доступность и дешевизна исходного сырья;
- его высокая репродуктивная способность, что позволяет за короткое время быстро наращивать необходимое количество биомассы;
- совместимость с окружающей средой и др.

Прошло не так и много времени с тех пор, когда были осуществлены первые эксперименты по рекомбинации плазмидных молекул ДНК, принадлежащих различным видам бактерий. Эти работы принято считать началом развития генетической инженерии «in vitro». Суть этих работ состоит в применении специальных ферментов – рестриктаз для выделения из хромосом необходимых фрагментов ДНК (генов) и лигазы для сшивания этих фрагментов в общий репликон, то есть автономно реплицирующуюся молекулу ДНК.

Благодаря многочисленным работам в области молекулярной биологии и генетики была доказаны возможность создания рекомбинантных молекул с использованием исходных молекул ДНК из различных видов и штаммов бактерий, их жизнеспособность, стабильность, функционирование.

Под рекомбинантными ДНК понимают ДНК образованные путем объединения «in vitro» двух и более фрагментов ДНК, выделенных из любых источников. Ключевыми в этом определении являются слова «фрагмент ДНК» и «объединение in vitro», что указывает на сущность генетической инженерии и на ее отличие от всех остальных методов получения гибридных (или химерных) организмов, таких как генетическая селекция, эмбриональная инженерия и т.д.

Таким способом были получены рекомбинантные ДНК, обеспечивающие продукцию гормона роста человека с помощью клеток *E. coli* и человеческого интерферона тоже с помощью клеток *E. coli* и дрожжевых клеток.

Был получен также ряд биологически активных гибридных плазмид из *E. coli* и *Staphylococcus aureus*. Благодаря этому налажен выпуск некоторых гормонов человека, получаемых биотехнологическим способом.

Решающим шагом в истории развития генетической инженерии был этап, связанный с переходом к клонированию и экспрессии генов животных и человека в бактериальных клетках. К сегодняшнему дню описано получение многих гибридных ДНК, содержащих гены эукариотов и плазмиды прокариотов в качестве векторов (инсулин, интерферон, гормон роста и др.)

Первой работой на этом этапе развития генной инженерии были работы группы Бойера по созданию гормона роста – соматостатина. Для этого гены человека клонируют в микроорганизмы, например, для получения соматотропного гормона (СТГ) человека используют биомассу бактерий *Escherichia coli*, содержащих рекомбинантную плазмиду с геном СТГ человека.

Крупнейшим достижением биотехнологии в области генной инженерии является разработка эффективных методов производства человеческого интерферона. В результате высканий были получены α -интерферон (реаферон), β - и γ -интерфероны, проинсулин человека – гибридный белок β -галактозидаза (проинсулин предлагается для получения лекарственных форм инсулина). Это все стало возможным благодаря технологии генетическое перестройке в опытах «in vitro».

С помощью бактерий были получены с высоким выходом некоторые белки – продукты генов животных и их вирусов. Так, были созданы штаммы *E. coli*, у которых 20 % всего клеточного белка составляли коровий антиген вируса гепатита В, гормон роста человека или главный капсидный антиген вируса ящура.

В некоторых случаях повысить выход белков можно, применяя не содержащие протеазы мутанты. Так, при выработке проинсулина, предшественника инсулина, некоторая защита от протеаз обеспечивается тем, что полипептид секретируется в периплазматическое пространство у клеточной стенки *E. coli*. Время полужизни проинсулина в клетке 2 минуты, а в периплазматическом пространстве – 20 минут.

Инсулин, выделенный из поджелудочной железы свиней и коров, отличаются по аминокислотному составу от инсулина человека: у коровы – по 3 аминокислотам, у свиней – по 1. Это обуславливает побочные эффекты при применении

Применяя технологию рекомбинантных ДНК в производстве инсулина:

- на I этапе воссоздают аминокислотную последовательность ДНК инсулина человека, раздельно синтезируя гены его А- и В-цепей;
- на II этапе каждый из генов встраивают в ген β -галактозидазы плазмид;
- на III этапе плазмиды вводят в клетки E.coli.

Поскольку бактерии растут на среде с галактозой, а не с глюкозой, то в них индуцируется синтез β -галактозидазы, и вместе с ней А- и В-цепей инсулина. После выделения и очистки синтезированный таким образом инсулин не содержит белков E.coli, эндотоксинов и пирогенных веществ, не отличается от человеческого инсулина и проявляет полную биологическую активность.

Аналогично с помощью E.coli получают проинсулин, который после расщепления трипсином и β -карбокисипептидазой переходит в нативный инсулин.

Бактерии Bacillus в отличие от E.coli способны экскретировать проинсулин в культуральную жидкость. Выделенный в среду белок обычно проще очищать, чем внутриклеточный. Помимо этого, использование штаммов Bacillus имеет то преимущество, что они не образуют эндотоксинов.

Интерфероны – это группа белков, открытых в ходе изучения веществ, вырабатываемых клетками, зараженными вирусами. Они индуцируют как локальные, так и системные противовирусные реакции в других клетках. Кроме того, интерфероны обладают еще двумя важными свойствами: а) подавляют пролиферацию клеток (являются потенциально противоопухолевым средством); б) модулируют иммунную систему. Классифицируют интерфероны на группы

1. α -интерфероны (лейкоцитарные);
2. β -интерфероны (интерфероны фибробластов);
3. γ -интерфероны (иммунные или Т-лимфоцитарные).

Ранее интерфероны получали из лейкоцитов крови человека, поэтому были дороги и малодоступны из-за небольшого получаемого количества. Сейчас интерфероны получают, включая его ген в плазмиды, затем клонируя их в клетки E. coli (α - и γ -интерфероны) или дрожжевые клетки (β -интерфероны).

Гормон роста человека – это белок, который образуется и секретируется в кровь передней долей гипофиза. Он необходим для роста костей. Его недостаток приводит к карликовости. До недавнего времени его получали только из трупного материала, что имеет свои ограничения. Благодаря технологии рекомбинантных ДНК с использованием клеток E. coli стало возможным наладить его производство в достаточном количестве. Очищенный препарат гормона из бактерий по биологической активности подобен гормону из гипофиза.

Ферменты. Получен активатор тканевого плазминогена (АТП), который активирует плазминоген, который трансформируется в плазмин, а последний – растворяет внутрисосудистые тромбы. АТП получают методом встройки генов (технология рекомбинантных ДНК) в клетки животных организмов. Он более селективен в отношении внутрисосудистых тромбов, чем стрептокиназа и стрептодеказа, обладает меньшим побочным действием и быстро (в течение нескольких минут) инактивируется в печени.

Кроме того, ферменты составляют основу многих тестов, используемых в клинической медицине.

Методы молекулярной генетики и технологии рекомбинантных ДНК применяются также в пренатальной диагностике наследственных болезней (например, серповидноклеточная анемия, β -талассемия).

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA АКАДЕМИАСЫ «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144

Благодаря технологии рекомбинантных ДНК стало возможным получать стволовые клетки в коммерческих количествах

Различные варианты биоконверсии. Микроорганизмы используются и на отдельных стадиях синтеза лекарственных веществ, который ранее осуществлялся путем многоступенчатых и дорогостоящих химических реакций\). Так, один из штаммов хлебной плесени – *Rhizopusarrhizus* – на начальном этапе синтеза производного стероида – кортизона, может гидроксировать прогестерон по 11-му положению. Применение подобной стратегии биоконверсии наряду с традиционными химическими превращениями позволило получать многие стероиды более простыми и дешевыми способами на основе стерол-содержащего растительного сырья. Именно благодаря этому методу такие стероиды, как преднизон, дексаметазон, тестостерон, эстрадиол могут применяться сегодня в клинике достаточной широко. Получение преднизолона из гидрокортизона, гидрокортизона из кортексолона, преднизона из ацетата кортизона, из сорбозы сорбита – вот неполный перечень процессов, осуществляемых в настоящее время в промышленных масштабах методом микробиологической трансформации. Так, для гидроксирования стероидов используются микроскопические грибы, для восстановления стероидов – микроорганизмы рода *Mycobacterium* и т.д. Метод биоконверсии также применяется для расширения номенклатуры антибиотиков и др. веществ.

IV. Иллюстративный материал: прилагается

V. Литература:

основная:

14. Егорова Т.А., Клунова С.М., Живухина Е.А. Основы биотехнологии. – М.: Изд. центр «Академия», - 2008. – 208 с.
15. Евтушенков А.Н., Фомичев Ю.К. Введение в биотехнологию: Курс лекций. – Минск.: БГУ, 2002. - 105 с.
16. Сазыкин Ю.О., Орехов С.Н., Чакалева И.И. Биотехнология: Учебное пособие. – М.: Изд. Центр «Академия». – 2006. – 256 с.
17. Орехов С.Н. Фармацевтическая биотехнология. Руководство к практическим занятиям. – Учебное пособие. – Под ред. акад. РАМН В.А. Быкова, проф. А.В Катлинского. – М. : ГЭОТАР-Медиа 2009. – 384 с.
18. Елинов Н.П. Химическая микробиология. - Учебник. - М.: Высшая школа. - 1989, 448 с
19. Воробьева Л.И. Промышленная микробиология. - Учебное пособие. - М.: Изд-во МГУ. - 1989, 294 с.
20. Биотехнология. Принципы и применение. Пер. с англ. / Под ред. И. Хиггинса, Д. Беста, Дж. Джонса. - М.: Мир. - 1988, 480 с.
21. Чуешов В.И., Зайцев А.И., Шебанова С.Г. Промышленная технология лекарств. Том 2. Харьков, 2002.
22. Биотехнология микробного синтеза (Под ред. Бекера М.Е.) – Рига – 1980.
23. Биотехнология. (Отв. редактор А.А. Баев). - М.: Наука. - 1984, 310 с.
24. Перт С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов. М., - 1979 г.
25. Промышленная микробиология (Под ред. Егорова Н.С.) – М., 1989 г.
26. Процессы и аппараты химической технологии (Под ред. П.Г. Романкова). – Л. – 1981.

дополнительная:

7. Березов Т.Т. , Коровкина Б.Ф. – Биологическая химия (Под ред. И.М. Ивановой) – М., Медицина – 1981 г.
8. Никитин Г.А. – Биохимические основы микробиологических производств – Киев, 1981.
9. Бриттон Г. – Биохимия природных пигментов. М., Мир – 1986 г.
10. Попова Т.В. – Развитие биотехнологии в СССР – М., Наука - 1988 г.

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA АКАДЕМИАСЫ «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11	
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144	

11. Популяционные аспекты биотехнологии – Печуркин Н.С., Брильков А.В., Маркенкова Т.В. – Новосибирск: - Наука – 1990 г.
12. Специальные журналы: «Биотехнология», «Фармация Казахстана», «Фармацевтический бюллетень» и др.

VI. Контрольные вопросы (обратная связь):

5. Каковы основные достижения биотехнологии?
6. Из каких основных компонентов состоит биотехнологический процесс?
7. Каковы преимущества биотехнологического способа производства целевых продуктов?

Лекция № 3

I. Тема: Задачи биотехнологии. Основные направления их решения. Связь между совершенствованием биотехнологического производства, повышением качества получаемой продукции с официальной нормативной документацией, гарантирующей качество выпускаемой продукции. Товарные формы препаратов биотехнологического производства.

II. Цель: Ознакомить студентов с биотехнологическими задачами, основными направлениями их решения, а также с товарными формами препаратов биотехнологического производства.

III. Тезисы лекции:

Самым главным направлением биотехнологии (основной задачей) является всемерная интенсификация производственных процессов, что достигается, с одной стороны, внедрением новых высокопродуктивных биологических объектов (продуцентов), а также широким применением эффективных технологических приемов (технологических режимов). Указанная цель достигается подбором подходящего сырья (субстрата для выращивания продуцента), разработкой наилучшей конструкции биореактора (ферментатора), оптимизацией условий культивирования продуцента, обеспечением эффективного контроля за самим технологическим процессом, а также усовершенствованием способов выделения и очистки целевого продукта.

Человечеству необходимо научиться эффективно изменять наследственную природу живых организмов, чтобы обеспечить себя доброкачественной пищей и сырьем и при этом не привести планету к экологической катастрофе. Поэтому не случайно главной задачей селекционеров в наше время стало решение проблемы создания новых форм растений, животных и микроорганизмов, хорошо приспособленных к индустриальным способам производства, устойчиво переносящих неблагоприятные условия, эффективно использующих солнечную энергию и, что особенно важно, позволяющих получать биологически чистую продукцию без чрезмерного загрязнения окружающей среды. Принципиально новыми подходами к решению этой фундаментальной проблемы является использование в селекции геномной и клеточной инженерии.

Основные направления биотехнологии. *Биотехнология — это производство необходимых человеку продуктов и материалов с помощью живых организмов, культивируемых клеток и биологических процессов.*

Возможности биотехнологии необычайно велики благодаря тому, что ее методы выгоднее обычных: они используются при оптимальных условиях (температуре и давлении), более производительны, экологически чисты и не требуют химических реактивов, отравляющих среду и др.

Главными направлениями биотехнологии являются: 1) производство с помощью микроорганизмов и культивируемых эукариотических клеток биологически активных



соединений (ферментов, витаминов, гормональных препаратов), лекарственных препаратов (антибиотиков, вакцин, сывороток, высокоспецифичных антител и др.), а также белков, аминокислот, используемых в качестве кормовых добавок; 2) применение биологических методов борьбы с загрязнением окружающей среды (биологическая очистка сточных вод, загрязнений почвы и т. и.) и для защиты растений от вредителей и болезней; 3) создание новых полезных штаммов микроорганизмов, сортов растений, пород животных и т. п.

Основные направления развития Биотехнологии:

1. Поиск новых и совершенствование известных процессов биосинтеза и биodeградации (переработка отходов).
2. Поиск экологически чистых методов получения углеродсодержащего сырья для химической промышленности.
3. Поиск новых методов биотехнологической переработки и очистки продуктов.
4. Совершенствование производства продуктов бытовой химии (клеи, красители, душистые вещества, волокна, пластмассы, полимеры и др.).
5. Создание новых источников энергии.
6. Совершенствование производства экологически чистых и защищенных от микроорганизмов пищевых продуктов и напитков.
7. Внедрение биотехнологических способов в производство фармацевтических препаратов, медикаментов и предметов для медицинского и санитарно-гигиенического применения.
8. Добыча и переработка минерального сырья, внедрение биотехнологических способов получения (выделения) чистых металлов из руд.
9. Внедрение биотехнологических способов по контролю за окружающей средой.

Все эти процессы возможны лишь при участии катализаторов, роль которых выполняют природные ферменты или искусственно вводимые специальные добавки (реактивы).

Связь между совершенствованием биотехнологического производства, повышением качества получаемой продукции с официальной нормативной документацией, гарантирующей качество выпускаемой продукции, а также товарные формы препаратов биотехнологического производства может быть рассмотрена на примере ферментов, получаемых биотехнологическим путем.

Ферменты входят в состав всех клеток и тканей живых организмов и регулируют течение процессов, лежащих в основе жизнедеятельности организма. Разнообразие этих процессов свидетельствует о существовании большого количества ферментов. В настоящее время описано около 3000 ферментов, примерно 100 из них получены в кристаллическом виде. Промышленность выпускает свыше 50 индивидуальных ферментов и вдвое больше ферментных препаратов, представляющих собой смеси, содержащие кроме целевого продукта - значительное количество близких по физико-химическим свойствам белков.

Как и все белки, ферменты являются высокомолекулярными соединениями от 10 000 до 1 000 000. Они обладают малостойкой структурой, весьма чувствительны к изменениям рН среды и температуры. Для каждого фермента существует свой оптимум значения рН среды. Отклонение рН среды в ту или иную сторону ведет к снижению скорости ферментативной реакции. Оптимальное значение температуры для большинства ферментов – +20 - +40⁰С. Повышение температуры до 40-50⁰С, как правило, приводит к падению ферментативной активности и даже к полной денатурации белка.

В соответствии с современной классификацией все ферменты делят на 6 основных классов по типу катализируемой ими реакции:

- | | |
|---------------------|------------------------|
| 1. Оксидоредуктазы; | 4. Лиазы; |
| 2. Трансферазы; | 5. Изомеразы; |
| 3. Гидролазы; | 6. Лигаза (синтетаза). |



- стрептолитин ГЗх - (с помощью *Streptomyces* species) применяется для профилактики и лечения эндометритов у коров, а также для получения из мясных отходов белковых гидролизатов, используемых в микробиологической промышленности;
- лизоцим ГЗх - компонент мультиэнзимной композиции для стимуляции роста цыплят, а также для профилактики и лечения заболеваний ЖКТ животных и птиц.

В технологии рекомбинантных ДНК для расщепления двуспиральных молекул ДНК применяются различные ферменты. Широкое применение получили рестриктазы. Так, поли-ДНК-(дезоксирибонуклеотид)-лигаза или ДНК-лигаза и др. применяются в геной инженерии и для синтеза высокополимерных поли-дезоксирибонуклеотидных цепей с контролируемой последовательностью нуклеотидов.

Полученные биотехнологическим способом ферменты уреазы, лизиндекарбоксилаза и др. используются в клинико-диагностических лабораториях для анализа биологических жидкостей.

В ходе ферментации микроорганизмов-продуцентов ферментов в питательную среду вводятся предшественники роста и биосинтеза. Так, введение аминокислот инициирует биосинтез соответствующих декарбоксилаз. Введение в среду аргинина индуцирует синтез аргиназы. Наличие в среде культивирования различных биополимеров обуславливает одновременное накопление комплекса протеаз, амилаз, нуклеаз, липаз. Наличие в среде большой концентрации мочевины стимулирует биосинтез уреазы. На рост микроорганизмов и биосинтез ферментов существенное влияние оказывают ионы кальция, магния, марганца, цинка и др. ионы железа и магния активируют и стабилизируют протеолитические ферменты. Продуценты ферментов, относящиеся к строгим анаэробам, требуют полностью бескислородных условий культивирования и очень богатых, полноценных сред. Процесс культивирования в этом случае можно проводить в более простых ферментерах, так не нужна аэрация и перемешивание. Таким образом, оптимизация питательных сред и условий культивирования для обеспечения направленного биосинтеза продуцентом целевых продуктов является важным этапом разработки биотехнологических процессов получения высокоочищенных ферментов. Преимущественный биосинтез культурой нужного продукта с минимальным содержанием посторонних белков позволяет в дальнейшем существенно упростить выделение и очистку ферментов.

Полученные ферментные препараты стандартизуют, определяя ферментативную активность. Активность ферментов выражается в Международных единицах (МЕ) или единицах действия (ЕД).

МЕ - это такое количество фермента, которое при заданных условиях катализирует превращение одного микромоля субстрата за 1 минуту.

ЕД - это условная единица, величина которой указывается в частных статьях.

Удельная активность препарата - выражается в единицах ферментативной активности фермента (МЕ или ЕД) на 1 мг препарата и на 1 мг белка (вторая величина характеризует чистоту препарата).

Доза выражается в единицах ферментативной активности (МЕ или ЕД) на единицу лекарственной формы.

Высокая лабильность ферментов к различным факторам окружающей среды (значению рН, температуре), быстрая инактивация в организме и выделение из организма, наличие антигенных свойств чужеродных организму белков в значительной мере могут быть устранены при использовании ферментов в иммобилизованном виде.

Иммобилизация ферментов - это повышение их стабильности. Существуют различные способы физической (адсорбция на нерастворимом носителе, включение в гель, микрокапсулирование, включение ферментов в липосомы и др.) и химической (с помощью ковалентного связывания, металлохелатный способ) иммобилизации. Их проводят в строго асептических условиях, но ни один из существующих способов иммобилизации

биологически активных молекул, таких, как ферменты, антигены, антитела, не является универсальным.

Все товарные формы биопрепаратов с точки зрения технологии их получения можно разделить на три основные группы.

Первая группа – биопрепараты, имеющие в товарном продукте в качестве основного активного компонента жизнеспособные микроорганизмы. К этой группе относятся средства защиты растений, бактериальные удобрения, закваски для силосования кормов, биодеграданты, другие активные средства биотрансформации.

Вторая группа – биопрепараты, в состав которых входит инактивированная биомасса клеток и продукты ее переработки. Кормовые дрожжи, грибной мицелий и др.

Третья группа – биопрепараты на основе очищенных продуктов метаболизма микроорганизмов. К ним относятся витамины, аминокислоты, ферменты, антибиотики, биоллипиды, полисахариды, продукты комплексной переработки микробных биомасс и метаболитов.

Даже простое перечисление товарных форм биопрепаратов показывает возможности биотехнологии. Однако этот важный вопрос заслуживает некоторой детализации.

Некоторые ферменты и области их применения

Фермент	Применение
а-Амилаза	Пивоварение, производство спирта
Аминоацилаза	Получение L-аминокислот
Бромелаин	Размягчение мяса, осветление соков
Каталаза	Антиоксидант в готовых к употреблению пищевых продуктах
Целлюлаза	Получение спирта и глюкозы
Фицин	Размягчение мяса, осветление соков
Глюкоамилаза	Пивоварение, производство спирта
Глюкозоизомераза	Производство сиропов с высоким содержанием фруктозы
Глюкозооксидаза	Антиоксидант в готовых к употреблению пищевых продуктах
Инвертаза	Инверсия сахарозы
Лактаза	Утилизация сыворотки, гидролиз лактозы
Липаза	Сыроварение, получение ароматизаторов
Папанн	Размягчение мяса, осветление соков
Пектиназа	Осветление соков, производство спирта
Протеаза	Детергент, производство спирта
Реннин	Сыроварение

IV. Иллюстративный материал: прилагается

V. Литература:

основная:

1. Егорова Т.А., Клунова С.М., Живухина Е.А. Основы биотехнологии. – М.: Изд. центр «Академия», - 2008. – 208 с.
2. Евтушенков А.Н., Фомичев Ю.К. Введение в биотехнологию: Курс лекций. – Минск.: БГУ, 2002. - 105 с.
3. Сазыкин Ю.О., Орехов С.Н., Чакалева И.И. Биотехнология: Учебное пособие. – М.: Изд. Центр «Академия». – 2006. – 256 с.
4. Орехов С.Н. Фармацевтическая биотехнология. Руководство к практическим занятиям. – Учебное пособие. – Под ред. акад. РАМН В.А. Быкова, проф. А.В Катлинского. – М. : ГЭОТАР-Медиа 2009. – 384 с.

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA АКАДЕМИАСЫ «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144

5. Елинов Н.П. Химическая микробиология. - Учебник. - М.: Высшая школа. - 1989, 448 с
6. Воробьева Л.И. Промышленная микробиология. - Учебное пособие. - М.: Изд-во МГУ. - 1989, 294 с.
7. Биотехнология. Принципы и применение. Пер. с англ. / Под ред. И. Хиггинса, Д. Беста, Дж. Джонса. - М.: Мир. - 1988, 480 с.
8. Чуешов В.И., Зайцев А.И., Шебанова С.Г. Промышленная технология лекарств. Том 2. Харьков, 2002.
9. Биотехнология микробного синтеза (Под ред. Бекера М.Е.) – Рига – 1980.
10. Биотехнология. (Отв. редактор А.А. Баев). - М.: Наука. - 1984, 310 с.
11. Перт С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов. М., - 1979 г.
12. Промышленная микробиология (Под ред. Егорова Н.С.) – М., 1989 г.
13. Процессы и аппараты химической технологии (Под ред. П.Г. Романкова). – Л. – 1981.

дополнительная:

1. Березов Т.Т. , Коровкина Б.Ф. – Биологическая химия (Под ред. И.М. Ивановой) – М., Медицина – 1981 г.
2. Никитин Г.А. – Биохимические основы микробиологических производств – Киев, 1981.
3. Бриттон Г. – Биохимия природных пигментов. М., Мир – 1986 г.
4. Попова Т.В. – Развитие биотехнологии в СССР – М., Наука - 1988 г.
5. Популяционные аспекты биотехнологии – Печуркин Н.С., Брильков А.В., Маркенкова Т.В. – Новосибирск: - Наука – 1990 г.
6. Специальные журналы: «Биотехнология», «Фармация Казахстана», «Фармацевтический бюллетень», и др.

VI. Контрольные вопросы (обратная связь):

1. Назовите основные направления развития биотехнологии?
2. Каковы основные товарные формы биопрепаратов?

Лекция № 4-5

I. Тема: Экологические аспекты биотехнологического производства. Характерные особенности биотехнологических производств, основные виды образующихся отходов, их количество, загрязненность, потенциальная опасность для экологии. Организация контроля за охраной окружающей среды в условиях биотехнологического производства: эффективность утилизации вредных отходов, стабильное долговременное активное состояние во внешней среде, экологическая безвредность и др.

Биоповреждения (вред от микроорганизмов) и пути их предотвращения.

II. Цель: Ознакомить студентов с экологическими аспектами биотехнологических производств, организацией контроля за окружающей средой. Повреждение от микроорганизмов и пути их предотвращения.

III. Тезисы лекции:

Экологические аспекты биотехнологии
Понятие «экология»

В течение последних десятилетий понятие «экология» постоянно используется средствами массовой информации и встречается, как правило, при описании загрязнения окружающей среды и другого рода антропогенных воздействий на биосферу. Таким образом, понятие «экология» ассоциируется с определенными нарушениями, которые следует предотвратить.

Впервые термин «экология» был введен в научную литературу еще в XIX в. известным биологом Э.Геккелем. Экология (по Геккелю) – это «общая наука об отношениях организмов к окружающей среде».

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA АКАДЕМИАСЫ «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144

Современные определения экологии конкретизированы и усложнены, например:

«экология – наука о взаимоотношениях живых существ между собой и с окружающей их неорганической природой, о связях в надорганизменных системах (сообществах), о структуре и функционировании этих систем»;

«экология – наука о взаимоотношениях: организмов и их популяций со средой обитания; о биоценозах и экосистемах как результате взаимообусловленной эволюции организмов и среды; об ауторегуляции экосистем и их роли в биосфере планеты».

Второе определение шире и подразумевает ответственность человека за свою деятельность по изменению окружающей среды. В этом случае экология исследует не только закономерности данного момента, но и эволюционные закономерности в движении. Кроме того, здесь ставится вопрос об ауторегуляции как проявлении внутреннего качества экосистем.

Как научная дисциплина экология может быть дифференцирована:

- на глобальную экологию (со своими закономерностями как предметом изучения);
- общую экологию;
- частную экологию (для определенной группы микроорганизмов определенного таксономического ранга).

Существует также деление этой дисциплины на нормальную и патологическую экологию.

Нормальная экология исследует взаимоотношения организмов и среды их обитания в естественных условиях.

Патологическая экология призвана изучать факторы, обусловленные антропогенной деятельностью, а также их влияние на сложившиеся природные отношения организмов со средой и перспективу этих отношений.

Как известно, биосфера (область распространения жизни на нашей планете) охватывает литосферу, гидросферу и атмосферу. Для человека окружающая среда фактически равнозначна биосфере, но данную аналогию нельзя экстраполировать на все живые организмы на Земле. В какой-то мере антропогенная деятельность начала сказываться и на околоземном космосе (околоземный «космический мусор»), но проблемы патологической экологии, в основном, сосредоточены все же на биосфере, где они становятся в настоящее время все более ощутимы, что дает даже повод говорить не только об экологической опасности, но и грозящей экологической катастрофе.

Однако при объективном взгляде на результате деятельности цивилизации придется отметить, что первыми на планете появились микроорганизмы, получавшие энергию в результате хемосинтеза. Именно их деятельность подготовила почву (в прямом и переносном смысле) к возникновению более сложных форм жизни. В результате произошло первое глобальное явление в биосфере, которое, как ни парадоксально, можно назвать экологической катастрофой.

Появились и в полном смысле слова завоевали планету зеленые растения, что привело к резкому увеличению количества кислорода в атмосфере, а последнее – к вымиранию некоторых высокочувствительных к кислороду организмов.

Этот убедительный пример показывает, как нарушение баланса неживой природы неизбежно влечет изменения живой природы в глобальном масштабе.

Нет оснований полагать, что эволюция на современном этапе жизни на Земле уже завершилась, но даже при достаточно беглом анализе последствий развития цивилизации становится очевидным, что ситуация ухудшается с каждым годом.

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA АКАДЕМИАСЫ «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11	
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144	

Человек одновременно является высшей формой жизни и природной силой, которая преобразует окружающую среду (биосферу), что в свою очередь отражается на эволюции всех форм жизни, в том числе и на самом человеке. Действительно, некоторые изменения биосферы можно однозначно связать с воздействием антропогенных факторов, однако возникает вопрос – негативны они или позитивны?

Во время зарождения жизни на Земле повышение содержания кислорода в атмосфере привело к новой, более совершенной биоэнергетике и в дальнейшем – к животной клетке. Позитивность или негативность определенного фактора для жизни может быть установлена только по конечному результату.

Предвидеть направление дальнейшей эволюции живого мы не можем. Моделировать такой процесс также практически невозможно. Поэтому вопрос дифференцировки антропогенных воздействий на благоприятствующие и препятствующие будущему развитию человечества остается открытым.

Человек уникален тем, что, создавая благо для себя, он одновременно может действовать во вред себе как виду. Даже если предположить, что этим человек создаст предпосылки для собственной эволюции, нельзя при этом допускать ни сокращения продолжительности жизни, ни утраты здоровья. Поэтому понятия «экологическая катастрофа и экологическая опасность», прежде всего, целесообразно прилагать к самому человеку, а не распространять их на все эволюционные процессы.

Эколого-биохимические взаимодействия в организменных сообществах

Известно, что специализированные железы растений и животных вырабатывают биологически активные молекулы с сигнально-коммуникативными функциями, которые выделяются в окружающую среду и вызывают специфическую ответную реакцию у воспринимающих их особей того же вида. Ответной реакцией у воспринимающей особи может быть изменение либо поведения, либо процесса развития.

Таким образом, химической коммуникацией осуществляется передача информации. Вещества, обуславливающие подобного рода явления, получили название феромонов (от греч. *Phero* – управлять, приносить и т.п.)

Выделяют феромоны-релизеры и феромоны-праймеры.

Феромоны-релизеры вызывают немедленные поведенческие эффекты. К ним относятся половые феромоны, феромоны тревоги, следа, «мечения» территории и др. Отметим их исключительно высокую биологическую активность. Например, нескольких молекул этого феромона в 1 м³ воздуха достаточно, чтобы воспринимающая его особь животного изменила направление своего движения. Так, немногочисленная популяция белых медведей, рассеянных на огромных территориях Арктики в виде отдельных кочующих особей, получает возможность встречи для дальнейшего спаривания благодаря своему видоспецифическому половому феромону. То же происходит и в немногочисленной популяции уссурийских тигров, причем необходимо отметить чрезвычайно высокую специфичность биологической активности соответствующего феромона, так как воздух уссурийской «субтропической тайги» содержит многочисленные летучие органические соединения растительного и животного происхождения.

Феромоны-праймеры вызывают длительные физиологические эффекты в воспринимающем организме. К ним относятся вещества, которые фиксируют срок наступления половой зрелости животного (здесь прослеживается связь с простагландинами). Еще одним эффектом некоторых феромонов-праймеров является возможность сигнализации к моногамии и отсутствию инцеста у определенных видов млекопитающих, например, у некоторых видов грызунов. В данном

ÖNTÜSTİK-QAZAQSTAN MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144

случае прослеживается приближение к закономерностям нейроэндокринного характера. К феромонам-праймерам относятся также вещества, регулирующие принадлежность к определенной касте особей «общественных» насекомых.

К феромонам относятся также *алломоны* и *кайромоны*. С их участием осуществляется «общение» в надорганизменных межвидовых сообществах. Алломоны приносят пользу тому, кто их вырабатывает, кайромоны – реципиентам.

Общебиологическое значение феромонов несомненно, хотя во многом еще не раскрыто. Как химические соединения феромоны исключительно разнообразны по структуре.

Исследование в области феромонов ведутся как с позвоночными, так и с беспозвоночными. Из позвоночных, преимущественно млекопитающих, выделено несколько сотен химических структур с сигнально-коммуникативной активностью. Из беспозвоночных – около двух тысяч. И первые, и особенно вторые с их огромным количеством видов в качестве источника феромонов изучены еще очень мало.

Перспективы применения феромонов в сельском хозяйстве – от животноводства до борьбы с сельскохозяйственными вредителями (замена инсектицидов) не вызывают сомнений и частично уже реализуются.

Представляет интерес разнообразная активность феромонов для использования в области фармации, однако решение этого вопроса зависит от раскрытия механизма действия феромонов на молекулярном уровне.

Экологические аспекты биотехнологического производства

Подчеркнем, что антропогенное воздействие на биосферу неотъемлемо от развития цивилизации. Распашка земель, вырубка лесов, «вытаптывание» степей постоянно сопутствуют истории человечества. Уместно вспомнить об уничтожении отдельных видов животных и растений и о расселении некоторых видов из мест коренного обитания.

В связи с особой актуальностью проблемы влияния промышленности на биосферу рассмотрим, как выглядит в этом отношении биотехнологическое производство. Прежде всего, оно наукоемко и по сравнению с химико-технологическим производством более эффективно, так как клетка продуцента (биообъекта) представляет «сбалансированный комплекс биокатализаторов», работающий более производительно, чем системы последовательных химических реакций с неорганическими катализаторами.

Потребление энергоресурсов и воды биотехнологической промышленностью составляет доли процента от потребляемого современной химической промышленностью. Выброс в атмосферу газообразных отходов предприятий биотехнологической промышленностью в целом. Именно биотехнологическое производство наиболее приемлемо в современных условиях, однако и оно имеет специфические, экологические проблемы и, соответственно, совершенствуется в направлениях:

- создания и использования более активных биообъектов-продуцентов (в результате на единицу продукции будет меньше отходов!);
- замены сред и реагентов на менее дефицитные;
- иммобилизации биообъектов (как клеток, так и ферментов), многократного их использования для уменьшения отходов;
- внедрения мембранной технологии на стадии выделения и очистки целевого продукта (уменьшение количества применяемых органических растворителей во избежание агрессивных условий на некоторых на некоторых стадиях производственного процесса);
- соблюдения правил **GMP**.

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA АКАДЕМИАСЫ «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144

Рассмотрим кратко проблемы, относящиеся к ликвидации (утилизации) или очистки производственных отходов традиционного биотехнологического предприятия.

Твердые отходы. Прежде всего, к ним относится мицелий (биомасса) продуцента после его отделения от культуральной жидкости и целевого продукта. О количестве мицелия, с которым приходится иметь дело, можно получить наглядное представление исходя из того, что объем слива промышленного ферментера – это 50-100 м³ густой, вязкой (из-за наличия мицелия) жидкости. Учитывая, что на предприятии имеется ряд ферментеров, а ферментационный цикл длится около недели, можно сделать вывод, что этот вид твердых отходов на одном (крупном) предприятии составляет сотни тон в год. При этом необходимо учитывать, что мицелий содержит и остаточные количества целевого продукта, а это, как правило, биологически высокоактивные вещества.

В настоящее время твердые отходы ликвидируют путем переработки мицелия. Его перемешивают с почвой и помещают в ямы с бетонными подложками. Каждую такую яму оставляют закрытой на несколько лет. За это время почвенные микроорганизмы подвергают органические вещества мицелия ферментативному расщеплению, используя их для построения «своей» биомассы. Фактически образуется компост, органическая часть мицелия при этом разлагается. Бетонная подложка в такого рода «компостных ямах» необходима, чтобы предотвратить попадание еще неразложившихся растворимых органических веществ мицелия в грунтовые воды и водоемы с дождевой водой. Обычно для компостных ям выделяют специальные участки на территории предприятия. Отметим, что вывоз подсушенного мицелия (его масса по сравнению с первоначальной уменьшается в 10-100 раз) на общегородские свалки запрещен.

Попытки применения мицелия для тех или иных целей в целом пока не увенчались успехом, однако в лабораторных условиях уже создана малоотходная технология. Из мицелия актиномицета продуцента тетрациклина, образуемого продуцентом, принадлежащим к тому же штамму. В некоторых случаях (при ограниченности пастбищ) простерилизованную и перемолотую биомассу некоторых микроорганизмов используют в качестве добавки в корм сельскохозяйственных животных. Мицелий грибов и актиномицетов (отходы при производстве антибиотиков) повышает качество некоторых строительных материалов (керамзитовые плиты, кирпич и др.), увеличивая их прочность. Но по экономическим соображениям производить эти материалы нецелесообразно.

Жидкие отходы. В случае биотехнологического производства жидкими отходами являются стоки и сточная жидкость после отделения от нее мицелия и извлечения целевого продукта. Суммарный годовой объем культуральной жидкости, которая должна подвергнуться к очистке, составляет для одного предприятия десятки тысяч кубометров. Степень очистки, контролируемой разными методами, должна быть такой, чтобы очищенная жидкость могла сливаться в открытые водоемы.

Существуют разные схемы очистки. Почти во всех из них ключевую роль играют микроорганизмы (биологическая очистка). Приведем одну из таких схем (рис. 12). Первым компонентом системы очистки является железобетонный отстойник, куда попадает отработанная культурная жидкость. На две отстойника проложены трубы, через которые происходит отсасывание осадка. На этой стадии из культуральной жидкости удаляется примерно 40% загрязнений. Следующий участок системы очистки состоит из одного или нескольких, расположенных один за другим, аэротенков – баков с проходящими по дну трубами, из которых выходит

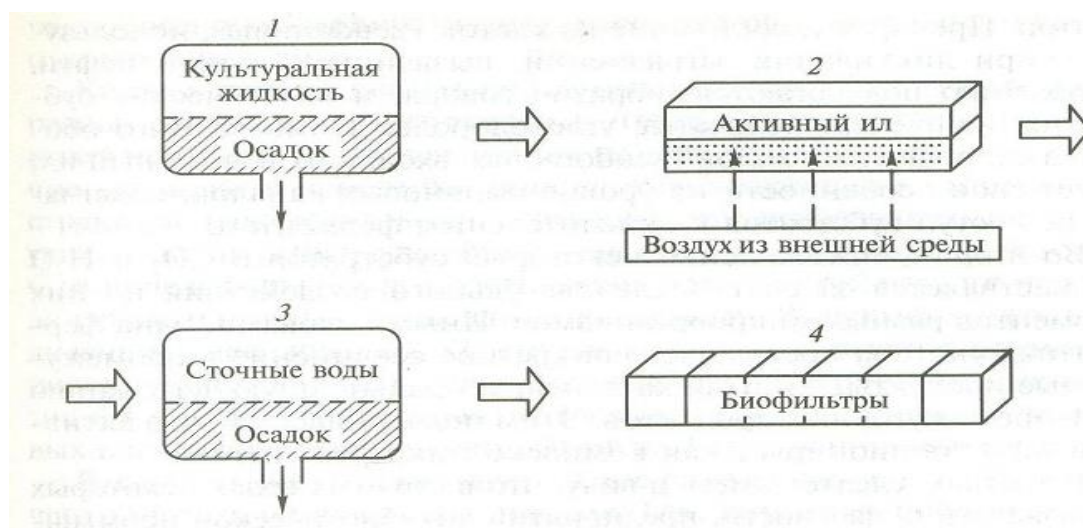


Рис. 12. Схема биологической очистки жидких отходов:

1,3 – соответственно первичный и вторичный железобетонные отстойники; 2 – аэротенк; 4 – блок доочистки

в виде пузырьков воздуха, проходящий через всю толщу жидкости, в результате она насыщается кислородом. Воздух способствует интенсивному протеканию окислительных процессов. Ключевая особенность аэротенка – наличие в нем так называемого «активного ила» (искусственного биоценоза – сообщества микроорганизмов, окисляющих растворенные в жидкости органические вещества до CO_2 и H_2O), постепенно формирующегося в процессе работы предприятия.

Видовой состав биоценоза активного ила на разных предприятиях может незначительно варьировать, поскольку последний зависит от окисляемых субстратов. Как правило, в нем доминируют представители рода *Pseudomonas* (70%). Далее следуют микроорганизмы, объединенные в род *Bacterium* (20%). Остальные 10% составляют представители родов *Bacillus*, *Sarcina* и другие микроорганизмы. Характеризуя активный ил как биоценоз или как надорганизменное межвидовое сообщество применительно к очистке сточной жидкости биотехнологического производства, следует отметить три важных обстоятельства.

Во-первых, принципиальную роль здесь играют штаммы рода *Pseudomonas*. Однако не следует сводить этот род только к виду *Pseudomonas aeruginosa* – известному возбудителю опасных для человека видов. Именно непатогенные штаммы входят в состав активного ила. Для этих микроорганизмов характерен широкий набор окислительных ферментов. Препараты, состоящие из клеток *Pseudomonas*, используются при ликвидации загрязнений, вызванных утечкой нефти. Окислению подвергаются, образно говоря, и экзотические субстраты, например, кольчатые углеводороды. Помимо этого оболочка сапрофитных видов *Pseudomonas*, входящих в активный ил, имеет свои особенности на уровне пориновых каналов, облегчающие доступ субстратов к окислительным ферментам.

Во-вторых, превращение некоторых субстратов в CO_2 и H_2O осуществляется за счет последовательного воздействия на них ферментов разных микроорганизмов. Иными словами, одна ферментная система превращает конкретное соединение в промежуточные продукты, а другая катализирует дальнейшую деградацию этих промежуточных продуктов. Этим подчеркивается, что активный ил функционирует как комплекс микроорганизмов.

В-третьих, следует иметь в виду, что в сточных водах некоторых производств (в частности, предприятий антибиотической промышленности) могут содержаться остаточные

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA АКАДЕМИЯСЫ «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144

количества антимикробных веществ. Это означает, что микроорганизмы в аэротенках постоянно контактирует с ними, т.е. создают условия для селекции резистентных форм. Но не исключены случаи, когда концентрация антимикробных веществ в очищаемых жидких отходах может оказаться необычно высокой и вызвать гибель клеток активного ила.

Это требует контроля за состоянием активного ила. После участка с аэротенком или несколькими последовательно расположенными аэротенками и вторичным отстойником принципиально важным для системы жидких отходов является «блок доочистки». В нем культуральная жидкость, в которой остается примерно 10% первоначального содержания органических веществ (как правило, это трудноокисляемые вещества), пропускается через биофильтры – пленки с иммобилизованными клетками микроорганизмов с наиболее высокой окислительной активностью. Нередко эти клетки принадлежат к сконструированным методами генной инженерии штаммам, содержащим плазмиды, несущие гены окислительных ферментов (ферментов деструкции). Такие целенаправленно полученные «штаммы-деструкторы» способны окислять трудноокисляемые вещества и уничтожать оставшиеся 10% загрязнений в очищаемой жидкости.

Иммобилизация клеток таких штаммов в биопленках рациональна ввиду того, что при способном размножении этих клеток искусственно повышенная окислительная активность может быть утрачена за счет обратных мутаций или потери плазмид. В этом случае в «блоке доочистки» как бы «сочетаются» генная инженерия и инженерная энзимология. Прошедшая «блок доочистки» жидкость, соответствующая официальным критериям питьевой воды (одним из принятых методов контроля токсичности в данном случае является подавление жизнеспособности микроскопического ракообразного *Daphniamagna*), хлорируется и затем поступает в открытые водоемы.

Касаясь работы систем биологической очистки сточных вод в разных режимах, следует отметить, что при максимальных («шоковых») нагрузках могут возникнуть разные трудности. В такие рабочие периоды в аэротенки вносят высокоактивные штаммы деструкторы («бактериальные закваски»), что позволяет значительно усилить пропускную способность системы очистки жидких отходов. С этой целью для биотехнологических предприятий разного профиля рекомендованы специальные препараты: «Phenobac» - для утилизации углеводов, «Thermobac» - для окисления полисахаридов, «Polibac» - для освобождения от синтетических детергентов и т.п. Ориентировочная доза «бактериальной закваски» из живых клеток составляет около 100 мг на 1 м³ сточной жидкости.

В заключение отметим возможное разнообразие схем биологической утилизации жидких отходов. Так помимо аэробной очистки в схему могут быть включены: этап анаэробной очистки, этапы с использованием сорбентов (активированного угля, цеолитов и др.), этапы с применением электрохимических методов (например, электрокоагуляции).

Газообразные отходы. Газовые выбросы очищают от органических соединений при температуре от 300 до 1 000°C в колонках с неорганическими катализаторами. В этом случае летучая «органика» превращается в CO₂. В некоторых случаях используются биологические фильтры на основе микроорганизмов, окисляющих органические вещества до CO₂.

Однако при использовании микроорганизмов во благо необходимо, прежде всего, знать вред от них и пути его предотвращения. Вред от микроорганизмов называется биоповреждением и представляет собой любое нежелательное изменение свойств материалов, вызванное жизнедеятельностью микроорганизмов.

Биоповреждения и пути их предотвращения:

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA АКАДЕМИАСЫ «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144

Биоповреждениям подвергаются, прежде всего, следующие материалы:

1. Пищевые продукты. Для их защиты от микроорганизмов используется замораживание, засаливание, засахаривание, кипячение, консервирование (введение специальных химических добавок-консервантов) и др.
2. Целлюлоза и изделия из нее (бумага, дерево, ткани). Например, хлопчатобумажная ткань, находясь в земле при +25° С, полностью теряет свою прочность, поэтому натуральные и полусинтетические ткани, деревянные изделия, некоторые сорта бумаги пропитывают специальными химическими составами.
3. Поверхностные покрытия (пластик, пластмассы), предназначенные для защиты изделий от окислительной коррозии, могут сами подвергаться биокоррозии под действием микроорганизмов. Поэтому в их состав также вводят химические добавки.
4. Металлы (различные трубопроводы, особенно, находящиеся в земле) также подвергаются биокоррозии под действием железобактериальных (и других) микроорганизмов. Кроме того, микроорганизмы могут накапливаться в трубопроводах, сужая их просвет.
5. Различное топливо и смазочные материалы тоже нуждаются во введении различных химических добавок, т.к. они могут подвергаться действию литотрофных микроорганизмов.
6. Биоповреждениям подвергаются также драгоценные металлы (золото), драгоценные и полудрагоценные камни (бирюза, янтарь, кораллы), поэтому они также нуждаются в обработке химическими составами.
7. Резины и пластмассы достаточно устойчивы к воздействию микроорганизмов, т.к. возможность биоповреждений была учтена и предотвращена уже при их создании.

Защита материалов различной природы от биоповреждений является самостоятельной задачей биотехнологии.

IV. Иллюстративный материал: прилагается

V. Литература:

основная:

27. Егорова Т.А., Клунова С.М., Живухина Е.А. Основы биотехнологии. – М.: Изд. центр «Академия», - 2008. – 208 с.
28. Евтушенко А.Н., Фомичев Ю.К. Введение в биотехнологию: Курс лекций. – Минск.: БГУ, 2002. - 105 с.
29. Сазыкин Ю.О., Орехов С.Н., Чакалева И.И. Биотехнология: Учебное пособие. – М.: Изд. Центр «Академия». – 2006. – 256 с.
30. Орехов С.Н. Фармацевтическая биотехнология. Руководство к практическим занятиям. – Учебное пособие. – Под ред. акад. РАМН В.А. Быкова, проф. А.В Катлинского. – М. : ГЭОТАР-Медиа 2009. – 384 с.
31. Елинов Н.П. Химическая микробиология. - Учебник. - М.: Высшая школа. - 1989, 448 с
32. Воробьева Л.И. Промышленная микробиология. - Учебное пособие. - М.: Изд-во МГУ. - 1989, 294 с.
33. Биотехнология. Принципы и применение. Пер. с англ. / Под ред. И. Хиггинса, Д. Беста, Дж. Джонса. - М.: Мир. - 1988, 480 с.
34. Чуешов В.И., Зайцев А.И., Шебанова С.Г. Промышленная технология лекарств. Том 2. Харьков, 2002.
35. Биотехнология микробного синтеза (Под ред. Бекера М.Е.) – Рига – 1980.
36. Биотехнология. (Отв. редактор А.А. Баев). - М.: Наука. - 1984, 310 с.
37. Перт С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов. М., - 1979 г.
38. Промышленная микробиология (Под ред. Егорова Н.С.) – М., 1989 г.
39. Процессы и аппараты химической технологии (Под ред. П.Г. Романкова). – Л. – 1981.

дополнительная:

ÖNTÜSTİK-QAZAQSTAN MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144

13. Березов Т.Т. , Коровкина Б.Ф. – Биологическая химия (Под ред. И.М. Ивановой) – М., Медицина – 1981 г.
14. Никитин Г.А. – Биохимические основы микробиологических производств – Киев, 1981.
15. Бриттон Г. – Биохимия природных пигментов. М., Мир – 1986 г.
16. Попова Т.В. – Развитие биотехнологии в СССР – М., Наука - 1988 г.
17. Популяционные аспекты биотехнологии – Печуркин Н.С., Брильков А.В., Маркенкова Т.В. – Новосибирск: - Наука – 1990 г.
18. Специальные журналы: «Биотехнология», «Фармация Казахстана», «Фармацевтический бюллетень» и др.

VI. Контрольные вопросы (обратная связь):

1. Каков общий вклад биотехнологии в решение современных экологических проблем?
2. Что собой представляют биотехнологические отходы?
3. Какие существуют схемы по очистке твердых, жидких и газообразных отходов?
4. Какова роль генной инженерии в экологии?
5. По каким направлениям можно совершенствовать биотехнологическое производство в плане экологической безопасности?

Лекция №6

I. Тема: Основные требования к материалам и аппаратам биотехнологических производств: эксплуатационные, конструктивные, экономические требования.

Требования техники безопасности, промышленной санитарии и охраны труда в биотехнологическом производстве.

II. Цель: Ознакомить студентов с основными требованиями к материалам и аппаратам, технике безопасности, промышленной санитарии и охраны труда в биотехнологическом производстве.

III. Тезисы лекции:

ТРЕБОВАНИЯ К МАТЕРИАЛАМ И АППАРАТАМ

При создании аппарата с целью проведения технологического процесса необходимо учитывать эксплуатационные, конструктивные и экономические требования, а также охрану труда и технику безопасности в промышленных условиях.

Эксплуатационные требования

Аппарат создается для проведения определенного технологического процесса, требующего определенных условий. Такими условиями являются: температура и давление, при которых осуществляется процесс; скорость движения и взаимный контакт потоков; механические, тепловые и другие воздействия.

Так, например, при варке питательных сред, содержащих пектиновые вещества, могут образовываться осадки на поверхности обогрева и скапливаться продукты денатурации, которые влияют на процесс теплообмена, поэтому рационально применение котла, оснащенного планетарной/якорной или быстроходной лопастной мешалкой достаточно большого диаметра.

Котел имеет цилиндрический корпус 1, сферическое днище 2, снабженное паровой рубашкой 3 и якорной мешалкой 4. Мешалка способствует равномерному обогреву среды, а также предотвращает осаждение денатурированных пектиновых веществ. Устройство такого аппарата позволяет создать оптимальные условия для протекания процесса, тогда как другие типы аппаратов (например, цилиндрическая форма котла с плоским днищем, лопастной мешалкой и змеевиком для пара) не обеспечили бы указанных условий.

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA АКАДЕМИАСЫ «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11	1стр.из144
Фармацевтическая биотехнология»		

Главной характеристикой аппарата является его производительность, т.е. количество полученного готового продукта за единицу времени.

Более полно характеризует конструкцию производительность, отнесенная к 1 м^2 поверхности, например: напряжение выпарных аппаратов - количество воды, выпаренной за 1 ч и отнесенное к 1 м^2 его поверхности.

Производительность аппарата можно увеличить интенсификацией процесса, заменой периодических процессов непрерывными, механизацией и автоматизацией их.

Конструктивные требования

При проектировании нового аппарата с соблюдением эксплуатационных требований ставятся такие условия:

- минимальная масса;
- обеспечение соответствующей прочности;
- применение легко заменяемых деталей и узлов, а также удобство в эксплуатации, ремонте, монтаже и разборке;
- технологичность в изготовлении.

При проектировании аппарата, чтобы уменьшить его массу, используют такую форму, при которой отношение боковой поверхности аппарата к его объему было бы минимальным.

Самое малое отношение поверхности к объему имеют аппараты шаровые, последние используются при создании хранилищ для жидкостей. При проектировании аппаратов цилиндрической формы с крышкой и плоским дном указанное условие сохраняется при соотношении $H:D = 2$ (H - высота, D - диаметр). Изготовление отдельных деталей и узлов из материалов высокой прочности также уменьшает массу аппарата.

Герметизация и стерилизация оборудования

Асептические условия производства требуют стерилизации перед началом процесса всей аппаратуры (изнутри) и всех материальных потоков. Этого, однако, недостаточно. Стерильность должна быть сохранена в течение всего рабочего цикла. Иными словами, технологический процесс должен быть защищен от контаминации за счет обеспечения герметичности всех соединений в аппаратуре.

В монтажной схеме любого ферментера имеется несколько десятков разного рода герметизирующих элементов. Наиболее распространенные из них – фланцевые соединения и запорная арматура уязвимы в отношении герметичности при монтаже с обвязкой ферментера.

В системах, работающих в асептических условиях, должна быть обеспечена возможность стерилизации всех точек внутренних объектов аппаратов и коммуникаций. Для этого перед загрузкой ферментеров через них пропускают насыщенный водяной пар под давлением. Однако здесь существуют свои сложности. Это касается, например, открытых трубных окончаний – участков труб, одним концом соединенных полостью ферментера, а другим соприкасающихся с атмосферой. К ним относятся узел отвода отработанного, т.е. прошедшего через ферментер, воздуха и узлы отбора проб.

