

УЧЕБНОЕ
ПОСОБИЕ

Я.М. Станишевский

ПРОМЫШЛЕННАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Министерство науки и высшего образования РФ

Рекомендовано Координационным советом по области образования «Здравоохранение и медицинские науки» в качестве учебного пособия для использования в образовательных учреждениях, реализующих основные профессиональные образовательные программы высшего образования уровня магистратуры по направлению подготовки 33.04.01 «Промышленная фармация»

Регистрационный номер рецензии 1025 от 19 марта 2020 г.



Москва
ИЗДАТЕЛЬСКАЯ ГРУППА
«ГЭОТАР-Медиа»
2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений и условных обозначений	5
Введение	6
Глава 1. Роль биотехнологии в современной фармации	8
Глава 2. Основные этапы (стадии) биотехнологического производства лекарственных средств.	12
2.1. Методы хранения микроорганизмов (консервация)	12
2.2. Процессуальная схема биотехнологического производства	13
2.3. Стадия получения посевного материала.	15
2.4. Стадия приготовления питательной среды	17
2.5. Аэрация и перемешивание при ферментации	21
2.6. Пенообразование и пеногашение	23
2.7. Параметры и способы контроля в ферментере	25
2.8. Асептика биотехнологического производства	27
2.9. Выделение биомассы	32
2.10. Выделение целевых продуктов биотехнологического производства.	33
2.10.1. Выделение биопрепаратов первой группы (инактивированная биомасса)	33
2.10.2. Выделение биопрепаратов второй группы (продукты метаболизма)	35
2.10.3. Выделение биопрепаратов третьей группы (препараты на основе жизнеспособных микроорганизмов)	41
Глава 3. Основные методы и процессы биотехнологического производства лекарственных средств.	43
3.1. Методы культивирования микроорганизмов.	43
3.2. Процессы культивирования микроорганизмов.	44
3.2.1. Периодический процесс культивирования микроорганизмов	45
3.2.2. Непрерывный процесс культивирования микроорганизмов	48
Глава 4. Биологические объекты-продуценты (микроорганизмы), используемые в биотехнологическом производстве лекарственных средств	51
4.1. Понятие о микроорганизмах.	51
4.2. Метаболизм микробной клетки, принципы его регулирования	56

Глава 5. Селекция микроорганизмов-продуцентов	60
5.1. Мутагенез микробной клетки (мутации)	61
5.2. Рекомбиногенез.	64
5.2.1. Основы генной инженерии	64
5.2.2. Лекарственные препараты, полученные методом генной инженерии	68
Глава 6. Профилактические и диагностические средства биотехнологического производства	71
6.1. Иммунобиотехнологические средства (вакцины и сыворотки)	71
6.2. Диагностические препараты (иммунодиагностикумы)	77
6.3. Иммобилизованные ферменты	84
Глава 7. Разработки биотехнологического производства лекарственных средств	89
7.1. Биотехнологическое производство вакцин	89
7.1.1. Технология получения бактериальных вакцин.	90
7.1.2. Особенности получения вирусных вакцин	94
7.2. Биотехнологическое производство бактериофагов.	96
7.3. Бактериальные препараты, которые нормализуют микрофлору человека	99
7.4. Биотехнологическое производство антибиотиков	103
7.4.1. Особенности при получении пенициллина.	113
7.5. Биотехнологическое производство витаминов	124
7.5.1. Особенности получения витамина B ₂ (рибофлавина)	125
7.5.2. Особенности получения витамина B ₁₂	128
7.5.3. Особенности получения витамина А	131
7.6. Биотехнологическое производство ферментных препаратов.	134
Литература и интернет-источники	139
Предметный указатель	140

Глава 1

РОЛЬ БИОТЕХНОЛОГИИ В СОВРЕМЕННОЙ ФАРМАЦИИ

Биотехнология (само слово включает в себя корень «жизнь», от др.-греч. βίος) — промышленный метод получения ценных для человека продуктов, который базируется на использовании живых организмов, в большинстве случаев — микроорганизмов.

Промышленная биотехнология — это наукоемкая технология, включающая достижения науки, использующей биологических агентов для целенаправленного воздействия на природу, а также сфера производства полезных для человека продуктов, в том числе лекарственных средств, со своим специфическим аппаратным оформлением.

В категорию лекарственных средств, полученных промышленной биотехнологией, входят:

- ▶ **лекарственные средства** для лечения (аминокислоты и препараты на их основе, антибиотики, ферменты, коферменты, кровезаменители и плазмозаменители, гормоны стероидной и полипептидной природы, алкалоиды и др.);
- ▶ **профилактические средства** (вакцины, анатоксины, интерфероны, сыворотки, иммуномодуляторы, нормофлоры и др.);
- ▶ **диагностические средства** (ферментные и иммунные диагностикумы, препараты на основе моноклональных антител и иммобилизованных клеток и др.).

Это далеко не полный перечень лекарственных средств, которыми располагает современная фармация и в основе производства которых используются биотехнологии.

Историческая справка по развитию биотехнологии

Люди с давних времен использовали микроорганизмы, не зная об их существовании. Например, в процессе брожения при получении хлеба или вина, о чем свидетельствует факт обнаружения в египетских пирамидах хлеба и рисунков, изображающих технологии винного производ-

ства. Две тысячи лет назад виноделие начало развиваться во Франции. Существует мнение, что пиво научились варить пять тысяч лет тому назад. В IX веке пиво было распространено в Киевской Руси.

Кисломолочные продукты появились вместе с развитием животноводства. Немного позже люди научились получать этиловый спирт из дрожжей.

Многие исследователи в то время считали, что брожение — это следствие действия дрожжей. Единственная их ошибка была в том, что они приписывали дрожжам растительное происхождение. Биологи того времени догадывались, что брожение — это биологическое явление, хотя химики, такие как Юстус фон Либих, немецкий ученый, утверждали, что брожение — чисто химическое явление, возникающее вследствие распада органических веществ.

Конец этим спорам положили работы французского микробиолога Луи Пастера (рис. 1.1), проведенные в середине XVIII столетия, когда был сконструирован первый микроскоп.



Рис. 1.1. Луи Пастер (1822–1895)

Луи Пастер подтвердил экспериментально, что дрожжи — это живые существа, а брожение — это биологическое явление. Кроме того, в своих работах Луи Пастер показал, что существуют микроорганизмы, которые не нуждаются в кислороде (анаэробные).

Пастер обнаружил также, что нагревание продуктов до определенной температуры не влияет на их качество, но уничтожает микроорганизмы. Позже этот процесс назвали пастеризацией, а Луи Пастера стали считать основоположником современной биотехнологии.

