

ЛЕКЦИЯ № 4

ЕДИНАЯ СИСТЕМА GLP, GCP И GMP ПРИ ВНЕДРЕНИИ В ПРАКТИКУ И ПРОИЗВОДСТВО ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ АНТИБИОТИКОВ

Для студентов, обучающихся по направлению подготовки «Биология»
(профиль «Биохимия») при изучении дисциплины «Биотехнология в производстве антибиотиков»

ПЛАН ЛЕКЦИИ

1. Требования системы GLP к биотехнологическому производству
2. Требования системы GCP к биотехнологическому производству
- 2.1. Биоэтические проблемы клинических испытаний лекарственных средств
- 2.2. Этические комитеты
3. Требования системы GMP к биотехнологическому производству
4. Общая схема биотехнологического производства
5. Структура биотехнологического производства антибиотиков
6. Биотехнология пенициллина
- 6.1. Подготовка инокулята и питательной среды
- 6.2. Ферментация
- 6.3. Выделение и очистка пенициллина как целевого продукта
7. Отходы биотехнологического производства антибиотиков. Охрана окружающей среды
8. Основные виды сырья, используемые в биотехнологическом производстве антибиотиков
9. Аппаратурно-технологическое оформление процесса ферментации при производстве антибиотиков
10. Сохранение штаммов продуцентов антибиотиков в активном состоянии

Международные стандарты:

- GMP (Good manufacturing practice) – надлежащей производственной практики
- GLP (Good Laboratory Practice) – доклинической оценки безопасности фармакологических средств
- GCP (Good Clinical Practice) – проведения клинических испытаний

Гарантии:

- разработка, испытания и изготовление лекарственных препаратов проведены с учетом требований международных стандартов;
- производство обеспечено утвержденными технологическими регламентами и методиками и/или инструкциями, учитывающими требования международных стандартов;
- четко определена ответственность руководящего персонала за качество готового продукта, что должно быть установлено должностными инструкциями;
- контроль качества исходного сырья, вспомогательных, упаковочных и маркировочных материалов проведены на стадиях их изготовления и/или поставки и перед применением в производстве;
- проведена регистрация всех производимых контрольных испытаний сырья, вспомогательных, упаковочных и маркировочных материалов, полупродуктов и готовых продуктов, поэтапного контроля процесса производства, калибровки приборов и валидации;
- готовый продукт произведен в соответствии с утвержденными технологическими регламентами;
- реализация готового продукта осуществлена только после получения соответствующего разрешения руководителя отдела контроля качества;
- имеется документация, позволяющая контролировать условия хранения продукта в течение срока годности у производителя, а также при транспортировке и до реализации.

ТРЕБОВАНИЯ СИСТЕМЫ GLP К БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОМУ ПРОИЗВОДСТВУ

- Доклинические исследования можно подразделить на несколько этапов:
- 1) скрининг специфической биологической активности природных или синтетических химических соединений;
- 2) сравнительный анализ фармакологической эффективности новых биологически активных веществ (БАВ) в сравнении с уже известными;
- 3) изучение механизмов действия новых фармакологических средств;
- 4) исследование безопасности новых лекарственных средств в соответствии с международными требованиями GLP.

- При проведении исследований по изучению специфической активности и эффективности новых БАВ важное значение имеют:
- 1) выбор экспериментальных биологических моделей адекватных физиологическим процессам, протекающих в организме человека;
- 2) использование методических подходов, обладающих соответствующей чувствительностью, специфичностью и воспроизводимостью;
- 3) составление исследовательского протокола, отвечающего требованиям «чистого эксперимента».

- Если в ходе исследований предполагается использование животных, то кроме исследовательского протокола составляется протокол-заявка на лабораторных животных, который утверждается комиссией по биоэтике.
- По окончании доклинических исследований определяют терапевтический индекс нового фармакологического вещества, который выражают отношением LD_{50} (50 % летальная доза) к ED_{20} (20 % эквиэффективная доза) или ED_{50} .
- Завершающим этапом доклинических испытаний является исследование безопасности новых лекарственных средств. Этот этап регламентируется международными требованиями системы GLP и включает в себя изучение острой и хронической токсичности, генотоксичности, канцерогенности и репродуктивной токсичности.

ТРЕБОВАНИЯ СИСТЕМЫ GCP К БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОМУ ПРОИЗВОДСТВУ

- В настоящее время правовой базой для проведения клинических исследований в России является Федеральный закон (ФЗ) «О лекарственных средствах», который гласит:
- *«Целью клинических исследований лекарственных средств является получение научными методами оценок и доказательств эффективности и безопасности лекарственных средств, данных об ожидаемых побочных эффектах от применения лекарственных средств и эффектах взаимодействия с другими лекарственными средствами».*

- В соответствии с ФЗ «О лекарственных средствах» правовую основу проведения клинических испытаний в России составляют следующие документы:
- решение Департамента государственного контроля качества, эффективности, безопасности лекарственных средств и медицинской техники о проведении клинических испытаний;
- договор о проведении клинических испытаний между учреждением здравоохранения и организацией-разработчиком лекарственного средства.
- Договор должен содержать сведения о сроках и объемах клинических испытаний, общей стоимости программы клинических испытаний, о форме представления результатов клинических испытаний в Федеральный орган контроля качества лекарственных средств, а также сведения об условиях страхования здоровья пациентов, участвующих в клинических испытаниях.

- С 1999 г. клинические испытания лекарственных средств в РФ проводятся согласно:
- «Правилам проведения качественных клинических испытаний (GCP)», принятым в качестве стандарта отрасли (ОСТ № 42-511-99 от 29.12.98);
- «Положению о порядке проведения экспертизы эффективности и безопасности лекарственных средств» (№ 291-22/81 от 04.11.99);
- «Положению о Комитете по этике при Федеральном органе контроля качества, эффективности, безопасности лекарственных средств» от 21.06.2000.
- В соответствии с положениями главы IX ФЗ «О лекарственных средствах», МЗ РФ издан приказ № 103 от 24.03.2000 г. «О порядке принятия решения о проведении клинических испытаний лекарственных средств», в соответствии которым для принятия решения о проведении клинических испытаний организация-разработчик лекарственного средства должна представить в МЗ РФ следующие документы: заявление, положительное заключение Комитета по этике при МЗ РФ, отчет и заключение о доклинических исследованиях.

- С введением в практику «Правил проведения качественных клинических исследований» в РФ разработчикам лекарственных средств и фирмам-спонсорам предоставлено право свободного выбора клинических баз из числа учреждений здравоохранения, допущенных к указанному виду деятельности
- Статьей 12 ФЗ «О лекарственных средствах» предусмотрено лицензирование учреждений здравоохранения на право проведения клинических испытаний лекарственных средств
- Конституция РФ (статья 21) гласит, что никто не может быть подвергнут медицинским, научным или иным опытам без его добровольного согласия.
- ФЗ «О лекарственных средствах» содержит нормы, определяющие права пациентов, участвующих в клинических исследованиях
- Этическими вопросами занимается Комитет по этике при Департаменте государственного контроля качества, эффективности, безопасности лекарственных средств и медицинской техники и локальные этические советы при учреждениях здравоохранения

В ближайшее время планируют:

- утверждение типового положения об этических комитетах при учреждениях здравоохранения, проводящих клинические испытания;
- разработку закона о страховании всех субъектов клинических испытаний лекарственных средств;
- создание эффективной системы контроля за ходом клинических испытаний, разрешенных МЗ РФ;
- усиление контроля за клиническими испытаниями иммунобиологических препаратов и дезинфицирующих средств;
- обучение специалистов правилам GCP в соответствии с ОСТ 42-511-99;
- создание Реестра клинических испытаний, разрешенных МЗ РФ.