Повышенное давление в открытом трубном окончании создать невозможно, следовательно, и температура там будет не выше 100°C . Из-за этого приходится увеличивать продолжительность обработки. Обычно в трубе делают вырезку, и во время работы пар непрерывно подается в открытое трубное окончание. В случае так называемых «тупиковых полостей» трудно обеспечить вытеснение воздуха и циркуляцию пара. Обычно в трубопровод врезают два вентиля, между которыми – подвод пара и отвод образующегося конденсата.

Промышленные ферментеры большого объема стерилизуют в течение часа при $125\text{-}130^\circ\text{C}$.

Экономические требования

ÖNTÜSTİK-QAZAQSTAN MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144

Затраты на проектирование, изготовление, монтаж и эксплуатацию химико-фармацевтических аппаратов с учетом оптимально реальных условий должны быть минимальными и обоснованы технико-экономическими расчетами. Экономическая целесообразность внедрения в производство аппарата зависит от качества производимой на нем продукции и затрат на его обслуживание.

Требования техники безопасности и промышленной санитарии

Аппараты и приборы для химико-фармацевтического производства проектируют и изготавливают с требуемым запасом прочности, снабжают их предохранительными системами, предупреждающими аварии, а также ограждают его движущиеся детали и узлы.

Поэтому используют наиболее удобные в этом отношении герметически закрытые аппараты непрерывного действия, в которых контроль осуществляется с пульта управления автоматически с соответствующей двойной защитой (например, тепловая и электрическая). Аппараты фармацевтических производств должны строго соответствовать высоким санитарно-гигиеническим требованиям, предупреждающим бактериальное, механическое или химическое загрязнения и разложение лекарственных средств.

Для обеспечения указанных условий аппараты должны быть герметичны, удобны для возможной тщательной зачистки и дезинфекции, кроме того, аппараты должны быть изготовлены из материалов, не взаимодействующих с окружающей средой, перерабатываемыми материалами.

Документация предприятия по охране труда включает правила по технике безопасности и производственной санитарии, а также инструкции по охране труда, требования которых должны соблюдаться рабочими и служащими предприятия. Инструкции содержат пять разделов: общие требования безопасности, требования безопасности перед началом выполнения работ, во время работы, в аварийных ситуациях и по окончании работы. Ими должны быть обеспечены все работающие, руководители подразделений и профсоюзный комитет. Эти документы пересматриваются не реже 1 раза в 5 лет, а для работ повышенной опасности в 3 года, а также в случае изменения НД по охране труда и законодательства о труде.

Размещение лаборатории в специально предназначенном здании обеспечивает надлежащее санитарное состояние всех рабочих помещений с соблюдением основных требований, предъявляемых к освещенности помещения, устройству вытяжных шкафов и оборудованию, приточно-вытяжной вентиляции. Предусмотрено правильное размещение лабораторного оборудования и приборов.

Персонал лаборатории должен иметь достаточно высокую квалификацию и навыки практической работы. Все сотрудники должны проходить подготовку по технике безопасности. Обучение проводится ежегодно. В течение года (2-4 раза) проводят инструктаж непосредственно на рабочих местах с учетом специфики работ данного участка. На практических занятиях знакомят с правилами применения огнетушителя, пожарного рукава, проверяется выполнение инструкций. Инструктаж фиксируется в специальном журнале с указанием темы занятий, фамилии лица, проводившего инструктаж.

Сотрудники лаборатории должны работать в халатах, а в некоторых случаях (при разведении кислот, щелочей и переноске их в больших количествах) обязательно надевать защитные очки, резиновые перчатки, прорезиненный фартук и резиновые сапоги.

Реактивы и материалы должны храниться в лаборатории в соответствии с их особенностями. Концентрированные кислоты, щелочи и другие реактивы, выделяющие вредные пары и газы, хранят в небольших количествах только в вытяжных шкафах, в

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA АКАДЕМИАСЫ «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144

склянках с притертыми пробками и защитными колпачками. Основные запасы этих реактивов хранят в отдельно расположенном бетонном подвале.

При размещении реактивов на складе необходимо помнить, что нельзя хранить вместе вещества, различные по своим химическим свойствам. В складских помещениях стены и пол не должны покрываться горючими материалами.

На рабочих местах находятся реактивы, не представляющие опасности, в количествах, необходимых для анализов. Огнеопасные реактивы (эфир, спирт, бензол) следует хранить в отдельном прохладном помещении или металлическом шкафу, окрашенном масляной краской белого цвета или алюминиевой пудрой во избежание нагревания, и выдавать только в день проведения анализа в ограниченных количествах (не более 200 мл).

Работать с огнеопасными веществами надо с особой осторожностью, так как их пары обладают способностью распространяться на значительном расстоянии и воспламеняться. В помещении, где проводится анализ, запрещается зажигать горелки, использование других источников ограничено. Подогрев или перегонка огнеопасных веществ осуществляют в предварительно нагретой водяной бане. Во избежание взрыва запрещается выпаривать низкокипящие ЛВЖ (легковоспламеняющиеся жидкости) досуха. При выпаривании обязательно должно оставаться небольшое количество жидкости в посуде. Запрещается нагревать на водяной бане вещества, которые могут вступать в реакцию с водой со взрывами и выделением паров или газов. При проливе ЛВЖ необходимо немедленно выключить все источники огня, электронагревательные приборы, в дневное время обесточить помещение выключением общего рубильника, а при больших количествах разлитого вещества выключить все источники открытого огня и электронагревательные приборы и в соседних помещениях. Место пролива жидкости следует засыпать песком, загрязненный песок собрать совком или лопатой.

За хранение ядовитых веществ, их выдачу и учет отвечает один сотрудник. Работать с ядовитыми веществами должны работники, ознакомленные с правилами работ с ядами, в отдельной комнате под тягой. По окончании работ рабочее место тщательно убирается и посуда после обезвреживания передается на мойку.

При отборе проб сточной воды необходимо соблюдать санитарные меры предосторожности. При отмеривании сточной воды пипетками нужно пользоваться только резиновыми баллончиками. Категорически запрещается засасывать воду ртом.

Отбор проб сточных вод из колодцев должны проводить два человека. После снятия крышки необходимо длительно и тщательно проветрить колодцы, чтобы работающий (при использовании защитных средств) как можно меньше вдыхал вредные испарения, ядовитые газы.

Каждый работник должен соблюдать правила личной гигиены:

- строго соблюдать режим труда и отдыха;
- постоянно поддерживать на рабочем месте нормальные параметры микроклимата (температура, скорость движения воздуха);
- при выполнении работы обязательно пользоваться спецодеждой, которая должна быть исправной и чистой;
- личную одежду обязательно хранить отдельно от спецодежды;
- не хранить пищу в холодильнике, где хранятся низкокипящие химические вещества;
- обязательно вымыть руки перед приемом пищи;
- запрещается принимать пищу на рабочих местах и пользоваться для этих целей лабораторной посудой;

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA АКАДЕМИЯСЫ «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144

- после выполнения работ в лаборатории обязательно мыть руки с мылом, при работе с летучими веществами и порошками необходимо вымыть также лицо.

Газовая сеть, краны, горелки и отводящие резиновые трубки должны находиться в исправном состоянии.

Все работы в лаборатории должны проводиться только на исправном оборудовании, снабженном необходимыми защитными приспособлениями. Все оборудование должно быть заземлено во избежание поражения электрическим током при повреждении изоляции, соединительные элементы должны быть в исправном состоянии, электрические шнуры не должны иметь нарушений в изоляции.

В лаборатории обязательно должны быть средства пожаротушения: сухой песок, истовой асбест, кошма, асбестовое полотнище, достаточное число огнетушителей и пожарные рукава. Кошмой, асбестовым полотнищем, шерстяным одеялом накрывают небольшие емкости с горящими, легковоспламеняющимися жидкостями. Воду можно использовать для тушения большинства горючих веществ. Запрещено тушить водой: кальций, калий, железо, магний, натрий, карбид кальция, известь, селитру, щелочноземельные металлы, установки под напряжением, горящее масло или жир, пламя газа, горючие жидкости, ацетон, бензин, спирты. При воспламенении масла тушить следует мокрой тряпкой, при воспламенении бензина, скипидара, спирта, эфира, серной кислоты - песком, асбестом, огнетушителями.

В случае возгорания необходимо немедленно:

- отключить принудительную вентиляцию;
- обесточить электросеть в секторе возгорания или во всей лаборатории;
- закрыть окна и двери;
- принять меры по тушению возгорания первичными средствами пожаротушения;
- одновременно с тушением возгорания удалить из зоны возгорания ЛВЖ и другие горючие вещества.

Наибольшая опасность для персонала при поверхностном способе культивирования микроорганизмов – это непосредственный контакт с культурой продуцента. Должна быть точная гарантия в том, что данный микроорганизм не патогенен и что он тщательно обследован перед передачей на производство. При работе с микроорганизмами используются индивидуальные средства защиты, не допускается вход в растительную камеру во время роста культуры, особенно на стадии спорообразования и подсушивания культуры. Отбор проб культуры должен проводиться пробоотборниками, исключая возможность попадания культуры на кожу работающего. Нарушение правил работы, отсутствие аспирационных и герметизирующих устройств могут способствовать увеличению запыленности воздуха, а при работе с готовой культурой – повышению концентрации спор микроскопических грибов в воздухе до $10^4 - 10^5$ на 1 м³, что может повлечь за собой заболевание работающих. Наиболее часто отмечаются поражения кожи и слизистых – контактный аллергический дерматит. Часто при прекращении контакта с аллергеном явления дерматита исчезают, но у некоторых лиц наблюдается явление сенсибилизации и при возобновлении работы вновь появляются признаки дерматита.

Особую пожарную опасность представляют цех получения очищенных ферментных препаратов с помощью органических растворителей и цех по регенерации органических растворителей. Эти цехи должны быть изолированы от смежных невзрывоопасных помещений глухими (брандмауерными) стенами, сообщение между ними допускается только по специальным переходам. Они должны иметь специальный пожарный выход, а при высоте

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA АКАДЕМИЯСЫ «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144

помещения больше 10 м – наружную металлическую пожарную лестницу с уклоном не более 45° и шириной не менее 0,7 м. Взрывоопасные помещения должны покрываться только легко сбрасываемыми при взрывной волне кровельными перекрытиями.

Все электродвигатели, пусковые устройства которых могут искрить, должны быть герметизированы и изготовлены во взрывобезопасном исполнении. Электрооборудование должно удовлетворять требованиям, изложенным в Правилах устройства электроустановок (ПУЭ).

Емкости для хранения растворителей устанавливают на значительном расстоянии от производственного здания по основному направлению ветра для данной местности. Безопасность хранения легковоспламеняющихся и горючих жидкостей обеспечивается путем установления в резервуарах и цистернах выхлопного клапана и огнепреградителя. Трубопроводные линии для легколетучих и взрывоопасных жидкостей окрашивают в коричневый цвет и удаляют от других коммуникаций.

От прямых ударов молний предусматривается оборудование грозозащиты. Для защиты от проявления статического электричества всю аппаратуру, металлоконструкции, трубопроводы и емкости с органическими растворителями, воздухопроводы и резервуары заземляют.

Все оборудование, имеющее открытые вращающиеся или движущиеся элементы, закрывают защитными коробами или сетками.

Оборудование и установки, издающие шумы, должны по возможности герметизироваться и устанавливаться на амортизационных подушках или в специальных помещениях.

Оборудование и устройство бытовых помещений (кроме туалетных, курительных комнат и помещений для кормления грудных детей) осуществляются в зависимости от санитарной характеристики производственных процессов.

Повышенная взрыво- и пожароопасность ферментных предприятий, разнообразие используемых аппаратов и устройств, опасность, которую представляют продуценты ферментов, вызывают необходимость тщательного изучения и освоения правил техники безопасности и промышленной санитарии. Занятия, инструктаж и проверку полученных знаний и навыков следует проводить не реже 1 раза в квартал. Каждый вновь поступающий на работу проходит обязательный инструктаж. Изучение правил техники безопасности и правил промышленной санитарии обязательно для каждого студента.

Инструкции по технике безопасности и правила санитарии разрабатываются для каждого рабочего места, выдаются на руки исполнителям и вывешиваются на видных местах. Инженерный персонал завода должен внимательнейшим образом следить и неукоснительно исполнять сам все правила техники безопасности и промышленной санитарии. Ответственность за соблюдение правил охраны труда несут руководители подразделений, а в целом по предприятию – директор и главный инженер.

IV. Иллюстративный материал: прилагается

V. Литература:

основная:

40. Егорова Т.А., Клунова С.М., Живухина Е.А. Основы биотехнологии. – М.: Изд. центр «Академия», - 2008. – 208 с.
41. Евтушенко А.Н., Фомичев Ю.К. Введение в биотехнологию: Курс лекций. – Минск.: БГУ, 2002. - 105 с.

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA АКАДЕМИАСЫ «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144

42. Сазыкин Ю.О., Орехов С.Н., Чакалева И.И. Биотехнология: Учебное пособие. – М.: Изд. Центр «Академия». – 2006. – 256 с.
 43. Орехов С.Н. Фармацевтическая биотехнология. Руководство к практическим занятиям. – Учебное пособие. – Под ред. акад. РАМН В.А. Быкова, проф. А.В Катлинского. – М. : ГЭОТАР-Медиа 2009. – 384 с.
 44. Елинов Н.П. Химическая микробиология. - Учебник. - М.: Высшая школа. - 1989, 448 с
 45. Воробьева Л.И. Промышленная микробиология. - Учебное пособие. - М.: Изд-во МГУ. - 1989, 294 с.
 46. Биотехнология. Принципы и применение. Пер. с англ. / Под ред. И. Хиггинса, Д. Беста, Дж. Джонса. - М.: Мир. - 1988, 480 с.
 47. Чуешов В.И., Зайцев А.И., Шебанова С.Г. Промышленная технология лекарств. Том 2. Харьков, 2002.
 48. Биотехнология микробного синтеза (Под ред. Бекера М.Е.) – Рига – 1980.
 49. Биотехнология. (Отв. редактор А.А. Баев). - М.: Наука. - 1984, 310 с.
 50. Перт С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов. М., - 1979 г.
 51. Промышленная микробиология (Под ред. Егорова Н.С.) – М., 1989 г.
 52. Процессы и аппараты химической технологии (Под ред. П.Г. Романкова). – Л. – 1981.
- дополнительная:**
19. Березов Т.Т. , Коровкина Б.Ф. – Биологическая химия (Под ред. И.М. Ивановой) – М., Медицина – 1981 г.
 20. Никитин Г.А. – Биохимические основы микробиологических производств – Киев, 1981.
 21. Бриттон Г. – Биохимия природных пигментов. М., Мир – 1986 г.
 22. Попова Т.В. – Развитие биотехнологии в СССР – М., Наука - 1988 г.
 23. Популяционные аспекты биотехнологии – Печуркин Н.С., Брильков А.В., Маркенкова Т.В. – Новосибирск: - Наука – 1990 г.
 24. Специальные журналы: «Биотехнология», «Фармация Казахстана», «Фармацевтический бюллетень» и др.

VI. Контрольные вопросы (обратная связь):

8. Каковы основные требования к материалам и аппаратам биотехнологического производстве?
9. Каковы требования к стерильности аппаратов и коммуникации?
10. Какие правила личной инструкции по технике безопасности и гигиены должен соблюдать работник?
Что необходимо предпринять в случае возгорания предприятия?

Лекция № 7-8

I. Тема: Основные понятия и термины биотехнологии. Объекты биотехнологии (продуценты), их классификация. Свойства биообъектов. Условия сохранения культуры.

Методы биотехнологии: поверхностное и глубинное культивирование (периодическое и непрерывное). Ферментация.

II. Цель: Ознакомить студентов с основными понятиями и терминами биотехнологии, объектами и их классификацией, свойством биообъектов, условия сохранения культуры. О методах биотехнологии, ферментации, поверхностной и глубинной культивирований.

III. Тезисы лекции:

Объектами биотехнологии служат многочисленные представители групп живых организмов — микроорганизмы (вирусы, бактерии, протисты, дрожжи и др.) растения, животные, а также изолированные из них клетки и субклеточные структуры (орга-неллы). Биотехнология базируется на протекающих в живых системах физиолого-биохимических процессах, в

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA АКАДЕМИАСЫ «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144

результате которых осуществляются выделение энергии, синтез и расщепление продуктов метаболизма, формирование химических и структурных компонентов клетки.

Понятие «биообъект»

Биообъект – центральный и обязательный элемент биотехнологического производства, создающий его специфику.

Биообъектом может быть целостный сохранивший жизнеспособность многоклеточный или одноклеточный организм. Им могут являться изолированные клетки многоклеточного организма, а также вирусы и выделенные из клеток мультиферментные комплексы, включенные в определенный метаболический процесс. Наконец, биообъектом может быть индивидуальный изолированный фермент.

Функция биообъекта – полный биосинтез целевого продукта, включающий ряд последовательных ферментативных реакций или катализ лишь одной ферментативной реакции, которая имеет ключевое значение для получения целевого продукта.

Биообъект, осуществляющий полный биосинтез целевого продукта, называется продуцентом. Биообъект, являющийся индивидуальным ферментом или выполняющий функцию одной ферментативной реакции, используемой биотехнологом, называют промышленным биокатализатором.

Таким образом, к биообъектам относятся как макромолекулы, так микро- и макроорганизмы.

В качестве макромолекул в промышленном производстве используются ферменты всех известных классов, но наиболее часто – гидролазы и трансферазы.

Доказано, что использование ферментов в производстве в иммобилизованном виде, т.е. связанных с нерастворимым носителем, наиболее рационально, так как в этом случае обеспечиваются многократность их применения и стандартность повторяющихся производственных циклов.

С некоторой условностью «Лестница живых существ» начинается с вирусов. Последние в качестве биообъектов (с ослабленной патогенностью) используются прежде всего для приготовления вакцин.

Как биообъекты микробные клетки прокариот и эукариот в современном биотехнологическом производстве занимают доминирующее положение. Они являются продуцентами используемых в качестве лекарственных средств первичных метаболитов: аминокислот, азотистых оснований, коферментов, моно-и дисахаров, ферментов медицинского назначения, применяемых в заместительной терапии и т.д.

Микроорганизмы образуют огромное количество вторичных метаболитов, многие из которых также нашли применение, например, антибиотики и другие корректоры гомеостаза клеток млекопитающих.

Пробиотики – препараты на основе биомассы отдельных видов микроорганизмов используются при дисбактериозах для нормализации микрофлоры желудочно-кишечного тракта. Микроорганизмы необходимы также при производстве вакцин. Наконец, микробные клетки методами генной инженерии могут быть превращены в продуценты видоспецифических для человека белковых гормонов, белковых факторов неспецифического иммунитета и т.д.

Высшие растения являются традиционным и к настоящему времени все еще наиболее обширным источником получения лекарственных средств. При использовании растений в качестве биообъектов основное внимание сосредоточено на вопросах культивирования

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA АКАДЕМИАСЫ «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11	
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144	

растительных тканей на искусственных средах (калусные и суспензионные культуры) и открывающихся при этом новых перспективах.

Традиционными поставщиками лекарственных и диагностических средств являются представители животного мира. Довольно часто в качестве биообъектов выступают млекопитающие, птицы, рептилии, амфибии, членистоногие, рыбы, моллюски. Разнообразие образуемых ими биологических активных соединений, нашедших применение в медицине, крайне велико.

В последние годы в связи с развитием технологии рекомбинантной ДНК стремительно возрастает важность такого биообъекта как человек, хотя на первый взгляд это кажется парадоксальным.

В принципе человек уже давно мог быть отнесен к биообъектам, например, при получении гомологичной антисыворотки или в случае использования тканей и органов человека для их пересадки, например костного мозга, почек и т.д.

Однако биообъектом с позиций биотехнологии (при использовании биореакторов) человек стал лишь после реализации возможности клонирования его ДНК (точнее ее экзонов) в клетках микроорганизмов. За счет такого подхода был ликвидирован дефицит сырья для получения видоспецифических белков человека.

Выбор биотехнологических объектов

Главным звеном биотехнологического процесса, определяющим всю его сущность, является биологический объект, способный осуществлять определенную модификацию исходного сырья и образовывать тот или иной необходимый продукт. **В качестве таких объектов биотехнологии могут выступать клетки микроорганизмов, животных и растений, трансгенные животные и растения, а также многокомпонентные ферментные системы клеток и отдельные ферменты.**

Основой большинства современных биотехнологических производств до сих пор все еще является микробный синтез, т. е. синтез разнообразных биологически активных веществ с помощью микроорганизмов. К сожалению, объекты растительного и животного происхождения в силу ряда причин еще не нашли столь широкого применения.

Независимо от природы объекта, первичным этапом разработки любого биотехнологического процесса является получение чистых культур организмов (если это микробы), клеток или тканей (если это более сложные организмы – растения или животные). Многие этапы дальнейших манипуляций с последними (т.е. с клетками растений или животных), по сути дела, являются принципами и методами, используемыми в микробиологических производствах. И культуры микробных клеток, и культуры тканей растений и животных с методической точки зрения практически не отличаются от культур микроорганизмов. Поэтому дальнейшие рассуждения целесообразно вести применительно к микробиологическим объектам.

Мир микроорганизмов крайне разнообразен. В настоящее время относительно хорошо охарактеризовано (или известно) более 100 тысяч различных их видов. Это в первую очередь прокариоты (бактерии, актиномицеты, риккетсии, цианобактерии) и часть эукариот (дрожжи, нитчатые грибы, некоторые простейшие и водоросли). При столь большом разнообразии микроорганизмов весьма важной, а зачастую и сложной, проблемой является правильный выбор именно того организма, который способен обеспечить получение требуемого продукта, т. е. служить промышленным целям. Разделение микроорганизмов на промышленные и непромышленные для лиц, далеких от микробиологии, молекулярной

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA АКАДЕМИАСЫ «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11	
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144	

биологии и молекулярной генетики, кажется достаточно определенным: те микроорганизмы, которые используются в промышленном производстве – промышленные, а те, которые не используются, – непромышленные.

Однако для тех, кто близко соприкасается с вышеперечисленными отраслями биологических знаний, граница проходит между немногочисленной, но глубоко изученной группой микроорганизмов, служащих модельными объектами при исследованиях фундаментальных жизненных процессов, и всеми остальными микроорганизмами, которые, как правило, генетиками, молекулярными биологами и геными инженерами не изучались совсем или изучались в очень ограниченной степени.

К числу первых относятся кишечная палочка (*E. coli*), сенная палочка (*Bac. subtilis*) и пекарские дрожжи (*S. cerevisiae*).

Во многих биотехнологических процессах используется ограниченное число микроорганизмов, которые классифицируются как GRAS («generally recognized as safe» обычно считаются безопасными). К таким микроорганизмам относят бактерии *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, другие виды бацилл и лактобацилл, виды *Streptomyces*. Сюда также относят виды грибов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus* и дрожжей *Saccharomyces* и др. GRAS-микроорганизмы непатогенные, нетоксичные и в основном не образуют антибиотики, поэтому при разработке нового биотехнологического процесса следует ориентироваться на данные микроорганизмы, как базовые объекты биотехнологии.

Микробиологическая промышленность сегодня использует тысячи штаммов из сотен видов микроорганизмов, которые первично были выделены из природных источников на основании их полезных свойств, а затем (в большинстве своем) улучшены с помощью различных методов. В связи с расширением производства и ассортимента выпускаемой продукции в микробиологическую промышленность вовлекаются все новые и новые представители мира микробов. Следует отдавать себе отчет, что в обозримом будущем ни один из них не будет изучен в той же степени, как *E. coli* и *Bac. subtilis*. И причина этого очень простая – колоссальная трудоемкость и высокая стоимость подобного рода исследований.

Следовательно, возникает проблема разработки стратегии и тактики исследований, которые обусловили бы с разумной затратой труда извлечь из потенциала новых микроорганизмов все наиболее ценное при создании промышленно важных штаммов-продуцентов, пригодных к использованию в биотехнологических процессах.

Классический подход заключается в выделении нужного микроорганизма из природных условий.

Из естественных мест обитания предполагаемого продуцента отбирают образцы материала (берут пробы материала) и производят посев в селективную среду, обеспечивающую преимущественное развитие интересующего микроорганизма, т. е. получают так называемые накопительные культуры.

Следующим этапом является выделение чистой культуры с дальнейшим дифференциально-диагностическим изучением изолированного микроорганизма и, в случае необходимости, ориентировочным определением его продукционной способности.

Существует и другой путь подбора микроорганизмов-продуцентов – это выбор нужного вида из имеющихся коллекций хорошо изученных и досконально охарактеризованных микроорганизмов. При этом, естественно, устраняется необходимость выполнения ряда трудоемких операций.

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144

Главным критерием при выборе биотехнологического объекта (в нашем случае микроорганизма-продуцента) является способность синтезировать целевой продукт. Однако помимо этого, в технологии самого процесса могут закладываться дополнительные требования, которые порой бывают очень и очень важными, чтобы не сказать решающими. В общих словах микроорганизмы должны:

- обладать высокой скоростью роста;
- утилизировать необходимые для их жизнедеятельности дешевые субстраты;
- быть резистентными к посторонней микрофлоре, т. е. обладать высокой конкурентоспособностью.

Все вышперечисленное обеспечивает и1079 значительное снижение затрат на производство целевого продукта. Конечно, в каждом конкретном случае ведущим является какой-то один из этих критериев, поскольку в природе устроено так, что во всем получить выигрыш не удастся никогда.

И это правило необходимо постоянно иметь в виду. Ниже приводятся примеры, имеющие своей целью проиллюстрировать ранее сказанное.

1.Одноклеточные организмы, как правило, характеризуются более высокими скоростями роста и синтетических процессов, чем высшие организмы. Тем не менее это присуще не всем микроорганизмам. Существуют такие из них (например, олиготрофные), которые растут крайне медленно, однако они представляют известный интерес, поскольку способны продуцировать различные очень ценные вещества.

2. Особое внимание как объекты биотехнологических разработок представляют фотосинтезирующие микроорганизмы, использующие в своей жизнедеятельности энергию солнечного света. Часть из них (цианобактерии и фотосинтезирующие эукариоты) в качестве источника углерода утилизируют CO₂, а некоторые представители цианобактерий, ко всему сказанному, обладают способностью усваивать атмосферный азот (т. е. являются крайне неприхотливыми к питательным веществам). Фотосинтезирующие микроорганизмы перспективны как продуценты аммиака, водорода, белка и ряда органических соединений. Однако прогресса в их использовании вследствие ограниченности фундаментальных знаний об их генетической организации и молекулярно-биологических механизмах жизнедеятельности, по всей видимости, следует ожидать не в скором будущем.

3. Определенное внимание уделяется таким объектам биотехнологии, как термофильные микроорганизмы, растущие при 60–80° С. Это их свойство является практически непреодолимым препятствием для развития посторонней микрофлоры при относительно не стерильном культивировании, т. е. является надежной защитой от загрязнений. Среди термофилов обнаружены продуценты спиртов, аминокислот, ферментов, молекулярного водорода. Кроме того, скорость их роста и метаболическая активность в 1,5–2 раза выше, чем у мезофилов. Ферменты, синтезируемые термофилами, характеризуются повышенной устойчивостью к нагреванию, некоторым окислителям, детергентам, органическим растворителям и другим неблагоприятным факторам. В то же время они мало активны при обычных температурах. Так, протеазы одного из представителей термофильных микроорганизмов при 200 С в 100 раз менее активны, чем при 750 С. Последнее является очень важным свойством для некоторых промышленных производств. Например, широкое применение в генетической инженерии нашел фермент Таq-полимераза из термофильной бактерии *Thermusaquaticus*. Ранее уже упоминалось о еще одном весьма существенном свойстве этих организмов, а именно, что при их культивировании температура среды, в

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA АКАДЕМИАСЫ «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144

которой они пребывают, значительно превышает температуру окружающей среды. Данный высокий перепад температур обеспечивает быстрый и эффективный обмен тепла, что позволяет использовать биологические реакторы без громоздких охлаждающих устройств. А последнее, в свою очередь, облегчает перемешивание, аэрацию, пеногашение, что в совокупности значительно удешевляет процесс.

Культуру продуцента хранят

4.1 в запаянных ампулах

4.2 в жидком азоте

4.3 на твердых носителях – пшено, ячмень, рис.

4.4 в лиофилизированном состоянии – лучше хранятся споры, чем живые клетки

4.5 в ампулах в лиофилизированном состоянии на носителе (пшено, желатин-альгинат натрия)

4.6 в пробирке на скошенном агаре – срок хранения до нескольких месяцев.

Селекция. Неотъемлемым компонентом в процессе создания наиболее ценных и активных продуцентов, т. е, при подборе объектов в биотехнологии, является их селекция. А генеральным путем селекции является сознательное конструирование геномов на каждом этапе отбора нужного продуцента. Такая ситуация не всегда могла быть реализована, вследствие отсутствия эффективных методов изменения геномов селектируемых организмов. В развитии микробных технологий в свое время сыграли (да и сейчас еще продолжают играть!) очень важную роль методы, базирующиеся на селекции спонтанно возникающих измененных вариантов, характеризующихся нужными полезными признаками. При таких методах обычно используется ступенчатая селекция: на каждом этапе отбора из популяции микроорганизмов отбираются наиболее активные варианты (спонтанные мутанты), из которых на следующем этапе отбирают новые, более эффективные штаммы. И так далее.

Несмотря на явную ограниченность данного метода (приема), заключающуюся в низкой частоте возникновения мутантов, возможности его рано считать полностью исчерпанными. Процесс селекции наиболее эффективных продуцентов значительно ускоряется при использовании метода индуцированного мутагенеза. В качестве мутагенных воздействий применяются УФ, рентгеновское и гамма-излучения, определенные химические вещества и др. Однако и этот прием также не лишен недостатков, главным из которых является его трудоемкость и отсутствие сведений о характере изменений, поскольку экспериментатор ведет отбор по конечному результату. Например, устойчивость организма к ионам тяжелых металлов может быть связана с подавлением системы поглощения данных катионов бактериальной клеткой, активацией процесса удаления катионов из клетки или перестройкой системы (систем), которая подвергается ингибирующему действию катиона в клетке. Естественно, знание механизмов повышения устойчивости позволит вести направленное воздействие с целью получения конечного результата за более короткое время, а также селектировать варианты, лучше подходящие к конкретным условиям производства.

Таким образом, тенденцией сегодняшнего дня является сознательное конструирование штаммов микроорганизмов с заданными свойствами на основе фундаментальных знаний о генетической организации и молекулярно-биологических механизмах осуществления основных функций организма. Короче говоря, применение перечисленных подходов в сочетании с приемами классической селекции является сутью современной селекции микроорганизмов-продуцентов. Селекция микроорганизмов для микробиологической промышленности и создание новых штаммов часто направлены на

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA АКАДЕМИАСЫ «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144

усиление их продукционной способности, т.е. образование того или иного продукта. Решение этих задач в той или иной степени связано с изменением регуляторных процессов в клетке, поэтому в настоящем разделе имеет смысл несколько задержаться на возобновлении сведений о регуляции биохимической активности бактериальной клетки.

Как известно, изменения скорости биохимических реакций у бактерий может осуществляться по крайней мере двумя путями. Один из них очень быстрый (реализующийся в течение секунд или минут) заключается в изменении каталитической активности индивидуальных молекул фермента. Второй, более медленный (реализуется в течение многих минут), состоит в изменении скоростей синтеза ферментов. В обоих механизмах используется единый принцип управления системами – принцип обратной связи, хотя существуют и более простые механизмы регуляции активности метаболизма клетки.

Самый простой способ регуляции любого метаболического пути основывается на доступности субстрата или наличии фермента. Действительно, снижение количества субстрата (его концентрации в среде) приводит к снижению скорости потока конкретного вещества через данный метаболический путь. С другой стороны, повышение концентрации субстрата приводит к стимулированию метаболического пути. Поэтому, независимо от каких-то иных факторов, наличие (доступность) субстрата следует рассматривать как потенциальный механизм любого метаболического пути. Иногда эффективным средством повышения выхода целевого продукта является увеличение концентрации в клетке какого-либо определенного предшественника.

Аналогичный эффект может быть получен и в результате повышения концентрации ферментов, что достигается, например, амплификацией генов, контролирующих синтез соответствующего фермента. Наиболее распространенным способом регуляции активности метаболических реакций в клетке является регуляция по типу ретроингибирования. Биосинтез многих первичных метаболитов характеризуется тем, что при повышении концентрации конечного продукта данного биосинтетического пути угнетается активность одного из первых ферментов этого пути.

Впервые о наличии такого регуляторного механизма было сообщено в 1953 г. А. Novik и L. Szillard, исследовавшими биосинтез триптофана клетками *E. coli*. Заключительный этап биосинтеза данной ароматической аминокислоты состоит из нескольких, катализируемых индивидуальными ферментами стадий. Указанными авторами было обнаружено, что у одного из мутантов *E. coli* с нарушенным биосинтезом триптофана добавление данной аминокислоты (являющейся конечным продуктом этого биосинтетического пути) резко тормозит накопление одного из предшественников – индол глицерофосфата в клетках. Уже тогда было высказано предположение, что триптофан ингибирует активность какого-то фермента, катализирующего образование индол глицерофосфата.

Несколько позднее было четко установлено, что таким чувствительным к триптофану ферментом является антранилатсинтетаза, которая катализирует более раннюю реакцию триптофанового пути – образование антранилата из хоризмата и глутамин. Этот факт был экспериментально обоснован в опыте, когда добавление триптофана в клеточные экстракты *E. coli*, содержащие фермент антранилатсинтетазу и его субстраты (хоризмат и глутамин), приводило к резкому ингибированию образования антранилата. Более того, было однозначно продемонстрировано, что активность антранилатсинтетазы подавляется только триптофаном и никакие другие метаболиты клетки подобного действия не оказывают. Существует мнение,

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA АКАДЕМИАСЫ «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144

что регуляция по типу ретроингибирования является общим свойством клеточного метаболизма.

Более тщательное изучения механизма ингибирования активности фермента метаболитами этого же пути, проведенное в условиях *in vitro*, показало, что метаболит, являющийся ингибитором, специфически связывается с участком молекулы фермента, обладающим высокой степенью сродства к данному ингибитору и абсолютно отличающимся от активного центра фермента (т. е. не перекрывающимся с каталитическим центром). Этот участок получил название аллостерического центра (от греч. "аллос" – другой, "стерос" – пространственный), а сами ферменты, обладающие подобным центром, стали называться аллостерическими ферментами. Аллостерические ферменты представляют собой олигомеры, состоящие из взаимодействующих между собой нескольких одинаковых или различающихся субъединиц. При взаимодействии фермента с ингибитором конформация его молекулы изменяется, активный центр при этом также претерпевает изменения, приводящие к утрате каталитической способности фермента. При мутационном изменении аллостерического центра (центра взаимодействия с ингибитором) чувствительность к ингибитору утрачивается и фермент сохраняет свою активность, обеспечивая требуемый для синтеза конечного продукта этап биосинтетического пути.

Зная точно механизм регуляции синтеза интересующего продукта, участвует ли в регуляции механизм ретроингибирования, можно пытаться получить более активный продуцент данного соединения. Для отбора таких продуцентов используют структурные аналоги метаболитов, по отношению к которым селекционируют резистентные варианты. Например, 5-метилтриптофан, аналог триптофана, так же как и триптофан, ингибирует активность антранилатсинтетазы, но не заменяет собой триптофан в клеточном метаболизме, т. е. не способен включаться в клеточные белки без потери последними биологической активности. Вследствие этого данный структурный аналог необходимого метаболита задерживает рост бактерий, если он добавлен в питательную среду, Некоторые мутанты, устойчивые к ингибирующему действию 5-метилтриптофана, способны синтезировать значительные количества триптофана и выделять его во внешнюю среду, а антранилатсинтаза у них оказывается нечувствительной к триптофану, т. е. не подвержена ретроингибированию этой аминокислотой. Такой методический прием часто используется в селекции продуцентов аминокислот, нуклеотидов и витаминов.

Если же необходимо добиться накопления (продукции) какого-нибудь промежуточного продукта биосинтетического пути, то следует получить мутант с заблокированным за этим продуктом этапом. Такой мутант будет зависимым от наличия в среде выращивания вещества, являющегося продуктом заблокированного этапа, либо конечного продукта данного биосинтетического пути.

Давно установлено, что из тысяч ферментов, синтезируемых растущими клетками, одни образуются постоянно и независимо от состава питательной среды, в то время как другие появляются лишь тогда, когда в среде присутствует субстрат их действия. Первые называются конститутивными ферментами (это ферменты гликолиза и др.), вторые относятся к адаптивным или индуцибельным ферментам. Так, клетки *E. coli*, растущие на среде с глюкозой, обладают следовыми количествами ферментов метаболизма лактозы, а также многих других источников углерода, которые способны усваивать клетки данного микроорганизма.

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA АКАДЕМИАСЫ «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144

Но если эти же клетки перенести на среду с лактозой, являющейся в данном случае единственным источником углерода и энергии, то уже через 1–2 минуты можно зарегистрировать повышение активности β -галактозидазы, ключевого фермента в утилизации лактозы. Этот фермент гидролизует лактозу до глюкозы и галактозы. В течение следующего непродолжительного периода (равного 20–180 минутам) активность β -галактозидазы повышается примерно в 1000 раз по сравнению с исходным уровнем. Иными словами, имеет место выраженная индукция фермента, которая может быть определена следующим образом: Индукция фермента – это относительное увеличение скорости его синтеза в ответ на появление в среде культивирования определенного химического соединения, называемого индуктором. Часто великолепными индукторами являются не утилизируемые аналоги субстратов. Например, для β -галактозидазы таким веществом служит изопропил- β – D-тио-галактопиранозид (ИПТГ) неметаболизируемый аналог лактозы. С другой стороны, не всегда субстрат является индуктором синтеза соответствующего ему фермента. Так, лактоза, прежде чем выступить в роли индуктора, должна сначала превратиться в свой изомер аллолактозу (под действием β -галактозидазы).

Механизм генетической регуляции процесса индукции ферментов был расшифрован в экспериментах на кишечной палочке при изучении синтеза упоминавшегося фермента утилизации лактозы- β -галактозидазы.

В 1961 г. F. Jacob и J. Monod на основании результатов генетического и биохимического изучения процесса утилизации лактозы бактериями *E.coli* K 12 сформулировали концепцию, получившую широкую известность как "модель оперона". В соответствии с этой моделью данная система регуляции состоит из четырех компонентов: структурных генов (детерминирующих структуру ферментов), гена-регулятора, оператора и промотора. Ген-регулятор определяет структуру белка-репрессора, способного связываться с оператором, который, в свою очередь, контролирует функционирование прилежащих к нему структурных генов.

Промотор представляет собой область для связывания с ферментом транскрипции – РНК-полимеразой. Если белок-репрессор связан с оператором, то РНК-полимераза не может перемещаться на промотор и синтез информационной РНК не может осуществляться. Результатом является отсутствие синтеза соответствующих ферментов.

Первым из подробно изученных оперонов является лактозный оперон кишечной палочки. Авторы концепции предположили, что репрессор является аллостерическим белком, обладающим двумя специфическими центрами, один из которых характеризуется $u1089$ сродством к нуклеотидной последовательности области оператора, а другой – к молекуле индуктора. Взаимодействие индуктора с репрессором снижает сродство последнего (вследствие изменения центра связывания с оператором) к оператору, результатом чего является освобождение оператора. Репрессор *lac*-оперона выделен в чистом виде и состоит из четырех идентичных субъединиц (общая молекулярная масса равна 150 000 дальтон). Каждая субъединица взаимодействует с одной молекулой индуктора (т. е. требуется четыре молекулы индуктора, чтобы инактивировать репрессор).

Репрессор в чистом виде характеризуется исключительно высоким сродством к оператору и эффективно связывается с нуклеотидной последовательностью *lac*-оператора в условиях *in vitro*. В присутствии индуктора связывание нарушается. Изложенные результаты выполненных экспериментов являются веским подтверждением гипотезы Jacob и Monod, которая в настоящее время считается полностью доказанной.

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA АКАДЕМИАСЫ «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ		SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11	
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144	

Известно, что мутации в последовательностях гена-регулятора или оператора приводят в определенных случаях к нарушению либо образования полноценного репрессора, либо к нарушению его сродства к оператору. И в том, и в другом случае потребность в индукторе для запуска синтеза информационной РНК, а следовательно, и соответствующих ферментов, исчезает. Подобные мутанты (или мутации) называются конститутивными, поскольку синтез ферментов осуществляется постоянно. Получение конститутивных мутантов имеет важное значение в селекции определенных штаммов промышленных микроорганизмов.

Концепция оперона применима и к процессу репрессии ферментов. Отличием от индуцибельных систем в данном случае является наличие в таких оперонах не активного репрессора (апорепрессора), который в одиночку не способен взаимодействовать с оператором, но может активироваться конечным продуктом (корепрессором) с образованием активного репрессора.

Уже отмечалось, что с помощью аналога триптофана (5-метилтриптофана) можно получить устойчивые u1082 к ингибирующему действию триптофана мутанты, характеризующиеся повышенной продукцией данной аминокислоты. У некоторых из этих мутантов нарушен процесс ретроингибирования антранилатсинтетазы; у других – координированно дерепрессированы ферменты пути биосинтеза триптофана (т. е. ферменты триптофанового оперона). Генетический анализ показал, что у таких мутантов поврежден ген-регулятор, располагающийся на значительном расстоянии от контролируемых им генов триптофанового оперона. Такие мутанты являются конститутивными вследствие либо полного отсутствия репрессора, либо в результате невозможности последнего активироваться триптофаном.

Таким образом, изменяя регуляцию индуцибельных и репрессибельных оперонов, существует возможность повышать продукционную активность определенных промышленных штаммов-продуцентов. Уместно отметить, что структурные гены одного метаболического пути не всегда объединены в единый оперон (наподобие лактозного), однако это не мешает их регуляции с помощью индукции или репрессии. Так, например, гены *E. coli*, детерминирующие структуру ферментов, обеспечивающих биосинтез аргинина, располагаются в различных областях хромосомы, но все контролируются одним и тем же геном-регулятором. Такая система образует регулон. Другим показательным примером является SOS-регулон, гены которого детерминируют структуру более десятка различных белков и ферментов, участвующих в репарации повреждений ДНК клетки. Все эти структурные гены регулируются одним репрессором – продуктом гена *lexA*. Опероны и регулоны, контролируемые взаимосвязанные физиологические функции обнаружены у всех генетически изученных видов бактерий.

Очень важным регуляторным элементом любого оперона является область ДНК, именуемая промотором. Этот участок оперона обеспечивает взаимодействие (связывание) с РНК-полимеразой для начала транскрипции (т. е. синтеза молекулы информационной РНК). От особенностей промотора зависит эффективность u1090 транскрипции. Мутации в области промотора, изменяя его активность, могут повышать или понижать экспрессию оперона. Данное свойство промоторов также используется в создании более активных продуцентов.

Большие перспективы в селекции продуцентов открывает генетическая инженерия, методы которой позволяют заменять регуляторные области катаболических оперонов на более эффективные промоторы, повышающие продукцию клетками биологически активных веществ и обеспечивающие новые возможности контроля активности генов.

Само собой разумеется, что это не единственные способы повышения продуктивности бактерий за счет изменения регуляторных механизмов.

Объектами биотехнологии, в том числе генетической инженерии, являются:

- а) микроорганизмы: грибы, бактерии, вирусы, простейшие и др.;
- б) клетки растений, реже животных;
- в) биологически активные вещества специального назначения – ферменты;
- г) плазмиды.

Мир микроорганизмов чрезвычайно разнообразен. По мере их открытия и изучения они были распределены на следующие группы:

1. Бактерии – Schizomycetes – грибы-дробянки (от лат. Schizo – расцепляю, mycetes – грибы);
2. Лучистые грибы – Actinomycetes (от лат. Actino - луч);
3. Нитчатые грибы – Trichomycetes (от греч. Trichos – волос) ;
4. Дрожжевые грибы – Blastomycetes (от греч. blastos - почка, размножение почкованием);
5. Сине-зеленые водоросли – Cyanophyta, они же цианобактерии – Cyanobacteria;
6. Спирохеты – Spirochaena (от греч. Spira - спираль и chaita - волос);
7. Простейшие – Protozoa;
8. Риккетсии – Rickettsia;
9. Микоплазмы – Mycoplasma;
10. Вирусы;
11. Плазмиды.

Микроорганизмы, применяемые в промышленной микробиологии, то есть биотехнологии можно условно классифицировать следующим образом:

1. Некоторые водоросли – Algae;
2. Простейшие – Protozoa;
3. Грибы – Mucor:
 - а) Actinomycetes;
 - б) Streptomycetes;
 - в) Ascomycetes;
 - г) Oomycetes.

Грибы Mucor делятся на:

- а) плесневые – Penicillium;
 - б) дрожжевые – Aspergillus; $t^{\circ} = 23^{\circ} - 26^{\circ}C$, аэробы
 - в) дрожжеподобные – Candida;
 - г) дрожжи – Saccharomycetes.
- относятся к сапрофитным (условно-патогенным)
патогенные (вызывают кандидозы)

Грибы выращивают (для сохранения культуры) на питательных средах Сабуро, Чапека-Докса, жидком сусле или сусло-агаре при pH ниже 7,0. Грибы способны размножаться при pH от 3,0 до 10,0. Оптимальными являются параметры: pH 6,0-6,5, $t = 25-33^{\circ} C$, для дрожжевых и дрожжеподобных грибов – $36-37^{\circ} C$. Спорообразованию способствуют снижение влажности питательной среды и уменьшение в ней содержания белков и углеводов. Витамины, некоторые аминокислоты и микроэлементы для различных грибов являются важными факторами роста.

Поскольку большинство грибов относятся к аэробам, они вырастают в виде пленок на поверхности жидких сред, а на твердых средах образуют вначале бесцветные, а затем, как правило, пигментированные колонии. Размеры колоний зависят от вида гриба, скорости его роста и размножения, состава питательной среды.

Грибы имеют ряд признаков, присущих клеткам животных организмов. Для них характерны гетеротрофный тип питания и потребность в витаминах. Они образуют мочевины и синтезируют гликоген (а не крахмал) в качестве резервного гомогликана, содержат хитин.



Грибы – бесхлорофилльные, гетеротрофные аэробные или факультативно-анаэробные микроорганизмы. Многие из них растут в течение 1–5 суток (иногда и более) на минимальных по составу ингредиентов питательных средах, включающих приемлемый органический источник углерода (н-р, олигосахара), неорганический источник азота в форме нитратов или аммонийных солей, при исходном значении рН 6,0-6,5.

Грибы чаще размножаются с помощью спор, а также вегетативно, образуют мицелий.

Бактерии. Энтеробактерии. Это семейство включает большую группу условно-патогенных патогенных палочек, средой обитания большинства из которых является кишечник человека и животных. Энтеробактерии: *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Yersinia* - хорошо растут на простых питательных средах, продуцируют сахаролитические, протеолитические и другие ферменты, определение которых имеет таксономическое значение.

Род *Escherichia* назван именем Т. Эшериха, который в 1885 г. впервые выделил и подробно описал бактерии, названные кишечной палочкой – *Esch. coli*.

Esch. coli, размножаясь при $t^{\circ} = 37^{\circ} \text{C}$ на плотных средах, образуют S- и R- колонии. В жидких средах дают помутнение, затем осадок. Продуцируют ферменты, расщепляющие углеводы, белки и другие соединения.

Азотфиксирующие бактерии – *Clostridium pasteurianum* (анаэробы) – были открыты в 189 году С.Н. Виноградским. К ним относятся некоторые виды *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, цианобактерий.

Антибиотикопродуцирующие грибы:

- а) пенициллины производят плесневые грибы рода *Penicillium* (открыты в 1940 г.);
- б) стрептомицин производят некоторые виды *Actinomyces griseus* (препарат был предложен в 1944 г. С. Ваксманом);
- в) цефалоспорины производят некоторые виды грибов рода *Cephalosporium* и другие.

Антибиотики, вырабатываемые одними микроорганизмами, подавляют рост и размножение других видов микроорганизмов (бактериостатическое действие). Механизмы микробного антагонизма различны; они могут быть связаны с конкуренцией за кислород и питательные вещества, с изменением рН среды в сторону, неблагоприятную для конкурента и т.п.

Наиболее важным объектом биотехнологии, в частности молекулярной биологии и генетической (генной) инженерии являются **плазмиды** бактерий как наипростейшие. Имея ряд сходств с вирусами, плазмиды тем не менее существенно от них отличаются.

Главные отличия плазмид бактерий от вирусов:

1. Геном плазмид представлен только двунитевой ДНК (которую в молекулярной биологии научились расщеплять). У вирусов имеется более 10 вариантов РНК- и ДНК-геномов.
2. Плазмиды, в отличие от вирусов и других микроорганизмов, вообще не имеют никакой оболочки. Они представляют собой «голые» геномы. Это главная биологическая особенность плазмид.
3. В связи с отсутствием белковой оболочки размножение плазмид происходит только путем саморепликации их ДНК и не требуют синтеза структурных белков и процессов самосборки (вирусы имеют оболочки).
4. Средой обитания вирусов являются клетки бактерий, растений, животных и человека. Среда обитания плазмид – только бактерии.
5. В отличие от вирусов, плазмиды обладают системами генов, которые наделяют их способностью к самопереносу или к мобилизации на перенос из клетки в клетку.

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144

6. Плазмиды и вирусы отличаются друг от друга и по последствиям, к которым приводит инфицирование ими клеток:

- заражение вирусом часто приводит к подавлению функционирования клеточного генома. Вирулентный (токсичный) вирус размножается в клетке и вызывает ее гибель или нарушает нормальное функционирование;
- плазмиды, проникая в бактериальную клетку, не размножаются в ней бесконтрольно и не подавляют функции бактериальной хромосомы, а сосуществуют с ней и сами контролируют образование числа возможных своих копий на хромосому клетки. То есть в плаزمидлах осуществляется контроль равномерного распределения (по одной) дочерних плазмид в дочерние бактериальные клетки не рандомически (случайно), а с помощью генетического механизма;
- в отличие от вирусов, плазмиды не только не вызывают гибели клеток, которые являются для них естественной средой обитания, а, наоборот, очень часто наделяют их важнейшими дополнительными (селективными) свойствами, то есть плазмиды своим присутствием обеспечивают размножение бактерий в неблагоприятных для них условиях (например, в присутствии лекарственных препаратов), таким образом обеспечивая собственное существование.

Благодаря этим отличиям от вирусов, плазмиды нашли применение в генной инженерии для генетической перестройки, то есть используются в качестве векторов для клонирования различных генов в бактерии.

Методы биотехнологии:

1. Поверхностное культивирование на твердых и полутвердых питательных средах с целью:
 - а) получения посевного материала;
 - б) для сохранения культуры в течение длительного срока;
 - в) наращивания каллусной биомассы при культивировании ткани или клеток растений;
2. Крупномасштабное глубинное культивирование биологических объектов в специальном режиме для получения целевых продуктов (ферментация).

При периодическом типе культивирования рост клеточной популяции подразделяется на несколько фаз:

- 1) лаг-фаза, или фаза задержанного роста, при которой клетки растут медленно и адаптируются к новой среде обитания в объеме ферментора;
- 2) экспоненциальная фаза, характеризующаяся интенсивным делением клеток и сбалансированностью роста всей популяции;
- 3) фаза замедленного роста, связанная с исчерпанием питательных субстратов и накоплением токсических продуктов метаболизма;
- 4) стационарная фаза, при которой прирост новых клеток количественно равняется числу погибающих;
- 5) фаза отмирания, характеризующаяся прогрессирующей гибелью клеток.

Стадия культивирования микроорганизмов является наиболее сложной и ответственной.

Рост и культивирование биомассы требуют следующих условий:

- жизнеспособности посевного материала;
- наличия источника энергии (тепла);
- достаточного количества соответствующей питательной среды;
- необходимых физико-химических условий для жизнедеятельности.

С начала 1950-х гг. вирус полиомиелита для производства вакцины выращивали в культуре клеток млекопитающих, в том числе фибробластов эмбриона человека. С тех пор

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA АКАДЕМИАСЫ «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144

фибробласты эмбриона стали незаменимы для выделения и выращивания ряда других вирусов, при производстве высокоспецифичных белков (антител, интерферонов), в исследованиях рака и противовирусной химиотерапии.

Культуры, приготовленные непосредственно из тканей организма (эмбриональных или тканей новорожденных), называют **первичными культурами**. В большинстве случаев клетки первичной культуры переносят из культуральной чашки и используют для получения большого количества **вторичных культур**, которые можно последовательно переливать в течение недель или месяцев. Разные типы клеток нуждаются в различных питательных веществах, а также в одном или нескольких белковых факторах роста.

Клеточные линии можно использовать для получения клонов, которые происходят из одной клетки-предшественника.

Биотехнология использует методы поверхностного и глубинного культивирования микроорганизмов.

При поверхностном культивировании (в монослое) суспензию клеток получают обработкой измельченной ткани эмбриона трипсином. Клетки в такой суспензии, оседая на плотной поверхности сосуда с культуральной средой, становятся плоскими и делятся, образуя монослой на поверхности сосуда. Обычно при этом способе культивирования пользуются цилиндрическими бутылками, которые медленно вращаются вдоль своей длинной оси. Рост клеток и выход биомассы можно увеличить, добавив к суспензии носитель-микроскопические гранулы из инертного синтетического полимера, на которых клетки закрепляются и пролиферируют. Суспензионные культуры можно получать в сосудах объемом до 1000 л при перемешивании.

