

Занятие семинарского типа № 7

ТЕМА ЗАНЯТИЯ: Структура биотехнологического производства антибиотиков

УЧЕБНЫЙ МАТЕРИАЛ

1. Технологические особенности биосинтеза биологически активных веществ

В основе технологии биосинтеза биологически активных веществ (БАВ) главными компонентами являются биообъекты: вирус, гриб, растительные или животные клетки, биомолекулы, обладающие различными физиологическими свойствами.

Основная задача технологии биосинтеза БАВ состоит в преобразовании природного сырья или отходов с помощью биообъекта (микроорганизмов, изолированных клеток, ферментов, клеточных органелл), поддержание и активизация путей обмена клеток, ведущих к накоплению БАВ в целевом продукте при заметном подавлении других реакций обмена у культивируемого организма, а также получение клеток или их составных частей (преимущественно ферментов) для направленного изменения сложных молекул.

1.1. Принципы микробиологического синтеза биологически активных веществ

Принципы микробиологического синтеза БАВ основываются на принадлежности биообъектов к надцарствам живых существ (акариот, прокариот, эукариот); функциональной активности биообъекта (биосинтез, биотрансформация); возможности вычленения отдельных этапов из биотехнологических схем производства в виде самостоятельных процессов (подготовка питательных сред и оборудования, ферментация, стерилизация сред и оборудования).

К основным преимуществам микробиотехнологии относятся:

- ✓ простота организации генома;
- ✓ легкая приспособляемость (лабильность) к среде обитания в естественных и искусственных условиях;
- ✓ достаточно высокие скорости протекания ферментативных реакций при низких температурах (20–60 °С) и нарастания клеточной массы;
- ✓ возможность использования недефицитного, доступного и экономичного сырья (отходы промышленности, сточные воды).

К недостаткам технологии микробного синтеза БАВ относятся: многокомпонентность питательных сред, необходимость стерилизации питательных сред, оборудования и коммуникаций для удаления или разрушения контаминантов при сохранении качества среды, а также трудности в управлении процессом биосинтеза и автоматизации.

Это связано с процессами саморегуляции биообъектов (включая способность к мутации), которые могут привести к непредвиденному изменению биотехнологического процесса.

В процессе размножения и развития происходит постоянное изменение отдельных параметров, и в каждый момент времени клетки функционируют в новых условиях. В связи с этим, при управлении технологическим процессом биосинтеза БАВ следует учитывать индивидуальные особенности «поведенческих реакций» биообъекта в конкретных условиях культивирования: его чувствительность к воздействию физико-механических факторов при перемешивании, а также знание химической природы синтезируемого БАВ, характера биохимических процессов, осуществляемых биообъектами, специфике наследственных свойств данного вида.

1.2. Основные технологические показатели биосинтеза биологически активных веществ

Для нормального роста, размножения биообъекта в процессе биосинтеза БАВ необходимо поддерживать оптимальные условия его культивирования. При нарушении оптимальных условий нарушается обмен веществ, прекращается или ограничивается рост и размножение культуры, снижается выход и качество целевого продукта.

К параметрам контроля процесса культивирования биообъектов, представляющим собой основные технологические показатели биосинтеза БАВ, относятся:

- ✓ температура;
- ✓ значение рН среды;
- ✓ количество биомассы клеток;
- ✓ скорость потребления источников питания;
- ✓ количество растворенного кислорода (в случае аэробных биообъектов);
- ✓ количество образующегося метаболита.

1.3. Технологические стадии биотехнологического производства биологически активных веществ

К основным технологическим стадиям биосинтеза БАВ относятся:

- ✓ предферментационная стадия (подготовительные работы);
- ✓ ферментация (биосинтез целевого продукта);
- ✓ постферментационная стадия (выделение и химическая очистка целевого продукта).

Предферментационная стадия включает в себя подготовительные стадии вплоть до биосинтеза БАВ (целевого продукта):

- 1) приготовление и подготовка среды;
- 2) получение и подготовка посевного материала;
- 3) выбор и подготовка оборудования.

При этом одним из основных элементов в подготовке оборудования, питательных сред и посевного материала является их стерилизация. В частности, стерилизации подлежат пеногасители, жидкие добавки, коммуникации и датчики. Необходимость стерилизации обусловлена тем, что микроорганизмы-контаминанты не только могут подавить функциональное развитие биообъекта в силу конкуренции и антибиоза, но и дезорганизовать отдельные ткани или среду выращивания. Некоторые из них способны продуцировать токсичные вещества, которые могут попасть в целевой продукт.

В производственных условиях источниками микроорганизмов-контаминантов могут быть почва, вода, окружающий воздух, люди.

Наличие в воздухе частиц пыли или капелек влаги создают благоприятную среду для жизнедеятельности микроорганизмов.

По степени загрязненности воздуха микроорганизмами и механическими частицами из расчета на 1 м³ производственного помещения, в которых производятся лекарственные препараты, классифицируют на четыре класса чистоты.

Защита биотехнологических процессов от микроорганизмов-контаминантов осуществляется с использованием фильтров.

В лабораторных условиях стерилизацию питательных сред и других объектов осуществляют в автоклавах паром при температуре 120–122 °С под давлением не менее 0,3 МПа или холодным способом.

Датчики измерительных приборов и регуляторов, как правило, не выдерживают воздействия высоких температур при стерилизации, поэтому к ним применяют холодные или химические способы стерилизации. Для этого используются бактерицидные газы (этилен), растворы антисептиков (формалин и др.).

Сахаросодержащие материалы стерилизуют отдельно от других компонентов питательной среды в мягких условиях во избежание реакций меланоидирования, гумификации, карамелизации, реверсии, кислотного разложения.

Для контроля эффективности стерилизации вводится критерий стерильности – временем выдержки или длительностью экспозиции. Под данным термином понимают интервал, в пределах которого погибают микроорганизмы. Гибель последних спор в среде является случайным процессом, поэтому введено понятие «критерий стерильности» (N), т.е. отношение числа операций стерилизации, в результате которых выжили по одной термостойкой споре к общему числу проведенных операций.

Для стерилизации сред принимают критерий стерильности, равный $0,01 \pm 0,001$. В случае, если исходное количество спор в среде принять за N_0 , то получим соотношение N/N_0 – уровень стерильности или коэффициент выживания, означающий, что для достижения заданного критерия стерильности (например, 0,01) среда должна выдерживаться при температуре стерилизации строго определенное время для того, чтобы популяция спор уменьшилась от исходного значения N_0 до N/N_0 (например, до 10–16).