Биоэтические проблемы клинических испытаний лекарственных средств

- Проведение испытаний нового лекарственного средства или метода лечения на людях необходимо для предотвращения развития возможных опасных побочных реакций в процессе применения лекарственного препарата. Для этого проводят многоцентровые клинические испытания, а в ряде случаев и межнациональные исследования.
- При этом также возникают проблемы этического характера: *как правильно организовать рандомизированные исследования с учетом особенностей законодательства и социальных условий разных стран, а также соблюсти и защитить права лиц, принимавших в них участие?*

Этические комитеты

- – это независимые организации, в состав которых входят профессиональные медики и лица немедицинских специальностей, несущие ответственность за обеспечение защиты прав и здоровья людей, участвующие в испытании, и гарантирующие такую защиту для общества в целом.
- Деятельность по контролю за соблюдением прав человека при проведении клинических испытаний осуществляют независимые ЭК (НЭК).

- Регламенту работы НЭК и вопросам, решение которых находится в их компетенции, уделяют большое внимание многие международные и общественные организации. Базовым документом для создания и функционирования НЭК признан ICN (International Conference on Harmonisation – Международная конференция по гармонизации), в котором определены основные направления их работы, включающих выполнение следующих процедур:
- учреждение этических комитетов;
- предоставление заявок на рассмотрение;
- экспертиза;
- принятие решения о проведении клинического испытания;
- контроль проведения клинического испытания.

Требования ICH—GCP к этическим комитетам.

- Европейский форум GCP разработал рекомендации относительно состава ЭК. В их состав должны входить не менее 5 человек.
- Среди них должны быть как минимум 2 врача, имеющих опыт проведения испытаний в соответствии с требованиями GCP и независимых от учреждения, в котором оно проводится.
- В состав ЭК должны быть также включены юрист, парамедик и хотя бы один человек, который не занимается научной деятельностью.
- В ЭК должны быть лица обоего пола, разного возраста.
- Члены ЭК должны быть хорошо ознакомлены с культурными и этническими традициями региона, население которого предполагается привлекать к участию в испытании.

- До начала проведения клинического испытания лекарственного средства ЭК оценивает этические и нравственно-правовые аспекты программы (протокола) клинического испытания. При обсуждении материалов клинического испытания члены этического комитета рассматривают следующие вопросы:
- соответствие представленного протокола целям и задачам исследования, возможность получения обоснованного результата при минимальной степени риска для субъектов исследования, оправданность возможного риска и неудобств для субъекта в сравнении с ожидаемой пользой для субъекта и других лиц;
- пригодность исследователя для проведения предложенного клинического испытания;
- соответствие исследовательского центра целям и задачам исследования;
- процедуру привлечения потенциальных субъектов к исследованию;
- порядок страхования пациентов и выплаты компенсации (если таковая предполагается);
- содержание информации об исследовании, предоставляемой пациенту;
- процедуру получения согласия пациента на участие в исследовании.

- *В процессе проведения клинических испытаний исследователь информирует Комиссию в следующих случаях:*
- при внесении любых изменений и дополнений к протоколу клинических испытаний;
- при внесении любых изменений и дополнений к информации, предоставляемой субъектам клинических испытаний.
- при возникновении тяжелых и/или неожиданных побочных эффектов или побочных явлений.
- при появлении любых новых данных о возможном влиянии исследуемого препарата на человека.

ТРЕБОВАНИЯ СИСТЕМЫ GMP К БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОМУ ПРОИЗВОДСТВУ

- **GMP** – единая система требований по организации биотехнологического производства и контроля качества лекарственных средств от начала переработки сырья до получения готового продукта, включая общие требования к помещению, оборудованию и персоналу.
- Правила GMP имеют сходную рубрикацию независимо от того, являются ли они национальными, региональными или международными, и состоят из 8 разделов.

- В первом разделе – «Терминология» приводится определение ключевых понятий, используемых в документе.
- Во втором разделе – «Обеспечение качества» указаны обязательные мероприятия, включающие укомплектованность персоналом, наличие сотрудников, ответственных за качество продукции; регистрацию этапов производства; определяется порядок возврата серий продукции при нарушении ее качества; выяснение причин нарушений качества, т.д.
- Третий раздел касается персонала предприятия. В нем подчеркивается обязательность профильного образования для руководителя предприятия (но не владельца), обязательность четкого разграничения функций руководящих работников. Специально оговаривается порядок подготовки персонала, личная гигиена и поведение персонала особенно в «чистых помещениях». Перечисляются правила использования и поддержания в функциональном состоянии технологической одежды, инструкции для персонала, порядок доведения их до сведения работников и т.д.

- Четвертый раздел правил GMP касается соответствия зданий и помещений производству. В разделе содержится свыше 40 требований, хотя такое требование, как обязательное расположение предприятия вне жилых зон и на большом расстоянии от других производств, отрицательно влияющих на качество продукции, выполнить очень трудно.
- Пятый раздел относится к технологическому оборудованию, начиная с цеха ферментации, и заканчивая цехом очистки и т.д. Оборудование должно быть адекватно процессам, контрольно-измерительные приборы в соответствии с графиком должны подвергаться проверке. Ряд рекомендаций касается конструкций оборудования, его размещения и эксплуатации.

- Шестой раздел правил GMP касается производства в целом. Большое внимание уделяется исходному сырью (документация, условия хранения, контроль и т.д.). Для биотехнологического производства особое значение имеют такие виды сырья, как компоненты комплексных питательных сред (кукурузный экстракт, хлопковая, гороховая мука и т.п.). Согласно требованиям GMP такое сырье подвергается проверке на микробную обсемененность и хранится в отдельных непроизводственных и неподвальных помещениях. Выдача серий (образцов) сырья для использования в производстве регистрируется.
- В этот раздел также входит важнейший пункт, в котором указано, что на предприятии обязателен постадийный контроль процесса, проводимый совместно работниками цехов и отдела контроля качества (ОКК). При этом проверяются соответствие сырья, вспомогательных материалов и полупродуктов требованиям НТД, санитарное состояние цехов и рабочих мест, выполнение регламентированных технологических операций. Результаты постадийного контроля фиксируются. Записи результатов проверки хранятся не менее года по истечении срока годности лекарственного средства, при изготовлении которого производилась проверка.

- Седьмой раздел правил GMP посвящен отделу ОКК. Указывается, что этот отдел обязателен для предприятия. ОКК контролирует не только готовый продукт, но также сырье и полупродукты при передаче их из цеха в цех. Именно ОКК контролирует стабильность продукта, хранит образцы каждой серии готового продукта (не менее 3 лет).
- Восьмой раздел «Валидация» (оценка и документированное подтверждение соответствия производственного процесса и качества продукта установленным требованиям). Валидация позволяет получить данные о соответствии технологического процесса регламенту, о соответствии качества готового продукта НТД. Оцениваются процесс, оборудование (его адекватность поставленной задаче), конечный продукт, пределы возможных отклонений при реализации процесса. Валидация завершается составлением отчета, на основании которого технологический процесс аттестуется или бракуется. Валидация проводится для каждого нового технологического процесса перед его внедрением в производство для стерильных и для нестерильных лекарственных средств.

Общая схема биотехнологического производства

- 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) продуцента.
- ОТС-2. Отделение биомассы от культуральной жидкости: осуществляется фильтрованием, центрифугированием, сепарированием.

- В случае, если целевой продукт содержится в биомассе, то в дальнейшем идет переработка биомассы (первый путь). Обычно в биомассе содержатся липиды, фосфолипиды, некоторые витамины, белки и др. В этом случае в культуральной жидкости целевой продукт содержится в незначительном количестве и его выделение является нерентабельным.
- В случае, если целевой продукт экскретируется в культуральную жидкость, то в дальнейшем осуществляется именно ее переработка (второй путь). Обычно в культуральную жидкость из клеток выделяются антибиотики, ферменты и др. В этом случае содержание целевого продукта в биомассе незначительно, поэтому его выделение становится нерентабельным.