Преобладающим является *глубинный метод* культивирования, предполагающий возможность использования всего объема питательной среды.

На рост и развитие микроорганизмов влияют внутри- и внеклеточные факторы. К внутриклеточным факторам относятся: структура клетки, механизмы метаболизма и генетические характеристики. Внеклеточные (внешние) факторы, т.е. условия внешней среды клетки, являются основными регуляторными факторами биотехнологии.

Биореакторы

Биотехнологические процессы принципиально отличаются от процессов химического синтеза и могут быть двух типов: периодическими и непрерывными. Специфика биотехнологических процессов состоит в том, что в них участвуют живые клетки, субклеточные структуры или выделенные из клеток ферменты и их комплексы. Это оказывает довольно существенное влияние на процессы массопередачи (обмена веществ между различными фазами – перенос кислорода из газообразной фазы в жидкую) и теплообмена (перераспределение тепловой энергии между взаимодействующими фазами). Поэтому одним из важнейших компонентов биореакторов является система перемешивания, обеспечивающая однородность условий в аппарате, оптимальность массопередачи между фазами реактора, между культуральной жидкостью и клетками и т. д.

Особенности роста популяции бактерий

Кинетика роста бактериальной популяции не устанавливается кинетикой роста индивидуальной клетки, хотя между ними, несомненно, существует взаимосвязь.

Среднюю валовую (абсолютную) скорость роста (V_{cp}) за отрезок времени ($t_1 - t_0$) можно определить по абсолютному приросту биомассы по формуле:

$$V_{cp.} = \frac{m_1 - m_0}{t_1 - t_0}$$

Где m_0 – величина биомассы в начале;

m_1 – величина биомассы в конце исследованного отрезка времени.

Скорость размножения бактерий (число удвоений за единицу времени) описывают уравнением:

$$v = \frac{n}{t_1 - t_0}$$

Где n – число поколений

Продолжительность жизни одного поколения (время генераций) « g » в среднем составляет:

$$g = \frac{t_1 - t_0}{n}$$

Скорость роста микробной популяции не является величиной неизменной. В развитии популяции различают следующие последовательные стадии: лаг-фаза (фаза адаптации - I); лог-фаза (II, III, IV); стационарная фаза (накопление целевых продуктов - V); автолиз (VI, VII, VIII).

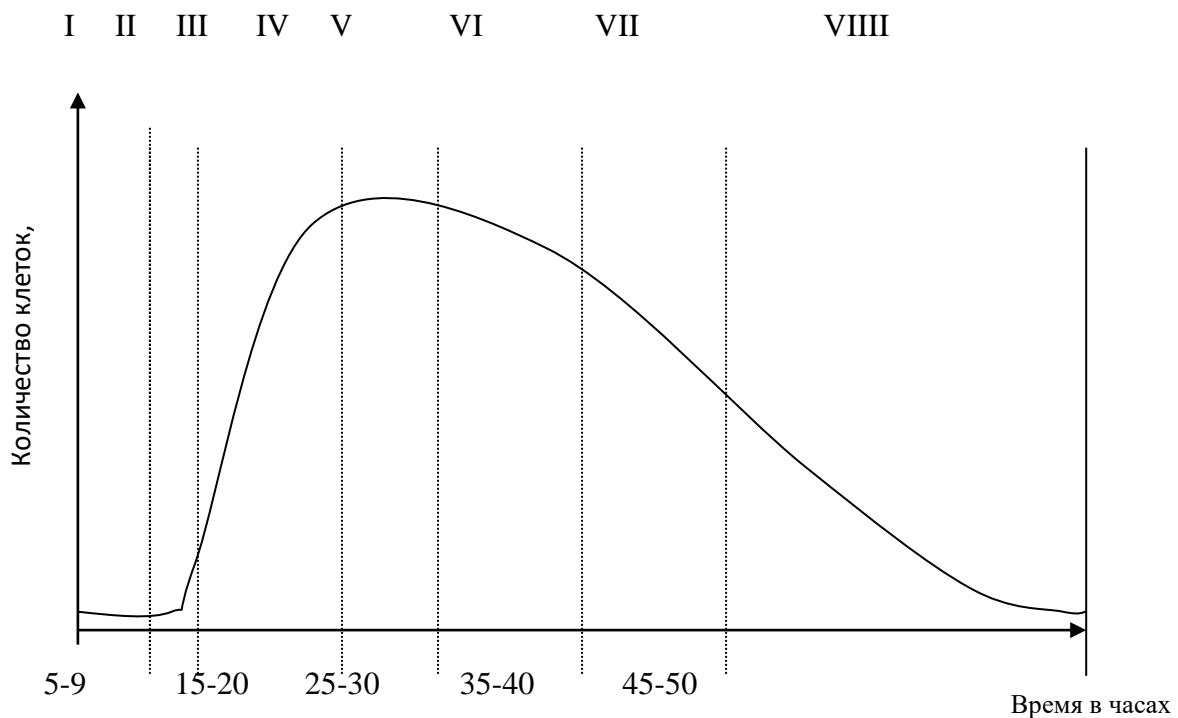


Рис. 1. Стадии роста периодической культуры

I – лаг-фаза; II – фаза положительного ускорения; III – фаза логарифмического роста; IV - фаза отрицательного ускорения; V - стационарная фаза; VI – фаза ускоренной гибели; VII - фаза логарифмической гибели; VIII – фаза уменьшения скорости гибели клеток

На оси ординат показана скорость размножения клеток, выраженная логарифмом от числа живых клеток на 1 мл среды.

Эти фазы отражают сложные процессы адаптации бактерий, привнесенных из одной среды обитания в другую, как правило, оптимальную для их размножения. Природа лаг-фазы во многом связана с тем, что в этот период происходит синтез всех компонентов белоксинтезирующей системы и прежде всего такого количества рибосом, которое позволило бы обеспечить максимальную активность всех биосинтетических процессов.

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA АКАДЕМИАСЫ «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144

Последующие стадии развития периодических культур отражают высокую скорость размножения бактерий. Затем, в силу постепенного истощения источники энергии и других жизненно важных метаболитов, скорость размножения бактерий уменьшается, и в стационарной фазе наступает период некоторого равновесия – количество вновь образующихся клеток становится сопоставим с числом погибших клеток. Вслед за этим наступает стадия, характеризующаяся постепенным уменьшением количества жизнеспособных бактерий.

Это является следствием ряда причин - истощением источников энергии и других жизненно важных метаболитов, невозможности эффективно регулировать pH и гН₂ среды, накопления продуктов метаболизма, тормозящих рост и, возможно, каких-то других факторов.

Очевидно, что популяция бактерий – это тоже саморегулирующаяся система, очень зависящая от среды, истощение которой оказывает на нее отрицательное действие. Жизнеспособные клетки, перенесенные из такой среды в новую питательную среду, вновь повторяют полностью весь цикл развития популяции.

Большинство микробиологических (биотехнологических) производств до недавнего времени основывалось исключительно на применении клеток соответствующих микроорганизмов; многие такие производства существуют и в настоящее время. Это условно называемый «клеточный» уровень биотехнологических процессов. В качестве примера можно назвать разные виды брожения: маслянокислое, молочнокислое, спиртовое и др., а также окислительные процессы (получение уксусной, лимонной, яблочной и других кислот), производство большинства антибиотиков, дрожжей и т.д.

IV. Иллюстративный материал: предлагается

V. Литература:

основная:

53. Егорова Т.А., Клунова С.М., Живухина Е.А. Основы биотехнологии. – М.: Изд. центр «Академия», - 2008. – 208 с.
54. Евтушенко А.Н., Фомичев Ю.К. Введение в биотехнологию: Курс лекций. – Минск.: БГУ, 2002. - 105 с.
55. Сазыкин Ю.О., Орехов С.Н., Чакалева И.И. Биотехнология: Учебное пособие. – М.: Изд. Центр «Академия». – 2006. – 256 с.
56. Орехов С.Н. Фармацевтическая биотехнология. Руководство к практическим занятиям. – Учебное пособие. – Под ред. акад. РАМН В.А. Быкова, проф. А.В Катлинского. – М. : ГЭОТАР-Медиа 2009. – 384 с.
57. Елинов Н.П. Химическая микробиология. - Учебник. - М.: Высшая школа. - 1989, 448 с
58. Воробьева Л.И. Промышленная микробиология. - Учебное пособие. - М.: Изд-во МГУ. - 1989, 294 с.
59. Биотехнология. Принципы и применение. Пер. с англ. / Под ред. И. Хиггинса, Д. Беста, Дж. Джонса. - М.: Мир. - 1988, 480 с.
60. Чуешов В.И., Зайцев А.И., Шебанова С.Г. Промышленная технология лекарств. Том 2. Харьков, 2002.
61. Биотехнология микробного синтеза (Под ред. Бекера М.Е.) – Рига – 1980.
62. Биотехнология. (Отв. редактор А.А. Баев). - М.: Наука. - 1984, 310 с.
63. Перт С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов. М., - 1979 г.
64. Промышленная микробиология (Под ред. Егорова Н.С.) – М., 1989 г.
65. Процессы и аппараты химической технологии (Под ред. П.Г. Романкова). – Л. – 1981.

дополнительная:

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA АКАДЕМИАСЫ «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144

25. Березов Т.Т. , Коровкина Б.Ф. – Биологическая химия (Под ред. И.М. Ивановой) – М., Медицина – 1981 г.
26. Никитин Г.А. – Биохимические основы микробиологических производств – Киев, 1981.
27. Бриттон Г. – Биохимия природных пигментов. М., Мир – 1986 г.
28. Попова Т.В. – Развитие биотехнологии в СССР – М., Наука - 1988 г.
29. Популяционные аспекты биотехнологии – Печуркин Н.С., Брильков А.В., Маркенкова Т.В. – Новосибирск: - Наука – 1990 г.
30. Специальные журналы: «Биотехнология», «Фармация Казахстана», «Фармацевтический бюллетень» и др.

VI. Контрольные вопросы (обратная связь):

11. Назовите основные биообъекты, используемые в биотехнологическом производстве?
12. Какие микроорганизмы являются объектами в генетической инженерии?
13. Перечислите методы культивирования биообъектов в биотехнологическом производстве.
14. Перечислите преимущества глубинного культивирования.
15. Перечислите недостатки поверхностного культивирования.
16. На какие фазы подразделяются рост клеточной популяции при периодическом культивировании?
17. Какие условия требуются для роста и культивирования биомассы?

Лекция № 9-10

I. Тема: Моделирование биотехнологических процессов.

Питательные (культуральные) среды и критерии качества исходного сырья. Процессы биосинтеза с дробным добавлением питательных субстратов. Понятие о мутагенезе, гибридизации и гибридной технологии.

II. Цель: Ознакомить студентов с основами моделирования биотехнологических процессов, с требованиями к качеству исходного сырья, с процессами биосинтеза с дробным добавлением питательных субстратов, с понятием о мутагенезе и видами мутаций.

III. Тезисы лекции:

Важнейшим фактором эффективности технологии ферментных препаратов является качество питательной среды. Основное требование к качеству питательной среды состоит в полноценности ее состава, обеспечивающий рост продуцента и биосинтез целевого фермента. Микроорганизмы нуждаются прежде всего в соединениях, содержащих углерод, азот, водород и кислород. К ним относятся органические вещества, соли аммония и вода. Кроме того в состав питательной среды должны быть включены минеральные соединения, содержащие Mg, Ca, P, S, Fe, Ки другие макро- и микроэлементы, витамины, ростовые вещества (биотин, инозит) и пр. Питательные среды в зависимости от состава делятся на синтетические и комплексные. Синтетическими считают те среды, которые состоят из определенного по качественному и количественному составу набора индивидуальных веществ. В комплексные среды входят различные природные продукты, часто отходы пищевых производств. К их числу относятся различные жмыхи, барда спиртовых заводов, картофельная мезга, кукурузный экстракт, меласса, отруби и прочие продукты. Благодаря использованию отходов комплексные питательные среды доступны, дешевы и обеспечивают безотходность биотехнологических производств.

Микроорганизмы в природе не синтезируют целевые вещества с заданными свойствами в масштабах, когда их выделение стало бы рентабельным. Очевидным является необходимость осуществления физиологических подходов к направленному биосинтезу

целевых продуктов – получение микроорганизмов-продуцентов. Таким образом, становится актуальным освоение студентами теоретических основ и методов расширения номенклатуры промышленных штаммов-продуцентов.

Как правило, в промышленной биотехнологии не используют дикие микроорганизмы, а получают штаммы. **Штаммами** (Stammen - нем., происходить) называются чистые культуры микроорганизмов, выращенных в определенных условиях и способных к синтезу определенного комплекса веществ (липидов, витаминов, аминокислот и др.) для поддержания их жизнедеятельности, размножения и распространения. Штамм считается низшей таксономической единицей бактерий.

Специфические и особенности микроорганизмов определили набор тех признаков и свойств, которые используются для их систематизации, классификации и идентификации.

1. Морфологические признаки – величина, форма, характер взаиморасположения.
2. Тинкториальные свойства – способность окрашиваться различными красителями. особенно важным признаком является отношение к окраске по Грамму, которое зависит от структуры и химического состава клеточной стенки бактерий. Морфологические свойства и отношение к окраске по Грамму определяют принадлежность к крупным таксонам - роду, семейству и т.п.
3. Культуральные свойства – особенности роста бактерий на жидких (образование пленки, осадок, помутнение) и плотных (форма, размер, консистенция, края, поверхность, прозрачность колоний, образование пигмента и другие свойства) питательных средах.
4. Спорообразование – форма и характер расположения споры в клетке.
5. Физиологические свойства – способы углеродного (аутоотрофы, гетеротрофы), азотного (аминотрофы, аминокетотрофы) питания; тип дыхания (аэробы, факультативные анаэробы, строгие анаэробы, микроаэрофилы).
6. Биохимические свойства – способность ферментировать различные углеводы, протеолитическая активность, образование индола, HS_2 , наличие уреазы и других ферментов и т.д.
7. Химический состав клеточных стенок – содержание и состав основных сахаров и аминокислот.
8. Липидный и жирнокислотный состав – изучение состава жирных кислот проводят с помощью газовой хроматографии, которая обладает высокой разделительной способностью и чувствительностью.

Под **колонией** принято понимать видимую простым глазом изолированную структуру, образующуюся в результате размножения и накопления бактерий за определенный срок инкубации. Колония образуется обычно из одной родительской клетки или из нескольких идентичных клеток. Поэтому пересевом изолированной колонии может быть получена чистая культура микроорганизма.

Под **культурой** понимают всю совокупность бактерий, выросших на плотной или жидкой питательной среде. Как колония, так и чистая культура каждого вида характеризуется определенными признаками.

Основной и главный принцип бактериологии – во избежание ошибок изучать свойства только чистых, однородных культур.

Каждая выделенная культура данного вида бактерий называется также **штаммом**, то есть конкретным образцом данного вида.

Наиболее широко используемым методом выделения чистой культуры является метод Дригальского, который состоит в следующем: на поверхность чашки Петри с мясо-пептонным агаром (или какой-либо другой питательной средой) наносят петлей или пастеровской пипеткой небольшую каплю исследуемого материала. Стерильным шпателем каплю тщательно растирают по всей поверхности питательной среды, после чего тем же шпателем (не беря нового материала) делают посев еще на двух чашках. В результате такого посева на поверхности третьей чашки, а иногда и на второй вырастают отдельные колонии,

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA АКАДЕМИАСЫ «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144

которые после макро- и микроскопического изучения пересевают в пробирки с питательной средой.

Для получения более совершенных штаммов, синтезирующих заданный (целевой) продукт в больших, чем обычно, количествах, требуется правильный подбор условий их культивирования.

Основным методом расширения номенклатуры промышленных штаммов до сих пор остается индуцированный мутагенез и ступенчатый отбор. В этом случае популяцию клеток обрабатывают мутагеном (чаще всего специальным химическим веществом или УФ-светом), рассеивают на питательную среду и анализируют популяции, возникшие при размножении отдельных клеток (клональный анализ). Отобрав более продуктивный клон, процедуру повторяют (ступенчатый отбор). Метод чрезвычайно трудоемок. Обычная бактериальная клетка содержит около 5000 генов. Мутагенез неограничен, то есть нельзя предсказать заранее, у какого гена произойдет мутация, поэтому большинство мутаций вредно или летально для клеток, следовательно, нужная мутация (или набор мутаций) возникает редко. Таким образом, основной недостаток метода – непредсказуемость результатов плюс трудоемкость.

При этом (кроме того) ферменты, участвующие в биосинтезе (или в метаболизме) конкретных продуктов, осуществляют их количественный контроль, то есть при повышении внутриклеточной концентрации того или иного вещества его синтез под действием соответствующего фермента снижается или подавляется.

Мутационным путем изменяя фермент так, чтобы он сохранял активность, но терял способность к аллостерической реакции, можно получить суперпродуценты, когда избыток целевого продукта не будет влиять на интенсивность его синтеза. Этот метод широко используется в биотехнологическом производстве аминокислот, витаминов, антибиотиков и др.

Кроме того, при определенных условиях получают синхронные культуры, то есть культуры, в которых все клетки делятся одновременно (синхронно). Однако такая синхронность сохраняется, как правило, в течение 2-3 циклов деления, а затем она нарушается.

Основные пути получения новых штаммов и на их основе – новых продуктов

Промышленная биотехнология имеет свою главную цель – увеличить количество синтезируемого продукта и улучшить его качество.

Для получения новых штаммов-продуцентов необходимо выделить селективные факторы для получения специфических типов микроорганизмов, которыми можно управлять.

1. Для автотрофных микроорганизмов:

а) для аэробных автотрофных микроорганизмов (живущих при аэрации воздухом):

I вариант: Свет и сульфид отсутствуют.

- а) NH_4^+ – источник азота;
- б) NO_2^- – источник азота.

II вариант: Свет присутствует, а сульфид отсутствует.

Источник азота может быть в свободном (N_2) или в связанном виде.

б) для анаэробных автотрофных микроорганизмов (живущих без воздуха, например, в среде метана и др.):

I вариант: Свет отсутствует.

- а) сульфид в виде S^0 или $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ – окисляют для получения энергии;

II вариант: Свет присутствует.

Имеет значение концентрация сульфида (низкая или высокая).

2. Для гетеротрофных микроорганизмов:

а) для аэробных автотрофных микроорганизмов (живущих при аэрации воздухом):

Свет присутствует или отсутствует, рН среды нейтральная или кислая, источник азота – N_2 или азотсодержащие соединения (NO_3^-). Источником серы являются сульфаты (SO_4^{2-}), в качестве источника углерода и CO_2 – вводят глюкозу.

б) для анаэробных автотрофных микроорганизмов (живущих без воздуха, например, в среде метана и др.):

Свет присутствует или отсутствует, рН среды нейтральная или кислая, источник азота – N_2 или азотсодержащие соединения (NO_3^-). Источником серы отсутствует, в качестве источника углерода и CO_2 – вводят глюкозу.

После обработки микроорганизмов мутагенами их культивируют в присутствии их же аналогов, которые тормозят или прекращают их рост. При этом выживают лишь те клетки, которые тем или иным путем преодолели барьеры негативной регуляции.

Как правило, штамм-продуцент должен нести в своем геноме несколько необходимых для сверхсинтеза продукции мутаций.

Стратегия ступенчатого отбора предполагает последовательное введение мутаций в геном микроорганизма. Любой метод генетического обмена может устранить из потомства вредные мутации и собрать в одной клетке нужные.

Аэрация осуществляется подачей через барботер стерильного воздуха или инертного газа (азота). При этом одновременно идет перемешивание ферментационной среды.

При необходимости для стимулирования или ингибирования роста биомассы и усиления синтеза целевых продуктов в питательную среду вводят микроэлементы: Fe^{+2} , Mn^{+2} , Mo^{+} и др., а также витамины: Н, В₁, В₂, В₆, С, РР и др.

Сохранение культуры

Культура (или штамм) микроорганизма называется чистой, если родительские и дочерние клетки практически неразличимы в ней и между ними нельзя установить родственные связи. Как правило, чистые культуры представляют собой коллекционный материал. Для сохранения культуры микроорганизмов их регулярно (один раз в месяц, иногда чаще) пересевают на твердые питательные среды (обычно в чашках Петри или в пробирках, на «косыках», то есть на косом срезе плотной среды) и хранят в холодильнике при температуре $+8+10^0$ С, то есть таким образом, чтобы размножение микроорганизма происходило в основном за счет спорообразования. Чтобы культура клеток не погибла при истощении питательной среды, ее регулярно, как сказано выше, пересевают на свежую твердую (плотную) среду.

Питательные среды и критерии качества исходного сырья

Для выращивания объектов биотехнологии (микроорганизмов, культуры тканей и клеток растений) применяют различные питательные среды. Для приготовления питательных сред в микробиологическом (биотехнологическом) производстве используют сырье минерального, растительного и животного происхождения, а также синтезированное химическим путем. Вещества, входящие в состав питательных сред, должны обеспечивать развитие культуры, биосинтез и накопление целевых продуктов и не должны содержать вредных примесей. Они могут быть жидкими, твердыми (плотными) и полутвердыми (полужидкими).

1. **Жидкие** среды готовят на основе водных растворов каких-либо веществ, чаще всего мясной воды, различных гидролизатов, иногда естественных продуктов (молока и др.)
2. Для получения **плотных** (твердых) сред к ним добавляют или агар, или желатин, или силикагель в соответствующей концентрации. Агар представляет собой полисахарид, получаемый из морских водорослей. Он имеет плотную волокнистую структуру. Агар плавится при 100^0 С, но при охлаждении сохраняет жидкую консистенцию до $+45^0$ С. Его в плотные среды добавляют в концентрации 1,5-3,0 %.
3. **Полужидкие** (полутвердые) среды имеют вязкую консистенцию благодаря добавлению к ним небольшого количества (0,3-0,7 %) агара.

По происхождению среды делятся на:

- Естественные (кровяные, молочные, картофельные, яичные и др.);
- Искусственные, получившие широкое применение. Они представляют собой искусственные, сбалансированные смеси питательных веществ в концентрациях и сочетаниях, необходимых для поддержания роста и размножения микроорганизмов. В них в качестве универсального источника азота и углерода применяют пептоны – продукты неполного расщепления белков с помощью ферментов (пепсина), различные гидролизаты (рыбный, казеиновый, дрожжевой и т.п.). Часто в них вводят предшественники роста, ПАВ, антибактериальные препараты.

Требования, предъявляемые к питательным средам:

1. Они должны содержать в достаточном количестве все необходимые питательные вещества (источники энергии, азота, углерода), соли и ростовые факторы (микроэлементы и витамины).
2. Питательные среды должны иметь оптимальное для роста данного вида биообъектов значение рН.
3. Среда (твердые и полужидкие) должны иметь достаточную влажность, так как при усыхании повышается концентрация веществ, особенно солей, что может затормозить рост микроорганизмов.
4. Для лучшего определения культуральных свойств бактерий питательные среды должны быть, по возможности, прозрачными.
5. Питательные среды должны быть стерильными, не содержать посторонней микрофлоры.

При выборе компонентов питательных сред необходимо учитывать не только чистоту веществ (отсутствие вредных примесей), но также себестоимость исходных веществ и материалов.

По **назначению** питательные среды делятся на следующие категории:

- | | |
|------------------------------------|-----------------------|
| 1. Универсальные. | 5. Специальные. |
| 2. Дифференциально-диагностические | 6. Синтетические. |
| 3. Селективные. | 7. Полусинтетические. |
| 4. Дифференциально-селективные. | |

Питательные среды готовят по общепринятой схеме.

В качестве примеров могут быть представлены следующие среды.

Состав простой плотной (агаризованной) питательной среды:

Пептона 1,0

Натрия хлорида 0,5

Агара 2,0

Воды очищенной до 100 мл

Стерилизуют 30 минут при 120⁰ С или 1 час при 100⁰ С.

Состав синтетической жидкой питательной среды (соотношение С/Н равно 40:1):

Глюкозы 6,0

Мочевина 0,2

Магния сульфата 0,05

Натрия хлорида 0,05

Калия фосфата однозамещенного 0,1

Дрожжевого экстракта 0,05

Железа сульфата двухвалентного 0,001

Воды очищенной до 100 мл

Значение рН среды 6,3-6,8

Растворы глюкозы и мочевины готовят отдельно, стерилизуют.

Смешивают перед посевом культуры.

Стерилизовать 30 минут при 120⁰ С или 1 час при 100⁰ С.

Хранить не более 24 часов после смешения

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA АКАДЕМИАСЫ «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144

Для получения более совершенных продуцентов используется мутагенез, гибридизация и генетическая перестройка в опытах «in vivo» и «in vitro».

Ко времени открытия антибиотиков генетика обладала мощным средством перестройки генов – мутагенезом. Этот метод и был положен в основу всей селекционной работы с микроорганизмами, продуцентами различных продуктов биосинтеза: антибиотиков, аминокислот, витаминов, ферментов и др. Следует отметить, что эффективность отбора лучших продуцентов за 30-40 лет достигла высоких производственных результатов. Так, например, продуктивность по синтезу пенициллина увеличилась в 300-400 раз, лизина – в 400-450 раз. Полученные результаты позволили снизить себестоимость ряда биосинтетических продуктов до самой низкой отметки и сделали их широко используемыми в медицинской практике, ветеринарии, пищевой промышленности, в сельском хозяйстве.

Среды, предназначенные для ферментационных процессов

Превалирующим компонентом всех (или почти всех) биотехнологических процессов является вода. В лабораторных условиях можно легко определить специфические потребности любого конкретного организма и затем (с известной долей приближения) экстраполировать на производственный уровень.

Если процесс крупномасштабный, то важным моментом будет доступность субстрата для культивирования (наличие его в требуемых количествах, стабильность, восполняемость, легкость в обращении и сохранении). Стоимость материалов является важным фактором, поскольку внедрение любого биотехнологического процесса в значительной степени зависит от его стоимости по сравнению с существующими методами производства этого же продукта.

Неотъемлемым фактором является здоровье работников, особенно при манипуляциях с порошковыми материалами.

Приготовление питательных сред для ферментационных процессов обычно рассматривается как мало интересная часть общей задачи, но фактически оно является краеугольным камнем, обеспечивающим успех всех последующих этапов. Среды неподходящего состава обусловят низкий уровень ростовых процессов и, следовательно, низкий уровень выхода целевого продукта.

Известно, что главенствующую роль в клетке играет ядро или его аналог у бактерий и условно – у вирусов.

Постоянным компонентом ядра (или нуклеотида) является ДНК, входящая в состав хромосом. Каждая хромосома содержит только одну молекулу ДНК, в которой в линейном порядке сгруппированы самовоспроизводящиеся дискретные единицы, или **гены** (цистроны – или первичные гены), обладающие элементарной биохимической функцией.

Понятие о мутагенезе

Мутация – это скачкообразное наследуемое изменение гена.

В основе мутагенеза лежит изменчивость микроорганизмов, под которой понимают разнообразие организмов, ныне существующих и вновь образующихся. Поэтому при работе с микроорганизмами используют в качестве объекта не одну особь, а популяции.

Популяция – многочисленные клетки (особи) одного вида, обитающие в ряду поколений в определенных условиях, где нет заметных преград для случайного свободного скрещивания этих клеток. Микроорганизмы в популяции характеризуются общностью генетической программы и возможностью свободного обмена генетической информацией.

Характерные показатели популяции:

- а) плотность – число особей на единицу объема или площади;
 б) прирост – число новых особей, возникающих в единицу времени;
 в) гибель – число особей, гибнущих в единицу времени.

Изменение численности популяции выражается кривыми размножения или кривыми выживания.

Культура микроба называется чистой, если родительские и дочерние особи практически неразличимы и между ними нельзя установить родственные связи. Чистые культуры (как популяции) мало или совсем непригодны для генетических исследований, которые выполняются, в основном, на клоновых культурах.

Клон – это культура, состоящая из наследственно однородных клеток, возникающих в результате бесполого размножения. Однако клоновые культуры грибов (одноклеточных низших) трудно получить, так как их клетки могут быть многоядерными.

Мутация – это генетическое и необратимое изменение нормы реакции организма.

Норма реакции организма – это проявление фенотипа в разных условиях существования вида.

Фенотип – это определенная сумма признаков организма в конкретных внешних условиях.

Виды мутагенов:

Химические мутагены: производные этилена, уретаны, алкилсульфонаты, иприты, этиленимины и др.;

Физические мутагены: излучения (ионизирующие – β и γ ; ультрафиолетовое), ультразвук, повышенная температура и др.;

Биологические мутагены: вирусы бактерий (фаги).

Клетки, наследственно изменившиеся под влиянием мутагенов, называются мутантными, а культуры, полученные из них – мутантами.

Мутации по механизму возникновения могут быть:

- Индуцированные (контролируемые);
- Спонтанные (неконтролируемые или ненаправленные). Они имеют место в естественных условиях без вмешательства экспериментатора.

Адекватность генотипического изменения клеток условиям среды обитания оценивается в ходе естественного отбора при адаптации, так как мутанты могут быть жизнеспособными и нежизнеспособными.

Типы мутаций:

- Ненаследуемые модификации;
- Длительные наследственные фенотипические модификации. Они присущи только клеточным структурам, но не вирусам.

Микробы, как высшие организмы, способны собирать и перераспределять уже имеющуюся наследственную информацию между родственными, но генетически неидентичными клетками. Процесс комбинирования в одной клетке мутировавших генов из двух разных клеток называют генетической рекомбинацией. Она наблюдается при трансформации, трансфекции, конъюгации и трансдукции.

При этом не происходит истинного слияния клеток, и лишь часть генетического материала переходит в клетку-реципиент. Образуется неполный, или частичный, диплоид - мерозигота (частичная зигота).

Трансформация – это процесс, при котором осуществляется перенос информации химически чистой ДНК от бактериальной клетки-донора в бактериальную клетку-реципиент, где в результате рекомбинации происходит замещение специфической последовательности генома.

Трансфекция – это процесс, при котором информация переносится в компетентную бактериальную клетку, когда она поглощает ДНК фага. Процесс поглощения ДНК фага компетентной клеткой при трансфекции сходен с процессом трансформации, однако они существенно различаются, поскольку фрагментация ДНК происходит только при трансфекции. Процесс идет естественным путем подобно заражению клеток фаговыми частицами.

Конъюгация (лат. conjugatio – соединение – это процесс полного или частичного переноса генетической информации из мужской особи в женскую при установленном клеточном контакте между разнополюми клетками бактерий.

Трансдукция – это процесс переноса ДНК из бактериальной клетки-донора в фагочувствительную клетку-реципиент с помощью фага. Фаг выступает посредником между донорской и реципиентной клетками.

Мутантные клетки предварительно размножают в присутствии ингибиторов роста (здесь используется **метод отбора – скрининг**). Затем отбирают лишь те мутанты (по форме и размерам колоний), которые преодолевают нарушение обмена веществ за счет образования (синтеза) избытка желаемого соединения (целевого продукта).

Гибридизация – как основной метод биотехнологии

В биотехнологии широко используется метод получения гибридных клеток на основе слияния микробных протопластов (парасексуальная гибридизация). Этот уровень биотехнологии называется «клеточной» инженерией. Таким путем удается повысить потенциальную активность исходных клеток в гибридном потомстве.

С помощью скрининга (отсева, просева) мутантов отбираются клетки, у которых наблюдается достаточно длительные модификационные изменения, обусловленные включением в стабильные метаболические циклы.

Гибридизация (лат. hibrida– скрещивание, помесь) стала применяться для объединения желаемых свойств разных штаммов в одном микроорганизме. Обычно скрещивают штаммы, принадлежащие к противоположным типам.

У бактерий половой процесс называется конъюгацией (см. выше). Это способ переноса генетической информации из одной бактериальной клетки в другую. Он осуществляется за счет образования длинного мостика между клетками, который служит для переноса ДНК из одной клетки в другую.

Половой процесс бактерий при конъюгации контролируется системой несовместимости.

Способность к формированию мостика закодирована во многих плазмидах бактерий, по нему они переносят свои гены, а в некоторых случаях и гены клетки-хозяина (клетки-донора) в клетку-реципиент. Плазмиды, осуществляющие перенос генов клетки-хозяина, обладают, таким образом, способностью к мобилизации хромосом. У клеток E. coli такие F-плазмиды выступают в роли фактора пола. Они способны мобилизовать хромосому не только E. coli, но и родственных энтеробактерий (Shigella, Klebsiella, Salmonella, Erwinia), и поэтому могут использоваться для переноса генов между бактериями разных родов.

У разных видов *Streptomyces* хорошо развиты системы скрещивания, что позволяет получать свыше 60 % наименований применяющихся сегодня антибиотиков, особенно у их близких родственников – видов *Nocardia* (они синтезируют рифамицины). Для повышения выхода антибиотиков, синтезируемых *Penicillium* и *Cephalosporium*, применен парасексуальный цикл гибридизации.

У грибов помимо конъюгации (слияние содержимого вегетативных клеток) существуют другие типы скрещивания, так как многие микроскопические грибы не имеют истинного полового цикла. В этом случае применяется парасексуальный цикл (слияние протопластов), но он менее эффективен.

Гибридная биотехнология

Гибридома – это клетка, которая получена в результате гибридизации.

Соматические гибриды высших организмов

1. Получение соматических гибридов растительных клеток

Для осуществления гибридизации соматических клеток растений методом слияния протопластов (метод применяется в культуре тканей и клеток растений – см. Лекцию № 10) необходимо выполнить следующие операции:

1. Выделить протопласты;
2. Осуществить слияние;
3. Регенерировать клеточные стенки;
4. Осуществить слияние ядер так, чтобы получить полноценное гибридное ядро;
5. Размножить гибридные клетки;
6. Регенерировать целое растение.

Осуществить слияние протопластов растений, вообще говоря, несложно. Представляет трудности процесс размножения гибридных клеток и регенерация целого растения. Однако в настоящее время уже получены мутантные растения – соматические гибриды.

2. Слияние клеток животных

Осуществить слияние клеток животных и получить внутри- и межвидовые гибриды клеток млекопитающих методически проще, чем в случае микроорганизмов или растений, так как клетки млекопитающих не имеют клеточной стенки, которую необходимо удалять перед слиянием.

Следует помнить, что при слиянии клеток растений получается гибридное растение, а при слиянии клеток млекопитающих – лишь гибридная клетка.

Гибридизация лежит в основе получения моноклональных антител.

Моноклональные и поликлональные антитела

Еще до разработки технологии гибридом (гибридома – это клетка, получаемая гибридизацией, слиянием двух клеток в результате конъюгации или другим путем), позволяющей получать гомогенные (моноклональные) антитела, большое влияние на развитие клинической медицины оказали «обычные» (поликлональные) антитела. При этом наработка подходящих антител всегда осложнялась непредсказуемостью иммунного ответа, и их титр, как и перекрестные реакции, варьировали от животного к животному и от одной партии сыворотки к другой. Это определялось тем, что данный антиген вызывает образование целого набора антител.

Антитела – это гликопротеиды, образующиеся в ответ на введение антигена. Они относятся к классу иммуноглобулинов, обладают общностью строения и отличаются способностью связывать различные антигены. В медицинской практике применяются антитела γ -класса (IgG, IgM, IgA, IgE, IgD).

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA АКАДЕМИЯСЫ «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144

Один из результатов использования метода слияния клеток млекопитающих чрезвычайно быстро нашел применение в биотехнологии – это линии клеток, полученных при гибридизации с участием клеток миеломы (так называемые «гибридомы»), с помощью которых могут вырабатываться моноклональные антитела. Этот метод разработан Мильштейном с соавт. в Кембридже. Он основан на создании «бессмертных» клеток, то есть клеток нормальных лимфоцитов, обуславливающих иммунный статус организма, производящих антитела, за счет слияния их с клетками миеломы*. Таким способом получают моноклональные антитела только одного типа в каждом конкретном случае. Область их применения различна: в диагностике вирусных и онкологических заболеваний; в определении (идентификации) возбудителей инфекционных заболеваний; при пересадке органов; при очистке белков методом иммуно-адсорбции; при очистке интерферонов и т.п.

Примечание: Миелома*- это злокачественные новообразования иммунной системы; они развиваются в результате неконтролируемой пролиферации линии лимфоцитов. При этом в больших количествах синтезируется один тип миеломных белков-антител, или так называемых аномальных иммуноглобулинов. Миеломные белки – удобная мишень для структурного изучения антител, так как они представляют собой структурно-гомогенные антитела, вырабатываемые опухолевыми плазматическими клетками – потомками одной злокачественно-перерожденной клетки. Иными словами, миеломы являются природными продуцентами моноклональных антител.

В основе получения моноклональных тел, как сказано выше, лежит гибридная технология (уровень «клеточной» инженерии). Здесь осуществляется гибридизация β -лимфоцитов (выделенных из периферической крови, миндалин или селезенки человека) и клеток миеломы млекопитающих (мышей, крыс, человека). Слияние достигается с помощью, например, полиэтиленгликоля. Полученная гибридома способна продуцировать так называемые моноклональные антитела. В производствах антител биотехнологический процесс рассчитан на использование метода выращивания гибридных клеток в инкапсулированном виде. При достижении клетками определенной плотности в капсулах антитела выделяются и очищаются с помощью простейших процедур. Таким способом можно получать практически неограниченное количество гомогенных (моноклональных) антител.

Субстраты для культивирования биообъектов

Питательные среды для выращивания объектов биотехнологии, т. е. продуцентов тех или иных соединений, могут быть неопределенного состава и включать различные биогенные добавки (растительные, животные или микробные) – мясной экстракт, кукурузную муку, морские водоросли и т. п. Применяются также среды из чистых химических соединений определенного состава, так называемые синтетические. Компонентный состав сред определяется питательными потребностями продуцента. Во многих процессах используют в качестве объектов организмы, ранее называвшиеся гетеротрофами, которые в настоящее время подразделяются на: органы автотрофы (употребляющие органические вещества как источники энергии), литогетеротрофы (использующие органические вещества как источники углерода) и органогетеротрофы (для которых органические вещества служат и источниками энергии, и источниками углерода). Питательные среды призваны обеспечивать жизнеспособность, рост и развитие соответствующих продуцентов, а также синтез целевого продукта с максимальной эффективностью. Требования к питательным средам, используемым в биотехнологии, ничем не отличаются от требований, предъявляемым к питательным средам, применяемым в микробиологии для культивирования тех или иных микроорганизмов. Для приготовления

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA АКАДЕМИАСЫ «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144

питательных сред в биотехнологии используются разнообразные субстраты, которые должны удовлетворять определенным критериям.

Субстрат представляет собой сырье для получения целевого продукта и должен быть недефицитным, дешевым, по возможности легко доступным.

IV. Иллюстративный материал: прилагается

V. Литература:

основная:

66. Егорова Т.А., Клунова С.М., Живухина Е.А. Основы биотехнологии. – М.: Изд. центр «Академия», - 2008. – 208 с.
67. Евтушенков А.Н., Фомичев Ю.К. Введение в биотехнологию: Курс лекций. – Минск.: БГУ, 2002. - 105 с.
68. Сазыкин Ю.О., Орехов С.Н., Чакалева И.И. Биотехнология: Учебное пособие. – М.: Изд. Центр «Академия». – 2006. – 256 с.
69. Орехов С.Н. Фармацевтическая биотехнология. Руководство к практическим занятиям. – Учебное пособие. – Под ред. акад. РАМН В.А. Быкова, проф. А.В Катлинского. – М. : ГЭОТАР-Медиа 2009. – 384 с.
70. Елинов Н.П. Химическая микробиология. - Учебник. - М.: Высшая школа. - 1989, 448 с
71. Воробьева Л.И. Промышленная микробиология. - Учебное пособие. - М.: Изд-во МГУ. - 1989, 294 с.
72. Биотехнология. Принципы и применение. Пер. с англ. / Под ред. И. Хиггинса, Д. Беста, Дж. Джонса. - М.: Мир. - 1988, 480 с.
73. Чуешов В.И., Зайцев А.И., Шебанова С.Г. Промышленная технология лекарств. Том 2. Харьков, 2002.
74. Биотехнология микробного синтеза (Под ред. Бекера М.Е.) – Рига – 1980.
75. Биотехнология. (Отв. редактор А.А. Баев). - М.: Наука. - 1984, 310 с.
76. Перт С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов. М., - 1979 г.
77. Промышленная микробиология (Под ред. Егорова Н.С.) – М., 1989 г.
78. Процессы и аппараты химической технологии (Под ред. П.Г. Романкова). – Л. – 1981.

дополнительная:

31. Березов Т.Т. , Коровкина Б.Ф. – Биологическая химия (Под ред. И.М. Ивановой) – М., Медицина – 1981 г.
32. Никитин Г.А. – Биохимические основы микробиологических производств – Киев, 1981.
33. Бриттон Г. – Биохимия природных пигментов. М., Мир – 1986 г.
34. Попова Т.В. – Развитие биотехнологии в СССР – М., Наука - 1988 г.
35. Популяционные аспекты биотехнологии – Печуркин Н.С., Брильков А.В., Маркенкова Т.В. – Новосибирск: - Наука – 1990 г.
36. Специальные журналы: «Биотехнология», «Фармация Казахстана», «Фармацевтический бюллетень» и др.

VI. Контрольные вопросы (обратная связь):

18. Способы для получения новых штаммов?
19. Каковы требования предъявляемые к питательным средам?
20. Расскажите о видах мутагенов?
21. Что такое гибридизация?
22. Что такое гибридомная биотехнология?

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA АКАДЕМИАСЫ «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144

Лекция № 11-12

I. Тема: Физиологические подходы при биотехнологическом промышленном синтезе целевых продуктов: изменение условий культивирования (температура, давление, интенсивность аэрации); изменение количественного и качественного соотношения компонентов культуральной среды (соотношение азотно-углеродного питания, содержание макро- и микроэлементов и др.) и другие факторы.

II. Цель: Ознакомить студентов с физиологическими подходами в биотехнологическом промышленном синтезе целевых продуктов.

III. Тезисы лекции:

Технология ферментационных процессов

При ферментационной технологии можно использовать цельные живые клетки (микробов, клетки животных и растений) или какие-нибудь клеточные компоненты (например, ферменты) с целью физических или химических преобразований органических веществ. Однако недостаточно получать требуемые изменения веществ, метод должен иметь преимущества перед другими, применяемыми в настоящее время, технологиями производства этих же самых продуктов.

Преимущества производства органических продуктов биотехнологическими способами перед чисто химическими методами достаточно многогранны:

- многие сложные органические молекулы, такие, как белки и антибиотики, не могут практически быть синтезированы химическими способами;
- биоконверсия обеспечивает значительно больший выход целевого продукта;
- биологические системы функционируют при более низких температурах, менее высоких значениях рН (близких к нейтральному) и т. п.;
- каталитические биологические реакции и намного специфичнее, чем реакции химического катализа;
- биологические процессы обеспечивают почти исключительно продукцию чистых изомеров одного типа, а не их смесей, как это часто бывает в реакциях химического синтеза.

Но вместе с тем биологические способы в сравнении с химическими методами обладают рядом явных недостатков:

1. Биологические системы могут легко быть загрязнены посторонней нежелательной микрофлорой.
2. Целевой продукт, синтезируемый биологическим способом, присутствует в довольно сложной смеси, что обуславливает необходимость разделения его от примеси ненужных веществ.
3. Биотехнологические производства требуют больших количеств воды, которую в итоге необходимо удалять, сбрасывая в окружающую среду.
4. Биопроцессы обычно идут медленнее в сравнении со стандартными химическими процессами.

Условия проведения ферментаций

Для обеспечения проведения процесса ферментации необходимо строгое соблюдение таких условий, как качество питательной среды (состав), температура, аэрация, давление, перемешивание, рН среды, количество исходных клеток, свет.

Основные показатели, характеризующие ферментационный процесс:



1. Физические показатели: температура, давление, вводимая мощность, частота вращения мешалки, пенообразование, скорость потока воздуха (инертного газа), скорость потока питательной среды, вязкость, турбулентность, мутность и др.
2. Химические показатели: рН среды, окислительно-восстановительный потенциал, содержание растворимого O₂ и CO₂, содержание O₂ и CO₂ в подаваемом газе (воздухе), содержание углерода, содержание предшественников роста, содержание азота, фосфора, Mg⁺², K⁺, Ca⁺², Na⁺, Fe⁺², SO₄⁻² и др., концентрация синтезируемого продукта.
3. Биологические показатели: содержание субстрата, продукта, отсутствие посторонней микрофлоры.
4. Физическое состояние продуцента: удельная скорость роста, его морфологическое состояние (величина клетки, количество делящихся клеток), ряд биохимических показателей (содержание РНК, ДНК, NAD, NADH₂, АТФ, АМР, активность ключевых ферментов).

Автоматизация процесса контроля за ферментацией (за перечисленными показателями), позволяет не только регистрировать анализируемые показатели, но и регулировать их.

Культивирование

Стадия культивирования микроорганизмов является наиболее сложной и ответственной.

Рост и культивирование биомассы требуют следующих условий:

- жизнеспособности посевного материала;
- наличия источника энергии (тепла);
- достаточного количества соответствующей питательной среды;
- необходимых физико-химических условий для жизнедеятельности.

С начала 1950-х гг. вирус полиомиелита для производства вакцины выращивали в культуре клеток млекопитающих, в том числе фибробластов эмбриона человека. С тех пор фибробласты эмбриона стали незаменимы для выделения и выращивания ряда других вирусов, при производстве высокоспецифичных белков (антител, интерферонов), в исследованиях рака и противовирусной химиотерапии.

Культуры, приготовленные непосредственно из тканей организма (эмбриональных или тканей новорожденных), называют **первичными культурами**. В большинстве случаев клетки первичной культуры переносят из культуральной чашки и используют для получения большого количества **вторичных культур**, которые можно последовательно перевивать в течение недель или месяцев. Разные типы клеток нуждаются в различных питательных веществах, а также в одном или нескольких белковых факторах роста.

Клеточные линии можно использовать для получения клонов, которые происходят из одной клетки-предшественника.

Биотехнология использует методы поверхностного и глубинного культивирования микроорганизмов.

При поверхностном культивировании (в монослое) суспензию клеток получают обработкой измельченной ткани эмбриона трипсином. Клетки в такой суспензии, оседая на плотной поверхности сосуда с культуральной средой, становятся плоскими и делятся, образуя монослой на поверхности сосуда. Обычно при этом способе культивирования пользуются цилиндрическими бутылками, которые медленно вращаются вдоль своей длинной оси. Рост клеток и выход биомассы можно увеличить, добавив к суспензии носитель-микроскопические гранулы из инертного синтетического полимера, на которых клетки

закрепляются и пролиферируют. Суспензионные культуры можно получать в сосудах объемом до 1000 л при перемешивании.

Преобладающим является *глубинный метод* культивирования, предполагающий возможность использования всего объема питательной среды.

На рост и развитие микроорганизмов влияют внутри- и внеклеточные факторы. К внутриклеточным факторам относятся: структура клетки, механизмы метаболизма и генетические характеристики. Внеклеточные (внешние) факторы, т.е. условия внешней среды клетки, являются основными регуляторными факторами биотехнологии.

Микроорганизмы можно выращивать:

- в ферментере периодического действия;
- в ферментере периодического действия с добавлением субстрата;
- в непрерывной культуре.

В первом случае микроорганизмы выращивают в стерильных условиях без добавления в ходе ферментации свежей культуральной среды. При периодической ферментации свежей культуральной среды, концентрация микроорганизмов (биомассы), количество белкового продукта или метаболита зависят от фазы роста, клеточного метаболизма и наличия питательных веществ.

Как было сказано ранее (в лекции № 7-8), различают шесть основных фаз роста:

- лаг-фаза (1);
- фаза ускорения (2);
- экспоненциальная или логаримическая фаза (3);
- фаза замедления (4);
- стационарная фаза (5);
- фаза отмирания (6).

Как правило, после инокуляции стерильной культуральной среды мгновенного увеличения числа клеток не наблюдается. В течение определенного увеличения числа клеток не наблюдается. В течение определенного периода времени, называемого *лаг-фазой*, клетки адаптируются к новым условиям (другим рН или концентрации питательных веществ). Продолжительность лаг-фазы зависит от времени, в течение которого клетки посевного материала находились в стационарной фазе, и от того, насколько различалась среда, в которой росла культура, от новой, свежей культуральной среды. Если посевным материалом служит культура, находящаяся в *экспоненциальной фазе*, выраженная лаг-фаза может отсутствовать и рост клеток начнется немедленно после инокуляции. Между лаг- и экспоненциальной фазами есть короткий период- фаза ускорения, когда скорость роста клеток увеличивается до достижения постоянной величины. В период экспоненциальной фазы клетки претерпевают несколько делений. Когда субстрат присутствует в избытке, достигается максимальная скорость роста культуры в экспоненциальной фазе, из-за большого числа клеток в конце экспоненциальной фазы субстрат расходуется очень быстро, наступает фаза замедления, которая может быть кратковременной. В результате истощения лимитирующего субстрата или накопления продуктов метаболизма, замедляющих рост, увеличение числа клеток постепенно прекращается и культуре переходит в стационарную фазу. В это время биомасса остается постоянной, метаболизм претерпевает кардинальные изменения, синтезируются соединения (вторичные метаболиты), представляющие коммерческий интерес, например антибиотики. Продолжительность стационарной фазы зависит от конкретного микроорганизма условий роста. В *фазе отмирания* метаболизм

ÖNTÜSTİK-QAZAQSTAN MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11	
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144	

прекращается, так как энергетические запасы клеток оказываются исчерпанными. При промышленном синтезе, еще до наступления фазы отмирания, ферментацию останавливают.

Периодическая культура с добавлением субстрата предполагает периодическое внесение в ферментер увеличивающегося количества питательных веществ. При этом культуральную среду не удаляют до окончания процесса. Периодическое добавление субстрата приводит к удлинению экспоненциальной и стационарной фаз, к увеличению биомассы и количества метаболитов, синтезируемых во время стационарной фазы. Для обеспечения непрерывного синтеза рекомбинантного белка и его стабильности необходим тщательный контроль процесса и добавление субстрата (источника углерода, азота, витаминов, микроэлементов и др. БАВ) тотчас, как в этом возникает необходимость.

В зависимости от генотипа микроорганизма и природы рекомбинантного белка периодическая ферментация с добавлением субстрата может повысить выход готового продукта на 25-1000% по сравнению с простой периодической ферментацией.

Периодическая ферментация с добавлением субстрата используется также для культивирования клеток млекопитающих и насекомых; эти культуры широко применяют для получения белковых продуктов, имеющих медицинское значение, кроме того, без периодического добавления субстрата, клетки млекопитающих неэффективно синтезируют чужеродные белки. Для периодической ферментации характерны небольшие различия во времени сбора клеток, который проводят, начиная с середины экспоненциальной фазы, и заканчивают ее поздним этапом.

Однако в стационарной фазе микроорганизмы часто синтезируют протеолитические ферменты - *протеиназы*, разрушающие производимые белки; если цель ферментации – получение белковых продуктов, нужно остановить процесс до перехода его в стационарную фазу. Определяя время добавления следующей порции субстрата, используют показатели, коррелирующие с его расходом: количество синтезированных органических кислот, значение рН или количество образовавшегося CO₂. Конечный продукт собирают по завершении процесса.

При непрерывной ферментации свежая культуральная среда поступает в ферментер непрерывно, параллельно отводится такой же объем клеточной суспензии. Таким образом, убыль числа клеток (удаление продукта) уравнивается их увеличением в результате деления. При этом жестко контролируют скорость притока культуральной среды и постоянный объем культуры в биореакторе.

Следует заметить, что в промышленных целях непрерывная ферментация применяется реже, хотя стоимость получения определенного количества биомассы в ферментере непрерывного действия существенно ниже, чем в биореакторе, работающем в периодическом режиме. Это удешевление обусловлено следующим:

- при непрерывной ферментации нужны не столь громоздкие биореакторы и оборудование для сбора клеток, их разрушения, последующей очистки белкового продукта или метаболита, синтезированного микроорганизмами;
- биореактор периодического действия время от времени разгружают, готовя к повторному использованию (ремонт, чистка, стерилизация биореактора-основная причина снижения эффективности процесса); для ферментера, работающего в непрерывном режиме, простой существенно меньше;

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA АКАДЕМИАСЫ «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144

- при непрерывной ферментации синтез целевого продукта происходит более согласованно, так как физиологический статус большинства клеток одинаков.

Непрерывную ферментацию используют для промышленного получения белков одноклеточных микроорганизмов и антибиотиков, однако и этот способ выращивания микроорганизмов связан с определенными затруднениями:

- продолжительность ферментации в непрерывном режиме составляет иногда 500-1000 ч, в течение которого некоторые клетки могут потерять рекомбинантные плазмиды (известно, что клетки, не несущие плазмид, расходуют меньше энергии, делятся быстрее, поэтому со временем выход целевого продукта может снижаться из-за уменьшения числа клеток, способных его синтезировать);

- в промышленных установках затруднительно в течение длительного времени поддерживать стерильные условия; непрерывные процессы требуют наличия стерильного резервного оборудования, что значительно увеличивает основные затраты.