Бурное развитие биотехнологии ощущалось в годы Первой мировой войны. В Германии для военных целей требовалось большое количество нитроглицерина (1,2,3-тринитроксипропана), служащего источником для получения взрывчатых веществ. Ранее нитроглицерин получали из жира животных путем гидролиза. В Германии же в эти годы впервые был разработан метод получения нитроглицерина из дрожжей и сахара.

В Англии в годы Первой мировой войны был разработан микробиологический метод получения ацетона из бактерий и муки. В 1920-х годах биотехнологические процессы получения спиртов, ацетона, органических кислот почти полностью вытеснили химические производства. Со временем методы органического синтеза совершенствовались, и уже в 1940-х годах эти продукты стали вырабатывать и химические предприятия.

В 1925 г. советские микробиологи Г.А. Надсон и Г.С. Филиппов открыли, что рентгеновское излучение оказывает мутагенное влияние на микроорганизмы. Советский ученый, микробиолог и физиолог В.О. Таусон установил, что некоторые микроорганизмы способны питаться даже парафинами нефти. Благодаря этому через некоторое время стало возможным проводить процесс биологической очистки сточных вод. Кроме этого, данное открытие сделало возможным получение белково-витаминного концентрата, который используется при изготовлении комбикормов в животноводческих хозяйствах.

В 1940-х годах биотехнологическими методами были получены различные антибиотики, в том числе пенициллин. Открытие антибиотиков стало одним из важнейших событий первой половины XX столетия.

В 1955 г. было обнаружено, что некоторые микроорганизмы способны образовывать аминокислоты, например лизин (2,6-диаминогексановая кислота, лат. *lysin*).

Всю историю биотехнологии можно разделить на пять периодов.

- ▶ **Допапастеровский период (до 1865 г.)** характеризуется использованием спиртового и молочнокислого брожения для получения вина, пива, хлеба и кисломолочных продуктов.
- ▶ **Послепапастеровский период (1866–1940 гг.)** характеризуется получением спиртов, ацетона, органических кислот биотехнологически

ми методами. Также к этому периоду относят разработку методов очистки сточных вод от нефтепродуктов.

- ▶ **Период антибиотиков (1941–1960 гг.)** характеризуется получением пенициллина и других антибиотиков, а также вирусных вакцин.
- ▶ **Период направленного биосинтеза (1961–1975 гг.)** характеризуется получением аминокислот, ферментов и использованием иммобилизованных ферментов.
- ▶ **Период современной биотехнологии (с 1975 г. по настоящее время)** характеризуется развитием генной и клинической инженерии, получением моноклональных антител и трансплантацией эмбрионов.

В настоящее время промышленная биотехнология лекарственных средств является очень перспективным и бурно развивающимся направлением научно-технического прогресса в фармации.

Можно выделить следующие *преимущества биотехнологических методов получения лекарственных средств* по сравнению с другими, например, химическими:

- ▶ Микроорганизмы растут в сотни раз быстрее, чем растения или животные.
- ▶ Технология микробиологического синтеза намного проще химического, поскольку все реакции протекают под влиянием биокатализаторов (ферментов), что позволяет проводить процесс в мягких условиях, т.е. при температуре 20–60 °С, без использования высокого давления или глубокого вакуума. Следствием этого становятся меньшие капиталовложения и энергозатраты.
- ▶ Биотехнологические процессы в большей степени отвечают экологическим требованиям, они менее вредны для окружающей среды, чем процессы химического синтеза.

Глава 2

ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ (СТАДИИ) БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

2.1. МЕТОДЫ ХРАНЕНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ (КОНСЕРВАЦИЯ)

Все микроорганизмы необходимо некоторое время хранить. Факторы внешней среды влияют на жизнедеятельность клеток микроорганизмов, в основном на обмен веществ. При охлаждении все жизненные процессы замедляются, а при обезвоживании наступает состояние анабиоза. Тем не менее клетки микроорганизмов сохраняют свою жизнедеятельность, и, если их потом поместить в определенные условия, они начинают расти и размножаться, т.е. полностью восстанавливают свои функции.

На биофармацевтическом производстве используют несколько методов хранения микроорганизмов.

Хранение в холодильнике при температуре от -4°C до $+4^{\circ}\text{C}$

Культуру микроорганизмов вносят в пробирки с питательной средой, например с агар-агаром, закрывают ватными тампонами и хранят в течение 1–2 мес. При этом культуру микроорганизмов нельзя размораживать и снова замораживать. Температура в диапазоне от -4°C до $+4^{\circ}\text{C}$ должна быть постоянной.

Хранение микроорганизмов под слоем минерального масла

Питательную среду, например, агар-агар, вносят в стеклянные емкости и заливают стерильным минеральным маслом (вазелиновое масло, парафины). Важно, чтобы толщина слоя минерального масла была в пределах 1 см. Если толщина слоя будет больше, культура микроорганизмов может погибнуть от недостатка кислорода. Если толщина

слоя будет меньше 1 см, это приведет к высыханию и к гибели культуры микроорганизмов.

Хранение в сыпучих материалах

Культуру микроорганизмов засевают на сыпучих материалах, таких как песок, глина, зерно. После этого испаряют воду при комнатной температуре. Такую высушенную культуру микроорганизмов хранят в течение нескольких месяцев. Когда необходимо восстановить ее функции, сыпучий материал с культурой микроорганизмов заливают водой в чашках Петри и выращивают на соответствующей питательной среде.

Хранение культуры микроорганизмов при глубоком охлаждении может быть осуществлено двумя способами:

- ▶ культуру микроорганизмов помещают в защитную среду, например, 10% раствор глицерина, затем полученную смесь заливают в ампулы и запаивают. Хранят при температуре ниже -20°C . Данный метод позволяет сохранять культуру микроорганизмов несколько лет.
- ▶ культуру микроорганизмов помещают в защитную среду и хранят в жидком азоте при температуре от -175°C до -195°C в течение многих лет.

Лиофилизация (сублимационная сушка) — наиболее перспективный метод хранения микроорганизмов. Данный метод позволяет хранить культуру микроорганизмов в течение 5 лет.

Метод сублимационной сушки включает несколько этапов. Сначала культуру микроорганизмов помещают в защитную среду, например раствор сахарозы. Полученную смесь быстро замораживают при пониженной температуре от -35°C до -40°C . При быстром замораживании образуются мелкие кристаллы льда, которые не так значительно повреждают клеточную стенку микроорганизмов, как крупные. После этого происходит процесс сублимации. Сублимация — это переход из твердого состояния в газообразное, минуя жидкое. Сублимация происходит в глубоком вакууме под давлением от 1 до 10 кПа при начальной температуре от -10°C до -12°C , с последующим досушиванием при комнатной температуре.