Первый путь. Обработка биомассы:

- ОТС-3. Разрушение клеток микроорганизмов для выделения внутриклеточных целевых продуктов с их одновременным экстрагированием, т.е. разрушение клеточных стенок осуществляется в среде экстрагента следующими способами:
 - а) дезинтеграция (механическая, ультразвуковая);
 - б) ферментативный лизис;
 - в) химический лизис.
- ОТС-4. Отделение экстракта путем центрифугирования, сепарирования, мембранной фильтрации.
- ОТС-5. Выделение и очистка целевого продукта из экстракта с помощью разных методов (этерификация, высаливание, хроматографические методы, в том числе и 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.).

Второй путь. Обработка культуральной

ЖИДКОСТИ:

- ОТС-3. Концентрирование целевых продуктов в культуральной жидкости с помощью ультрафильтрации, ионообменной хроматографии, диализа.
- ОТС-5. Выделение и очистка целевого продукта из экстракта с помощью разных способов: этерификации, высаливания, хроматографических методов (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 (первый путь) или на стадии ОТС-3 (второй путь) для отделения раствора целевого продукта широко применяют мембранную фильтрацию (или ультрафильтрацию).
- 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.

Структура биотехнологического производства антибиотиков

- 1. получение штамма – продуцента антибиотика;
- 2. биосинтез антибиотика;
- 3. выделение и очистка антибиотика;
- 4. концентрирование, стабилизация антибиотика и получение готового продукта.

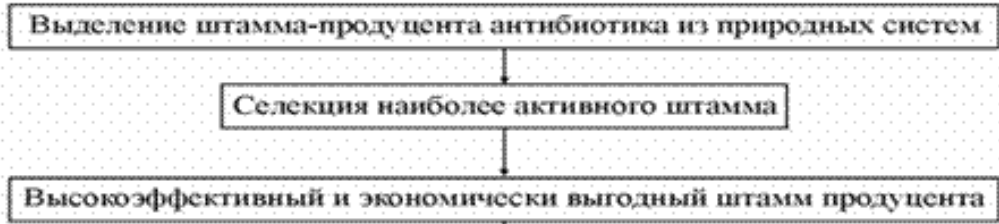
Среды для культивирования микроорганизмов.

- Мясопептонная среда, в состав которой наряду с мясным экстрактом и пептоном входят хлорид натрия, фосфат калия, иногда глюкоза или сахароза. Данная среда обычно используется в лабораторной практике.
- Картофельные среды с глюкозой и пептоном в основном используют в лаборатории для культивирования некоторых видов актиномицетов и бактерий.
- Среды с кукурузным экстрактом, соевой мукой, бардой и др., в состав которых входят сульфат аммония, карбонат кальция, фосфаты, глюкоза, сахароза, лактоза или др. Данные среды применяются в производстве, т.к. являются экономичными и обеспечивают хорошее развитие микроорганизмов с высоким выходом антибиотиков.

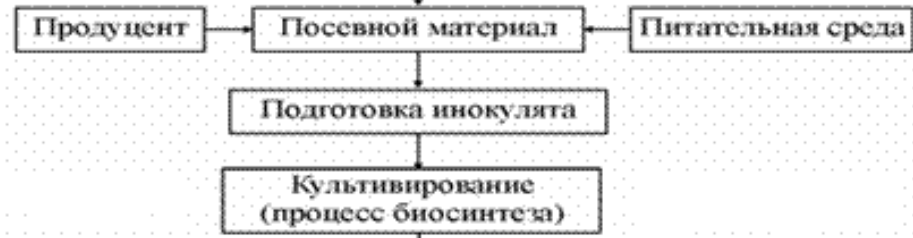
Продуценты антибиотиков по отношению к содержанию фосфора в среде

- высокочувствительные продуценты, для которых оптимальная концентрация фосфора в среде составляет менее 0,01 % (продуценты нистатина, тетрациклинов, флоримицина, ванкомицина);
- продуценты средней чувствительности, для которых оптимальная концентрация фосфора составляет 0,010–0,015 % (продуценты стрептомицина, эритромицина, циклосерина, неомицина);
- малочувствительные продуценты, для которых оптимальная концентрация фосфора составляет 0,018–0,020 % (продуценты новобиоцина, грамицидина, олеандомицина).