Технология подготовки питательных сред

Понятие "питательная среда" или среда культивирования включает качественный и количественный состав исходных компонентов, необходимых для реализации процессов энергетического обмена в клетке. В состав питательных сред для развития культуры продуцента и биосинтеза БАВ входят такие компоненты, как: азот, фосфор, углерод, микроэлементы, витамины, минеральные соли, ростовые вещества и т.п.

Процесс приготовления питательных сред включает выбор компонентов питания, необходимых продуцентам БАВ для их воспроизводства и биотрансформации. Подбор состава сред осуществляется эмпирически, продолжителен по времени и требует определенных навыков.

В составе питательной среды представлены: углерод, водород, кислород, азот, фосфор, сера, калий, кальций, магний, железо, микроэлементы. Некоторым продуцентам БАВ в процессе биосинтеза необходимы витамины и регуляторы роста.

Состав питательных сред подбирают, исходя из материального баланса с учетом трансформации разных элемента питания и расходуемой (выделяемой) энергии.

При этом следует соблюдать правило разработки оптимального состава питательных сред: для получения заданного количества биомассы компоненты питательной среды берутся в соотношениях, пропорциональных потребностям в них культур (1):

$$C_i/A_i = \dots C_2/A_2 = C_1/A_1 = S_0, \quad (1)$$

где C_i – концентрация i -го компонента в сбалансированной питательной среде;

A_i – коэффициент метаболизма культуры по i -му компоненту;

S_0 – заданный запас субстрата в среде, выраженный в единицах концентрации биомассы.

По своему назначению питательные среды классифицируют на диагностические и производственные.

Диагностические питательные среды предназначены для обнаружения, выделения и идентификации патогенных микроорганизмов по морфологическим и физиологическим признакам. Они подразделяются на элективные среды, среды для консервирования, среды обогащения и дифференциально-диагностические среды.

Элективные среды служат для посева тест-штамма для получения чистой культуры.

Среды обогащения предназначены для преимущественного накопления одной группы микроорганизмов при одновременной задержке роста сопутствующих видов.

Дифференциально-диагностические среды предназначены для идентификации отдельных видов микроорганизмов.

Производственные среды по составу классифицируют на две группы: натуральные (неопределенного состава) и синтетические среды.

Натуральные среды состоят из природных соединений, продуктов животного или растительного происхождения. Они содержат все необходимые компоненты для роста и развития микроорганизмов. Однако, вследствие сложности и неопределенности их химического состава трудно оценить влияние отдельных компонентов на механизм биосинтеза БАВ. В производстве натуральные среды используют для поддержания развития микроорганизмов, накопления биомассы, а также для диагностических целей.

Синтетические среды удобны для изучения обмена веществ. Благодаря сложной ферментативной организации микроорганизмов из простых составляющих осуществляется биосинтез сложных БАВ.

Среди натуральных сред широкое применение нашли: меласса (отход свеклосахарного производства) в качестве основного источника углерода, кукурузный экстракт, отруби и др.

Жидкие питательные среды изготавливают в аппаратах, снабженных мешалкой, в которые загружают компоненты в определенной последовательности (согласно технологическому регламенту).

При биотехнологическом производстве антибиотиков для каждого продукта разрабатывается оптимальная питательная среда. При этом среда должна соответствовать определенным требованиям:

- а) обеспечивать максимальный выход антибиотика;
- б) состоять из доступных и экономичных компонентов;
- в) иметь хорошую фильтрующую способность;
- г) обеспечивать применение наиболее экономичных приемов выделения и очистки антибиотиков.

Стерилизация питательных сред в промышленных условиях в основном осуществляется двумя методами: периодическим и непрерывным.

Периодический метод стерилизации применяется при использовании небольших объемов среды и состоит в том, что среда нагревается до 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 охлаждается до температуры 27–30 °С.

За период времени, затрачиваемый на нагрев среды до температуры, необходимой для стерилизации, и ее охлаждение, в ней происходит уничтожение микроорганизмов. Известно, что для нагревания больших объемов среды до температуры стерилизации и затем ее охлаждения требуется больше времени, чем для небольших объемов, поэтому время, затрачиваемое на поддержание наиболее высокой стерилизующей температуры в больших объемах, может быть меньшим, чем для небольших объемов с тем же эффектом стерилизации.

Высокая эффективность стерилизации и сохранение термолabileльных веществ в среде достигаются в том случае, если стерилизацию проводят при более высокой температуре в течение непродолжительного времени.

Непрерывный метод стерилизации целесообразно применять в случае больших объемов среды. Приготовленная среда из специального реактора с помощью насоса направляется в стерилизационную колонку, через которую пропускают острый пар под давлением (505 Па). Пар подают сверху по внутренней трубе, имеющей щелевидные прорези, благодаря чему он поступает в среду, быстро ее нагревая. Среда в колонку поступает снизу и движется по спирали вокруг внутренней трубы.

Среда, нагретая в колонке до необходимой для стерилизации температуры (около 130 °С), поступает в специальный аппарат, в котором она выдерживается в течение определенного времени при температуре 125–130 °С. При этом время выдерживания зависит от состава среды и составляет около 5–10 мин. Затем стерильная среда подается в змеевиковый холодильник, охлаждается до температуры 30–35 °С (на выходе) и поступает в ферментер.

Непрерывный метод стерилизации отличается рядом преимуществ: возможностью автоматического регулирования процесса, быстрым и равномерным нагревом среды, обеспечением более полной стерильности среды и др.

При применении в качестве отдельных компонентов субстрата термолabileльных веществ их, как правило, стерилизуют отдельно в условиях более мягкого режима.

Технология подготовки посевного материала

Подготовка посевного материала состоит из лабораторного и производственного этапов.

Лабораторный этап заключается в приготовлении рабочего посевного материала. Для этого исходный штамм микроорганизма, сохраняемый в состоянии анабиоза (путем высушивания на стерильной почве, песке, пшенице лиофилизации или сублимационной сушки) оживляют добавлением стерильной жидкой питательной среды, а затем высевают на уплотненную питательную среду и проверяют чистоту культуры. После оживления, т.е. перевода консервированной культуры на косяк, осуществляют пересев штамма на среду возрастающих объемов, постепенно переходя от пробирок к колбам (емкостью 1 л) и бутылкам (емкостью 20 л). При этом следует соблюдать соотношение посевного и рабочего объемов – 1:10. Коэффициент заполнения емкостей не должен превышать 0,5–0,6.