2.2. ПРОЦЕССУАЛЬНАЯ СХЕМА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА

Каждое биотехнологическое производство имеет свою технологию, тем не менее в любом биотехнологическом производстве используют общие стадии (рис. 2.1).

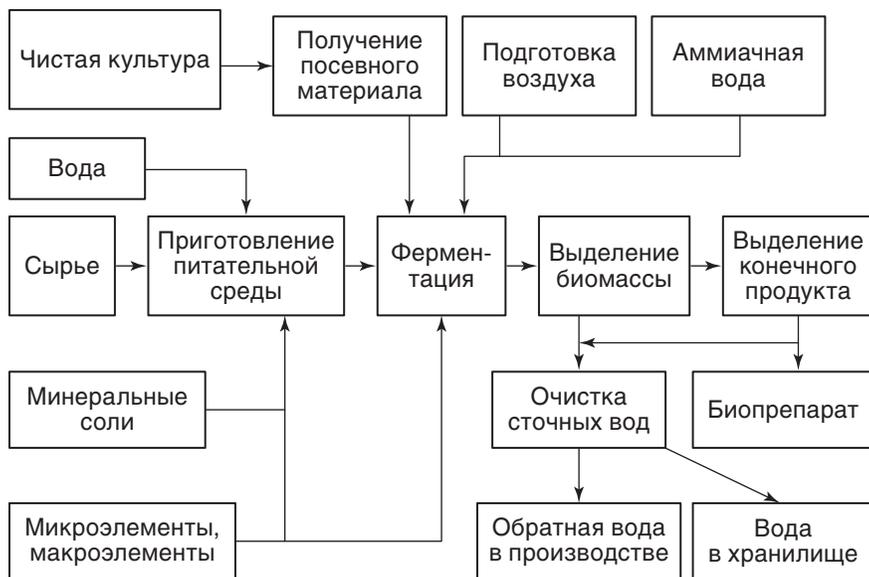


Рис. 2.1. Процессуальная схема биотехнологического производства

В любом производстве можно выделить следующие стадии: подготовка сырья, получение посевного материала, подготовка питательной среды, очистка и стерилизация воздуха, ферментация, выделение биомассы, выделение конечного продукта, очистка сточных вод.

Каждая стадия имеет свои особенности, например могут быть разными состав питательной среды или посевной материал, могут отличаться условия ферментации. Все биотехнологические производства имеют различные стадии выделения целевого конечного продукта. В зависимости от того, где находится целевой конечный продукт (в биомассе клеток микроорганизмов или в культуральной жидкости), будут зависеть и методы его выделения:

- ▶ если целевой конечный продукт содержится в биомассе, все сводится к сушке биомассы;
- ▶ если же целевой конечный продукт содержится в культуральной жидкости, используют такие методы, как коагуляция, сепарация, экстракция, ионный обмен, кристаллизация и др.

2.3. СТАДИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПОСЕВНОГО МАТЕРИАЛА

Посевным материалом называют культуру микроорганизмов, размноженную до такого объема, который необходим для засеваания промышленных аппаратов. На каждом предприятии культура микроорганизмов сохраняется в центральной заводской лаборатории (ЦЗЛ). Каждая культура микроорганизмов имеет свой паспорт, в котором указаны ее род, вид, дата изготовления, срок хранения и рецептура питательной среды.

Процесс выращивания посевного материала состоит из нескольких стадий (рис. 2.2).

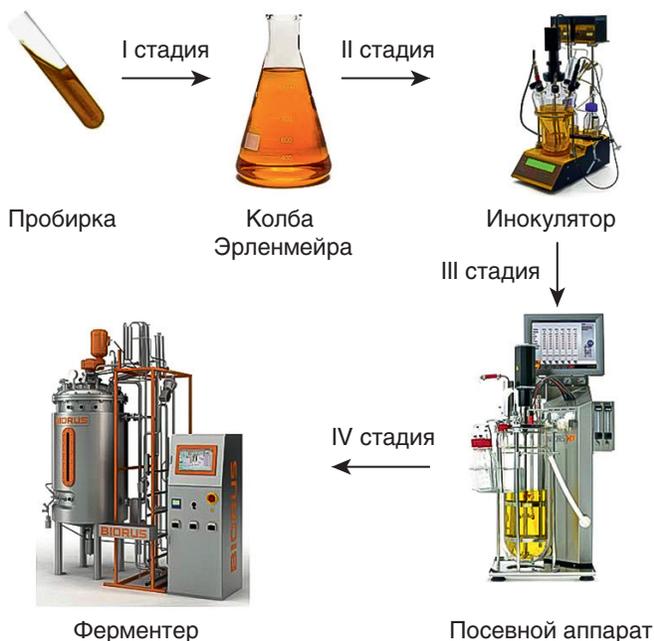


Рис. 2.2. Схема получения посевного материала

На первой стадии исходную культуру микроорганизмов берут в пробирке из центральной заводской лаборатории и размножают на питательной среде, например агар-агаре. Потом смывают эту культуру микроорганизмов в колбы Эрленмейера объемом 750 мл, в которых содержится 100–150 мл жидкой питательной среды. Колбы оставляют в термостате при температуре 28–30 °С при постоянном перемешивании,

чтобы улучшить массообменный процесс и увеличить скорость размножения.

На второй стадии содержимое колбы Эрленмейера переносят в инокулятор (аппарат объемом 300 л), который содержит мешалку с редуктором, аэрирующими приспособлениями, контрольно-измерительной аппаратурой. В инокуляторе содержится свежая жидкая питательная среда.

Объем питательной среды не должен превышать 60% объема инокулятора. Количество посевного материала должно составлять 10–12% объема питательной среды. Если посевного материала будет меньше, время инкубации увеличится.

На третьей стадии содержимое инокулятора передается в посевной аппарат объемом 3200–5000 л, где выращивание посевного материала проводится в тех же условиях.

На четвертой стадии содержимое посевного аппарата в количестве 5–10% переносится в ферментер объемом 50 м³, где проходит процесс ферментации (выращивание культуры микроорганизмов).

Ферментёр — аппарат для глубинного выращивания (культивирования) микроорганизмов в питательной среде в условиях стерильности, интенсивного перемешивания, непрерывного продувания стерильным воздухом и постоянной температуры. Схема ферментера представлена на рис. 2.3.