1



2



3



4

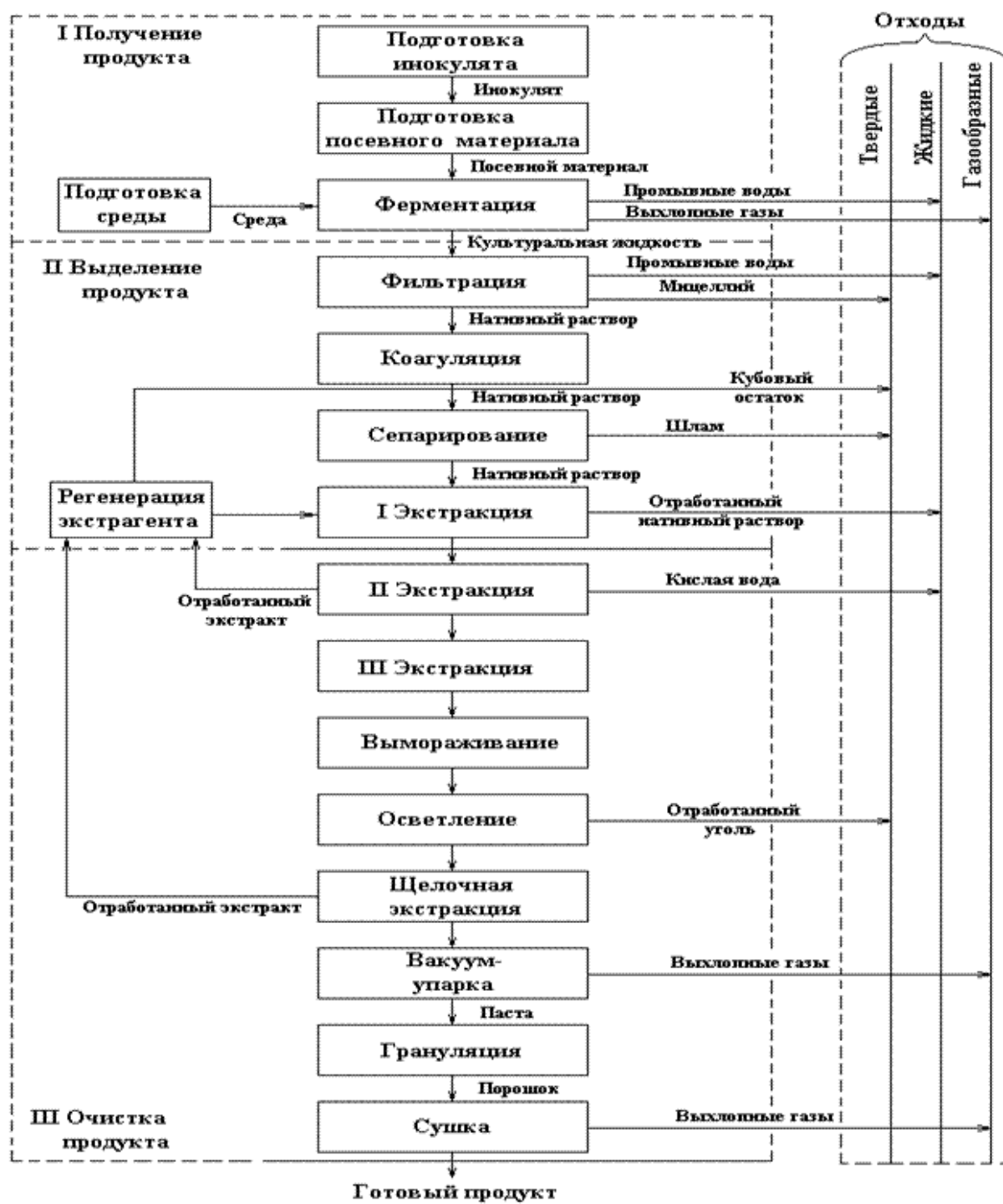


- Влияние рН среды. Многие бактериальные организмы, синтезирующие антибиотики, лучше развиваются при значении рН 7,0, хотя некоторые, например, молочнокислые стрептококки, продуцирующие низин, лучше развиваются в среде при величине рН 5,5–6,0. Большинство актиномицетов хорошо развиваются при начальных значениях рН среды в пределах от 6,7 до 7,8. В большинстве случаев жизнеспособность актиномицетов при значении рН ниже 4,0–4,5 подавлена.
- Температура. Для большинства бактерий температурный оптимум развития находится в диапазоне 30–37 °С. Для продуцента грамицидина С оптимальная температура для развития и биосинтеза составляет 40 °С. Актиномицеты, как правило, культивируют при температуре 26–30 °С, хотя некоторые виды стрептомицетов могут развиваться как при пониженных (0–18 °С), так и при повышенных (55–60 °С) температурах. Для большинства мицелиальных грибов температурный оптимум – 25–28 °С.

- Аэрация. Большинство изученных продуцентов антибиотиков являются аэробами. Для биосинтеза многих антибиотиков (пенициллин, стрептомицин и др.) максимальное их накопление происходит при степени аэрации, равной 1, при которой через определенный объем среды за 1 мин. продувается такой же объем воздуха.
- В процессе развития продуцента антибиотика в промышленных условиях потребность организма в кислороде изменяется в зависимости от стадии развития, вязкости культуральной жидкости и др. На определенных стадиях процесса могут возникнуть ситуации, связанные с кислородным голоданием продуцента. В этих условиях следует принимать дополнительные меры, например, повышение концентрации окислителя за счет введения пероксида водорода.
- Наиболее перспективным методом выращивания микроорганизмов – продуцентов антибиотиков признан метод глубинного культивирования с использованием периодических процессов. В условиях глубинной культуры процесс развития организма и биосинтеза антибиотика проходит в две фазы.
- В первой фазе развития культуры (тропофаза или фаза сбалансированного роста) наблюдается интенсивное накопление биомассы продуцента, связанное с быстрым потреблением основных компонентов среды и с высоким уровнем поглощения кислорода.
- Во второй фазе развития (идиофаза или фаза несбалансированного роста) накопление биомассы замедлено или в некоторых случаях снижено. В этот период продукты микробного метаболизма лишь частично используются для построения клеточного материала, в основном они направляются на биосинтез антибиотика. Обычно максимум продукции антибиотика в среде наступает после максимума накопления биомассы.

Производство пенициллина

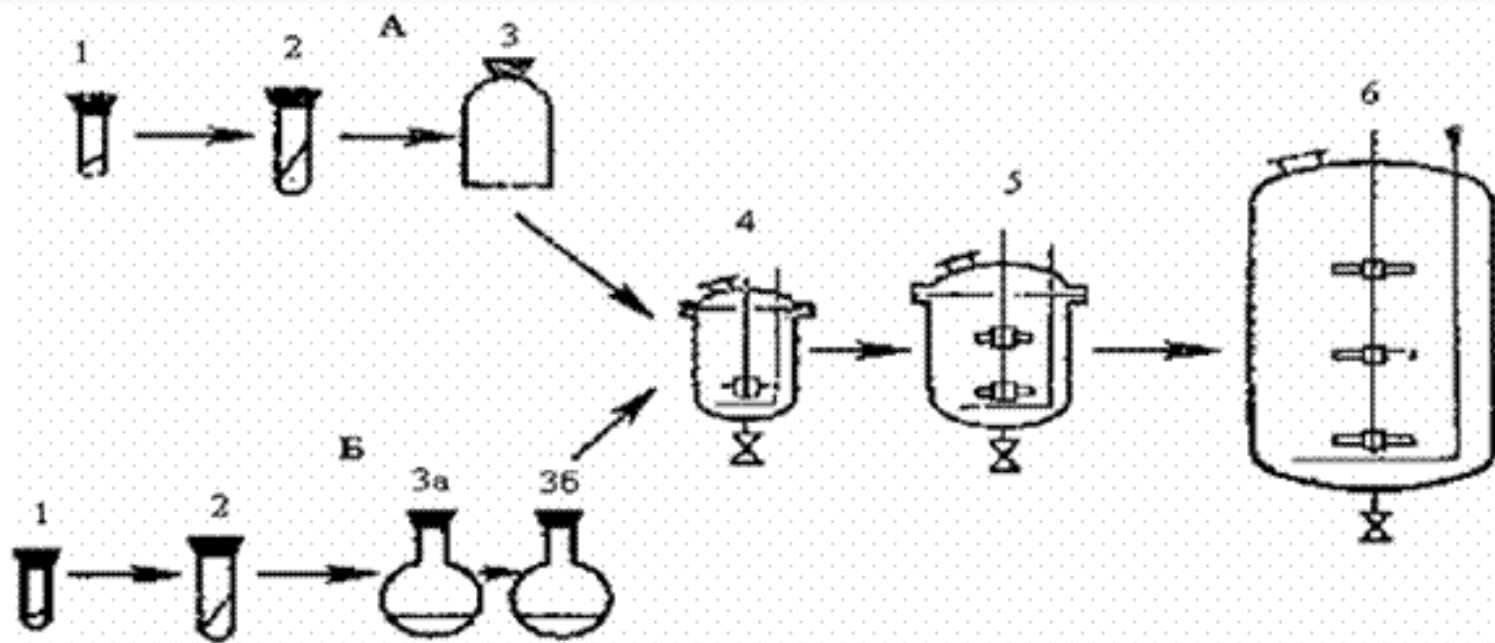
- Способность образовывать пенициллин широко распространена среди многих плесневых грибов, относящихся к родам *Penicillium* и *Aspergillus*. Однако, данное свойство более характерно для группы *Penicillium notatum* и *Penicillium chrysogenum*.
- Под названием «пенициллин» объединена обширная группа веществ, являющихся N-ацильными производными гетероциклической аминокислоты. Из природных пенициллинов применяются бензилпенициллин и феноксиметилпенициллин.



Подготовка инокулята

А – выращивание во флаконах; Б – в колбах на качалках: 1 - законсервированный исходный материал;

2 – споровая генерация на косом агаре в пробирке; 3 – вторая споровая генерация на твердой среде в сосуде; 3а и 3б – первая и третья генерации на жидкой среде в колбе; 4 – ферментер предварительного инокулирования; 5 – ферментер инокулирования; 6 – основной ферментер



- Основной задачей при культивировании продуцента пенициллина в посевных аппаратах на стадии подготовки инокулята является быстрое получение большой массы мицелия, способного обеспечить при пересеве в ферментер интенсивный рост и высокий выход антибиотика. Для решения данной задачи продуцент необходимо выращивать на средах, богатых легкоусвояемыми питательными веществами, в условиях хорошей аэрации, при оптимальной для его роста температуре.
- В качестве легкоусвояемого углерода используют глюкозу, сахарозу и т.д. В качестве второго источника углерода применяют лактозу в небольших количествах.

