МИНОБРНАУКИ РОССИИ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
“ВОРОНЕЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ”

БИОТЕХНОЛОГИЯ
(Часть 1)
Микробная биотехнология
Химическая энзимология

Учебное пособие

Составители:
Т.А. Ковалева,
А.И. Сливкин,
А.С. Беленова
С.Н. Суслина

Издательско-полиграфический центр
Воронежского государственного университета
2011

Утверждено научно-методическим советом фармацевтического факультета
30 мая 2011 г., протокол 3

Рецензент д-р биол. наук, доцент М.Ю. Грабович

В данном учебном пособии излагаются основные этапы становления и развития фармацевтической биотехнологии, методы хранения продуцентов лекарственных препаратов и БАД на фармацевтических предприятиях, основные принципы технологии антибиотиков. Кроме того, рассмотрены вопросы основных достижений микробной биотехнологии и Инженерной энзимологии. В конце каждой главы и некоторых наиболее сложных параграфов предложены вопросы для обсуждения, а также тесты для контроля усвоения учебного материала.

Учебное пособие подготовлено на кафедре фармацевтической химии и фармацевтической технологии фармацевтического факультета Воронежского государственного университета. Рекомендовано для студентов 6 курса заочной формы обучения по специальности «Фармация».

СОДЕРЖАНИЕ

1. Биотехнология. Определение. История развития.
Основные разделы биотехнологии 4
Вопросы для самоконтроля 4
2. Общая характеристика продуцентов лекарственных препаратов и биологически активных веществ 18
Вопросы для самоконтроля 28
3. Слагаемые биотехнологического процесса производства лекарственных средств. Методы культивирования лекарственных препаратов и биологически активных добавок 28
Вопросы для самоконтроля 36
4. Получение посевного материала, выделение, концентрирование, очистка, стандартизация, сушка и контроль фармацевтической продукции 37
Вопросы для самоконтроля 49
5. Антибиотики. Классификация. Получение антибиотиков. Биологические методы анализа антибиотиков 49
Вопросы для самоконтроля 67
6. Инженерная энзимология. Общая характеристика. Иммобилизованные ферменты 68
Вопросы для самоконтроля 71
7. Применение гетерогенных биокатализаторов в промышленной технологии 72
Вопросы для самоконтроля 77
Тестовые задания 77
Контрольно-измерительные материалы 83
Список литературы 85

1. Биотехнология. Определение. История развития. Основные разделы биотехнологии.

В середине 60-х годов в литературе широко обсуждалась проблема возникновения «новой биологии», которая представляла собой развитие прикладных исследований, способствовавших коренному улучшению технологии получения химических и фармацевтических веществ. Это стало реальностью благодаря открытиям в биохимии, генетике, молекулярной биологии и химической технологии, и основывалось на расшифровке первичной структуры ферментов, их использовании в иммобилизованной форме в качестве биокатализаторов, открытии способов модификации ДНК, изучении плазмид и ферментов рестрикции.

Таким образом, в середине 70-х годов появился термин «биотехнология», который сразу же заполнил страницы академических и популярных изданий.

Биотехнологию относят к числу приоритетных наук, где можно прогнозировать более быстрые и важнейшие достижения для социально-экономического прогресса общества. В биотехнологических производствах используются микроорганизмы, полученные путем индуцированного мутагенеза для получения белковых препаратов, аминокислот, вакцин, моноклональных антител. Применение новых подходов в производстве фармацевтической продукции позволило значительно удешевить себестоимость медицинских препаратов, получить новые уникальные лекарственные средства и одновременно разрешило проблемы утилизации отходов пищевой, деревообрабатывающей и нефтехимической промышленности. В настоящее время более 50 лекарственных веществ – это объект биотехнологических разработок: тромболитические агенты, дисмутазы, предупреждающие клеточные повреждения, эритропоэтин, стимулирующий эритропоэз, эпидермальный ростовой фактор, применяемый для заживления ран, моноклональные антитела для трансплантации костного мозга, лечения сепсиса и ряда других патологических состояний

Важнейшим достижением биотехнологии является применение в клинической практике фармацевтических препаратов, полученных с помощью генетической инженерии: гормона роста человека (2 варианта), α-интерферона, активатора тканевого плазминогена для лечения тромбозов коронарных сосудов, вакцины против гепатита Б, фактора VIII для лечения гемофилии, мышиных моноклональных антител для предупреждения отторжения почечных трансплантантов.

По оценкам экспертов в ближайшие годы биотехнология обеспечит прирост сельскохозяйственной продукции на 15-20%. Биосистемы для получения энергии смогут обеспечить 10-15% необходимого производства энергии в таких странах, как Китай, США, Канада, Индия, Филиппины.

Термин биотехнология впервые был применен в 1917 г инженером

Карлом Эреки для описания процесса крупномасштабного выращивания свиней с использованием в качестве корма сахарной свеклы.

По определению К.Эреки биотехнология – это все виды работ, при которых из сырьевых материалов с помощью живых организмов производятся те или иные продукты. Однако это довольно точное определение не получило широкого распространения.

В литературе нет единого мнения относительно определения биотехнологии как науки. М.Е. Беккер (1979) в книге «Биотехнология микробного синтеза» определяет биотехнологию как раздел науки о получении продуктов биосинтеза. По мнению А. Хастинга (1980) «Биотехнология – это промышленное получение продуктов (пива, уксуса, сыра) с использованием биохимических процессов.

В 1980 году Европейская федерация по биотехнологии дала следующее определение. Биотехнология – это приложение биологических систем или процессов к промышленности.

Эти определения в основном верные, но круг наук, практические результаты которых воплощаются в биотехнологии значительно шире.

В 1983 году на конгрессе социалистических стран по биотехнологии в Братиславе было принято следующее определение: «биотехнология – это наука, разрабатывающая научные основы крупнотоннажной реализации процессов получения с помощью биокатализаторов, различных веществ и средств защиты окружающей среды».

Академик Баев А.А. (1984) определяет биотехнологию как науку о применении биологических процессов и систем в производстве. Академик Ю.А. Овчинников считает, что биотехнология – это комплексная, многопрофильная область научно-технического прогресса, включающая микробиологический синтез в его широком понимании, генетическую и клеточную инженерию, инженерную энзимологию.

Анализ существующих определений позволяет сделать заключение, что определение, данное в конце 70-ых годов, в основном, верно. Термин биотехнология имеет два значения: с одной стороны – это наука о применении биотехнологических процессов в производстве, с другой – это комплексное научно-техническое направление, изучающее эти процессы.

Человечество использовало биотехнологические приемы многие тысячи лет (хлебопечение, виноделие, сыроварение, силосование кормов). Люди пользовались одноклеточными организмами давно, даже не подозревая об их существовании (за 6 тыс. лет до н.э.). Биотехнология возникла в процессе развития технологической микробиологии на базе традиционных микробиологических производств.

Биотехнология формировалась и эволюционировала по мере формирования и развития человеческого общества. Ее возникновение, становление и развитие условно можно подразделить на 4 периода: эмпирический, этиологический, биотехнический и генотехнический.

В эмпирическом периоде развития биотехнологии были распространены

способы получения квашеной капусты, медовых алкогольных напитков, мыла из жиров, силосование кормов, мочка лубоволокнистых растений.

Искусство ферментации, химическое превращения органических соединений с помощью ферментов, известно очень давно. Способность дрожжей вырабатывать спирт в виде пива использовалась шумерами и вавилонянами еще до шестого тысячелетия до н.э. Около 4000 г. до н. э. египтяне обнаружили, что пивные дрожжи благодаря образуемой ими двуокиси углерода, разрыхляют тесто при выпечке хлеба.

К XIV веку во многих странах мира уже широко применяли перегонку спирта из сброженного зерна. К другим процессам ферментации, уходящим корнями в древние времена, относится культивирование уксуснокислых бактерий для получения уксуса, молочнокислых бактерий для сохранения молока, различных бактерий и плесеней для производства сыра.

Таким образом, при помощи микроорганизмов получали пищевые продукты и напитки на протяжении более чем 8 тысяч лет, до того как об их существовании стало известно в XVII веке. Датчанин Антон ван Левенгук, исследуя с помощью простых линз воду, различные пищевые остатки, обнаружил в них крошечные движущиеся организмы, которые он назвал «анималькули».

Этиологический, период охватывает вторую половину XIX века и связан с выдающимися исследованиями Л. Пастера (1822-1895 гг.), основоположника научной микробиологии и ряда микробиологических дисциплин (промышленной, медицинской, химической). Л. Пастер открыл микробную природу брожений, доказал возможность жизни в бескислородных условиях, создал научные основы вакцинопрофилактики и вакцинотерапии, предложил метод стерилизации. На основе его учений Э. Бюхнер в 1887 г. открыл бесклеточный метаболизм.

В ряду открытий всемирного значения стоит обнаружение в 1892 г. вируса мозаичной болезни табака Д.И. Ивановским (1864-1920). Последовавшие за этим открытие других вирусов обеспечили становление новой научной дисциплины – вирусологии.

В 1928 г. А. Флеминг заметил, что плесневый гриб Penicillum notatum, случайно попавший в культуральные чашки, убил культуру бактерий Staphyllococcus aureus. Выделив бесклеточную жидкость из культуры, он обнаружил, что она может подавлять развитие многих бактерий. Флеминг назвал активный компонент жидкости пенициллином. В 1937 г. М. Велиш описал первый антибиотик, выделенный из стрептомицетов – актиномицетин. Работы по поиску новых антибиотических веществ, эффективных при лечении бактериальных, вирусных и раковых заболеваний, протозойных и паразитических болезний, активно развивались.

В 1933 году А. Клюйвер и Л. Перкин опубликовали работу «Методы изучения обмена веществ у плесневых грибов», в которой изложили основные технические приемы, а также подходы к оценке и интерпретации получаемых результатов при глубинном культивировании грибов. С этого

времени начинается третий период в развитии биотехнологии – биотехнический, связанный с внедрением в биотехнологию крупномасштабного герметизированного оборудования, обеспечившего проведение процессов в стерильных условиях. Особенно мощный толчок в развитии промышленного биотехнологического оборудования был отмечен в период становления и развития производства антибиотиков.

Особую роль в формировании биотехнологии в данный период имели исследования Э. Мишера (1869 г.), открывшего нуклеиновые кислоты, Г. Хаберланда (1902 г.), впервые продемонстрировавщего возможность длительного культивирования различных растительных тканей на питательной среде, Г.А. Надсона и Г.С. Филиппова (1925 г.), разработавших основы получения мутантов дрожжевых клеток с помощью ионизирующей радиации. Примерно за 40 лет третьего периода развития биотехнологии были разрешены задачи по конструированию биореакторов, стерилизационного оборудования, систем концентрирования и очистки фармацевтической продукции, полученной с помощью нетрадиционных технологий.

Четвертый период развития биотехнологии – генотехнический – начался в 1972 г., когда П. Берг с сотрудниками создали первую рекомбинантную молекулу ДНК. Особое значение для биотехнологии в это время имели исследования в области молекулярной биологии, изучение структуры и функций нуклеиновых кислот и белков, выделение и изучение механизма действия ферментов, осуществляющих гидролиз и синтез нуклеиновых кислот in vivo.

К основным достижениям, которые определили развитие генетической инженерии можно отнести следующие:

1. Доказательства ДНК как носителя генетической информации О. Эйвери 1944 г. и открытия в 1953 г. Дж. Уотсоном и Ф. Криком структуры ДНК.

2. Экспериментальное подтверждение универсальности генетического кода.

3. Интенсивное развитие молекулярной генетики, объектами которой стали бактерии *Esherichia coli*, а также вирусы и плазмидные ДНК.

4. Разработка методов выделения и очистки неповрежденных ДНК вирусов и плазмид, а также методов введения в клетки реципиента рекомбинантных ДНК, конструируемых in vitro, обеспечивающих репликацию и экспрессию кодируемых ими генов.

Для генотехнического периода характерны:

1. Использование генетической и клеточной инженерии для получения новых продуцентов; 2. Получение моноклональных антител, гибридов и изолированных протопластов; трансплантация эмбрионов; 3. Разработка и внедрение экологически чистых и безотходных технологий; 4. Автоматизация и компьютеризация промышленного производства биотехнологической продукции.

Биотехнология открыла перспективы создания принципиально новых продуцентов биологически активных веществ, а также животных и растений, несущих функционально активные чужеродные гены.

В настоящее время появилась возможность искусственно создавать гены, кодирующие химерные полипептиды, обладающие свойствами двух или более природных белков.

Развитие биотехнологии революционизировало биологическую науку и дало мощный толчок созданию новых и совершенствованию существующих технологических процессов получения биологически активных веществ и лекарственных препаратов путем селекции высокопродуктивных штаммов, а также разработки наиболее эффективных способов выделения, очистки и стабилизации фармацевтической продукции.

Современная биотехнология имеет 3 раздела: микробная биотехнология, генетическая и клеточная инженерия, инженерная энзимология.

Микробная биотехнология – это раздел биотехнологии, изучающий промышленное получение веществ с помощью микроорганизмов.

Развитие микробной биотехнологии началось ранее, чем других разделов (генетической и клеточной инженерии и инженерной энзимологии). Этому способствовало в течение тысячелетий применение метода микробиологической ферментации для получения пищевых продуктов (уксуса, хлеба, сыра). Первые микробиологические производства появились в начале XX века – это производство органических растворителей (метанола, этанола, бутанола и изопропанола).

Важным этапом было широкое промышленное производство антибиотиков после Второй мировой войны.

Период с 1940 по 1960 год XX в. называют эрой антибиотиков или фармацевтическим периодом развития биотехнологии. В 60-70-е годы развивается «метаболическая инженерия» - получение с помощью микроорганизмов аминокислот, бактериальных полисахаридов, ферментов, белка, одноклеточных.

Промышленный биосинтетический процесс, в котором для производства коммерческой продукции используются микроорганизмы, состоит из 3 этапов:

1. Исходная обработка сырья, чтобы его можно было использовать в качестве питательных веществ для микроорганизмов-продуцентов.
2. Ферментация и биотрансформация: рост микроорганизмов в биореакторе (более 100 л) с последующим образованием нужного метаболита (антибиотиков, ферментов, гормонов).
3. Конечная обработка: очистка продукта от компонентов культуральной жидкости или от клеточной массы.

Все препараты, получаемые в микробиологическом производстве, делятся на 3 основные группы:

1. Биопрепараты, имеющие в товарном продукте в качестве основного активного компонента жизнеспособные микроорганизмы (средства защиты

растений, бактериальные удобрения, закваски для силосования кормов).

2. Биопрепараты, в состав которых входит инактивированная биомасса (кормовые дрожжи, грибной мицелий).

3. Биопрепараты, получаемые на основе очистки продуктов метаболизма микроорганизмов (витамины, аминокислоты, ферменты, антибиотики, полисахариды).

Продукты биотехнологической промышленности можно разделить на крупнотоннажные (этанол, дрожжи, органические кислоты) и малотоннажные медикаменты (аминокислоты, гормоны и другие продукты микробного синтеза).

Получение белковых веществ не является единственным направлением крупнотоннажной отрасли биотехнологии. Очень велика роль производства аминокислот кормового, пищевого и медицинского назначения, различного ряда ферментных препаратов для медицины и ветеринарии, биологических удобрений, средств защиты растений, витаминов.

Микробная биотехнология связана с геологической микробиологией. В этой связи возникла новая область биотехнологии – биогеотехнология.

Биогеотехнология – это приложение биотехнологических приемов и методов к добыче, обогащению и переработке руд, отделению и концентрированию металлов из сточных вод как вторичного сырья, экстракции остаточных порций нефти из иссекающих месторождений. Биогеотехнология основана на применении смешанных культур микроорганизмов (ассоциаций).

Методы биогеотехнологии используются для извлечения широкого круга ценных металлов: Cu, U, Mn, Au, Ag, Pt, Zn, Ni, Sn, Cd и др.

Биотехнология получения металлов основана на способности некоторых микроорганизмов переводить металлы в растворимые соединения (выщелачивание металлов из руд). Так, *Thiobacillus ferrooxidans* выщелачивает железо, цинк, медь и другие металлы с помощью окисления серной кислоты, которую образуют эти организмы из сульфида. *Chromobacterium* способна растворять золото при обработке отходов золотодобывающих преприятий. Получены штаммы *Pseudomonas* для удаления серы из угля. Таким путем может быть решена важнейшая экологическая проблема: при сгорании уголь очень сильно загрязняет окружающую среду серой. Для извлечения металлов из сточных вод перспективно использовать штаммы *Citobacter*, способные накапливать уран, медь, кобальт. Бактерии рода *Nocardia* используют для эмульгирования и сорбции углеводородов нефти из водной среды. Они способны очищать источники воды от примесей нефти. Таким образом, мы видим, что микробная биотехнология наряду с решением чисто производственных задач включается в решение и экологических проблем. Именно с ней связаны надежды, что удастся создать экологически чистые и экономически высокоэффективные фармацевтические производства, которые придут в XXI веке на смену нынешним.

Генетическая инженерия изучает способы конструирования in vitro (в пробирке) функционально активных генетических структур. В ее основе лежит перенос единиц наследственности (генов) из одного организма в другой с целью создания нового продукта или получения уже известного вещества в промышленных масштабах. С развитием генетической инженерии появилась возможность не просто отбирать высокопродуктивные штаммы, но и использовать микроорганизмы и эукариотические клетки как биологические фабрики для производства ряда низкомолекулярных веществ и макромолекул, которые в естественных условиях (в клетке) синтезируются в минимальных количествах (инсулин, интерферон, гормоны роста, вирусные антигены и ряд других белков). Живые организмы становятся естественными биореакторами, продуцирующми новые или измененные генные продукты, которые никогда не могли бы быть созданы методами мутагенеза и селекции. Поэтому биотехнология способствует развитию принципиально новых методов диагностики и лечения различных заболеваний.

В нашей литературе употребляют как синонимы два термина: «генетическая инженерия» и «генная инженерия». Генная инженерия короче, произносится легче, включает только манипуляции генов. Генетическая инженерия точнее выражает суть дела, и сюда можно включить все виды работ, связанных с изменением генетических программ.

Датой рождения генетической инженерии следует считать 1972 год, когда была создана первая рекомбинантная ДНК. Генетическая инженерия связана с молекулярной генетикой, но становление ее зависело от химической энзимологии и химии нуклеиновых кислот. В нашей стране исследователи включились в разработку генноинженерных методов в 1972 году, с 1970 года в нашей стране ведутся исследования по селекции культур для промышленных целей.

Различают три уровня генетической инженерии: 1. Генный – прямое манипулирование рекомбинантными ДНК; 2. Хромосомный – манипуляция с большими группами генов или хромосомами; 3. Геномный – перенос всего или большей части генетического материала из одной клетки в другую. Современная генетическая инженерия – это первый уровень, т.е. технология рекомбинантных ДНК. Геномная инженерия соответствует по существу клеточной инженерии.

Работы в области генетической инженерии включают 4 основных этапа:

1. Получение гена; 2; Встраивание в генетический элемент (вектор), способный к репликации; 3. Введение гена, входящего в состав вектора, в организм-реципиент; 4. Идентификация клеток, которые приобрели желаемый ген. Инструментом молекулярного манипулирования являются два типа ферментов: Рестриктазы – это эндонуклеазы, разрывающие связи в определенных участках ДНК; Лигазы – сшивающие фрагменты гена.

На стыке технологии рекомбинантных ДНК и биотехнологии возникла новая область – молекулярная биотехнология. Фрагментами этой дисциплины являются промышленная микробиология, молекулярная

биология, генетика бактерий, энзимология, химия нуклеиновых кислот.