В ферментерах выделяют следующие основные рабочие узлы:

- ▶ мешалка для равномерного распределения всех продуктов среды;
- ▶ тепловая рубашка для обогрева и поддержания температуры ферментации;
- ▶ отбойники, препятствующие образованию «мертвых зон», т.е. зон, недоступных для регулирования ферментационного процесса;
- ▶ слив для культуральной жидкости для последующего выделения целевого продукта;
- ▶ барботер с воздухом для аэрации процесса ферментации;
- ▶ клапаны для входа и выхода воздуха;
- ▶ входное отверстие для загрузки в ферментер.

Обязательным принципом является многоэтапное выращивание посевного материала. Это связано с тем, что на каждой стадии выращивания посевного материала необходимо контролировать процесс биосинтеза основной микробной клетки и не допускать попадания сторонней микрофлоры, а также подготовить микробную клетку к биосинтезу в фазе ее интенсивного роста.

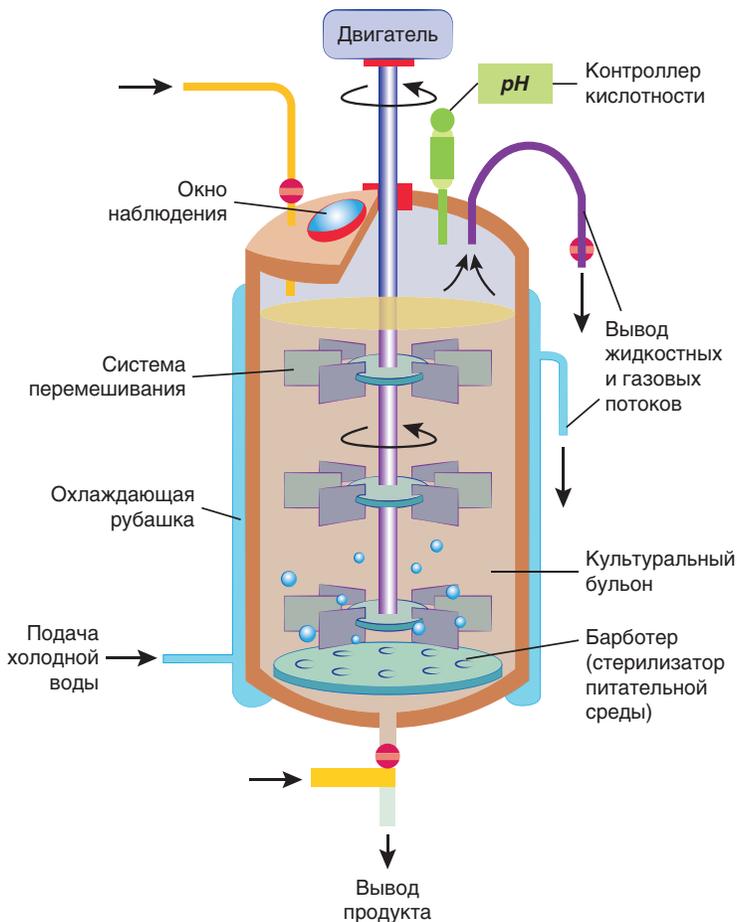


Рис. 2.3. Основные рабочие узлы ферментера

2.4. СТАДИЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ

Все микроорганизмы нуждаются в источниках углеводов и источниках энергии. Большинство промышленных штаммов микроорганизмов одновременно используют углеводсодержащие соединения как в качестве источника энергии, так и в качестве источника углерода. Разные штаммы микроорганизмов способны питаться различными углеводсодержащими соединениями.

Когда возникает вопрос о выборе среды, необходимо учитывать физиологические потребности микроорганизмов и стоимость сырья (табл. 2.1).

Таблица 2.1. Стоимость основных питательных сред для микроорганизмов, доллары США

Питательная среда	Цена за 1 т, \$
Кукурузная мука	130–180
Глюкоза	580
Сахароза	260
Меласса	280
Парафины нефти	—

Все микроорганизмы способны поглощать несколько источников углеводов. Однако только некоторые могут усваивать парафины нефти, так как они плохо растворяются в воде.

Компоненты питательной среды

Вода

Воду для приготовления питательной среды берут из водохранилищ или водопровода. Перед использованием ее очищают от биологических примесей. Кроме того, вода, используемая в промышленной биотехнологии, не должна быть «жесткой». Вода в промышленной биотехнологии используется не только для приготовления питательной среды, но и для промывки аппаратов и их охлаждения, поэтому ее требуется много.

Источники углеводов

Микроорганизмы способны поглощать источники углеводов не одновременно, а по очереди. Рассмотрим некоторые наиболее часто применяемые источники углеводов.

- ▶ **Глюкоза** усваивается микроорганизмами лучше всего, но это не означает, что ее часто необходимо использовать в биотехнологическом производстве. Глюкоза — очень дорогое сырье, поэтому ее следует использовать только в производстве дефицитных лекарств или других дорогих продуктов метаболизма.
- ▶ **Кукурузная мука** чаще других источников углеводов используется в биотехнологическом производстве, потому что она производится в большом количестве и имеет невысокую стоимость. В ней содержится 70% крахмала, 10% других углеводов и 12% белка; остальную массу составляют зольные элементы.
- ▶ **Сахароза** — органическое соединение, образованное остатками двух моносахаридов: глюкозы и фруктозы. Сахарозу используют при производстве дефицитных дорогостоящих лекарств.

- ▶ **Лактоза** — молочный сахар. Его получают как побочный продукт при производстве сыра или масла из молочного сырья. Молочную сыворотку сгущают до концентрации сахара 50% и в таком виде используют в качестве сырья. Столь ценное и достаточно дешевое сырье, как лактоза, к сожалению, мало используется на практике.
- ▶ **Меласса** представляет собой отходы сахарного производства. Она содержит 55% сахарозы. Кроме того, в ее состав входят ценные аминокислоты (глутаминовая, аспарагиновая кислоты, лейцин, тирозин), а также витамины группы В.
- ▶ **Гидрол** — еще один вид отходов сахарного производства. Гидрол содержит 50% глюкозы и является очень перспективным сырьем.
- ▶ **Крахмал** состоит из смеси полисахаридов и используется в производстве фруктозных сиропов.
- ▶ **Мелассная барда** — отходы мелассно-спиртового производства. Содержит аминокислоты и дрожжевую массу.
- ▶ **Отходы бумажно-целлюлозной промышленности. Древесина.** Древесина состоит из смеси полисахаридов. Для того чтобы микроорганизмы могли ее усваивать, ее нужно обработать, т.е. гидролизовать с помощью воды при высоких температурах. После гидролиза древесина будет содержать гексозы, пентозы и органические соединения.
- ▶ **Торф** по составу похож на древесину. Перед использованием торф также необходимо гидролизовать. Разница заключается в том, что торф гидролизуют с помощью кислот. После этого он содержит 50% полисахаридов и может быть использован в производстве кормовых дрожжей.
- ▶ **Парафины нефти** с фракцией $C_{20}-C_{27}$ используют для производства кормовых дрожжей.