Состав среды для выращивания посевного материала

Вещество	%
Кукурузный экстракт	2 (на сухой вес)
Глюкоза	2
Лактоза	0,5
Азотнокислый аммоний	0,125
Однозамещенный фосфорнокислый калий	0,2
Сернокислый магний	0,025
Сернокислый натрий	0,05
Мел	0,5

- *Таким образом, для каждого продуцента антибиотика разрабатывается своя оптимальная среда, которая должна отвечать следующим требованиям:*
- а) обеспечивать хороший рост продуцента и максимально возможное образование антибиотика;
- б) содержать доступные и экономичные компоненты;
- в) обладать хорошей фильтрующей способностью;
- г) обеспечивать применение наиболее экономичных и эффективных приемов выделения и очистки антибиотика.

Стерилизация:

- Периодический способ стерилизации применяется при использовании небольших объемов среды и состоит в том, что среда нагревается до определенной температуры (120–130 °С) непосредственно в ферментерах или в специальных котлах-стерилизаторах, выдерживается при данной температуре в течение 30–60 мин. (в зависимости от объема и состава среды). Затем среда охлаждается до температуры 27–30 °С.
- Непрерывный метод стерилизации целесообразно использовать в случае больших объемов среды. Приготовленная среда из специального сосуда с помощью насоса подается в стерилизационную колонку, через которую сверху по внутренней трубе, имеющей щелевидные прорези, пропускается острый пар (давление пара около 5 атм.). Питательная среда в колонку поступает снизу и движется по спирали вокруг внутренней трубы. Затем среда, нагретая в колонке, поступает в специальный аппарат – выдерживатель, в котором она находится при температуре 125–130 °С в течение определенного времени (5–10 мин.). После она поступает в змеевиковый холодильник, охлаждается до температуры 30–35 °С (на выходе) и поступает в ферментер.

- Значительное влияние на рост мицелия оказывает значение рН среды. Оптимальное значение рН для роста мицелия составляет 6,0–6,5. В противном случае развитие продуцента замедляется.
- Выращивание посевного мицелия осуществляется в течение 36–50 ч до получения биомассы средней густоты. Мицелий, выращенный в инокуляторах, передается в количестве 10 % по объему в посевные аппараты, где культивируется в течение 12–18 ч, а затем передается в ферментеры в количестве 15–20 %. Процесс выращивания посевного мицелия первой и второй генерации осуществляется при температуре 24–26 °С.
- Продуценты пенициллина являются типичными аэробами и требуют для своего роста и развития наличия кислорода. Для получения высокопродуктивного посевного мицелия наряду с оптимальной по составу питательной средой необходимо обеспечить эффективную аэрацию. В процессе производства пенициллина выращивание посевного мицелия осуществляют при непрерывном перемешивании и бесперебойной подаче воздуха в аппараты в количестве 1,2–1,5 объема воздуха на 1 объем среды в минуту.

Глубинный способ

- Различают 4 модификации глубинного способа выращивания микроорганизмов:
- 1. Периодическое культивирование. В данном случае процесс развития микроорганизмов полностью завершается в одном ферментере, после чего он освобождается от культуральной жидкости, промывается, стерилизуется и вновь заполняется свежей средой. Среда засеивается изучаемым микроорганизмом, и процесс возобновляется.
- 2. Отъемный метод. Культивирование микроорганизмов осуществляется в ферментерах с периодическим отбором части культуральной жидкости и доводится свежей средой до исходного уровня. Применение отъемно-доливного метода позволяет в 2–3 раза увеличить время пребывания продуцента в активной форме. Недостаток этого метода состоит в том, что доливы осуществляются средой плотного состава. Данным способом удается не только продлить активную фазу, в которой находится продуцент, но и повысить степень использования им субстрата, а в конечном итоге – продуктивность всего процесса, т.е. увеличить выход конечного продукта в расчете на потребленный субстрат.

- 3. Батарейный способ. Микроорганизмы развиваются в ряду последовательно соединенных ферментеров. Культуральная жидкость на определенной стадии развития микроорганизма перекачивается из первого ферментера во второй, затем из второго в третий и т.д. Освобожденный ферментер заполняется свежей средой, засеянной микроорганизмом. При этом способе выращивания аппараты используются более рационально.
- 4. Непрерывное культивирование. Данный метод основан на принципе непрерывного потока среды, что позволяет поддерживать развитие микроорганизма на определенной стадии его роста. Стадия развития микроорганизма определяется тем, что в этот период происходит максимальный биосинтез антибиотика. Установлено, что в условиях непрерывного процесса биосинтеза некоторых антибиотиков можно получить хорошие результаты, если процесс осуществлять в две стадии. В первом аппарате батареи поддерживают высокую скорость потока, обеспечивающую большую скорость роста продуцента антибиотика, с тем, чтобы получить высокоактивную биомассу, а во втором аппарате – обеспечивают низкую скорость потока и соответственно небольшую скорость роста.

Турбидостат

- В данной системе при быстром потоке среды создаются условия, близкие к тем, которые соответствуют экспоненциальной фазе, а при медленном – приближаются к условиям, соответствующим стационарной фазе. В установившемся режиме удельная скорость потока среды равна удельной скорости размножения культуры. Повышение скорости протока или воздействие, замедляющее рост, приводит к тому, что скорость размножения оказывается меньше скорости протока, и клетки культуры будут «вымываться» из ферментера.

Хемотрост

- В системе «хемотрост» величину клеточной популяции контролируют с помощью отдельных компонентов среды. Среда составляется так, чтобы один из компонентов, необходимый для роста биомассы клеток, был в недостаточном количестве или лимитировал рост, поддерживая культуру в нужном состоянии. При этом, используя батарею ферментеров, можно в каждом аппарате постоянно поддерживать продуцент в определенной фазе размножения.

Минеральный состав

- В качестве источника минерального азота обычно используют нитрат аммония, сернокислый аммоний и некоторые другие соли. При ассимиляции культурой продуцента этих солей аммонийного азота высвобождаются анионы кислот, способствующие некоторому закислению среды.
- Очень важную роль в обмене веществ микробной клетки играет фосфор, который необходим не только для ее нормального роста и развития, но и для осуществления биосинтеза пенициллина. При этом для образования пенициллина требуется более высокая концентрация фосфора в среде, чем для роста его продуцента.
- Обязательным компонентом ферментационной среды является сера, входящая в состав важнейших аминокислот и ферментов. Сера необходима еще и потому, что она входит в состав молекулы пенициллина. В питательные среды сера вносится в виде солей серной кислоты и гипосульфита.
- Из других питательных веществ, необходимых для нормальной жизнедеятельности культуры продуцента и биосинтеза антибиотика, следует отметить калий, магний, цинк, железо, марганец, медь.

Предшественники

- Предшественниками называют вещества, непосредственно включающиеся в молекулу целевого продукта.
- Предшественником бензилпенициллина является фенилуксусная кислота (ФУК) или ее производные – фенилацетамид (ФАА), фенилэтиламин, фенилацетилглицин и др.
- Предшественником феноксиметилпенициллина является феноксиуксусная кислота (ФОУК).