Конечной целью любого биотехнологического проекта является создание конечного продукта. Поэтому молекулярная биотехнология связана с экономикой. В период 1980-1983 гг. в США было создано около 200 биотехнологических компаний, причем вице-президентами их часто были ученые, открывшие метод клонирования гена. Сегодня в США работают более 1500 биотехнологических фирм, а во всем мире их более 3000. Большой вклад в развитие молекулярной биотехнологии внесли крупные химические и биотехнологические компании.

Молекулярная медицина выявляет предрасположенность человека к различным болезням, и возникла она благодаря молекулярной биотехнологии. Отличительная черта молекулярной медицины – лечение заболеваний (как наследственной, так и ненаследственной природы) проводится на генном уровне. В качестве лекарственного препарата выступают гены (точнее специальные генетические конструкции). Генная терапия не только устраняет определенные симптомы заболевания, а корректирует функции клеток и организма в целом. Ее терапевтический эффект может достигаться различными путями: замена «больного» гена на «здоровый», направленная коррекция фигуры и, соответственно, функции «больного» гена, частичное или полное подавление «больного» гена.

И, наконец, еще один важный принцип молекулярной медицины: любое медикаментозное лечение должно подбираться строго индивидуально, учитывая особенности генома больного. Этим занимается недавно возникшая наука – фармакогенетика.

Уже сегодня практическое применение молекулярной медицины весьма разнообразно. Это – и молекулярная диагностика наследственных заболеваний на любой стадии развития организма, в том числе и до рождения (пренатальная диагностика), и определение генов предрасположенности к некоторым распространенным болезням, и геномная «дактилоскопия» – точная идентификация личности на основе особенностей структуры его генома (именно этот метод был с успехом применен при генетическом анализе останков царской семьи).

В геноме человека насчитывается 35-50 тысяч различных генов, изменения в некоторых из них приводят к нескольким тысячам наследственных болезней. Гены практически всех наиболее частых (около 320) и сравнительно редких (около 170) наследственных болезней уже известны. Методы их обнаружения достаточно просты и универсальны и поэтому широко применяются в медицине.

Сейчас у нас в стране можно определить около 40 наиболее тяжелых наследственных болезней. Молекулярная диагностика генов наследственных болезней проводится в НИИ акушерства и гинекологии в Санкт-Петербурге, в Научном центре медецинской генетики и Институте неврологии РАМН в Москве, в Институте биохимии и генетики научного центра РАН в Уфе, в Институте медицинской генетики в Томске и в Медико-генетическом центре

в Новосибирске.

Методы молекулярной диагностики позволяют выявить не только гены наследственных болезней, но и гены предрасположенности к тому или иному заболеванию. Гены предрасположенности – объект исследования многих научных групп по всей России. Так, в Санкт-Петербурге на кафедре медицинской генетики Педиатрической академии активно изучаются гены предрасположенности к тромбофлебии, варикозному расширению вен и ряду других заболеваний.

В настоящее время в мире около 400 проектов по генной терапии находятся на различных стадиях клинических испытаний: 261 из них проходит первую стадию (оценка токсичности), 133 – вторую (испытание на небольшой группе тяжелобольных пациентов) и только 3 проекта (два по лечению рака мозга и один по гемофилии) – на заключительной третьей стадии (масштабные клинические испытания). Пока генная терапия применяется в основном в онкологии (более 60% проектов). Примерно по 15% приходится на генную терапию инфекционных (СПИД, гепатит В, туберкулез) и моно генных заболеваний (муковисцидоз, семейная гиперхолестеринемия, мукополисахаридозы, гемофилия А и др.). Методы генной терапии позволяют лечить различные генетические патологии в период внутриутробного развития. Введенный ген или генная конструкция попадает во множество интенсивно делящихся клеток, предотвращая начало развития заболевания. После такой терапии нет необходимости искусственного прерывания беременности – ребенок рождается здоровым. Но, тем не менее, вопрос о ее целесообразности поднимается все чаще – теоретически существует опасность внедрения искусственных генных конструкций в геном половых клеток, что может привести к «засорению» генофонда.

Генная терапия успешно применяется для лечения не только наследственных, но и значительно более распространенных мультифакториальных болезней (диабет, остеопороз, ревматоидный артрит, различные опухоли). Для лечения таких заболеваний применяется не одна, а сразу много генетических конструкций, исправляющих дефекты различных стадий течения патологического процесса.

Научные работы в этой области ведутся и в России. В институте акушерства и гинекологии имени Д.О. Отта РАМН разрабатываются новые подходы к генной терапии таких тяжелых наследственных заболеваний, как мышечная дистрофия Дюшенна и муковисцидоз. Работы по генной терапии также проводятся в научных учреждениях Москвы (Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, Институт молекулярной генетики РАН, Институт медицинской химии РАМН, Научный центр медицинской генетики РАМН) и Новосибирска.

Молекулярная геномика уже применяется в Европе и Соединенных Штатах для решения разнообразных задач медицины и медицинской генетики. Например, в Великобритании созданы информационные центры, и

каждый, позвонивший туда, может получить консультацию по любым вопросам, касающимся своей наследственности и генетической предрасположенности к различным заболеваниям. Во Франции создана и используется на практике компьютерная экспертная система Сезам (SESAM – Systeme Expert Specialisee aux Analyses Medicales) для определения склонности человека к различным заболеваниям. Она включает собственно экспертную систему оценки риска возникновения заболевания, основанную на многочисленных лабораторных (иммунологических, биохимических, серологических и генетических) тестах (более 80), программу для обучения врачей основам молекулярной медицины, медицинское консультирование по результатам лабораторных тестов и популярный справочник для населения.

Клеточная инженерия – это метод конструирования клеток нового типа на основе их культивирования, гибридизации и реконструкции. Данный раздел биотехнологии начал свое развитие в 60-70-е годы XX в., хотя методы культивирования клеток были предложены в конце прошлого века. Новый этап развития биотехнологии связан в первую очередь с использованием растительных клеток. Клеточная инженерия основана на способности растений к неограниченному вегетативному размножению, т. е. к регенерации полноценного растения из черенка, а в условиях биотехнологических систем – из небольшой группы клеток или из одной клетки. При культивировании в питательных средах растительные клетки способны в одних условиях неограниченно наращивать биомассу, в других дифференцироваться, образуя вегетативные органы, формируя в пробирке миниатюрные растения. Таким образом, в неполевых, контролируемых условиях можно размножать наиболее ценные сорта растений или получать в контролируемых условиях фармацевтические препараты (убихинон-10-табак, ятрорризин-барбарис, шиконин). Благодаря биотехнологии традиционные методы гибридизации растений расширились и стали проводиться на клеточном уровне. С помощью новых методов клеточной инженерии теперь возможно слияние друг с другом клеток различных по систематическому положению растений, расширились границы спектра скрещиваемости.

Этапным периодом для развития клеточной инженерии можно считать разработку способов, получение изолированных протопластов растений, а также открытие гибридизации соматических клеток (искусственное объединение целых клеток с образованием гибридного генома). Реконструкция гена связана с созданием жизнеспособной клетки из отдельных фрагментов разных клеток (ядра, цитоплазмы, хромосом). Это служит для улучшения клеток продуцентов в культуре.

Гибриды, полученные при слиянии протопластов, имеют важные отличия от половых гибридов, поскольку несут цитоплазму обоих родителей. Возможно создание гибридов, наследующих ядерные гены одного из родителей наряду с цитоплазматическими генами обоих родителей. Особый интерес представляют гибриды растений, несущие цитоплазматические гены устойчивости к различным патогенам и стрессорным факторам от

дикорастущих видов или цитоплазматические гены мужской стерильности. Слияние протопластов используют также для получения гибридов с ценными в хозяйственном отношении свойствами между отдаленными видами, которые плохо или вообще не скрещиваются обычным путем. Удалось, например, «ресинтезировать» рапс, являющийся естественным амфидиплоидом между турнепсом и капустой, получить соматический гибрид картофеля с томатами и т.д. При слиянии протопластов создают и новые клеточные линии-продуценты биологически активных веществ.

Изменять свойства клеток можно, вводя клеточные органеллы (ядра, хлоропласты), изолированные из одних клеток, в протопласты других клеток. Так, одним из путей активизации фотосинтеза растительной клетки может служить введение в нее высокоэффективных хлоропластов. Искусственные ассоциации растительных клеток с микроорганизмами используют для моделирования на клеточном уровне природных симбиотических отношений, играющих важную роль в обеспечении растений азотным питанием в природных экосистемах. Рассматривается возможность придания растениям способности к фиксации молекулярного азота при введении в них целых клеток азотфиксирующих микроорганизмов. Реконструкцию клеток проводят также при слиянии клеточных фрагментов, безъядерных кариопластов с ядром, содержащим лишь часть генома интактной. В результате получают клетки с различными свойствами, например, цибриды, или клетки с ядром и цитоплазмой от разных родителей. Такие конструкции используют для изучения влияния цитоплазмы в регуляции активности ядра.

Выращиваемые на искусственных питательных средах клетки и ткани растений составляют основу разнообразных технологий в сельском хозяйстве. Одни из них направлены на получение идентичных исходной форме растений и клональное микроразмножение на основе меристемных культур, создание искусственных семян, криосохранение генофонда при глубоком замораживании меристем и клеток пыльцы. Клеточные технологии при создании растений, генетически отличных от исходных, путем или облегчения и ускорения традиционного селекционного процесса. В первом случае применяют искусственное оплодотворение, культуру незрелых гибридных семяпочек и зародышей, регенерацию растений из тканей летальных гибридов, гаплоидные растения, полученные при культивировании пыльников или микроспор, во втором - формы растений создаются на основе мутантов, образующихся in vitro, и трансгенных растений. Таким путем получены растения, устойчивые к вирусам, гербицидам, способные синтезировать токсины, патогенные для насекомых-вредителей, а также растения с чужеродными генами, контролирующими синтез белков, определяющих морозоустойчивость и белков с улучшенным аминокислотным составом, растения с измененным балансом фитогормонов и др.

Важную роль в животноводстве сыграла разработка методов длительного хранения спермы в замороженном состоянии и искусственного

осеменения. Реально же развернулись исследования по клеточной инженерии на млекопитающих только с освоением техники оплодотворения in vitro, обеспечившей получение зародышей на ранних стадиях развития. Генетическое улучшение животных связано с разработкой технологии трансплантации эмбрионов и методов микроманипуляций с ними (получение однояйцевых близнецов, межвидовые пересадки эмбрионов и получение химерных животных, клонирование животных при пересадке ядер эмбриональных клеток в энуклеированные, т.е. с удаленным ядром яйцеклетки). В 1996 г. шотландским ученым из Эдинбурга впервые удалось получить овцу из энуклеированной яйцеклетки, в которую было пересажено ядро соматической клетки (вымени) взрослого животного. Эта работа открывает широкие перспективы в области клонирования животных и принципиальную возможность клонирования в будущем и человека. В этой же лаборатории было получено еще пять клонированных ягнят, в геном одного из которых был встроен ген белка человека.

Клеточная инженерия позволяет конструировать клетки нового типа с помощью мутационного процесса гибридизации, и более того, комбинировать отдельные фрагменты разных клеток, клетки различных видов, относящиеся не только к разным родам, семействам, но и царствам. Это облегчает решение разных теоретических проблем и имеет практическое значение. Клеточная инженерия широко используется в селекции растений. Выведены гибриды томата и картофеля, яблони и вишни. Регенерированные из таких клеток растения с измененной наследственностью позволяют синтезировать новые формы, сорта, обладающие полезными свойствами и устойчивые неблагоприятным условиям и болезням. Этот метод широко используется для «спасения» ценных сортов, пораженных вирусными болезнями.

Этим путем созданы межвидовые гибриды табака, картофеля, капусты с турнепсом и других растений. Приведем наиболее интересные гибриды, полученные в результате слияния клеток. В США получен гибридный сорт помидоров, устойчивых к вирусам (PRLV и PYV) в результате слияния протопластов дикого вида *Solinum brevidens* и коммерческого *Solinum tuberosum*.

Инженерная энзимология объединяет целый ряд областей современного естествознания: химическую энзимологию, биохимию, химическую технологию. Инженерная энзимология занимается созданием биотехнологических процессов, в которых используется каталитическое действие ферментов, выделенных из биосистем. Промышленное применение ферментов, синтезированных микроорганизмами, было начато в 90-е годы XIX века. Высокая специфичность ферментативного катализа обеспечивает больший выход целевого продукта, заметно удешевляет технологические процессы, а также позволяет перейти на практически безотходные технологии, не загрязняющие окружающую среду. Эффективность ферментативных процессов, используемых в различных областях

человеческой деятельности (медицина, пищевая промышленность, энергетика, микроэлектроника) удалось увеличить с помощью иммобилизованных ферментов, связанных с нерастворимыми носителями.

Препаративное получение ферментов в промышленных масштабах позволит существенным образом изменить технологические процессы получения лекарств, методы анализа, а также внедрить в промышленность принципиально новые технологии. В отличие от многих технологических процессов в химической технологии, требующих высоких давлений и температур, реакции, катализируемые ферментами, происходят при температурах, не превышающих 60-70ºС, нормальном атмосферном давлении и pH 4,5-9,0. Ферменты субстратно специфичны и это создает возможность осуществлять необходимые химические преобразования одного вещества, не затрагивая другие составные части обрабатываемого материала. Поэтому при биотехнологическом производстве фармацевтической продукции не возникает побочных соединений и применение ферментов лежит в основе экологически чистых промышленных технологий.

В настоящее время описано более 3000 ферментов. Около пятидесяти из них будут иметь в ближайшее время прикладное значение. В современных технологических процессах наибольшее значение имеют гидролитические ферменты. Они осуществляют ферментативные реакции без кофакторов и коферментов. Во многих производствах гидролазы заменили процесс кислотного гидролиза на ферментативный, продукты которого содержат минимальное количество посторонних веществ и не требуют специальных методов очистки. К этому ряду ферментов относятся амилазы и глюкоамилазы, целлюлазы, β-галактозидаза, расщепляющая лактозу на глюкозу и галактозу.

Иммобилизованные ферменты можно применять многократно в непрерывном технологическом режиме.

Кроме иммобилизованных ферментов находят применение иммобилизованные микробные клетки. В жизнеспособных клетках ферменты более стабильны, чем в препаратах, они представляют собой целые полиферментные системы.

Одним из ведущих направлений фармацевтической индустрии, имеющим уже сегодня реальные достижения, является ферментативный синтез аминокислот, пептидов, нуклеотидов. В этих процессах, как правило, используют доступные метаболические предшественники. Например, при синтезе L-аспарагиновой кислоты таким веществом является фумаровая кислота, реакция осуществляется аспартазой. Для получения L-лизина источником служит отход химической промышленности DL-α-амино-ε-капролактам.

Переворот в технологическом процессе получения полусинтетических пенициллинов произошел после выделения и иммобилизации пенициллинамидазы. Применение этого фермента позволило сначала получить 6-аминопенициллановую кислоту. Благодаря специфичности

фермента обеспечивается высокая точность при гидролизе. Многие ферменты используются для анализа фармацевтических препаратов.

Пируваткиназа применяется для определения глицерина и фосфосодержащих метаболитов, глутаматдекарбоксилаза – для определения глутаминовой кислоты; содержание ионов аммония определяют с помощью L-глутаматдегидрогеназы. Для диагностических целей в медицине выпускают готовые препараты.

В настоящее время лидерами в области биотехнологии являются США – около 1000 биотехнологических фирм, Япония – 300, Западная Европа – 800. В этих странах биотехнология и ее развитие поставлены на уровень государственной политики, а фундаментальные исследования в этой области отнесены к разряду приоритетных и хорошо финансируются правительствами этих стран.

Из научных учреждений России ведущее место в развитии биотехнологии занимает институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН (ИБФМ). Существенный вклад в решение биотехнологических проблем внесли коллективы ВНИИ «Синтез-белок», ВНИИ биотехнологии, ВНИИА, Сибирское отделение РАН, институт молекулярной биологии РАН, институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов и др.

В России давно и хорошо известны предприятия, выпускающие биотехнологическую продукцию – антибиотики, ферменты, различные дрожжи и кормовые белки и т. д. Это же можно сказать и о предприятиях в странах СНГ. В Башкортостане примерами таких производств являются НПО «Иммунопрепарат» (г. Уфа), ББХК (г. Благовещенск) и др.

С развитием биотехнологии связаны самые большие надежды человечества:

1. Возможность точной диагностики ряда инфекционных и генетических заболеваний.
2. Значительное повышение урожайности сельскохозяйственных культур путем создания новых сортов, устойчивых к вредителям, грибковым и вирусным инфекциям и вредным воздействиям среды.
3. Создание микроорганизмов, продуцирующих различные химические соединения, антибиотики, полимеры, ферменты, аминокислоты.
4. Создание пород сельскохозяйственных животных с улучшенными наследуемыми признаками.
5. Переработка отходов промышленности и сельского хозяйства.

Но эта новая отрасль науки привела и к развитию дискуссии по следующим вопросам:

1. Не будут ли организмы, полученные методами генетической инженерии оказывать вредное воздействие на другие живые организмы или на окружающую среду?
2. Не приведет ли создание и распространение генетически модифицированных организмов к уменьшению природного генетического разнообразия?

3. Правомочно ли, используя генно-инженерные методы, изменять генетическую природу человека?

4. Следует ли патентовать животных, полученных генно-инженерными методами?

5. Не нанесет ли биотехнология вред традиционному сельскому хозяйству?

Эти и многие другие вопросы рассматривают правительственные комиссии, активно обсуждают на конференциях и в научных публикациях ученые.

Вопросы для самоконтроля

1. Биотехнология как наука.
2. Основные периоды развития биотехнологии.
3. Перечислите ключевые научные открытия, послужившие толчком для развития биотехнологии.
4. Основные этапы развития микробной биотехнологии
5. Генетическая и клеточная инженерия как ключевой этап развития биотехнологии
6. История формирования и развития инженерной энзимологии.

2. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОДУЦЕНТОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ И БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Из громадного разнообразия (более 2 млн. видов) живых организмов нашей планеты в биотехнологии исследуются для применения в качестве продуцентов и используются непосредственно лишь сотая доля процента. Для обозначения продуцента так же, как и в других биологических дисциплинах, применяют бинарную номенклатуру, т.е. латинское название рода и вида, за которым указывают номер штамма, полученного путем селекции, например, *Aspergillus awamori* 16.

В настоящее время в биотехнологии в качестве продуцентов используются одноклеточные и многоклеточные организмы, построенные из клеток одного типа (бактерии, грибы, водоросли), а также клетки и ткани высших растений и животных. Объектами биотехнологии являются ферменты, нуклеиновые кислоты, простагландины, лектины, нейропептиды и различные БАВ (биологически активные вещества). В промышленной биотехнологии применяют 3 вида штаммов: 1) природные штаммы, улучшенные естественным и искусственным отбором (при производстве микробной биомассы); 2) штаммы, полученные в результате индуцированного мутагенеза; 3) генно-инженерные штаммы (обладают самой высокой генетической нестабильностью).

Промышленные штаммы должны удовлетворять следующим

требованиям:

1. Безвредность для потребителя и обслуживающего персонала.
2. Высокая скорость роста биомассы и целевого продукта (БАВ) при экономичном потреблении питательной среды.
3. Направленная биосинтетическая активность при минимальном образовании побочных продуктов.
4. Генетические однородность и стабильность в отношении к субстратам и условиям культивирования.
5. Отсутствие токсических веществ в целевом продукте и промышленных стоках.
6. Устойчивость к фагам и другой посторонней микрофлоре.
7. Способность расти на дешевых и доступных субстратах, отходах пищевой и химической промышленности при высокой плотности клеток.