Культуры с высокой плотностью. При максимальной конечной плотности культуры получается и максимальное количество целевого продукта. В ферментерах периодического действия с добавлением субстрата концентрация рекомбинантных клеток *E.coli* достигает 50 г сухого вещества на 1 л питательной среды (в некоторых случаях более 100 г/л). Один из способов повышения плотности культуры- оптимизация культуральной среды.

Следует иметь в виду, что некоторые питательные вещества (в том числе источники углерода, азота) при высоких концентрациях замедляют рост клеток. Так, глюкоза подавляет рост при концентрации более 50 г/л, аммиак- при концентрации свыше 3 г/л; железо, магний, фосфор, цинк соответственно – более 1,15 г/л, 8,7 г/л, 10 г/л, 0,038 г/л.

Таким образом, простое увеличение содержания питательных веществ в культуральной среде при периодической ферментации не дает желаемого результата.

Для избежание недостатка кислорода в культурах с высокой плотностью повышают количество поступающего диспергированного воздуха и скорость перемешивания. Возможна подача в культуру чистого кислорода, а не воздуха (содержащего только 20% кислорода) или выращивание клеток под определенным давлением для увеличения растворимости кислорода. Высокой плотности роста культуры удается достичь в периодическом режиме с добавлением субстрата. Режим подачи питательных веществ может быть: непрерывным, ступенчатым, экспоненциальным.

При непрерывном режиме в культуральную среду в течение всей ферментации вносят одинаковые количества питательных веществ. *При ступенчатом режиме* питательные вещества добавляют во все большем количестве по мере увеличения концентрации клеток. *При экспоненциальном режиме* питательные вещества добавляют в количестве, обеспечивающем постоянную скорость роста клеток.

Периодическую подачу питательных веществ автоматизируют, основываясь на результатах измерения концентрации лимитирующего субстрата культуральной среды (например, глюкозы) в процессе ферментации.

При крупномасштабной ферментации следует учитывать еще один аспект. Важно не допустить случайного попадания рекомбинантных микроорганизмов в окружающую среду; для этого используют надежные системы, предотвращающие утечку живых рекомбинантных организмов или ограничивающие их распространение при произошедшей утечке.

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA АКАДЕМИАСЫ «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144

Перед окончательным удалением из установки, все рекомбинантные микроорганизмы должны быть инактивированы в соответствии с определенными инструкциями. Исползованную культуральную среду тщательно проверяют на наличие в ней жизнеспособных микроорганизмов, чтобы исключить их попадания в окружающую среду.

Превышение эффективности ферментации

Независимо от типа биореактора процесс ферментации строго контролируют по:

- концентрации растворенного кислорода;
- рН;
- температуре;
- интенсивности перемешивания биомассы.

Существенные изменения любого из этих параметров резко снижают скорость роста клеток и стабильность белкового продукта. Для оптимального роста *E. Coli* и других микроорганизмов, используемых при экспрессии рекомбинантных белков, нужна хорошо аэрируемая культуральная среда. Кислород плохо растворим в воде (0,0084 г/л при 25 °C), поэтому он должен подаваться в среду непрерывно. В процессе ферментации специальный датчик контролирует содержание по всему объему, тщательность перемешивания культуры, что, вместо взятое, обеспечивает эффективность диспергирования пузырьков. Пространство, где взаимодействуют микроорганизмы питательная среда, принято называть микросредой. Если микросреда данной культуры одинакова в каждой точке, такую культуру считают гомогенной. Гомогенность достигается эффективным перемешиванием всех компонентов среды и микроорганизмов по всему рабочему объему. Гомогенность невозможна без аэрации, которая осуществляется барботерами различных конструкций, например, в виде кольцевого желоба с отверстиями, перфорированной трубы или форсунки.

Оптимальный рост большинства микроорганизмов идет при рН от 5,5 до 8,5; однако клеточные метаболиты, выделяющиеся в культуральную среду, могут изменять рН. Изменение рН среды заметно сказывается на активности ферментов микроорганизмов, состоянии промежуточных продуктов, их диссоциации, растворимости и т.п., что значительно влияет на выход конечного продукта. Тщательно контролируя рН, при необходимости в ферментер добавляют кислоту или основание, хорошо перемешанные с питательной средой и равномерно распределенные по всему объему.

Успех ферментации зависит от температуры. Если она ниже оптимальной (37 °C), рост микроорганизмов замедлен, интенсивность их метаболизма снижена. При повышении температуры до 38 °C, возможна преждевременная индукция синтеза белка или индукция белков теплового шока, что активизирует клеточные протеиназы и снижает выход белкового продукта. Для отвода тепла используют охлаждающую рубашку.

IV. Иллюстративный материал: прилагается

V. Литература:

основная:

79. Егорова Т.А., Клунова С.М., Живухина Е.А. Основы биотехнологии. – М.: Изд. центр «Академия», - 2008. – 208 с.
80. Евтушенков А.Н., Фомичев Ю.К. Введение в биотехнологию: Курс лекций. – Минск.: БГУ, 2002. - 105 с.
81. Сазыкин Ю.О., Орехов С.Н., Чакалева И.И. Биотехнология: Учебное пособие. – М.: Изд. Центр «Академия». – 2006. – 256 с.

82. Орехов С.Н. Фармацевтическая биотехнология. Руководство к практическим занятиям. – Учебное пособие. – Под ред. акад. РАМН В.А. Быкова, проф. А.В Катлинского. – М. : ГЭОТАР-Медиа 2009. – 384 с.
83. Елинов Н.П. Химическая микробиология. - Учебник. - М.: Высшая школа. - 1989, 448 с
84. Воробьева Л.И. Промышленная микробиология. - Учебное пособие. - М.: Изд-во МГУ. - 1989, 294 с.
85. Биотехнология. Принципы и применение. Пер. с англ. / Под ред. И. Хиггинса, Д. Беста, Дж. Джонса. - М.: Мир. - 1988, 480 с.
86. Чуешов В.И., Зайцев А.И., Шебанова С.Г. Промышленная технология лекарств. Том 2. Харьков, 2002.
87. Биотехнология микробного синтеза (Под ред. Бекера М.Е.) – Рига – 1980.
88. Биотехнология. (Отв. редактор А.А. Баев). - М.: Наука. - 1984, 310 с.
89. Перт С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов. М., - 1979 г.
90. Промышленная микробиология (Под ред. Егорова Н.С.) – М., 1989 г.
91. Процессы и аппараты химической технологии (Под ред. П.Г. Романкова). – Л. – 1981.
- дополнительная:**
37. Березов Т.Т. , Коровкина Б.Ф. – Биологическая химия (Под ред. И.М. Ивановой) – М., Медицина – 1981 г.
38. Никитин Г.А. – Биохимические основы микробиологических производств – Киев, 1981.
39. Бриттон Г. – Биохимия природных пигментов. М., Мир – 1986 г.
40. Попова Т.В. – Развитие биотехнологии в СССР – М., Наука - 1988 г.
41. Популяционные аспекты биотехнологии – Печуркин Н.С., Брильков А.В., Маркенкова Т.В. – Новосибирск: - Наука – 1990 г.
42. Специальные журналы: «Биотехнология», «Фармация Казахстана», «Фармацевтический бюллетень» и др.

VI.Бақылау сұрақтары (кері байланыс):

23. Ашыту процестерінің шарттары мен негізгі параметрлері?
24. Ашыту процесін сипаттайтын негізгі көрсеткіштер қандай?
25. Өсіру әдістері?

Лекция № 13

I. Тема: Масштабирование биотехнологических процессов. Принципиальная технологическая схема биотехнологического производства целевых продуктов.

II. Цель: Ознакомить студентов с принципамимасштабирования и этапами биотехнологических процессов, принципиальной технологической схемой биотехнологического производства целевых продуктов.

III. Тезисы лекции:

Основные этапы биотехнологического процесса

Общая характеристика

Процесс биотехнологического производства фармацевтических препаратов состоит из определенного количества составляющих (рис.9) и имеет разную степень сложности. Его сложность обусловлена слагаемыми конкретного биотехнологического процесса, которые варьируют в зависимости от продуцента – биообъекта (микроорганизма, растения, млекопитающего и др.), и зависит от целевого конечного продукта. Если целевым продуктом является биомасса (например, живые клетки молочнокислых бактерий), то технологическая линия короче; если это субстрат для производства высокоочищенных инъекционных препаратов, то схема производства сложнее

(технологическая линия длиннее).



Рис. 9. Общая схема биотехнологического производства

Если же

Источником целевого продукта является микроорганизм (например, при производстве антибиотиков), то для его культивирования обязательны асептические условия, соответствующие оборудованию и специальная подготовка к проведению процесса.

Свои особенности имеет биотехнологическое производство, основанное на использовании микроорганизмов-рекомбинантов, которое требует усиленного контроля за стабильностью продуцента, и, кроме того, тщательного и постоянного соблюдения мер, предотвращающих возможность попадания этого биообъекта в окружающую среду. Такие меры предусматривают использование специального оборудования и соблюдения определенных правил, относящихся непосредственно к технологическому режиму.

Общая (принципиальная) технологическая схема получения продуктов микробиологического синтеза состоит из ряда основных (ОТС) и вспомогательных технологических стадий (ВТС):

- ВТС – 1. Подготовка культуральной среды: составление композиции питательных веществ (витаминов, микроэлементов, углерода, азота, солей и др.) и стерилизация.
- ВТС – 2. Подготовка посевного материала (осуществляется в инокуляторе).
- ОТС – 1. Культивирование (ферментация) биообъекта-продуцента.
- ОТС – 2. Отделение биомассы от культуральной жидкости (осуществляется фильтрованием, центрифугированием, сепарированием).

Если целевой продукт содержится, в основном, в биомассе, то в дальнейшем идет переработка биомассы (1-й путь). Обычно в биомассе содержатся липиды, фосфолипиды, некоторые витамины, белки и др. Тогда в культуральной жидкости целевой продукт содержится в незначительных количествах и его выделение становится нерентабельным.

Если биосинтезируемый целевой продукт секретирует (переходит) из клеток во время ферментации, в основном, в культуральную жидкость (биосинтез внеклеточных продуктов), то в дальнейшем идет именно ее переработка (2-й путь). Обычно в культуральную жидкость из клеток выделяются антибиотики, ферменты и др. Тогда в биомассе содержание целевого продукта незначительное и проведение работ по его выделению становится нерентабельным.

1-й путь. Обработка биомассы:

- ОТС – 3. Разрушение клеток микроорганизмов для выделения внутриклеточных целевых продуктов с их одновременным экстрагированием, то есть разрушение клеточных

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA АКАДЕМИАСЫ «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11	
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144	

стенки идет в среде экстрагента. Осуществляется следующими способами:

- а) дезинтеграция (механическая, ультразвуковая);
- б) ферментативный лизис;
- в) химический лизис.

ОТС – 4. Отделение экстракта (центрифугирование, сепарирование, мембранная фильтрация).

ОТС – 5. Выделение и очистка целевого продукта из экстракта с помощью различных методов (этерификация, высаливание, чаще хроматографические методы: колоночная адсорбция и др.)

ОТС – 6. Стандартизация целевого продукта.

ОТС – 7. Приготовление лекарственной формы (таблеток, инъекционных растворов в ампулах, стерильных порошков во флаконах и др.).

2-й путь. Обработка культуральной жидкости:

ОТС – 3. Концентрирование целевых продуктов в культуральной жидкости (ультрафильтрация, ионообменная хроматография, диализ).

ОТС – 5. Выделение и очистка целевого продукта из экстракта с помощью различных способов (этерификация, высаливание, чаще хроматографические методы: колоночная, тонкослойная, ионообменная адсорбция и др.).

ОТС – 6. Стандартизация целевого продукта.

ОТС – 7. Приготовление лекарственной формы (таблеток, инъекционных растворов и др.).

На стадии ОТС – 4 (1-й путь) либо на стадии ОТС – 3 (2-й путь) для отделения раствора целевого продукта широко применяется мембранная фильтрация (или ультрафильтрация).

Важную роль при очистке и выделении целевых продуктов играют хроматографические методы. При этом применяют:

- а) гель-фильтрацию или эксклюзивную хроматографию;
- б) ионообменную хроматографию;
- в) обращенно-фазовую или гидрофобную хроматографию;
- г) аффинную или лигандную хроматографию (наиболее перспективные методы).

Процессы и аппараты периодического и непрерывного культивирования

Несколько подробнее об особенностях вышеуказанных процессов. Периодическое культивирование включает:

- а) стерилизацию сред и всего оборудования;
- б) загрузку биореактора питательной средой;
- в) внесение посевного материала (клеток или спор);
- г) выращивание культуры (это может совпадать во времени с последующим этапом или предшествовать ему);
- д) синтез целевого продукта; е) отделение и очистку готового продукта.

Все этапы представлены во временном аспекте; после окончания последнего этапа производится мойка биореактора и подготовка его к новому циклу.

Приготовление посевного материала

Штаммы микроорганизмов для производства биологических препаратов поступают в ампулах, где они законсервированы в виде чистых культур. Каждая культура имеет паспорт с описанием питательных сред, морфологических, физиологических и других характеристик, условий для их поддержания, выращивания и срока хранения. Режим хранения культур предполагает охлаждение, замораживание или обезвоживание; во всех случаях должен быть резко сокращён или полностью прекращён клеточный обмен веществ. Культуры штаммов хранят:

- на косом агаре при температуре минус 1-5⁰С;
- замороженными при температуре ниже – 20⁰С (недопустимо повторное оттаивание и замораживание);

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA АКАДЕМИАСЫ «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144

- лиофилизированными в ампулах, хранящимися в течение нескольких лет.

Большинство культур клеток млекопитающих, в том числе и клеток человека, удается сохранить неопределенно долгое время замороженными в специальной среде при температуре- 180⁰С.

Через определённое время, специфическое для каждого вида микроорганизмов и вида хранения, культуру пересеивают.

Перед началом технологического процесса культуру размножают в стерильных условиях при оптимальном составе питательной среды и режиме выращивания, длительность стадии выращивания -24 ч.

Многоэтапное выращивание посевного материала – обязательный принцип биотехнологического производства. Среда для выращивания посевного материала обычно не совпадает по составу с ферментационной средой, т.е. при выращивании посевного материала среда может быть обогащена для быстрого роста биомассы.

IV. Иллюстративный материал: прилагается

V. Литература:

основная:

92. Егорова Т.А., Клунова С.М., Живухина Е.А. Основы биотехнологии. – М.: Изд. центр «Академия», - 2008. – 208 с.
93. Евтушенко А.Н., Фомичев Ю.К. Введение в биотехнологию: Курс лекций. – Минск.: БГУ, 2002. - 105 с.
94. Сазыкин Ю.О., Орехов С.Н., Чакалева И.И. Биотехнология: Учебное пособие. – М.: Изд. Центр «Академия». – 2006. – 256 с.
95. Орехов С.Н. Фармацевтическая биотехнология. Руководство к практическим занятиям. – Учебное пособие. – Под ред. акад. РАМН В.А. Быкова, проф. А.В Катлинского. – М. : ГЭОТАР-Медиа 2009. – 384 с.
96. Елинов Н.П. Химическая микробиология. - Учебник. - М.: Высшая школа. - 1989, 448 с
97. Воробьева Л.И. Промышленная микробиология. - Учебное пособие. - М.: Изд-во МГУ. - 1989, 294 с.
98. Биотехнология. Принципы и применение. Пер. с англ. / Под ред. И. Хиггинса, Д. Беста, Дж. Джонса. - М.: Мир. - 1988, 480 с.
99. Чуешов В.И., Зайцев А.И., Шебанова С.Г. Промышленная технология лекарств. Том 2. Харьков, 2002.
100. Биотехнология микробного синтеза (Под ред. Бекера М.Е.) – Рига – 1980.
101. Биотехнология. (Отв. редактор А.А. Баев). - М.: Наука. - 1984, 310 с.
102. Перт С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов. М., - 1979 г.
103. Промышленная микробиология (Под ред. Егорова Н.С.) – М., 1989 г.
104. Процессы и аппараты химической технологии (Под ред. П.Г. Романкова). – Л. – 1981.

дополнительная:

43. Березов Т.Т. , Коровкина Б.Ф. – Биологическая химия (Под ред. И.М. Ивановой) – М., Медицина – 1981 г.
44. Никитин Г.А. – Биохимические основы микробиологических производств – Киев, 1981.
45. Бриттон Г. – Биохимия природных пигментов. М., Мир – 1986 г.
46. Попова Т.В. – Развитие биотехнологии в СССР – М., Наука - 1988 г.
47. Популяционные аспекты биотехнологии – Печуркин Н.С., Брильков А.В., Маркенкова Т.В. – Новосибирск: - Наука – 1990 г.
48. Специальные журналы: «Биотехнология», «Фармация Казахстана», «Фармацевтический бюллетень» и др.

VI. Контрольные вопросы (обратная связь):

23. Общая характеристика биотехнологического производства.
24. Как получается целевой продукт из культуральной жидкости?
25. Как готовится посевной материал?

Лекция № 14-15

I. Тема: Асептика в биотехнологическом производстве. Очистка и стерилизация технологического воздуха, применяемые фильтры. Стерилизация и герметизация оборудования. Условия проведения биотехнологических процессов.

II. Цель: Ознакомить студентов с очисткой и стерилизацией технологического воздуха, устройством применяемых фильтров и условиями проведения биотехнологических процессов.

III. Тезисы лекции:

Стерилизация технологического воздуха.

Технологический воздух – это воздух, проходящий через ферментер. Через ферментер с объемом 50м³ (кубических метров за час) пропускается 30000 м³/час (кубических метров за час) воздуха. Обычный воздух содержит в 1 м³ (метр кубический) от 1 тысячи до 100 тысяч клеток микроорганизмов. Воздух стерилизуют только **фильтрацией**, пропуская его через систему фильтров, другие способы (УФ, термические) не подходят, так как нужно стерилизовать очень большие объемы воздуха.

Технологическая схема получения стерильного воздуха:

Воздух с улицы поступает на → Фильтр предварительной очистки от пыли и влаги, затем поступает на → Компрессор (происходит сжатие воздуха, при этом воздух нагревается), затем - на → Холодильник (для охлаждения воздуха, поступившего от компрессора, затем) → Воздух под давлением проходит через головной фильтр и подается на → Индивидуальный фильтр (у каждого ферментера).

Индивидуальные фильтры не должны пропускать более 0,25 микрона (мкм) микроорганизмов. Размеры микроорганизмов. - кокки составляют 0,5-1,5 мкм, кишечные палочки – 0,4- 0,8 мкм. Существует коэффициент проскока, поэтому фильтры 100% стерилизацию дают не всегда. Фильтры стерилизуются острым паром при 120° С 30 мин.

Стерилизация и герметизация оборудования.

Ферментер и все трубопроводы стерилизуют насыщенным паром при 130° С 1 час. Для проверки эффективности стерилизации проводят пробную стерилизацию с использованием биологического теста.

Стерилизация питательных сред

Водопроводная вода содержит до 100 микробных клеток в 1 миллилитре. Компоненты питательной среды – источники углерода, азота, содержат в 1 грамме муки от 10000 до 1 миллиардов клеток микроорганизмов.

Питательную среду стерилизуют термическим нагреванием, но при этом могут инактивироваться термолабильные соединения, витамины и др. Поэтому для каждой среды имеются свои условия стерилизации. Стерилизация – процесс вероятностный.

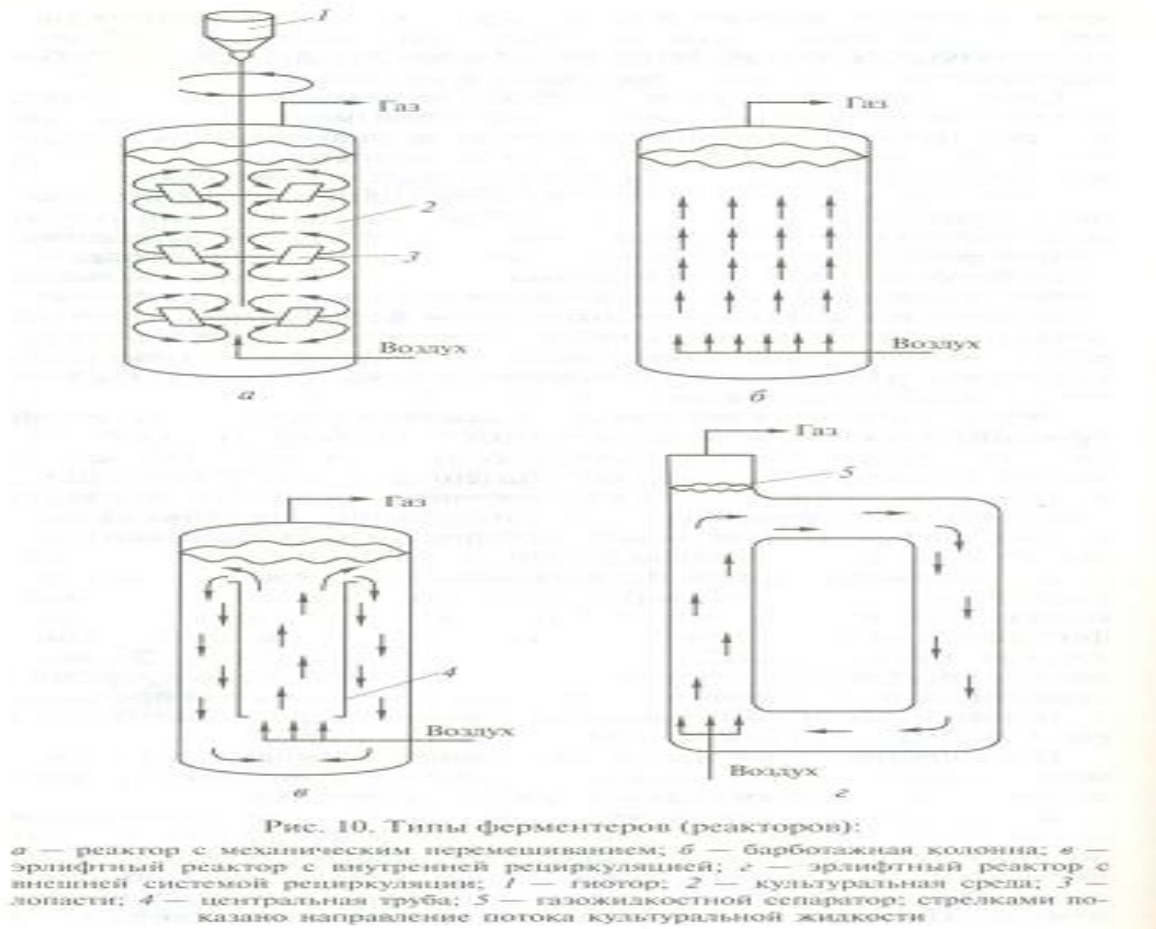
В современном биотехнологическом производстве наиболее частым биообъектом – продуцентом целевого продукта является штамм микроорганизма, выращиваемый в специальных ферментационных аппаратах (ферментерах или ферментаторах) разных типов (рис. 10). Ферментер снабжен приспособлениями (так называемой «обвязкой»), позволяющими создавать оптимальные условия для роста биообъекта и биосинтеза целевого продукта (не всегда эти условия совпадают). Поэтому основным требованием любой

ферментации является стерильность питательной среды, используемого оборудования, приборов и коммуникаций для предотвращения микробного загрязнения основного биообъекта-продукента.

Ферментационные аппараты, используемые фармацевтической промышленностью, в основном изготавливаются из коррозионно-стойкой стали. Их объем варьирует от десяти до ста кубических метров. Обычно ферментер, установленный в цехе ферментации, выглядит как вертикально расположенный цилиндр с полукруглым дном, в котором имеется приспособление для слива культуральной жидкости. В верхней части ферментера имеется полукруглая крышка с рядом входных устройств (вводов): для питательной среды, посевного материала, пропускаемого через специальное устройство воздуха (аэрация) и выходного устройства для вывода воздуха, прошедшего через толщу питательной среды. В центре ферментера по его вертикальной оси находится мешалка (однорусная, многорусная), обеспечивающая массообмен. Во внутреннем пространстве ферментера находятся «отбойники», предотвращающие возникновение «застойных» (мертвых) зон при работе мешалки. Этим обеспечивается равномерность концентрации растворимых веществ и коллоидных частиц в среде.

Постоянство оптимальной для процесса температуры в ферментере обычно поддерживается его наружной «рубашкой», через которую пропускается вода с заданной температурой.

Важнейшим условием успешного осуществления ферментации является соблюдение стерильности процесса. В реальных условиях добиться стерильности непросто. Этому мешают большой объем ферментера и сложность состава среды, а также большой объем пропускаемого через него воздуха и сложность конструкции ферментера.



Попадание в культурную среду и размножение в ней разных микроорганизмов во время ферментации приводят к изменению ее состава, pH и реологических свойств, что, в конечном счете, ведет к снижению выхода целевого продукта. Также в нем могут присутствовать в виде примесей (или микропримесей) новые соединения, образовавшиеся в результате жизнедеятельности посторонней микрофлоры.

Нестерильные ферментации недопустимы. Ввиду этого перед проведением каждого ферментационного цикла проводится стерилизация:

- всех внутренних поверхностей ферментера и входящих в него трубопроводов;
- пропускаемого через ферментер воздуха (так называемого «технологического воздуха», подаваемого в ферментер под давлением);
- питательных сред.

Как правило, ферментер заполняется питательной средой только на две трети своей емкости. Вносимый в ферментер посевной материал должен быть представлен чистой культурой биообъекта (не зараженной другими микроорганизмами).

Следует иметь в виду, что при нарушении стерильности в одном месте контаминируется вся система, и содержимое ферментера, по жаргонному выражению производителей, «сливается в трап», т.е. выбрасывается. Сложность ситуации заключается и в том, что для обнаружения заражения воды, воздуха и компонентов питательных сред микробиологическим путем необходимо от 24 ч до нескольких суток, чтобы содержание (число) посторонних клеток в 1 мл увеличилось до тысячи – видимого в микробиологическом мазке их количества.

Подготовка и стерилизация технологического воздуха

Эта подготовительная операция требуется для обеспечения дыхания микроорганизмов – биообъектов, большинство которых является аэробами. Использовать для аэрации кислород можно,

но экономически и по технике безопасности это целесообразно. Поэтому используется воздух, который под давлением поступает в ферментер непосредственно с территории предприятия.

Какое же количество воздуха нужно для обеспечения одной ферментации в промышленном масштабе? Приведем такой пример: в ферментер объемом 50 м³ ежчасно подается порядка 3000м³ стерильного воздуха, а время ферментации измеряется сутками.

Для очистки и стерилизации воздуха его многократно фильтруют (рис. 11).

На первом этапе пригодного для пропускания через ферментер («технологического») воздуха его очищают от пыли в фильтре предварительной очистки, а затем подают последовательно в компрессор с системой холодильников, фильтр грубой очистки, систему стерилизации (головной фильтр, фильтры тонкой очистки).



Рис. 11. Схема очистки технологического воздуха (стрелками показано направление потока воздуха):

a — за пределами цеха ферментации; *б* — в цехе ферментации

Таким образом, воздух подвергается не менее чем трехкратной фильтрации и, как минимум, дважды пропускается через стерилизующие фильтры. При этом, если головной фильтр является общим для всех аппаратов в цехе или вне цеха ферментации, то каждый из фильтров тонкой очистки относится к конкретному аппарату.

На стадии грубой очистки (головной фильтр) используются волокнистые фильтрующие материалы с волокнами диаметром от 15 до 50 мкм из стекла и базальта и грубозернистые и пористые перегородки: Эффективность очистки на этой стадии достигает 98%.

На стадии тонкой очистки (индивидуальные фильтры) применяются тонковолокнистые материалы (картон и бумага) с волокнами диаметром 0,5 мкм; зернистые жесткие фильтрующие перегородки – керамические и металлокерамические, из разных полимеров. Используются даже мембранные фильтры.

При выборе фильтрующих материалов учитывают размер бактериальной клетки (например, для кокковых форм диаметр волокна 1 мкм, а для широко распространенной бактерии, как кишечная палочка, - 2 мкм). Естественно возникает вопрос о защите находящихся в ферментере биообъектов – бактерий, актиномицетов, грибов от фагов. Это трудная задача, которая решается прежде всего получением фагоустойчивых штаммов биообъекта.

Постоянное использование фильтров, стерилизующих технологический воздух, требует также периодической стерилизации самих фильтров, так как задержанные фильтром микроорганизмы могут при благоприятных условиях размножаться. Слои фильтрующего материала будут при этом прорастать, микроорганизм появляется на «чистой стороне» фильтра и затем с потоком воздуха, проходящего через фильтр, распространяется по воздуховодам и внутренней поверхности ферментера.

Стерилизация фильтров может быть проведена обработкой антисептиками, ионизирующим облучением и, наконец, горячим паром. Последний метод наиболее надежен и экономичен. При выборе режима стерилизации, с одной стороны, обязательно уничтожить все микробные клетки и все споры, а с другой стороны, желательна сохранить свойства фильтрующего материала с тем, чтобы продлить срок службы фильтров. Температура при обработке паром 120-125 °С, время обработки 20-30 мин.

Герметизация и стерилизация оборудования

Асептические условия производства требуют стерилизации перед началом процесса всей аппаратуры (изнутри) и всех материальных потоков. Этого, однако, недостаточно. Стерильность должна быть сохранена в течение всего рабочего цикла. Иными словами, технологический процесс должен быть защищен от контаминации за счет обеспечения герметичности всех соединений в аппаратуре.

В монтажной схеме любого ферментера имеется несколько десятков разного рода герметизирующих элементов. Наиболее распространенные из них – фланцевые соединения и запорная арматура уязвимы в отношении герметичности при монтаже с обвязкой ферментера.

В системах, работающих в асептических условиях, должна быть обеспечена возможность стерилизации всех точек внутренних объектов аппаратов и коммуникаций. Для этого перед загрузкой ферментеров через них пропускают насыщенный водяной пар под давлением. Однако здесь существуют свои сложности. Это касается, например, открытых трубных окончаний – участков труб, одним концом соединенных полостью ферментера, а другим соприкасающихся с атмосферой. К ним относятся узел отвода отработанного, т.е. прошедшего через ферментер, воздуха и узлы отбора проб.

Повышенное давление в открытом трубном окончании создать невозможно, следовательно, и температура там будет не выше 100°С. Из-за этого приходится увеличивать продолжительность обработки. Обычно в трубе делают вырезку, и во время работы пар непрерывно подается в открытое трубное окончание. В случае так называемых «тупиковых полостей» трудно обеспечить вытеснение воздуха и циркуляцию пара. Обычно в трубопровод врезают два вентиля, между которыми – подвод пара и отвод образующегося конденсата.

Промышленные ферментеры большого объема стерилизуют в течение часа при 125-130 °С.

Стерилизация питательных сред

Используемые в промышленности среды (как правило, жидкие комплексные, реже синтетические) стерилизуются тепловым методом (насыщенным паром).

Устойчивость микроорганизмов к тепловому воздействию определяется многими факторами, в частности видовой принадлежностью микроорганизма. Учитывается, что споры гораздо устойчивее к нагреванию, чем негативные клетки. На эффективность тепловой стерилизации влияет количество клеток в среде: чем их меньше, тем легче достигается стерилизующий эффект. Из этого следует, что перед стерилизацией необходимо понижать количество микробных клеток в среде.

Определяющее значение при тепловой стерилизации имеют температура и время ее поддержания. Чем выше температура, тем быстрее достигается стерилизующий эффект. Для оценки эффективности процесса стерилизации используют физические (по температуре и давлению пара), химические (по температуре плавления или изменению цвета), микробиологические (с высевом на стандартные среды), биоиндикаторные (с использованием *Bacillusstearothermophilus*) методы.

При тепловой стерилизации помимо гибели контаминирующих микроорганизмов могут разрушаться термолабильные вещества среды: витамины ферменты, некоторые аминокислоты. С этим явлением, ухудшающим качество питательных сред, борются, повышая температуру и уменьшая время стерилизации.

Тепловая стерилизация жидкостей выполняется двумя способами: периодическим и непрерывным. При периодическом способе стерилизация происходит в самом ферментере. Одновременно нагревается весь объем жидкости (среды) до температуры стерилизации, которая выдерживается определенное время, после чего понижается до заданной. Этот способ прост и

применяется в случае небольших аппаратов. Его недостатки: значительный градиент температуры по объему и «недостерилизация» в тупиках. При непрерывном способе (более прогрессивном и производительном) стерилизация осуществляется в специальных установках.

В результате температуру можно увеличить до 130-150 °С; при этом время стерилизации уменьшается до 3-10 мин, что положительно сказывается на качестве среды.

Недостатком в данном случае является увеличение протяженности трубопроводов, что повышает вероятность вторичной контаминации.

Для стерилизации биореакторов применяют пар под давлением. Внутри биореактора не должно быть «мертвых зон», недоступных для пара во время стерилизации. Стерилизации подлежат все клапаны, датчики, входные и выходные отверстия.

Стерильность обеспечивается и герметизацией биотехнологического оборудования, работающего в асептических условиях. Стерильная передача жидкости осуществляется через штуцеры парового затвора. Технологическая обвязка биореактора исключает контаминацию культуральной жидкости посторонней микрофлорой и возможности попадания продуктов биосинтеза в окружающую среду. Основные агенты, контаминирующие клеточные культуры – бактерии, дрожжи, грибы, простейшие, микоплазмы, вирусы. Источники контаминации – воздух, пыль, питательные среды, рабочие растворы, оборудование, рабочий персонал.

Очистка воздуха от микроорганизмов и аэрозольных частиц осуществляется через фильтры предварительной очистки (комбинированные глубинные фильтры – бумага, картон, тканевые материалы), которые устанавливаются на всасывающей линии перед компрессором (воздух очищается от частиц размером более 5мкм) и фильтры тонкой очистки (ткань ФП, удаляющая частицы размером до 0,3 мкм, металлокерамические и мембранные фильтры).

Металлокерамические фильтры изготовлены из калиброванных металлических порошков (бронзы, никеля, нержавеющей стали, титана) способами спекания, прессования, прокаты; размер опр варьирует от 2 до 100 мкм. Металлокерамические фильтры стерилизуют при температуре **150 С** 50 мин. Они стойки к действию сильных кислот, щелочей, окислителей, спиртов, могут использоваться при температуре от **-250 С до +200 С**.

Преимущество металлокерамических фильтрующих элементов – простота регенерации, большой срок работы (5-10 лет). В отличие от волокнистых, нетканых и фторопластовых фильтров, зернистые металлокерамические материалы имеют неизменную структуру, химически инертны, поддаются любым методам стерилизации, отличаются высокой механической прочностью, просты в изготовлении.

Мембранные фильтры патронного и кассетного типа несмотря на менее значительный срок службы (1 год) обладают высокой эффективностью, быстрой съемностью, надежны в работе. Отмечена способность рядом фильтрующих материалов, заряженных отрицательно, задерживать живые клетки, бактерии, вирусы, эритроциты, лимфоциты и тромбоциты. Частицы, размер которых меньше величины пор фильтрующего материала, остаются на фильтре, если дзета-потенциал (электрический потенциал) частиц и стенок пор фильтра имеет противоположные заряды. Это явление наблюдается при использовании в качестве фильтрующих элементов мембран с соответствующими электростатическими свойствами. Выбор фильтрующего материала зависит от объекта фильтрации и дзета-потенциала суспендированных частиц.

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA АКАДЕМИАСЫ «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144

Отработанный воздух, отводимый из лабораторных и производственных помещений, контролируется на чистоту (отсутствие микроорганизмов).

Для обслуживания установок глубинного культивирования применяют *автоматизированную модульную систему*, включающую:

- очистка и стерилизация воздуха и пара с использованием металлокерамических и титановых фильтрующих элементов;
- модули технологической обвязки, содержащие автономную систему термостатирования, запорную и регулируемую арматуру, индивидуальные входные фильтры, электропневмообразователи и другие регулирующие устройства;
- блок автоматического контроля и управления, содержащий программное устройство, преобразователи сигналов от измерительных электродов, газоанализаторы для измерения **O**, **CO**, **eH**, температуры **pCO**, **pO**;
- системы цифровой и диаграммной индикации текущих параметров культивирования.

Установка глубинного культивирования снабжены блоками дистанционного измерения давления в биореакторе и его рубашке, блоками дистанционного контроля интенсивности аэрации воздухом или газовой смесью (кислорода и азота, кислорода и углекислого газа, воздуха и углекислого газа, азота и углекислого газа).

Блок автоматического управления позволяет контролировать и поддерживать на заданном уровне программную стерилизацию биореактора и арматуры, скорость вращения мешалки дистанционный контроль открытия или закрытия вентилей и регулирующих клапанов.

Ряд стран специализируется на выпуске широкого ассортимента оборудования для культивирования различного назначения (фирма NBS – США; Полиферм, биотек – Швеция; Марубиши – Япония; ЛН – Ферментейшн – Великобритания; Браун – Германия; БИОР-0,1, БИОР-0,2 – Россия, институт биологического приобритения с опытом заводов АН РФ).

IV. Иллюстративный материал: прилагается

V. Литература:

основная:

- 105.Егорова Т.А., Клунова С.М., Живухина Е.А. Основы биотехнологии. – М.: Изд. центр «Академия», - 2008. – 208 с.
- 106.Евтушенков А.Н., Фомичев Ю.К. Введение в биотехнологию: Курс лекций. – Минск.: БГУ, 2002. - 105 с.
- 107.Сазыкин Ю.О., Орехов С.Н., Чакалева И.И. Биотехнология: Учебное пособие. – М.: Изд. Центр «Академия». – 2006. – 256 с.
- 108.Орехов С.Н. Фармацевтическая биотехнология. Руководство к практическим занятиям. – Учебное пособие. – Под ред. акад. РАМН В.А. Быкова, проф. А.В Катлинского. – М.: ГЭОТАР-Медиа 2009. – 384 с.
- 109.Елинов Н.П. Химическая микробиология. - Учебник. - М.: Высшая школа. - 1989, 448 с
- 110.Воробьева Л.И. Промышленная микробиология. - Учебное пособие. - М.: Изд-во МГУ. - 1989, 294 с.
- 111.Биотехнология. Принципы и применение. Пер. с англ. / Под ред. И. Хиггинса, Д. Беста, Дж. Джонса. - М.: Мир. - 1988, 480 с.
- 112.Чуешов В.И., Зайцев А.И., Шебанова С.Г. Промышленная технология лекарств. Том 2. Харьков, 2002.
- 113.Биотехнология микробного синтеза (Под ред. Бекера М.Е.) – Рига – 1980.
- 114.Биотехнология. (Отв. редактор А.А. Баев). - М.: Наука. - 1984, 310 с.
- 115.Перт С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов. М., - 1979 г.
- 116.Промышленная микробиология (Под ред. Егорова Н.С.) – М., 1989 г.

117. Процессы и аппараты химической технологии (Под ред. П.Г. Романкова). – Л. – 1981.

дополнительная:

49. Березов Т.Т., Коровкина Б.Ф. – Биологическая химия (Под ред. И.М. Ивановой) – М., Медицина – 1981 г.
50. Никитин Г.А. – Биохимические основы микробиологических производств – Киев, 1981.
51. Бриттон Г. – Биохимия природных пигментов. М., Мир – 1986 г.
52. Попова Т.В. – Развитие биотехнологии в СССР – М., Наука - 1988 г.
53. Популяционные аспекты биотехнологии – Печуркин Н.С., Брильков А.В., Маркенкова Т.В. – Новосибирск: - Наука – 1990 г.
54. Специальные журналы: «Биотехнология», «Фармация Казахстана», «Фармацевтический бюллетень» и др.

VI. Контрольные вопросы (обратная связь):

26. Назовите основные требования любой ферментации в биотехнологическом производстве?
27. Как обеспечивается герметизация и стерилизация оборудования?
28. Как обеспечивается стерилизация биореакторов?
29. Как происходит метод стерилизации питательных сред?

Лекция № 16-17

I. Тема: Ферментационное оборудование. Биореакторы (инокуляторы, ферментаторы и др.) и общие принципы аппаратного оформления процессов культивирования биообъектов.

Способы обеспечения аэрации и перемешивания при культивировании продуцентов. Проведение ферментационного процесса для продуцентов-анаэробов.

II. Цель: Ознакомить студентов с ферментационным оборудованием, видами биореакторов, общими принципами аппаратного оформления процессов культивирования биообъектов.

III. Тезисы лекции:

Высокая производительность биотехнологических способов производства целевых продуктов с заданными свойствами обусловлена способностью микроорганизмов, культуры тканей или клеток к интенсивному размножению, т.е. быстрому наращиванию биомассы. В результате этого происходит накопление целевых продуктов в биомассе или в культуральной жидкости.

По способу проведения глубинное культивирование различают:

- В периодическом режиме.
- Непрерывно в проточном режиме.

Глубинное культивирование проводят в аппаратах, называемых ферментаторами или ферментерами.

Ферментеры, используемые в периодическом режиме, делятся на:

- Барботажные;
- Эрлифтные (англ. – air – воздух, lift - поднимать).
- Барботажно-эрлифтные;
- С механическим перемешиванием;
- Барботажные с циркуляционным перемешиванием;
- С эжекционной системой и др.

При проведении глубинного культивирования непрерывно в проточном режиме используемые ферментеры по принципу действия делятся на:

- а) Хемостаты;
- б) Турбидостаты.

Для каждого биотехнологического процесса должна быть разработана подходящая схема, а сам процесс должен постоянно наблюдаться и тщательно контролироваться. Для большинства практических биотехнологических процессов такими системами являются ферменторы или биореакторы, которые обеспечивают необходимые физические условия, способствующие наилучшему взаимодействию катализатора со средой и поставляемым материалом. Биореакторы варьируют от простых сосудов до весьма сложных систем с различным уровнем компьютерного оснащения.

Биореакторы изготавливаются в двух вариантах или типах. Первый тип для нестерильных систем, когда нет абсолютной необходимости оперировать с чистыми культурами микроорганизмов (например, ферментация при пивоварении, производство пекарских дрожжей и т. п.).

Биореакторы второго типа предназначены для асептических процессов, обычно используемых в производстве таких соединений как, антибиотики, аминокислоты, полисахариды и одноклеточный бактериальный белок. В реакторах такого типа все посторонние микроорганизмы должны быть исключены, что, естественно, связано со значительными сложностями при их конструировании и разработке самого биотехнологического процесса.

Основное требование к биореакторам любого типа сводится к обеспечению оптимальных условий роста продуцента или накоплению синтезируемого им продукта. Для достижения указанных целей необходимо разрабатывать технологию, призванную оптимизировать процесс, а именно: использовать подходящий источник энергии, набор питательных веществ должен соответствовать питательным потребностям организма-продуцента, из ростовой среды должны быть удалены соединения, ингибирующие его жизнедеятельность, должна быть подобрана соответствующая посевная доза и, наконец, обеспечены все остальные требуемые физико-химические условия. Экономически рентабельные процессы в своей основе весьма сходны, независимо от избранного продуцента, используемой среды и образуемого продукта.

Главная задача – получение максимального количества клеток с одинаковыми свойствами при их выращивании в определенных тщательно контролируемых условиях. Фактически один и тот же биореактор (лишь с небольшими изменениями) может быть использован для производства ферментов, антибиотиков, органических кислот или одноклеточного белка.

Другим существенным различием между биотехнологическими и химическими процессами является необходимость создания аэробных или анаэробных условий, требуемых для культивирования соответствующего организма. Поэтому в определенных случаях необходимо подавать кислород и удалять образующиеся газообразные продукты иного рода, в первую очередь двуокись углерода (CO₂).

Системы **аэрации** зачастую бывают очень сложной конструкции, поскольку они должны обеспечить баланс между расходом O₂ и его поступлением в нужных количествах, учитывая тот факт, что потребность в кислороде не одинакова на различных стадиях культивирования.

Крайне важным является обеспечение должного уровня **теплообмена** в биореакторах, поскольку жизнедеятельность и метаболическая активность объектов зависит в значительной степени от колебаний температуры. Поддержание температуры в определенном узком диапазоне диктуется:

- 1) резким снижением активности ферментов по мере падения температуры и
- 2) необратимой инактивацией (денатурацией) макромолекул (в первую очередь белков) при ее повышении до критических значений.

Температурный оптимум у каждого организма лежит в определенных пределах. Большинство биотехнологических процессов осуществляется в мезофильных условиях (30–50 °C). С одной стороны, это имеет преимущество, потому что лишь в редких случаях

приходится обеспечивать повышенный подогрев реакторов. Однако, с другой стороны, возникает проблема удаления избыточного тепла, выделяющегося при интенсивном росте культивируемых клеток, поэтому биореактор должен быть оснащен эффективной системой охлаждения. Еще одной серьезной проблемой при культивировании в биореакторах является **пенообразование**, связанное с необходимостью аэрирования содержимого, в котором постоянно присутствуют поверхностно-активные вещества (ПАВ) продукты распада жиров (мыла) и белки (составные компоненты субстрата например, белки соевой и кукурузной муки и т. п.). Образующийся слой пены опять же, с одной стороны, способствует росту аэробных микроорганизмов, а с другой – сокращает полезный объем реактора и способствует заражению культуры посторонней микрофлорой. Это заставляет интенсивно разрабатывать эффективные системы пеногашения.

Специфическим элементом биореактора является система, обеспечивающая **стерильность** процесса. Стерилизация осуществляется на разных этапах процесса, как до его начала, так и при осуществлении и после окончания. Иными словами, в биотехнологическом производстве важное место отводится принципу асептики, выдвинутому еще в 60-е годы XIX в. Луи Пастером.

В последнее время в биотехнологию внедряется принцип дифференцирования режимов культивирования: разные этапы одного и того же процесса осуществляются при различных условиях – температура, рН, аэрация и т. п. Естественно, это создает новые (дополнительные) требования при конструировании реакторов. Таким образом, в соответствии с основными принципами реализации биотехнологических процессов современные биореакторы должны обладать следующими системами:

- эффективного перемешивания и гомогенизации среды выращивания;
- обеспечения свободной и быстрой диффузии газообразных компонентов системы (аэрирование в первую очередь);
- теплообмена, обеспечивающего поддержание оптимальной температуры внутри реактора и ее контролируемые изменения;
- пеногашения;
- стерилизации сред, воздуха и самой аппаратуры;
- контроля и регулировки процесса и его отдельных этапов.

Биотехнологически ценные продукты синтезируются как в экспоненциальной фазе (нуклеотиды, многие ферменты, витамины – так называемые первичные метаболиты), так и в стационарной фазе роста (антибиотики, пигменты и т. п. так называемые вторичные метаболиты).

Довольно широко в биотехнологии используется периодическое культивирование с подпиткой, при котором, помимо первичного внесения питательного субстрата до засева культуры, в процессе культивирования в аппарат через определенные интервалы добавляют питательные вещества либо порциями, либо непрерывно "по каплям".

Существует также отъемно-доливочное культивирование, когда часть содержимого биореактора периодически изымается и добавляется равное количество питательной среды. Такой прием обеспечивает регулярное "омолаживание" (обновление) культуры и задерживает (отдаляет) ее переход в фазу отмирания. Этот прием иногда называется полунепрерывным культивированием.

Модификацией периодического культивирования является культивирование с диализом, при котором питательный субстрат постоянно поступает в реактор через специальную мембрану. Диализ ведет к снижению концентрации продуктов жизнедеятельности клеток, неблагоприятно влияющих на их жизнеспособность. Помимо этого, диализ удаляет из культуры часть жидкости, что позволяет получать в конце процесса концентрированную биомассу.

В непрерывных процессах культивирования клетки постоянно поддерживаются в экспоненциальной фазе роста. С этой целью в биореактор непрерывно подается свежая

питательная среда и обеспечивается отток из него культуральной жидкости, содержащей клетки и продукты их жизнедеятельности. Основным принципом непрерывных процессов (как уже отмечалось выше) является точное соблюдение равновесия между приростом биомассы вследствие деления клеток и их убылью в результате разбавления содержимого свежей средой. Различают хеостатный и турбидостатный режимы непрерывного культивирования.

При хеостатном режиме культивирования саморегулируемая система возникает в силу следующих причин: если первоначальное поступление $\mu_{0.89}$ свежей питательной среды и вымывание биомассы превышает скорость деления клеток, то в результате разбавления культуры снижается концентрация веществ, ограничивающих ростовые процессы и скорость роста культуры повышается; увеличивающаяся популяция начинает активнее "выедать" субстрат, что в свою очередь приводит к торможению роста культуры. Конечным итогом этих процессов является (после серии затухающих колебаний) установление равновесия между скоростью роста культуры и ее разбавлением.

Биореактор, работающий в хеостатном режиме культивирования, называют хеостатом. Его конструкция предусматривает наличие:

- 1) приспособления для подачи питательной среды;
- 2) устройства, обеспечивающего отток культуральной жидкости вместе с клетками,
- 3) системы, контролирующей концентрацию элементов питательной среды и управляющей скоростью подачи питательной среды.

Последнее является наиболее важным и наиболее сложно осуществимым устройством.

Турбидостатный режим культивирования базируется на прямом контроле концентрации биомассы. Наиболее распространенным методом ее определения является измерение светорассеивания с помощью фотоэлементов. Повышение концентрации клеток и соответственно оптической плотности автоматически ускоряет проток жидкости и наоборот. По своей конструкции турбидостаты отличаются от хеостатов лишь системами контроля скорости протока.

Хеостаты применяются в процессах, характеризующихся малым протоком, когда концентрация клеток изменяется незначительно с изменением скорости протока, что облегчает саморегулировку системы. Область использования турбидостатов – высокие скорости разбавления, обуславливающие быстрое и резкое изменение концентрации биомассы. С технической точки зрения турбидостат может применяться только для культивирования одноклеточных микроорганизмов. При длительном культивировании в турбидостате возникает довольно серьезная проблема, связанная с прилипанием клеток к фотоэлементу. Однако имеются и определенные преимущества. Так, например, если засеивается смешанная культура, то в турбидостате автоматически отбирается более быстро растущий вид, что может использоваться для предохранения от массивного заражения посторонней микрофлорой (если, конечно, она растет медленнее) и селекции определенных форм.

Непрерывное культивирование в одном биореакторе называется одностадийным. Многостадийное выращивание предусматривает последовательное или каскадное расположение биореакторов, позволяющее обеспечивать внедрение принципа дифференцированных режимов в непрерывные биотехнологические процессы, основанные на создании системы биореакторов.

При разработке новых биотехнологических процессов сначала прибегают к периодическому культивированию. На непрерывный режим пока еще переведено небольшое число процессов, однако перспективность его не вызывает сомнений, несмотря на более сложные конструкции аппаратов и систем контроля (иными словами, на более солидные капиталовложения).

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA АКАДЕМИАСЫ «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11	
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144	

Конечно, и периодическое культивирование еще не исчерпало своих возможностей. Пока что выбор режима (периодическое или непрерывное культивирование) подчиняется (да и будет подчиняться в дальнейшем) соображениям экономической целесообразности.

Тщательное перемешивание культурной среды – один из наиболее распространенных процессов в БТ. Перемешивание необходимо для:

- равномерной доставки питательных веществ к клеткам;
- предотвращения накопления токсических побочных продуктов метаболизма в каком-нибудь небольшом участке биореактора.

Механическое перемешивание и аэрация снабжают растущую культуру кислородом, азотом, отводят продукты газообмена и физиологическое тепло, выделяемое микроорганизмами в процессе биосинтеза, способствуют гомогенизации суспензии, увеличивают скорость процессов масса- и теплообмена.

Конструкция мешалки играет важную роль в работе биореактора. Мешалки делят на быстро- и тихоходные. Быстроходные аппараты с большой и средней циркуляционной производительностью используют в препаратах с отражательными перегородками (отбойниками). Отсутствие перегородок приводит к завихрению жидкости, снижению скорости у стенки аппарата и образованию воронок.

- Мешалки быстроходные – турбинные, пропеллерные, лопастные, дисковые. Тихоходные – якорные, рамные, ленточные, вибрационные, скребковые; последние для перемешивания средне- и высоковязких сред. Для глубинного культивирования чаще всего используют турбинную мешалку с прямыми лопастями, расположенными радиально.
- Перемешивание культуральной среды влияет на другие параметры:
- скорость переноса кислородного из пузырьков газа в жидкую среду, из среды – в клетки;
- эффективность теплопередачи;
- точность измерения концентрации метаболитов культуральной жидкости;
- эффективность диспергирования добавляемых реагентов (кислот, оснований, питательных и т.д.).

Следует соблюдать баланс между необходимостью тщательного перемешивания среды и целостностью клеток, так как при чрезмерном перемешивании в среде могут возникнуть гидромеханические эффекты, губительные для бактериальных клеток.

Непрерывный мониторинг всех параметров, дает возможность изменять условия в ходе ферментации. Как правило, оптимальные условия изменяются при каждом десятикратном увеличении объема биореактора.

Механическое перемешивание и аэрация снабжают растущую культуру кислородом, азотом, отводят продукты газообмена и физиологическое тепло, выделяемое микроорганизмами в процессе биосинтеза, способствуют гомогенизации суспензии, увеличивают скорость процессов масса- и теплообмена.

Конструкция мешалки играет важную роль в работе биореактора. Мешалки делят на быстро и тихоходные. Быстроходные аппараты с большой и средней циркуляционной производительностью используют в препаратах с отражательными перегородками (отбойниками). Отсутствие перегородок приводит к завихрению жидкости, снижению скорости у стенки аппарата и образованию воронок.