Для обеспечения максимального выхода пенициллина основные компоненты среды должны входить в ее состав в строго определенных соотношениях и концентрациях

Компоненты	Среда		
	кукурузная	жмыховая	жировая
Кукурузный экстракт	2,0–3,0	-	2,0–3,0
Жмыхи (арахисовый, подсолнечный, соевый и др.)	-	2,0–4,0	-
Лактоза	5,0	5,0	1,0
Глюкоза или гидрол	1,5	1,5	1,5
Кашалотовый жир или растительные масла	0,5–0,1	0,5–0,1	2,5–3,5
Азотнокислый аммоний	0,4	0,4	0,4
Сернокислый натрий	0,05	0,05	0,05
Фосфорнокислый калий однозамещенный	0,4	0,4	0,4
Сернокислый магний	0,025	0,025	0,025
Серноватистоокислый натрий (гипосульфит)	0,2	0,2	0,2
Мел	0,5–1,0	0,5–1,0	0,5–1,0
Предшественник	0,3–0,4	0,3–0,4	0,3–0,4

Фильтрация

- Для отделения мицелия от культуральной жидкости применяют вакуум-барабанные фильтры непрерывного действия. Фильтрацию начинают до начала автолиза мицелия. В связи с тем, что при фильтрации автолизированной культуры мицелий не образует плотной пленки на фильтрующей поверхности барабана, а налипает в виде отдельных тонких комков, которые не отходят в зоне «отдувки» фильтра, и их приходится удалять вручную. При этом продолжительность фильтрации увеличивается в 2–3 раза, выход фильтрата резко снижается, а фильтрат получается очень мутным.
- Кроме того, необходимо соблюдать условия, препятствующие разрушению пенициллина во время фильтрации, – охлаждение нативного раствора до 4–6 °С и систематическая (после каждой загрузки) обработка фильтра, коммуникаций и сборников антисептиками (хлорамином и т.п.). Фильтр должен систематически стерилизоваться острым паром.

Предварительная обработка нативного раствора

- Нативный раствор (фильтрат культуральной жидкости) представляет собой более или менее мутную жидкость, окрашенную в желто-коричневый или зеленовато-коричневый цвет. Величина рН среды в зависимости от штамма продуцента, состава среды и продолжительности ферментации обычно варьируется от 6,2 до 8,2.
- Важной характеристикой нативного раствора является содержание в нем белковых веществ, которые определяют путем осаждения трихлоруксусной кислотой или другими методами.

- Применяется несколько способов предварительной обработки нативного раствора для освобождения от белковых примесей:
- осаждение солями многовалентных металлов (Al^{3+} , Fe^{3+} , Zn^{2+});
- коагуляция танином;
- термическая коагуляция при температуре 60–75 °С и значении рН 5,5 – 6,0;
- осаждение примесей катионными детергентами типа четвертичных аммониевых оснований (цетилпиридинийбромидом или додецилтриметиламмонийхлоридом и т.п.).

Экстракция и очистка пенициллина

- К растворителям, применяющимся для экстракции пенициллина, предъявляются следующие требования:
- 1) малая растворимость в воде;
- 2) отсутствие взаимодействия с пенициллином;
- 3) низкая упругость пара при температуре 5–30 °С;
- 4) возможность регенерации при температуре не выше 120–140 °С;
- 5) низкая стоимость.

- **Ионообменная сорбция** состоит в том, что при пропускании водных растворов антибиотиков, являющихся по химической природе кислотами, основаниями или амфотерными соединениями, через колонки с соответствующими ионообменными смолами, они сорбируются на них, а раствор с частью примесей, имеющих противоположный (антибиотику) заряд, проходит через колонку. Смолы в зависимости от положительного или отрицательного заряда иона в них называют катионитами или анионитами. Антибиотик в виде отрицательно заряженного иона будет сорбироваться на катионитной смоле, положительно заряженный – на анионите. Затем его элюируют (десорбируют) и получают значительно очищенный и препарат. Далее раствор препарата можно вновь пропустить через ионообменную смолу, имеющую противоположный заряд. При этом примеси осядут на смоле, а раствор очищенного антибиотика пройдет через колонку.

- **Метод осаждения** основан на том, что антибиотик связывают с органическими или неорганическими веществами с целью получения соединения, выпадающего в осадок. Полученный осадок с помощью фильтров или путем центрифугирования отделяют от нативного раствора, промывают, в ряде случаев высушивают, после чего образовавшееся соединение разлагают и антибиотик экстрагируют или вновь осаждают (кристаллизуют).

Выделение кристаллических солей пенициллина

- 1. Обезвоживание бутилацетатного экстракта путем охлаждения до температуры $-16 - -18$ °С с последующим отделением льда путем фильтрации. Удаление пигментных загрязнений обработкой углем активированным с оследующей фильтрацией на охлажденном друк-фильтре.
- 2. Получение концентрата калиевой соли бензилпенициллина экстракцией $0,56-0,6$ н. раствором едкого кали.

Выделение кристаллических солей пенициллина

- 3. Стерилизующая фильтрация концентрата калиевой соли и упаривание под вакуумом с бутиловым спиртом (2,5 объема) при температуре 16–26 °С и остаточном давлении 5–10 мм рт. ст. Объем кубового остатка должен составлять не более 60–80 % объема загруженного концентрата. После удаления воды и большей части бутилового спирта калиевая соль бензилпенициллина кристаллизуется.
- 4. Отделение осадка калиевой соли бензилпенициллина с помощью фильтрующей центрифуги и его промывка безводным бутиловым спиртом.
- 5. Гранулирование полученной пасты и сушка калиевой соли бензилпенициллина в вакуум-сушильном шкафу при температуре 75–80 °С и остаточном давлении 10–20 мм рт. ст. При этом образуется калиевая соль бензилпенициллина в виде белого мелкокристаллического порошка с содержанием бензилпенициллина порядка 95 % и выходом 70 % от количества антибиотика в нативном растворе.

Отходы производства

- отработанные нативные растворы,
- водные маточные и промывные растворы,
- водные растворы кислот и щелочей после регенерации ионообменных смол,
- отработанный активированный уголь,
- кубовые остатки после регенерации растворителей.
- Часть этих отходов составляют антибиотики, продукты их деструкции и органические растворители.

- *Значительное снижение потерь антибиотиков в процессе их выделения может быть достигнуто путем решения комплекса задач:*
- усовершенствование процесса ферментации с целью повышения качества культуральных жидкостей;
- проведение эффективной очистки нативных растворов от примесей, затрудняющих процессы выделения антибиотиков;
- сокращение числа технологических стадий;
- уменьшение продолжительности процессов;
- использование эффективного высокопроизводительного оборудования.

Охрана окружающей среды

- Газообразные выбросы в основном включают в себя оксид углерода (77,4 %), сернистый газ (15,2%) и окислы азота (7,4 %).
- К специфическим для производства антибиотиков жидким и газообразным отходам относятся пары органических растворителей, составляющие 24,3% от общей суммы выбрасываемых веществ.
- Кроме того, в воздушных выбросах присутствует ряд примесей паров разных веществ, составляющих 0,4 % от общей суммы выбрасываемых в атмосферу жидких и газообразных отходов.
- Специфические для производства антибиотиков твердые веществ из воздушных выбросов на 92,5 %, органические растворители – на 10%, обезвреживается 5,4% от объема воздушных выбросов при биосинтезе антибиотиков.

Основные виды сырья, использующиеся в производстве антибиотиков

- Сырье, применяющееся на стадии ферментации, используется для приготовления питательных сред.
- Основой всех сред является вода.
- В качестве источников углерода используют углеводы (глюкоза, крахмал, сахароза, лактоза) или продукты, богатые углеводами (гидрол, меласса, кукурузная и пшеничная мука), жиры или масла.
- В качестве источников азота применяют соевую муку, кукурузный экстракт, жмыхи масличных культур, а также минеральные соли азота.
- Из неорганических соединений в среды часто добавляют мел и поваренную соль, а в некоторые – соединения фосфора и серы.

- Сырье, применяющееся на стадиях предварительной обработки культуральной жидкости и нативного раствора, выделения и химической очистки антибиотиков:
- Дезэмульгаторы. В производстве пеницилина, нативный раствор которого содержит большое количество белковых и органических примесей, дающих при обработке бутилацетатом стойкую эмульсию, затрудняющую сепарирование, применяют дезэмульгаторы, частично разрушающие эмульсию и способствующие более эффективному разделению на сепараторах.