Только по совокупности этих и других свойств можно оценить полезность и рентабельность продуцента. Наиболее изучены и чаще применяются в биотехнологии бактерии рода *Clostridium, Thermoanaerobacter, Bacillus, Acetobacter, Pseudomonas, Brefibacterium*. Охарактеризуем их особенности как продуцентов в биотехнологии.

Бактерии имеют очень высокую скорость размножения, их клетки делятся через 30-60 минут (некоторые виды через 8-10 минут). Они могут перерабатывать в сутки объем биомассы, превышающий массу клетки в 30-40 раз (масса 10^{-12} г, объем – 10^{-12} мл), и за 2-4 суток способны образовывать биомассу 10^{10} т.

В действительности этого не происходит, так как действуют разнообразные ограничивающие факторы. Но возможности бактерий к быстрому размножению намного превосходят другие виды организмов, что является важнейшим при производстве микробного белка и БАВ. Бактерии биохимически универсальны в том смысле, что могут усваивать самые разнообразные питательные вещества и даже способны выбирать наилучшие органические соединения из смеси, поэтому могут приспосабливаться к самым разнообразным условиям существования. Например, *Pseudomonas multivorans* в качестве источника углерода может использовать 90 веществ, в том числе углеводы и их производные, жирные кислоты, спирты, аминокислоты и даже циклические углеводороды (фенол).

В зависимости от отношения к O_2 бактерии принято делить на облигатные аэробы, факультативные анаэробы, аэротолерантные анаэробы. Большинство продуцентов в микробной биотехнологии являются облигатными аэробами, поэтому культивирование их протекает при постоянном притоке O_2, некоторые продуценты растут при низком содержании O_2 (2-10%), их называют микроаэрофилами, а условия, в которых их культивируют, микроаэробными. К факультативным анаэробам относятся некоторые представители рода Bacillus, Escherichia, к аэротолерантным анаэробам – метанообразующие бактерии.

Большинство бактерий культивируют на сложных органических средах,

содержащих факторы роста (витамины, аминокислоты, пурины, пиримидины). Продуценты, нуждающиеся в факторах роста, называют ауксотрофами, штаммы, не обнаруживающие эту потребность, прототрофами. Молочнокислые бактерии можно отнести к ауксотрофам. Многие продуценты могут расти на синтетических средах, содержащих всего одно органическое вещество в качестве источника углерода. Некоторые продуценты используют в качестве источника энергии метан, метанол, метилированные амины. В микробной биотехнологии широко используется способность ряда бактерий осуществлять жизнедеятельность в результате окисления молекулярного водорода, сероводорода, аммония, нитратов, солей двухвалентного железа и некоторых других неорганических соединений. Для многих продуцентов характерен лабильный метаболизм, что выражается в способности использовать большое число разных соединений углерода, азота и др. элементов, а также переключения с одного типа питания на другой. Большинство бактерий имеют в составе клеточной стенки пептидогликаны (состоят из N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты).

Особое значение как продуценты имеют архебактерии, древние представители прокариот. Они обитают в средах с экстремальными условиями (высокие концентрации неорганических веществ, повышенные температуры). Среди архебактерий галобактерии представляют большой интерес для биотехнологии. Они растут в среде, содержащей 20-30% NaCl (концентрированный раствор, Мертвое море), живут на сухой соленой рыбе, кожаных изделиях, имеют белки, нормальное функционирование которых происходит только при высоких концентрациях NaCl. Это палочки, кокки, квадраты, содержащие фотоактивные пигменты бактериородопсин и галородопсин. Галородопсин способен превращать электромагнитную энергию света в химическую энергию, за счет которой происходит фосфорилирование и синтез АТФ. Если пурпурные бактерии *Halobacterium* иммобилизовать на носителе, то при освещении можно получать электричество, АТФ и обессоливать морскую воду.

В будущем предполагают с помощью таких микропреобразователей энергии обеспечивать электричеством отдельные жилища в странах с высокой солнечной радиацией. Метаногенные бактерии широко изучаются в биотехнологии как способ получения дополнительной энергии из возобновляемого субстрата. Биологический метаногенез был известен в Китае еще во II веке до н.э. В 1911 году в г. Бирменгеме был построен завод по анаэробному разложению сточных вод. Газовый генератор превращал метан в электричество, обеспечивая жизнь целого города. В настоящее время в Китае работает более 7 млн. установок по производству биогаза. Биомассу метаногенных бактерий можно применять как концентрат витамина B_{12} для сельскохозяйственных животных.

Серозависимые архебактерии и термоплазмы также вызывают большой интерес биотехнологов. Они обитают в горячих и кислых водоемах, в вулканических расщелинах. Энергию получают за счет окисления H_2, S, Fe^{2+}

сульфитов металлов. Например, Thermoproteales живут при 108 ºС, (не ниже 80 ºС), анаэробы, причем ферменты, синтезированные в их клетках, обладают высокой терморезистентностью. Основное преимущество термофильных анаэробных архебактерий состоят в следующем: 1. сокращение сроков культивирования; 2. возможность обойтись без аэрации; 3. уменьшение вероятности заражения.

Актиномицеты – группа грамположительных бактерий, клетки которых способны к ветвлению. Внешнее сходство с грибами нашло отражение в их названии («лучистые грибы», актис – луч, микес – гриб). Но фактически никакого родства с грибами, являющимися эукариотами, эти прокариотические организмы не имеют. Нити, образующие мицелий актиномицетов, имеют диаметр 0,3-1 мкм (у грибов – около 50 мкм).

Колонии многих актиномицетов окрашены различными пигментами. Многие актиномицеты образуют плотный субстратный мицелий, врастающий в питательную среду. К антибиотикам, продуцируемым актиномицетами, относятся разнообразные химические соединения с широким спектром биологического действия: аминогликозиды, тетрациклины, актиномицины, макролиды, акзамицины.

Важнейшими продуцентами этих групп антибиотиков являются *Streptomyces griseus, Saccharopolispora hisuta, Micromonospora olivoasterospora, Nocardia mediterranea*.

Известно несколько основных вариантов использования бактерий для приготовления лекарств. Самый популярный основан на получении биомассы и последующем ее использовании в качестве полупродукта или же искомого препарата. Другой вариант основан на использовании биообъектов, которые накапливаются в среде выращивания. На этом принципе основано производство аминокислот, витаминов, ферментов, антибиотиков, полисахаридов.

Микробные клетки используются в качестве источника белка главным образом в кормах для животных и для микробиологических трансформаций, которые проводят с помощью растущих или даже высушенных клеток. Суть таких превращений заключается в том, что одно соединение превращают в другое, родственное по структуре, с помощью одного или нескольких образуемых клетками ферментов. В отличие от большинства небиологических химических реакций биологические превращения происходят при биологических температурах, а растворителем служит вода. Полученные продукты отличаются высокой степенью чистоты, практически не содержат побочных продуктов. Биологическое превращение – строго специфичный процесс, т.е. каждый фермент катализирует только один вид реакции в специфическом месте молекулы субстрата. Однако при применении бактерий как продуцентов фармацевтической продукции должен быть тщательно изучен состав их липидов, так как у некоторых из них (например, у микобактерий) могут содержаться токсические компоненты. К тому же бактериальные клетки мелкие и процесс концентрирования

биомассы из-за этого затруднен.

Известно около 30 видов бактерий, являющихся продуцентами различной биотехнологической продукции, в том числе и лекарственных веществ.

Источником углерода при культивировании бактерий могут служить отходы различных видов промышленности, в том числе природный и попутный газы (водород), а также метанол, этанол, пропанол. На газовых питательных средах культивируются бактерии рода *Methylococcus, Pseudomonas, Methylophillus*. На метаноле в Великобритании организовано производство белкового препарата прутин, содержание белка в котором 74% от сухой массы. В России разработана технология промышленного получения меприна с использованием в качестве питательной среды метанол.

В производстве белковых препаратов можно применять в качестве продуцентов и водородоокисляющие бактерии, накапливающие в клетках до 80% белка, особенно в близи химических предприятий.

Использование бактерий в качестве продуцентов белка и витаминов при производстве фармацевтической продукции имеет ряд приоритетов:

1. Возможности использования отходов пищевых и химических производств для культивирования;
2. повышенное содержание незаменимых аминокислот в бактериальных клетках по сравнению с растительными белками;
3. Высокая скорость реакции биосинтеза белка;
4. Относительно несложная технология культивирования в промышленных масштабах, независимая от сезонов и других изменяющихся условий окружающей среды;
5. Возможность направленного воздействия с помощью методов селекции на химический состав клеток для совершенствования биологической ценности целевого продукта.

Однако фармацевтическая продукция, полученная на основе клеток бактерий, должна подвергаться тщательной медико-биологической проверке для выявления канцерогенного, мутагенного, эмбриотропного действия на организм человека.

Среди грибов в качестве продуцентов лекарственных веществ применяют микромицеты (дрожжи, *Penizillum, Aspergillus*) и макромицеты, формирующие в процессе роста и развития плодовые тела.

Грибы имеют сходство и с растениями (верхушечный, или апикальный рост, прочная клеточная стенка, наличие вакуолей и поперечных перегородок у многих из них), и с животными (гетеротрофный тип питания, большая или меньшая потребность в витаминах, наличие хитина или хитозана, синтез гликогена). В то же время лишь грибам присуще мицелиальное строение и как следствие абсорбционный способ питания (осмотрофия). Для них известны явления дикариозиса -раздельное нахождение двух ядер в одной клетке, способных к одновременному делению и имитирующих диплоидное ядро, а также и гетерокариозиса - нахождение разнокачественных ядер в

одной клетке.

Грибы имеют диаметр клеток в 3-5 раз больше, чем бактерии, и более устойчивы к фагам.

Удельная производительность ферментеров по биомассе при применении бактерий в качестве продуцентов выше, чем при культивировании грибов (для Candida lipolytica 7 г/кг·ч, для бактерий Micrococcus lactis 22 г/кг·ч). Это связано не только с высокой скоростью роста бактерий, но и со способностью окисления более широкого спектра углеводов.

В производстве спиртных напитков дрожжи представляют собой единственный промышленно используемый штамм микроорганизмов.

Помимо производства пива и вина дрожжи применяют в промышленных масштабах для получения технического спирта и глицерина, а также в качестве добавок к кормам для животных.

В качестве продуцентов используют *Saccharomyces cerevisiae, Candida lipolytica*. Из соединений углерода дрожжи лучше всего используют гексозы, из полисахаридов утилизируют инулин и крахмал, некоторые можно культивировать на метаноле и этаноле, органических кислотах. В качестве источника азота при производстве дрожжей применяют соли аммония (нитраты, нитриты). Большинство дрожжей растет в границах pH 3,0-8,0, оптимальная температура культивирования 28-30 ºС, причем пивные дрожжи имеют более широкий оптимум температуры. Спиртовое брожение у дрожжей отличается от гликолиза у высших растений лишь последними этапами (образуется этиловый спирт), что обусловлено наличием фермента пируватдекарбоксилазы, катализирующей превращение пирувата в ацетальдегид, который затем восстанавливается в этанол.

Штаммы *Saccharomyu cerevisiae* подразделяются на расы низового и верхового брожения. К расам низового брожения относят винные и пивные дрожжи, к расам верхового – спиртовые, хлебопекарные. Дрожжи низового брожения функционируют в производстве при 6-10 ºС, верховые – при 14-25 ºС. В конце брожения низовые дрожжи оседают на дно, а верховые образуют «шапку».

При культивировании дрожжей на этаноле выход по массе составляет 30% производительность ферментеров больше в 2-3 раза, чем при выращивании на n-алканах. Применение этанола для получения дрожжевой биомассы не встречает психологических возражений. В Чехии организовано производство биомассы *Candida utilis* на этаноле для добавления в продукты питания человека с целью улучшения их органолептических свойств. Дрожжи используют при производстве эргостерина и β-каротина. С точки зрения производства фармацевтической продукции наиболее важны продуценты родов: *Aspergillus,Cephalosporium,Fusarium,Penicillum*. К числу основных продуктов метаболизма их относятся антибиотики, органические кислоты и ферменты.

Для культивирования дрожжей в качестве питательной среды

применяют неразветвленные углеводороды с 10-30 углеродными атомами в молекуле, т.е. жидкие фракции углеводородов нефти, а также молочную сыворотку (1 т сыворотки содержит 10 кг белка и 50 кг лактозы). В настоящее время разработана эффективная промышленная технология получения белка из молочной сыворотки методом ультрафильтрации, который применяется для получения сухого обезжиренного молока.

Жидкие отходы от этого производства (перлиат) используются далее для выращивания кормовых дрожжей. Дрожжи культивируют на метаноле и этаноле. При такой технологии препарат содержит 56-62% белков и значительно меньшее количество вредных примесей (производных бензола, аминокислот, аномальных липидов, токсинов), чем при выращивании на n-парафинах нефти.

Дрожжи по содержанию таких аминокислот, как лизин, треонин, валин и лейцин значительно превышает многие растительные белки.

Белковые препараты из дрожжевой биомассы применяются в качестве пищевых добавок. Это пивные и пищевые дрожжи *Sacharomices serevisiae, Candida arborea, Candida ufilis*. В США разработана рецептура приготовления сосисок из мяса индейки с добавлением 25% дрожжевого белка. В Великобритании применяют 14 видов дрожжей рода *Candida* для утилизации молочной сыворотки и получения биомассы, богатой белками и витаминами. . Пивные дрожжи *Sacharomyces carlsbergensis* содержат не менее 48% белка, 14 различных витаминов и характеризуются хорошей сбалансированностью по незаменимым аминокислотам, поэтому широко применяются в медицине и пищевой промышленности при производстве колбас в качестве заменителя казеина.

При переработке дрожжей в пищевой белок они подвергаются специальной обработке. Сначала стенки дрожжевых клеток разрушают (механическим, щелочным, кислотным воздействием или с помощью специальных ферментов), далее обрабатывают гомогенную биомассу подходящим органическим растворителем с целью освобождения от низкомолекулярных примесей и сопутствующих органических веществ. Следующая стадия – обработка растворами щелочей для растворения белков и диализ. Очищенные с помощью таких методических приемов белки осаждают, высушивают и применяют в пищевой технологии и медицине.

Мицелиальные грибы образуют около 1200 антибиотических соединений. Наибольший интерес для клинической практики представляют пенициллины, цефалоспорины, гризеофульвин, трихотецин, фумагиллин и др. Пенициллины синтезируются определенными видами *Penizillum* (*chrysogenium, brevicompactum, nigricans)* и некоторыми видами *Aspergillus* (*flavus, nidulans*). Основным продуцентом при промышленном получении этого антибиотика является *Penizillum chrysogenium*, в процессе жизнедеятельности которого образуются различные формы пенициллинов, отличающиеся строением боковой части молекулы антибиотика, биологической активностью и спектром противомикробного действия.

Важнейшим продуцентом антибиотиков цефалоспоринового ряда, применяемым в фармацевтической промышленности, является Cephalosporium acremonium и актиномицет Streptococcus clavuligereus (цефалоспорин С, цефамицин С, цефалексин, цефрадин). В последние годы получены новые химические модификации цефалоспоринов (цефапарол, цефатризин, цефамандол, цефакситин).

Большие затруднения при производстве антибиотиков на основе микромицетов представляет биомасса в виде мицелия, что усложняет конструкции биореакторов и приводит к изменению гидродинамических свойств культуральной жидкости.

В качестве продуцентов в биотехнологии используют водоросли. Они медленнее растут, чем грибы. Общее содержание белка в них может достигать 40-70%, причем белки полноценные по аминокислотному составу. При культивировании водорослей можно получить в 2-10 раз больше сухого вещества, чем при культивировании высших растений.

К макрофитам, применяемым в пищу человека относятся ульва, алария, порфира, родимения, хондрус, ундария, фурцеллярии, спирулина.

В Японии культивирование порфиры занимает 60 000 г акватории.

В нашей стране из черноморских водорослей добывают филлофору для производства иода, агар-агар производят из анфельции. Общая добыча водорослей около 3 млн. т (КНР, Япония), из них 2,2 млн т культивируют. Спирулина добывается и культивируется в водоемах, как традиционный продукт питания на территории Мексики и Центральной Африки. В России из нее получают вкусовые и белково-витаминные добавки к овощам, консервам, соусам (содержит 9 незаменимых аминокислот). Биомассу хлореллы и спирулины применяют для замены пищевого сырья для приготовления питательных сред при культивировании микроорганизмов, клеток растений и животных. Хлорелла представляет интерес для создания искусственных экологических систем для жизнеобеспечения экипажей космических кораблей. Следует отметить, что использование водорослей в качестве компонентов пищевых продуктов связано с рядом технологических проблем: 1. необходимость удаления клеточной стенки для уменьшения количества неперевариваемых компонентов; 2. обезжиривание, так как некоторые компоненты липидной фракции придают продукту неприятный вкус; 3. детоксикация пигментированных белков.

Потенциальный продуцент биотехнологии царства животных – простейшие и различные группы почвенных беспозвоночных (дождевые черви и др.).

Хотя простейшие в настоящее время не используются в промышленном масштабе ни для производства биомассы, ни для синтеза биологически активных веществ, они наряду с другими микроорганизмами играют большую роль в биологической очистке сточных вод фармацевтических предприятий. Простейшие относятся к числу нетрадиционных объектов биотехнологии. настоящее время они лишь завоевывают себе место в

исследовательской работе и микробиологической промышленности как продуценты БАВ. При этом рациональнее использовать свободноживущих простейших. Они являются важной составной частью геологических пород, почвы, пресных и морских вод, некоторые продуцируют целлюлазный мультиферментный комплекс.

Трипаносома стала первым продуцентом противоопухолевого препарата круцина (Россия, Франция), обладающего цитотоксическим эффектом при прямом контакте с опухолью.

Свободноживущий жгутиконосец *Astasia longa* культивируют для получения астазилида, обладающего противоопухолевым действием не через цитотоксический эффект, а при воздействии на клеточное звено иммунитета. Эвгленовые можно рассматривать как перспективные продуценты гликанов и других гетерополисахаридов.

Важнейшие продуценты лекарственной продукции царства животных

№ п/п	Продуцент	Использование в биотехнологическом производстве	
	Вид	**Лекарственное средство**	**Орган**
1.	Человек	Эритроцитарная масса для гемотрансфузии, лейкоцитарная масса	Кровь
2.	Лошадь, осел, мул	Антистафилококковая плазма, гетерологические антитоксические сыворотки, противодифтерийная, противостлбнячная, сыворотки	Кровь
3.	Марал (изюбр, пятнистый олень)	Пантокрин	Панты
4.	Корова, як	Инсулин Панкреотин Паратиреоидин Тиреотропин Гиалуронидаза Румалон	Ткань поджелудочной железы, паращитовидной железы, гипофиза, семенников, хрящей
5.	Баран	Нормальные эритроциты для постановки ИФА	Кровь
6.	Коза	Гетерологичная антисыворотка к вирусу клещевого энцефалита	Кровь
7.	Свинья	Пепсин Инсулин	Слизистая желудка

8.	Кролик Новорожденный крольчонок	Диагностические сыворотки Вакцина против бешенства	Кровь Среда для размножения вируса
9.	Курица	Лизоцим Лецитин	Белковая фракция, желтка яиц
10.	Змеи	Антитоксические сыворотки (анти-эфа, анти-гюрза)	Антигены для иммунизации
11.	Пчелы	Пчелиный яд	Ткань брюшных желез
12.	Скорпионы	Антитоксическая сыворотка	яд

Большинство используемых в биотехнологии продуцентов по отношению к температуре являются мезофилами: их рост и развитие происходит при температуре 25-37ºС. Психрофильные микроорганизмы растут при температуре 0-15ºС, и термофилы – при температуре 60-80ºС. Все перечисленные группы имеют промежуточные формы. Для биосинтетических процессов в промышленном производстве желательно использовать термофильные микроорганизмы. Отдельные термофилы растут при 110ºС, а в подводных выбросах сверхгорячих источников больших океанических глубин найдены микроорганизмы, развивающиеся при t 300ºС и под давлением.