Ллиофилизация культур осуществляется путем быстрого замораживания (от -40 до -60 °С) суспензии клеток или спор микроорганизма, приготовленной на среде, богатой белками (кровяная сыворотка), с последующим высушиванием под вакуумом до остаточной влажности (0,5–0,7%). После такой обработки ампулы со спорами и клетками лиофилизированного микроорганизма запаивают. Данный метод пригоден как для спорообразующих, так и для бесспорных культур микроорганизмов. Ллиофилизированные формы

бактерий могут сохраняться в течение 16-18 лет, а споры грибов – в течение 10 лет, не теряя основных свойств.

Производственный этап. Дальнейшую подготовку посевного материала осуществляют в инокуляторах, в которых наращивают посевной материал. При этом одноклеточные культуры доводят до середины логарифмической фазы роста (когда клетки делятся синхронно). Рабочую культуру подают в инокулятор, заполненный стерильной питательной средой, из расчета 8–10 % к объему среды. Во избежание утечки посевного материала в инокуляторах и биореакторах следует поддерживать избыточное давление.

Инокуляторы должны отвечать следующим основным требованиям: конструктивная простота, удобство и надежность эксплуатации. Посевные аппараты отечественного производства имеют объем 10, 5, 2 и 0,63 м³, диаметр от 0,9 до 2 м и частоту вращения мешалки от 180 до 270 об./мин. Общий объем ферментатора заполняют инокулированной средой на 70–80 %, а 20–30 % объема заполняют газами (инертным – для анаэробов, воздухом – для аэробов).

Микроорганизм в виде суспензии определенной плотности подают из инокулятора(-ов) в промышленный биореактор (ферментер), в котором содержится стерильная жидкая питательная среда. При этом должно быть исключено попадание посторонней микрофлоры в питательную среду вместе с продуцентом. В этой связи, все соединения системы должны быть герметично закрыты.

Для осуществления процесса в асептических условиях необходимо введение дополнительных стадий, обеспечивающих стерилизацию питательных сред и воздуха, подаваемого в ферментер. Стерильную среду засевают с соблюдением правил асептики через специальное устройство посевным материалом, выращенным в лаборатории, поддерживая оптимальный для развития культуры продуцента режим (температуру, аэрацию и перемешивание).

После достижения требуемой стадии развития и количества биомассы посевной материал перемещают с помощью стерильного сжатого воздуха по посевному коллектору в инокулятор большей вместимости.

На второй ступени выращивания посевного материала стремятся получить большее количество биомассы клеток для того, чтобы в ферментере можно было создать необходимую для данного штамма продуцента исходную плотность популяции. В случае, если это требование выполнимо без второй ступени, то ферментационную среду засевают непосредственно из инокулятора.

Все ферментаторы цеха соединены между собой несколькими коллекторами:

- посевным коллектором, благодаря которому можно засеивать среду в любом ферментере из любого посевного аппарата; коллектором подачи стерильной питательной среды;
- коллектором подвода стерильного сжатого воздуха к индивидуальным фильтрам;
- коллектором отработанного воздуха, выходящего из ферментера;

- коллектором перекачивания культуральной жидкости из ферментера.

В случае проведения ферментаций в нестерильных условиях питательную среду и воздух для аэрации не стерилизуют, но посевной материал всегда выращивают на стерильных питательных средах в асептических условиях.

Требования к промышленным штаммам:

- ✓ стабильность структурно-морфологических признаков и физиологической активности при длительном хранении и эксплуатации в производстве;
- ✓ повышенные скорости роста и биосинтеза целевых продуктов в лабораторных и производственных условиях;
- ✓ широкий диапазон устойчивости к воздействию неблагоприятных внешних факторов – изменению температуры, значения рН среды, аэрации, перемешиванию, вязкости среды;
- ✓ умеренная требовательность к ограниченному числу источников питания.

Ферментация проводится в производственных биореакторах. В процессе ферментации необходимо использование стерильных питательных сред, воздуха и биореакторов, выбор которых обусловлен общими требованиями биообъектов.

Ферментацию следует осуществлять в герметизированных биореакторах во избежание рассеивания биообъекта во внешнюю среду.

К основным принципам технического оснащения биопроизводств относятся:

- ✓ конструкционное совершенство и универсальность биореакторов;
- ✓ инертность или коррозионная стойкость материалов биореакторов и другого технологического оборудования, вмещающих биообъект или продукты его метаболизма;
- ✓ эксплуатационная надежность технологического оборудования;
- ✓ доступность, эстетичность, легкость обслуживания, замены, смазки, чистки, обработки антисептиками.

Аппаратурное оформление биотехнологических производств

В связи с тем, что в технологии биосинтеза БАВ много общего, то знание этих общих закономерностей облегчает выбор биореактора, сепарирующего оборудования, сушилок и т.п.

К общим показателям биообъектов в процессе биосинтеза БАВ относятся:

- ✓ уровень структурной организации;
- ✓ способность к размножению (или репродукции);
- ✓ наличие или отсутствие собственного метаболизма при культивировании.

Бактерии и грибы выращивают в однотипных биореакторах, имеющих однотипную обвязку, включающую: ферментер, стерильный многокорпусный вентиль для подачи питательной среды, посевного материала, подпитки и пр., системы регулирования значения рН, температуры, подачи пеногасителя, системы контроля расхода воздуха, пробоотборник, электродвигатель.

Конструкции ферментеров для культивирования микроорганизмов – продуцентов БАВ можно разделить на два типа: без подводки стерильного воздуха (для анаэробов) и с подводкой стерильного воздуха (для анаэробов).

Размеры ферментеров определяются соотношением внешнего диаметра к высоте 1:2 до 1:6.

Ферментеры классифицируют по способу ввода в аппарат энергии для перемешивания: газовой фазой (ГФ), жидкой фазой (ФЖ), газовой и жидкой фазами (ФЖГ).

Ферментеры периодического действия из групп ФЖГ применяют с 1944 г. в промышленном производстве антибиотиков, витаминов и других БАВ. Их конструкция обеспечивает стерильность ферментации в течение длительного времени (несколько суток) при оптимальных условиях для роста и жизнедеятельности продуцента.

Ферментеры такой конструкции изготавливают на 1,25; 2,0; 2,5; 3,2; 4,0; 5,0; 6,3; 10,0; 16,0; 20,0; 32,0; 50,0; 63,0; 100,0 и 160,0 м³.