Мешалки быстроходные – турбинные, пропеллерные, лопастные, дисковые. Тихоходные – якорные, рамные, ленточные, вибрационные, скребковые; последние для перемешивания средне- и высоковязких сред. Для глубинного культивирования чаще всего используют турбинную мешалку с прямыми лопастями, расположенными радиально.

Открытые и замкнутые ферментационные системы

В практике современной промышленной биотехнологии существует три главных типа биореакторов и две формы биокатализаторов.

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA АКАДЕМИЯСЫ «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144

Биореакторы могут функционировать на основе разовой (однократной), восполняемой (неполностью) и непрерывной (продолженной) загрузки. А в самих реакторах культуры могут быть статическими и перемешивающимися, находиться в присутствии кислорода (аэробы) или без него (анаэробы), а также в водной фазе или условиях низкого увлажнения.

Биокатализаторы (цельные клетки или ферменты) могут быть свободными или иммобилизованными путем прикрепления к поверхности биореактора или к специальным устройствам. Обычно реакции, протекающие в ферменторах, осуществляются при умеренных значениях pH (около нейтрального) и температуры (от 20 до 60 С). При многих биотехнологических процессах конечные продукты метаболизма (так называемые целевые продукты) накапливаются в низких концентрациях в растворимой фазе (в водной среде) и требуют сепарации, прежде чем будут направлены на реализацию. Биореакторные системы для выращивания микроорганизмов могут быть классифицированы как "замкнутые" и "открытые". Система рассматривается в качестве замкнутой, когда многие компоненты данной системы не могут быть из нее удалены или добавлены. Так, например, в традиционных однократных (т. е. замкнутых) ферментационных системах все питательные компоненты добавляются в начале ферментации и, как результат этого, скорость роста, находящегося в таких условиях организма, в конечном счете, будет снижена до нуля вследствие уменьшения количества питательных веществ или накопления токсических продуктов отхода метаболизма.

Системы, функционирующие в таких условиях, называются как batch-системы (замкнутые системы). Большинство современных биотехнологических систем функционируют как batch-процессы, при которых однажды оптимизированные условия обеспечивают максимальное накопление целевого (требуемого) продукта, например, приготовление пива, производство антибиотиков и ферментов и т. п.

Модификацией процесса с разовой загрузкой является возобновляемая ферментация (feedbatch – от feed-насыщающий), при которой количество питательного вещества может быть добавлено в ходе ферментации с целью восполнения частично израсходованного субстрата или для активации процесса. Однако в своей принципиальной основе подобные системы остаются замкнутыми, поскольку у них нет постоянного оттока содержимого.

В противоположность этому, ферментационная система, рассматривается как открытая, если ее компоненты (микроорганизмы и питательные субстраты) могут постоянно добавляться и удаляться из биореактора. Такие ферментеры оснащены приспособлениями, постоянно подающими свежую питательную среду и удаляющими биомассу и другие продукты. В таких системах скорость конверсии субстрата в биомассу или в целевой продукт должна быть точно сбалансирована со скоростью поступления вышеуказанных компонентов, что обеспечивает устойчивое состояние метаболических процессов в реакторе.

Хотя непрерывные процессы приобрели широкое практическое применение в лабораторных условиях (масштабах), лишь немногие из них используются в промышленности. Однако непрерывные процессы довольно широко практикуются в производстве одноклеточного белка; например, продукция ICI Prutin на метаноле и производство микопротеина компанией RankHovisMcDougall.

Конструкция биореакторов

Все формы и виды ферментационных систем создаются, имея основной целью обеспечение одинаковых условий для всех компонентов содержимого реактора. В ферменторах биокатализаторы суспендированы в жидкой среде, содержащей необходимые субстраты для обеспечения роста организмов и образования нужного целевого продукта.

Для создания оптимальной биореакторной системы необходимо точно придерживаться следующей генеральной линии:

- Биореактор должен быть сконструирован так, чтобы исключить попадание загрязняющих микроорганизмов, а также обеспечить сохранения требуемой микрофлоры.

- Объем культивируемой смеси должен оставаться постоянным, т. е. чтобы не было утечки или испарения содержимого.

- Уровень растворенного кислорода должен поддерживаться выше критических уровней аэрирования культуры аэробных организмов.

- Параметры внешней среды, такие, как температура, рН и т. п., должны постоянно контролироваться.

- Культура при выращивании должна быть хорошо перемешиваемая.

К материалам, используемым при конструировании сложных, прецизионно работающих ферменторов, предъявляются определенные требования (порой весьма строгие):

а) все материалы, вступающие в контакт с растворами, подающимися в биореактор, соприкасающиеся с культурой микроорганизма, должны быть устойчивыми к коррозии, чтобы предотвратить загрязнения металлами даже в следовых количествах;

б) материалы должны быть нетоксичным и, чтобы даже при самой малой растворимости они не могли бы ингибировать рост культуры;

в) компоненты и материалы биореактора должны выдерживать повторную стерилизацию паром под давлением;

г) перемешивающая система биореактора и места поступления и выхода материалов и продуктов должны быть легко доступными и достаточно прочными, чтобы не деформироваться или ломаться при механических воздействиях;

д) необходимо обеспечить визуальное наблюдение за средой и культурой, так что материалы, используемые в процессе, по возможности должны быть прозрачными.

Для оптимизации биотехнологических процессов требуется постоянный и тщательный контроль за изменяющейся картиной ферментации, что обеспечивается наличием в биореакторах соответствующих датчиков, позволяющих осуществлять избирательный анализ определенных параметров ферментационного процесса.

Аппаратурное оформление биотехнологического процесса.

Биореакторы

Промышленное производство биопрепаратов представляет собой сложный комплекс взаимосвязанных физических, химических, биофизических, биохимических, физико-химических процессов и предполагает использование большого количества разнотипного оборудования, которое связано между собой материальными, энергетическими потоками, образующими технологические линии.

Основным аппаратурным элементом биотехнологического процесса является биореактор - ферментер (рис.10). Биореакторы предназначены для культивирования микроорганизмов, накопления биомассы, синтеза целевого продукта. Биореакторы изготавливают из высоколигированных марок стали, иногда из титана. Внутренняя поверхность биореактора должна быть отполирована.

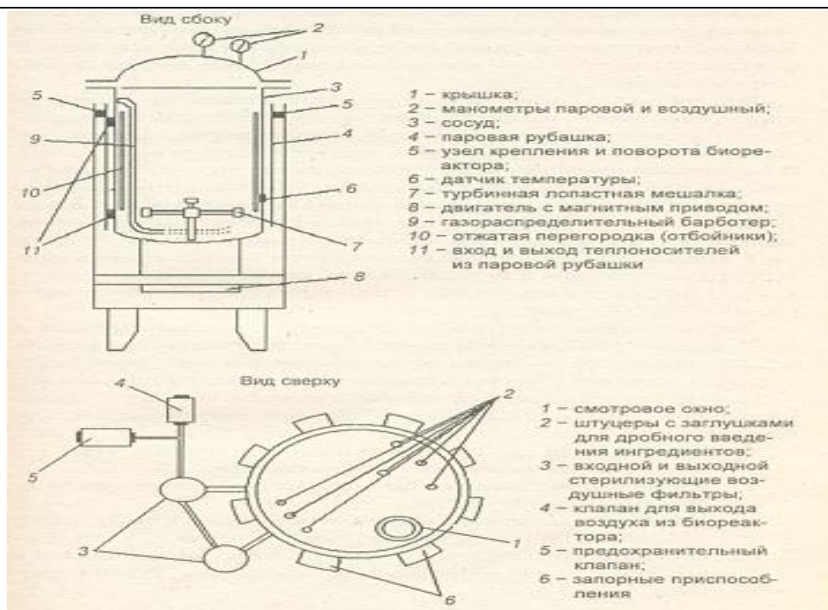


Рис. 10. Схема биореактора (по А.Я. Самуйленко, Е.А.Рубану)

Типовые ферментеры представляют собой вертикальные ёмкости различной вместимости (малые- от 1 до 10 л, многотоннажные –более -1000 л) с минимальным числом штуцеров и передающих устройств. В биореакторах должны быть обеспечены оптимальные гидродинамические и массообменные условия.

Ферментеры снабжены паровой рубашкой, мешалками, барботерами, стерилизующими воздушными фильтрами,отбойниками, обеспечивающими необходимые температурный, газовый режим, гидродинамическую обстановку в биореакторе (т.е. процессы массо- и теплообмена). В биореакторах имеются пробоотборники для отбора проб культуральной жидкости в процессе биосинтеза. Могут быть и другие конструктивные особенности, учитывающие специфику биотехнологического процесса. Работа отдельных узлов контролируется измерительными приборами, фиксирующими как параметры технологического процесса, так и отдельные физико-химические показатели культивирования, скорость вращения мешалки, давление, расход воздуха или газов на аэрацию, пенообразование, рН, еН, рО₂, рСО₂ среды).

Тип биореактора, чистота обработки внутренних стенок аппарата и отдельных его узлов, ёмкость, коэффициент заполнения, поверхность теплоотдачи, способ отвода тепла, тип перемешивающих, аэрирующих устройств, арматура и запорные приспособления, способ пеногашения,- далеко не полный перечень отдельных элементов, которые, в отдельности и во взаимосвязи, влияют на процесс культивирования микроорганизмов и клеток.

Биореакторы подразделяют на три основные группы (рис.11):

- 1) **реакторы с механическим перемешиванием;**
- 2) **барботажные колонны**, через которые для перемешивания содержимого пропускают воздух;
- 3) **эрлифтныереакторы** с внутренней или внешней циркуляцией; перемешивание и циркуляция культуральной среды в них обеспечивается потоком воздуха, за счет которого между верхним и нижним слоями культуральной среды возникает градиент плотности.

Биореакторы первого типа используют чаще всего, так как они позволяют легко изменять технологические условия и эффективно доставлять к растущим клеткам воздух, определяющий характер развития микроорганизмов и их культуральную среду под давлением через разбрызгиватель- кольцо с множеством маленьких отверстий. При том стрелки- направление потока культуральной среды образуются мелкие пузырьки воздуха и за счет механического перемешивания обеспечивается их равномерное распределение.

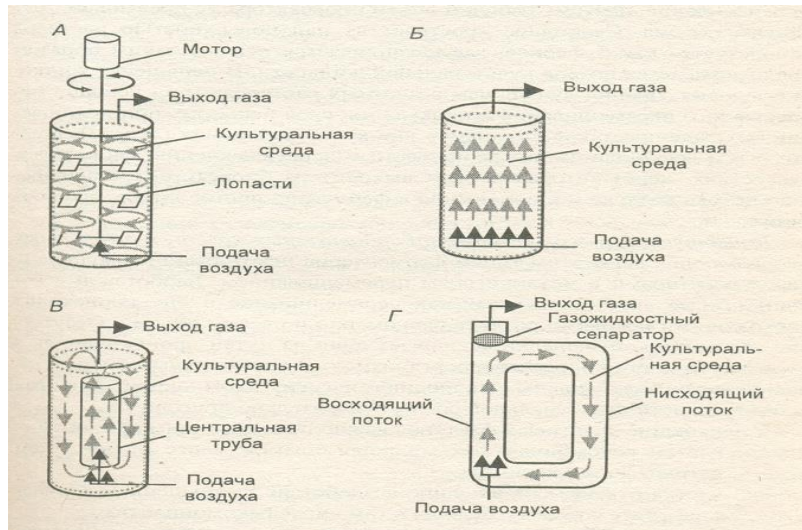


Рис.11. Упрощенные схемы биореакторов различных типов (по Б. Глику, Дж. Пастернаку): А-реактор с механическим перемешиванием; Б- барботажная колонна; В-эрлифтный реактор с внутренней циркуляцией; Г-эрлифтный реактор с внешней циркуляцией.

Для этой же цели используют мешалки – одну или несколько. Мешалки, разбивая крупные пузырьки воздуха, разносят их по всему реактору и увеличивают время пребывания в культуральной среде. Эффективность распределения воздуха зависит от типа мешалки, числа оборотов, физико-химических свойств среды.

При интенсивном перемешивании культуральной среды происходит ее вспенивание, поэтому рабочий объем биореактора не превышает 70% общего объема. Свободное пространство над поверхностью раствора используется как буферное, где накапливается пена, и таким образом предотвращается потеря культуральной жидкости. В пенящейся жидкости условия аэрации лучше, чем в плотных растворах (при условии непрерывного перемешивания и циркуляции слоя пены, т.е. при исключении нахождения микроорганизмов вне культуральной жидкости). Вместе с тем вспенивание может привести к переувлажнению фильтров в отверстиях, через которые воздух выходит из биореактора, уменьшению потока воздуха и к попаданию в ферментер посторонних микроорганизмов.

Конструктивные особенности барботажных колонн и эрлифтных биореакторов дают этим типам ферментеров некоторые преимущества перед реакторами с механическим перемешиванием. Барботажные колонны более экономичны, так как перемешивание в них происходит восходящими потоками воздуха равномерно по всему объему. Отсутствие механической мешалки исключает один из путей проникновения в биореактор посторонних микроорганизмов. В барботажных биореакторах не возникает сильных гидродинамических возмущений (сдвигов слоев жидкости культуральной среды относительно друг друга).

Уменьшение сдвиговых факторов важно по следующим причинам:

- клетки рекомбинантных микроорганизмов менее прочны, чем нетрансформированные;
- клетка отвечает на внешние воздействие уменьшением количества синтезируемых белков, в том числе рекомбинантных;
- под влиянием сдвиговых эффектов могут изменяться физические и химические свойства клеток, что затрудняет дальнейшую работу с ними (ухудшаются условия выделения, очистка рекомбинантных белков).

В барботажных колоннах воздух подают под высоким давлением в нижнюю часть биореактора; по мере подъема мелкие пузырьки воздуха объединяются, что влечет неравномерное его распределение. Кроме того, подача воздуха под высоким давлением приводит к сильному пенообразованию.

В эрлифтных биореакторах воздух подают в нижнюю часть вертикального канала.

Поднимаясь, воздух увлекает за собой жидкость к верхней части канала, где расположен газожидкостный сепаратор (здесь частично выходит воздух). Более плотная деаэрированная жидкость опускается по другому вертикальному каналу ко дну реактора и процесс повторяется. Таким образом, в эрлифтном биореакторе культуральная среда вместе с клетками непрерывно циркулирует в биореакторе.

Эрлифтные биореакторы выпускаются в двух конструктивных вариантах. В первом – реактор представляет емкость с центральной трубой, которая обеспечивает циркуляцию жидкости (реакторы с внутренней циркуляцией). У эрлифтного биореактора второго типа культуральная среда проходит через отдельные независимые каналы (реактор с внешней системой циркуляции).

Эрлифтные биореакторы более эффективны, чем барботажные колонны, особенно в суспензиях микроорганизмом с большой плотностью или вязкостью. Перемешивание в эрлифтных ферментерах более интенсивно и вероятность слипания пузырьков минимальна.

Неотъемлемой частью большинства ферментаций является та или иная степень компьютеризации.

За последние десятилетия форма биореакторов существенно изменилась. Первые (исходные) ферментационные системы представляли собой неглубокие емкости, перемешивание в которых осуществлялось либо путем их встряхивания, либо посредством перемешивания содержимого вручную. На основе первичных систем в последующем были созданы аэрируемые башенные конструкции, которые в настоящее время доминируют в промышленном производстве.

Системы перемешивания являются важным классификационным принципом биореакторов различного типа. Правда, поскольку биореакторы являются многопараметровыми аппаратами, они могут классифицироваться и по другим критериям: размерам, целевым назначениям (лабораторные, опытно-промышленные или пилотные, промышленные), режиму работы (периодического и непрерывного действия), условиям культивирования (аэробные и анаэробные, мезофильные и термофильные, для поверхностного и глубинного выращивания, для жидких и твердых питательных сред, газофазные).

И все же система перемешивания имеет не последнее значение в классификации. По способу перемешивания и аэрации биореакторы подразделяются на аппараты с механическим, пневматическим и циркуляционным перемешиванием.

Аппараты с механическим перемешиванием

Эти реакторы имеют механическую мешалку с центральным валом и лопастями (лопатками), число которых обычно равно 6, реже 8 (рис.2).

Лопастки могут быть прямыми или изогнутыми, часто их располагают в несколько ярусов, что обеспечивает более эффективное перемешивание больших объемов жидкости. В систему входят также отражательные перегородки – узкие металлические пластинки, прикрепленные к внутренним стенкам биореактора. Они предотвращают возникновение водоворотов и обеспечивают вихревое движение жидкости, равномерно распределяемое по всему объему реактора. Однако в ряде случаев они не могут быть применены (культивирование мицелиальных грибов), так как обрастают микроорганизмами (мицелием). Нежное и медленное перемешивание создается в биореакторах, предназначенных для выращивания клеток животных и (в меньшей степени) растений.

Аэрация (без явного, интенсивного перемешивания) может осуществляться путем барботажа – подачи воздуха снизу через горизонтальную трубку с отверстиями, иногда аэрирование достигается применением специальных вибраторов, которые обеспечивают высокую степень асептики, малый расход энергии и относительно слабо травмируют клетки. В некоторых ферментаторах используют полые мешалки, в которых воздух поступает в среду культивирования через отверстия в нижнем конце их валов и полые лопатки.

Аппараты с механическим перемешиванием – наиболее распространенные конструкции в современной микробиологической промышленности.

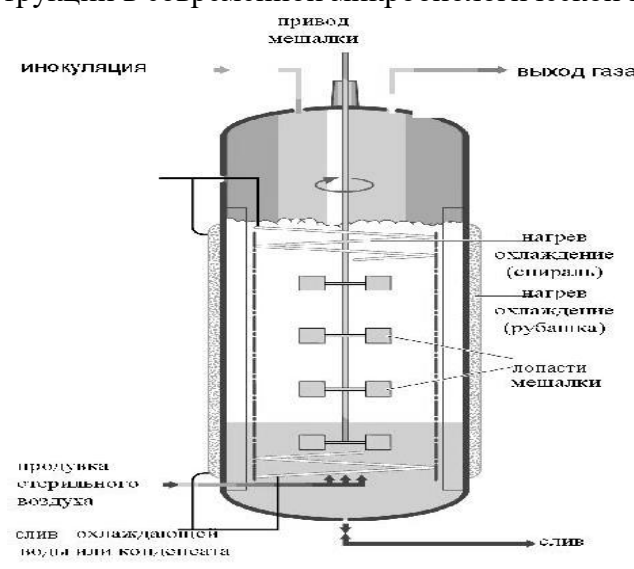


Рис 2. Ферментер с механическим перемешиванием.

Аппараты с пневматическим перемешиванием

В такого типа аппаратах мешалка отсутствует и перемешивание жидкости осуществляется пузырьками газа (рис.3). Естественно, что скорость массообмена в них намного ниже, чем в ферментаторах с механическим перемешиванием (с мешалками).

Классическим аппаратом такого типа является эрлифтный реактор (airlift – подъем воздуха). Биореакторы с пневматическим перемешиванием характеризуются более мягким (плавным) перемешиванием содержимого и получили распространение при выращивании клеток животных и растений. Пневматические аппараты привлекают также простотой конструкции и малыми энергозатратами.

Основной их недостаток – "тихоходность" Однако и это не всегда является недостатком, поскольку, например, в условиях "тихоходных" установок культуры клеток растений характеризуются биосинтетическими способностями, присущими целому растению. Так, клетки *Digitalis lanata* в эрлифтном ферменторе продуцируют ценный кардиологический препарат – р-метилдигоксин.

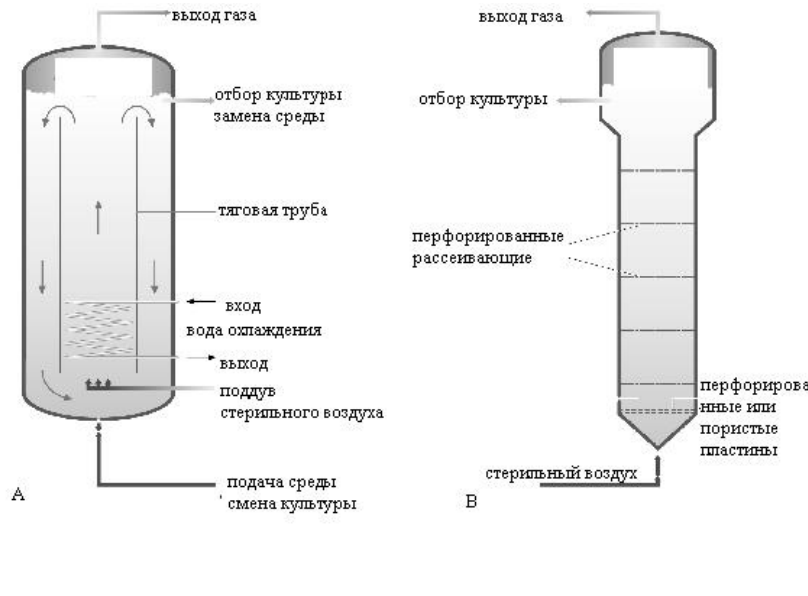


Рис.3. Ферментеры с пневматическим перемешиванием:

а) эрлифтный; б) пузырькового типа

Аппараты с циркуляционным перемешиванием

Биореакторы циркуляционного или гидродинамического типа оснащены насосами и эжекторами, создающими направленный ток жидкости по замкнутому контуру (кругу). Жидкость увлекает за собой пузырьки газа и тем самым культуральная среда одновременно с перемешиванием может насыщаться либо атмосферным кислородом, либо (с использованием специальных устройств и эжекторов) газом иного типа.

Эти аппараты (биореакторы) отличаются простотой конструкции и надежностью в эксплуатации.

Ферментеры циркуляционного типа часто заполняются твердыми частицами (насадкой), которые способствуют лучшему перемешиванию содержимого реактора, препятствуют обрастанию стенок при длительном культивировании, а также обеспечивают диспергирование воздуха в жидкости. Некоторые микроорганизмы, прикрепляясь к таким насадкам (в частности, грибы и актиномицеты), развиваются намного лучше. От биореакторов с насадками – один шаг к ферментерам для иммобилизованных клеток или к аппаратам для иммобилизованных ферментов.

В последнее время разрабатываются новые способы аэрации. Например, воздух может подаваться через специальные полипропиленовые мембраны. Это позволяет избежать пенообразования и очень хорошо зарекомендовало себя при выращивании клеток эукариотических организмов, в частности при промышленном получении интерферона.

Система теплообмена

Теплообмен осуществляется с помощью труб с охлаждающим или нагревающим агентом, которые оплетают аппарат и образуют так называемую рубашку реактора. Иногда эта система труб располагается непосредственно в полости ферментора. Нагревающими

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA АКАДЕМИАСЫ «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144

агентами в промышленных биореакторах служат горячая вода или пар. Естественно, в лабораторных ферменторах чаще используется электрический подогрев.

В качестве охлаждающих агентов применяют воду с низкой температурой (артезианскую или пропущенную через холодильную установку); более глубокое охлаждение достигается использованием этиленгликоля или фреонов. Проблема охлаждения ферментаторов становится очень значительной в промышленных масштабах.

Система пеногашения

Пеногашение – средство борьбы с избыточным пенообразованием. Существуют химические, механические, акустические и другие виды пеногашения. Наиболее часто применяют химические и механические способы пеногашения. К химическим средствам относятся поверхностно-активные вещества, которые, внедряясь в стенки пузырей, становятся центрами их неустойчивости. Эффективными пеногасителями служат растительные (соевое, рапсовое, кокосовое, подсолнечное, горчичное) масла, животные (сало, рыбий жир) и минеральные жиры. Недостатком этих пеногасителей является то, что при их утилизации микробными клетками сами по себе способствуют пенообразованию.

Механические пеногасители представляют собой различные устройства, сбивающие пену: диски, лопасти, барабаны, располагающиеся в верхней части реактора. Более сложными приспособлениями являются сепараторы пены, которые одновременно служат для сбора биомассы, содержащейся в пенном слое. Все эти устройства, конечно же, приводят к дополнительным затратам и удорожают производство.

Система стерилизации

Устройства и режим стерилизации определяется конструкцией биореактора, вспомогательного оборудования, используемых питательных сред и т. п. Наибольшее значение имеют термический метод стерилизации оборудования и сред и фильтрационный способ, применяемый для удаления микроорганизмов из подаваемого в ферменторы воздуха или другого газа.

Режимы термальных способов стерилизации определяются химическим составом питательных сред. При этом определяющим является состояние компонентов среды после стерилизации; главное – сохранность ее питательных качеств.

Проблемы масштабирования ферментационных процессов

Технология производственного процесса отрабатывается поэтапно: в лабораторных, пилотных (опытно-промышленных) и промышленных установках. Чаще встречаются аппараты с объемами ферментаторной камеры: 0,5–100 л (лабораторные), 100–5000 л (пилотные) и 5000–1000000 л и более (промышленные). На каждом этапе увеличения масштаба ферментации (процесса) – масштабном переходе (масштабировании биотехнологического процесса) – решаются конкретные задачи отработки (налаживания) производства и его оптимизации.

Лабораторные ферментеры по устройству и форме напоминают промышленные и подразделяются на те же типы. Правда, в лабораторных масштабах наиболее часто применяются аппараты с механическим перемешиванием. По принципу теплообмена и стерилизации они делятся на две категории. К первой относятся лишенные собственных систем теплообмена и стерилизации. Такие аппараты, по сути дела, представляют собой камеры для культивирования, помещаемые в водяные бани и стерилизуемые в автоклавах.

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA АКАДЕМИЯСЫ «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144

Аппараты второй категории снабжены системами теплообмена и стерилизации, принципиально не отличающимися от таковых промышленных установок.

С помощью лабораторных биореакторов решаются следующие задачи:

- 1) кинетические – определение скорости роста клеток, эффективность утилизации субстратов и образования целевого продукта;
- 2) некоторые массообменные – расчет коэффициентов массопередачи, скорость поступления в среду O₂ и других газов, скорость освобождения от газообразных продуктов, образующихся при культивировании продуцентов (в первую очередь CO₂);
- 3) определение коэффициентов реакций, связывающих утилизируемые субстраты и O₂ с получаемыми целевым и побочными продуктами.

Пилотные установки используют для поиска (отсюда и название) наиболее целесообразных технологий и в общих чертах моделирование промышленного процесса. Поэтому на данном этапе стараются применять тот тип аппарата, который предполагается использовать в промышленном масштабе. Иными словами, отрабатываются все аспекты производства, вплоть до штатных вопросов. При масштабных переходах следует постоянно иметь в виду, что при соблюдении одинаковых условий (среда, тип аппарата, температура и pH, скорость перемешивания) уровень и скорость синтеза целевого продукта могут существенно различаться ситуация, очень четко прослеженная еще в 1940–1950 гг. при организации крупномасштабных производств антибиотиков.

Вследствие сказанного при переходе от лабораторных к пилотным, а затем от пилотных к промышленным установкам, приходится наряду с объемом изменять и конструкцию, и режимы работы аппаратов.

Центральной проблемой при этом является подбор надежных критериев масштабирования, обеспечивающих разработку высокоэффективных и экономичных технологий промышленного производства целевого продукта.

Специализированные ферментационные процессы

Большинство ферментационных технологий связано с жидкими аэрируемыми системами, однако в настоящее время достаточно широко используются ферментационные технологии, основанные на утилизации плотных субстратов, при отсутствии воды или малом ее количестве, а также в бескислородных условиях.

Анаэробные процессы

Биореакторы для таких процессов лишены приспособления для аэрирования среды, хотя некоторые из анаэробных процессов сопровождаются потреблением газообразных продуктов водорода, метана, поэтому требуют соответствующих приспособлений для подачи газов в жидкую среду. Ведущим моментом является обеспечение анаэробноза, что сопряжено со значительными сложностями.

Твердофазные процессы

Многие биотехнологические процессы основаны на взаимодействии трех фаз: твердой, жидкой и газообразной. Существуют процессы, в которых роль жидкой фазы сведена до минимума: она лишь используется для увлажнения твердой поверхности или воздуха (газа). В зависимости от преобладающей фазы процессы и соответствующие им аппараты подразделяются на твердофазные и газофазные.

Твердофазные осуществляются, как правило, на основе растительного сырья и используют чаще всего мицелиальные грибы и дрожжи или их комбинации. Различают три типа твердофазных процессов:

- Поверхностные, когда слой субстрата не превышает 3–7 см ("тонкий слой"). В качестве "биореакторов" используются большие (до нескольких квадратных метров) подносы или культуральные камеры.
- Глубинные процессы, идущие в не перемешиваемом слое ("высокий слой"). Биореакторы представляют собой глубокие открытые сосуды. Для аэробных твердофазных процессов разработаны приспособления, обеспечивающие диффузионный и конвекционный газообмен.
- Перемешиваемые процессы, протекающие в перемешиваемой и аэрируемой массе субстрата, который может быть гомогенным (полужидкой консистенции) или состоять из частиц твердого вещества, взвешенных в жидкости (переходный вариант от твердофазного процесса к процессу в жидкой фазе). Для этого обычно используют биореакторы с низкоскоростным перемешиванием.

Интерес к твердофазным процессам обусловлен их некоторыми преимуществами по сравнению с процессами, осуществляющимися в жидкой фазе:

- 1) они требуют меньших затрат на оснащение и более дешевые в эксплуатации;
- 2) характер субстрата облегчает отделение и очистку продукта;
- 3) низкое содержание воды препятствует заражению культуры продуцента посторонней микрофлорой;
- 4) твердофазные процессы не связаны со сбросом в окружающую среду больших количеств сточных вод.

Однако и здесь существуют свои проблемы. Вследствие отсутствия хорошего перемешивания продуцент часто растет в виде колоний и лишь постепенно может распространяться по субстрату; при этом возникает локальная нехватка питательных веществ, тогда как часть субстрата вообще не используется (не колонизируется) продуцентом; недостаточно эффективный контроль за аэрацией и др.

Газофазные процессы

Процессы этого типа осуществляются в аппаратах с твердым наполнителем, через который пропускают газ. В таких аппаратах получают, например, спирт на основе дрожжей, а также их биомассу, мелкие агрегаты дрожжевых клеток, предварительно увлажненные концентрированной питательной средой, "парят" в потоке газа, подаваемого под сильным давлением через сопло в днище реактора. Газ, покидающий аппарат, несет с собой летучие продукты жизнедеятельности дрожжей (в том числе и спирт), которые конденсируются в холодильнике. Процесс может осуществляться как в аэробных, так и в анаэробных условиях (в зависимости от используемого газа).

Технология выращивания культур животных и растительных клеток

Массовое культивирование организмов для биотехнологических целей достаточно хорошо разработано применительно к бактериям, дрожжам и мицелиальным грибам, и лишь сравнительно недавно начались интенсивные исследования в области выращивания культур клеток животных и растений. С помощью техники культивирования растительных клеток во многих странах с успехом готовится посевной материал для размножения определенных и 1088 растений. Стимулом для совершенствования методов культивирования растительных клеток явились работы по изучению органогенеза и амплификация проростков с последующим высевом их в грунт. Однако крупномасштабное выращивание суспендированных культур клеток многих видов растений уже разработано и используется для получения продуктов, типичных продуктам цельных растений: например, производство

ÖNTÜSTİK-QAZAQSTAN MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144

никотина, алкалоидов и женьшеня. Считается перспективным производство таких дорогостоящих препаратов, как дигиталиса (наперстянки), жасмина, мяты, кодеина и т. п. Ферментационные методы, применяемые при культивировании растительных клеток в жидкой перемешивающейся среде, во многом заимствованы из микробиологической техники. Правда, культуры растительных клеток растут намного медленнее, нежели бактериальные, хотя большинство других характеристик довольно близкие. И хотя некоторые продукты растительной биотехнологии уже появились на рынке, специалисты полагают, что в коммерческом отношении процессы такого рода вряд ли будут привлекательными на протяжении многих лет.

Тем не менее, потенциально очень важные органические соединения синтезируются только растительными или животными клетками, что заставляет изыскивать подходы в решении возникающих проблем, не обращая существенного внимания на стоимость этих технологий.

Клетки животных способны расти либо в виде суспензий, либо прикрепленными к плотному субстрату (твердой поверхности). Такие клетки как, HeLa (клетки, происходящие из опухоли человека) могут расти в любом из этих состояний; лимфобластные клетки растут в суспендированных культурах; а нормальные диплоидные клетки способны расти только будучи прикрепленными к твердой поверхности.

Монослойное культивирование животных клеток во многом определяется доступностью поверхности для их прикрепления, вследствие чего многие конструкторские разработки направлены на создание методов увеличения возможной площади прикрепления. Ранние технологии основывались преимущественно на использовании вращающихся пробирок или флаконов с целью лучшего обеспечения растущих клеток питательными веществами и воздухом.

Создаваемые в последнее время системы предназначаются для поддержания роста клеток на свернутых в виде "бухт" проницаемых для газов тефлоновых трубочках, каждая из которых имеет поверхность около 10 000 см² (а общее их число в реакторе более 20). В таких условиях многие типы клеток культивируются довольно хорошо.

Еще одним перспективным способом культивирования клеток животных является способ, основанный на использовании небольших бусин (шариков, микроносителей), к которым прикрепляются клетки. Шарик может изготавливаться из сефадекса и обладать поверхностью в 7 см² на 1 мг. Шарик способен плавать в суспендированном состоянии и на них могут расти клетки различных типов. Таким путем уже получают человеческий интерферон. Данный способ, полагают, способен заменить метод монослойных культур.

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ BIOTEХНОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

Самым главным направлением биотехнологии (основной задачей) является всемерная интенсификация производственных процессов, что достигается, с одной стороны, внедрением новых высокопродуктивных биологических объектов (продуцентов), а также широким применением эффективных технологических приемов (технологических режимов).

Указанная цель достигается подбором подходящего сырья (субстрата для выращивания продуцента), разработкой наилучшей конструкции биореактора (ферментатора), оптимизацией условий культивирования продуцента, обеспечением эффективного контроля за самим технологическим процессом, а также усовершенствованием способов выделения и очистки целевого продукта.

Субстраты для культивирования биообъектов

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA АКАДЕМИАСЫ «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144

Питательные среды для выращивания объектов биотехнологии, т. е. продуцентов тех или иных соединений, могут быть неопределенного состава и включать различные биогенные добавки (растительные, животные или микробные) – мясной экстракт, кукурузную муку, морские водоросли и т. п. Применяются также среды из чистых химических соединений определенного состава, так называемые синтетические.

Компонентный состав сред определяется питательными потребностями продуцента. Во многих процессах используют в качестве объектов организмы, ранее называвшиеся гетеротрофами, которые в настоящее время подразделяются на: органо-автотрофы (употребляющие органические вещества как источники энергии), литогетеротрофы (использующие органические вещества как источники углерода) и органогетеротрофы (для которых органические вещества служат и источниками энергии, и источниками углерода).

Питательные среды призваны обеспечивать жизнеспособность, рост и развитие соответствующих продуцентов, а также синтез целевого продукта с максимальной эффективностью. Требования к питательным средам, используемым в биотехнологии, ничем не отличаются от требований, предъявляемым к питательным средам, применяемым в микробиологии для культивирования тех или иных микроорганизмов.

Для приготовления питательных сред в биотехнологии используются разнообразные субстраты, которые должны удовлетворять определенным критериям.

Субстрат представляет собой сырье для получения целевого продукта и должен быть недефицитным, дешевым, по возможности легко доступным.

Растительная биомасса и (в меньшей степени) биомасса животных организмов представляют собой достаточно хорошо утилизируемые источники углерода для биотехнологических целей. На основе этих источников основано давно существующее производство алкоголя из зерна и сыра из молока. Растительные источники могут рассматриваться как практически неистощимые. Первичная продукция фотосинтеза (рост растений за счет использования солнечной энергии) на земле обеспечивает 2×10^{11} т вещества (биомассы) в год в пересчете на сухой вес!

Наибольшая доля биомассы (около 44 %) образуется в виде древесины. Вызывает удивление факт, что продукция сельского хозяйства составляет лишь 6 % первичной продукции за счет фотосинтеза, хотя именно из этого количества получается основная часть пищи для людей и животных, а также многие необходимые материалы (например, для текстильной и бумажной промышленности).

В будущем значительная часть традиционных сельскохозяйственных продуктов сможет производиться с использованием современной биотехнологии. В частности, новые биотехнологические подходы позволят обеспечить утилизацию большого количества отходов сельского хозяйства, которые в настоящее время не находят применения, и использовать их для приготовления питательных продуктов.

Биомасса сельского и лесного хозяйства в настоящее время является значительным экономическим потенциалом во многих национальных экономиках, в первую очередь в тропических и субтропических регионах.

IV. Иллюстративный материал: прилагается

V. Литература:

основная:

- 118.Егорова Т.А., Клунова С.М., Живухина Е.А. Основы биотехнологии. – М.: Изд. центр «Академия», - 2008. – 208 с.
- 119.Евтушенков А.Н., Фомичев Ю.К. Введение в биотехнологию: Курс лекций. – Минск.: БГУ, 2002. - 105 с.
- 120.Сазыкин Ю.О., Орехов С.Н., Чакалева И.И. Биотехнология: Учебное пособие. – М.: Изд. Центр «Академия». – 2006. – 256 с.
- 121.Орехов С.Н. Фармацевтическая биотехнология. Руководство к практическим занятиям. – Учебное пособие. – Под ред. акад. РАМН В.А. Быкова, проф. А.В Катлинского. – М. : ГЭОТАР-Медиа 2009. – 384 с.
- 122.Елинов Н.П. Химическая микробиология. - Учебник. - М.: Высшая школа. - 1989, 448 с
- 123.Воробьева Л.И. Промышленная микробиология. - Учебное пособие. - М.: Изд-во МГУ. - 1989, 294 с.
- 124.Биотехнология. Принципы и применение. Пер. с англ. / Под ред. И. Хиггинса, Д. Беста, Дж. Джонса. - М.: Мир. - 1988, 480 с.
- 125.Чуешов В.И., Зайцев А.И., Шебанова С.Г. Промышленная технология лекарств. Том 2. Харьков, 2002.
- 126.Биотехнология микробного синтеза (Под ред. Бекера М.Е.) – Рига – 1980.
- 127.Биотехнология. (Отв. редактор А.А. Баев). - М.: Наука. - 1984, 310 с.
- 128.Перт С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов. М., - 1979 г.
- 129.Промышленная микробиология (Под ред. Егорова Н.С.) – М., 1989 г.
- 130.Процессы и аппараты химической технологии (Под ред. П.Г. Романкова). – Л. – 1981.
- дополнительная:**
55. Березов Т.Т. , Коровкина Б.Ф. – Биологическая химия (Под ред. И.М. Ивановой) – М., Медицина – 1981 г.
56. Никитин Г.А. – Биохимические основы микробиологических производств – Киев, 1981.
57. Бриттон Г. – Биохимия природных пигментов. М., Мир – 1986 г.
58. Попова Т.В. – Развитие биотехнологии в СССР – М., Наука - 1988 г.
59. Популяционные аспекты биотехнологии – Печуркин Н.С., Брильков А.В., Маркенкова Т.В. – Новосибирск: - Наука – 1990 г.
60. Специальные журналы: «Биотехнология», «Фармация Казахстана», «Фармацевтический бюллетень» и др.

VI. Контрольные вопросы (обратная связь):

30. Какая подходящая схема должна быть разработана для каждого биотехнологического процесса?
31. Какие типы ферментеров используются в биотехнологическом производстве?
32. Какими системами должны обладать современные биореакторы?
33. Какие субстраты используются при культивировании биообъектов?
34. Назовите основные требования оптимальной биореакторной системы.
35. В чем заключаются особенности анаэробного культивирования?
36. В чем заключаются особенности твердофазного культивирования?

Лекция № 18-19

I. Тема: Методы отделения биомассы (мицелия продуцента) от культуральной жидкости. Особенности выделения (экстрагирования) и очистки целевых продуктов: при переработке биомассы, при переработке культуральной среды.

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA АКАДЕМИАСЫ «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11	
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144	

II. Цель: Ознакомить студентов с методами отделения биомассы от культуральной жидкости, особенностями выделения и очистки целевых продуктов, методами при переработке биомассы и культуральной среды.

III. Тезисы лекции:

Отделение биомассы

Первым этапом в процессе очистки целевого продукта является разделение культуральной жидкости и клеточной биомассы сепарация. В некоторых случаях сепарации предшествует специальная обработка реакционной смеси, способствующая более эффективному отделению биомассы и стабилизации выделяемого продукта. Применяются различные методы сепарации.

1. Флотация. Метод используется в том случае, если клетки продуцента в силу низкой смачиваемости накапливаются в поверхностных слоях содержимого биореактора. Особые устройства (флотаторы) различной конструкции удаляют образующуюся при культивировании пену вместе с прилипшими к пузырькам газа клетками. Повышение эффективности отбора биомассы достигается вспениванием жидкости с последующим отделением ее верхнего слоя механическим путем. Достоинствами метода является его экономичность, высокая производительность и возможность использования в непрерывных процессах.

2. Фильтрация. Различны применяемые в настоящее время фильтрующие системы (барабанные, ленточные, тарельчатые фильтры, карусельные вакуум-фильтры, фильтры-прессы, мембранные фильтры) основаны на одинаковом принципе – задержке биомассы на пористой фильтрующей перегородке. Недостатком способа является налипание клеток на фильтре, слой которых снижает скорость потока жидкости в процессе фильтрования.

Для фильтров непрерывного действия предусматриваются системы автоматической очистки от биомассы, забивающей поры. Она может сдуваться с поверхности фильтров сжатым воздухом или удаляться специальными "ножами".

Существуют также фильтры для многократного или однократного периодического использования. Например, мембранные (в частности, тефлоновые) фильтры, позволяющие фильтровать очень разбавленные клеточные взвеси. Однако проблемой их использования является быстрая закупорка пор клетками, белками и другими коллоидными частицами.

Приемы механического удаления материала, забивающего фильтры, при данном способе фильтрации не пригодны, так как повреждают мембраны. Приемлемым путем преодоления затруднений такого рода является покрытие мембранных фильтров гидрофильным слоем, препятствующим контакту белков (коллоидов) с поверхностью фильтра, либо обработкой фильтров гидролитическими ферментами.

3. Центрифугирование. Данный способ требует более дорогостоящего оборудования, чем фильтрование, поэтому он применяется если: а) суспензия фильтруется слишком медленно; б) возникает необходимость максимального освобождения культуральной жидкости от содержащихся в ней частиц; в) требуется обеспечить непрерывный процесс сепарации, когда фильтры рассчитаны на периодическое действие.

Центрифугирование и фильтрация в некоторых биотехнологических процессах осуществляется в комбинации, т. е. применяются фильтрационные центрифуги, в которых разделение жидкой и твердой фазы основано на двух процессах фильтрования и центрифугировании.

Довольно широко используются приемы, где разделение обеспечивается лишь центробежной силой. Наиболее перспективными в этом отношении являются центрифуги-сепараторы, в которых отделяемая биомасса оседает на стенках вращающегося цилиндра или специальных тарельчатых вставках.

Выделение продуктов биосинтеза

Общая схема этой стадии технологического процесса представлена на рис. 12. Если продукт локализован внутри клеток, их разрушают, удаляют клеточные осколки и выделяют продукты из осветленной среды; секретлируемый продукт выделяют непосредственно из среды.

Для отделения биомассы клеток или культуральной жидкости используют сепараторы, осадительные центрифуги, фильтр – прессы, вакуум – барабанные фильтры, ротационно-вакуумные фильтры, отстойники. Выбор оборудования зависит от масштаба культивирования, типа клеток, свойства культуральной жидкости.

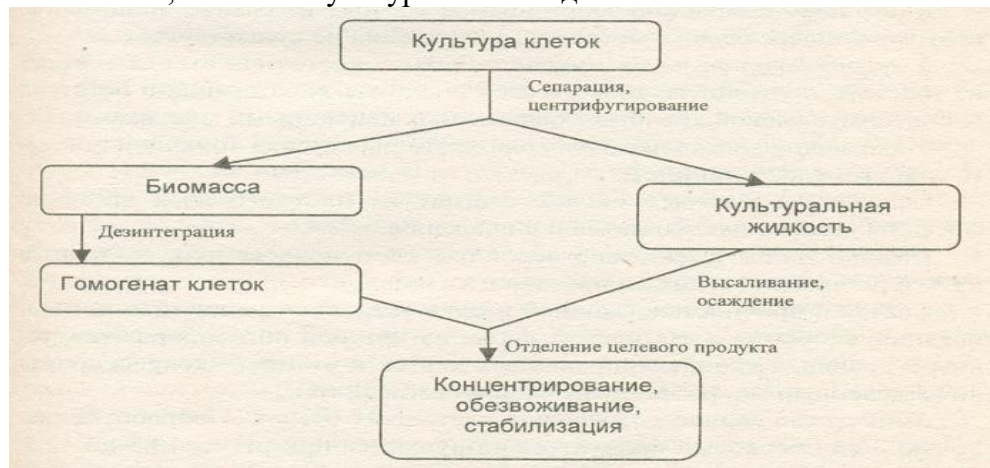


Рис. 12. Выделение продуктов биосинтеза

Для выделения клеток из больших объемов культуральной среды (в промышленных масштабах) используют высокоскоростное центрифугирование с помощью соответствующих центрифуг полунепрерывного действия. Суспензию клеток непрерывно подают в барабан центрифуга, клетки концентрируются в нем, осветленная жидкость удаляется. Когда барабан заполняется осажденными клетками, центрифугу останавливают и клетки собирают. Неудобства этого способа – необходимость остановки процесса, вероятность утечки микроорганизмов окружающей среду, невозможность полного удаления клеток и среды.

Альтернативный метод выделения клеток из культуральной среды – фильтрация через мембрану. Но процесс фильтрации быстро замедляется за счет накопления клеток на поверхность фильтра. Увеличение давления фильтруемой среды дает временный эффект, так как клетки забивают поры, образуя менее проницаемый слой.

Отделение, очистка и модификация продуктов

Конечные стадии при биотехнологических процессах

Завершающие стадии биотехнологических процессов – выделение целевого продукта – существенно различаются в зависимости от того, накапливается продукт в клетке или он выделяется в культуральную жидкость, или же продуктом является клеточная биомасса. Наиболее сложным является выделение внутриклеточного продукта. При этом клетки необходимо отделить от среды культивирования, подвергнуть их разрушению, а затем целевой продукт очистить от остатков разрушенных клеток.

Выделение продукта существенно облегчается, если он экскретируется продуцентом в культуральную жидкость. Поэтому одной из насущных задач биотехнологии является создание промышленных штаммов микроорганизмов, секретирующих возможно большее число ценных продуктов в значительных количествах.

Технология выделения и очистки в значительной степени определяется природой целевого продукта. В ряде случаев существует возможность не использовать тщательную очистку продукта, если он обладает требуемыми активностями в неочищенном состоянии и если примесь посторонних веществ не оказывает каких-либо нежелательных влияний при его использовании. Некоторые традиционные биотехнологические процессы вообще исключают этап отделения продукта.

Разрушение (дезинтеграция) клеток. Для этой цели применяют разнообразные химические, биологические, физические методы. Все процедуры должны быть одновременно достаточно жесткими, чтобы разрушить клеточную стенку, и достаточно мягкими для исключения денатурации белка. (изменения структуры конечного продукта).

Клеточные стенки микроорганизмов состоят из разных полимеров, по этому универсального метода их разрушения не существуют.

У грамположительных микроорганизмов клеточная стенка состоит из толстого пептидогликанового слоя N –ацетилглюкозамина и остатков N – ацетилмурамовой кислоты, соединенных пептидными мостиками.

У грамотрицательных бактерии клеточная стенка тоньше и покрыты снаружи слоем липидов.

Стенка дрожжевых клеток состоит из плотного слоя частично фосфорилированных маннанов и β – глюканов.

Низшие грибы имеют многослойные клеточные стенки, состоящие из α и β глюканов, гликопротеидов и хитина.

Состав и прочность клеточной стенки зависит от условий культивирования, скорости роста клеток, фазы, на которой они собираются, условия хранения сконцентрированных клеток и от того, экспрессировал ли выделенный микроорганизм клонированный ген.

Химический метод разрушения клеточных стенок – обработка щелочью. Если белковый продукт не разрушаются при pH от 10,5 до 12,5, то можно без труда лизировать большие количества бактериальных клеток. Например, рекомбинантный гармон роста человека очень просто выделить из клеток *E. coli* обработкой натрия гидрокарбонатом при pH 11. После обработки щелочью не остается практически не одной жизнеспособной клетки, что автоматически решают проблему утечки рекомбинантных микроорганизмов.

Основной биохимический метод разрушения клеток микроорганизмов – лизис с помощью ферментов. Так, лизоцим яичного белка легко гидролизует клеточные стенки грамположительных бактерий. Для разрушения клеток грамотрицательных бактерий используют лизоцим и ЭДТА. Клеточные стенки дрожжей и плесневых грибов гидролизуют одним или несколькими ферментами: фосфоманназой, β -1,2- и β -1,6- глюканазой, хитиназой – или комплексным дрожжелитическим препаратом. Ферментативная обработка высокоспецифична, а лизис происходит в мягких условиях.

Клетки можно разрушать физическими методами: немеханическими (осмотическим шоком или быстрым многократным замораживанием-оттаиванием), механическими (обработкой УЗ, соударением, гомогенизацией под давлением). Механическое разрушение высокоэффективно, особенно УЗ-излучателями, генерирующими высокочастотные звуковые волны. УЗ-дезинтеграторы состоят из транзисторного генератора УЗ-волн, пьезоэлектрического или магнитострикционного преобразователя, набора рабочих камер (аппарат на основе УЗ-диспергатора УЗДН-1, Россия).

При большом количестве клеток используют баллистическую дезинтеграцию, ее проводят в высокоскоростных шаровых мельницах, куда помещают концентрированную суспензию клеток. Камера мельницы заполнена инертным абразивным материалом (стеклянными, полимерными шариками диаметром 1 мм). Содержимое быстро перемешивают лопасти, насаженные на ось. Большинство клеток разрушаются под действием сдвиговых напряжений, возникающих в результате быстрого движения шариков относительно друг друга, поверхности лопастей и камеры. Условия оптимального разрушения клеток подбирают, варьируя числом и формой лопастей, скоростью перемешивания, числом и размером шариков, геометрией камеры, температурой, концентрацией клеток (аппараты фирмы «Willia. Bachhotem», Швейцария, «GiffordWoodCo», США).

Соударения – клеточную суспензию большой вязкости направляют под давлением на неподвижную поверхность, в месте соприкосновения выделяется большое количество

энергии, разрушающей клетки. Активность клеточных белков при разрушении клеток методом соударения уменьшается незначительно.

Экструзионные методы (продавливание суспензии клеток через капиллярные отверстия) предназначены для обработки жидких или замороженных суспензий клеток. Диаметр отверстий рабочих матриц составляет от нескольких миллиметров до десятых его долей. В гидроэкструдерах давление достигает 2000-4000 кг/см², в твердофазовых экструдерах – 10000-50000 кг/см². После экструзии давление резко сбрасывают, что вызывает лизис клеток. Экструзионные дезинтеграторы производят фирмы «MantonGaulin» (США), LKB (Швеция).

Дальнейшая обработка. После разрушения клеток их осколки удаляют низкоскоростным центрифугированием или микрофльтрацией через мембрану.

Завершающей стадией любого микробиологического производства является выделение целевого продукта из культуральной среды и его очистка. Таким целевым продуктом может быть либо биомасса клеток, либо какой-то продукт клеточного метаболизма. Если целевой продукт находится внутри клетки (накапливается или входит в состав клеточных структур или оболочки), то он является **эндометаболитом**, если выделяется клеткой в культуральную жидкость - **экзометаболитом**.

В большинстве случаев извлечения эндометаболитов необходимо предварительное разрушение клеток. Однако этот процесс удобнее проводить не непосредственно в культуральной среде, извлекаемой из реактора, а с концентратом клеток после удаления культуральной жидкости. Поэтому первым этапом выделения большинства продуктов микробиологического синтеза является отделение биомассы микроорганизмов продуцентов из культуральной жидкости. При этом в зависимости от типа используемых микроорганизмов могут применяться самые различные методы.

Для отделения бактериальных культур применяются вакуум-фильтры: нутч-фильтры, ленточные, барабанные, камерные. Фильтрация бактериальных суспензий сопряжена с большими трудностями, которые обусловлены малым размером клеток, высокой вязкостью суспензий и наличием большого количества примесей микрочастиц. Поэтому стадии фильтрования обычно предшествует предварительная обработка суспензий с целью максимально возможной коагуляции клеток и примесей в более крупные и легко фильтруемые частицы. Применяются несколько видов **коагуляции**: тепловая, органическими и неорганическими кислотами, неорганическими солевыми электролитами (**Na₂SiO₃**, **Na₂HPO₄**), которые взаимодействуют с ионами **Ca²⁺**, находящимися в культуральной жидкости, с образованием труднорастворимых соединений.



Образующиеся частицы осадка захватывают клетки микроорганизмов и примеси.

Процесс коагуляции улучшается при использовании комбинированных методов, таких, как кислотная и тепловая, электролитная и тепловая коагуляция. Эффективным методом коагуляции суспензий является обработка их высокомолекулярными полиэлектролитами - флокулянтами. При этом в отличие от обычной коагуляции образуются флоккулы, или осадки рыхлой структуры, что значительно улучшает процесс фильтрации.