Среди термофилов обнаружены ценные продуценты спиртов, аминокислот, ферментов, молекулярного водорода. Скорость роста и метаболическая активность у них выше, чем у мезофиллов. Ферменты, синтезируемые термофилами (протеазы), имеют высокую устойчивость к нагреванию, действию окислителей, детергентов и других неблагоприятным условиям. Применение термофилов в микробной биотехнологии (продуценты протеаз *Thermus aquaticus и Termus caldophilus*) позволяет снизить затраты на стерилизацию промышленного оборудования и на системы охлаждения биореакторов. Это позволит применять ферментеры без громоздких теплообменных устройств и упростить их конструкцию.

В микробиологическом синтезе для каждой культуры микроорганизмов есть оптимум, минимум и максимум pH. Большинство микроорганизмов лучше всего развивается при pH 7,0 (нейтральная среда). Ацидофильным микроорганизмам (некоторые дрожжи, плесени) необходимо иметь водородный показатель среды 1,5-4,5, базофильным – pH 8,5-9,5.

Ацидофильные формы не растут при pH выше 5,0-5,5, *Thiobacillus ferrooxidans* встречается в шахтных водах месторождений сульфидных

минералов (pH иногда меньше 1,0). Алкалофильные бактерии растут при pH более 10 (некоторые бактерии рода *Bacillus*), разлагающие мочевину до аммиака. В промышленности предпочтительнее применять ацидофильные штаммы, так как посторонняя микрофлора в таких субстратах погибает и уменьшаются средства, применяемые для стерилизации.

Одним из факторов, ограничивающих рост микроорганизмов, является высокое осмотическое давление среды. К осмофильным видам относятся некоторые дрожжи (*Xeromyces bisporus*) и мицелиальные грибы, они могут расти на субстратах, содержащих 20% сахара и более.

В настоящее время особую значимость для производства фармацевтической продукции приобретают исследования процессов перестройки генетических программ клеток продуцентов в направлении увеличения скорости биосинтеза целевых продуктов и конверсии питательной среды методами современной генетики.

Вопросы для самоконтроля

1. Преимущества использования бактерий в качестве продуцентов белка и витаминов при производстве фармацевтической продукции.
2. Биологические объекты, используемые в биотехнологии в качестве продуцентов.
3. Требования, предъявляемые к штамма микроорганизмов, используемых в промышленности.
4. Факторы, влияющие на рост микроорганизмов-продуцентов.
5. Важнейшие продуценты лекарственных веществ.

3. СЛАГАЕМЫЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА ПРОИЗВОДСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ. МЕТОДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ И БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ДОБАВОК

Если представить любой из вариантов использования современных биотехнологий в производстве как иерархическую структуру, то биообъекты (мутанты и генно-инженерные клетки прокариот, дифференцированные клетки тканей высших растений и животных, иммобилизованные ферменты) в совокупности с управляемыми реакторами, сепараторами, системами смешивания газожидкостных потоков, флотаторами, экстракторами, абсорберами и другим оборудованием составят компоненты первой ступени этого построения.

Объединение нескольких взаимосвязанных технологических процессов и аппаратов в функциональную единую технологическую цепочку представляет собой цех фармацевтического предприятия, т.е. элемент второй ступени иерархии. Например, цех выращивания клеток меристемы женьшеня, участок отделения культурального фильтрата от биомассы

коринобактерий при производстве лизина. Именно на второй ступени иерархии закладываются технологические основы создания безотходности биотехнологического производства фармацевтической продукции и оптимизации как отдельных аппаратов, так и типовых модулей.

Третья ступень иерархии: опытно-промышленная установка или же предприятие законченного цикла, где наряду с основными подсистемами присутствуют вспомогательные, а точнее общеинженерные подсистемы.

Сопоставляя структуры биотехнологического производства лекарственной продукции, можно заключить, что набор элементов на разной ступени иерархии практически одинаков. При любой поставленной цели типовой процесс предусматривает использование биообъектов, биореакторов, систем асептики, подачи пластического и энергетического материалов и разделение продуктов ферментации. Основные различия начинают выявляться со второй ступени иерархии и особенно наглядны на уровне организации вспомогательных подсистем.

Например, при производстве витамина B_{12}, где все операции направлены на обеспечение синтетической функции биообъекта, такие подсистемы, как подача предшественника в биореактор, мембранная фильтрация для извлечения цианокобаламина из культуральной жидкости, функционально необходимы. При выращивании каллусных культур родиолы никакой необходимости в подобного рода подсистемах нет.

Среди элементной базы первой иерархической ступени есть множество как типовых, так и специфических решений, связанных с использованием разнообразных биообъектов и различиями в их потребностях к факторам пластического и энергетического обеспечения.

Эффективность производства фармацевтической продукции биотехнологическими методами зависит от всех слагаемых и общего материального и энергетического баланса. При этом следует помнить, что в биотехнологии есть два активных представителя средств производства и между ними существует взаимовлияние. Действительно, чем выше темп функционирования биообъекта, тем более высокие требования предъявляются к аппаратурному оформлению процессов с его использованием. Необходима оптимизация как биообъекта, так и процессов и аппаратов биотехнологических производств.

Общая технологическая схема производства включает:

1. подготовку посевного материала или инокулята, куда входит ряд этапов, начиная от засева пробирок и качалок колб до проведения выращивания в засевном ферментере. Все операции осуществляют в специальном цехе и при соблюдении правил микробиологических работ, в том числе и при систематической стерилизации воздуха в помещениях. Инокулят получают путем масштабирования чистой культуры продуцента.
2. подготовку питательной среды для производственного ферментера, которая включает выбор и реализацию рецептуры среды. Стерилизация должна гарантировать сохранность всех пластических и энергетических

компонентов в исходном количестве и качестве. Для получения питательной среды применяют различное оборудование,причем в специальном цехе проводят и водоподготовку,включающую очистку воды.

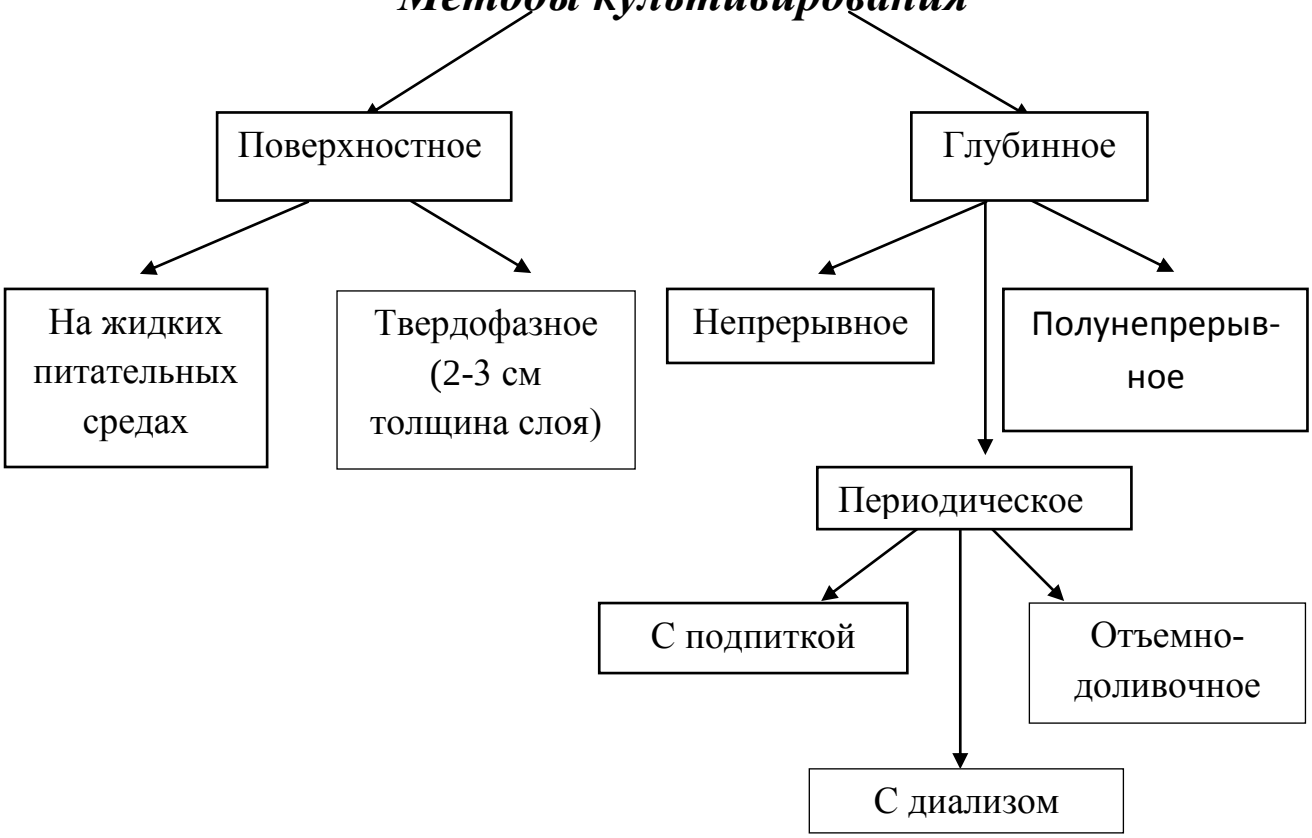
3. подготовку ферментационного оборудования, гарантирующего сохранность от попадания в процесс контаминационной флоры.На этом этапе проводят стерилизацию всех узлов ферментеров, а также примыкающих к ним трубопроводов.
4. стадию биосинтеза, где в максимальной степени используются возможности биообъекта для получения лекарственного начала, которое накапливается внутри клетки или же секретируется в культуральную среду.При этом все производственные операции осуществляют в стерильных условиях, при определенной температуре и значении pH среды,а также в течение характерного для каждого продуцента периода времени.
5. стадию концентрирования, одновременно предназначенную и для удаления балласта;
6. стадию очистки, реализуемую за счет повтора ряда однотипных операций или же за счет набора различных препаративных приемов повышения удельной специфической активности лекарственного начала (ультрафильтрация, экстракция, сорбция, кристаллизация);
7. стадию получения конечной субстанции или готовой лекарственной формы с последующими операциями расфасовки и упаковки;

Центральный этап фармацевтического производства – ферментация. Под ферментацией понимают всю совокупность последовательных операций от внесения в питательную среду посевного материала (инокулята) до завершения процесса роста или биосинтеза биологически активных веществ. В основе процесса ферментации лежит культивирование продуцентов, т.е. выращивание культуры микроорганизмов, клеток высших растений или плесневых грибов.

Культура микроорганизмов – это популяция микроорганизмов, выращиваемая в питательной среде и находящаяся в стадии размножения или закончившая его. При производстве лекарств и БАД применяются следующие методы культивирования.

Твердофазная поверхностная ферментация осуществляется на увлажненной, сыпучей или пастообразной среде. Рост продуцента происходит на поверхности твердых частиц, а также в порах, заполненных водой или воздухом. Типичным примером является приготовление силоса или компоста в кучах. Управляемый процесс твердофазной ферментации имеет место при производстве ферментов с помощью микромицетов.

Методы культивирования



Для поверхностного культивирования на твердых средах применяют свекловичный или виноградный жом, зерновую шелуху, пшеничные или рисовые отруби, к которым добавляются различные питательные вещества. Оптимальная влажность субстрата 40-70%. Стерилизация осуществляется путем прямого введения пара в среду при перемешивании. Если увлажнение проводят подкисленными растворами, то стерилизация происходит 15-20 мин при 95 ºС. Обеспечение кислородом затрудняется с увеличением слоя субстрата, поэтому для каждого штамма или производства своеобразная толщина слоя питательной среды. При выращивании мицелиальных грибов перемешивание не допускается. При твердофазной поверхностной ферментации очень большая проблема - поддержание постоянной температуры во всем объеме питательной среды. Например, температура компостов увеличивается от поверхности к глубинным слоям.

Кинетика роста популяции на поверхности (пленке) отличается от глубинных условий. При твердофазном культивировании в начале роста культуры, когда в среде отсутствует градиент концентрации субстрата, все клетки в колонии могут расти с максимальной для данной среды удельной скоростью роста, т.е. по экспоненциальному закону. В центральной части субстрата рост клеток лимитирован диффузией и, таким образом, биомасса растет с максимальной удельной скоростью лишь на поверхности питательной среды.

Управляемый процесс твердофазного поверхностного культивирования применяется при производстве энзиматических лекарственных препаратов.

Рассмотрим производство амилолитических ферментов. В качестве питательной среды используют пшеничные отруби. Стерилизованную питательную среду после засева соответствующего штамма микромицета распределяют по кюветам и транспортируют в растильные камеры, где поддерживается определенная температура и влажность воздуха, а также обеспечивается вентиляция вдоль поверхности субстрата с целью аэрации.

Для *Aspergillus awamori* как продуцента амилаз различают 3 стадии выращивания культуры: 1. Рост до начала прорастания конидий (t - 32º - 38ºС, 100% влажность воздуха); 2. Стадия интенсивного прироста биомассы при t 27ºС; 3. На третьей стадии прекращают подачу в камеру кондиционированного воздуха. Общая продолжительность процесса 42 часа. Существенным недостатком этого метода является наличие больших производственных площадей, трудность автоматизации технологического процесса. В настоящее время разработаны типы механизированных растительных установок, которые в той или иной мере устраняют указанные недостатки кюветного способа. Применяют выращивание биомассы микромицетов на специальных лотках, установленных на движущемся транспортере, причем каждый лоток имеет специальный воздуховод и ворошитель.

При выращивании микроорганизмов глубинным методом клетки суспендированы в жидкости и находятся во взвешенном состоянии. В условиях лаборатории в колбы,(50-250мл) наливают жидкую питательную среду, в которую засевают чистую культуру (из ампул), затем ее помещают на сутки в термостат с определенной температурой, где она растет и размножается. Аэробные продуценты выращивают в специальных колбах на качалках в термокамере. Вот этот пример является периодическим глубинным культивированием, т.е. рост продуцента осуществляется в закрытой системе (обмен газами, теплом), но питательная среда и посевной материал не вводятся в процессе роста продуцента.

При периодическом культивировании выделяют несколько фаз в развитии культуры.

Управляемый процесс твердофазного поверхностного культивирования применяется при производстве энзиматических лекарственных препаратов.

Рассмотрим производство амилолитических ферментов. В качестве питательной среды используют пшеничные отруби. Стерилизованную питательную среду после засева соответствующего штамма микромицета распределяют по кюветам и транспортируют в растильные камеры, где поддерживается определенная температура и влажность воздуха, а также обеспечивается вентиляция вдоль поверхности субстрата с целью аэрации.

Для *Aspergillus awamori* как продуцента амилаз различают 3 стадии выращивания культуры: 1. Рост до начала прорастания конидий (t - 32º - 38ºС, 100% влажность воздуха); 2. Стадия интенсивного прироста биомассы при t 27ºС; 3. На третьей стадии прекращают подачу в камеру кондиционированного воздуха. Общая продолжительность процесса 42 часа.

Существенным недостатком этого метода является наличие больших производственных площадей, трудность автоматизации технологического процесса. В настоящее время разработаны типы механизированных растительных установок, которые в той или иной мере устраняют указанные недостатки кюветного способа. Применяют выращивание биомассы микромицетов на специальных лотках, установленных на движущемся транспортере, причем каждый лоток имеет специальный воздуховод и ворошитель.

При выращивании микроорганизмов ***глубинным метод***ом клетки суспендированы в жидкости и находятся во взвешенном состоянии. В условиях лаборатории в колбы,(50-250мл) наливают жидкую питательную среду, в которую засевают чистую культуру (из ампул), затем ее помещают на сутки в термостат с определенной температурой, где она растет и размножается. Аэробные продуценты выращивают в специальных колбах на качалках в термокамере. Вот этот пример является периодическим глубинным культивированием, т.е. рост продуцента осуществляется в закрытой системе (обмен газами, теплом), но питательная среда и посевной материал не вводятся в процессе роста продуцента.

При периодическом культивировании выделяют несколько фаз в развитии культуры.

1. **Латентная фаза.** Культура микроорганизмов осваивает питательную среду, заметного увеличения числа клеток не происходит. В этот период перестраивается метаболизм клетки, синтезируются ферменты, необходимые для использования новых субстратов, активируется биосинтез белка.2.Фаза ускорения роста культуры отличается тем,что митотическая активность клеток продуцента возрастает и плотность клеток в реакторе возрастает.

3. **Фаза экспоненциального роста** характеризуется быстрым накоплением биомассы и продуктов метаболизма. При этом запас питательных веществ в среде в оптимальной концентрации, увеличение числа клеток пропорционально времени, т.е. линейный рост культуры.

4. **Фаза замедления рос**та – это непродолжительный период, в течение которого скорость роста культуры снижается, что связано с накоплением токсических продуктов метаболизма и расходованием питательных веществ среды.

5. **Стационарная фаза** – это скорость прироста биомассы полностью компенсируется скоростью гибели и лизиса клеток.

6. **Фаза отмирания культуры** – характеризуется полным истощением субстрата, накоплением веществ, ингибирующих рост, скорость прироста биомассы равно нулю.

При производстве лекарственных препаратов важную роль играет любая фаза. Так, при производстве первичных метаболитов важно сокращение до минимума латентной фазы и увеличение экспоненциальной фазы. Продолжительность латентной фазы зависит от состава питательной среды, возраста и массы инокулята. Перенос клеток из одной среды в другую, резкое

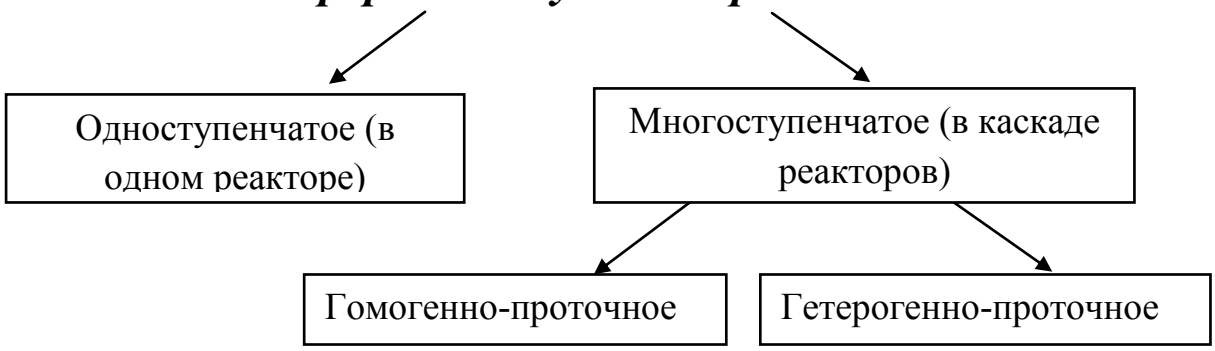
изменение условий при масштабировании может оказывать на продуцент разностороннее воздействие. Системы контроля и регуляции ферментативной активности включают и адаптационные механизм, т.е., сталкиваясь с новыми питательными веществами, клетки начинают усваивать их только после синтеза ферментов.