Данный ферментер представляет собой цилиндрический вертикальный аппарат со сферическим днищем, снабженный аэрирующим, перемешивающим и теплопередающим устройствами. Воздух для аэрации поступает в ферментер через барботер, установленный под нижним ярусом мешалки.

При использовании ферментера группы ФГ с эрлифтом проще поддерживать асептические условия без механического перемешивания. К недостаткам ферментеров этой группы относится низкая интенсивность массообмена по кислороду. Воздух для аэрации среды подается по трубе, расположенной вертикально в ферментере. Аэратор, конструкция которого обеспечивает вихревое движение выходящего воздуха, расположен в нижней части диффузора и насыщает питательную среду воздухом. Газожидкостная смесь поднимается по диффузору и перемешивается через его верхние края. В этой же зоне часть воздуха уходит из аппарата, а более плотная среда опускается вниз в кольцевом пространстве между корпусом ферментера и диффузором. Так происходит многократная циркуляция среды в ферментере.

Для отвода биологического тепла внутри ферментера установлен змеевик, а также аппарат снабжен секционной рубашкой.

Широкое распространение на биотехнологических предприятиях получили ферментеры с самовсасывающими мешалками группы ФЖ. Для выращивания чистой культуры дрожжей созданы ферментеры вместимостью 0,32; 3,2 и 50 м³. Ферментер представляет собой вертикальный цилиндрический аппарат, снабженный циркуляционными, теплообменными и аэрирующими устройствами. В качестве циркуляционных устройств использованы системы направляющих диффузоров, разграничивающих восходящие и нисходящие

потоки. Теплообменные устройства выполнены в виде трубок, установленных в трубных решетках диффузоров.

Вместимость такого ферментера – 800 м³ (рабочий объем 320 м³). Данный аппарат разделен на 12 секций. Ферментационная среда последовательно проходит все секции, а из последней выходит культуральная жидкость с максимальной концентрацией биомассы. В каждой секции установлены перемешивающие и аэрирующие устройства и змеевики для отвода тепла.

В последние годы апробированы мембранные биореакторы, биореакторы с полыми волокнами и некоторые другие перспективные конструкции аппаратов.

При расчете и конструировании биореакторов следует учитывать время протекания разных биологических процессов у представителей различных групп организмов.

Управление технологическими процессами биосинтеза БАВ

Биосинтез целевого продукта в ферментере происходит при заданных значениях температурного режима, аэрации, перемешивании и рН культуральной жидкости. При этом величину рН обычно регулируют периодической подачей аммиачной воды через барботер ферментера.

Аэрация жидкости способствует пенообразованию, снижающему качество ферментации, поэтому используют пеногашение механическое (установка в верхней части ферментера специальной дополнительной мешалки) или физико-химическое (использование ПАВ для снижения поверхностного натяжения на границе раздела фаз газ – жидкость).

Длительность ферментации зависит от природы используемых биообъектов, особенностей их развития и строения.

Для поддержания постоянства концентраций отдельных компонентов питательной среды их подают в виде стерильных растворов по команде автоматизированной системы управления (АСУ) с определенной скоростью и периодичностью в ферментер из специальных аппаратов.

Постферментационная стадия

После завершения стадии ферментации отделяют клетки (клеточную массу) или культуральную жидкость, в которой содержится целевой продукт – БАВ. В первом случае отходом является культуральная жидкость, во втором – плотная часть (биомасса).

Культуральная жидкость, образующаяся в процессе ферментации, представляет собой сложную многокомпонентную систему. В водной фазе содержатся клетки продуцента, продукты их жизнедеятельности, непотребленные компоненты питательной среды, мельчайшие капельки жира, пузырьки воздуха, мел. В свою очередь, водная фаза культуральной жидкости (нативный раствор) включает большое количество органических и неорганических веществ, коллоидных фракций белков; сухой остаток культуральной жидкости – до 17% и более.

Содержание биомассы в культуральной жидкости достигает 8–10%.

Концентрация целевого продукта чаще всего не превышает 1,5%, что составляет менее 10% сухого остатка.

1.4. Отходы биотехнологических производств, их обезвреживание и утилизация

Отходы биотехнологических производств относятся к типу разлагающихся в природных условиях под действием биологических, химических и физико-химических факторов.

К плотным отходам относятся: микробная масса, шламы, растительная биомасса после экстракции, тканевые культуры животных, осадок сточных вод (ил).

Все отходы биотехнологических производств подлежат анализу на содержание патогенной микрофлоры.

При этом нетоксичные сухие остатки используются в качестве кормовых добавок, для приготовления компоста, получения биогаза при метановом брожении. При метановом брожении почти все органические вещества (кроме лигнина) с помощью микроорганизмов трансформируются до метана и углекислоты. Метан используют в виде топлива, углекислоту – в виде сухого льда. Плотный осадок, оставшийся после брожения, представляет собой органическую субстанцию, содержащую гумусовые вещества, которые используют в качестве органического удобрения.

Жидкие отходы биотехнологических предприятий могут содержать как неорганические, так и органические примеси вследствие неполного использования продуцентами питательной среды. Данные отходы могут накапливаться на стадии подготовки сырья (мойка), и попадать в воду.

Органические вещества жидких отходов обезвреживают с помощью микроорганизмов. Нитраты обезвреживают с помощью бактерий-нитрификаторов. Соли фосфора осаждают химическими реактивами.

Жидкие отходы подлежат очистке для сохранения равновесия в водоемах, они могут содержать масла и жиры, используемые для пеногашения, снижающие поступление кислорода в водоем. В свою очередь, нарушение кислородного баланса в природных водоемах приводит к конкуренции среди видов (подавление одного вида другими).

Газообразные отходы биотехнологических производств включают отработанный воздух, в котором могут присутствовать болезнетворные микроорганизмы, а также углекислый газ, образующийся при сбраживании углеводов и дыхании биообъектов.

При этом углекислый газ улавливается и утилизируется в хладагент, который используется в пищевой промышленности. Отработанный воздух подвергается очистке.

2. Структура биотехнологического производства антибиотиков

Подготовка посевного материала является одной из ответственных операций в биотехнологическом цикле получения антибиотиков. От количества и качества посевного материала зависит как развитие микроорганизма в

ферментере, так и биосинтез антибиотика. Продуцент антибиотика обычно выращивают на богатых по составу натуральных средах, способных обеспечить наиболее высокую физиологическую активность микроорганизмов.

Подготовка посевного материала представляет собой многоступенчатый процесс. Микроорганизм – продуцент антибиотика предварительно выращивают на агаризованной среде в пробирке, затем из пробирки производят посев в колбы с жидкой средой и проводят две генерации при глубинном выращивании на качалках в течение 2–3 сут. для каждой генерации.