Образующиеся в результате коагуляции и флокуляции крупные частицы перед фильтрованием могут быть подвергнуты **седиментации** (осаждению под действием силы тяжести) с последующей **декантацией** надосадочной жидкости, которая далее может быть дополнительно очищена фильтрованием.

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 используют барабанный фильтр с намывным слоем - аппарат полунепрерывного действия. Перед работой на фильтрующую поверхность барабана намывают дренажный слой наполнителя, представляющего собой порошок диатомита, фильтрперлита (размолотые вулканические породы, содержащие SiO_2 и Al_2O_3) или древесной муки. Особенность работы такого фильтра (в отличие от обычного вакуум-барабанного) состоит в том, что нож, предназначенный для съема осадка с барабана, имеет специальную микрометрическую подачу. 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.

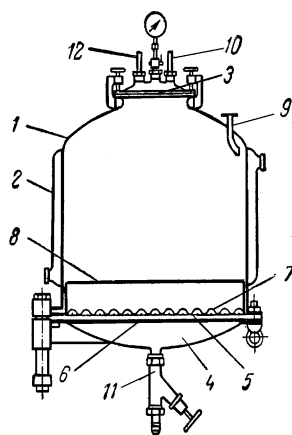


Рис. 1. Нутч, работающий под давлением до 3 ат:

1 — корпус; 2 — рубашка; 3 — съемная крышка; 4 — перемещающееся дно; 5 — фильтровальная перегородка; 6 — опорная перегородка; 7 — защитная сетка; 8 — кольцевая перегородка; 9 — штуцер для подачи суспензии; 10 — штуцер для подачи сжатого воздуха; 11 — штуцер для удаления фильтрата; 12 — предохранительный клапан.

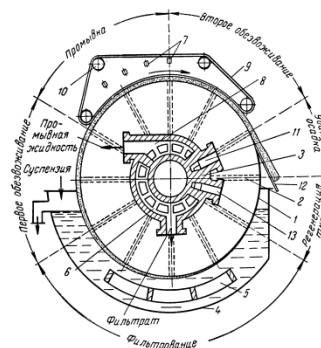


Рис. 2. Схема действия барабанного вакуум-фильтра с наружной поверхностью фильтрования:

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 — разбалтывающее устройство; 9 — бесконечная лента; 10 — направляющий ролик; 11, 13 — полости распределительного устройства, сообщающиеся с источником сжатого воздуха; 12 — нож для съема осадка.

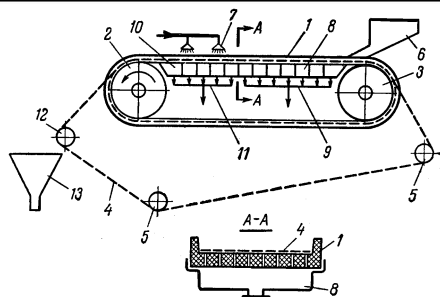


Рис.3. Ленточный вакуум-фильтр:

1 — опорная резиновая лента; 2 — приводной барабан; 3 — натяжной барабан; 4 — фильтровальная ткань; 5 — натяжные ролики; 6 — лоток для подачи суспензии; 7 — форсунки для подачи промывной жидкости; 8 — вакуум-камеры для фильтрата; 9 — коллектор для фильтрата; 10 — вакуум-камеры для промывной жидкости; 11 — коллектор для промывной жидкости; 12 — направляющий ролик; 13 — бункер для осадка.

Для предварительного концентрирования (сгущения) более крупных и тяжелых клеток дрожжей и микрогрибов широко используют **флотацию**. Основной движущей силой флотации являются всплывающие пузырьки газа, которые захватывают клетки и выносят их на поверхность. В результате над слоем отработанной культуральной жидкости образуется пенный слой, в котором сконцентрированы клетки. Процесс проводят в специальных аппаратах - флотаторах, в которых нагнетают воздух и, в зависимости от их конструкции, диспергируют его через барботер или эжектор, пену гасят и выводят сконцентрированную в 4-6 раз суспензию клеток (получение пекарских дрожжей).

Для последующего концентрирования и отделения биомассы грибов и дрожжей используют **сепарирование** (одноступенчатое или многоступенчатое) для разделения суспензий и эмульсий, а так же **центрифугирование** для отделения твердых осадков и клеток от культуральной жидкости. Так для сгущения суспензии дрожжей от 20-30 г/л до 550-600 г/л с помощью сепаратора- сгустителя непрерывного действия тарельчатого типа **СОС-501 К-3**, необходимо последовательное сепарирование в 2-3 ступени. С помощью центрифуг различных конструкций удастся отделять из культуральных жидкостей бактерии, дрожжи, мицелиальные грибы. Наличие в культуральной жидкости высоковязких компонентов, таких как различные экзополисахариды типа декстрана, аубазидана, пуллулана и др. существенно затрудняет процесс центрифугирования.

Для извлечения целевых продуктов эндометаболитов из концентрата микробной биомассы ее либо обрабатывают каким-либо экстрагентом без разрушения клеток (экстракция петролейным эфиром биожира из кормовой биомассы дрожжей, извлечение полиеновых антибиотиков), либо клетки разрушают каким-либо из методов, а затем экстрагируют продукты.

Для разрушения (дезинтеграции) клеток применяют целый набор методов, которые можно отнести к трем основным группам: **физико-механические, химические и энзиматические** (ферментные) методы. Все процедуры должны быть достаточно жесткими, чтобы разрушить клеточную стенку, и в то же время достаточно мягкими, чтобы исключить денатурацию или разрушение целевого продукта. А поскольку клеточные стенки у разных микроорганизмов состоят из различных полимеров (иногда сопоставимых или

превосходящих по прочности лучшие сорта стале́й), то никакого универсального метода их разрушения не существует.

К **физическим** методам относятся: разрушение клеток баллистическим способом с применением бус баллотини, кварцевого песка, растирание клеток в дисковой мельнице, дробление замороженных в жидком азоте или в сухом льде клеток; экструдирование клеток под высоким давлением (2-5 атм) через узкую щель или отверстие; гадодекомпрессионная дезинтеграция, основанная на создании в камере с разрушаемым материалом высокого давления и быстрым сбросом его, приводящим к разрыву клеточных стенок; ультразвуковая дезинтеграция.

Энзиматические методы основаны на применении литических ферментов, разрушающих клеточную стенку: **лизоцима**, выделяемого из белка куриных яиц и разрушающего главным образом оболочки бактериальных клеток; ферментного комплекса, содержащегося в желудочном соке улитки **Helix pomatia** или продуцируемого некоторыми видами актиномицетов, лизирующего оболочки эукариотических клеток, в частности грибов.

Химические методы дезинтеграции основаны на разрушении клеточной оболочки под воздействием щелочей, кислот, детергентов, ингибиторов синтеза оболочки клетки.

Выбор метода дезинтеграции определяется целью работы: для получения внутриклеточных ферментов наиболее приемлемы баллистические и экструзионные способы; энзиматические методы широко применяют в научных исследованиях для выделения в целости различных субклеточных структур (органелл, мембран и т.д.), а так же для получения протопластов. Применение химических методов дезинтеграции микроорганизмов ведет к нарушению целостности клеточных структур, инактивации ферментов. Поэтому химические методы обычно применяют для получения пищевого белка и биожира из дрожжей.

В результате обработки клеточной биомассы по одному из методов дезинтеграции получают гомогенат, содержащий неразрушенные клетки, оболочки разрушенных клеток, обрывки мембран, различные клеточные структуры, которые могут быть отделены путем фильтрования. При этом большая часть веществ-эндометаболитов переходит в культуральную жидкость или раствор экстрагента.

Дальнейшее выделение и очистка целевых продуктов из культуральной жидкости или экстрактов зависит от их химической и физической природы.

Для извлечения таких соединений, как спирты, карбонильные соединения, кислоты, их производные, большинство антибиотиков, витаминов, алкалоидов, применяют обычные приемы и методы, используемые в химической технологии (перегонку, выпаривание, экстракцию, перекристаллизацию, возгонку и др.). В качестве примера приведем технологию экстракционного выделения бензилпенициллина из культуральной жидкости.

Современное производство бензилпенициллина включает в себя стадию глубинного культивирования микроорганизма-продуцента с последующим извлечением целевого продукта из культуральной жидкости.

На первом этапе мицелий отфильтровывается от культуральной жидкости (обычно на барабанных вакуум-фильтрах непрерывного действия). Фильтрат культуральной жидкости (нативный раствор) затем подвергается предварительной обработке (дополнительная фильтрация с применением активированного угля).

Выделение пенициллина из нативного раствора основано на способности пенициллина в виде кислоты растворяться в бутилацетате, в воде он нерастворим. Калиевая соль пенициллина, напротив, хорошо растворима в воде и нерастворима в бутилацетате. В производстве после передачи нативного раствора цеху химической очистки в сборник нативного раствора перед началом экстракции добавляют 0.03-0.06 масс.%дезэмульгатора (авироль) для лучшего разделения эмульсии.

Нативный раствор из сборника подают в эмульгатор, куда одновременно подается 9-12% раствор H_2SO_4 и охлажденный бутилацетат. В эмульгаторе происходит смешивание всех трех компонентов и экстрагирование бензилпенициллина (кислоты) бутилацетатом. Температуру процесса поддерживают в пределах $10-12^{\circ}C$, рН среды – $2,8 \pm 3,0$. При таком значении рН резко уменьшается степень диссоциации карбоксильных групп молекул бензилпенициллина, в недиссоциированном состоянии они переходят в органическую фазу (бутилацетат). Более сильные кислоты и другие электролиты находятся в диссоциированном состоянии и поэтому не растворяются в бутилацетате; в водной фазе остаются почти все минеральные компоненты, аминокислоты, водорастворимые белки. Затем эмульсия поступает в экстрактор, где дополнительно обрабатывается бутилацетатом.

Далее бутилацетатный экстракт последовательно отмывают обессоленной водой и подвергают двухступенчатой экстракции водным раствором бикарбоната натрия при рН = 7,3 -7,8 . При этих условиях пенициллин находится в диссоциированном состоянии и хорошо растворяется в водной фазе и практически не растворим в бутилацетате. На данной стадии удастся, очистится от примесей (в основном органических), являющихся более слабыми кислотами, чем бензилпенициллин.

Из бикарбонатного экстракта антибиотик вторично экстрагируют бутилацетатом при рН = 2,2 – 2,5.

Полученный вторичный бутилацетатный экстракт осветляют обработкой с активированным углем, далее вымораживают при $-5^{\circ}C$ в течение 20-30 минут, отфильтровывают от кусочков льда и кристалликов сульфата натрия, обезвоживая, таким образом, бутилацетатный экстракт.

Выделение калиевой соли бензилпенициллина из бутилацетатного экстракта проводят путем добавления рассчитанного количества насыщенного раствора ацетата калия (раствор ацетата калия готовят в отдельном аппарате).

Полученную калиевую соль дополнительно очищают перекристаллизацией из водно-бутанольного раствора, полученные кристаллы отфильтровывают, промывают безводным бутанолом и сушат.

Наибольшую сложность представляет выделение продуктов белковой природы: ферментных препаратов, белковых антител, вакцин, гормонов и других физиологически активных веществ. Поэтому рассмотрим подробнее особенности их выделения и очистки на примере получения ферментных препаратов.

IV. Иллюстративный материал: прилагается

V. Литература:

основная:

- 131.Егорова Т.А., Клунова С.М., Живухина Е.А. Основы биотехнологии. – М.: Изд. центр «Академия», - 2008. – 208 с.
- 132.Евтушенков А.Н., Фомичев Ю.К. Введение в биотехнологию: Курс лекций. – Минск.: БГУ, 2002. - 105 с.
- 133.Сазыкин Ю.О., Орехов С.Н., Чакалева И.И. Биотехнология: Учебное пособие. – М.: Изд. Центр «Академия». – 2006. – 256 с.
- 134.Орехов С.Н. Фармацевтическая биотехнология. Руководство к практическим занятиям. – Учебное пособие. – Под ред. акад. РАМН В.А. Быкова, проф. А.В Катлинского. – М. : ГЭОТАР-Медиа 2009. – 384 с.
- 135.Елинов Н.П. Химическая микробиология. - Учебник. - М.: Высшая школа. - 1989, 448 с
- 136.Воробьева Л.И. Промышленная микробиология. - Учебное пособие. - М.: Изд-во МГУ. - 1989, 294 с.
- 137.Биотехнология. Принципы и применение. Пер. с англ. / Под ред. И. Хиггинса, Д. Беста, Дж. Джонса. - М.: Мир. - 1988, 480 с.
- 138.Чуешов В.И., Зайцев А.И., Шебанова С.Г. Промышленная технология лекарств. Том 2. Харьков, 2002.
- 139.Биотехнология микробного синтеза (Под ред. Бекера М.Е.) – Рига – 1980.
- 140.Биотехнология. (Отв. редактор А.А. Баев). - М.: Наука. - 1984, 310 с.
- 141.Перт С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов. М., - 1979 г.
- 142.Промышленная микробиология (Под ред. Егорова Н.С.) – М., 1989 г.
- 143.Процессы и аппараты химической технологии (Под ред. П.Г. Романкова). – Л. – 1981.

дополнительная:

61. Березов Т.Т. , Коровкина Б.Ф. – Биологическая химия (Под ред. И.М. Ивановой) – М., Медицина – 1981 г.
62. Никитин Г.А. – Биохимические основы микробиологических производств – Киев, 1981.
63. Бриттон Г. – Биохимия природных пигментов. М., Мир – 1986 г.
64. Попова Т.В. – Развитие биотехнологии в СССР – М., Наука - 1988 г.
65. Популяционные аспекты биотехнологии – Печуркин Н.С., Брильков А.В., Маркенкова Т.В. – Новосибирск: - Наука – 1990 г.
66. Специальные журналы: «Биотехнология», «Фармация Казахстана», «Фармацевтический бюллетень» и др.

VI. Контрольные вопросы (обратная связь):

37. Назовите методы отделения биомассы от культуральной жидкости.
38. Что такое дезинтеграция и применяемые методы?
39. В чем разница между эндометаболизмом и экзометаболизмом?

Лекция № 20-21

I. Тема: Методы очистки целевых продуктов от высокомолекулярных веществ, выделяющихся при лизисе клеток продуцента. Экстракционные, сорбционные и другие методы, применяемые для избирательного извлечения целевых продуктов из культуральной жидкости. Применяемое технологическое оборудование. Требования к нему.

II. Цель: Ознакомить студентов с методами очистки целевых продуктов от высокомолекулярных веществ, а также с экстракционными, сорбционными методами применяемых для избирательного извлечения целевых продуктов из культуральной жидкости.

III. Тезисы лекции:

Основы технологии выделения, концентрирования и очистки белковых и ферментных препаратов

Проведение этих стадий процесса обусловлено рядом технических сложностей, связанных, в основном, с нестабильностью (лабильностью) ферментов, потерей им активности под влиянием незначительных изменений внешних условий. Поэтому при выборе технологии выделения, концентрирования и очистки ферментных препаратов ищут решения, позволяющие проводить эти процессы в непрерывном режиме, с высокой скоростью, в "мягких" условиях и добиваться максимального обезвоживания образующихся осадков. Для уменьшения потерь продуктов применяют различные стабилизаторы ферментов, проводят процесс при оптимальном значении рН растворов, стараются обеспечить максимально возможную механизацию и автоматизацию всех процессов.

Для предварительного концентрирования растворов ферментов перед их осаждением и сушкой используют процесс **вакуум-упаривания**. Его стараются проводить при нейтральных значениях рН раствора. При значениях рН раствора меньше 4,5 и больше 8,2 активность ферментов начинает падать уже при нагревании раствора выше 35°C. При рН = 6 тот же эффект наблюдается лишь при температуре выше 50°C. Установлено, что чем меньше время выпаривания, тем выше может быть температура греющего агента, а выпаривание наиболее очищенного раствора ферментов сопровождается большей потерей активности фермента.

Последнее объясняется тем, что присутствующие в растворе примеси "защищают" выделяемый фермент от неблагоприятных температурных воздействий.

Процесс выпаривания чаще всего проводят в пленочных или роторных выпарных аппаратах. Потеря активности фермента в таком процессе может достигать 5-20%. С целью возможного снижения этой величины к выпариваемому раствору добавляют белки-стабилизаторы: альбумин, казеин или осуществляют выпаривание вместе с клетками продуцента. В качестве стабилизаторов используют и такие соли, как хлориды кальция, натрия и ацетат кальция. Правильный в качественном и количественном отношении подбор стабилизаторов позволяет при минимально допустимых потерях активности ферментов увеличить скорость процесса выпаривания раствора за счет повышения температуры греющего пара.

Технически более сложно осуществить процесс вакуум-упаривания непосредственно культуральных жидкостей. По сравнению с водными экстрактами содержание сухих веществ в них в 4-5 раз ниже и составляет 2,5-3,5%. В ходе концентрирования раствора в осадок

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA АКАДЕМИАСЫ «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144

выпадают гидроксиды, сульфаты, карбонаты и фосфаты кальция, магния и других металлов. Это приводит к изменению солевого состава и рН раствора, что способствует инактивации фермента.

Часто полученный в процессе упаривания культуральной жидкости концентрат ферментов отделяют от осадка и, не подвергая дальнейшей очистке, добавляют к нему раствор хлорида натрия, чтобы довести концентрацию препарата в нем до 50% и предотвратить инфицирование продукта посторонней микрофлорой. Полученный таким образом препарат марки Г2х разливают по емкостям в 40-50 мл и отправляют потребителю.

Для концентрирования и выделения ферментных препаратов часто применяют процесс **высаливания**. Он основан на уменьшении растворимости большинства белков в солевых растворах. Для этой цели в технологии чаще всего используют сульфат аммония как наиболее дешевый и хорошо растворимый реагент. Однако недостатком использования сульфата аммония является выделение аммиака при повышенных значениях рН раствора, что приводит к коррозии металлических частей оборудования.

Тот же эффект высаливания достигается при использовании сульфата натрия вместо сульфата аммония. Однако из-за меньшей по сравнению с сульфатом аммония растворимостью его можно использовать при температурах раствора не ниже 35-40°C. При охлаждении раствора наблюдается выпадение осадка сульфата натрия, что создает возможность его регенерации и повторного использования. Однако использование сульфата натрия предполагает повышение энергозатрат на нагревание растворов, а пребывание ферментов в условиях повышенных температур способствует их инактивации.

При проведении процесса высаливания большое значение имеет режим осуществления контакта соли с раствором фермента. Для высаливания можно брать соль в виде тонкоизмельченного порошка или в виде насыщенного раствора. В последнем случае процесс можно проводить в периодическом или непрерывном режиме. Установлено, что наибольший эффект - минимально необходимое количество соли на 1 кг осаждаемого белка - достигается при использовании соли в виде тонко измельченного порошка. Наименьший эффект достигается при непрерывном смешении насыщенного раствора соли с раствором фермента. Для достижения того же процента высаливания в последнем случае соли требуется в 1,3-1,5 раза больше.

Время образования осадков белков при высаливании для различных ферментов колеблется в пределах 0,5-12 часов. Время высаливания и необходимое для проведения процесса количество соли зависят от количества (процентного содержания) растворенных веществ. Чем их больше, тем меньшее количество воды подлежит связыванию. Так, например, для получения 1 кг препарата из культуральной жидкости требуется 45-50 кг соли, а из упаренного до 30%-ной концентрации раствора - только 1,4-1,6 кг.

В получаемых таким образом осадках белка содержится 60-85% балластных веществ, в том числе 30-45% соли. Повторное использование операций растворение - высаживание дает возможность получать высокоочищенные ферментные препараты для медицинских целей.

Варьируя такие параметры, как температура и рН среды, в ряде случаев, возможно, осуществить фракционное высаживание белков. Для этого в присутствии соли изменяют рН исходного раствора или температуру, добиваясь денатурации балластной фракции белка. Последние необратимо выпадают в осадок, который отделяют от маточного раствора. На последующей стадии уже выделяют целевой ферментный препарат.

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA АКАДЕМИАСЫ «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144

Довольно часто вместо соли используют полиэтиленгликоль с молекулярной массой 6000. Он оказывает стабилизирующее воздействие на активные белки, легко отделяется от белка методом ионообменной хроматографии или ультрафильтрации.

В технологии выделения ферментов методом осаждения значительное место занимает процесс получения активных белков осаждением их с помощью органического растворителя. Действие органических растворителей основано на снижении диэлектрической постоянной среды, которая определяет величину силы электростатического взаимодействия между молекулами растворенного белка и растворителя. Устойчивость белковых растворов обусловлена толщиной гидратного слоя, окружающего молекулу белка. При разрушении этого гидратного слоя молекулы белка начнут образовывать конгломераты и выпадать в осадок. Для осуществления такого процесса необходимо использовать вещества более гидрофильные, чем осаждаемый белок. В качестве растворителей используют, в основном, этанол, метанол, изопропанол и ацетон. Варьируя тип органического растворителя, его количество, величину рН раствора можно проводить избирательное осаждение той или иной фракции белков.

В технологии процесс осаждения органическим растворителем проводят в реакторе непрерывного и периодического действия. Для снижения процента потерь активности выделяемого фермента при смешении растворителя с водным раствором активных белков обе жидкости первоначально охлаждают до температур соответственно $-5 \pm -8^\circ \text{C}$ и $5 \pm 6^\circ \text{C}$. Полученную смесь, содержащую не менее 8-10% белков, тщательно перемешивают, и через 20-30 мин происходит выпадение мелких частиц белка. Процесс осаждения проводят в вертикальном цилиндрическом аппарате с коническим днищем, снабженным мешалкой и рядом штуцеров для удаления жидкой фазы. Потеря активности фермента на этой стадии составляет около 15%, в основном, по причине длительного контакта фермента с органическим растворителем. Организация процесса по способу непрерывного осаждения при времени контакта 10-15 мин позволяет снизить потери активности фермента на 20-25%.

Полученный на этой стадии осадок отделяют на центрифуге, промывают чистым этанолом и вновь сепарируют до остаточной влажности 30-35%.

Для получения высокоочищенных ферментных препаратов, полученные на стадии выделения активные белки подвергают, как правило, **сорбционной чистке**. Поскольку в молекуле фермента присутствуют функциональные группы, сообщающие ей кислотный или основной характер, то обычно для этой цели используют метод ионного обмена на ионитах, полученных на основе целлюлозы: катионит КМЦ (карбоксиметилцеллюлоза) и анионит ДЭАЭ (диэтиламиноэтилцеллюлоза).

В последние годы число различных ионитов сильно возросло, и для конкретного производства ферментного препарата существует возможность выбрать наилучший. Среди ионитов, получивших достаточно широкое распространение, необходимо отметить такие, как обработанный крахмал, сефадексы на основе декстрана, катиониты на основе полиметакриловой кислоты, аниониты на основе поливинилового спирта и др.

Процесс проводят в насадочных колоннах, через которые пропускается раствор фермента, или в аппаратах с мешалкой. В последнем случае предполагается последующее отделение твердой фазы.

Десорбцию осуществляют элюирующими растворами, специально подобранными для каждого фермента и сорбента.

Потери фермента на стадии сорбционной чистки не превышают 15%. Для получения более высокоочищенных ферментов используют различные препаративные методы. Среди них наибольшее распространение получили такие, как **диализ, гельфильтрация, вымораживание, электрофорез, аффинная хроматография и др.**

Диализ - процесс диффузии ионов через полимерную мембрану под действием градиента концентраций. При этом за счет диффузии через мембрану удаляются соли и другие низкомолекулярные продукты, а их место в исходном растворе ферментного препарата занимают молекулы растворителя, в данном случае воды. И хотя исходный раствор фермента при этом увеличивается в объеме, но активность его возрастает в 3-4 раза.

В последние годы с развитием промышленности по производству синтетических пленок сильно возрос интерес к использованию процесса диализа в промышленном масштабе и был создан для его осуществления ряд промышленных установок.

Разновидностью процесса диализа является **электродиализ**. Перенос ионов через мембраны осуществляется в этом случае не за счет градиента концентраций, а под действием электрического поля.

Вымораживание - метод основан на частичном замораживании раствора ферментного препарата. Образующиеся при этом кристаллы льда отделяют на центрифуге. Фермент концентрируется в водной фазе. Подбирая условия замораживания исходного раствора можно фракционировать белки по составу и еще более сконцентрировать целевой фермент.

Электрофорез - метод, основанный на различной подвижности ионов в электрическом поле. Процесс достаточно длительный. За счет диффузии может происходить размытие концентрационных зон. Частичная интенсификация процесса возможна за счет создания температурного градиента. Применяется, в основном, для получения высокоочищенных препаратов в лабораторных условиях.

Аффинная хроматография – метод, основанный на способности ферментов избирательно связывать те или иные лиганды - субстраты, коферменты, конкурентные ингибиторы, аллостерические эффекторы и т.п. Такое связывание весьма специфично, что позволяет выделить тот или иной фермент из множества других белков.

Для синтеза аффинного сорбента, соответствующего специфичности данного фермента, лиганд (субстрат или его аналог) присоединяют к инертной матрице (макропористые гидрофильные гели, синтетические полимеры, неорганические носители).

Для глубокой очистки целевых продуктов применяют следующие операции:

Адсорбционно-хроматографические методы

Эти методы широко внедряются в производство ферментов, гормонов, рекомбинантных ДНК; для получения БАВ растительного и животного происхождения, к чистоте которых предъявляют особенно жесткие требования, традиционная технология очистки не подходит. В промышленном производстве успешно себя зарекомендовала распределительная хроматография, самый надежный и эффективный метод очистки. В настоящее время широко используют непрерывную колоночную и ступенчатую хроматографию. В табл. 8.1. приведены несколько известных хроматографических методов, основанных на различных параметрах разделяемых молекул.

Таблица 8.1.

Хроматография түрлері	Қолданылатын молекулалардың қасиеттері
Ионообменная	Заряд
Гель-фильтрация	Размер
Гидрофобная	Полярность

Ионообменная хроматография

Хроматография БАВ с помощью ионообменных сорбентов, называемая ионообменной, является одним из методов разделения, имеющих наибольшую продолжительную историю развития. В настоящее время промышленная ионообменная хроматография стала одной из важнейших технологических стадий получения коммерчески значимых количеств БАВ.

В основе ионообменной хроматографии лежит реакция обмена между неподвижным твердым ионообменным сорбентом и растворенным в растворителе веществом.

Гель-фильтрация

Гель-фильтрация, или хроматография на молекулярных ситах, позволяет разделять вещества с различными молекулярными массами. В этом случае насадка колонки состоит из частиц геля с определенным диаметром пор. Если размер молекул больше диаметра пор, то они не могут диффундировать в гель и быстро проходят через колонку, тогда как молекулы меньшего размера проникают в гель и поэтому движутся более медленно (рис. 8.2).

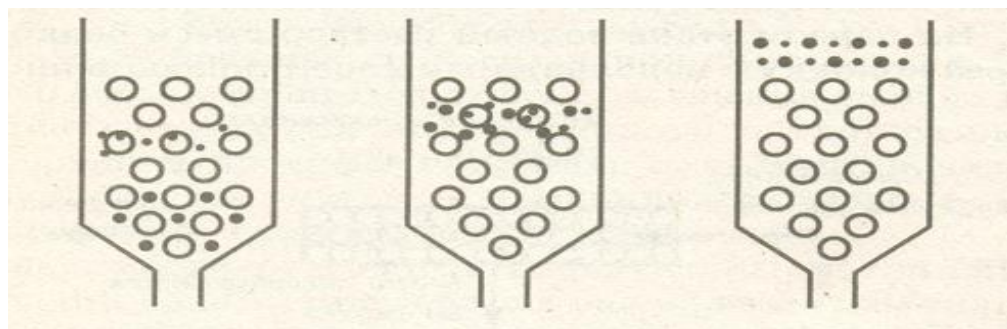


Рис. 8.2. В хроматографии на молекулярных ситах молекулы большего размера быстрее проходят через колонку, а молекулы меньшего размера задерживаются, проникая в частицы геля

В качестве сорбентов обычно используют сефадексы G₂₅, G₅₀, G₇₅, G₁₀₀, состоящие из полимерных цепей полисахарида декстрана, соединенные через определенные промежутки поперечными связями и образующие своеобразные молекулярные сита. В химико-фармацевтической промышленности более широкое применение находят сефадексы G₂₅ и G₅₀ в виде гранул с диаметром пор 100- 30 мкм и 20-80 мкм соответственно. Проницаемость мембраны для каждого из веществ смеси определяется величиной молекулы. В этой связи гель-хроматографию иногда называют молекулярным просеиванием. Определенный объем растворителя вымывает из колонки вещества с большей молекулярной массой (сефадексы G₂₅), и с меньшей молекулярной массой (G₂₅, G₅₀).

Основной величиной, измеряемой в гель-хроматографии, является удерживаемый объем V_e :

$$V_e = V_0 + K_d \cdot V_p,$$

где V_0 и V_p - объемы подвижной и неподвижной хроматографических фаз;

K_d - коэффициент распределения, который зависит от соотношения размеров молекул и пор.

Гель-фильтрация – метод, малочувствительный к составу образца, используются в основном при удалении осадителя, замене буфера и обессоливании.

Гидрофобная хроматография

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA АКАДЕМИАСЫ «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144

Метод гидрофобной хроматографии используют для разделения БАВ на основе гидрофобных свойств, характерных для биологических объектов.

В основе механизма селективности при гидрофобной хроматографии лежит проявление так называемого гидрофобного эффекта, а также модуляция электростатических взаимодействий, вследствие понижения локальной диэлектрической постоянной среды при введении неполярных радикалов или понижении активности растворителя.

Гидрофобная хроматография реализуется в виде нескольких различных процессов. В наиболее часто встречаемом варианте сорбция амфифильных соединений гидрофобными сорбентами осуществляется из разбавленных водных растворов при низких значениях pH (2,0-4,0), а элюация – путем снижения так называемой элюотропной силы подвижной фазы, достигаемой изменением pH, уменьшением полярности элюента (при добавлении спиртов, детергентов и других органических модификаторов). Этот вид хроматографии получил название обратнофазной (ОФХ).

При введении в раствор амфифильных соединений, способных вступать во взаимодействие с разделяемыми менее гидрофобными компонентами, сорбентами осуществляется из разбавленных водных растворов при низких значениях pH (2,0-4,0), а элюация – путем снижения так называемой элюотропной силы подвижной фазы, достигаемой изменением pH, уменьшением полярности элюента (при добавлении спиртов, детергентов и других органических модификаторов). Этот вид хроматографии получил название обратнофазной (ОФХ).

При введении в раствор амфифильных соединений, способных вступать во взаимодействие с разделяемыми менее гидрофобными компонентами, последние все же можно разделить. Таким методом на неполярных сорбентах удается разделить даже ионизированные соединения, если добавить в раствор противоположно заряженные амфифильные соединения, способные образовывать ионные пары с изучаемыми компонентами. Этот вид хроматографии был назван ион-парной обратнофазной хроматографией.

Гидрофобное взаимодействие реализуется также и при так называемой высаливающей хроматографии (ВХ), часто называемой хроматографией гидрофобных взаимодействий, основной прием которой заключается в сорбции амфифильных соединений из водных растворов при большой концентрации солей с последующей элюацией солевыми растворами с более низкой ионной силой или водой. Иногда элюацию осуществляют таким образом, что одновременно с уменьшением концентрации соли повышают концентрацию гидрофобного вытеснителя. Как в обратнофазной, так и высаливающей хроматографии могут использоваться одни и те же типы сорбентов с пришитыми неполярными радикалами.

Аффинная хроматография

Интересным хроматографическим методом является аффинная хроматография, основанная на негативной специфичности некоторых биополимеров, особенно если они содержатся в культуральной жидкости в небольших концентрациях - менее 1 мкг/мл. В этом методе хорошее разделение достигается за счет специфического взаимодействия между иммобилизованным агентом и растворенным веществом.

Между аффинной хроматографией и другими более традиционными методами адсорбционной или ионообменной хроматографии существуют значительные различия. В традиционных хроматографических методах сначала адсорбируются все компоненты

смеси, а их разделение осуществляется на стадии десорбции посредством, например, замены концентрации элюента, или концентрации солей в элюенте, или постепенного повышения рН элюента. Напротив, специфичность аффинной хроматографии определяется в основном на стадии сорбции (рис.8.3). Поэтому в аффинной хроматографии через колонку целесообразно пропускать раствор разделяемой смеси в течение достаточно длительного промежутка времени, пока не будет достигнуто насыщение неподвижной фазы, так как в ней адсорбируются практически только выделяемые соединения. Таким образом, проведение разделения БАВ в аффинной хроматографии приближается к обычной сорбции в неподвижном слое вплоть до насыщения слоя адсорбента и резко отличается от обычного разделения многокомпонентной смеси, вводимой в колонку однократно в виде концентрированного раствора.

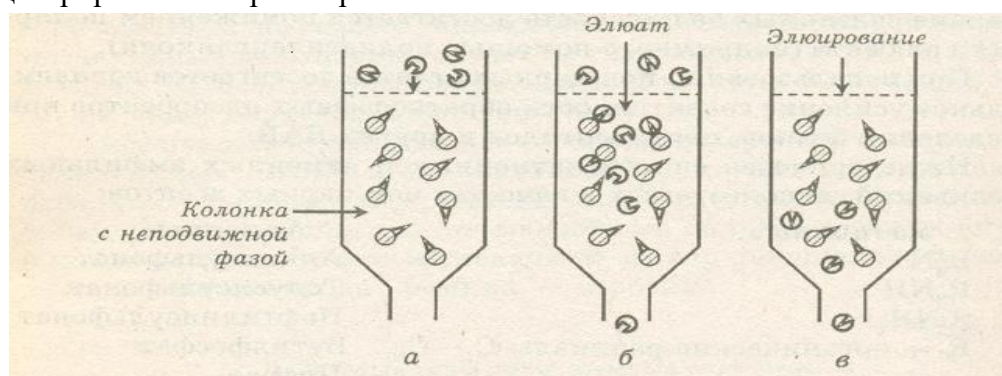


Рис. 8.3. Схематическое представление аффинной хроматографии:

а – ввод смеси веществ; б – разделение; в – элюирование связанного; с- неподвижной фазой компонента смеси

В этом методе хорошее разделение достигается за счет специфического взаимодействия между иммобилизованным агентом и растворенным веществом. Показаны три стадии: ввод смеси веществ а, разделение б; элюирование, связанное с неподвижной фазой компонента смеси в.

Кристаллизация

Процесс образования и роста кристаллов из растворов и газовой фазы называют кристаллизацией. Обычно вещества имеют строго определенную кристаллическую решетку, за исключением полиморфных веществ. Ряд веществ образуют кристаллогидраты, причем количество включенных молекул воды зависит от температуры. Для образования кристаллов из растворов необходимо пресыщение, определяемое разностью исходной концентрации a_n и равновесной концентрации насыщения (предельной растворимости A_n). Кристаллизация происходит, когда переход вещества из жидкого в твердое состояние сопровождается уменьшением свободной энергии системы Φ , т.е.

$$\Delta\Phi=(pV/M) \cdot (\varphi_2-\varphi_1)+ \sigma F \leq 0$$

где p - плотность зародыша кристалла;

V/F - его объем и поверхность;

M - его молекулярная масса;

$(\varphi_2-\varphi_1)$ - химические потенциалы исходной и новой фаз;

σ - межфазное поверхностное натяжение.

Для получения крупно кристаллического порошка кристаллизацию ведут при малом пресыщении, в раствор вводят затравочные кристаллы, мелкие кристаллы удаляют в процессе кристаллизации, кристаллический продукт повторно обрабатывают в насыщенном растворе (при этом мелкие кристаллы растворяются), вводят в раствор посторонние примеси, повышают температуру (ограниченно).

Методы кристаллизации: выпаривание растворителя (изотермический), охлаждение горячих растворов (изогидрический), одновременное охлаждение и выпаривание (комбинированный), добавление в раствор других веществ, снимающих растворимость (высаливание), вымораживание.

Схемы кристаллизации: однократная (с полным возвратом маточного раствора и периодически полным сливом, с частичным его возвратом, с частичным возвратом после дополнительного упаривания и кристаллизации), двукратная с такими же манипуляциями маточным раствором, причем на слив дают маточный раствор после первого кристаллизатора, а после второго - насыщенный маточный раствор возвращают в первый кристаллизатор.

В фармацевтической промышленности кристаллизацией выделяют твердые вещества из их растворов, разделяют смеси веществ на фракции и очищают их от примесей. Для очень глубокой очистки термолabile веществ, следовало бы использовать зонную плавку, для разделения эфетических расплавов или веществ с низкими коэффициентами распределения - экстракционную кристаллизацию. При разделении эфетических и азеотропных расплавов целесообразно сочетать процессы кристаллизации и ректификации.

Экстракция в системах жидкость-жидкость

В основе жидкостной экстракции лежит переход вещества из одной жидкости (раствора) в другую, не смешивающуюся с первой.

В результате взаимодействия экстрагента с исходной жидкостью получают экстракт-раствор извлеченных веществ и рафинат-остаточный исходный раствор, обедненный извлекаемыми веществами и содержащий некоторое количество экстрагента. Переход веществ, происходит при наличии разности концентрации между жидкими фазами до динамического равновесия между ними. Согласно этому закону отношение равновесных концентраций распределяемого между двумя жидкими фазами вещества есть величина постоянная (для данной температуры), называемая коэффициентом распределения:

$$W = \frac{V}{X},$$

Где V и X - равновесные концентрации распределяемого вещества в экстракте и рафинате, %.

Процесс экстракции в системах жидкость- жидкость состоит из следующих стадий: смешивание исходного раствора с экстрагентом для создания между ними тесного контакта, разделение двух несмешивающихся жидких фаз, регенерация экстрагента, т.е. удаление его из экстракта (раствора) и рафината.

Жидкостная экстракция может быть ступенчатой и *непрерывной*. Ступенчатая экстракция делится на одноступенчатую, которая проходит в одном аппарате, многоступенчатую - экстракция протекает в нескольких аппаратах. Многоступенчатая экстракция может быть прямоточной и противоточной.

В промышленности применяют разнообразные технологические схемы экстракционных процессов. Аппараты для жидкостной экстракции работают по принципу механического перемешивания и гравитации. Аппараты, работающие по принципу механического перемешивания, - это колонны с мешалкой и центробежные экстракторы, использующие центробежную силу для смешивания и разделения фаз. В гравитационных аппаратах используется разность плотностей растворителей. Принцип гравитации лежит в основе работы различных насадочных колонн, с сетчатыми тарелками, колонного типа, распылительных и других конструкций.

V. Иллюстративный материал: прилагается

V. Литература:

основная:

- 144.Егорова Т.А., Клунова С.М., Живухина Е.А. Основы биотехнологии. – М.: Изд. центр «Академия», - 2008. – 208 с.
- 145.Евтушенков А.Н., Фомичев Ю.К. Введение в биотехнологию: Курс лекций. – Минск.: БГУ, 2002. - 105 с.
- 146.Сазыкин Ю.О., Орехов С.Н., Чакалева И.И. Биотехнология: Учебное пособие. – М.: Изд. Центр «Академия». – 2006. – 256 с.
- 147.Орехов С.Н. Фармацевтическая биотехнология. Руководство к практическим занятиям. – Учебное пособие. – Под ред. акад. РАМН В.А. Быкова, проф. А.В Катлинского. – М. : ГЭОТАР-Медиа 2009. – 384 с.
- 148.Елинов Н.П. Химическая микробиология. - Учебник. - М.: Высшая школа. - 1989, 448 с
- 149.Воробьева Л.И. Промышленная микробиология. - Учебное пособие. - М.: Изд-во МГУ. - 1989, 294 с.
- 150.Биотехнология. Принципы и применение. Пер. с англ. / Под ред. И. Хиггинса, Д. Беста, Дж. Джонса. - М.: Мир. - 1988, 480 с.
- 151.Чуешов В.И., Зайцев А.И., Шебанова С.Г. Промышленная технология лекарств. Том 2. Харьков, 2002.
- 152.Биотехнология микробного синтеза (Под ред. Бекера М.Е.) – Рига – 1980.
- 153.Биотехнология. (Отв. редактор А.А. Баев). - М.: Наука. - 1984, 310 с.
- 154.Перт С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов. М., - 1979 г.
- 155.Промышленная микробиология (Под ред. Егорова Н.С.) – М., 1989 г.
- 156.Процессы и аппараты химической технологии (Под ред. П.Г. Романкова). – Л. – 1981.

дополнительная:

67. Березов Т.Т. , Коровкина Б.Ф. – Биологическая химия (Под ред. И.М. Ивановой) – М., Медицина – 1981 г.
68. Никитин Г.А. – Биохимические основы микробиологических производств – Киев, 1981.
69. Бриттон Г. – Биохимия природных пигментов. М., Мир – 1986 г.
70. Попова Т.В. – Развитие биотехнологии в СССР – М., Наука - 1988 г.
71. Популяционные аспекты биотехнологии – Печуркин Н.С., Брильков А.В., Маркенкова Т.В. – Новосибирск: - Наука – 1990 г.
72. Специальные журналы: «Биотехнология», «Фармация Казахстана», «Фармацевтический бюллетень» и др.

VI. Контрольные вопросы (обратная связь):

1. Какие процессы и методы кристаллизации используются в биотехнологическом производстве?
2. Расскажите особенности гель-фильтрации?

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA АКАДЕМИАСЫ «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144

3. Какие еще методы применяются для избирательного извлечения целевых продуктов из культуральной жидкости?

Лекция № 22-23

I. Тема: Основные принципы мембранного разделения биологически активных веществ. Типы и характеристика мембран. Ультрафильтрация. Стерильная фильтрация. Обратный осмос. Аппаратура. Применение метода ультрафильтрации для выделения низкомолекулярных (ферменты, рекомбинантные белки и др.) продуктов из культуральной жидкости и экстракционных вытяжек.

II. Цель: Ознакомить студентов с основными принципами и характеристиками мембран и их разделением, о видах и методах применения фильтрации.

III. Тезисы лекции:

Основные типы и роль мембранных структур в клетке.

Биологические мембраны представляют собой специальные полупроницаемые барьеры, отделяющие внутриклеточное содержимое и содержимое внутриклеточных органелл от окружающей среды. Все биологические мембраны построены по единым принципам, а особенностиструктурной организации и функционирования обусловлены различиями в химическом составе мембран и специфичности межмолекулярных взаимодействий мембранных компонентов.

Необходимость присутствия биологических мембран в клетке

В клетках прокариот (бактерии, риккетсии, микоплазмы) внутриклеточная дифференциация, а, следовательно, и внутриклеточные мембраны отсутствуют. Внутриклеточные органеллы характерны для клеток эукариот (растения, животные). Полагают, что одна из причин такого рода различий состоит в том, что линейные размеры клеток эукариот, как правило, на порядок больше размеров клеток прокариот. Вследствие этого удельная поверхность плазматической мембраны эукариот заметно меньше по сравнению с прокариотами. Развитая сеть внутриклеточных мембран позволяет увеличить удельную поверхность мембран в клетках эукариот и, таким образом, обеспечить оптимальные условия для протекания биохимических процессов на поверхности мембран и внутри отдельных компартментов.

С химической точки зрения разделение клетки на отдельные отсеки исключительно выгодно для координированного и эффективного осуществления биохимических реакций. Во-первых, скорость ферментативных реакций увеличивается за счет локализации во внутриклеточных органеллах, внутренний объем которых значительно меньше общего объема клетки. Это приводит к увеличению концентрации ферментов и субстратов и, как следствие этого, скорости химических реакций. Во-вторых, мембраны внутриклеточных органелл могут физически разделять в пространстве прямые и обратные реакции метаболического цикла. В-третьих, большинство клеточных ферментов работают на поверхности мембран, что в значительной степени повышает эффективность катализа, так как трехмерная диффузия реагирующих веществ заменяется наддумерную. В-четвертых, в обычных условиях мембраны непроницаемы для многих веществ, в том числе для низкомолекулярных ионов, что позволило в процессе эволюции создать специальные механизмы преобразования энергии и передачи информации с использованием потенциальной энергии трансмембранного градиента концентраций некоторых веществ и ионов.

Типы клеточных мембран

Эукариотические клетки содержат различные мембранные органеллы, причем каждая мембрана уникальна по своему составу, особенностям структурной организации и по характеру выполняемых функций. Рассмотрим кратко основные типы клеточных мембранных структур (рис.1).

Плазматическая мембрана образует границу, на которой осуществляется контакт клетки с ее окружением. Она содержит компоненты, участвующие в межклеточных контактах и взаимодействиях, в системах гормонального ответа и транспорта как малых, так и больших

молекулиз клетки и внутрь нее. Плазматическая мембрана чрезвычайно эластична, благодаря чему животные клетки могут довольно сильно изменять свою форму без разрыва мембраны. Большинство растительных и бактериальных клеток, в отличие от животных, не способны менять свою форму, так как они окружены толстой, прочной и малоупругой оболочкой – клеточной стенкой.

Плазматическая мембрана неоднородна по своему составу, она состоит из специализированных участков (апикальный, базолатеральный и инузоидный) которые имеют различное окружение. Плазматическая мембрана может иметь и специализированные структуры, например, микроворсинки, которые значительно увеличивают площадь поверхности мембраны, в результате чего повышается эффективность мембранного транспорта.

Ядерная мембрана состоит из двух мембран, расстояние между которыми составляет от 40 до 70 нм. В некоторых местах наружная и внутренняя мембраны ядра смыкаются; здесь имеются поры, диаметр которых достигает 80 нм. Интересно, что расположение пор меняется на протяжении жизни клетки: в фазе роста они распределены беспорядочно по всей поверхности ядра, в остальных фазах клеточного цикла собираются в определенных местах, а во время деления – вовсе исчезают. Полагают, что поры позволяют комплексам мРНК-белок переходить из ядра в цитоплазму, а регуляторным белкам в обратном направлении.

Ядерная мембрана выполняет не только защитную роль, но и служит передатчиком информации между ядром и остальной частью клетки.

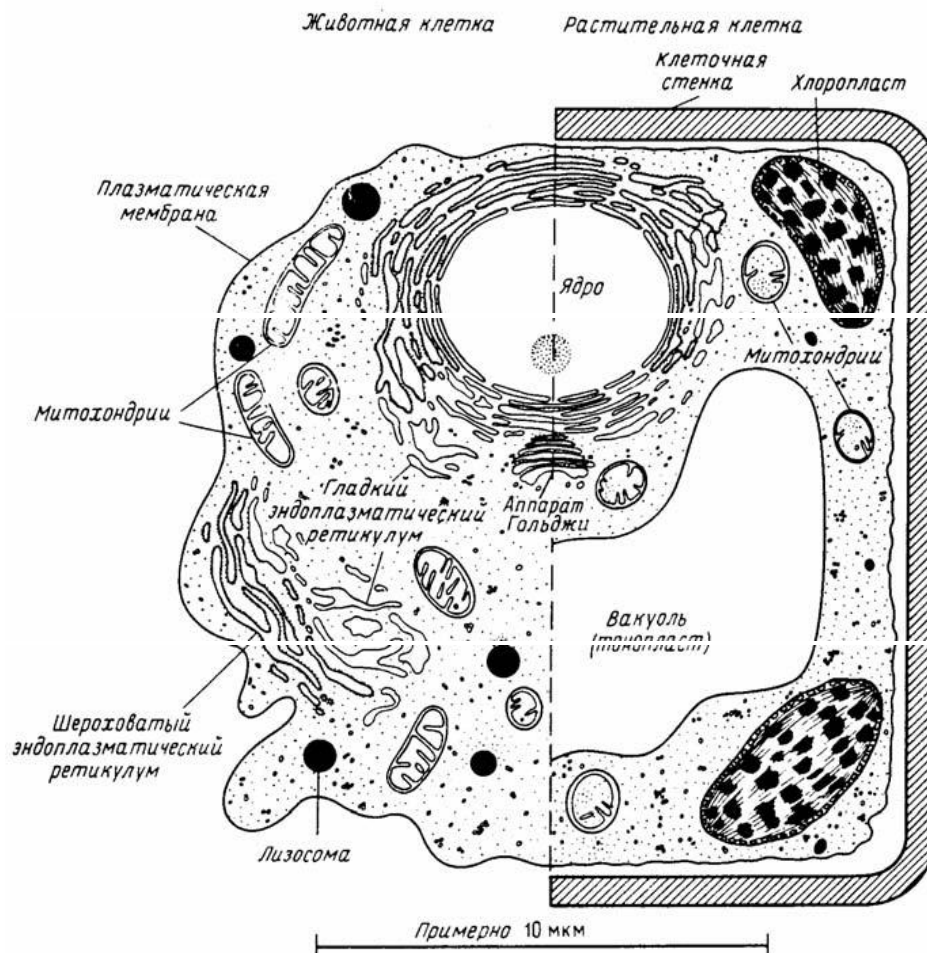


Рис.1. Схематическое изображение органелл эукариотических клеток животных и растений на основании данных электронной микроскопии

Митохондрии осуществляют окислительное фосфорилирование, в результате чего в ходе окисления субстратов (NADH, сукцинат) образуется АТФ. Эти органеллы являются

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144

субклеточными частицами, которые образованы двумя мембранами – наружной и внутренней, разделенными некоторым промежутком. Наружная мембрана – гладкая, ее толщина равна примерно 7 нм, тогда как внутренняя мембрана образует многочисленные складки (кристы) и содержит ферменты, участвующие в транспорте электронов и синтезе АТФ. Внутренняя область митохондрии называется матриксом.

Эндоплазматический ретикулум (ЭР) – это сложная сеть цистернообразных или трубчатых структур, которая занимает значительную часть внутреннего объема клетки. Основная роль ЭР состоит в том, что он служит местом биосинтеза белков (шероховатый ЭР, где расположены рибосомы), которые затем секретируются, включаются в лизосомы или в плазматическую мембрану. Области ЭР, не содержащие рибосом, называют гладким ЭР. Здесь протекают реакции детоксикации, биосинтез стеролов, десатурация жирных кислот.

Аппарат Гольджи представляет собой сеть уплощенных мешков (цистерн), собранных в стопки. Основная его функция заключается в посттрансляционной модификации гликопротеинов, синтезированных в ЭР и предназначенных для секреции, включения в плазматическую мембрану или доставки в лизосомы. Эти органеллы содержат ферменты гликозидазы и лизосилтрансферазы, которые вступают в действие последовательно, по мере того как белок, подвергаемый процессингу, перемещается от начала аппарата Гольджи (*цис*-область) до его конца (*транс*-область). Фактически аппарат Гольджи состоит из совокупности отдельных мембран, образующих цистерны.

Лизосомы ответственны за деградацию макромолекул и содержат ряд гидролитических ферментов, таких как протеазы и липазы. В лизосомах происходит также расщепление клеточных компонентов в ходе их жизненного цикла.

Пероксисомы содержат окислительные ферменты, участвующие в деградации малых молекул, таких, как аминокислоты, ксантин, жирные кислоты. Их название связано с присутствием в них фермента каталазы, которая разлагает перекиси, образующиеся как побочные продукты при окислении.

Хлоропласты – это органеллы, содержащие фотосинтетический аппарат. Они имеют наружную оболочку, образуемую двумя мембранами, и внутреннюю область – строму. В строме находятся тилакоидные мембраны, где локализованы компоненты системы фотосинтеза.

Функции биомембран

Основные функции, присущие биомембранам в клетке, состоят в следующем:

1. Мембраны представляют собой полупроницаемые барьеры – защитная функция для клеток и внутриклеточных органелл.
2. Мембраны осуществляют избирательный транспорт различных веществ внутрь клетки и из нее.
3. Передача информации посредством гормонов, медиаторов, нервного импульса.
4. Преобразование энергии (синтез АТФ осуществляется на внутренних мембранах митохондрий за счет энергии трансмембранного градиента концентраций протонов.)
5. Процессы молекулярного узнавания происходят на мембранах клеток, где располагаются рецепторы гормонов, молекулы иммунной системы.
6. Ферментативная деятельность мембран связана с координацией всех биохимических реакций, протекающих в клетке. Кроме основных, существуют и другие специальные функции мембран (мембраны кишечника, органов чувств, хлоропластов).

Методы выделения биологических мембран

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA АКАДЕМИАСЫ «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144

Исследование мембран начинается с их выделения из природных источников и очистки от других клеточных компонентов. Для каждого типа клеточных мембран нужно подобрать условия препаративного выделения и очистки.

1. Процесс выделения клеток начинается с разрушения тканей и клеток, обычно путём гомогенизации. При работе с животными клетками этот процесс проводят в гомогенизаторах со стеклянными стенками и тefлоновым пестиком. При этом клетки разрушаются за счет сдвиговых усилий при продавливании суспензии через узкий зазор между пестиком и стенкой гомогенизатора. При такой обработке “срывается” плазматическая мембрана и разрушаются связи между различными органеллами при сохранении их целостности. Для разрушения клеток, имеющих стенку (таких как бактерии, клетки грибов и растительные клетки), требуются более жесткие условия. Например, обработка ферментами и буферами, растирание клеток в присутствии абразивных материалов, обработка ультразвуком и экструзия. Большое значение при разрушении клеток имеет правильный выбор среды. Для того чтобы сохранить целостность мембранных органелл, следует использовать среду, изотоничную и внутреннему содержимому. Чаще всего для этого используют раствор 0.25 – 0.30 М сахарозы.