- Органические растворители и экстрагенты. При экстракционном методе выделения антибиотиков необходимо большое количество органических растворителей и экстрагентов:
- а) бутилацетат нормальный технический, применяют в качестве экстрагента в производстве пенициллина;
- б) изооктиловый спирт применяют в качестве экстрагента в производстве тетрациклина;
- в) бутиловый спирт применяют для получения азеотропной смеси при вакуум-выпаривании концентрата бензилпенициллина и при переводе тетрациклина основания в хлоргидрат. Для этих целей используется как нормальный первичный бутиловый спирт, получаемый брожением, так и бутиловый спирт заводов синтетического каучука, получаемый путем фракционной разгонки высших спиртов, образующихся в процессе производства синтетического каучука;
- г) метиловый спирт синтетический и лесохимический применяют в качестве растворителя в производстве хлортетрациклина;
- д) этиловый спирт технический (гидролизный), являющийся продуктом спиртового брожения сахаров, образующихся при гидролизе древесины, растительных отходов или при сульфитной варке целлюлозы, и этиловый спирт синтетический.

- Ионообменные смолы. В производстве антибиотиков широкое применение находят ионообменные смолы (иониты). Их применяют для сорбции антибиотиков из нативного раствора, обеззоливания и нейтрализации элюатов, для умягчения и обессоливания воды.
- Все смолы делятся на катиониты и аниониты.
- Катеониты обладают кислыми свойствами и способны к обмену катионов.
- Аниониты обладают основными свойствами и способны к обмену анионов.
- В зависимости от химического состава и степени диссоциации иониты классифицируют на сильнокислотные и слабокислотные катиониты, сильноосновные и слабоосновные аниониты.

- Активированный уголь. Для осветления растворов антибиотиков их обрабатывают активированным углем. Для этой цели используют осветляющий древесный уголь, являющийся продуктом активирования древесного угля-сырца водяным паром при высокой температуре.
- При этом различают уголь трех марок: марки А (осветляющий, сухой, щелочной), марки Б (осветляющий, влажный, кислый), марки В (осветляющий, влажный, нейтральный или слабощелочной).

- Разные химические продукты. В промышленности антибиотиков используется большое количество минеральных кислот и щелочей.
- Щавелевая кислота и соли щавелевой кислоты (оксалаты) применяются при обработке культуральной жидкости стрептомицина для удаления ионов металлов (кальция, железа, магния), а также для удаления белков и органических оснований.
- Для подщелачивания среды, нейтрализации элюатов, регенерации смол применяют растворы щелочей: едкое кали, едкий натр технический (сода каустическая). При этом применяют как твердый, так и жидкий едкий натр марки «химический».
- В качестве антисептиков для обработки емкостей, помещений, для добавления в нативный раствор антибиотиков перед подачей на ионообменные колонны используют формалин технический, получаемый из синтетического и лесохимического метилового спирта, фенол синтетический, технический, хлорамин, перекись водорода.

Аппаратурно-технологическое оформление процесса ферментации антибиотиков

- В современной литературе описаны сотни биореакторов, отличающихся по конструкции, принципу действия и размерам (от нескольких литров до нескольких тысяч кубометров). Многочисленность методов культивирования, существенное многообразие используемых биообъектов привели к огромному разнообразию конструктивных решений, зависящих от типа продуцента и среды, технологии и масштабов производства, целевого продукта и пр.
- Принципиальное отличие биотехнологических процессов от химических заключается:
- в чувствительности биологических агентов к механическим воздействиям;
- в наличии межфазового переноса веществ (по типу "жидкость – клетки", "газ – жидкость – клетки");
- в требовании условий асептики;
- в низких скоростях протекания многих процессов в целом;
- нестабильности целевых продуктов;
- пенообразовании;
- сложности механизмов регуляции биосинтеза.

Классификация ферментеров по способу ввода энергии

Ферментаторы	Характеристика конструкции аппарата	Тип аппарата
ФГ с подводом энергии газовой фазой	Простота конструктивного оформления и высокая надежность в связи с отсутствием движущихся узлов и деталей	Барботажный, барботажно-эрлифтный, колонный (колонный), форсуночный
ФЖ с подводом энергии жидкой фазой	Обычно энергия передается жидкой фазе самовсасывающейся мешалкой или насосом	Эжекционный, с циркуляционным контуром, с всасывающей мешалкой
ФЖГ (комбинированные)	Основным конструктивным элементом является перемешивающее устройство, обеспечивающее высокую интенсивность растворения кислорода и высокую степень диспергирования газа. В то же время энергия газовой фазой выводится обычным способом	Барботажный с механическим перемешиванием

Ферментаторы с подводом энергии газовой фазой (группа ФГ): а - барботажный: 1 – корпус; 2 – воздухораспределитель; 3 – карман; 4 – коллектор; б – барботажно-колонный: 1 – корпус; 2 – рубашка; 3 – воздухораспределитель; в – барботажно-эрлифтный: 1 – корпус; 2 – диффузор-теплообменник; 3 – воздухораспределитель; г – газлифтный: 1 – корпус; 2 – диффузор; 3 – диспергатор; 4 – воздухораспределитель; 5 – теплообменник; д – трубчатый: 1 – пеногаситель; 2-емкость; 3-трубы; 4-корпус; 5- распределительная перегородка.