Из второй генерации культуры в колбе осуществляют посев в небольшой (10 л) инокулятор, после чего хорошо развившуюся культуру переносят в более крупный инокулятор (100–500 л), а затем производят посев в основной ферментер. Для посева в основной ферментер используют 5–10 об. (%) посевного материала (инокулята). Однако, при получении пенициллина споровый материал микроскопического гриба, приготовленный на отрубях, рисовых зернах или пшене, засевают в инокулятор.

Ферментация

Методы культивирования продуцентов антибиотиков

В современных условиях наиболее перспективным методом выращивания микроорганизмов – продуцентов антибиотиков или других БАВ признан метод глубинного культивирования. Данный метод состоит в том, что микроорганизм развивается в толще жидкой среды, через которую непрерывно пропускается стерильный воздух и среда перемешивается.

Существует четыре основные модификации глубинного способа культивирования микроорганизмов.

1. Периодическое культивирование. При этом способе процесс развития микроорганизмов полностью завершается в одном ферментере. Затем ферментер 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 (30–60% общего объема). При этом объем культуральной жидкости в ферментере доводится свежей средой до исходного уровня.

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 немедленно заполняется свежей средой, засеиваемой микроорганизмом. При этом способе выращивания микроорганизмов биореакторы используются более рационально.

4. Непрерывное культивирование. Данный метод принципиально отличается от указанных модификаций глубинного культивирования продуцентов антибиотиков. Метод непрерывного культивирования основан на принципе

непрерывного потока питательной среды, что позволяет поддерживать развитие микроорганизма на определенной стадии его роста. Стадия развития микроорганизма определяется тем, что в этот период происходит максимальный биосинтез антибиотика.

В условиях непрерывного биосинтеза некоторых антибиотиков можно получить оптимальные результаты, если процесс осуществлять в две стадии: в первом аппарате батареи поддерживают высокую скорость потока, обеспечивающую большую скорость роста продуцента антибиотика, чтобы получить высокоактивную биомассу, а во втором аппарате обеспечивают низкую скорость потока и соответственно небольшую скорость роста.

Процесс непрерывного культивирования представляет собой перспективное направление современной биотехнологии антибиотиков.

Ферментеры

Для изучения условий образования антибиотиков и их производства в промышленных масштабах применяют ферментеры (специальные герметически закрытые емкости, в которых создаются оптимальные условия для глубинного развития продуцента и биосинтеза им антибиотика).

Ферментер (рис. 1) снабжен приспособлениями для аэрации и перемешивания культуры, поддержания оптимальной температуры, а также контрольно-измерительными приборами.

Аэрирование культуры реализуется в результате подачи стерильного, подогретого до необходимой температуры воздуха через специальные приспособления (барботеры) и перемешивания культуральной жидкости различными мешалками (пропеллерными, турбинными и др.), а также использования отбойников.

Аэрация культуры повышается при использовании мешалок новых конструкций. Такие мешалки во время работы засасывают воздух, который затем струями выталкивается вместе с культуральной жидкостью на поверхность среды. При этом происходит большее растворение кислорода, благодаря его лучшему диспергированию в среде.

Поддержание температуры, оптимальной для оптимального роста продуцента антибиотика и проявления им повышенной физиолого-биохимической активности, обеспечивается рубашкой ферментера или системой змеевиков. Змеевики используются также для подачи пара в процессе стерилизации или воды для охлаждения.

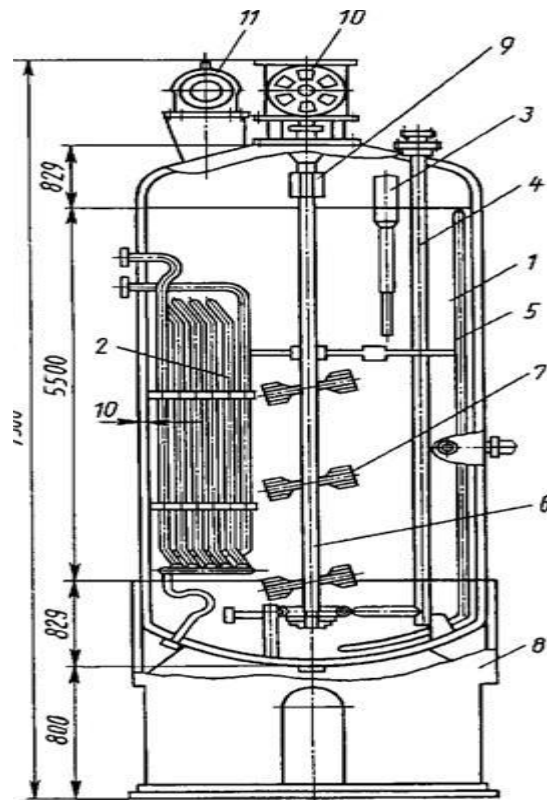


Рис. 1. Схема ферментера:

1 – корпус аппарата; 2 – теплообменник; 3 – гильза для термометра;
 4 – барботер, 5 – растяжки для центровки вала; 6 – вал мешалки; 7 – лопасть мешалки; 8 – стойка ферментера; 9 – соединительная муфта вала; 10 – привод мешалки, 11 – мотор

Наблюдение за основными процессами жизнедеятельности организма осуществляется с помощью контрольно-измерительных приборов, позволяющих поддерживать на заданном уровне температуру внутри ферментера, значение рН среды, количество пропускаемого воздуха, давление внутри ферментера и др. Кроме того, применяются установки, позволяющие автоматически определять содержание азота в среде в ходе развития микроорганизма – продуцента антибиотика.

Ферментеры снабжены приспособлениями для переноса инокулята, внесения дополнительных питательных веществ, необходимых для лучшего развития продуцента, пеногасителем и устройством для отбора проб. В современных ферментерах контрольно-измерительные приборы коммуницированы с компьютером, что позволяет автоматически контролировать весь биосинтетический процесс по заданной программе.

В зависимости от характера работ используют разные типы ферментеров: лабораторные, полупроизводственные и производственные.

Лабораторные ферментеры изготавливаются из стекла или нержавеющей стали. Их вместимость, как правило, не превышает 30 л. Обычно такие ферментеры стерилизуют в автоклавах. При этом питательную среду, как правило, стерилизуют отдельно, и после переносят в стерильный ферментер.