Источники азота

В качестве источников азота для подготовки питательной среды используют кукурузный экстракт, соевую муку и гидролизаты дрожжей.

- ▶ **Кукурузный экстракт** — густая жидкость желто-коричневого цвета, количество азотсодержащих веществ в которой составляет 40–50%. Кукурузный экстракт получают в результате замачивания кукурузы. При этом через некоторое время происходит ее ферментативный гидролиз, образуются пептиды и аминокислоты. Кукурузный экстракт содержит также фосфор и витамины группы В.
- ▶ **Соевая мука** является ценным источником азота. Она содержит почти все аминокислоты, но преобладает глутаминовая (около 20%). В состав соевой муки входят также витамины группы В.

- ▶ **Гидролизаты дрожжей** — это продукты, получаемые в результате химического или ферментативного расщепления органических полимеров или биомассы клеток. Часто в биотехнологии и микробиологии в качестве источников азота используют гидролизат казеина (источник аминокислот).

На практике при подготовке питательной среды важно соблюдать определенное соотношение между количеством углерода и азота. Если с помощью источников азота не удастся достичь необходимого соотношения, в питательную среду добавляют аммиачную воду.

Источники макроэлементов и микроэлементов

В качестве источников микро- и макроэлементов используют сульфаты (соли серной кислоты), например K_2SO_4 , $MgSO_4$, $ZnSO_4$, $FeSO_4$, а также хлорид калия KCl и карбонат калия K_2CO_3 .

Вспомогательные материалы

К вспомогательным материалам относят пеногасители, т.е. вещества для устранения пены. Используют как натуральные, так и синтетические пеногасители. К натуральным пеногасителям относят, например, подсолнечное масло, к синтетическим — полисилоксаны.

Виды питательных сред

Питательная среда — это не только определенное количественное и качественное соотношение углерода, азота, микро- и макроэлементов, но и среда, в которой микроорганизмы живут и размножаются. Именно поэтому понятие «питательная среда» включает определенные условия: температуру, pH, содержание кислорода и т.д.

Питательные среды разделяют на **жидкие** (т.е. растворы питательных веществ в воде) и **твердые** (агар-агар, желатин и т.д.).

В зависимости от состава питательные среды можно разделить на натуральные и синтетические:

- ▶ **натуральные** питательные среды содержат сырье растительного или животного происхождения и используются в промышленности;
- ▶ **синтетические** питательные среды используются только для научно-исследовательских работ.

Технология приготовления питательных сред

- ▶ Источники углеводов растворяют в воде до определенной концентрации и подают в ферментер.
- ▶ Минеральные соли растворяют в воде и перед подачей в ферментер обязательно фильтруют от извести и других неорганических осадков.

- ▶ В реакторе (ферментере) все компоненты перемешивают и устанавливают определенное значение рН среды с помощью аммиачной воды или кислоты. Реактор содержит мешалку. В зависимости от состава питательной среды выбирают различный тип мешалки.

После приготовления питательной среды ее необходимо стерилизовать. Стерилизацию производят острым паром, либо пропускают питательную среду через установку непрерывного действия, где происходит нагревание до высоких температур. Если питательную среду стерилизуют острым паром, образуется конденсат, увеличивается количество воды, соответственно, уменьшается концентрация питательных веществ. В связи с этим на конденсат необходимо делать поправку при расчетах.

2.5. АЭРАЦИЯ И ПЕРЕМЕШИВАНИЕ ПРИ ФЕРМЕНТАЦИИ

В промышленной биотехнологии лекарственных средств в основном используют аэробные микроорганизмы, в связи с чем в ферментер необходимо подавать кислород. В отличие от питательных веществ, кислород плохо растворим в воде. Его растворимость в воде составляет 8 мг в 1 л, а растворимость в питательной среде еще меньше — 4–7 мг в 1 л. Если отключить подачу кислорода, то клетки микроорганизмов смогут нормально развиваться только на протяжении 2–3 мин, а далее скорость биосинтеза начнет быстро уменьшаться, поэтому кислород выступает фактически главным лимитирующим компонентом.

Потребность микроорганизмов в определенной концентрации кислорода зависит от нескольких факторов:

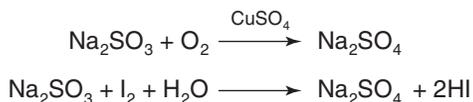
- ▶ вида и штамма микроорганизмов;
- ▶ концентрации микроорганизмов в культуральной жидкости — чем выше концентрация микроорганизмов, тем больше необходимость в кислороде;
- ▶ состава питательной среды, например, если дрожжи выращивать на сахаре, то требуется 0,8 г кислорода на 1 г дрожжей, если же их выращивать на органических кислотах, требуется 2 г кислорода на 1 г дрожжей, а если их выращивать на парафинах нефти, требуется 3 г кислорода на 1 г дрожжей;
- ▶ количества питательных веществ и ингибиторов — чем выше количество питательных веществ и ниже количество ингибиторов, тем интенсивнее проходит процесс биосинтеза и увеличивается количество кислорода;

- ▶ требуемого направления биосинтеза, например, для синтеза лизина, первичного метаболита, и пенициллина, вторичного метаболита, необходимо большое количество кислорода, т.е. интенсивная аэрация, а для синтеза фермента аспарагиназы и антибиотика грамицидина необходимо малое количество кислорода.

Аэрация для каждого конкретного производства различна. В основном кислород подают в ферментер через барботажное устройство, при этом происходит как аэрация, так и перемешивание. На прозрачных питательных средах барботажное устройство может заменить мешалку, а на вязких питательных средах мешалку необходимо использовать дополнительно. Следует делать поправку на неидеальность массопередачи. Например, большинство антибиотиков получают с помощью мицелл грибов, а последние имеют способность образовывать агломераты. Внутри этого агломерата количество питательных веществ будет ниже, поэтому количество питательных веществ и количество кислорода должны быть в избытке.