2. Разделение мембран в настоящее время чаще всего осуществляют различными методами центрифугирования. Мембранные частицы можно разделить по скорости их седиментации или по плавучей плотности. Первый метод называют зональным центрифугированием, и разделение происходит в соответствии со значениями коэффициента седиментации S ; а второй – изопикническим центрифугированием, и разделение происходит в условиях равновесной плотности. На практике обычно применяют некий гибрид этих двух методов.

Для выделения мембран из клеточных гомогенатов используют и другие методы:

- *Фазовое распределение.* Разделение мембранных частиц происходит в соответствии с их поверхностными свойствами – с этой целью формируют два или три несмешивающихся слоя водных растворов различных полимеров (полиэтиленгликоля, декстрана, фикоλλα), и мембранные частицы разделяются в соответствии с их сродством к этим фазам.
- *Непрерывный электрофорез в свободном потоке.* В этом случае разделение мембранных частиц происходит в соответствии с их электрическим зарядом.
- *Аффинная адсорбция.* Разделение основано на биоспецифическом взаимодействии между мембранными компонентами и твердой фазой, к которой ковалентно присоединены антитела. Чаще всего метод используют для выделения мембранных белков.
- *Использование микрогранул силикагеля.* Этот подход разработан специально для выделения плазматических мембран. Катионизированные микрогранулы силикагеля прочно адсорбируются на наружной поверхности плазматической мембраны интактных клеток, и фракция плазматических мембран, связанных с гранулами, легко отделяется в градиенте плотности сахарозы от других мембран за счет более высокой плотности гранул.

3. Определение чистоты мембранных фракций: наиболее объективным критерием чистоты выделенной мембранной фракции является присутствие в ней какого-либо уникального компонента, который содержится только в этой мембране или является в ней преобладающим. Обычно такими компонентами служат ферменты, называемые в этом случае *маркерами*. В ряде случаев более удобными мембранными маркерами являются специфические рецепторы лектинов, гормонов, токсинов или антител. Кроме того, если мембранная система хорошо охарактеризована, о чистоте можно судить по ее белковому составу. В некоторых случаях

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA АКАДЕМИАСЫ «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144

препарат характеризуют с помощью электронной микроскопии; а также по содержанию холестерина.

Среди жидкофазных мембранных процессов различают диализ, электродиализ, ультрафильтрацию, обратный осмос.

Диализ и электродиализ

Явление диализа и электродиализа находят применение при очистке растительных вытяжек. Диализ основан на свойствах молекул полимеров, имеющих большие размеры, не проходить через полупроницаемые мембраны, в то время как вещества с меньшими размерами молекул проходят через них довольно свободно. Для диализа используют пленки желатина, целлофана, коллодия, нитроцеллюлозы. Процесс диализа протекает обычно довольно медленно, он ускоряется при повышении температуры, увеличении площади диализа и приложении электрического тока. В последнем случае наблюдается явление электродиализа, которому подвержены в основном вещества, распадающиеся на ионы.

Простейшая установка для электродиализа состоит из ванны, разделенной двумя полупроницаемыми перегородками на три отсека. В крайние отсеки опущены катод и анод, в средний отсек наливается диализуемая вытяжка. Катионы под действием электрического тока двигаются через полупроницаемые перегородки к аноду, анионы к катоду. В среднем отсеке остаются вещества, которые не проходят через полупроницаемые перегородки. В процессе работы периодически или непрерывно производится отвод вытяжки, растворов продиализованного вещества.

Электродиализ с ионообменными мембранами до настоящего времени не нашел широкого применения. Имеются лишь исследования, доказывающие возможность очистки технических полупродуктов, содержащих алкалоиды гиосциамин и сольсолин от высокомолекулярных неионизированных веществ методом электродиализа с гетерогенными мембранами МК-40 и гомогенными мембранами МК-1СС.

Исследования также показали, что происходящее в процессе электродиализа превращение катионитовых мембран в форму органического иона сопровождается сжатием ионообменных частиц гетерогенных мембран, нарушением их связи с ненабухшей основой мембран и равномерным сжатием всей гомогенной мембраны. В первом случае это приводит к микродеструкции мембраны и к значительному увеличению переноса растворителя вместе с недиссоциированными соединениями, что ограничивает возможности очистки. В случае применения гомогенных мембран микродеструкции при переходе в форму органического иона не происходит, поэтому гомогенные мембраны более перспективны для применения в процессе разделения природных полярных и неполярных органических веществ.

Ультрафильтрация

Метод ультрафильтрации заключается в разделении высокомолекулярных и низкомолекулярных соединений на селективных мембранах, способных пропускать низкомолекулярные соединения под действием давления 1-5 кг/см². Ультрафильтрация в 50-20 раз эффективнее гель-фильтрации и в 1000 раз эффективнее очистки с использованием фракционирования эталоном. Применение ультрафильтрации имеет еще ряд преимуществ: исключается денатурация белка, так как процесс идет без фазовых превращений при любой температуре; возможны одновременное концентрирование и очистка от минеральных и низкомолекулярных органических веществ; незначительные затраты энергии. Ультрафильтрационные установки отличаются простой конструкцией.

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA АКАДЕМИАСЫ «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144

Недостатком ультрафильтрации является эмпирический подход к подбору мембран на определенной стадии выделения БАВ. Теоретически предсказать ультрафильтрационные свойства растворов сложного состава невозможно, так как мембраны обычно стандартизируют кислыми веществами с определенной массой. В нашей стране выпускают ультрафильтрационные ацетатцеллюлозные мембраны: УАМ 50м, УАМ 100м, УАМ 150м, УАМ 200м, УАМ 300м, УАМ 500м.

Технология ультрафильтрации следующая: суспензию под давлением пропускают через полупроницаемую мембрану с большим количеством пор мельчайшего диаметра (0,02-0,001 мкм), в результате чего коллоидные частицы задерживаются мембраной, а вода и содержащиеся в ней молекулы проходят сквозь стенки нитей и скапливаются интенсивный поток фильтрата. Активная часть мембраны – это поверхность, по которой проходит суспензия. Разделение фракций происходит именно на этой тонкой поверхности. Мембрана неоднородна по толщине, вследствие чего сопротивление течению жидкости по всей ее поверхности минимально.

Основные производители ультрафильтрационных установок – фирмы «Альфа-Лаваль» (Швеция), «Миллипор» (США), ДДС-РО (Дания), «Амикон» (Нидерланды), АИ-ОУВ, АИ-ОУП, УЛС-3, УКТ-40, УКФ-80 (Россия).

Обратный осмос

Обратный осмос (гиперфильтрация) – переход растворителя (воды) из раствора через полупроницаемую мембрану под действием внешнего давления. Избыточное рабочее давление раствора в этом случае намного больше осмотического. Движущей силой обратного осмоса является разность давлений:

$$P = P_{p-pa} - P_{oc}.$$

Для разделения веществ применяют мембраны двух типов:

1. Пористые с размером пор 10-4- 10-3 мкм (1 – 10 Е). Селективная проницаемость основана на адсорбции молекул воды поверхностью мембраны и ее порами. В нашей стране выпускают ацетатцеллюлозные мембраны: УАМ-50м, УАМ-500м.

2. Непористые диффузионные мембраны образуют водородные связи молекулами воды на поверхности контакта. Под действием избыточного давления эти связи разрушаются, молекулы воды диффундируют в противоположную сторону мембраны, а на образовавшиеся свободные места проникают следующие. Таким образом, вода как бы растворяется на поверхности и диффундирует внутрь слоя мембраны. Почти все БАВ, кроме газов, не могут проникать через такую мембрану. В нашей стране и странах СНГ выпускают гиперфильтрационные ацетатцеллюлозные мембраны МГА-80, МГА-90, МГА-100. Цифра в марке означает процент селективности (S):

$$S = \frac{c_1 - c_2}{c_1} \times 100\%,$$

Где C_1 и C_2 – концентрация веществ в исходном растворе и фильтрате, мг/мл.

На этом принципе работают промышленные отечественные установки типа «Роса», УГ-1, УГ-10, производительностью соответственно от 0,1 до 1 и от 1 до 10 м³/сут, и зарубежные фирмы «Абкор» (США), ДДС-РО (Дания). Обычно установки обратного осмоса предназначены для однородных высоковязких жидкостей, выпускают установки двух типов: трубчатые и рулонные, применяя не менее пяти марок фильтрующего материала, обладающих высокой стойкостью к рН (1 – 13), селективностью и рабочей температурой до 80 °С.

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA АКАДЕМИАСЫ «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144

Гельфильтрация - хроматографический метод разделения, основанный на использовании высокопористых носителей со строго определенным размером пор. При этом молекулы, способные проникнуть в поры носителя, дольше задерживаются в его материале, так как проходят при этом больший путь. В качестве материалов для проведения процессов гельфильтрации используют декстраны с поперечными связями, полиакриламид, стекло и др.

В отличие от вакуум-выпаривания и других методов концентрирования **ультрафильтрация или обратный осмос** (фильтрация через фильтры со сверхмалым размером пор) имеет ряд очевидных преимуществ, поскольку проводится в "мягких" условиях, обеспечивающих меньший процент снижения активности фермента. Кроме того, осуществляемое концентрирование сопровождается очисткой от балластных низкомолекулярных примесей и увеличением активности фермента в 100-150 раз. Однако энергозатраты оказываются рентабельными при концентрировании раствора до содержания сухих веществ не более 30%, что связано с забиванием пор мембраны белковыми молекулами и как следствие резким снижением скорости процесса.

Процесс ультрафильтрации в режиме **диализа** позволяет получать высокоочищенные препараты. Для его осуществления в получаемый концентрат постоянно добавляют чистую воду. Такая пятикратная промывка позволяет в 250-300 раз повысить активность ферментного раствора, т.е. при концентрации 30% раствор содержит практически один белковый ферментный препарат.

На практике процесс ультрафильтрации проводят в циркуляционных аппаратах периодического действия. Перед подачей раствора на стадию ультрафильтрации из него предварительно удаляют клетки продуцента и для предотвращения развития посторонней микрофлоры на поверхности мембран подвергают стерилизующей фильтрации через специальные бактериальные фильтры. В ходе проведения процесса ультрафильтрации в зависимости от свойств получаемого фермента раствор постоянно охлаждается до температуры 4-15° С.

Недостатком метода ультрафильтрации следует считать забивание пор мембраны осадками или адсорбированными молекулами, что приводит к снижению производительности мембранного аппарата во времени. Последнее требует периодического проведения промывки материала мембраны. Для предотвращения забивания пор мембраны осадками или сорбируемыми молекулами циркуляционный насос, используемый в этих установках, должен обеспечить линейную скорость потока жидкости через мембрану около 2-5 м/с. При таких скоростях наблюдается значительное гидравлическое сопротивление. Для его снижения на практике применяют две конструкции мембранных аппаратов: трубчатые мембранные аппараты и проточные с плоскими мембранными элементами, устанавливаемыми параллельно основному потоку раствора.

IV. Иллюстративный материал: прилагается

V. Литература:

основная:

- 157.Егорова Т.А., Клунова С.М., Живухина Е.А. Основы биотехнологии. – М.: Изд. центр «Академия», - 2008. – 208 с.
- 158.Евтушенков А.Н., Фомичев Ю.К. Введение в биотехнологию: Курс лекций. – Минск.: БГУ, 2002. - 105 с.
- 159.Сазыкин Ю.О., Орехов С.Н., Чакалева И.И. Биотехнология: Учебное пособие. – М.: Изд. Центр «Академия». – 2006. – 256 с.
- 160.Орехов С.Н. Фармацевтическая биотехнология. Руководство к практическим занятиям. – Учебное пособие. – Под ред. акад. РАМН В.А. Быкова, проф. А.В Катлинского. – М. : ГЭОТАР-Медиа 2009. – 384 с.

ÖNTÜSTİK-QAZAQSTAN MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144

161. Елинов Н.П. Химическая микробиология. - Учебник. - М.: Высшая школа. - 1989, 448 с
162. Воробьева Л.И. Промышленная микробиология. - Учебное пособие. - М.: Изд-во МГУ. - 1989, 294 с.
163. Биотехнология. Принципы и применение. Пер. с англ. / Под ред. И. Хиггинса, Д. Беста, Дж. Джонса. - М.: Мир. - 1988, 480 с.
164. Чуешов В.И., Зайцев А.И., Шебанова С.Г. Промышленная технология лекарств. Том 2. Харьков, 2002.
165. Биотехнология микробного синтеза (Под ред. Бекера М.Е.) – Рига – 1980.
166. Биотехнология. (Отв. редактор А.А. Баев). - М.: Наука. - 1984, 310 с.
167. Перт С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов. М., - 1979 г.
168. Промышленная микробиология (Под ред. Егорова Н.С.) – М., 1989 г.
169. Процессы и аппараты химической технологии (Под ред. П.Г. Романкова). – Л. – 1981.

дополнительная:

73. Березов Т.Т., Коровкина Б.Ф. – Биологическая химия (Под ред. И.М. Ивановой) – М., Медицина – 1981 г.
74. Никитин Г.А. – Биохимические основы микробиологических производств – Киев, 1981.
75. Бриттон Г. – Биохимия природных пигментов. М., Мир – 1986 г.
76. Попова Т.В. – Развитие биотехнологии в СССР – М., Наука - 1988 г.
77. Популяционные аспекты биотехнологии – Печуркин Н.С., Брильков А.В., Маркенкова Т.В. – Новосибирск: - Наука – 1990 г.
78. Специальные журналы: «Биотехнология», «Фармация Казахстана», «Фармацевтический бюллетень» и др.

VI. Контрольные вопросы (обратная связь):

1. Укажите основные органеллы животных и растительных клеток и выполняемые ими функции.
2. Назовите основные этапы и методы выделений клеточных мембран.
3. Расскажите о методах выделения биологических мембран?
4. Что вы знаете о процессе диализа и электродиализа?
5. В чем заключается метод ультрафильтрации?
6. Что такое обратный осмос?

Лекция № 24

I. Тема: Основные параметры контроля и управления биотехнологическими процессами. Общие требования к методам и средствам контроля.

II. Цель: Ознакомить студентов с основными параметрами контроля и управления биотехнологическими процессами и общим требованиям к методам и средствам контроля.

III. Тезисы лекции:

Контроль и управление биотехнологическими процессами

Эффективное проведение биотехнологических процессов тесно связано с совершенствованием способов контроля и управления. В период предистории биотехнологии делались отдельные попытки регулировать развитие продуцента с помощью изменений параметров внешней среды. До середины XX века регулирование в основном сводилось к эмпирике, так как без знания сущности происходящего невозможно эффективно контролировать и управлять процессом. В основном, объектом управления того периода была экстенсивная периодическая культура микроорганизмов со всеми ее недостатками: динамикой состояния продуцента и среды, отсутствием средств контроля. В последние 25 лет с внедрением управляемых культур биотехнологи переходят от простой задачи

поддержания определенных параметров среды к управлению процессом в целом. Для реализации управляемого культивирования необходимо построение алгоритмов управления, основанных на моделях биотехнологического процесса.

В современных биотехнологических процессах необходимо регистрировать и анализировать множество быстроизменяющихся факторов (концентрацию субстрата, биомассы и продукта в культуре, pH, температуру, парциальное давление кислорода и др.) (табл. 1.3). Это вызывает необходимость в применении электронной техники. Первые разработки по применению ЭВМ в биотехнологии относятся к концу 60-х гг. XX века. На первых этапах ЭВМ привлекали в качестве советчика оператора, управляющего исполнительными механизмами для поддержания оптимального течения биотехнологического процесса. Прежде всего, для сбора и обработки информации по показаниям датчиков и для представления этой информации в легковоспринимаемой форме. Разрабатывали также системы автоматического регулирования отдельных параметров (дозировка среды или отдельных компонентов, стабилизация температуры и pH среды, скорости потока) по принципу контроля с обратной связью. Позднее ЭВМ стали использовать для управления технологическим процессом в целом в составе автоматизированных систем АСУ. Задача создания АСУ стала особенно актуальной при реализации крупнотоннажных биотехнологических процессов. В настоящее время АСУ осуществляется на основе системного подхода, и управление имеет многоуровневую иерархическую систему.

Таблица 1 **Величины и расчетные параметры, применяемые для управления биотехнологическими процессами**

Измеряемые параметры	Расчеты на базе измерений
Мәдени ортадағы негізгі субстраттар мен өнімдердің концентрациясы (қант, алкоголь, органикалық қышқылдар және т.б.).	Продуктивность (кг /м ³ ч). (μ Удельная скорость роста, ⁻¹). Удельная скорость потребления субстрата, q_s (кг/кг X ч).
Маңызды жасушаішілік компоненттердің концентрациясы (көміртегі метаболізімінің ферменттері, негізгі метаболиттер, АТФ, НАДФ және т.б.). Биомассалардың концентрациясы. Мәдениеттегі микрофлораның құрамы. Культуралық ортадағы ерітілген O ₂ және CO ₂ концентрациясы. Көбік деңгейі мен жағдайы. Максатты өнімнің концентрациясы.	Удельная скорость образования продукта, q_p (кг/кг X ч). Экономический коэффициент, Y_p, Y_x (кг/кг). Объемный коэффициент массопередачи по кислороду, K_{vO_2} (ч ⁻¹). η Энергетический выход биосинтеза, Теплопродукция. Суммарный удельный расход сырья.

Внедрение АСУ позволяет осуществить рациональное управление процессом биосинтеза. В результате этого экономятся исходное сырье, электроэнергия, вода, повышается продуктивность процесса и производительность труда обслуживающего персонала. Затраты на создание и внедрение АСУ в биотехнологии окупаются сравнительно быстро, в течение 3–4 лет.

Обычная схема контроля и управления ферментацией включает ферментер, датчики, регулируемую систему, которая реализует расчетные зависимости на основе измерения параметров процесса. Исходные данные от датчиков поступают на ЭВМ, в которой они оперативно анализируются, и в результате выдаются данные для исполнительных устройств и механизмов. В настоящее время разработка и внедрение АСУ для биотехнологических

процессов, прежде всего, определяется уровнем технической оснащенности данных процессов и зависит от уровня электронного оборудования, средств контроля и автоматизации. Возникают также проблемы вследствие большой информационной емкости биотехнологических процессов. Эффективность АСУ зависит от быстродействия и объема памяти ЭВМ. Поэтому прогресс в области биотехнологии зависит от прогресса в области электроники. Большое будущее имеет, в частности, микропроцессорная техника. Внедрение АСУ сдерживается отставанием в создании надежной и быстродействующей контрольно-измерительной аппаратуры, выдерживающей стерилизацию и удовлетворяющей современные требования к чувствительности и точности измерения, быстродействию, надежности, миниатюризации.

Повышение эффективности ферментации

Независимо от типа биореактора процесс ферментации строго контролируют по:

- концентрации растворенного кислорода;
- рН;
- температуре;
- интенсивности перемешивания биомассы.

Существенные изменения любого из этих параметров резко снижают скорость роста клеток и стабильность белкового продукта. Для оптимального роста *E.coli* и других микроорганизмов, используемых при экспрессии рекомбинантных белков, нужна хорошо аэрируемая культуральная среда. Кислород плохо растворим в воде (0,0084 г/л при 25 °С), поэтому он должен подаваться в среду непрерывно. В процессе ферментации специальный датчик контролирует содержание растворенного кислорода в среде, равномерность его распределения по всему объему, тщательность перемешивания культуры, что, вместе взятое, обеспечивает эффективность диспергирования пузырьков. Пространство, где взаимодействуют микроорганизмы и питательная среда, принято называть микросредой. Если микросреда данной культуры одинакова в каждой точке, такую культуру считают гомогенной. Гомогенность достигается эффективным перемешиванием всех компонентов среды и микроорганизмов по всему рабочему объему. Гомогенность невозможна без аэрации, которая осуществляется барботерами различных конструкций, например, в виде кольцевого желоба с отверстиями, перфорированной трубы или форсунки.

Оптимальный рост большинства микроорганизмов идет при рН от 5,5 до 8,5; однако клеточные метаболиты, выделяющиеся в культуральную среду, могут изменять рН. Изменение рН среды заметно сказывается на активности ферментов микроорганизмов, состоянии промежуточных продуктов их диссоциации, растворимости и т.п., что значительно влияет на выход конечного продукта. Тщательно контролируя рН, при необходимости в ферментер добавляют кислоту или основание, хорошо перемешанные с питательной средой и равномерно распределенные по всему объему.

Успех ферментации зависит от температуры. Если она ниже оптимальной (37°С), рост микроорганизмов замедлен, интенсивность их метаболизма снижена. При повышении температуры до 38°С, возможна преждевременная индукция синтеза белка или индукция белков теплового шока, что активирует клеточные протеиназы и снижает выход белкового продукта. Для отвода тепла используют охлаждающую рубашку. Тщательное перемешивание культуральной среды – один из наиболее распространенных процессов в БТ. Перемешивание необходимо для:

- равномерной доставки питательных веществ к клеткам;

- предотвращения накопления токсических побочных продуктов метаболизма в каком-нибудь небольшом участке биореактора.

Перемешивание культуральной среды влияет на другие параметры:

- скорость переноса кислорода из пузырьков газа в жидкую среду, из среды – в клетки;
- эффективность теплопередачи;
- точность измерения концентрации метаболитов культуральной жидкости;
- эффективность диспергирования добавляемых реагентов (кислот, оснований, питательных сред и т.д.).

Следует соблюдать баланс между необходимостью тщательного перемешивания среды и целостностью клеток, так как при чрезмерном перемешивании в среде могут возникнуть гидромеханические эффекты, губительные для бактериальных клеток.

Непрерывный мониторинг всех параметров, дает возможность изменять условия в ходе ферментации. Как правило, оптимальные условия изменяются при каждом десятикратном увеличении объема биореактора.

IV. Иллюстративный материал: прилагается

V. Литература:

основная:

- 170.Егорова Т.А., Клунова С.М., Живухина Е.А. Основы биотехнологии. – М.: Изд. центр «Академия», - 2008. – 208 с.
- 171.Евтушенков А.Н., Фомичев Ю.К. Введение в биотехнологию: Курс лекций. – Минск.: БГУ, 2002. - 105 с.
- 172.Сазыкин Ю.О., Орехов С.Н., Чакалева И.И. Биотехнология: Учебное пособие. – М.: Изд. Центр «Академия». – 2006. – 256 с.
- 173.Орехов С.Н. Фармацевтическая биотехнология. Руководство к практическим занятиям. – Учебное пособие. – Под ред. акад. РАМН В.А. Быкова, проф. А.В Катлинского. – М.: ГЭОТАР-Медиа 2009. – 384 с.
- 174.Елинов Н.П. Химическая микробиология. - Учебник. - М.: Высшая школа. - 1989, 448 с
- 175.Воробьева Л.И. Промышленная микробиология. - Учебное пособие. - М.: Изд-во МГУ. - 1989, 294 с.
- 176.Биотехнология. Принципы и применение. Пер. с англ. / Под ред. И. Хиггинса, Д. Беста, Дж. Джонса. - М.: Мир. - 1988, 480 с.
- 177.Чуешов В.И., Зайцев А.И., Шебанова С.Г. Промышленная технология лекарств. Том 2. Харьков, 2002.
- 178.Биотехнология микробного синтеза (Под ред. Бекера М.Е.) – Рига – 1980.
- 179.Биотехнология. (Отв. редактор А.А. Баев). - М.: Наука. - 1984, 310 с.
- 180.Перт С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов. М., - 1979 г.
- 181.Промышленная микробиология (Под ред. Егорова Н.С.) – М., 1989 г.
- 182.Процессы и аппараты химической технологии (Под ред. П.Г. Романкова). – Л. – 1981.

дополнительная:

79. Березов Т.Т. , Коровкина Б.Ф. – Биологическая химия (Под ред. И.М. Ивановой) – М., Медицина – 1981 г.
80. Никитин Г.А. – Биохимические основы микробиологических производств – Киев, 1981.
81. Бриттон Г. – Биохимия природных пигментов. М., Мир – 1986 г.
82. Попова Т.В. – Развитие биотехнологии в СССР – М., Наука - 1988 г.
83. Популяционные аспекты биотехнологии – Печуркин Н.С., Брильков А.В., Маркенкова Т.В. – Новосибирск: - Наука – 1990 г.
84. Специальные журналы: «Биотехнология», «Фармация Казахстана», «Фармацевтический бюллетень» и др.

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144

VI. Контрольные вопросы (обратная связь):

40. Для чего осуществляется контроль биотехнологических процессов?
41. Какие параметры, как правило, обязательно контролируются в биотехнологическом производстве?
42. Какие специфические параметры могут контролироваться дополнительно в биотехнологическом производстве?
43. Что вы знаете о повышении эффективности ферментации?

Лекция № 25

I. Тема: Современное состояние методов и средств автоматического контроля в биотехнологии. Автоматический контроль температуры, давления газов и жидкостей. Контроль расхода газов и жидкостей.

II. Цель: Ознакомить студентов с современным состоянием методов и средств, автоматического контроля в биотехнологии, контроля температуры, давления газов и жидкостей.

III. Тезисы лекции:

ОБОСНОВАНИЕ ПРИБОРОВ И УСТРОЙСТВ АВТОМАТИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ И РЕГУЛИРОВАНИЯ

При выборе технических средств автоматизации экстрактора противоточного типа требуется учитывать следующие факторы: повышенная агрессивность среды и все датчики, регуляторы, трубопроводы и другие средства автоматизации имеющие контакт с продуктом должны быть выполнены из нержавеющей стали, с нанесением на них антикоррозионных покрытий. Также необходимо учитывать возможное влияние материалов, из которых они изготовлены, на качество пищевого продукта.

Класс точности измерительных приборов составляет 0,25 – 1,5, порог чувствительности – 0,05 – 0,1 % от диапазона измерения, быстродействие – не более 16. Для нашей установки примем:

- класс точности измерительных приборов – 1;
- порог чувствительности – 0,07 %;
- быстродействие – не более 10 с.

Достижение этих показателей возможно при использовании малоинерционных чувствительных измерительных элементов.

Выбор датчика давления

В работе нужно выбрать два измеряющих датчика давления. Первый измеряет давления воды из сети на входе в теплообменник 1. Второй измеряет давление пара в шнековом экстракторе. Чаще всего используются датчики давления марки х|actсі.

Диапазоны давления: от 0...0,16 до 0...10 бар, абсолютное, избыточное, разрежение

Основная погрешность: 0,2 % ДИ

Благодаря применяемому типу сенсора х|actсі может использоваться в агрессивных и густых средах, а также в средах, содержащих сухой остаток вещества. Порт для подключения давления выполнен из нержавеющей стали 1.4571 (316Ti). По запросу возможно применение других материалов. Различные варианты механических присоединений и материалы уплотнений позволяют использовать датчик в пищевой и химической промышленности.

Преимущества и особенности датчика давления хactсі:

-влияние температуры менее 0,1% ДИ/10К в температурном диапазоне -25...85°C

- штампованный алюминиевый корпус по классу защиты IP 67 для работы в сложных условиях
- различные варианты расположения дисплея для датчика в корпусе из нержавеющей стали
- настройка прибора при помощи клавиш на модуле дисплея
- долговременная стабильность калибровочных характеристик
- продолжительный срок службы

Выбор датчика концентрации

Датчик концентрации может комбинировать два коэффициента измерения и, используя ПО под ОС Windows™ для конфигурации выходов 4-20мА, измерять проводимость, % концентрации раствора, температуру, РРМ или солёность.

Интерфейс RS485 обеспечивает управляемый доступ ко всем конфигурационным параметрам и измерениям датчика проводимости в режиме on-line.

Работу оператора облегчает наличие 3-строчного монохромного жидкокристаллического дисплея с подсветкой, который отображает измеряемые значения и состояние системы.

Особенности:

- Измерение проводимости, % концентрации раствора, солёности и температуры
- Соппротивление тепловым всплескам до 135 °С при паровой стерилизации
- Прост в установке
- Сохранение и загрузка файла конфигурации датчика на ПК.
- Постоянное измерение концентрации, проводимости, температуры .

Выбор расходомера

Например, Расходомер РСМ-05 предназначен для измерения объемного расхода и объема с нарастающим итогом электропроводящих жидкостей, питьевой воды, жидких пищевых продуктов. РСМ-05 применяется как самостоятельный прибор, так и в составе теплосчетчиков для коммерческого и технологического учета расхода жидкости в системах теплоснабжения жилых, общественных, коммунально-бытовых зданий, промышленных предприятий, а также для использования в системах автоматического учета, контроля и регулирования параметров в химической, пищевой, перерабатывающей, фармацевтической и других отраслях промышленности.

Отличительные особенности и преимущества:

- отсутствие дополнительного гидравлического сопротивления потоку жидкости у первичных преобразователей расхода счетчиков РСМ-05;
- низкая восприимчивость к изменению физико-химических свойств измеряемой среды (плотность, вязкость, температура, электропроводность, режим течения), что позволяет с высокой точностью измерять расход различных электропроводных сред: вода, водные растворы кислот и щелочей, молоко, пиво, соки и т.д.;
- наличие дополнительных каналов для подключения термометров сопротивления позволяет иметь информацию о температуре потока;
- передача данных о всех измеряемых и вычисляемых параметрах по последовательным интерфейсам RS-232C и (или) RS-485, что позволяет применять расходомеры в автоматизированных системах любой сложности и конфигурации.

Выбор датчика температуры

Датчики температуры выбираем из каталогов или интернета, главное чтобы датчики соответствовали данному технологическому процессу и применялись в пищевой промышленности. На технологической линии используется один термопреобразователь.

Для измерения примем ТПУ 0304. Датчик погружной, включая погружную гильзу из высококачественной стали.

Например, Термопреобразователи универсальные ТПУ 0304 (далее – термопреобразователи) предназначены для измерения и непрерывного преобразования температуры, твердых, жидких, газообразных и сыпучих веществ в унифицированный выходной сигнал постоянного тока 4÷20 мА.

Термопреобразователи применяются в различных технологических процессах в промышленности и энергетике.

Выбор уровнемера. Уровнемер поплавковый

Например, датчики уровня РУПТ-А предназначены для непрерывного преобразования уровня жидкости в стандартный токовый выходной сигнал.

Датчики уровня состоят из первичного преобразователя (ПП) и передающего преобразователя (ППР).

РУПТ-А в комплекте с ЭП-0010 имеет следующие преимущества:

- высокая точность;
- удобный монтаж на емкости;
- отсутствие пневматических линий, проложенных на открытом воздухе;
- простота настройки при первичной установке и в процессе эксплуатации;
- значительно меньшее число вероятных неисправностей;
- меньшая стоимость.

Метрологические характеристики:

Нижний неизмеряемый уровень, мм, не более: 260

Верхний неизмеряемый уровень, мм, не более: 300

Характеристика рабочей среды:

нефть, нефтепродукты, сжиженные газы, вода и другие жидкости, не агрессивные к стали 12X18H10T ГОСТ 5632, вязкость которых не ограничивается при отсутствии застывания на них, препятствующих перемещению поплавка;

температура от минус 50 до плюс 50°С;

удовлетворяет требованиям технологического процесса. **ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КОНТРОЛЛЕРА**

Промышленные контроллеры Alpha имеют 3 модификации, различающиеся числом каналов ввода/вывода. Это модификации на 6 каналов ввода и 4 вывода, 8 ввода и 6 вывода, а также 15 ввода и 9 вывода. Две последние модификации имеют слот для установки одного модуля расширения, а также разъем для подключения модема или панели оператора. В слот расширения может устанавливаться один из следующих модулей: четырехканальный модуль ввода дискретных сигналов 24 В, два канала которого могут использоваться как счетчики импульсов с максимальной частотой следования до 1 кГц; четырехканальный модуль ввода дискретных сигналов ~220 В; четырехканальный релейный модуль вывода 24 В/~220 В с нагрузочной способностью до 2 А на канал; четырехканальный транзисторный модуль вывода 5–24 В с нагрузочной способностью до 1 А на канал; двухканальный модуль аналогового вывода сигналов 0–10 В или 4–20мА.

Благодаря входным каналам с режимом ввода аналоговых сигналов и возможности установки модуля аналогового вывода, а также наличию программного блока ПИД-регулятора можно реализовать такие задачи как управление тепловым пунктом или небольшой котельной управление вентиляцией, регулирование температурного режима в теплицах, камерах хранения, нагревательных емкостях и т.п. А благодаря возможности установки модуля со счетными входами можно объединять промышленный контроллер с приборами учета. Входные каналы промышленных контроллеров с напряжением питания ~220 В имеют только режим дискретного ввода, при этом за значение логической единицы принимается сигнал выше ~100 В, что очень удобно для контроля и управления оборудованием с питанием 220 В, таким как освещение, вентиляция и т.д. Для задач удаленного управления и мониторинга объектов, предусмотрена возможность непосредственного подключения к промышленным контроллерам Alpha обычных модемов, а также радиомодемов, работающих в стандарте GSM. По получению команды, промышленный контроллер реагирует в соответствии со своей программой, например, включает или выключает выходные реле или изменяет уставки.

Для подтверждения выполнения команды, а также для проверки статуса системы, может высылаться SMS сообщение. Функция автоматической отправки SMS при изменении состояния регистров промышленного контроллера, позволяет успешно использовать промышленные контроллеры Alpha для мониторинга удаленных объектов, таких как насосные станции, подвалы и чердаки многоквартирных домов с установленным в них оборудованием, и вплоть до дачных домиков, где можно реализовать удаленное управление включением/выключением отопления, освещения и т.п., а также получать данные о температуре внутри помещения или о нежелательном проникновении. Из новых функций, появившихся сравнительно недавно, стоит отметить ставшее возможным подключение графических сенсорных панелей оператора GT1020 или GT1030. Данные панели оператора с диагоналями экранов 3.7” или 4.5” обладают достаточно большим разрешением матрицы, изменяемым цветом светодиодной подсветки (зеленый-желтый-красный), а также поддержкой шрифтов TrueType, в том числе и кириллических. Данные панели прекрасно расширяют функционал промышленных контроллеров Alpha в тех случаях, когда возможностей встроенного дисплея недостаточно для отображения информации. Для удобства программирования (помимо возможности программирования непосредственно с клавиш панели управления) предлагается полностью русифицированная среда разработки с простым и понятным интерфейсом, рассчитанная на пользователей, не знакомых с программированием контроллеров, но обладающих базовым уровнем.

Компания MitsubishiElectric, одним из приоритетных направлений деятельности которой является производство продукции для промышленной автоматизации, представила свой первый компактный моноблочный промышленный контроллер в 1980 году. С тех пор номенклатура моноблочных промышленных контроллеров MitsubishiElectric постоянно расширялась, и на сегодняшний день представлена на рынке семейством контроллеров FX, состоящем из серий FX1N, FX3U и FX3UC, а также серией недорогих микроконтроллеров Alpha, ставшей одной из наиболее популярных серий компактных промышленных контроллеров MitsubishiElectric в России. Наряду с моноблочными промышленными контроллерами компания уже несколько десятилетий производит классические модульные промышленные контроллеры (семейство System Q), применяющихся для задач автоматизации высокой сложности. Благодаря богатым техническим возможностям и невысокой стоимости, промышленные контроллеры Alpha и младшие модификации промышленных контроллеров FX находят широкое применение в небольших задачах автоматизации, где использование комплекта из отдельных элементов релейной автоматики не отвечает современным требованиям, а применение мощных многоканальных промышленных контроллеров (ПЛК) избыточно. Создание решений на базе единого логического модуля позволяет значительно сократить затраты на создание системы управления, повысить ее гибкость, упростить монтаж и тиражирование, а также минимизировать занимаемое пространство.

Промышленные контроллеры Alpha, выпускаемые уже на протяжении 9 лет, непрерывно модернизируются, приобретая все новые и новые функции, востребованные заказчиками. Начав свое существование как промышленный контроллер, предназначенный для реализации простой дискретной логики, после модернизации 2003 года промышленный контроллер обзавелся поддержкой аналоговых каналов, поддержкой передачи данных через GSM-модем, новыми функциональными блоками среды программирования, включая ПИД-регулятор.

В проекте используется 7 датчиков с аналоговыми выходными сигналами, с этой целью целесообразно использовать контроллер Alpha 2 второй модификации с 8 каналами ввода и 6 вывода. Для преобразования величин от первичных датчиков используется нормирующий преобразователь AL 2-2PT-ADP который полностью

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA АКАДЕМИАСЫ «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144

Средства автоматического контроля температуры

Температура является важнейшим параметром множества технологических и теплотехнических процессов, характеристикой кинетической энергии молекул и характеризует степень нагретости тела. Единицей измерения температуры является Кельвин (К); допускается измерять температуру в градусах Цельсия ($^{\circ}\text{C}$). Диапазон измерения температур в практике весьма широк, следовательно, различны и методы измерения температуры. Самое широкое распространение получили:

1. Термометры сопротивления;
2. Термоэлектрические термометры;
3. Пирометры излучения.

Средства измерения давления газа жидкости и пара

Контроль за протеканием множества технологических процессов связан с регулированием давления или разности давлений газовых и жидких сред. Давление характеризует нормально распределенную силу, действующую на единицу поверхности. При измерениях различают абсолютное (p_a), барометрическое (p_b) и избыточное давления (p_u):

$$P_{изб} = P_a - P_b$$

Прибор для измерения давления называется манометр, а для измерения разности давлений – дифференциальный манометр (диффманометр).

В зависимости от измеряемого давления манометры делятся на барометры (измеряют атмосферное давление p_b), вакуумметры (измеряют давление разрежения), манометры избыточного давления (измеряют избыточное давление p_u), манометры абсолютного давления (измеряют давление в трубопроводах или агрегатах p_a).

Манометры для измерения $P < \pm 40 \text{ кПа}$ называются напоромерами и тягомерами.

По принципу действия манометры делятся на:

1. жидкостные;
2. пружинные;
3. мембранные;
4. сильфонные.

IV. Иллюстративный материал: прилагается

V. Литература:

основная:

- 183.Егорова Т.А., Клунова С.М., Живухина Е.А. Основы биотехнологии. – М.: Изд. центр «Академия», - 2008. – 208 с.
- 184.Евтушенков А.Н., Фомичев Ю.К. Введение в биотехнологию: Курс лекций. – Минск.: БГУ, 2002. - 105 с.
- 185.Сазыкин Ю.О., Орехов С.Н., Чакалева И.И. Биотехнология: Учебное пособие. – М.: Изд. Центр «Академия». – 2006. – 256 с.
- 186.Орехов С.Н. Фармацевтическая биотехнология. Руководство к практическим занятиям. – Учебное пособие. – Под ред. акад. РАМН В.А. Быкова, проф. А.В Катлинского. – М. : ГЭОТАР-Медиа 2009. – 384 с.
- 187.Елинов Н.П. Химическая микробиология. - Учебник. - М.: Высшая школа. - 1989, 448 с
- 188.Воробьева Л.И. Промышленная микробиология. - Учебное пособие. - М.: Изд-во МГУ. - 1989, 294 с.
- 189.Биотехнология. Принципы и применение. Пер. с англ. / Под ред. И. Хиггинса, Д. Беста, Дж. Джонса. - М.: Мир. - 1988, 480 с.

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA АКАДЕМИАСЫ «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144

190. Чуешов В.И., Зайцев А.И., Шебанова С.Г. Промышленная технология лекарств. Том 2. Харьков, 2002.
191. Биотехнология микробного синтеза (Под ред. Бекера М.Е.) – Рига – 1980.
192. Биотехнология. (Отв. редактор А.А. Баев). - М.: Наука. - 1984, 310 с.
193. Перт С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов. М., - 1979 г.
194. Промышленная микробиология (Под ред. Егорова Н.С.) – М., 1989 г.
195. Процессы и аппараты химической технологии (Под ред. П.Г. Романкова). – Л. – 1981.
- дополнительная:**
85. Березов Т.Т., Коровкина Б.Ф. – Биологическая химия (Под ред. И.М. Ивановой) – М., Медицина – 1981 г.
86. Никитин Г.А. – Биохимические основы микробиологических производств – Киев, 1981.
87. Бриттон Г. – Биохимия природных пигментов. М., Мир – 1986 г.
88. Попова Т.В. – Развитие биотехнологии в СССР – М., Наука - 1988 г.
89. Популяционные аспекты биотехнологии – Печуркин Н.С., Брильков А.В., Маркенкова Т.В. – Новосибирск: - Наука – 1990 г.
90. Специальные журналы: «Биотехнология», «Фармация Казахстана», «Фармацевтический бюллетень» и др.

VI. Контрольные вопросы (обратная связь):

44. Как нужно выбрать датчик давления, концентрации, расходомера и температуры?
45. Расскажите о технической характеристике контроллера.

Лекция № 26

I. Тема: Дозирующие устройства для стерильных растворов разного типа действия.

II. Цель: Ознакомить студентов с дозирующими устройствами для стерильных растворов разного типа действия.

III. Тезисы лекции:

Приборы для дозирования, разведения и пробоотбора.

В практике работ с клеточными культурами постоянно возникает необходимость массового дозирования, пробоотбора или разведения биологически активных жидкостей. Для этого используются автоматические или полуавтоматические устройства, называемые в различных источниках дозаторы-дилуторы, автоматические пипетки и т. п.

Одним из основных требований к такого рода приборам является отсутствие контакта между дозируемым раствором и частями конструкции дозатора. Данным требованиям отвечают полуавтоматические и автоматические шприцевые дозаторы, которые производят разведение или дозирование одновременно по двум каналам и могут работать как в автоматическом, так и полуавтоматическом режимах.

Наиболее часто применяемый автоматический шприцевой дозатор типа «Дозатрон-4» предназначен для автоматического дозирования жидкостей в иммунологические планшеты с микроюветами. Объем единичной дозы устанавливается в зависимости от целей эксперимента.

Пипетки лабораторные типа ПЛ-01, дозаторы пипеточные типа КДП-1 и П1 производят полуавтоматическое дозирование биологически активных жидкостей. Пипетки лабораторные ПЛ-01 поставляются в наборах из 3 моделей. Величина дозы задается пользователем в определенном диапазоне (2–20 мкл, 20–200 мкл, 200–1000 мкл). Комплект

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA АКАДЕМИАСЫ «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144

дозаторов пипеточных КДП-1 включает 8 моделей, каждая из которых обеспечивает выдачу 2 фиксированных по объему доз (от 5 до 1000 мкл). Комплект дозаторов П1 включает 5 моделей, настроенных на 1 фиксированную дозу (от 20 до 500 мкл). Все указанные типы устройств предполагают использование сменных наконечников, которые могут подвергаться паровой стерилизации и повторно использоваться.

Описанные выше приборы позволяют выполнять работу с жидкостями, нагретыми до 40° С и имеющими вязкость, близкую к вязкости воды. Тем самым не обеспечивается дозирование питательных сред на основе агара, которые для придания им малой вязкости должны быть нагреты до температуры не менее 60° С. В таких случаях используются приборы типа «Агар-1». Этот аппарат для разлива питательных сред, состоящий из перистальтического насоса-дозатора и разливочного механизма, обеспечивает автоматическое одновременное заполнение в течение 1 мин 16 стеклянных чашек Петри диаметром 100 мм, находящихся в специальных планшетах. Стерильные условия в аппарате поддерживаются путем УФ-облучения его внутреннего объема.

В экспериментах также применяются устройства малой лабораторной техники, не являющиеся по своей сути дозаторами, но способные облегчить этот процесс. Это так называемые приборы «Pipet-Aid» (фирмы «Flow», «Bellco», «Cole-Parmer» и другие), предназначенные для пробоотбора и выдачи дозы при работе с пипетками Пастера и любыми градуированными пипетками емкостью до 75 мл. Пипетка вставляется в специальный держатель, соединенный с малогабаритным вакуумным насосом, находящимся либо непосредственно в держателе, либо автономно. Управление работой прибора производится нажатием кнопок, размещенных на держателе.

IV. Иллюстративный материал: прилагается

V. Литература:

основная:

196. Егорова Т.А., Клунова С.М., Живухина Е.А. Основы биотехнологии. – М.: Изд. центр «Академия», - 2008. – 208 с.
197. Евтушенков А.Н., Фомичев Ю.К. Введение в биотехнологию: Курс лекций. – Минск.: БГУ, 2002. - 105 с.
198. Сазыкин Ю.О., Орехов С.Н., Чакалева И.И. Биотехнология: Учебное пособие. – М.: Изд. Центр «Академия». – 2006. – 256 с.
199. Орехов С.Н. Фармацевтическая биотехнология. Руководство к практическим занятиям. – Учебное пособие. – Под ред. акад. РАМН В.А. Быкова, проф. А.В. Катлинского. – М.: ГЭОТАР-Медиа 2009. – 384 с.
200. Елинов Н.П. Химическая микробиология. - Учебник. - М.: Высшая школа. - 1989, 448 с
201. Воробьева Л.И. Промышленная микробиология. - Учебное пособие. - М.: Изд-во МГУ. - 1989, 294 с.
202. Биотехнология. Принципы и применение. Пер. с англ. / Под ред. И. Хиггинса, Д. Беста, Дж. Джонса. - М.: Мир. - 1988, 480 с.
203. Чуешов В.И., Зайцев А.И., Шебанова С.Г. Промышленная технология лекарств. Том 2. Харьков, 2002.
204. Биотехнология микробного синтеза (Под ред. Бекера М.Е.) – Рига – 1980.
205. Биотехнология. (Отв. редактор А.А. Баев). - М.: Наука. - 1984, 310 с.
206. Перт С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов. М., - 1979 г.
207. Промышленная микробиология (Под ред. Егорова Н.С.) – М., 1989 г.
208. Процессы и аппараты химической технологии (Под ред. П.Г. Романкова). – Л. – 1981.

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA АКАДЕМИАСЫ «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11	
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144	

дополнительная:

91. Березов Т.Т. , Коровкина Б.Ф. – Биологическая химия (Под ред. И.М. Ивановой) – М., Медицина – 1981 г.
92. Никитин Г.А. – Биохимические основы микробиологических производств – Киев, 1981.
93. Бриттон Г. – Биохимия природных пигментов. М., Мир – 1986 г.
94. Попова Т.В. – Развитие биотехнологии в СССР – М., Наука - 1988 г.
95. Популяционные аспекты биотехнологии – Печуркин Н.С., Брильков А.В., Маркенкова Т.В. – Новосибирск: - Наука – 1990 г.
96. Специальные журналы: «Биотехнология», «Фармация Казахстана», «Фармацевтический бюллетень» и др.

VI. Контрольные вопросы (обратная связь):

46. Дайте определение биотехнологии.
47. Назовите основные направления

Лекция № 27

I. Тема: Потенциометрические методы контроля рН среды и ионного состава культуральных сред. Контроль концентрации субстратов и биотехнологических продуктов.

II. Цель: Ознакомить студентов с потенциометрическими методами рН среды и ионного состава культуральных сред и рассказать о контролях концентрации субстратов, биотехнологических продуктов.

III. Тезисы лекции:

Методы контроля биомассы и количества клеток при культивировании.

Апоптоз и некроз клеток

Под определением биомасса подразумевается общая концентрация микроорганизмов или клеток на твердой или жидкой питательной среде при культивировании. Наиболее чувствительный метод контроля биомассы – подсчет клеток с определением линейных размеров или числа жизнеспособных клеток (метод окрашивания) при помощи микроскопа. Количество клеток в биомассе можно контролировать и по объему осадения в центрифужных стаканчиках. Также используют косвенные методы определения биомассы по интенсивности дыхания (изменению концентрации **СО** инфракрасным газоанализатором) или содержанию белка (самый чувствительный метод – бромсульфалеиновая проба, основанная на связывании бромсульфалеина основными группами белка). Количество микроорганизмов и клеток можно определять физико-химическими методами: кондуктометрически (по удельной электропроводимости), спектрофотометрически, коллометрически, нефелометрически.

Гибель клеток ведет в выделению клеточных фрагментов, загрязняющих фильтры и пробы, высвобождению внутриклеточных ферментов.

Гибель клеток идет по двум механизмам: **аптоз и некроз.**

Погибать могут, казалось бы, жизнеспособные клетки, т.е. те, которые еще не успели исчерпать, свои жизненные ресурсы. Зачастую активную роль в своей гибели играет сама клетка – с помощью содержащихся в ней механизмов, которые лишь запускаются теми или иными факторами внеклеточной или внутриклеточной среды; в результате возникло представление об апоптозе или запрограммированной клеточной гибели. Апоптоз определяют,

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144

как программируемую клеточную смерть, понимая под этим такую гибель клетки, в развитии которой активную роль играют специальные и генетически запрограммированные внутриклеточные механизмы.

Исходный смысл слова «апоптоз» весьма поэтичен, по-гречески он означает опадание листьев.

Круг обстоятельств, когда в клетке включается программа апоптоза, весьма широк, их можно представить двумя группами:

- «неудовлетворительное» состояние самой клетки, что вызывает апоптоз изнутри;
- «негативная» сигнализация снаружи, передающаяся через специальные рецепторы клетки («апоптоз по команде»).

О «неудовлетворительном» состоянии самой клетки может свидетельствовать серьезное повреждение хромосом и внутриклеточных мембран. В этом смысле апоптоз выполняет функцию уничтожения дефектных клеток. Важнейший инструмент апоптоза – цитоплазматические протеазы, ядерные эндонуклеазы, последние разрушают ДНК не до нуклеотидов, а лишь до более или менее крупных фрагментов. К прочим «орудиям» апоптоза относится совокупность сильных окислителей – избыточное накопление не только оксида азота, но и других реакционноактивных веществ – супероксидного и гидроксидного радикалов, пероксинитрита, нитритов, нитратов и т.д. известно, что в нормальной клетке существуют механизмы защиты от радикалов и окислителей. Это ферменты антиоксидантной системы: супероксиддисмутаза (превращает супероксид в перекись водорода), каталаза и пероксидаза, элиминирующие из среды пероксид водорода.

Повреждения клеток могут быть вызваны изменением температуры, нарушением питания. Если же повреждения клетки чрезмерны, процесс ее гибели становится неуправляемым – это уже некроз.

Таким образом, в зависимости от интенсивности и характера повреждающих воздействий гибель клетки может пойти либо по апоптотическому, либо по некротическому пути.

Выделение продуктов биосинтеза.

Общая схема этой стадии технологического процесса представлена на рис. 12. Если продукт локализован внутри клеток, их разрушают, удаляют клеточные осколки и выделяют продукты из осветленной среды; секретлируемый продукт выделяют непосредственно из среды.

Для отделения биомассы клеток или культуральной жидкости используют сепараторы, осадительные центрифуги, фильтр – прессы, вакуум – барабанные фильтры, ротационно-вакуумные фильтры, отстойники. Выбор оборудования зависит от масштаба культивирования, типа клеток, свойства культуральной жидкости.



Рис. 12. Выделение продуктов биосинтеза

Для выделения клеток из больших объемов культуральной среды (в промышленных масштабах) используют высокоскоростное центрифугирование с помощью соответствующих центрифуг полунепрерывного действия. Суспензию клеток непрерывно подают в барабан центрифуга, клетки концентрируются в нем, осветленная жидкость удаляется. Когда барабан заполняется осажденными клетками, центрифугу останавливают и клетки собирают. Неудобства этого способа – необходимость остановки процесса , вероятность утечки микроорганизмов окружающей среду, невозможность полного удаления клеток и среды.

Альтернативный метод выделения клеток из культуральной среды – фильтрация через мембрану. Но процесс фильтрации быстро замедляются за счет накопления клеток на поверхность фильтра. Увеличение давления фильтруемой среды дает временный эффект, так как клетки забивают поры , образуя менее проницаемый слой .

Разрушение (дезинтеграция) клеток. Для этой цели применяют разнообразные химические , биологические, физические методы. Все процедуры должны быть одновременно достаточно жесткими, чтобы разрушить клеточную стенку, и достаточно мягкими для исключения денатурации белка. (изменения структуры конечного продукта).

Клеточные стенки микроорганизмов состоят из разных полимеров , по этому универсального метода их разрушения не существуют.

У грамположительных микроорганизмов клеточная стенка состоит из толстого пептидогликанового слоя N –ацетилглюкозамина и остатков N – ацетилмурамовой кислоты, соединенных пептидными мостиками.

У грамотрицательных бактерии клеточная стенка тоньше и покрыты снаружи слоем липидов.

Стенка дрожжевых клеток состоит из плотного слоя частично фосфорилированных маннанов и β – глюканов.

Низшие грибы имеют многослойные клеточные стенки, состоящие из α и β глюканов, гликопротеидов и хитина.

Состав и прочность клеточной стенки зависит от условий культивирования , скорости роста клеток, фазы , на которой они собираются , условия хранения сконцентрированных клеток и от того , экспрессировал ли выделенный микроорганизм клонированный ген.

Химический метод разрушения клеточных стенок – обработка щелочью. Если белковый продукт не разрушается при pH от 10,5 до 12,5, то можно без труда лизировать большие количества бактериальных клеток. Например, рекомбинантный гормон роста человека очень просто выделить из клеток *E. coli* обработкой натрия гидрокарбонатом при pH 11. После

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA АКАДЕМИАСЫ «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144

обработки щелочью не остается практически не одной жизнеспособной клетки, что автоматически решают проблему утечки рекомбинантных микроорганизмов.

Основной биохимический метод разрушения клеток микроорганизмов – лизис с помощью ферментов. Так, лизоцим яичного белка легко гидролизует клеточные стенки грамположительных бактерий. Для разрушения клеток грамотрицательных бактерий используют лизоцим и ЭДТА. Клеточные стенки дрожжей и плесневых грибов гидролизуют одним или несколькими ферментами: фосфоманназой, β -1,2- и β -1,6- глюканазой, хитиназой – или комплексным дрожжелитическим препаратом. Ферментативная обработка высокоспецифична, а лизис происходит в мягких условиях.