Вместимость полупроизводственных ферментеров составляет 100 л. Их изготавливают из нержавеющей стали.

В производственных условиях получения антибиотиков применяют промышленные ферментеры различной вместимости – от 0,5 до 100 м³.

Стерилизация полупроизводственных и производственных ферментеров, а также всех обслуживающих их коммуникаций осуществляется перегретым паром. Воздух, необходимый для аэрации, стерилизуют с помощью фильтрации через специальные фильтры, заполненные стеклянной ватой или активированным древесным углем. Использование волокнистых фильтров (типа стеклянной ваты) является широко распространенным и экономически более выгодным механическим способом стерилизации воздуха. Причем, чем меньший диаметр имеют волокна материала, тем выше их фильтрующая способность. Установлено, что проникновение в фильтр бактериальных клеток или спор, перемещающихся с воздушным потоком, зависит от скорости движения воздуха. При этом их проникновение усиливается с повышением скорости воздушного потока и достигает максимального значения в диапазоне 10–25 см/с (в зависимости от плотности упаковки фильтра). При дальнейшем увеличении скорости движения воздуха проникновение частиц уменьшается.

Развитие продуцента антибиотика в ферментерах

Развитие микроорганизма – продуцента антибиотика в ферментерах проходит при строгом контроле всех стадий и соблюдении условий его развития. Большое внимание уделяют поддержанию заданной температуры культивирования, активной кислотности среды (рН), степени аэрации и скорости работы мешалки. В процессе развития микроорганизма осуществляют биологический контроль, учитывают потребление им основных питательных компонентов субстрата (источников углерода, азота, фосфора), а также контролируют процесс образования антибиотика. В последнее время все чаще биологический контроль проводят с использованием компьютерных технологий.

Значительное внимание при развитии продуцента антибиотика в ферментерах уделяют процессу пеногашения. При продувании воздуха через культуру микроорганизма образуется обильная пена, которая существенно нарушает процесс развития продуцента антибиотика в ферментере. Появление большого количества пены обусловлено белковыми веществами, находящимися в среде, а также ее высокой вязкостью, связанной с обильным накоплением биомассы.

Для борьбы с избыточной пеной в ферментерах используют поверхностно-активные вещества (ПАВ): растительные масла (соевое, подсолнечное), животный жир (лярд, кашалотовый жир), реже – минеральные масла (вазелиновое, парафиновое), спирты и высшие жирные кислоты. Нередко в качестве пеногасителей используют вещества, полученные путем химического синтеза (силиконы, диазобутанкарбамил и др.).

Многие вещества (масла, жиры, спирты и др.), используемые в качестве пеногасителей, потребляются продуцентами антибиотиков как дополнитель-

ные источники углеродного питания. При этом часто наблюдается повышение выхода антибиотика. Однако, внесение пеногасителя может снижать скорость растворения кислорода, что, в свою очередь, отрицательно сказывается на развитии микроорганизма и его биосинтетической активности.

В некоторых случаях прибегают к механическим способам пеногашения (отсасывание пены через специальные трубы, разрушение пузырьков пены сильными струями жидкости, пара или газа).

Общая схема производства антибиотиков до стадии выделения и химической очистки представлена на рис. 2.

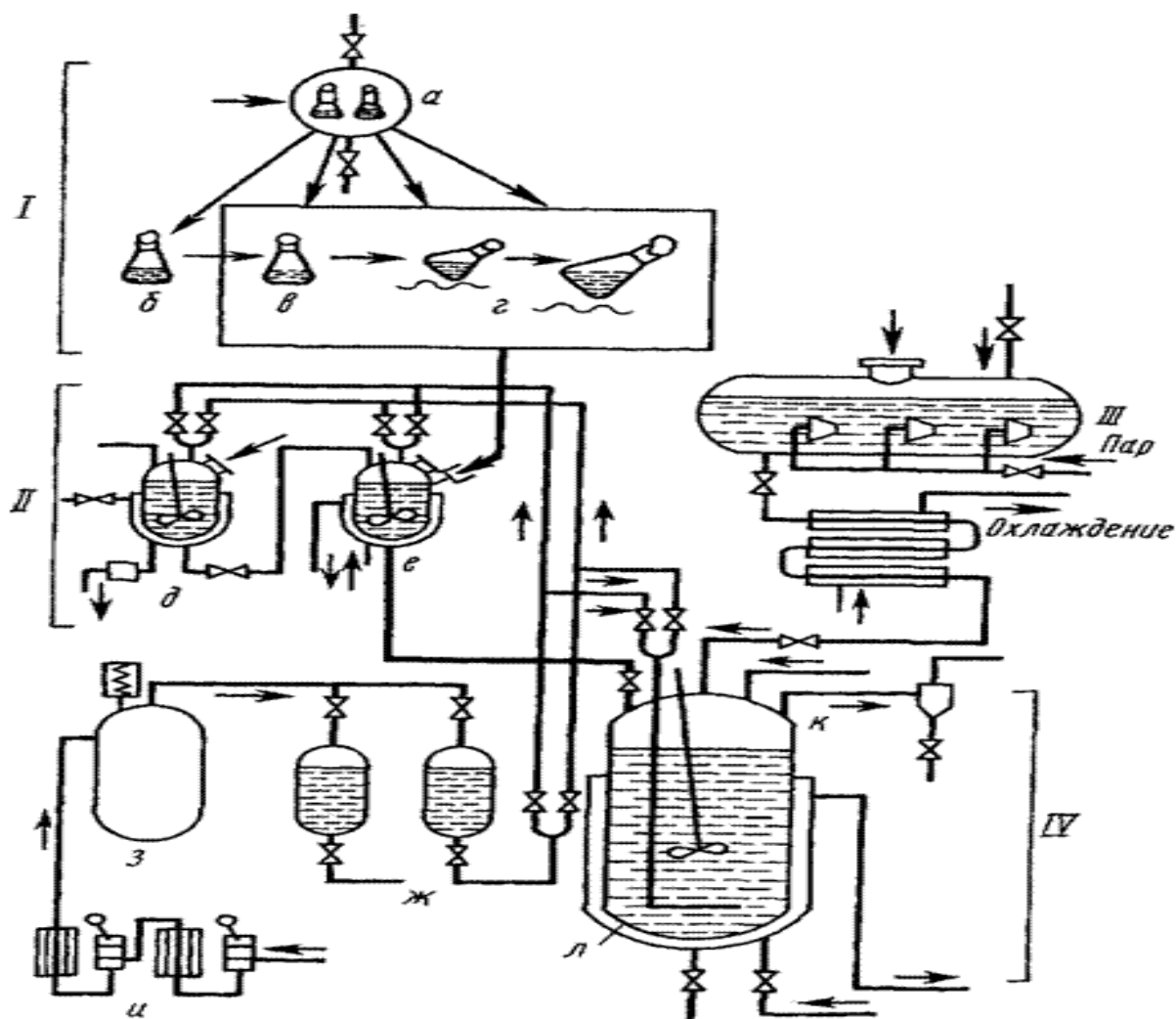


Рис. 2. Схема производства антибиотиков:

- I – приготовление посевного материала; II – инокуляторы для наращивания посевного материала; III – стерилизатор среды для большого ферментера; IV – установка для биосинтеза антибиотика:
 а – стерилизация среды в колбах; б – охлаждение и посев культуры продуцента в колбу; в – рост культуры в покое; г – рост культуры в качалке;
 д – инокулятор со стерильной средой; е – инокулятор со средой, засеянной культурой продуцента; ж – фильтры и компрессор; з – резервуар со сжатым воздухом; и – нагрев воздуха; к – ферментер; л – рубашка для охлаждения ферментера

Предварительная обработка культуральной жидкости, выделение и химическая очистка антибиотиков

В процессе развития микроорганизмов, продуцируемые ими антибиотики, в большинстве случаев почти полностью выделяются из клеток в окружающую среду. Однако, в ряде случаев в культуральную жидкость попадает лишь часть антибиотика, а другая часть сохраняется внутри клеток.

Кроме того, у ряда продуцентов антибиотик почти полностью накапливается в клетках организма.

В зависимости от того, где локализован антибиотик, применяют соответствующие методы его выделения. В частности, если антибиотик находится в культуральной жидкости, то его выделяют методами экстракции, используя для этого растворители, не смешивающиеся с жидкой фазой, осаждают в виде нерастворимого соединения или сорбируют с помощью ионообменных смол. Из клеток микроорганизмов антибиотик выделяют с помощью экстракции органическими растворителями. В случае, если антибиотик содержится и в культуральной жидкости, и в клетках продуцента, то сначала его переводят в фазу, из которой наиболее целесообразно его изолировать.

Отделение нативного раствора от биомассы продуцента и взвешенных частиц проводят методами фильтрации или центрифугирования. Для осуществления фильтрации используют фильтр-пресс, нутч-фильтр, друк-фильтр, центрифуги или сепараторы. Фильтр-прессы применяют для обработки больших объемов культуральной жидкости. Данные аппараты состоят из ряда чередующихся плит и рам с расположенными между ними фильтрующими перегородками. В данном случае процесс фильтрования осуществляется под давлением.

Для фильтрования небольших объемов культуральной жидкости обычно применяют нутч-фильтры или друк-фильтры. При этом нутч-фильтр работает под вакуумом, а в друк-фильтре процесс фильтрации осуществляется под давлением.

Кроме того, для отделения нативного раствора от биомассы также применяют способ центрифугирования. Хорошие результаты получают в том случае, если при правильном подборе скорости подачи жидкости скорость вращения центрифуги достигает 15 000 об./мин. Отделять мицелий или другие взвешенные частицы также можно в сепараторах. При скорости вращения барабана сепаратора 7000–7500 об./мин., благодаря центробежной силе твердые частицы устремляются к стенкам барабана, осаждаются на них, а отсепарированная жидкость стремится к центру барабана и поднимается вверх в специальную камеру.

Цель химической очистки является выделение антибиотика из нативной жидкости или из клеток продуцента, его концентрация и высвобождение (собственно очистка) от сопутствующих примесей и, в конечном счете, получение высокоочищенного лекарственного препарата, соответствующего требованиям нормативно-технической документации.

В ряде случаев антибиотики под влиянием жестких условий внешней среды (повышенная температура, высокая кислотность или щелочность и

т.п.) утрачивают свои свойства, инактивируются. В связи с этим, при их выделении и очистке необходимо соблюдать определенные правила. В частности, полиеновые макролидные антибиотики содержат ряд лабильных к внешним воздействиям группировок: сопряженные двойные связи, аминсахара, макролактонное кольцо. Все это обуславливает их нестабильность в процессе выделения и очистки.

При этом нестабильность данных антибиотиков, как правило, связана с их термоокислительной инактивацией. Причем начальная стадия инактивации связана с образованием на стадии выделения и очистки свободных радикалов, пероксидов и некоторых других соединений. В этой связи, применение антиоксидантов способствует стабилизации полиеновых структур при их экстракции из мицелия.

Различают несколько основных методов очистки антибиотиков.

Метод экстракции. Нередко для очистки антибиотика от различных примесей его многократно переводят из одного растворителя в другой с предварительным осаждением (кристаллизацией). Такой прием носит название перекристаллизации.

Ионообменная сорбция. Водные растворы антибиотиков, являющихся по своей химической природе кислотами, основаниями или амфотерными соединениями, пропускают через колонки с соответствующими ионообменными смолами, на которых они сорбируются. При этом раствор с частью примесей, имеющих заряд, противоположный заряду антибиотика, проходит через колонку. Ионообменные смолы в зависимости от положительного или отрицательного заряда их ионов называют катионитами или анионитами. В данном случае антибиотик (как отрицательно заряженный ион) будет сорбироваться на катионитной смоле, и наоборот. Антибиотик, адсорбированный на смоле, элюируют (десорбируют), в результате чего получают очищенный и концентрированный препарат. Затем раствор данного препарата можно повторно пропустить через ионообменную смолу, но имеющую противоположный заряд. При этом на смоле адсорбируются примеси, а раствор очищенного антибиотика пройдет через колонку.

Метод осаждения. Антибиотик связывают с органическими или неорганическими веществами для получения соединения, выпадающего в осадок, который с помощью фильтров или путем центрифугирования отделяют от нативного раствора, промывают и в ряде случаев высушивают. При этом образовавшееся соединение растворяют, а антибиотик экстрагируют или вновь осаждают (кристаллизуют).

Одной из стадий химической очистки антибиотиков является концентрирование полученных растворов. Это достигается за счет отгонки большей части растворителя, как правило, в высоком вакууме.

Применяемые методы выделения и химической очистки, а также качество оборудования и используемых реактивов имеют большое значение, прежде всего, для улучшения качества получаемого антибиотика и увеличения его выхода.