Первичные метаболиты синтезируются в экспоненциальной фазе (нуклеотиды, ферменты, витамины), в стационарной фазе и фазе отмирания - вторичные метаболиты (антибиотики, красящие вещества).

При непрерывном культивировании процесс постоянно протекает в экспоненциальной фазе, нет смены фаз развития культуры, как при периодическом культивировании (можно сравнить с оранжереей, где вегетация и плодоношение растений идет в течение всего года). Можно сказать, что при непрерывном культивировании жизнедеятельность культуры продлевается за счет постоянной подачи питательной среды и отбора культуральной жидкости, вместе с которой из реактора удаляются и токсические метаболиты.

Непрерывное культивирование может осуществляться в условиях крупнотоннажного производства в каскаде реакторов. Впервые данный метод был применен в 1915 году при производстве спирта, в 1940 году – для получения ацетона. В настоящее время в фармацевтическом производстве применяются следующие разновидности непрерывного культивирования продуцентов.

Непрерывное культивирование



При гомогенно проточном процессе параметры постоянны во времени во всех реакторах. Основным принципом непрерывного процесса культивирования является равновесие между приростом биомассы за счет деления клеток и убылью в результате разбавления свежей питательной средой, причем объем заполнения ферментера остается постоянным.

При непрерывном культивировании микроорганизмов необходимо отрегулировать такую скорость притока питательной среды и вытекания культуральной жидкости из системы, чтобы предотвратить вымывание клеток из системы, т.е. концентрация клеток должна быть постоянной.

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

При многостадийном непрерывном культивировании нарушение режима

одного реактора влечет за собой выход из строя всей установки. Поэтому многостадийные непрерывные процессы требуют надежной системы стерильности и контроля, сложной конструкции реакторов. Длительное протекание непрерывных процессов приводит к обрастанию труб и стенок реактора прилипающими клетками или гифами мицелия. В этом случае процессы автоселекции протекают особенно интенсивно, и возникает проблема появления рекомбинантных мутантов.

При непрерывном культивировании поддержание состояния динамического равновесия в реакторе осуществляется двумя методами - ***хемостатным и турбидостатным***.

По турбидостатному принципу в системе поддерживается определенная концентрация биомассы, а по хемостатному принципу – постоянная концентрация одного из компонентов среды (углерода, кислорода, витамина и др.). Известен также метод регулирования роста культуры по значению pH (pH-стат).

При турбидостатном методе регулирования контролируется концентрация суспензии выходящей жидкости, создаваемая микробными клетками.

Хемостатный способ контроля осуществляется по входящему потоку.

Метод хемостатного регулирования непрерывного культивирования применим ко всем типам микроорганизмов и клеткам различных тканей животных или растений, которые могут расти в гомогенной перемешиваемой культуре. Биореактор, работающий в хемостатном режиме имеет: а) устройство для вливания питательной среды; б) выпускное приспособление для оттока культуральной жидкости; в) систему контроля скорости протока. Регулирование хемостатным способом предполагает перемешивание. Это означает, что при добавлении малых объемов среды, время, необходимое для того, чтобы вещество гомогенно распределилось по всей культуре, должно быть минимальным. Если перемешивание будет недостаточное, то в ферментере образуются области, скорость разбавления в которых будет отличаться от средней скорости разбавления. Такие отклонения называют «эффектом аппаратуры». Продуценты фармацевтической продукции могут прилипать к поверхности ферментеров при непрерывном культивировании в течение длительного времени (месяцы), и наблюдаеся так называемый пристеночный рост, который может приводить к массивным обрастаниям поверхности ферментера. Чтобы поддержать в реакторе действительно гомогенные условия, нужно эти процессы свести к минимуму. Прилипание биомассы можно предотвратить силиконированием стенок и чисткой ферментера или применением оболочек из тефлона. Таким образом, хемостатный режим регулирования непрерывного культивирования дает возможность изменять скорость роста биомассы, не производя в окружающей среде никаких изменений, кроме увеличения или уменьшения концентрации лимитирующего фактра среды.

Хемостатный режим успешно применяется при малом протоке

питательной среды, когда концентрация клеток изменяется незначительно. Для турбидостатного режима непрерывного культивирования характерны высокие скорости разбавления и резкое изменение концентрации биомассы. Этот режим применяется лишь при выращивании одноклеточных организмов.

Турбидостатный контроль с помощью фотоэлемента оправдывает себя, если при изменении скорости разбавления концентрация биомассы меняется быстро. Если скорость изменения концентрации биомассы незначительна, то турбидостатный контроль оказывается недостаточно чувствительным, чтобы поддерживать скорость разбавления культуры на постоянном уровне. В случае длительного культивирования применение турбидостата может приводить к прилипанию организмов к поверхности фотоэлементов. В настоящее время контроль при турбидостатном регулировании осуществляется не только с помощью фотоэлемента, но и другими средствами, чувствительными либо к продуктам биосинтеза, либо к диоксиду углерода.

Турбидостатный контроль можно осуществить и с помощью pH-электрода в том случае, если в культуральной жидкости образуются органические кислоты. Для турбидостатного контроля можно также измерять концентрацию растворенного O_2 с помощью специального электрода.

Непрерывный процесс можно использовать в производстве лекарственной продукции только в том случае, когда культура при длительном выращивании не теряет способности к синтезу, т.е. генетически устойчива и однородна.

Характеризуя непрерывное культивирование, надо отметить, что высокая продуктивность процесса может быть достигнута при большем значении D (скорости разбавления), а это может быть связано с выносом неутилизированного субстрата. Поэтому данный метод далеко не всегда можно применять, например, в производстве антибиотиков и других препаратов медицинского назначения.

Для штамма *Brechibacterium flavium* 22 (производство лизина) экономическая эффективность при непрерывном режиме в 6 раз выше, чем при периодическом культивировании.

Вопросы для самоконтроля

1. Слагаемые биотехнологического процесса производства лекарственных средств.
2. Основные этапы общей технологической схемы производства.
3. Процесс ферментации. Общая характеристика.
4. Методы культивирования.
5. Периодическое культивирование: определение, типы периодического культивирования.

6. Непрерывное культивирование. Характеристика, виды непрерывного культивирования.

7. Фазы развития культуры при периодическом культивировании.

8. Методы поддержания состояния динамического равновесия в реакторе при непрерывном культивировании.

4. ПОЛУЧЕНИЕ ПОСЕВНОГО МАТЕРИАЛА, ВЫДЕЛЕНИЕ, КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ, ОЧИСТКА, СТАНДАРТИЗАЦИЯ, СУШКА И КОНТРОЛЬ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ

Для получения посевного материала используют исходную музейную культуру продуцента, которая поступает в заводскую лабораторию из научно-исследовательского института или с посевной станции.

Как правило, посевной материал, содержащий молодые, растущие клетки микроорганизмов на начальной стадии спорообразования (споры, конидии) поступает в пробирках на скошенных агаровых средах или в виде чистых культур в ампулах.

Каждая производственная культура имеет паспорт, в котором указаны продуцент и его коллекционный номер, серия и дата изготовления, средняя активность серии и срок годности. В паспорте представлена характеристика среды для выращивания и хранения культуры. Полученный посевной материал подвергают тщательному микробиологическому и биохимическому контролю, так как от его активности и чистоты зависит дальнейший производственный цикл.

В зависимости от вида продуцента, его физиолого-биохимических способностей приготовление посевного материала (до стадии производственной ферментации) проходит в несколько этапов: исходная культура → скошенная агаровая среда → выращивание на качалке в колбах на жидкой питательной среде (одна или две стадии) → посевные аппараты (одна, несколько стадий) → стадия производственной ферментации.

Исходную культуру при оптимальных температурах выращивают в пробирках на скошенной агаровой питательной среде. Для микроскопических грибов, актиномицетов продуценты культивируют до наступления оптимального спорообразования (72-120 час), для бактериальных культур фаза устанавливается экспериментально.

Выращенную культуру (1-5% от объема) с поверхности скошенной агаровой среды стерильно смывают водой и переносят в колбы Эрленмейера на 750 мл, содержащие 50-100 мл жидкой питательной среды. Засеянные колбы выращивают на качалке (120-240 об/мин) при температуре 28-30-50°С в течение 18-36 часов, т.е. глубинным способом, что увеличивает скорость роста культуры. Все стадии роста продуцента контролируют по морфологическим показателям микроорганизмов. При этом установлено, что наилучшие результаты дает культура, которая находится в стадии физиологической зрелости.

Готовую культуру стерильно переносят в посевной аппарат (малый инокулятор) с предварительно простерилизованной питательной средой. Посевной аппарат оснащен мешалкой, аэрирующим устройством, а также контрольно-измерительной аппаратурой для регулирования pH среды, температуры и степени аэрации.

Масштабирование при получении инокулята желательно осуществлять тогда, когда рост популяции происходит с максимальной скоростью, т.е. в экспоненциальной фазе.

Процесс выделения и очистки представляет собой ряд последовательных технологических операций, количество которых возрастает с повышением желаемой чистоты конечного продукта.

Культуральная жидкость весьма чувствительна к различным воздействиям, поэтому наблюдаются потери при выделении лекарственных соединений. Она представляет собой сложную многофазную систему, содержащую от 1 до 5% и более сухого вещества, отдельные микробные клетки или мицелий, продукты биосинтеза и остатки питательной среды. Как правило, выделение конечного продукта связано с определенными трудностями и в основном зависит от предварительной очистки нативного раствора.

Первой стадией подготовки культуральной жидкости для дальнейшей переработки является отделение взвешенной фазы или микробной массы, в состав которой входят микроорганизмы, продукты их жизнедеятельности, а также остатки неиспользованной питательной среды.

Седиментацию применяют в качестве метода выделения в тех случаях, когда диаметр осаждаемых частиц более 3 мкм, продукты достаточно стабильны и различные фракции осаждаемых продуктов содержат БАВ, необходимые для производства фармацевтической продукции.

Применяют несколько видов коагуляции*:* неорганическими солевыми электролитами, органическими и неорганическими кислотами, термической обработкой, добавлением веществ, образующих наполнители. Процесс коагуляции улучшается при использовании комбинированных методов: кислотное и тепловое, электролитное и тепловое воздействие.

Эффективным методом коагуляции дисперсных систем является обработка их высокомолекулярными полиэлектролитами – флокулянтами. При этом в отличие от обычной коагуляции образуются флокулы или осадки рыхлой структуры, что значительно улучшает процесс фильтрации.

Более прогрессивным методом разделения является метод центрифугирования, в основе которого лежит разделение неоднородных систем под воздействием центробежных сил в центрифугах. Основное преимущество центрифугирования по сравнению с другими методами обработки неоднородных систем (отстаиванием и фильтрованием) заключается в увеличении производительности разделения, и производительность современных центрифуг непрерывного действия достигает сотен $м^3$/ч. С помощью центрифугирования удается выделить из

суспензий частицы размером до сотых долей микрометра. Центрифугирование широко применяется в биотехнологических производствах лекарственной продукции, прежде всего для выделения из культуральной жидкости меристемы растений, биомассы дрожжей, бактерий, грибов, отделения различных продуктов микробиологического синтеза (антибиотиков, ферментов, витаминов и т.п.), переведенных предварительно в твердую фазу, а также для разделения эмульсий, образующихся при экстракции.

В биотехнологическом производстве лекарственных веществ сепараторы являются одним из самых распространенных типов центрифуг**.** По способу работы они делятся на три группы:

1.Сепараторы непрерывно-циклического действия, обеспечивающие разделение жидких смесей с непрерывным выводом из барабана текучих фракций и периодической ручной выгрузкой осадка из барабана;

2.Сепараторы непрерывно-циклического действия, обеспечивающие раз деление жидких смесей с непрерывным выводом из барабана текучих фракций и периодической выгрузкой осадка из барабана под действием центробежных сил;

3.Сепараторы непрерывного действия, обеспечивающие разделение жидких смесей с непрерывным выводом из барабана всех отсепарированных фракций.

Для извлечения внутриклеточных продуктов биосинтеза широко используются методы дезинтеграции. Дезинтеграция, т.е. разрушение клеточных оболочек микроорганизмов, осуществляется несколькими способами: химическими, биологическими, физическими (механическими).

Химические способы дезинтеграции основаны на деструкции упорядоченных структур клеточной стенки микроорганизма. Наиболее известные химические способы: обработка клеточной суспензии непосредственно щелочью, мочевиной, глицерином, аммиаком, перекисью. Химический способ предназначен для выделения суммарных белков пищевого назначения и не нашел широкого применения в фармацевтической промышленности вследствие возникновения нежелательных эффектов. Так, при обработке суспензии клеток микроорганизма щелочью в определенных условиях образуется лизин-аланин, из-за которого снижается количество доступного лизина и питательная ценность получаемого белка.

Биологические способы относятся к наиболее мягким способам разрушения клеточной оболочки и выделения внутриклеточных метаболитов. В качестве примера можно привести расщепление клеточной стенки при помощи литических ферментов. Расщепление клеток под действием внутриклеточных гидролитических ферментов проводится в кислой среде при температуре 30-35°С в течение нескольких часов или суток. В результате получают смесь продуктов гидролиза - аминокислоты, пептиды, полипептиды.

Физические способы. Физическая (механическая) дезинтеграция - это процесс, происходящий при высоких скоростях и сопровождающийся быстрым перемешиванием разрушаемого материала в зоне действия дезинтегрирующих сил. Физическую дезинтеграцию можно проводить в непрерывном режиме с автоматизацией процесса. Наиболее известные способы разрушения биоматериала - замораживание и оттаивание, ультразвуковое воздействие, истирание клеток, экструзия.

Если целевой продукт представляет собой растворимый метаболит или он синтезируется внутри клетки и не секретируется в культуральную жидкость, то прибегают к следующим методам выделения: экстракции, сорбции, хроматографии, выделению с помощью мембран.

Экстракцию проводят органическими растворителями из клеток (например, антибиотика гризеофульвина ацетоном, или бензилпенициллина при pH 2,0-3,0 – бутилацетатом). Экстракция ферментов осуществляется в двухфазных системах, например, полиэтиленгликолем.

Метод адсорбции применяют в микробиологических производствах в основном при получении кристаллических аминокислот, а также высокоочищенных и иммобилизованных ферментов. При выделении и иммобилизации ферментов используют органические сорбенты (крахмал, целлюлозу, синтетические и ионообменные смолы) или неорганические (цеолиты, гидроксид алюминия, силикагели и др.).

Процессы адсорбции осуществляют в аппаратах периодического или непрерывного действия с неподвижным или подвижным слоем адсорбента. Для выделения из культуральных жидкостей аминокислот применяются иониты, которые адсорбируются при прохождении через слой ионообменника, а сопутствующие примеси отводятся из колонны с отработанной культуралыюй жидкостью. После насыщения смолы аминокислотой подачу культуральной жидкости прекращают и смолу промывают водой, после чего смола готова к повторному циклу.

Хроматографическое разделение БАВ используют в различных вариантах: гель-фильтрация, ионобменная хроматография, аффинная хроматография.

В случае аффинной хроматографии используют высокую специфичность таких природных веществ, как ферменты, антитела и лектины. Ферменты образуют комплексы с ингибиторами, антитела - с соответствующими антигенами (иммуносорбционная хроматография), лектины - со специальными рецепторами клеточных стенок.

Метод выделения различных веществ или клеток с помощью мембран все шире внедряется в биотехнологию. *К мембранным методам* разделения относятся диализ и электродиализ, обратный осмос, ультрафильтрация и микрофильтрация. Общность всех мембранных методов разделения заключается в том, что основным элементом их аппаратурного оформления являются мембраны.

Причем они обладают рядом преимуществ:

-концентрирование и очистка происходят без изменения агрегатного со стояния лекарственных соединений и фазовых превращений;

-фармацевтический продукт не подвергается тепловым и химическим воздействиям;

-механическое и гидродинамическое воздействие на биологический материал незначительно;

-легко обеспечивают герметичность и асептические условия.

Основные ограничения в применении мембранных методов разделения связаны с тем, что некоторые материалы, из которых изготавливаются мембраны, не выдерживают очень низких и очень высоких значений pH и высоких температур.

Получаемая в конце цикла культуральная жидкость содержит от 0,1 до 5% сухих веществ. На последующих стадиях из нее извлекают полезные продукты (антибиотики, ферменты, аминокислоты и другие вещества), которые затем превращаются в конечную товарную форму. Большинство лекарственных соединений выпускаются в сухом виде с остаточной влажностью не более 5-12%. В промышленных условиях обезвоживание культуральной жидкости или полученных из нее промежуточных более концентрированных суспензий и растворов осуществляется двумя способами:

• механическим, без изменения агрегатного состояния воды (фильтрование, центрифугирование). Этим способом можно удалить основную часть влаги, но затруднительно получить продукт с необходимой конечной влажностью (около 5-12%);

• тепловым с изменением агрегатного состояния воды из жидкого в парообразное. К тепловому способу обезвоживания относятся выпаривание и сушка.

Удаление влаги и тепловое воздействие в ходе сушки фармацевтической продукции приводит к существенным изменениям, влияющим на их качество. Наибольшие трудности возникают при необходимости сохранить такие термолабильные объекты, как живые микроорганизмы (бактериальные препараты) или ферментные препараты. Основными причинами их термолабильности являются денатурация белка и инактивация ферментов при тепловом воздействии, увеличение концентрации электролитов и токсичных веществ при удалении влаги, а также структурные и механические повреждения в процессе сушки.

По исходному агрегатному состоянию влаги различают следующие методы сушки: сушку из жидкого состояния, испарение из твердого состояния, минуя жидкую фазу - сублимацию.

Сушка культуральной жидкости или биомассы осуществляется контактным, конвективным и радиационным способом.

При контактной сушке тепло передается высушиваемому материалу через нагретые поверхности (плиты, вальцы), а испаряющаяся влага переходит в

воздух. Для сушки продуктов биологического синтеза применяются одно- и двухвальцовые шкафные сушилки.

При конвективной сушке тепло, необходимое для процесса сушки, доставляется газообразным сушильным агентом, который играет роль теплоносителя и среды, в которую переходит влага из материала.

Этот метод широко применяется в пневматических, аэрофонтанных, распылительных сушилках и сушилках в кипящем слое.

Кроме перечисленных методов возможна также сушка в электромагнитном поле высокой частоты (диэлектрический нагрев), этот метод для сушки фармацевтической продукции из-за высокой стоимости установки, значительного расхода энергии и сложности эксплуатации не применяется.

Поскольку большинство продуктов биологического синтеза являются термолабильными веществами, то при их стремятся снизить температуру и время воздействия. Для этих целей используют вакуум или сушку тонкодисперсного материала. Еще более выгодные условия для сушки термолабильных веществ создаются при сублимации.

Сублимационный метод основан на удалении влаги из замороженного состояния путем перехода в газообразную фазу, минуя жидкую..

Характерными особенностями сублимации являются минимальные по сравнению с другими методами сушки изменения структуры высушиваемого материала и более низкие температуры высушивания. Поэтому данный метод применяется для особо термолабильных продуктов, например живых микроорганизмов, ферментов, некоторых антибиотиков.

При сублимационной сушке хорошо сохраняется структура материала, так как растворенные вещества остаются более равномерно распределенными по всему объему, а влага перемещается внутри материала в виде пара.