Контроль количества кислорода в культуральной жидкости

Количество кислорода в культуральной жидкости контролируют различными методами, например сульфитным методом. Он заключается в том, что отбирают пробу культуральной жидкости и добавляют раствор сульфита натрия (Na_2SO_3) и сульфат меди (CuSO_4) в качестве катализатора.



Сульфит натрия (Na_2SO_3) окисляется кислородом (O_2), который содержится в культуральной жидкости. Непрореагировавший Na_2SO_3 оттитровывают раствором йода (I_2) до обесцвечивания раствора. Затем вычисляют количество не прореагировавшего Na_2SO_3 и количество O_2 .

В последнее время на многих биотехнологических предприятиях используют полярографический метод определения концентрации O_2 . Он основан на реакции восстановления кислорода на катоде. В качестве катода применяют платиновый электрод, в качестве анода — хлорсеребряный электрод.

Аэрация имеет значение не только для обеспечения клеток микроорганизмов кислородом, но и для очищения культуральной жидкости от ненужных метаболитов, таких как углекислый газ (CO_2). CO_2 всегда

выделяется в процессе ферментации и ингибирует рост клеток. Особенно чувствительны к CO_2 бактерии рода *Pseudomonas*.

2.6. ПЕНООБРАЗОВАНИЕ И ПЕНОГАШЕНИЕ

В процессе ферментации образуется большое количество пены. Наличие пены вредит процессу, потому что она уменьшает пористый объем аппарата (0,5–0,6%) и может произойти выброс пены с ценными веществами. Устранение пены — очень важная задача. Устранение пены называют пеногашением. Существуют различные методы пеногашения: химические, физические, механические, комбинированные.

Химическое пеногашение

Как известно, в чистой воде пена не образуется. В культуральной жидкости она образуется за счет наличия белковых пенообразователей. Основная цель применения химических пеногасителей — это устранение белковых пенообразователей с поверхностного слоя пузырьков пены. Химические пеногасители делят на природные и синтетические. К природным относят подсолнечное масло или жир животных, например, кашалотовый. Недостаток химических природных пеногасителей состоит в том, что нужно применять в больших количествах (около 2–3% объема питательной среды). Такое количество жиров в культуральной жидкости усложняет выделение целевого продукта. Этих недостатков лишены *синтетические пеногасители*, которые можно использовать в маленьких количествах. Кроме того, они очень стойкие и не усложняют выделение целевого продукта. В качестве синтетических пеногасителей в основном используют полисилоксаны.

Недостаток всех химических пеногасителей заключается в их адсорбции на пузырьках воздуха, который подается на аэрацию. Из-за этого они препятствуют растворимости кислорода, за счет чего снижают скорость биосинтеза. Именно поэтому используют и другие способы пеногашения — физические и механические.

Физические пеногасители

К физическим пеногасителям относят ультразвук, электрические разряды, перепады температур.

- ▶ **Ультразвук.** Давно известно, что ультразвук разрушает пену, но использование его для погашения большого количества пены оказалось неэффективно.
- ▶ **Электрическое поле или α -излучение.** Если культуральную жидкость поместить между двумя электродами, образования пены не

будет, то же самое происходит и при использовании α -излучения. К сожалению, эти два метода мало изучены. Кроме того, и α -излучение, и ультразвук обладают мутагенными свойствами, поэтому их применение сомнительно и неперспективно.

- ▶ **Метод перепада температур** — наиболее перспективный физический метод. На определенном расстоянии от культуральной жидкости находится змеевик, через который проходит пар (рис. 2.4). Когда пена достигает этого змеевика, она разрушается вследствие испарения жидкости. Недостаток метода заключается в том, что продукты метаболизма осаждаются на поверхности змеевика и могут распадаться, к тому же микроорганизмы плохо реагируют на высокую температуру и могут подвергнуться лизису (гибнуть).

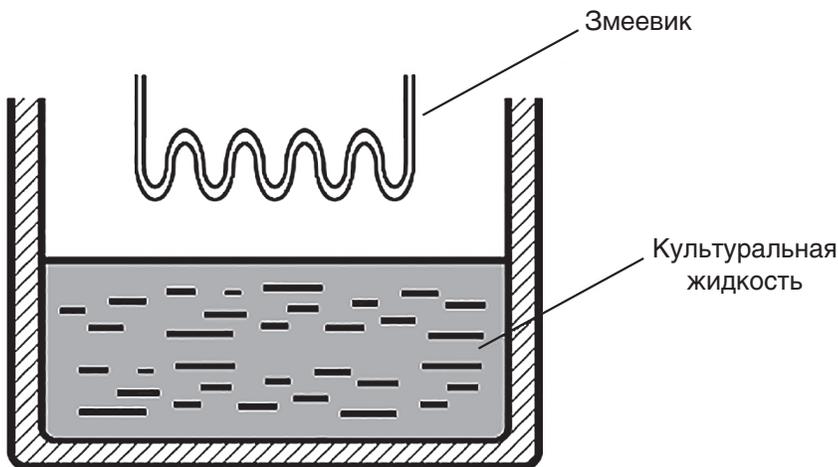


Рис. 2.4. Метод перепада температур (схема установки)

- ▶ **Механический метод** с целью пеногашения в биотехнологическом производстве применяют чаще всего.

Выделяют активные и пассивные способы механического пеногашения.

В способе **активного пеногашения** (рис. 2.5) используют вращающийся рабочий барабан, создающий центробежные силы (от центра), под влиянием которых пена разрушается. В первое отверстие выходит жидкость как более тяжелая фракция, а во второе — газ.

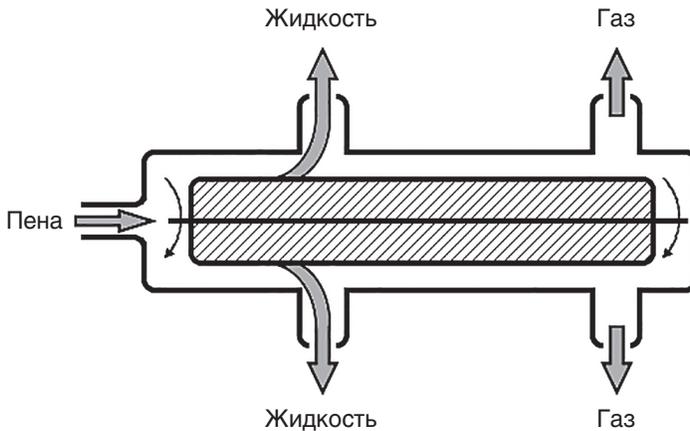


Рис. 2.5. Схема установки (метод активного пеногашения)

При способе **пассивного пеногашения** разрушение пены происходит за счет инерционных нагрузок, которые возникают в результате движения пены по каналам пеногасителя (лабиринты, спирали, циклоны). Понятно, что данным способом можно гасить только нестойкую пену, поэтому его применение ограничено.