Сушка, контроль и расфасовка препарата

После выделения и химической очистки антибиотика его необходимо высушить, т.е. удалить из полученного препарата свободную и связанную влагу. Поскольку большинство антибиотиков являются термолабильными соединениями, то для их обезвоживания применяют методы, не приводящие к потере биологической активности, не изменяющие цвета лекарственного препарата.

При промышленном производстве антибиотиков используют различные методы сушки.

Лиофильная сушка антибиотиков является одним из наиболее распространенных методов их обезвоживания. Данный вид сушки реализуется при сравнительно низких температурах (от -8 до -12 °С).

Обезвоживание полученных препаратов антибиотиков с применением распылительной сушилки является одним из прогрессивных методов при работе с большими их количествами. В данном случае раствор антибиотика пневматически распыляется до мельчайших капель в камере с потоком нагретого воздуха. Процесс сушки препаратов антибиотиков занимает всего несколько секунд. При этом даже термолабильные препараты антибиотиков не изменяют свойств.

Сушка в псевдооживленном слое или сушка в вакуум-сушильных шкафах применяется для высушивания зернистых и пастообразных препаратов антибиотиков.

Контроль готового продукта (лекарственного препарата антибиотиков)

Готовый лекарственный препарат антибиотика подвергают биологическому и фармакологическому контролю.

При биологическом контроле основной задачей является оценка стерильности готового лекарственного препарата антибиотика. Такая оценка, как правило, осуществляется с применением двух основных методов.

При этом первый метод связан с инактивацией антибиотика и его высевом в соответствующую питательную среду. В частности, биологический контроль бензилпенициллина и полусинтетических лекарственных препаратов антибиотиков, полученных на его основе, осуществляется следующим образом: в пробирки, содержащие тиогликолевую среду, вносят фермент β -лактамазу в количестве, способном полностью инактивировать пенициллин. Пробирки с ферментом выдерживают в течение 2–3 сут. при температуре 37 °С для контроля его стерильности. Затем в них вносят раствор пенициллина. Пробирки разделяют на две группы: одну выдерживают при температуре 37 °С, а другую – при температуре 24 °С в течение 5 сут. При этом осуществляют ежедневное наблюдение за возможным развитием микроорганизмов.

Второй метод оценки стерильности полученных препаратов антибиотиков базируется на том, что для большинства данных соединений отсутствуют инактиваторы их биологической активности. В этой связи, выявляют устойчивые к исследуемым лекарственным препаратам формы микроорганизмов и

определяют возможное присутствие чувствительной к ним микрофлоры. С этой целью раствор антибиотиков пропускают через мембранные фильтры с диаметром пор не более 0,75 мкм.

Следует отметить, что стерильность готового лекарственного препарата антибиотика обеспечивается соблюдением асептических условий работы на всех стадиях процесса развития продуцента, выделения и очистки целевого продукта.

Фармакологический контроль. К лекарственным препаратам антибиотиков, применяющихся в медицинской практике, в соответствии с Государственной фармакопеей предъявляются очень строгие требования. Каждый новый лекарственный препарат антибиотика, прежде, чем он будет разрешен к применению в клинической практике, должен пройти всесторонние испытания на токсичность, пирогенность и другие свойства, жизненно важные для организма. Лекарственный препарат антибиотика исследуют с применением разных видов лабораторных животных в отношении его острой и хронической токсичности (влияние на кровь, центральную нервную систему, дыхание и т.д.). При этом следует учитывать, что показатели острой токсичности служат одним из критериев качества антибиотика. В этой связи, устанавливают максимально переносимую дозу (МПД) антибиотика, дозу, вызывающую гибель 50% подопытных животных (LD_{50}), а также летальную дозу (LD_{100}). Только после всестороннего и тщательного исследования лекарственного препарата антибиотика, он может быть рекомендован к применению в клинической практике.

Фасовка и упаковка являются завершающими этапами производства лекарственного препарата антибиотика. Расфасованный и упакованный лекарственный препарат антибиотика с указанием его биологической активности, даты выпуска и срока годности поступает в продажу.

Таким образом, обобщая многостадийный и многоступенчатый процесс биотехнологического производства лекарственного препарата антибиотика, следует отметить, что он включает в себя четыре основные стадии.

I стадия связана с получением соответствующего штамма – продуцента антибиотика, пригодного для промышленного биотехнологического производства данного лекарственного препарата;

II стадия связана с процессом биосинтеза целевого продукта – антибиотика;

III стадия связана с выделением и химической очисткой препарата антибиотика, полученного в процессе биосинтеза;

IV стадия включает операции, связанные с концентрированием антибиотика, его стабилизацией и получением готового продукта - высокоочищенного лекарственного препарата.

Следует отметить, что на всех стадиях промышленного биотехнологического производства антибиотика должны соблюдаться требования технологического регламента. Кроме того, все технологические процессы при био-

технологическом производстве антибиотиков должны осуществляться в строго асептических условиях.

Строгое соблюдение параметров и условий реализации технологического процесса на II стадии биотехнологического производства антибиотиков обеспечивает возможность максимального биосинтеза антибиотика и, соответственно высокий выход целевого продукта.

Кроме того, особое внимание должно быть уделено III стадии биотехнологического производства антибиотика, связанной с выделением и химической очисткой целевого продукта. При нарушении технологической дисциплины, использовании не соответствующего (неадекватного) тем или иным технологическим операциям оборудования или в случае его неисправности происходят большие потери антибиотика, которые связаны с значительным экономическим уроном для биотехнологического предприятия.

Анализируя схему биотехнологического производства антибиотиков, следует отметить, что все четыре основные технологические стадии сохранились с конца 40-х гг. XX в., времени начала разработки и создания промышленного биотехнологического производства этих БАВ, до настоящего времени.

Безусловно, на всех этапах биотехнологического производства антибиотиков введены технологические операции и процессы, соответствующие современным достижениям научно-технического прогресса. В частности, существенно дополнена I стадия производства, связанная с получением высокопродуктивных штаммов – продуцентов антибиотиков. Хотя метод индуцированного мутагенеза со ступенчатым отбором, начиная с 50-х гг. XX в и до настоящего времени, остается основным методом повышения антибиотической активности промышленных штаммов микроорганизмов, но в современных условиях, благодаря успехам молекулярной биологии для этих целей стали активнее использоваться и другие методы, в том числе метод слияния протопластов, а также метод конструирования микроорганизмов с помощью генно-инженерных манипуляций.

Многие параметры процесса культивирования микроорганизмов – продуцентов антибиотиков в ферментерах больших объемов контролируются автоматически с выводом показателей на компьютеры.