При сушке большую часть времени материал находится при температуре 20-30°С и лишь в конце ее, когда содержание влаги незначительно, температура повышается до 30-40°С. Так как высушивание ведется при давлении воздуха 0,1-1 Па, и концентрация кислорода снижается в десятки тысяч раз по сравнению с его концентрацией в воздухе при атмосферном давлении, окислительные процессы в высушиваемом продукте снижаются.

Электролиты и другие растворенные вещества в ходе сушки не концентрируются, что в сочетании с низкой температурой создает благоприятные условия для сохранения белков, сложных биологически активных веществ и живых клеток. Однако проблемы воздействия на лекарственные соединения возникают не по время сушки, а на подготовительном этапе замораживания.

Так как, причиной гибели клеток может быть чрезмерное обезвоживание в процессе сублимационной сушки, для защиты их от гибели при замораживании и последующем высушивании применяются специальные защитные среды, включающие глицерин, сахарозу, поливинилпирролидон и другие вещества, замедляющие образование внутриклеточного льда. Эти

вещества уменьшают концентрирование электролитов и защищают клетки от грубого необратимого обезвоживания.

Полученные сухие фармацевтические продукты обычно используются в измельченном состоянии. Иногда, при распылительной сушке дополнительного измельчения высушенного продукта не требуется. В других случаях, когда готовый продукт предварительно очень быстро должен растворяться или смешиваться до гомогенного состояния, вводят операцию измельчения.

Измельчение зависит от размера частиц исходного материала и соответственно делится на несколько классов:

•дробление - крупное, среднее, мелкое;

•помол - грубый, средний, тонкий, коллоидный.

В промышленных условиях измельчение осуществляется одним из следующих способов: раздавливание, раскалывание, истирание и ударом. Иногда применяют комбинации этих методов.

Высушенные порошковидные препараты трудно дозировать, расфасовывать и транспортировать. Для увеличения средней плотности, уменьшения объема и снижения пылеобразования препараты гранулируют. Известны различные способы *гранулирования:* экструзия с последующим центробежным скатыванием, псевдоожижение и орошение жидкостью порошка с нанесением глазированной пленки на поверхность гранулята, прессование и формовка с помощью формовочных машин сухим или жидким способом.

Для объемного напорного дозирования жидких сред в точных и регулируемых количествах используют насосы и дозировочные агрегаты**.**

Для дозирования и расфасовки сыпучих материалов предназначены пневматические дозаторы, автоматические дозировочные весы, весовыбойные аппараты, ленточные дозаторы, вибродозаторы.

В значительной степени эффективность фармацевтического производства зависит от постановки микробиологического контроля. Контролируются музейная культура микроорганизма-продуцента, посевной материал, питательные среды, воздух, культуральная жидкость, а также готовая продукция. В зависимости от назначения микробиологической продукции предъявляются различные требования к ее обсемененности. Продукты, используемые в медицинской промышленности, должны быть практически свободными от микроорганизмов.

Одна из главных задач фармацевтического производства является поддержание в активном состоянии производственного штамма. В процессе неоднократных пересевов микроорганизмов, а также длительного воздействия условий культивирования с течением времени могут возникнуть спонтанные мутации, которые приводят к снижению продуктивности производственной культуры. В связи с этим периодически (два раза в год, а в отдельных случаях и чаще) проводят пересевы производственного штамма и отбор вариантов с наиболее высокой продуктивностью.

Биохимический контроль количества и специфической активности продуктов микробиологического синтеза позволяет проследить за выходом промежуточного и конечного продуктов. Этот вид контроля обеспечивает выпуск фармацевтической продукции, отвечающей требованиям стандартов.

По мере дальнейшего развития биотехнологии все более остро встает проблема контроля качества сырья, используемого для составления питательных сред, и качества продуктов биосинтеза. В настоящее время сырье и питательные субстраты для микробного промышленного биосинтеза оценивают по составу тех или иных компонентов, связанных с качеством.

Исключительно важен контроль качества продуктов биосинтеза, используемых в медицине: антибиотиков, ферментов, других фармацевтических соединений.

В соответствии с официальной методикой существует классификация показателей для оценки качества микробиологической продукции. Показатели назначения характеризуют свойства продукции, определяющие основные функции, для выполнения которых она предназначена, и обусловливают область ее применения. К группе показателей назначения относятся две важные подгруппы: показатели состава и показатели функциональной эффективности.

Показателями состава являются:

-содержание основного вещества;

-содержание посторонних примесей;

-показатели структуры и физико-химические характеристики.

Классификация показателей, применяемых при оценке уровня качества продукции

Признак классификации	Группа показателей качества продукции
Характеризуемые свойства	Показатель назначения Показатель сохранности Качественные характеристики Технологические показатели *Патентно-правовые* Экологические показатели Показатели безопасности
Способ выражения	Показатели, выраженные в натуральных единицах Показатели, выраженные в стоимостных единицах
Количество характеризуемых свойств	Единичные показатели
Применение для оценки	Комплексные показатели Базовые показатели
Стадия определения значений показателей	Относительные показатели Прогнозируемые показатели Производственные показатели

	Показатели потребления

Показатели содержания основного вещества включают:

• содержание (%) сырого протеина в дрожжах в пересчете на абсолютно сухое вещество (АСВ);

• содержание (%) белка в пересчете на АСВ;

• содержание (г) антибиотиков на 1 кг препарата;

• содержание (мг) витамина на 1 кг препарата;

• титр препарата;

• активность ферментных препаратов;

• коэффициент биологической активности;

• другие показатели.

Показатели содержания посторонних примесей:

• содержание (%) углеводородов в белке;

• содержание металломагнитных примесей в белке;

• содержание в продукции веществ, отличных по составу от основного компонента и снижающих качество продукции;

• содержание (%) золы в пересчете на АСВ и др.

Показатели структуры и физико-химические характеристики:

• крупность частиц;

• влажность (%);

• насыпная масса (г/л);

• скорость растворения;

• плотность (г/см^3) и др.

Контроль качества биопрепарата по показателям назначения сводится к анализу его состава и физико-химических свойств.

Качественные характеристики продукции (внешний вид, цвет, запах, вкус) рекомендуется определять органолептическим методом в сравнении с базовым образцом.

Также любой биотехнологический препарат (например, вакцина) подвергается стандартизации (контрольная проверка готового продукта) с помощью следующих тестов:

1) тест на стерильность;

2) тест на присутствие консерванта;

3) проверка на присутствие адъювантов (например, алюминиевые квасцы);

4) проверка на активность и идентичность.

Проверке подлежат документация, образцы, маркировка и упаковка. Все вышеперечисленные тесты необходимы для того, чтобы готовый продукт обладал необходимыми свойствами: был безопасен, надёжен и обладал необходимыми профилактическим или лечебным действием. Контроль качества, стандартизация биотехнологических препаратов проводится по соответствующим нормативным документам: фармкопейными статьями для каждого препарата. Международные рекомендации (рекомендации ВОЗ), касающиеся таких требований, облегчают обмен биологическими

препаратами между отдельными странами и служат руководством для работников, ответственных за изготовление этих препаратов, а также для тех, кто принимает решение по вопросам, касающимся методов их анализа и контроля.

На современном этапе развития биотехнологического производства лекарственных, профилактических и диагностических средств высокое качество продукции может быть достигнуто с учетом ряда общих требований к организации и контролю производства. Такие требования должны предупреждать возможные ошибки при проведении технологических процессов и вести к созданию экологически безопасных предприятий.

Их общее название - GMP расшифровывается как "Good Manufacturing Practice" и переводится как "Правила хорошего (или надлежащего) производства".

GMP следует понимать, как единую систему требований по организации производства и контролю качества любых лекарственных средств от начала переработки сырья до производства готовых продуктов, включая общие требования к помещениям, оборудованию и персоналу; они также полностью распространяются на все биотехнологические производства, занятые изготовлением лекарственных средств.

Правила GMP содержат лишь минимальные практические указания, но являются общим руководством, регламентирующим, как должен быть организован производственный процесс и как следует организовать контрольные испытания.

Существуют национальные GMP (у более чем 20 стран - США, Япония, Германия, Индия и др.), региональные GMP (ЕЭС), GMP ВОЗ. Правила, разработанные ВОЗ, составляют один из основных элементов "Системы удовлетворения качества фармацевтических препаратов в международной торговле, которая рекомендована всем странам-членам ВОЗ. Она является особым видом многостороннего соглашения с целью оказания помощи органам здравоохранения импортирующих (в том числе развивающихся) стран в оценке юридического статуса и технического уровня закупаемых ими лекарственных средств. Она дает определенную гарантию странам-импортерам.

Следует отметить, что требования GMP относятся только к препаратам медицинского применения.

Все национальные и другие правила GMP включены в сборник "International drug GMP", который периодически переиздается (в США).

Правила GMP - национальные, региональные, международные, - содержат следующие основные главы: введение, терминология, персонал, здания и помещения, оборудование, процесс производства и экологическая безопасность, лабораторный контроль, регистрация и отчетность.

Не анализируя подробно всех частей соответствующего официального документа (документов), отметим отдельные требования по некоторым из разделов.

Требования к персоналу связаны с уровнем его квалификации, состоянием здоровья, личной гигиеной, порядком использования технологической одежды и обуви, материалами для их изготовления (например безворсовая ткань), переподготовкой и медицинскими осмотрами персонала.

Требования к зданиям и помещениям уточняют их расположение, планировку с целью, например, предотвращения смешения различных видов и серий исходного сырья, полупродуктов и готовых лекарственных средств. Перечисляются специальные помещения для проведения конкретных технологических операций и т.д. Небезынтересно в этой связи отметить, что в ряде национальных руководств по GMP указывается, в частности, на технологические операции, связанные с производством, обработкой и упаковкой антибиотиков пенициллинов и цефалоспоринов, которые рекомендуется проводить в помещениях, изолированных от тех, где изготавливаются другие лекарственные средства. Это объясняется тем, что беталактамы могут проявлять аллергенное действие в крайне незначительных количествах, попадающих в другие лекарственные средства, для того, чтобы у сенсибилизированных больных возникли серьезные осложнения.

Значительное внимание уделяется в GMP облицовочным материалам, сантехнике и вопросу поддержания чистоты в помещениях.

Под особый контроль попадают помещения, где производятся стерильные лекарственные средства - в отношении их изолированности, особенностей планировки, вентиляции, поддержания постоянной разности давлений между отдельными помещениями в 3-5 мм вод.ст., причем, в помещениях более высоких классов чистоты давление должно быть выше. Нестерильные лекарственные средства не должны производиться в тех помещениях, где изготовляется стерильная продукция.

Многочисленны требования GMP к конструкции, размерам и расположению оборудования, особенно используемого при производстве стерильных лекарственных средств. В качестве одного из примеров можно отметить указание на то, что при производстве инъекционных препаратов следует избегать фильтров, отделяющих волокна. Если они вынужденно применяются (асбест и т.п.), после них следует использовать дополнительные мембранные фильтры с размером пор не более 0,45 мкм.

Во всех GMP даются подробные указания, имеющие целью оптимальное проведение всех этапов процесса производства. Правила касаются: 1) отбора проб, контроля качества сырья; 2) осуществления контроля непосредственно за процессами производства, обработки, упаковки. Даются правила для переработки бракованных серий.

Применительно к производству антибиотиков (стадия ферментации) непосредственно относится указание на карантин, которому должно подвергаться сырье (т.е. компоненты, входящие в комплексные среды), на необходимость статистических критериев вариабельности компонентов

сырья, на проверку определенных видов сырья на пирогенность.

Нормируется содержание микроорганизмов в воде для очистки и промывки получаемых лекарственных средств.

Контроль процесса производства лекарственных препаратов должен осуществляться в соответствии с технологической документацией. Следует отметить, что правила GMP разных стран не совпадают с предлагаемыми методами стерилизации готового продукта. В целом преимущество отдается термическим методам стерилизации. GMP некоторых стран допускают также радиационную стерилизацию и стерилизацию окисью этилена.

Большое внимание в GMP уделяется обеспечению четкого выполнения производственных инструкций.

Подробно регламентируется перечень документов, точек контроля, возможных отклонений от принятых норм. Регламентируются способы фиксации результатов.

Набор требований по регистрации и отчетности, содержащийся в GMP, позволяет проследить за ходом выполнения производственного процесса и точно установить в случае необходимости всю последовательность действий персонала, приведшую к отклонению качества продукта от требуемого параметра.

Само собой разумеется, что правила GMP предусматривают строгую регламентацию тех выбросов, которые могут поступать от фармацевтических и биотехнологических предприятий в окружающую среду. Правила рекомендуют практически полное предотвращение поступления штаммов-продуцентов рекомбинантных белков в стоки и газо - воздушные выбросы, исключение попадания аллергенноактивных продуктов микробиологического синтеза в атмосферу с помощью различных технических решений, предотвращение сброса со сточными водами биотехнологических полупродуктов, способных повлиять на активность и состав биоценозов, используемых на установках биологической очистки загрязненной воды.

Имеющие силу закона в ряде стран правила GMP позволяют предприятиям выпускать конкурентоспособную продукцию. Как показал международный опыт внедрения в медицинскую практику новых лекарственных препаратов, производимых биотехнологическими способами, организация их предварительных испытаний также должна подчиняться определенным правилам. Официальные инстанции, дающие разрешение на промышленный выпуск нового препарата, требуют соблюдения этих правил и соответствующего оформления документации. Всем этим повышается достоверность и объективность экспериментальных результатов и результатов испытаний в клинике.

Правила GLP расшифровываются как "Good Laboratory Practice", что означает правильную (надлежащую) организацию проведения лабораторной работы при исследовании препарата. Правила GLP охватывают всю систему

предклинических испытаний. В качестве лишь одного из примеров отметим, что правилами предъявляются определенные требования к планировке помещений вивария, где содержатся подопытные животные, к условиям содержания животных, их подбору и т.п. Организация предклинических лабораторных испытаний должна обеспечивать объективность при сопоставлении данных в контроле и опыте.

Весьма существенное значение для разрешения на промышленный выпуск нового препарата имеют правила GCP "Good Clinical Practice", т.е. надлежащая организация работы при проведении клинических испытаний. Соблюдение правил GCP позволяет получать объективные результаты и дает определенные гарантии приближения к максимальной безопасности в случае впервые вводимых человеку препаратов.

Вопросы для самоконтроля

1. Этапы подготовки культуральной жидкости к переработке.
2. Основные типы сепараторов, применяемые в биотехнологии.
3. Дезинтеграция. Основные способы дезинтеграции.
4. Методы разделения веществ, применяемые в биотехнологии.
5. Контроль качества продуктов биосинтеза.
6. Тесты, применяемые при стандартизации лекарственных средств.
7. GMP - как единая система требований по организации производства и контролю качества лекарственных средств.

5. АНТИБИОТИКИ. КЛАССИФИКАЦИЯ. ПОЛУЧЕНИЕ АНТИБИОТИКОВ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА АНТИБИОТИКОВ.

Антибиотики – это химиотерапевтические вещества, вырабатываемые микроорганизмами или получаемые из других источников (водоросли), а также получаемые путем химического синтеза, обладающие способностью подавлять возбудителя в организме больного.

Химиотерапевтические средства – это лекарственные вещества, используемые для подавления жизнедеятельности и уничтожения микроорганизмов в тканях и средах больного, обладающие избирательным, этиотропным (действующим на причину) действием.

Чтобы выбрать антибиотик для лечения того или иного заболевания, необходимо иметь представление каким образом антибиотики могут воздействовать на микроорганизмы. Все антибиотики можно классифицировать:

- по механизму действия:

1. Нарушающие синтез биомакромолекул; циклосерин; гликопептиды; ванкомицин; тейкоплакин).

2. Нарушающие функции цитоплазматической мембраны (циклические полипептиды, полиеновые антибиотики).

3.Нарушающие синтез белка в рибосомах (группа левомицетина, тетрациклина, макролиды, линкозамиды, аминогликозиды, фузидин, анзамицины).

4. Ингибиторы синтеза РНК и ингибиторы метаболизма фолиевой кислоты (рифампицины).

5. Ингибиторы синтеза мРНК (актиномицин).

-по типу действия:

1. Антибиотики с бактерицидным действием приводят к гибели бактерий путем влияния на клеточную стенку и цитоплазматическую мембрану и приводящие к гибели бактерии.

2. Антибиотики с бактериостатическим действием влияют на синтез макромолекул и останавливают размножение бактерий.

- по спектру действия:

1. Антибиотики с преимущественным действием на грамположительные микроорганизмы (линкозамиды, биосинтетические пенициллины, фузидин, ванкомицин).

2. Антибиотики с преимущественным действием на грамотрицательные микроорганизмы (монобактамы, циклические полипептиды).

3. Антибиотики широкого спектра действия (аминогликозиды, левомицетин, тетрациклины, пинемы, анзамицины, цефалоспорины).

- по химической структуре

Широкое применение антибиотиков в медицине, сельском хозяйстве и других отраслях народного хозяйства поставило задачу получения этих биологически активных веществ в больших количествах. Решение этой задачи стало возможным благодаря созданию мощной фармацевтической промышленности.

В основе промышленного производства антибиотиков лежит ряд последовательных этапов: получение высокопродуктивных штаммов-продуцентов, разработка наиболее благоприятных условий культивирования продуцента антибиотика с максимальным биосинтезом этого вещества, подбор и внедрение в практику соответствующих методов выделения и очистки антибиотика, создание готовых препаратов и контроль их качества. Каждый из этих этапов должен обеспечиваться соответствующими специалистами (генетиками, микробиологами, технологами и др.). Производство антибиотиков представляет ныне мощную, хорошо развитую отрасль, входящую в фармацевтическую промышленность. Она занимает одно из ведущих мест в производстве лекарственных препаратов. Особенно широко она развита в США, Англии, Японии, Франции, Италии и других странах. Например, в США ежегодно выпускается антибиотиков и их производных на сотни миллионов долларов.

Среди антибиотиков выделяют *β-лактамы*

Пенициллины. Пенициллин впервые получен из культуральной жидкости в аморфном, а затем – в кристаллическом виде А. Флемингом, Х. Флори и Е. Чейном в 1940 г. До сих пор антибиотики пенициллинового ряда составляют наиважнейшую группу химиотерапевтических препаратов. Ядром пенициллинов является 6-аминопенициллиновая кислота (6-АПК), которую используют для получения полусинтетических пенициллинов.

Один водород в аминогруппе 6-АПК может быть заменен на какой-либо радикал (R), усиливающий и (или) расширяющий (изменяющий) антимикробный спектр полусинтетического производного. Обычно 6-АПК получают из бензилпенициллина (пенициллина G).

В настоящее время в различных странах многие антибиотики и их полусинтетические производные на их основе производят биосинтетически с помощью Penizillum notatum или Penizillum chrysogenum.

Цефалоспорины – являются большой группой экстрацеллюлярных β-лактамных антибиотиков, в которых шестичленное дигидротиазиновое кольцо соединено с β -лактамным кольцом. Благодаря этому ядром цефалоспоринов является 7-аминоцефалоспорановая кислота – 7-АЦК *(цефемовое ядро),* впервые выделенная в ходе очистки цефалоспорина С – продуцент Cephalosporium acremonium.

Известно около 20 цефалоспоринов, созданных методом полусинтеза из АЦК: цефалоридин (цепорин), цефуроксим, цефалотин, цефацетрил, цефалексин, цефокситин, цефазолин, цефаридин, цецефотаксим, цефтриаксон, цефтазидим и др.