Клетки можно разрушать физическими методами: немеханическими (осмотическим шоком или быстрым многократным замораживанием-оттаиванием), механическими (обработкой УЗ, соударением, гомогенизацией под давлением). Механическое разрушение высокоэффективно, особенно УЗ-излучателями, генерирующим высокочастотные звуковые волны. УЗ-дезинтеграторы состоят из транзисторного генератора УЗ-волн, пьезоэлектрического или магнитострикционного преобразователя, набора рабочих камер (аппарат на основе УЗ-диспергатора УЗДН-1, Россия).

При большом количестве клеток используют баллистическую дзынтеригацию, ее проводят в высокоскоростных шаровых мельницах, куда помещают концентрированную суспензию клеток. Камера мельницы заполнена инертным абразивным материалом (стеклянными, полимерными шариками диаметром 1 мм). Содержимое быстро перемешивают лопасти, насаженные на ось. Большинство клеток разрушаются под действием сдвиговых напряжений, возникающих в результате быстрого движения шариков относительно друг друга, поверхности лопастей и камеры. Условия оптимального разрушения клеток подбирают, варьируя числом и формой лопастей, скоростью перемешивания, числом и размером шариков, геометрией камеры, температурой, концентрацией клеток (аппараты фирмы «Willia. Bachhotem», Швейцария, «GiffordWoodCo», США).

Соударения – клеточную суспензию большой вязкости направляют под давлением на неподвижную поверхность, в месте соприкосновения выделяется большое количество энергии, разрушающей клетки. Активность клеточных белков при разрушении клеток методом соударения уменьшается незначительно.

Экструзионные методы (продавливание суспензии клеток через капиллярные отверстия) предназначены для обработки жидких или замороженных суспензий клеток. Диаметр отверстий рабочих матриц составляет от нескольких миллиметров до десятых его долей. В гидроэкструдерах давление достигает 2000-4000 кг/см², в твердофазовых экструдерах – 10000-50000 кг/см². После экструзии давление резко сбрасывают, что вызывает лизис клеток. Экструзионные дезинтеграторы производят фирмы «MantonGaulin» (США), LKB (Швеция).

Дальнейшая обработка. После разрушения клеток их осколки удаляют низкоскоростным центрифугированием или микрофльтрацией через мембрану.

Получение готовой продукции

Получение готовой продукции связано с сушкой и консервированием биопрепаратов. Объект сушки – живые микроорганизмы, клетки, ферменты, гормоны и др. БАВ. Биопрепараты кроме биологически активной составляющей содержат органические соединения и значительное количество воды. Вода в продуктах биосинтеза может быть в

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA АКАДЕМИАСЫ «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144

свободном или связанном состояниях; значительная часть воды удерживается в субстрате физико-механическими и адсорбционными связями (вандерваальсовы силы). Физико-механически связанная вода находится в порах и капиллярах материала.

Для высушивания биопрепаратов применяют методы, не приводящие к потере биологической активности, где доминирует сублимационная сушка (установки типа «Иней» Институт биологического приборостроения, г. Пущино (Россия), «Юзефрау» (Франция), «Heto – Helton» (Дания).

Использование распылительных сушилок ограничено по причине сравнительно жестких условий сушки.

Термолабильные и неустойчивые по ряду показателей биопрепараты при высушивании в суспензиях (не содержащих защитных сред) подвержены существенным структурным и морфологическим изменениям. Это может сопровождаться утратой жизнеспособности и разрушениям клеточных структур.

Среды высушивания (защитные среды) – криопротекторы. Денатурирующее влияние замораживания сдерживается инактивацией (изменением свойств) защитных агентов:

- высокомолекулярных компонентов (ПВП м.м. от 2600 до 6400 – декстран, желатин, пептон);
- низкомолекулярных и буферных компонентов (глутамат, трисбуфер).

Защитная среда предохраняет биопрепараты от необратимых изменений в процессе замораживания, высушивания и при последующем хранении. Защитные среды, как правило, состоят из нескольких компонентов. Так, для консервирования клеточных культур используют криозащитные свойства глицерина и DMSO, их добавляют к питательной среде в концентрации 5-10%. При температуре минус 180-196 °С жизнеспособность законсервированной кукурузы может сохраняться неограниченно долго.

Розлив, укупорку, этикетировку, упаковку готовой продукции проводят в отдельных аппаратах (при малотоннажном производстве); это компактные установки для ампул, ёмкостей для инфузий; машины для укладки, упаковки.

Технологические линии (крупномасштабное промышленное производство) включают:

- УЗ-моечные машины;
- стерилизационные сушильные туннели (с ламинарными потоками горячего воздуха);
- машины для наполнения и запайки ампул;
- машины наполнения и запайки ёмкостей для растворов внутривенного введения (электронно-турбинный розлив в соответствии с GMP);
- машины для наполнения и запайки порошкообразных препаратов;
- машины для накопления и укупорки флаконов с навинчивающимся колпачком и специальной насадкой;
- наполнительные и укупорочные машины для инъекций;
- машины для нанесения кода (маркировка цветным кольцом);
- машины для контроля на герметичность;
- этикетировочные машины;
- машины для капсулирования порошков;
- машины для сборки, наполнения, запайки шприц-тюбиков.

Отдельные установки и технологические линии выпускают фирмы Америки, Швейцарии, Германии, Финляндии; установки этих фирм отвечают требованиям GMP.

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA АКАДЕМИАСЫ «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144

Субстраты для культивирования биообъектов

Питательные среды для выращивания объектов биотехнологии, т. е. продуцентов тех или иных соединений, могут быть неопределенного состава и включать различные биогенные добавки (растительные, животные или микробные) – мясной экстракт, кукурузную муку, морские водоросли и т. п. Применяются также среды из чистых химических соединений определенного состава, так называемые синтетические. Компонентный состав сред определяется питательными потребностями продуцента. Во многих процессах используют в качестве объектов организмы, ранее называвшиеся гетеротрофами, которые в настоящее время подразделяются на: органы автотрофы (употребляющие органические вещества как источники энергии), литогетеротрофы (использующие органические вещества как источники углерода) и органогетеротрофы (для которых органические вещества служат и источниками энергии, и источниками углерода). Питательные среды призваны обеспечивать жизнеспособность, рост и развитие соответствующих продуцентов, а также синтез целевого продукта с максимальной эффективностью. Требования к питательным средам, используемым в биотехнологии, ничем не отличаются от требований, предъявляемым к питательным средам, применяемым в микробиологии для культивирования тех или иных микроорганизмов. Для приготовления питательных сред в биотехнологии используются разнообразные субстраты, которые должны удовлетворять определенным критериям. Субстрат представляет собой сырье для получения целевого продукта и должен быть недефицитным, дешевым, по возможности легко доступным.

IV. Иллюстративный материал: прилагается

V. Литература:

основная:

- 209.Егорова Т.А., Клунова С.М., Живухина Е.А. Основы биотехнологии. – М.: Изд. центр «Академия», - 2008. – 208 с.
- 210.Евтушенко А.Н., Фомичев Ю.К. Введение в биотехнологию: Курс лекций. – Минск.: БГУ, 2002. - 105 с.
- 211.Сазыкин Ю.О., Орехов С.Н., Чакалева И.И. Биотехнология: Учебное пособие. – М.: Изд. Центр «Академия». – 2006. – 256 с.
- 212.Орехов С.Н. Фармацевтическая биотехнология. Руководство к практическим занятиям. – Учебное пособие. – Под ред. акад. РАМН В.А. Быкова, проф. А.В Катлинского. – М. : ГЭОТАР-Медиа 2009. – 384 с.
- 213.Елинов Н.П. Химическая микробиология. - Учебник. - М.: Высшая школа. - 1989, 448 с
- 214.Воробьева Л.И. Промышленная микробиология. - Учебное пособие. - М.: Изд-во МГУ. - 1989, 294 с.
- 215.Биотехнология. Принципы и применение. Пер. с англ. / Под ред. И. Хиггинса, Д. Беста, Дж. Джонса. - М.: Мир. - 1988, 480 с.
- 216.Чуешов В.И., Зайцев А.И., Шебанова С.Г. Промышленная технология лекарств. Том 2. Харьков, 2002.
- 217.Биотехнология микробного синтеза (Под ред. Бекера М.Е.) – Рига – 1980.
- 218.Биотехнология. (Отв. редактор А.А. Баев). - М.: Наука. - 1984, 310 с.
- 219.Перт С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов. М., - 1979 г.
- 220.Промышленная микробиология (Под ред. Егорова Н.С.) – М., 1989 г.
- 221.Процессы и аппараты химической технологии (Под ред. П.Г. Романкова). – Л. – 1981.

дополнительная:

97. Березов Т.Т. , Коровкина Б.Ф. – Биологическая химия (Под ред. И.М. Ивановой) – М., Медицина – 1981 г.
98. Никитин Г.А. – Биохимические основы микробиологических производств – Киев, 1981.
99. Бриттон Г. – Биохимия природных пигментов. М., Мир – 1986 г.

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA АКАДЕМИАСЫ «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11	
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144	

100. Попова Т.В. – Развитие биотехнологии в СССР – М., Наука - 1988 г.
101. Популяционные аспекты биотехнологии – Печуркин Н.С., Брильков А.В., Маркенкова Т.В. – Новосибирск: - Наука – 1990 г.
102. Специальные журналы: «Биотехнология», «Фармация Казахстана», «Фармацевтический бюллетень» и др.

VI. Контрольные вопросы (обратная связь):

48. Расскажите Методы контроля биомассы и количества клеток при культивировании.
49. По каким механизмам идет гибель клеток?
Какие применяются субстраты для культивирования

Лекция №28-29

I. Тема: Оптимизация технологических процессов биотехнологического производства целевых продуктов.

II. Цель: Ознакомить студентов с оптимизацией технологических процессов биотехнологического производства целевых продуктов.

III. Тезисы лекции:

Оптимизация биотехнологических процессов

Современный биотехнологический процесс немислим без применения ЭВМ для управления процессом ферментации, а именно для:

- Поддержания оптимального значения рН среды;
- Поддержания оптимальной температуры среды;
- Автоматического пеногашения;
- Регулирования частоты вращения мешалки;
- Контроля качества растворимого O₂;
- Контроля за удалением CO₂ из ферментера;
- Поддержания заданной скорости подачи субстрата и др.

ЭВМ используют для учета масштабного эффекта при оценке ферментационных параметров и поддержания их в оптимальном режиме, а также для проведения анализа при установлении влияния отдельных параметров на метаболическое поведение культур микроорганизмов. Процесс оптимизации требует *варьируемого параметра*, который надо оптимизировать удобными параметрами для вариаций служат (на выбор):

- общая продукция при ферментации в периодических условиях;
- образование продукта/ферментер·час;
- концентрация продукта в выходящем потоке (ферментация в непрерывном режиме);
- стоимость тонны продукта, выходящего из ферментера;
- стоимость тонны экстрагируемого продукта.

Компьютерный контроль очень важен для дозируемого добавления сырья и общего потребления энергии. Это особенно важно для ферментаций, в которых субстрат и сырье составляют главную стоимость.

Преимущество компьютерного контроля – это также быстрое и эффективное управление параметрами процесса, хранение и воспроизведение нужных данных, большая гибкость работы завода в соответствии со спросом на продукцию, наиболее надежный контроль загрязненности и безопасности на производстве.

Моделирование является одним из наиболее значимых направлений при разработке биотехнологических процессов, так как с помощью моделирования, экспериментального и математического, исследуются и разрабатываются новые процессы, совершенствуются

аппараты и технологические схемы производств. При экспериментальном моделировании в лабораторных и промышленных условиях применяются, как правило, модели объектов и процессов, отличающиеся масштабами. Экспериментальное моделирование позволяет исследовать и оптимизировать процессы, сущность которых мало изучена. Данный подход часто служит единственным средством для исследования биотехнологического процесса. Первым этапом экспериментального моделирования служит лабораторный уровень, в ходе которого при сравнительно небольших затратах проводится изучение новых продуцентов и разработка новых процессов. Далее полученные результаты переносят в опытные, полупромышленные и промышленные масштабы. На опытных установках отрабатываются все технологические детали будущего процесса, обучается персонал, создается оборудование, уточняются технико-экономические показатели. Затем проводятся крупномасштабные дорогостоящие промышленные эксперименты и испытания.

Экспериментальное моделирование имеет ряд особенностей: трудоемкость, сложность реализации новой модели процесса. Наиболее трудны при этом вопросы масштабирования технологии и оборудования. Развитие биологических агентов связано не только с поведением жидкости и реагентов в ферментере, но и с их собственным метаболизмом. Поэтому масштабирование в биологии требует специальных решений, при этом до настоящего времени нет единого подхода к решению данной задачи.

Для оптимизации и управления биотехнологическими процессами, помимо экспериментального, необходимо также привлечение математического моделирования. Эти два подхода, дополняя друг друга, позволяют более эффективно решать поставленные задачи. Экспериментальное моделирование часто предшествует математическому, являясь для него источником информации. Математические модели – удобное средство обобщения экспериментальных данных. Наличие математических моделей позволяет более обоснованно подходить к планированию экспериментов и обрабатывать данные, существенно сокращать объем экспериментальных работ. Для моделирования и расчета биотехнологических процессов в силу их сложности применяют системный подход. Математическая модель сложной биосистемы должна включать описание различных по своей природе объектов и явлений. Поэтому, анализируя биологическую системы в целом, применяют метод декомпозиции, расчлняя исходную систему на ряд подсистем: строятся модели массообмена, кинетики роста биообъекта и биохимических процессов. К настоящему времени разработано много моделей массообмена, кинетики потребления субстрата и образования различных продуктов. Наиболее сложная задача – моделирование собственно биологических объектов, так как они значительно сложнее химических, физических и технических. Объекты биотехнологии способны к саморегулированию, их сложность усугубляется неоднородностью. Процессы, протекающие в биореакторе, зависят не только от сложных внутриклеточных факторов, но и от условий внешней среды; в свою очередь, внешние процессы в биологии связаны с внутренними, поэтому их разделить нельзя. Кроме этого, на данном этапе уровня развития математической биологии отсутствует теория, адекватная сущности биологических процессов. Пока не создан математический аппарат, способный описать природу биологических превращений во всем многообразии, то есть необходимо развитие и совершенствование самого математического аппарата. Математическое описание биологических объектов дополнительно осложняется их недостаточной изученностью. Поэтому на данном этапе возможно достаточно упрощенное и приближенное математическое описание биологических объектов, это направление нуждается в существенном совершенствовании.

Оптимизация биотехнологических процессов осуществляется на основе сочетания экспериментального и математического моделирования и применения современных методов оптимизации (динамического и нелинейного программирования, вариационного исчисления). Однако в настоящее время для оценки оптимальности биотехнологических процессов трудно даже подобрать критерии. При оптимизации в биотехнологии необходимо

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11	
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144	

учитывать ограничения, связанные с экономическими и конструктивными условиями, возможностями контрольно-измерительной аппаратуры и средств управления, экологическими требованиями и др. Моделирование и оптимизация биотехнологических процессов – задача сложная и во многом еще не решенная. Однако именно разработка адекватных моделей различных биотехнологических процессов и на их основе создание совершенных методов оптимизации и управления – важнейшее направление биотехнологии, без которого невозможен прогресс.

Самым главным направлением биотехнологии является всемерная интенсификация производственных процессов, что достигается, с одной стороны, внедрением новых высокопродуктивных биологических объектов (продуцентов), а также широким применением эффективных технологических приемов (технологических режимов). Указанная цель достигается подбором подходящего сырья (субстрата для выращивания продуцента), разработкой наилучшей конструкции биореактора (ферментатора), оптимизацией условий культивирования продуцента, обеспечением эффективного контроля за самим технологическим процессом, а также усовершенствованием способов выделения и очистки целевого продукта.

Для обслуживания установок глубинного культивирования применяют *автоматизированную модульную систему*, включающую:

- очистка и стерилизация воздуха и пара с использованием металлокерамических и титановых фильтрующих элементов;
- модули технологической обвязки, содержащие автономную систему термостатирования, запорную и регулируемую арматуру, индивидуальные входные фильтры, электропневмообразователи и другие регулирующие устройства;
- блок автоматического контроля и управления, содержащий программное устройство, преобразователи сигналов от измерительных электродов, газоанализаторы для измерения O_2 , CO_2 , pH , температуры pCO_2 , pO_2 ;
- системы цифровой и диаграммной индикации текущих параметров культивирования.

Установка глубинного культивирования снабжены блоками дистанционного измерения давления в биореакторе и его рубашке, блоками дистанционного контроля интенсивности аэрации воздухом или газовой смесью (кислорода и азота, кислорода и углекислого газа, воздуха и углекислого газа, азота и углекислого газа).

Блок автоматического управления позволяет контролировать и поддерживать на заданном уровне программную стерилизацию биореактора и арматуры, скорость вращения мешалки дистанционный контроль открытия или закрытия вентилей и регулирующих клапанов.

Ряд стран специализируется на выпуске широкого ассортимента оборудования для культивирования различного назначения (фирма NBS – США; Полиферм, биотек – Швеция; Марубиши – Япония; ЛН – Ферментейшн – Великобритания; Браун – Германия; БИОР-0,1, БИОР-0,2 – Россия, институт биологического приобретения с опытом заводов АН РФ).

Важнейшая активная стадия формирования биотехнологической системы – отработка режима культивирования клеток-продуцентов. Этот самый сложный технологический процесс должен обеспечивать всю совокупность потребности клетки, обусловленных ее физиологией. Именно на этой стадии представляется возможным реализовать генетически предопределенный потенциал клетки. К уже рассмотренному выше комплексу – «клетка+питательная среда» - в процессе культивирования добавляется необходимость достижения благоприятных условий для жизнедеятельности клеток-продуцентов. Инженерное обеспечение оптимального процесса культивирования представляет собой весьма сложную многофакторную задачу, наиболее эффективное решение которой

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA АКАДЕМИАСЫ «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144

достигается в настоящее время с помощью автоматического управления процессом с использованием ЭВМ на основе математических моделей, с достаточной для практики точностью описывающих жизнедеятельность популяций клеток-продуцентов.

IV. Иллюстративный материал: прилагается

V. Литература:

основная:

- 222.Егорова Т.А., Клунова С.М., Живухина Е.А. Основы биотехнологии. – М.: Изд. центр «Академия», - 2008. – 208 с.
- 223.Евтушенков А.Н., Фомичев Ю.К. Введение в биотехнологию: Курс лекций. – Минск.: БГУ, 2002. - 105 с.
- 224.Сазыкин Ю.О., Орехов С.Н., Чакалева И.И. Биотехнология: Учебное пособие. – М.: Изд. Центр «Академия». – 2006. – 256 с.
- 225.Орехов С.Н. Фармацевтическая биотехнология. Руководство к практическим занятиям. – Учебное пособие. – Под ред. акад. РАМН В.А. Быкова, проф. А.В Катлинского. – М. : ГЭОТАР-Медиа 2009. – 384 с.
- 226.Елинов Н.П. Химическая микробиология. - Учебник. - М.: Высшая школа. - 1989, 448 с
- 227.Воробьева Л.И. Промышленная микробиология. - Учебное пособие. - М.: Изд-во МГУ. - 1989, 294 с.
- 228.Биотехнология. Принципы и применение. Пер. с англ. / Под ред. И. Хиггинса, Д. Беста, Дж. Джонса. - М.: Мир. - 1988, 480 с.
- 229.Чуешов В.И., Зайцев А.И., Шебанова С.Г. Промышленная технология лекарств. Том 2. Харьков, 2002.
- 230.Биотехнология микробного синтеза (Под ред. Бекера М.Е.) – Рига – 1980.
- 231.Биотехнология. (Отв. редактор А.А. Баев). - М.: Наука. - 1984, 310 с.
- 232.Перт С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов. М., - 1979 г.
- 233.Промышленная микробиология (Под ред. Егорова Н.С.) – М., 1989 г.
- 234.Процессы и аппараты химической технологии (Под ред. П.Г. Романкова). – Л. – 1981.

дополнительная:

103. Березов Т.Т. , Коровкина Б.Ф. – Биологическая химия (Под ред. И.М. Ивановой) – М., Медицина – 1981 г.
104. Никитин Г.А. – Биохимические основы микробиологических производств – Киев, 1981.
105. Бриттон Г. – Биохимия природных пигментов. М., Мир – 1986 г.
106. Попова Т.В. – Развитие биотехнологии в СССР – М., Наука - 1988 г.
107. Популяционные аспекты биотехнологии – Печуркин Н.С., Брильков А.В., Маркенкова Т.В. – Новосибирск: - Наука – 1990 г.
108. Специальные журналы: «Биотехнология», «Фармация Казахстана», «Фармацевтический бюллетень» и др.

VI. Контрольные вопросы (обратная связь):

50. Каковы оптимизации биотехнологических процессов?
51. Какие системы применяются для глубинного культивирования?
52. Что такое экспериментальное и математическое моделирование?

Лекция № 30

I. Тема: Социально- экономические аспекты дальнейшего развития биотехнологии.

II. Цель: Ознакомить студентов ссоциально- экономическими аспектами дальнейшего развития биотехнологии.

III. Тезисы лекции:

БИОТЕХНОЛОГИЯ – ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ

Современному обществу уже трудно представить свое существование без широкого использования продуктов, полученных с помощью микроорганизмов. В последние годы появился новый термин – «биотехнология», которым определяют технологию получения разнообразных, необходимых человеку продуктов из живых клеток различного происхождения. Биотехнология базируется на успехах микробиологии, биохимии, молекулярной биологии и генетики.

Менее полувека назад не были известны даже принципиальные подходы к промышленному получению антибиотиков, ферментов, аминокислот и многих других хозяйственно ценных препаратов, являющихся продуктами жизнедеятельности микроорганизмов, которые ныне прочно вошли в производственную практику. За последние годы возник ряд совершенно новых производств, основанных на применении различных мицелиальных грибов, дрожжей, бактерий. Сегодня мы можем говорить о широком круге микроорганизмов различных таксономических групп, которые могут использоваться в микробиологической промышленности как продуценты биологически активных и других веществ, необходимых для нужд народного хозяйства.

Сегодня уже определилось основные направления технического процесса в биотехнологии. Это в первую очередь: переход от периодических процессов к непрерывным, от поверхностного культивирования к глубинному, от открытых производств к асептическим, от производств, загрязняющих среду различными выбросами, к безотходной технологии. Как и в других отраслях, к числу важнейших направлений технического прогресса в биотехнологии относятся механизация и автоматизация производства. Важным критерием технического прогресса становится переход от производства технических препаратов к получению химически чистых продуктов, глубина переработки биомассы, метаболитов.

Совершенно новые пути в развитии биотехнологии связаны с осуществлением биохимических процессов в реакторах с иммобилизованными на различных носителях ферментами или клетками микроорганизмов. Это открывает пути развития непрерывных процессов, позволяет использовать дорогостоящие ферменты или микроорганизмы многократно и в течение длительного времени при высокой удельной производительности оборудования. Иммобилизованные ферменты уже находят применение при получении фруктозы из крахмала. В ближайшее время можно ожидать, что будут реализованы в производстве методы очистки сточных вод, получение глюкозы и ряда других хозяйственно ценных продуктов с помощью «иммобилизованных систем».

Качественно новым направлением в биотехнологии стали разработки по генной инженерии для получения новых штаммов микроорганизмов-продуцентов аминокислот, а также гормональных и иных веществ, которые нормально синтезируются только в организме человека и промышленное производство которых для медицинских целей встречает известные трудности. Этот способ позволил впервые осуществить микробиологический синтез инсулина, интерферона, ростовых гормонов и ряда других препаратов. Применение синтетической инженерии, представляющей собой своеобразный искусственный способ переноса генетического материала одних организмов, в том числе и от высших, к другим, в частности, к одноклеточным организмам, сулит широкие возможности дальнейшего развития биотехнологии, включая создание принципиально новых биотехнологических производств.

В числе таких методов биотехнологии следует назвать культивирование клеток и тканей высших растений в целях получения редких и дорогостоящих продуктов, например

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA АКАДЕМИАСЫ «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144

биологически активных веществ, добываемых из экзотических растений, не произрастающих в нашей стране или редко встречающихся в природе.

Обновится и расширится ассортимент микробиологических удобрений и средств защиты растений. Будут разработаны и внедрены новые, более удобные в применении и более эффективные рецептурные формы биопрепаратов.

В области производства микробиологического белка основным направлением может стать получение пищевых белковых продуктов. Это потребует опытно-промышленной отработки методов очистки микробной биомассы и белковых препаратов, а также пищевых продуктов из них. Дальнейшее развитие получит энзиматические производства фруктозы, галактозы, глюкозо-фруктозных сиропов из крахмалсодержащих и целлюлозосодержащих продуктов, отходов молочного производства.

Следует ожидать значительного возрастания роли промышленной микробиологии и энзимологии в развитии производства пластмасс, смол и других продуктов на полимерной основе. Это направление потребует новых научных подходов и инженерных решений.

Дальнейший прогресс биотехнологии приведет к созданию микробиологического и энзиматического производства как совершенно новых продуктов, так и веществ, производимых ныне энергетически менее выгодными способами. В числе таких веществ можно назвать различные углеводороды сложного строения, широкий набор органических кислот и других хозяйственно ценных веществ.

Многообещающие перспективы открываются при организации производства аденозинтрифосфата (АТФ) – универсального аккумулятора энергии в живых организмах. Организация широкого промышленного производства этого вещества будет способствовать созданию реальных условий создания биохимических производств, основанных на процессах энзиматического синтеза в бесклеточных системах.

В качестве источников сырья для биотехнологии все большее значение будут приобретать воспроизводимые ресурсы непищевых растительных материалов, отходов сельского хозяйства. Наряду с индустриальным сырьем, необходимым для крупных промышленных предприятий, отходы сельскохозяйственного производства и пищевой промышленности послужат дополнительным источником биосинтеза непосредственно в хозяйствах во все расширяющихся масштабах кормового белка, легкоусвояемых углеводов, других кормовых средств, а также вторичного топлива (биогаза), органических удобрений, консервантов.

Внедрение достижений биотехнологии в производство все в большей мере будет способствовать решению таких глобальных задач современности, как продовольственная, сырьевая, экологическая и энергетическая проблемы.

Биотехнологические аспекты фармацевтического производства.

Биотехнологическое производство наукоемкое производство и высоко эффективное производство, что влечет за собой значительное уменьшение количества отходов такого производства. При этом мало расходуется природных ресурсов, сам процесс является мало энергозатратным (мало энергоемким). Так потребление ресурсов (энергии) составляет всего 0,6-1% от всей промышленности, потребление воды 0,01%, выброс вредных веществ в атмосферу 0,00...%.

в бензольном кольце на гидроксильную группу.

биотехнологического производства

Направление совершенствования

1. Совершенствование биосинтеза в ферментере приведет к уменьшению потребления энергии, уменьшению выброса вредных веществ. Это достигается выбором продуцента.
2. Замена дефицитных сред на недефицитные, а также использование недефицитных реактивов (например, китовый жир используется как пеногаситель (детергент), но он дефицит, так как был принят запрет на отстрел китов и стали выпускать синтетические пеногасители).
3. Работа с иммобилизованными биообъектами.
4. Совершенствование выделения и очистки; уменьшение количества используемых органических растворителей и введение мембранной технологии; соблюдение правил GMP. Идеальное производство – это безотходное производство, что на практике получить невозможно. Реально иметь только малоотходное производство.

Биотехнология проникает в тяжелую промышленность, где микроорганизмы используются для добычи, превращения и переработки природных ископаемых. Уже в древности первые металлурги получали железо из болотных руд, производимых железобактериями, которые способны концентрировать железо. Теперь разработаны способы бактериальной концентрации ряда других ценных металлов — марганца, цинка, меди, хрома и др. Эти методы используются для разработки отвалов старых рудников и бедных месторождений, где традиционные методы добычи экономически невыгодны.

Биотехнология решает не только конкретные задачи науки и производства. У нее есть более глобальная методологическая задача — она расширяет и ускоряет масштабы воздействий человека на живую природу и способствует адаптации живых систем к условиям существования человека, т. е. к ноосфере. Биотехнология, таким образом, выступает в роли мощного фактора антропогенной адаптивной эволюции.

У биотехнологии, генетической и клеточной инженерии многообещающие перспективы. Со временем человек будет внедрять нужные гены в клетки растений, животных и человека, что позволит постепенно избавиться от многих наследственных болезней, заставит клетки синтезировать необходимые лекарства и биологически активные соединения, а затем — непосредственно белки и незаменимые аминокислоты, употребляемые в пищу. Используя методы, уже освоенные природой, биотехнологии надеются получать с помощью фотосинтеза водород — самое экологически чистое топливо будущего, а также превращать в аммиак атмосферный азот при обычных условиях и т. д.

Биодеградация токсических соединений и утилизация биомассы

Еще сравнительно недавно ни у кого не возникало сомнений, что окружающая среда — земля, воздух, вода — всегда будут эффективно перерабатывать бытовые, промышленные, сельскохозяйственные отходы. Человечество столкнулось с двумя фундаментальными проблемами — переработкой отходов, постоянно образующихся в огромном количестве, и разрушением токсических соединений, десятилетиями накапливающихся в воде, почве, на свалках. Отходы сжигают, обрабатывают химикатами, но это лишь усугубляет загрязнение окружающей среды и, к тому же, дорого обходится. Разные страны пытаются решить эти проблемы законодательным путем, однако успеха здесь нет. В условиях НТП экосфера испытывает мощное антропогенное воздействие, в результате нарушается природная гармония, сложившаяся тысячелетиями, происходят заметные сдвиги в экосистемах, приводящие к исчезновению целых видов животных и растений, возникают новые формы микроорганизмов, нарушаются иммунные реакции человека.

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA АКАДЕМИЯСЫ «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144

В настоящее время проходят проверку многие технологические, в том числе технологические приемы, с помощью которых возможно перерабатывать большие количества отходов и токсических веществ. Правительства многих стран поощряют предприятия, перерабатывающие отходы производства, повторно использующие содержащиеся в них полезные вещества.

Термин «биodeградация» относится к процессу разрушения загрязняющих веществ, попавших в окружающую среду, с помощью живых микроорганизмов. Термин «биомасса» - к совокупности веществ и материалов, побочных продуктов пищевой, перерабатывающей промышленности, ранее считавшихся отходами, ставших сырьем для производства ряда экономически важных продуктов.

В середине 1960-х гг. были обнаружены почвенные микроорганизмы, способные деградировать ксенобиотики (гербициды, пестициды, хладагенты, органические растворители и т.д.). Основную группу почвенных микроорганизмов, разрушающую ксенобиотики, составляют бактерии рода *Pseudomonas*, разные штаммы которых способны расщеплять более 100 органических соединений.

В биodeградации сложной органической молекулы обычно участвуют несколько разных ферментов. Гены, кодирующие такие энзимы, могут иметь хромосомную локализацию, но чаще всего входят в состав крупных плазмид, иногда локализуются и в хромосомной, и в плазмидной ДНК.

Бактерии, разрушающие *негалогенированныеароматические соединения*, как правило, превращают их в катехол или протокатехоат. Затем, в ходе нескольких реакций окислительного расщепления, - ацетилСоА и сукцинат или пируват и ацетильдегид, последние метаболизируют практически все микроорганизмы.

Галогенированные ароматические соединения, компоненты большинства пестицидов, гербицидов, с помощью этих же ферментов разрушаются до катехола, протокатехоата, гидрохинона или их галогенированных производственных; причем скорость их деградации обратно пропорциональна числу атомов галогена в исходном соединении. Дегалогенирование (отцепление замещенного атома галогена от органической молекулы) необходимо для детоксикации соединения. Дегалогенирование осуществляется по ходу неспецифическойдиоксигеназной реакции замещением галогена

Метаболические пути биodeградации ксенобиотиков, созданных методомгенной инженерии

Ряд микроорганизмов обладает природной способностью к деградации различных ксенобиотиков, однако:

- ни один из них не может разрушать все органические соединения;
- некоторые органические соединения при высокой концентрации подавляют функционирование или рост микроорганизмов, их деградирующих;
- большинство очагов загрязнения содержат смесь химикатов; микроорганизм, способный разрушать один или несколько этих смесей, может инактивироваться другими компонентами;
- многие не полярные соединения адсорбируются частицами почвы и становятся менее доступными;
- биodeградация органических соединений происходит довольно медленно.

Часть этих проблем решает конъюгированный перенос плазмид в один рецепиентный штамм. Если две плазмиды содержат гомологичные участки, между ними может произойти

рекомбинация с образованием гибридной плазмиды, которая имеет больший размер и обладает свойствами исходных плазмид. Если две плазмиды не содержат гомологичных участков и относятся к разным группам несовместимости, они могут сосуществовать в одной бактерии.

В 1970 г. был создан первый бактериальный штамм, обладающий более широкими катаболическими возможностями. Он расщеплял большинство углеводов нефти и был назван «супербациллой». Для его получения использовали плазмиды, каждая из которых кодировала фермент, расщепляющий определенный класс углеводов (рис. 22).

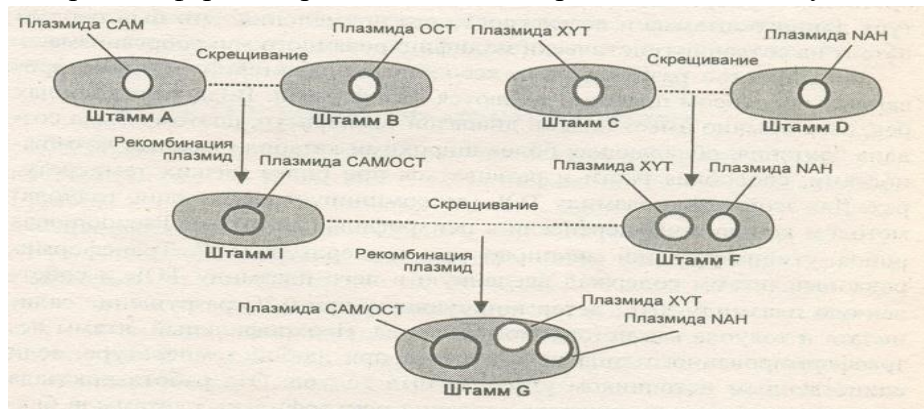


Рис. 22. Создание бактериального штамма, способного разрушать камфару, октан, ксилол и нафталин. Штамм А, несущий плазмиду САМ (она детерминирует разрушение камфары), скрещивают со штаммом В, несущим плазмиду ОСТ (разрушение октана). При этом образуется штамм Е, который содержит гибридную плазмиду, образовавшуюся в результате гомологичной рекомбинации между исходными плазмидами и обладающую функциями каждой из них. Штамм С, содержащий плазмиду ХУЛ (разрушение ксилола), скрещивают со штаммом D, содержащим плазмиду НАН (разрушения нафталина), и получают штамма F, который несет обе эти плазмиды. Наконец, скрещивают штаммы Е и F, в результате чего образуется штамм G, содержащий плазмиды САМ/ОСТ, ХУЛ и НАН (по Б.Глику, Дж. Пастернаку)

Конъюгацией была перенесена плазида САМ в штамм, несущий плазмиду ОСТ. Эти плазмиды не совместимы (не могут существовать в одной клетке в виде отдельных плазмид), но в результате произошедшей между ними рекомбинации образовалась одна плазида, объединяющая из функции. Затем плазмиду НАН перенесли в штамм, несущий плазмиду ХУЛ; эти плазмиды совместимы и могут сосуществовать в одной клетке-хозяине. Наконец, гибридную плазмиду в штамм, несущий плазмиды НАН и ХУЛ. В результате этих манипуляций получили штамм, растущий на неочищенной нефти лучше исходных штаммов, взятых по отдельности или вместе. Этот штамм не использовали для ликвидации нефтяных загрязнений, но он сыграл важную роль в становлении биотехнологической промышленности. Изобретатель «супербациллы» получил патент США, описывающий структуру данного штамма и возможности его применения. Это был первый патент на создание генетически модифицированного микроорганизма.

Большинства разрушающих ксенобиотики бактерий, модифицированных переносом плазмид, являются мезофиллами. Вода загрязненных рек, озер обычно имеет низкий диапазон температур, поэтому была создана бактерия, обладающая более широкими катаболическими возможностями, способная расти и развиваться при более низких температурах. Для этой цели плазмиду TOL (детерминирует разрушение толуола) методом конъюгации перенесли в психрофильный штамм Pseudomonasputida, утилизирующий салицилат при температуре 0 °C. Трансформированный штамм содержал введенную в него плазмиду TOL и собственную плазмиду SAL, детерминирующую при 0 °C разрушение салицилата и толуола как источников углерода. Психрофильный штамм не

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144

трансформированного типа не мог расти при любой температуре, если единственным источником углерода был толуол. Эта работа показала принципиальную возможность создания психрофильных штаммов бактерий, эффективно разрушающих ксенобиотики в природных условиях.

Объединение разных метаболических путей в одном микроорганизме с помощью конъюгации – это лишь один из способов создания бактерий с новыми свойствами. Можно расширить их катаболические возможности, модифицируя гены, кодирующие ферменты того или иного метаболического пути. Совершенствование того или иного катаболического пути реально с помощью технологии рекомбинантных ДНК, традиционного мутагенеза и соответствующих методов отбора.

Одним из наиболее распространенных веществ, загрязняющих почву и воздух, является трихлорэтилен, широко использующийся в качестве растворителя и обезвоживающего средства. Трихлорэтилен длительное время остается в окружающей среде, считается канцерогенным; к тому же, анаэробные почвенные бактерии дегалогенирует его, превращая в еще более токсичное соединение – винил хлорид.

Некоторые штаммы *P. putida*, разрушающие такие ароматические соединения, как толуол, разрушают и трихлорэтилен. Генетическими исследованиями установлено, что для полной детоксикации трихлорэтилена не нужны все ферменты расщепления ксилола и толуола, достаточно лишь толуолдиоксигеназы, которая в норме катализирует реакцию окисления толуола до цис-толуолдигидродиола. Образование функциональной толуолдиоксигеназы кодируется четырьмя генами; их выделили и экспрессировали в *E.coli* под контролем сильного промотора, который активируются изопропил-β-D-тиогалакто-пиранозидом, в результате трихлорэтилен разлагается до безвредных соединений. Исходная скорость деградации трихлорэтилена в *E.coli* ниже, чем *P. putida*, но она более длительно сохраняется в *E. coli*.

Утилизация крахмала и сахаров

Крахмал – основной резервный полисахарид растений, представляющий смесь гомополимеров D-глюкозы как линейных (амилоза), так и разветвленных (амилопектин). Крахмал широко используют в пищевой промышленности и пивоварении, при этом его сначала гидролизуют до низкомолекулярных компонентов, затем превращают в другие соединения, преимущественно во фруктозу и этанол. Основные ферменты, необходимые для гидролиза крахмала и дальнейших превращений, - α-амилаза, глюкоамилаза и глюкоизомераза, стоимость которых составляет около 30% общей стоимости ферментов, применяемых в настоящее время в промышленности. Промышленное производство фруктозы и этанола из крахмала – многоэтапный процесс, включающий ферментативные стадии (рис. 23).

1. *Желирование молотого зерна* (содержание крахмала примерно 40%) проводится паром под давлением, в результате разрушаются крахмальные зерна и крахмал становится доступен для последующего ферментативного гидролиза. Полученный продукт имеет желеобразную консистенцию.
2. Ожижение желированного крахмала заключается в его охлаждении до 50-60°C и добавлении до α-амилазы, под влиянием которой гидролизуются доступные α-1,4-связи с образованием низкомолекулярных полисахаридов. Высокая температура повышает эффективность проникновения фермента в желированный крахмал и увеличивает скорость гидролиза.

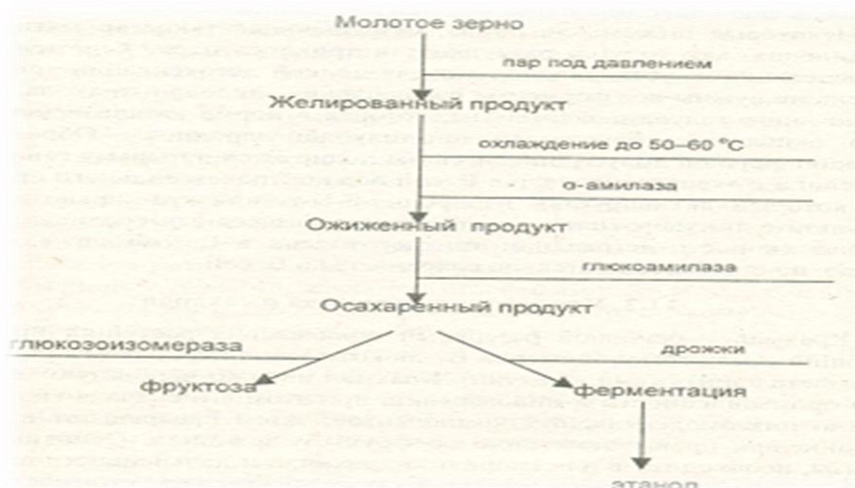


Рис. 23. Промышленное производство фруктозы и этанола из крахмала

3. Осахаривание (полный гидролиз) низкомолекулярных полисахаридов (как линейных, так и разветвленных) происходит под действием глюкоамилазы.

Конечным продуктом такой переработки является глюкоза, из которой с помощью дрожжевой ферментации получают этанол или при участии глюкозоизомеразы – фруктозу. α -амилазу можно выделить из многих микроорганизмов, для промышленных целей ее обычно получают из *Bacillus amyloliquefaciens*, глюкоамилазу также синтезируют многие микроорганизмы, но обычно ее получают из грибов *Aspergillus niger*.

Стоимость производства этанола и фруктозы из молотого зерна, в основном, определяется стоимостью ферментов, используемых однократно. Поэтому разработка недорогого широкомасштабного производства этих ферментов существенно снижает стоимость конечных продуктов; для этих целей используют:

- разновидности α -амилазы (встречающиеся в природе или созданные методом генной инженерии), обладающие более высокой активностью, позволяющие проводить ожижение при 80-90 °С, это ускоряет гидролиз желированного крахмала, экономит энергию, расходуемую на охлаждение до температуры, при которой идет гидролиз;
- модифицированные гены α -амилазы и глюкоамилазы, чтобы контролируемые ими ферменты имели одинаковые оптимумы температуры и pH, позволяющие совместить этапы ожижения и осахаривания;
- клонированные бактериальные гены, кодирующие ферменты – термостабильные, обладающие высокой каталитической активностью, устойчивые к действию этанола.

Сбраживание субстрата при промышленном производстве этанола осуществляется в основном *S. cerevisiae*, но более рационально использовать *Zygomonas mobilis*, грамтрицательную палочку, сбраживающую глюкозу, фруктозу, сахарозу с относительно большим выходом этанола.

Для расширения спектра утилизируемых *Z. mobilis* субстратов, были выделены и экспрессированы в *Z. mobilis* чужеродные гены (ферментов, гидролизующих лактозу, крахмал, целлюлозу, ксилозу, целлобиозу, пентозу), в частности ген глюкозо/ксилозоизомеразы и ксилулокиназы – ферментов, необходимых для утилизации ксилозы. На следующем этапе в *Z. mobilis* имплантировали плазмиду, несущую два оперона, один из которых кодировал два фермента, метаболизирующих пентозу. Затем эти два

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA АКАДЕМИАСЫ «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144

оперона встраивали в челночный вектор *E. coli* – *Z. Mobilis*, которые трансформировали *Z. Mobilis*. Трансформированные клетки утилизируют ксилозу и перерабатывали пентозы до этанола, причем продуценты эффективно росли, используя в качестве источника углерода побочные продукты деревообрабатывающей и целлюлозно-бумажной промышленности.

При переработке растительного материала образуется большое количество лигноцеллюлозных отходов, годовое производство их огромно, поэтому идет интенсивный поиск эффективных способов ферментативного расщепления. Комплекс лигноцеллюлозы подвержен совместному действию целлюлолитических микроорганизмов только после предварительной обработки сильной кислотой или щелочью, или высокой температурой под давлением, что существенно сказывается на стоимости конечного продукта.

Целлюлозные гены (эндо-и экзоглюканаза, β -глюкозидаза, целлебиогидролаза, целлобиза) клонировали и экспрессировали в *E.coli* или другие микроорганизмы и получали новые штаммы с полезными свойствами. Так *S. cerevisiae* и *Z. mobilis*, эффективно преобразующие в этанол простые сахара, после введения им целлюлозных генов могли превращать целлюлозу непосредственно в этанол.

Целлюлазы возможно использовать для промышленной биопереработки бумажных отходов в этанол. Для этого отходы частично расщепляли целлюлазами при 45°C, затем, удаляя целлюлазы, проводят ферментацию высвободившейся глюкозы *S. cerevisiae* при 37°C. Этот подход позволяет получить 400 л этанола из 1 т бумажных отходов, используя его в качестве топлива, экономя, примерно, 16% бензина.

Созданы штаммы *Lactobacillus plantarum*, способствующие более эффективному образованию силоса из сельскохозяйственных культур, которые содержат много крахмала, например люцерны.

Белок одноклеточных организмов (БОО) – этот термин принят для белковых продуктов, синтезируемых монокультурой *Methylophilus methylotrophus* (в качестве основного субстрата эти бактерии используют метан) на некоторых видах биомассы (целлюлозные отходы, продукты переработки нефти). Предполагалось, что БОО можно использовать в качестве пищевых добавок или корма для скота благодаря высокому содержанию метионина, лизина, витаминов, микроэлементов. Производство БОО оказалось экономически нецелесообразным по причинам высокой стоимости получаемых продуктов, сомнительного вкусового качества и токсичности. Для того чтобы разработать экономичный процесс производства БОО из отходов, необходимо изучить кинетику роста, метаболизма, возможность генетического манипулирования и безопасность многих микроорганизмов.

Основные санитарные и экологические требования к производству биопрепаратов

Продукция биопредприятий на всех этапах – от исследования и лабораторных испытаний до производства и упаковки конечного продукта - требует строгих правил к качеству, чистоте, безопасности лекарственных препаратов.

Производство стерильных препаратов особо точно регулируется национальными руководствами и Правилами производства и контроля качества лекарственных средств *good manufacturing practice for medicinal products* (GMP) ГОСТ Р 52249-2004.

Предприятия медицинской и микробиологической промышленности классифицирует согласно международному стандарту ИСО 14694-1 «Классификация чистых помещений и чистых зон загрязнения», 1998 (от ИОС -1 до ИОС-9 – класс чистоты ПДК). Этой классификации соответствует российский стандарт ГОСТ Р 50766-95 «Чистые помещения.

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144

Классификация. Методы аттестации. Основные требования». Стандарт отличается только тем, что вместо ИСО указано обозначение Р (русский), в скобках – класс чистоты по американскому стандарту.

Каждое биопроизводство должно обеспечить защиту:

- сырья, промежуточных и конечных продуктов от любого загрязнения;
- персонала об субстанций, с которыми они работают;
- окружающей среды от веществ, которые при отсутствии соответствующих мер и контроля могут потоком воздуха выйти наружу с биопредприятия.

При неосторожной работе с рекомбинантными штаммами не исключено их попадание в окружающую среду, где они могут вызвать неконтролируемые мутации не только у микроорганизмов, но и других видов живых существ. Это требует от персонала, занятого в разработке и реализации биотехнологических процессов с использованием приемов генной инженерии, большей ответственности и производственной дисциплины.

Перед окончательным удалением из установки все рекомбинантные микроорганизмы должны быть инактивированы в соответствии с определенными инструкциями. Отработанную культуральную среду тщательно проверяют на наличие в ней жизнеспособных микроорганизмов, чтобы исключить их попадание в окружающую среду.

Серьезные экологические проблемы возникают в связи с защитой водоемов от сточных вод, образующихся в больших объемах при биотехнологическом процессе. Основа очистки сточных вод и защиты от них водоемов – дорогостоящие специальные очистные сооружения, а также замкнутые системы водооборота. Перед спуском в сточных вод в очистные сооружения отработанные нативные растворы подвергают предварительно УФ-облучению с одновременным введением окислителя, что позволяет разрушить высокомолекулярные органические соединения с образованием низкомолекулярных веществ, поддающихся биологическому окислению, что позволяет разрушить высокомолекулярные органические соединения с образованием низкомолекулярных веществ, поддающихся биологическому окислению в системе очистных сооружений. В «часы пик» предпочтительно эпизодическое использование коммерческих препаратов – генно-инженерных штаммов-деструкторов, например бактерий рода *Pseudomonas*, в плазмидах которых имеются гены окислительных ферментов. Постоянное присутствие штаммов-деструкторов в промышленных стоках считается малоэффективным по причине малой стабильности плазмид. Затем идут следующие этапы очистки:

- Первичная обработка (удаление легко отделяющихся загрязнений- крупных, легко осаждающихся частиц, масляных плёнок);
- Вторичная обработка (удаление суспендированных твёрдых частиц, как правило, органической природы; для этой цели используют биологическое окисление – аэрацию);
- Третичная обработка (полное отделение всех оставшихся примесей методами электродиализа, обратного осмоса, фильтрации, адсорбции)

Используют биологические фильтры, но предпочтительны биологические окислительные пруды с природным комплексом микроорганизмов (активный ил), напоминающие естественные водные экосистемы, где в процессе фотосинтеза водоросли выделяют кислород, поддерживая аэробный режим, который необходим для бактерий, утилизирующих органические загрязняющие вещества. При этом чётко отслеживается баланс роста и продуктивности бактерий различных групп.

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН MEDISINA АКАДЕМИАСЫ «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ	 SKMA -1979-	SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»
Кафедра «Технологии фармацевтического производства»	044/48-11	
Фармацевтическая биотехнология»	1стр.из144	

Важной задачей защиты окружающей среды является сокращение выбросов вредных веществ в атмосферу. Ее решение связано с глубокой очисткой дымовых газов с исключением рассеивания в атмосфере конечного продукта.

Рациональное решение проблемы защиты окружающей среды должно базироваться на современных принципах разработки биотехнологических производств, основанных на безотходной или малоотходной технологии. Это наиболее прогрессивный путь решения экологических проблем, в том числе в области медицинской биотехнологии.

IV. Иллюстративный материал: прилагается

V. Литература:

основная:

- 235.Егорова Т.А., Клунова С.М., Живухина Е.А. Основы биотехнологии. – М.: Изд. центр «Академия», - 2008. – 208 с.
- 236.Евтушенков А.Н., Фомичев Ю.К. Введение в биотехнологию: Курс лекций. – Минск.: БГУ, 2002. - 105 с.
- 237.Сазыкин Ю.О., Орехов С.Н., Чакалева И.И. Биотехнология: Учебное пособие. – М.: Изд. Центр «Академия». – 2006. – 256 с.
- 238.Орехов С.Н. Фармацевтическая биотехнология. Руководство к практическим занятиям. – Учебное пособие. – Под ред. акад. РАМН В.А. Быкова, проф. А.В Катлинского. – М. : ГЭОТАР-Медиа 2009. – 384 с.
- 239.Елинов Н.П. Химическая микробиология. - Учебник. - М.: Высшая школа. - 1989, 448 с
- 240.Воробьева Л.И. Промышленная микробиология. - Учебное пособие. - М.: Изд-во МГУ. - 1989, 294 с.
- 241.Биотехнология. Принципы и применение. Пер. с англ. / Под ред. И. Хиггинса, Д. Беста, Дж. Джонса. - М.: Мир. - 1988, 480 с.
- 242.Чуешов В.И., Зайцев А.И., Шебанова С.Г. Промышленная технология лекарств. Том 2. Харьков, 2002.
- 243.Биотехнология микробного синтеза (Под ред. Бекера М.Е.) – Рига – 1980.
- 244.Биотехнология. (Отв. редактор А.А. Баев). - М.: Наука. - 1984, 310 с.
- 245.Перт С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов. М., - 1979 г.
- 246.Промышленная микробиология (Под ред. Егорова Н.С.) – М., 1989 г.
- 247.Процессы и аппараты химической технологии (Под ред. П.Г. Романкова). – Л. – 1981.

дополнительная:

109. Березов Т.Т. , Коровкина Б.Ф. – Биологическая химия (Под ред. И.М. Ивановой) – М., Медицина – 1981 г.
110. Никитин Г.А. – Биохимические основы микробиологических производств – Киев, 1981.
111. Бриттон Г. – Биохимия природных пигментов. М., Мир – 1986 г.
112. Попова Т.В. – Развитие биотехнологии в СССР – М., Наука - 1988 г.
113. Популяционные аспекты биотехнологии – Печуркин Н.С., Брильков А.В., Маркенкова Т.В. – Новосибирск: - Наука – 1990 г.
114. Специальные журналы: «Биотехнология», «Фармация Казахстана», «Фармацевтический бюллетень» и др.

VI. Контрольные вопросы (обратная связь):

53. Какие разработки стали качественным направлением в биотехнологии?
54. Какие перспективные развития наблюдаются в биотехнологии?
55. Метаболические пути биодegradации ксенобиотиков, созданных методом генной инженерии.
56. Какие основные санитарные и экологические требования к производству биопрепаратов?

ОҢТҮСТІК-ҚАЗАҚСТАН
MEDISINA
AKADEMIASY



SOUTH KAZAKHSTAN
MEDICAL
ACADEMY

«Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ

АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»

Кафедра «Технологии фармацевтического производства»

044/48-11

Фармацевтическая биотехнология»

1стр.из144