2.7. ПАРАМЕТРЫ И СПОСОБЫ КОНТРОЛЯ В ФЕРМЕНТЕРЕ

Чтобы культивирование микроорганизмов было эффективным, необходимо знать параметры в ферментере в каждый момент времени, чтобы иметь возможность их регулировать. Контроль параметров в ферментере осуществляют двумя путями:

- ▶ с помощью датчиков, установленных в ферментере или при выходе из него;
- ▶ путем отбора проб культуральной жидкости.

В большинстве случаев в биотехнологическом производстве используют второй путь. Это связано с тем, что датчики, которые погружают в ферментер, должны быть стерильными. Стерилизовать их острым паром невозможно, поскольку они выходят из строя; их можно стерилизовать только дезинфекционными способами, которые негативно влияют на сам процесс ферментации.

Все параметры, контролируемые в ферментере, разделяют на физические, химические, биохимические.

- ▶ *Физические*: температура, давление, уровень пены, частота оборотов мешалки.
- ▶ *Химические*: концентрация кислорода, рН среды, концентрация микроорганизмов, концентрация субстрата.
- ▶ *Биохимические*: количество дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), рибонуклеиновой кислоты (РНК) и активности ферментов.

Контроль физических параметров

Контроль *температуры* проводят с помощью обычных стеклянных термометров, которые находятся в защищенном металлическом корпусе. Единственная проблема при измерении температуры заключается в том, что процесс биосинтеза проводят при 25–37 °С, и очень важна точность измерения. Допустимая ошибка термометра составляет $\pm 0,5$ °С.

Давление измеряют с помощью стандартных манометров. Чтобы сохранить стерильные условия ферментеров, манометры присоединяют к ним через специальные разделительные мембраны. Современные манометры имеют пневматический или электрический выход, который дает возможность передавать сигнал на вторичный прибор.

Уровень пенообразования необходимо знать, когда она достигает критического значения, чтобы своевременно применить тот или иной метод пеногашения. Для этого на практике в ферментере есть металлический стержень, который расположен вертикально на определенном расстоянии от поверхности культуральной жидкости. Когда пена начинает подниматься (расти) и достигает этого стержня, происходит замыкание электрического поля и сигнал подается на вторичный прибор.

Скорость оборотов мешалки измеряют специальными приборами — тахометрами. Когда скорость оборотов изменяется, изменяется напряжение на тахометре, что фиксируется вольтметром.

Контроль химических параметров

Парциальное давление растворимого кислорода измеряют полярографическим методом. Прибор состоит из катода и анода, которые погружены в раствор ацетата натрия. Когда изменяется парциальное давление растворимого кислорода, изменяется сила тока, вырабатываемого датчиком и передаваемого на вольтметр или потенциометр.

Концентрацию клеток микроорганизмов определяют путем отбора проб: производят забор пробы культуральной жидкости и под микроскопом просчитывают количество клеток в определенном объеме.

Можно использовать и фотоэлементы, но только на прозрачных питательных средах, таких как глюкоза.

Концентрация субстрата. Для измерения концентрации углеводов необходим кислородный электрод, покрытый полимерной пленкой с иммобилизованной глюкозооксидазой (фермент). Глюкоза под влиянием растворимого в культуральной жидкости кислорода окисляется при наличии биокатализатора глюкозооксидазы, при этом содержание кислорода уменьшается.

Определение рН среды. Химическим путем рН раствора можно определить при помощи кислотно-основных индикаторов. Кислотно-основные индикаторы — органические вещества, окраска которых зависит от кислотности среды.

Наиболее распространенные индикаторы — лакмус, метиловый оранжевый, фенолфталеин. Лакмус в кислой среде окрашивается в красный цвет, в щелочной — в синий. Фенолфталеин в кислой среде бесцветен, в щелочной — окрашивается в малиновый цвет. Метиловый оранжевый в кислой среде окрашивается в красный цвет, а в щелочной — в желтый.

В лабораторной практике часто смешивают ряд индикаторов, подобранных таким образом, чтобы цвет смеси изменялся в широких пределах значений рН. С их помощью можно определить рН раствора с точностью до единицы. Эти смеси называют *универсальными индикаторами*.

Существуют специальные приборы — рН-метры, с помощью которых можно определить рН растворов в диапазоне от 0 до 14 с точностью до 0,01 единицы рН.

2.8. АСЕПТИКА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА

Все биотехнологические производства используют асептические условия, т.е. воздух и вода, которые подаются на ферментацию, должны быть стерильными. Стерильным должно быть и все оборудование.

Стороннюю микрофлору, попадающую в ферментер, называют контаминантом. Она вредит процессу биосинтеза. Во-первых, контаминанты выделяют продукты метаболизма, которые могут вредить основной микрофлоре. Во-вторых, контаминанты могут изменять рН среды или вязкость культуральной жидкости до таких значений, при которых основная микрофлора развиваться не может. В-третьих, не-

продуктивно расходуется питательная среда (на стороннюю микрофлору).

Для стерилизации оборудования на практике используют четыре метода.

- ▶ Стерилизация острым паром (перегретый пар температурой 120–130 °С).
- ▶ Стерилизация сухим жаром. В данном методе используют автоклавы, в которых устанавливают температуру 170 °С (этот метод менее эффективен, чем предыдущий, поскольку белки денатурируют легче при высоких температуре и влажности).
- ▶ Различные виды излучений. На практике чаще используют ультрафиолетовое излучение. Преимущество этого метода заключается в эффективности устранения спор бактерий, недостаток — в дороговизне.
- ▶ Химическая стерилизация. Данный способ заключается в стерилизации с помощью дезинфицирующих веществ. Все дезинфицирующие вещества разделяют на четыре группы в зависимости от механизма их действия на микроорганизмы:
 - вещества, взаимодействующие с азотистыми основаниями в молекулах ДНК (азотистая кислота, гидразин, окись этилена);
 - вещества, влияющие на ферментную систему микроорганизмов (соли тяжелых металлов Hg^{2+} , Cu^+ , Ag^+);
 - соединения, влияющие на цитоплазматическую мембрану микроорганизмов и нарушающие ее функцию, после чего клетки теряют возможность к размножению (все сильные окислители, например пероксид водорода H_2O_2 и галогены, все сильные восстановители, а также спирт, фенол и формальдегид);
 - антиметаболиты, т.е. вещества, по структуре схожие с метаболитами и способные подменять их действие, вызывая лизис большинства клеток (антибиотики).