Боковые цепочки, содержащие 2-аминотиазолил как R_1 в цефотаксиме, цефтриаксоне, цефтазидиме и некоторых других, усиливают активность цефалоспоринов против стрептококков и грамотрицательных бактерий.

Иминометоксигруппа в той же позиции, например, в цефуроксиме, обеспечивает активность антибиотика против стафилококков и грамотрицательных бактерий.

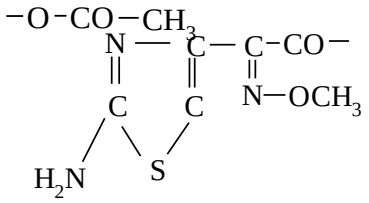
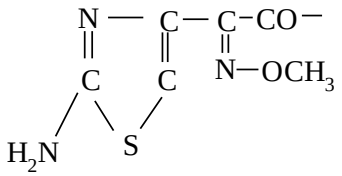
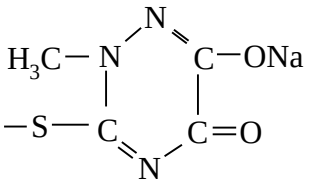
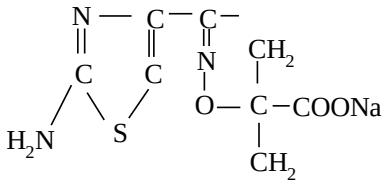
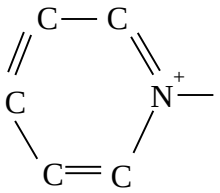
В таблице приведены радикалы R_1 и R_2.

1 – *Оксацефемы* – сходны с цефалоспоринами, у которых атом серы в дигидротиазиновом *(цефеконовом)* кольце замещен на кислород. Представителем такой группы антибиотиков является широкоспектральный препарат *латамоксеф (мексалактам),* в котором 7-α-метоксигруппа стабилизирует молекулу и придает устойчивость большинству β-лактамаз.

Клавамы – β-лактамные антибиотики, отличающиеся от пенициллинов тем, что в тиазолидиновом кольце последних сера заменена на кислород *(клавемовое оксазолидиновое кольцо)* и в позиции 6 нет боковой цели.

Такой антибиотик – *клавулановая кислота* выделена из Streptomyces clavuligerus. Она слабо активна в отношении бактерий, но является потенциальным ингибитором стафилококковой β-лактамазы и β-лактамазы, образуемой грамотрицательными бактериями.

Радикалы, входящие в состав цефалоспоринового ряда

R_1	R_2	Антибиотик
 2-аминотиазол-4-ил-(метоксиимино)ацетил	О-ацетил	Цефотаксим
 2-аминотиазол-4-ил-(метоксиимино)ацетил	 6-гидрокси-2-метил-5-оксо-2,5-дегидро-1,2,4-триазин-3-ил-тио…натриевая соль	Цефтриаксон
		Цефтазидим

1 – *Карбапенемы* – это новое семейство β-лактамных антибиотиков, представляющих собой аналоги пенициллинов или клавамов, в которых сера у первых, и кислород у вторых замещены на углерод:

К этому семейству относятся *оливановые кислоты* и *тиенамицин* Их продуцентами являются стрептомицеты. Эти антибиотики обладают широким антимикробным спектром и являются выраженными ингибиторами β-лактамаз.

Нокардицины – новая группа β-лактамных антибиотиков, продуцируемых бактериями из рода Nocardia. Выделены нокардицины A, B, D, E, F, G.

Монобактамы – это моноциклические монобактамные антибиотики, продуцируемые штаммами бактерий, например, Pseudomonas acidophila или Geuconobacter species.

Их ядром является 3-аминомонобактамовая кислота (3-АМК). Ее можно получить из природных монобактамов или из 6-АПК.

Антибиотики – тетрациклины – это антибиотики с широким спектром антибактериального действия. Их продуцентами являются стрептомицеты. Некоторые тетрациклины относятся к ряду полусинтетических препаратов.

Антибиотики - гликозиды. Среди этой группы антибиотиков выделяют группы, содержащие O-, S- и N- гликозидные связи. К числу первых относят аминогликозидные антибиотики и новобиоцин, ко вторым – клиндамицин и линкомицин, к третьим – некоторые нуклеозидные антибиотики.

Антибиотики – О-гликозиды. Аминогликозиды – содержат аминосахара в своей структуре. Большинство из них (канамицин, гентамицин и др.) продуцируются актиномицетами. Все антибиотики-аминогликозиды обладают широким спектром действия на различные патогенные бактерии.

Продуцентами гентамицинов является Mieromonospora. purpurea. *Антибиотики – макролиды* имеют О-гликозидные связи (эритромицин, олеандомицин, триацетилолеандомицин, спирамицин и др.). Они продуцируются стрептомицетами и проявляют активность против большинства грамположительных и некоторых грамотрицательных бактерий и содержат в своей структуре макроциклическое лактонное кольцо, связанное с углеводными остатками, из которых аминосахар, если он имеется, всегда располагается ближе к макролактону, чем нейтральный углевод.

Олеандомицин, его эфир - *триацетилолеандомицин* и *спирамицин* сходны по спектру антибактериального действия с эритромицином, но несколько слабее его активности.

Новобиоцин продуцируется культурой Streptomyces spheroides, активен против возбудителей пневмонии, некоторых кишечных и раневых инфекций, ангин и флегмон. По химической структуре – это О-гликозид (амидогликозид), агликон которого существенно массивнее углеводной части.

Оливомицин – О-гликозидный антибиотик, в котором углеводная часть представлена триозой и биозой, между которыми как бы «вставлен» агликон-оливин (хромомицинон).

Оливомицин является представителем большой группы антибиотиков – аналогов *ауреоловой кислоты (митрамицина),* активных против грамположительных бактерий и отдельных опухолей. Оливомицин продуцируется Streptomyces olivoreticuli.

Дауномицин (рубомицин) – О-гликозидный антибиотик из группы антрациклинов, образуемый Streptomyces species. Антибиотик обладает противомикробным и противоопухолевым действием.

Блеомицин – О-гликозидный антибиотик, обладающий иммуносупрессивным и противоопухолевым действием, синтезируемый стрептомицетами.

Ристомицин А (ристоцетин) – О-гликозидный антибиотик, в составе которого имеется циклизованная агликоновая часть (циклопентит) и углеводный компонент, включающий ристозамин, маннозу, арабинозу, глюкозу и рамнозу, активен против грамположительных бактерий.

Антибиотики - S-гликозиды

Из этой группы антибиотиков наиболее известны *линкомицин* и *клиндамицин,* гликоном которых является метил. Из них клиндамицин является производным линкомицина, у которого гидроксил в позиции 7 заменен на хлор.

Клиндамицин лучше всасывается в кровь из кишечника. Оба антибиотика активны преимущественно против грамположительных кокков.

Антибиотики - N-гликозиды

Гужеротин – антибиотик широкого спектра антимикробного действия, продуцируется культурой Streptomycis gougerotii.

Пуромицин – N-гликозидный антибиотик, применявшийся при изучении и расшифровке процесов элонгации, подобен 3'-концу аминоацил-тРНК, связывающейся с определенным участком рибосомы. Продуцентом пуромицина является Streptomyces alboniger. Антибиотик ингибирует, биосинтез белка многих микроорганизмов, включая трипаносомы, однако терапевтическое значение его невелико.

Антибиотики -депсипептиды

Они продуцируются бациллами и проявляют активнсть против грамположительных и/или грамотрицательных патогенных бактерий (бацитрацины, грамицидины, полимиксины и др).

В таблице представлены продуценты данных антибиотиков.

Табл. 3.1.2

Продуценты антибиотиков-диспепсидов

продуцент	***антибиотик***	***активность против***
Bacillus lichenitormis	Бацитрацины (10 форм)	Грамположительных бактерий и грамотрицательных коков
Bacillus brevis var.G.-B.	Грамицидины (5 форм)	Грамположительных бактерий и грамотрицательных коков
Bacillus polymixa	Полимиксины	Грамотрицательных бактерий
Bacillus.circulans	Колистины	
	Циркулины (22 формы)	

Полимиксин B_1, циркулин А и колистин различаются по единичным аминокислотным остаткам.

К циклопептидным антибиотикам относится также *циклоспорин* А, продуцируемый мицелиальными грибами Cephalosporium lucidum и Tolypoeladium inflatum-Bauveria nives. Отличительным свойством данного антибиотика является его иммуносупрессивное действие, его преимущественно используют трансплантологии. Также он проявляет антифунгицидную активность.

Антибиотики – актиномицины составляют большую группу сходных веществ, синтезируемых стрептомицетами. По химическому строению их относят к хромопептидам, содержащим феноксазиновую хромофорную группу и два пентапептида в форме циклических лактонов. Некоторые из них обладают противоопухолевым и иммуносупрессивным действием. На практике хорошо известен *актиношцин (дактиномицин),* ингибирующий синтез м*РНК.*

Антибиотики – полиены-это группа лекарственных препаратов, продуцентами которых являются стрептомицеты и некоторые мицелиальные грибы, образующие структуры с четырьмя-семью сопряженными двойными связями. В медицинской практике наибольшее распространение получили нистатин, фумагиллин, амфотерицин В и полусинтетический амфоглюкамин, обладающие противогрибковым действием (преимущественно – в отношении патогенных дрожжевых организмов и некоторых других видов грибов). Фумагиллин ингибирует стафилококки, дизентерийную амебу, бактериофаги. Нистатин – аналог амфотерицина В, но в его цепочке (в позиции 20-27) содержится 4 конъюгированных двойных связи.

Антибиотики – анзамицины образуются актиномицетами и некоторыми растениями. В молекулах антибиотиков данной группы к ароматическому ядру присоединяется алифатическая анза-цепь. Наиболее известными из них являются *рифоцин (рифампицин SV), рифампицин* и *рифамид.* Анзамицины – широкоспектральные антибиотики, ингибирующие бактерии, отдельные вирусы и некоторые эукариотические клетки.

Рифампицин – продуцент Streptomyces mediterranei, является одним из лучших химиотерапевтических средств при туберкулезе, проявляющим бактерицидное действие против Mycobacterium tuberculosis. Он проникает в спинномозговую жидкость и поэтому эффективен при туберкулезном менингите.

Антибиотики-стероиды продуцируются мицелиальным грибом Fusarium coccineum, активны в отношении многих типов грамположительных бактерий (особенно – стафилококков). К ним относят *фузидиевую кислоту,* выпускаемую в виде натриевой соли.

Прочие антибиотики

Гризеофульвин – продуцируется нитчатым грибом Penicillium griseofulvum и другими, активен в отношении болезнетворных грибов – дерматофитов.

Трихотецин – антифунгицидный антибиотик, используемый прежде всего в ветеринарии и растениеводстве, продуцируется нитчатым грибом Trichothecium roseum и некоторыми другими несовершенными грибами.

Более половины известных антибиотиков продуцируются актиномицетами. К этой группе антибиотиков относятся стрептомицин и другие антибиотики-гликозиды (неомицины, канамицины), тетрациклины, антибиотики-макролиды (эритромицин, олеандомицин) и анзамицины (римфампицин.

Другим важным продуцентом являются плесневые грибы – различные виды *Penicillium,Cephalosporium,* осуществляющие биосинтез противоопухолевых, антибактериальных и противовирусных лекарственных препаратов.

Бактерии рода *Bacillus* продуцируют большинство антибиотиков-полипептидов. Они, как правило, высокотоксичны, но некоторые из них (грамицидин, полимиксин и другие) применяются в медицине. Небольшая группа антибиотиков продуцируется лишайниками, водорослями и другими низшими растениями.

По способу получения антибиотики можно подразделить на три основные группы.

1. К первой группе относят антибиотики, получаемые путем микробиологического синтеза на основе плесневых грибов или актиномицетов. Этим способом
получают антибиотики тетрациклинового ряда, природные пенициллины, антибиотики-гликозиды, макролиды и некоторые другие.

2. Ко второй группе относят антибиотики, получаемые за счет химического синтеза из простых органических веществ. Его используют для получения антибиотиков, имеющих несложную химическую структуру – левомицетин и его производные.

3. К третьей группе относят антибиотики, получаемые путем сочетания микробиологического и химического синтеза – полусинтетические антибиотики. На основе трансформации молекул природных антибиотиков получают полусинтетические пенициллины, цефалоспорины, тетрациклины и другие.

Получение природных антибиотиков основано на их биосинтезе в клетках микроорганизмов-продуцентов и включает следующие основные этапы: поиск и селекция высокопроизводительных штаммов продуцентов; подбор оптимального состава питательных сред; разработка и аппаратурное оформление процесса ферментации; выделение и очистка целевого продукта.

Особую значимость в производстве антибиотиков приобретает поиск и селекция высокопроизводительных штаммов-продуцентов. Отобранные наиболее перспективные образцы далее подвергаются индуцированному мутагенезу. Чаще всего для этого используют искусственную мутацию, воздействуя на природный продуцент различными физическими и химическими факторами – ультрафиолетовым, ионизирующей радиацией и химическими веществами. В результате таких воздействий получают штаммы, которые по

своей продуктивности целевого продукта – антибиотика в десятки и даже сотни раз превосходят по своей продуктивности исходные (природные) формы.

Широкое применение антибиотиков в медицине, сельском хозяйстве и других отраслях народного хозяйства поставило задачу получения этих биологически активных веществ в массовых масштабах. Решение этой задачи стало возможным благодаря созданию мощной фармацевтической промышленности.

В основе промышленного производства антибиотиков лежит ряд последовательных этапов: получение высокопродуктивных штаммов-продуцентов, разработка наиболее благоприятных условий культивирования продуцента антибиотика с максимальным биосинтезом этого вещества, подбор и внедрение в практику соответствующих методов выделения и очистки антибиотика, создание готовых препаратов и контроль их качества. Каждый из этих этапов должен обеспечиваться соответствующими специалистами (генетиками, микробиологами, технологами и др.). Производство антибиотиков представляет ныне мощную, хорошо развитую отрасль, входящую в фармацевтическую промышленность. Она занимает одно из ведущих мест в производстве лекарственных препаратов. Особенно широко она развита в США, Англии, Японии, Франции, Италии и других странах. Например, в США ежегодно выпускается антибиотиков и их производных на сотни миллионов долларов.

По общему производству антибиотиков наша страна занимает ведущее место в мире.

Технологический процесс производства антибиотиков состоит из пяти стадий. На первой стади осуществляется подготовка питательной среды и посевного материала (инокулята).

Для каждого продуцента антибиотика и вновь полученного штамма разрабатывается своя оптимальная среда, которая должна отвечать следующим основным требованиям: а) обеспечивать хороший рост продуцента и максимально возможное образование антибиотика; б) содержать доступные и дешевые компоненты; в) обладать хорошей фильтрующей способностью; г) обеспечивать применение наиболее экономичных и эффективных приемов выделения и очистки антибиотика. Стерилизация питательных сред в промышленных условиях осуществляется двумя основными методами: периодическим и непрерывным.

Периодический метод 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 этой температуре в течение 30 – 60 мин (в зависимости от объема среды и ее состава), после чего среда охлаждается до 27—30°С.

Непрерывный метод стерилизации целесообразно применять при использовании 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.

Далее нагретая в колонке среда поступает в специальный аппарат – выдерживатель, где она при температуре 125-130°С находится определенное время (5-10 мин). Затем она поступает в змеевиковый холодильник, охлаждается до 30 – 35°С (на выходе) и поступает в ферментер. Непрерывный метод стерилизации имеет ряд преимуществ перед периодическим методом: возможность автоматического регулирования процесса, быстрый и равномерный нагрев среды, обеспечение более полной стерильности среды и другие факторы. При применении в качестве отдельных компонентов субстрата термолабильных веществ их, как правило, следует стерилизовать отдельно в условиях более мягкого режима.

Стадия биосинтеза – основная биологическая стадия в процессе получения антибиотика, обеспечивающая для продуцента такие условия развития, которые бы способствовали максимальному уровню образования БАВ.

Эффективность стадии биосинтеза определяется генетическими особенностями организма, составом питательной среды, режимом развития продуцента и зависит от времени максимального образования антибиотика, стоимости компонентов среды, пеногасителей, энергетических затрат, связанных с процессом развития организма-продуцента. В энергетические затраты включаются расходы энергии при стерилизации среды, ферментера и коммуникаций, а также систем перемешивания культуральной жидкости и продувания воздуха через нее.

В производстве антибиотиков используют методы *периодического, непрерывного культивирования,* а также методы, занимающие промежуточное положение между периодическим и непрерывным культивированием – *полунепрерывный отъемно-доливной метод.*

При непрерывном культивировании клетки продуцента размножаются со скоростью, зависящей от притока питательных веществ и некоторых других условий, при этом часть объема культуральной жидкости постоянно вытекает с той же скоростью, с какой подается питательная среда в аппарат.

Метод непрерывного проточного культивирования может быть организован как процесс полного вытеснения и как процесс полного смешения.

Применение *процесса полного вытеснения* возможно при культивировании анаэробных микроорганизмов в ферментере, представляющем собой трубу, в которую с одной стороны непрерывно подается питательная среда и посевной материал, а с другой стороны производится отбор культуральной жидкости. Процесс происходит без перемешивания и аэрации. Когда среда и посевной с материал попадают в ферментер, популяция продуцента находится в лаг-фазе, а на выходе из

ферментера культура может находиться в любой фазе в зависимости от скорости подачи среды. При этом воспроизводится кинетика роста продуцента, но не во времени, а в пространстве.

В *процессе полного смешения* размножение культуры происходит в ферментере при интенсивном перемешивании и аэрации. Во всем объеме культуральной жидкости условия должны быть одинаковыми. Процесс полного смешения по типу системы «турбидостат» и «хемостат».

В системе «турбидостат» в ферментере плотность популяции поддерживают постоянной. При быстром потоке среды в данной системе 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.

В системе «хемостат» величину клеточной популяции контролируют с помощью отдельных компонентов питательной среды. Среду составляют так, чтобы один из компонентов, необходимый для роста биомассы клеток, был в недостаточном количестве или лимитировал рост, поддерживая тем самым культуру в нужном состоянии. Используя батарею ферментеров, можно в каждом аппарате постоянно поддерживать продуцент в определенной фазе размножения.

Применение отъемно-доливного метода удается в 2 – 3 раза увеличить время пребывания продуцента в активной форме. Недостаток этого метода заключается в том, что доливы осуществляются питательной средой плотного состава. Сущность этого метода заключается в том, что в определенное время, начиная с экспоненциальной фазы, по специально отработанной программе, в культуральную жидкость добавляют отдельные компоненты питательной среды – раствор сахара, сульфат аммония, жир и т.д., поддерживая их концентрацию на постоянном оптимальном уровне – в начале для роста биомассы клеток, а затем – для синтеза целевого продукта.

Периодически из ферментера отбирают определенные объемы культуральной жидкости, все возрастающей концентрацией целевого продукта. Ферментацию прекращают после того как активность продуцента достигнет максимума. Этим 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, то есть увеличить выход конечного продукта в расчете на потребленный субстрат.

Из всего разнообразия используемых в биотехнологии способов наиболее сложными являются регулируемые ферментации с соблюдением условий асептики. Асептические условия предполагают введение дополнительных стадий, обеспечивающих стерилизацию питательных сред и подаваемого в ферментер воздуха.

Стерильную питательную среду в инокуляторе первой ступени засевают с соблюдением правил асептики через специальное устройство посевным материалом, который предварительно был выращен в колбах в лабораторных условиях. В аппарате поддерживаются необходимые режимы для размножения клеток продуцента – температуру, аэрацию, скорость перемешивания, а также контролируют и оценивают развитие культуры.