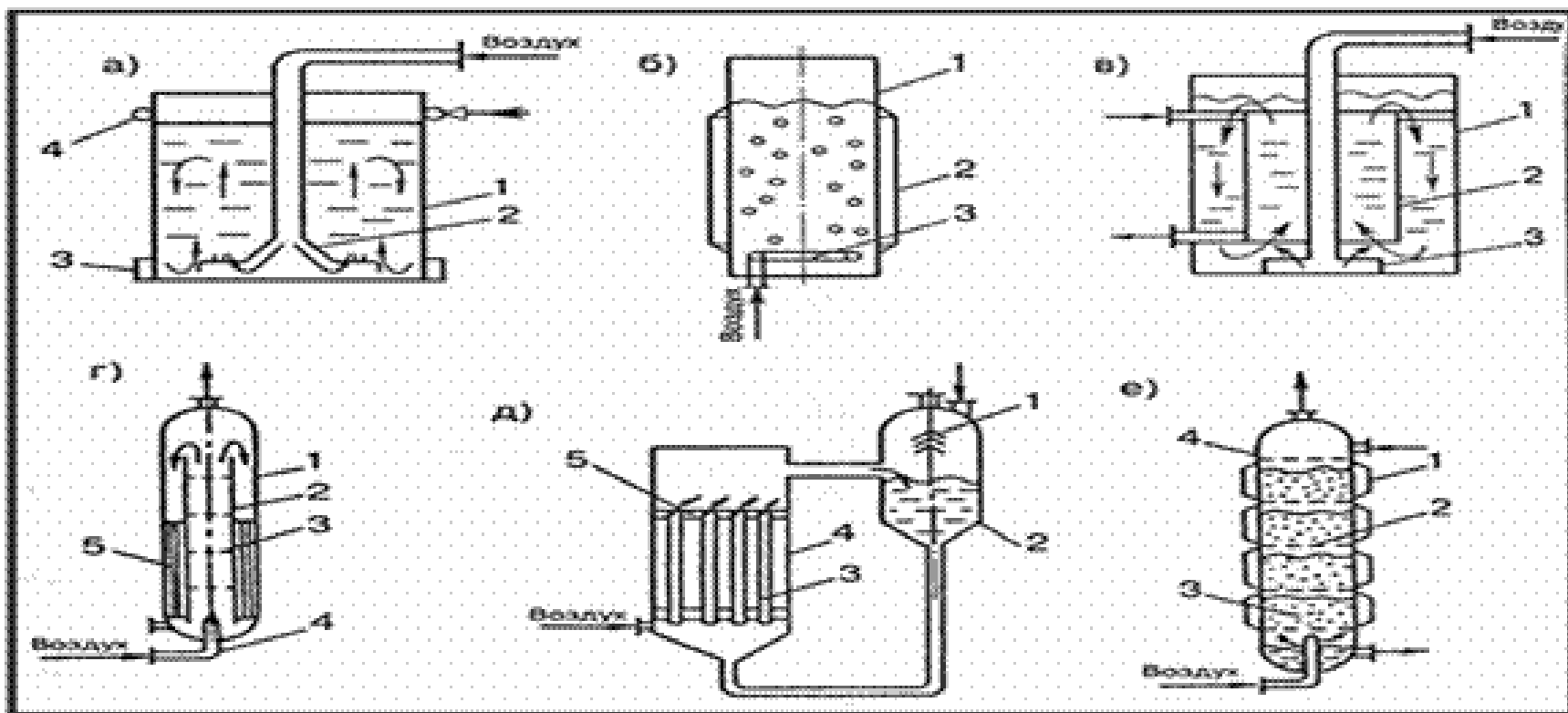


Рис. 5. Ферментаторы с вводом энергии жидкой фазой (группа ФЖ)

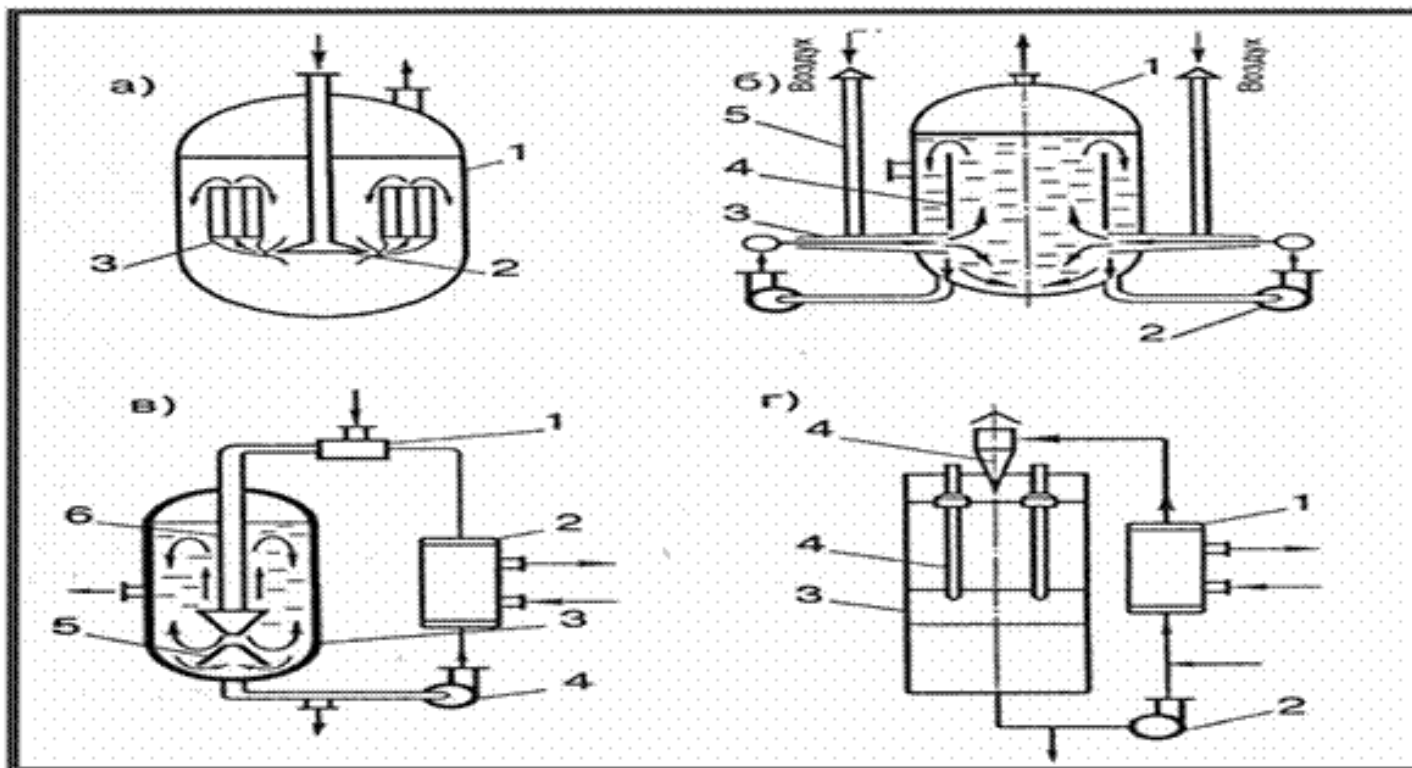
а – с самовсасывающей мешалкой: 1 – корпус; 2 – мешалка; 3 – циркуляционный контур-обменник;

б – эжекционный: 1 – корпус; 2 – насос; 3 – эжектор; 4 – диффузор-теплообменник; 5 – воздухозаборник;

в – струйный с затопленной струей: 1 – эжектор; 2 – теплообменник; 3 – корпус; 4 – насос; 5 – рассекаТЕЛЬ;

б – труба с насадкой;

г – струйный с падающей струей: 1 – теплообменник; 2 – насос; 3 – корпус; 4 – эжектор



Сушка в производстве антибиотиков

- в качестве одного из методов обезвоживания препаратов антибиотиков используется метод сублимации льда в вакууме из предварительно замороженных растворов (лиофильная сушка). Данный метод широко применяется в пищевом и химико-фармацевтическом производствах.
- Кроме того, на практике применяют метод сушки растворов антибиотиков с помощью сушилки с центробежным распылением.
- Для обезвоживания термолабильных препаратов используется конструкция двухступенчатой сушилки, совмещающей в себе две технологические стадии – выпаривание растворов и сушку. Концентрирование растворов в потоке нагретого воздуха обеспечивает несомненные преимущества перед методом выпаривания в вакууме.
- Более эффективным методом сушки для зернистых и пастообразных материалов является сушка во взвешенном слое. По режиму работы сушильные установки данного типа подразделяют на три группы: установки непрерывного, периодического и полунепрерывного действия. При этом наибольшее распространение в производстве получили сушильные установки непрерывного действия.
- Перспективным направлением является сушка с импульсной подачей воздуха. Данный способ сушки реализуется в сушилках периодического действия, работающих с пульсирующей подачей сушильного агента в слой материала. В данном случае материал, помещенный в камеру, в которую периодически вводится сушильный агент, приводится в состояние кратковременного интенсивного псевдоожижения. В результате воздействия многократных импульсов обеспечивается однородность высушенного препарата при достаточной интенсивности протекания процесса.

Сохранение штаммов продуцентов антибиотиков в активном состоянии

- 1. Лиофилизация культур.
- 2. Хранение вегетативных клеток или спор организмов в стерильной почве, стерильном песке или на семенах некоторых растений (например, просе). По данным ряда авторов, культуры актиномицетов, находящиеся в стерильной почве, сохраняют жизнеспособность в течение 30 лет и более.
- 3. Хранение спор в виде водных суспензий в запаянных ампулах.
- 4. Хранение спор в стерильном кварцевом песке.
- 5. Хранение культур на агаровом косячке под минеральным маслом.
- 6. Хранение культур при низких температурах (4 ± 1 °C).
- 7. В последнее время для сохранения различных микроорганизмов в активном состоянии используют жидкий азот, в который помещают отмытую от среды суспензию клеток. В некоторых случаях в газообразной фазе жидкого азота сохраняют культуры актиномицетов, находящиеся на агаровых блочках, вырезанных из агаровой пластинки в чашках Петри.