Очистка и стерилизация воздуха

Биотехнологические производства используют большое количество стерильного воздуха. Этот воздух необходим для аэрации, продувки аппаратов и т.д. Например, через ферментер объемом 50 м³ пропускается 30 000 м³ стерильного воздуха за 1 час.

Воздух из атмосферы подается на фильтр предварительной очистки (рис. 2.6), где он очищается до 92–98%, после чего поступает на компрессор, где сжимается до 300–500 кПа.



Рис. 2.6. Технологическая схема очистки и стерилизации воздуха

Когда воздух сжимается, происходит его нагревание до температуры $100\text{--}200\text{ }^\circ\text{C}$, в связи с этим его необходимо охладить в холодильнике до $25\text{--}30\text{ }^\circ\text{C}$. В ходе охлаждения конденсируется влага, содержащаяся в воздухе, поэтому на следующем этапе воздух подают на влагоотделитель. Далее воздух поступает в теплообменник, где нагревается до температуры ферментации. Затем воздух поступает на главный фильтр грубой очистки, где очищается до 99% и далее на индивидуальные фильтры тонкой очистки, которые находятся перед входом в ферментер, где очищается до 99,99%.

В фильтре предварительной очистки главным фильтрующим материалом служит металлическая сетка. Основное назначение фильтра предварительной очистки — очистка воздуха от частичек пыли, потому что на взвешенных частичках пыли осаждаются микроорганизмы.

В *главном фильтре грубой очистки* основной фильтрующий материал скомбинирован из слоя стекловаты, активированного угля и еще одного слоя стекловаты. Вместо слоя стекловаты может использовать-

ся стекловолокно. Недостаток такого фильтра заключается в том, что он не выдерживает стерилизации острым паром. При этом стекловата (стекловолокно) разрушается и срок ее службы не превышает одного месяца. В связи с этим возникла необходимость применения других фильтрующих материалов, например базальтового волокна, фторопласта, ткани Петрянова (синтетическая вата на марлевой основе).

Индивидуальные фильтры тонкой очистки в большинстве случаев представлены мембранным фильтром. Они не должны пропускать частицы более 0,25 мкм. Размеры микроорганизмов: размер кокковых форм бактерий варьирует от 0,5 до 1,5 мкм, кишечных палочек — от 0,4 до 0,8 мкм.

Существует коэффициент проскока, поэтому 100% стерилизацию фильтры дают не всегда.

Сами фильтры стерилизуют острым паром при 120 °С в течение 30 мин.

Очистка газовых выбросов

В биотехнологических производствах используется большое количество воздуха, следовательно, большое количество отработанного воздуха выбрасывается в атмосферу. Однако воздух без обработки выбрасывать в атмосферу нельзя. Воздух, выходящий из ферментера, содержит большое количество живых микроорганизмов. В связи с этим его необходимо стерилизовать острым паром, чтобы вызвать гибель клеток. Воздух, выходящий из ферментера, также содержит большое количество влаги, которую необходимо отделять. Для отделения влаги используют сетки из металла (нержавеющая сталь, бронза или никель), полимера или боросиликатного стекла. Перспективным считается использование боросиликатного стекла, которое позволяет удалять влагу до 99,99%.

После отделения влаги в воздухе находятся мертвые клетки микроорганизмов и механические примеси. Мертвые клетки микроорганизмов выбрасывать в атмосферу также нельзя, потому что они являются сильными аллергенами. Именно поэтому заключительным этапом очистки воздуха является очистка от механических примесей и мертвых клеток.

Такую очистку проводят двумя методами: мокрым и сухим. Мокрый метод заключается в пропускании воздуха через слой воды. В основе сухого метода лежит использование аппаратов типа циклон.

Циклон работает по принципу действия центробежных сил (рис. 2.7).

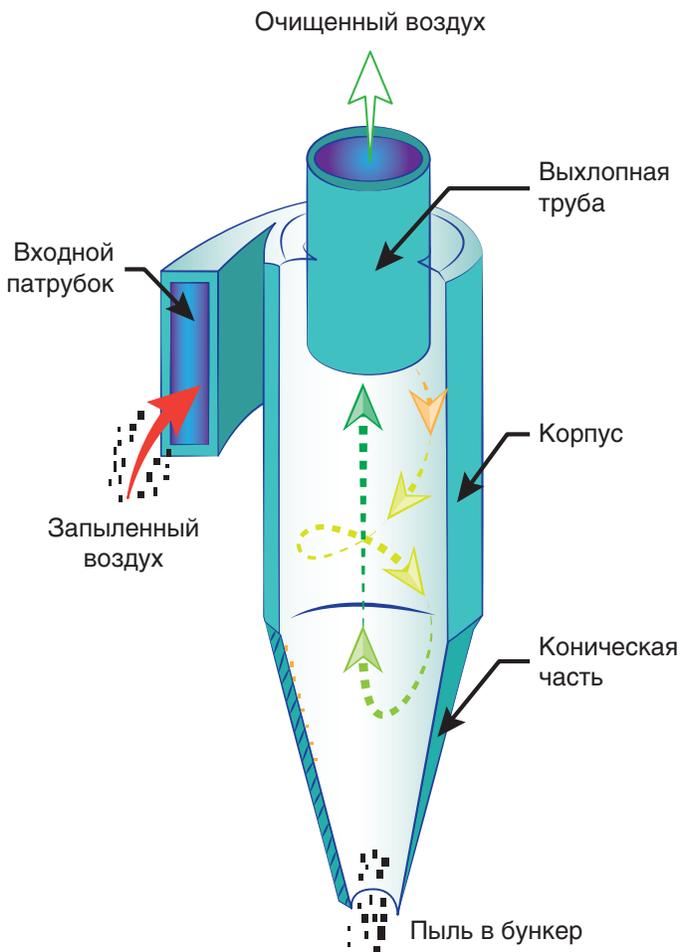


Рис. 2.7. Устройство циклона

Принцип действия циклона таков: поток запыленного газа вводится в аппарат через входной патрубок тангенциально в верхней части. В аппарате формируется вращающийся поток газа, направленный вниз, к конической части аппарата. Вследствие силы инерции (центробежной силы) частицы пыли выносятся из потока и оседают на стенках аппарата, затем под действием собственного веса падают, а чистый воздух выходит через верхнее отверстие.