При достижении требуемых стадий развития и количества биомассы посевной материал передавливают стерильным сжатым воздухом по посевному колектору перемещают в посевной аппарат большей вместимостью. На этой второй ступени выращивания посевного материала стремятся получить больше биомассы клеток, чтобы в ферментере можно было создать необходимую для данного штамма продуцента исходную плотность популяции. Если это требование может быть выполнено без второй ступени, то ферментационную среду засевают непосредственно из инокулятора.

При получении пенициллина с помощью микробиологического синтеза используют питательную среду (она же пригодна для приготовления инокулята), включающую глюкозу – 1,5%, лактозу – 5%, сульфат аммония и фосфаты – 0,5 -1%, кукурузный экстракт – 2-3%, «предшественники антибиотика – фенокси- или фенилуксусная кислота – 0,3-0,6%, мел – 0,5-1%, пеногаситель – 0,5-1%. Температуру ферментации поддерживают на уровне 22 – 26°С при pH от 5,0 до 7,5 и постоянной аэрации (1 $м^3$ воздуха на 1 $м^3$ среды в 1 минуту), продолжительность процесса – 4 суток.

В современных условиях развития фармацевтической промышленности наиболее перспективным методом выращивания микроорганизмов-продуцентов антибиотиков и других биологически активных соединений является метод глубинного культивирования, хотя используют и периодическое культивирование продуцентов.

Для получения антибиотиков в промышленных масштабах применяются специальные герметически закрытые емкости или ферментеры, обеспечивающие глубинное выращивание продуцентов.

Аэрирование культуры в ферментере происходит в результате подачи подогретого до необходимой температуры стерильного воздуха через специальные приспособления — барботеры, а также благодаря перемешиванию культуральной жидкости различного типа мешалками (пропеллерными, турбинными и др.).

В последнее время при производстве антибиотиков применяют низкочастотное вибрационное перемешивание культуральной жидкости как наиболее экономичный способ.

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

Наблюдение за основными процессами жизнедеятельности организма осуществляется контрольно-измерительной аппаратурой (КИП), позволяющей регулировать скорость перемешивания культуральной среды, поддерживать на заданном уровне температуру внутри ферментера, pH среды, количество пропускаемого воздуха, давление внутри ферментера и другие параметры. Применяются установки, позволяющие автоматически определять содержание азота в среде по ходу развития организма. Ферментеры снабжены приспособлениями для переноса инокулята, внесения дополнительных питательных веществ, необходимых для лучшего развития культуры, пеногасителя и устройством для взятия проб.

В промышленных условиях получения антибиотиков применяют ферментеры различной емкости – от 500 л до 50, 100 $м^3$ и более. Стерилизацию производственных ферментеров, а также всех обслуживающих их коммуникаций проводят перегретым паром. Воздух, необходимый для аэрации, стерилизуется через специальные фильтры, заполненные стеклянной ватой или активированным древесным углем.

Использование волокнистых фильтров (типа стеклянной ваты) – широко распространенный и экономически наиболее выгодный механический способ стерилизации воздуха (чем меньше диаметр волокна, тем лучше их фильтрующая способность).

Проникновение в фильтр бактериальных клеток или спор, перемещающихся с воздушным потоком, зависит от скорости движения воздуха. Проникновение увеличивается с увеличением скорости воздуха. В зависимости от плотности упаковки фильтра скорость движения воздуха не должна превышать 1,5 м/с.

Процесс развития микроорганизма в ферментерах проходит при строгом контроле всех стадий, очень точном выполнении разработанного регламента условий развития организма-продуцента антибиотика. Большое внимание уделяется поддержанию заданной температуры культивирования, кислотности среды, степени аэрации и скорости работы мешалки. Учитывается потребление организмом основных питательных компонентов субстрата (источников углерода, азота, фосфора), внимательно контролируется образование антибиотика.

Особенность второй стадии производства антиботиков является двухфазный характер стадии ферментации. В первой фазе развития культуры (тропофазы) идет интенсивное накопление биомассы, сопровождающееся усилением процессов биосинтеза белков, нуклеиновых кислот, углеводов, ферментов. Причем на этом этапе антибиотик, как правило, не синтезируется. Во второй фазе (идиофаза) накопление биомассы замедляется, так как питательная среда уже обеднена рядом компонентов и обогащена продуктами жизнедеятельности продуцента. Максимум биосинтеза антибиотика наступает в стадии отмирания культуры.

Особое внимание при развитии продуцента в ферментерах обращают на процесс пеногашения. При продувании воздуха через культуру

микроорганизма часто происходит обильное образование пены, которая существенно нарушает протекание всего процесса развития продуцента в ферментере. Основная причина появления большого количества пены наличие белковых веществ в среде и ее высокая вязкость, обусловленная обильным накоплением биомассы.

Для борьбы с пеной в ферментерах при антибиотикообразовании используют различные поверхностно-активные вещества: растительные масла (соевое, подсолнечное), животный жир, а иногда минеральные масла (вазелиновое, парафиновое), спирты и высшие жирные кислоты. Нередко в качестве пеногасителей используют специально синтезированные вещества (силиконы, диазобуталкарбомил и другие соединения).

Многие вещества (масла, жиры, спирты и др.) – пеногасители, потребляются продуцентами антибиотиков как дополнительные источники углеродного питания. При этом часто наблюдается повышение выхода антибиотика. Однако внесение пеногасителя снижает скорость растворения кислорода, что в свою очередь может отрицательно сказаться на развитии микроорганизма и его биосинтетической активности.

Иногда используются механические способы пеногашения (отсасывание пены через специальные трубы, разрушение пузырьков пены сильными струями жидкости, пара или газа) и аэродинамические методы.

В процессе развития микроорганизмов-продуцентов антибиотики в большинстве случаев почти полностью выделяются из клеток в окружающую среду. Однако в некоторых случаях лишь часть антибиотика выделяется в культуральную жидкость, а другая часть сохраняется внутри клеток. У ряда продуцентов антибиотик почти полностью содержится в клетках организма.

В процессе образования антибиотика в культуральную жидкость, наряду с присутствием в ней различных неиспользованных компонентов среды, выделяются и разнообразные продукты обмена, она обогащается продуктами автолиза клеток. Удаление примесей – первая и весьма важная стадия химической очистки антибиотика.

Стадия выделения и химической очистки включает ряд процессов: от обработки нативного раствора до сушки готового очищенного препарата. На этой стадии в зависимости от свойств антибиотика, его химического строения и места основного накопления применяют различные методы выделения и очистки. В качестве основных методов используют экстракцию, осаждение, сорбцию на ионообменных материалах, упаривание, сушку.

В зависимости от того, где антибиотическое вещество сосредоточено, применяют соответствующие методы его извлечения. Так, если антибиотик находится в культуральной жидкости, его выделяют методами экстракции растворителями, не смешивающимися с жидкой фазой, или осаждают в виде нерастворимого соединения, а также путем сорбции на ионообменных смолах.

Выделение антибиотика из клеток микроорганизмов осуществляют с помощью экстракции органическими растворителями. Если антибиотик

содержится в культуральной жидкости и в клетках продуцента, первичной операцией его выделения является перевод антибиотика в фазу, из которой наиболее целесообразно его изолировать. Для этого антибиотик, содержащийся в культуральной жидкости, и клетки с антибиотическим веществом переводят в осадок, а затем антибиотик экстрагируют.

Отделение нативного раствора от биомассы и взвешенных частиц проводят методами фильтрации или центрифугирования. При этом применяют меры для обеспечения лучшей фильтруемости культуральной жидкости (кислотную или тепловую коагуляцию, обработку электролитами, внесение различных добавок и т. П.). Для процесса фильтрации применяют различные фильтрующие аппараты: фильтр-пресс, нутч-фильтр, друк-фильтр, центрифуги, сепараторы.

Фильтр-прессы применяются для обработки больших объемов культуральной жидкости. Эти аппараты состоят из ряда чередующихся плит и рам и фильтрующих перегородок между ними. Процесс фильтрации осуществляется под давлением.

Для фильтрации небольших объемов культуральной жидкости обычно используют нутч-фильтры или друк-фильтры. Первый аппарат работает под вакуумом, второй – в условиях повышенного давления над фильтрующейся жидкостью.

Для получения жидкости, освобожденной от взвешенных частиц, широкое распространение нашел способ центрифугирования. Хорошие результаты достигаются при правильном выборе скорости подачи жидкости (лучший вариант – 15000 об/мин). Отделение мицелия или других взвешенных частиц может также происходить в сепараторах. При скорости вращения барабана сепаратора, равной 7000—7500 об/мин, благодаря центробежной силе твердые частицы устремляются к стенкам барабана и осаждаются там, а отсепарированная жидкость стремится к центру барабана и переходит в специальную камеру.

Одной из особенностей стадии выделения и химической очистки является то, что при выделении антибиотиков приходится иметь дело с весьма невысокими концентрациями выделяемого вещества (не превышающими одного процента). В конце стадии химической очистки концентрация антибиотика увеличивается и достигает 20-30%.

Цель химической очистки – извлечение антибиотика из культуральной жидкости или из клеток продуцента, концентрирование его и освобождение от сопутствующих примесей и в конечном счете получение высоко очищенного препарата, пригодного для соответствующего применения.

Антибиотики под влиянием повышенной температуры, высокой кислотности или щелочности среды инактивируются. Поэтому при их выделении и очистке необходимо соблюдать максимум осторожности.

Метод экстракции. Нередко в целях очистки антибиотика от различных примесей его многократно переводят из одного растворителя в другой с

предварительным осаждением (кристаллизацией). Такой прием носит название перекристаллизации.

Ионообменная сорбция. Метод 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. Далее его элюируют (десорбируют) и получают значительно очищенный и сконцентрированный препарат. Затем раствор препарата можно вновь пропустить через ионообменную смолу, но имеющую противоположный заряд. При этом примеси осядут на смоле, а раствор более 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 центрифугирования отделяют от нативного раствора, промывают и в ряде случаев высушивают, после чего образовавшееся соединение разлагают и антибиотик экстрагируют или вновь осаждают (кристаллизуют).

Одной из стадий химической очистки антибиотиков является концентрирование полученных растворов путем отгонки большей части растворителя, как правило, в 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 для увеличения его выхода.

Известно, что к антибиотикам, используемым в медицинской практике, предъявляются очень высокие требования (высокая степень очистки, стерильность препарата и др.). Поэтому на указанной стадии работы, а также при химической очистке препарата необходимо соблюдать высокую степень чистоты на всех операциях. Для этого поддерживают в исключительной чистоте не только используемое оборудование, но и помещение, где производят работу.

Антибиотики, предназначенные для инъекций, должны быть стерильными. Поэтому получение таких препаратов, приготовление различных лекарственных форм, расфасовка и упаковка осуществляются в асептических условиях.

После выделения и химической очистки антибиотика его необходимо высушить – удалить из полученного препарата свободную и связанную воду. Поскольку большинство антибиотиков в той или иной степени

термолабильны, для их высушивания необходимо применять методы, не приводящие к потере биологической активности и не изменяющие цвета препарата.

На современном этапе промышленного получения антибиотиков используют различные методы обезвоживания препаратов.

Широкое распространение получила лиофильная сушка антибиотиков, которая проводится при сравнительно низких температурах (-8, -12°С).

Прогрессивным методом при работе с большими количествами антибиотика является высушивание с применением распылительной сушилки. Раствор антибиотика пневматически распыляется до мельчайших капель в камере потоком нагретого воздуха. Процесс высушивания антибиотиков протекает в течение нескольких секунд. При этом даже термолабильные препараты не меняют своих свойств.

Сушка зернистых и пастообразных антибиотических препаратов производится в вакуум-сушильных шкафах или методом взвешенного слоя.

Готовый антибиотик подвергается тщательному биологическому и фармакологическому контролю.

К антибиотическим веществам, используемым в медицинской практике, в соответствии с Государственной фармакопеей предъявляются очень строгие требования. Каждый новый лекарственный препарат, прежде чем он будет разрешен к практическому применению, должен пройти всесторонние испытания на токсичность, пирогенность и другие жизненно важные функции организма. Препарат изучают на разных видах животных в отношении его острой и хронической токсичности (влияние на состав крови, центральную нервную систему, дыхание и т. Д.). Показатели острой токсичности – один из критериев качества антибиотического вещества. Устанавливают максимально переносимую дозу (МПД) антибиотика, дозу, вызывающую гибель 50% подопытных животных (LD_{50}) и дозу, смертельную для всех животных (LD_{100}). Только после всестороннего и тщательного изучения препарата он может быть рекомендован к практическому применению.

Количественное определение большинства антибиотиков проводят биологическими методами, основанными на сравнительной оценке угнетения роста тест-микроорганизма. Активность устанавливают *диффузионным* или *турбидиметричесхим методами.*

Государственная Фармакопея XI издания рекомендует для количественного определения метод диффузии в агар, сущность которого заключается в сравнении действия определенных концентраций испытуемого и стандартного образца антибиотика на тест-микроорганизм. Стандарты, отвечающие требованиям международных стандартов, готовят в Государственном контрольном институте медицинских биологических препаратов им. Л.А.Тарасевича, они выпускаются в запаянных ампулах нейтрального стекла и хранятся при температуре не выше 0°С.

Так как состав агаровой среды и условия выполнения биологического испытания одинаковы, величина зоны диффузии, в которой развитие тест-микроорганизма подавляется испытуемым антибиотиком, зависит только от химической природы препарата и его концентрации. Процесс инкубации осуществляется в течение 16-18 часов при 36-38°С.

При определении биологической активности методом диффузии в агар необходимо, чтобы зона задержки роста была достаточного диаметра и имела четкие границы. После завершения инкубации измеряют диаметры зон задержки роста (ЗЗР) тест-микроорганизма стандартным и испытуемым растворами. Для повышения точности измерений находят среднее значение площадей зон диффузии из трех опытов.

При изучении зон задержки роста и четкости краев рационально применят микрофотометры (например, марки, ИОФ-451), что позволяет получать более объективные количественные оценки результатов микробиологического анализа.

Единица действия (ЕД) является величиной биологической активности антибиотиков. За ЕД принимают минимальное количество антибиотика, подавляющего развитие тест-микроорганизма в определенном объеме питательной среды. Количественное выражение 1 ЕД различно у различных антибиотиков. Например, у натриевой соли бензилпенициллина 1 ЕД соответствует 0,5988 мкг химически чистого вещества, а у стрептомицина, тетрациклина и его производных 1 ЕД соответствует 1 мкг химически чистого вещества.

Расчет биологической активности производят по стандартной кривой, предварительно построенной на основании результатов определения пяти концентраций стандартного препарата. Степень активности антибиотика в1 мг препарата вычисляют, умножая полученную концентрации в ЕД/мл на степень разведения.

Среднее значение активности, найденной биологическим методом, несколько ниже, чем рассчитанная теоретическая активность. В соответствующих фармакопейных статьях приводятся значения теоретической активности и нижний допустимый предел активности испытуемого антибиотика в ЕД/мг.

В настоящее время разработаны ускоренные биологические методы определения антибиотиков в биологических жидкостях. К ускоренным микробиологическим методам относят методы, основанные на подавлении изменений pH питательной среды в процессе роста тест-микроорганизмов. Концентрацию определяют путем сравнения изменений pH в средах испытуемых и стандартных образцов через 1,5 часа после инкубации. На этом принципе основан так называемый *уреазный метод,* заключающийся в наблюдении за изменением pH

жидкой питательной среды, содержащей 2% мочевины. Выделяющийся в процессе роста микроорганизма аммиак вызывает изменение pH среды.

Ферментный метод основан на инактивации аминогликозидов в крови специфическими ферментами (аденилтрансфераза и ацетилтрансфераза), продуцируемые грамотрицательными микроорганизмами, устойчивыми к препаратам этой группы. Эти ферменты катализируют процесс аденилирования или ацетилирования аминогликозидов в присутствии ^{14}C-аденозинтрифосфата или ^{14}C-ацетилкоэнзима А. Они являются источником радиоактивности. Инактивированный антибиотик имеет положительный заряд и остаточную радиоактивность, что позволяет адсорбировать его на фосфоцеллюлозной бумаге. После адсорбции, методом подсчета радиоактивности делают заключение о концентрации антибиотика. Определение занимает 1-2 часа.

Радиоиммунный метод основан на сравнительной оценке конкуренции антибиотика, меченного тритием, и испытуемого антибиотика по отношению к специфическим антителам иммунной сыворотки.

Метод отличается очень высокой чувствительностью (0,003-0,01 мкг/мл), результаты получают в течение 1-2 часов, точность данного метода довольно высока – коэффициент вариации составляет 4 – 5%. Анализируя различные методы анализа антибиотиков можно прийти к заключению, что наиболее простыми и доступными в настоящее время являются метод диффузии в агар-агар и уреазный метод

Ферментативный и радиоиммунный метод – наиболее специфичные и точные. Они не требуют предварительной обработки сыворотки крови, когда в ней присутствуют другие антибиотики. Однако применение этих методов требует соответствующих условий и оборудования для работы с радиоактивными веществами, труднодоступных реактивов и специфической иммунной сыворотки. На точность биологических методов оказывают влияние целый ряд факторов – характер питательной среды, условия инкубации, точность измерения зон угнетения роста и т.д.

Вопросы для самоконтроля

1. Назовите основные группы антибиотиков, учитывая механизм их действия и спектр влияния на клетки возбудителей инфекционных болезней.
2. β-лактамы, их структура и механизм действия.
3. Напишите радикалы, входящие в состав антибиотиков цефалоспоринового ряда.
4. Методы получения антибиотиков на фармацевтических предприятиях.
5. Структура и механизм действия антибиотиков – полиенов.

6. Структура и механизм действия антибиотиков – депсипептидов.
7. Схема производства антибиотиков в процессе микробного биосинтеза.
8. Методы культивирования продуцентов, применяемых при производстве антибиотиков.
9. Питательные среды, используемые на фармацевтических предприятиях при производстве антибиотиков.
10. Методы выделения и очистки антибиотиков, применяемых при производстве антибиотиков.
11. Методы получения 6-аминопенициллиновой кислоты, применяемые в промышленной технологии.
12. Основные способы получения 7- аминоцефалоспориновой кислоты.
13. Схема выделения антибиотика из культуральной жидкости.
14. Принципиальная схема выделения и очистки канамицина.
15. Промышленный метод получения полусинтетических антибиотиков.
16. Биологические методы анализа качества антибиотиков.

6. ИНЖЕНЕРНАЯ ЭНЗИМОЛОГИЯ. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА. ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ ФЕРМЕНТЫ.

Химическая и инженерная энзимология возникла на стыке молекулярной биологии, физической химии и энзимологии. Это наука о создании биоорганических катализаторов, в которых использованы принципы действия активных центров ферментов.

Химическая энзимология изучает широкий круг вопросов, связанных с новыми аспектами функционирования ферментов как гетерогенных биокатализаторов, создаваемых для промышленного производства фармацевтических препаратов и пищевых продуктов. Ферменты традиционно и давно (еще в древности) применялись в практической деятельности как уникальные ускорители многих химических реакций. Скорость реакций, протекающих при участии ферментов, в 10^{12}-10^{14} раз выше, чем реакций, катализируемых катализаторами неорганической природы.

Ферменты – биологические катализаторы белковой природы, которые применяются в различных отраслях народного хозяйства, в том числе при производстве лекарственных средств, а также в медицинской практике как лечебные и диагностические препараты. Всего для клинического применения разрешено свыше 40 ферментных препаратов животного, растительного и микробного происхождения.

Среди основных направлений использования ферментов как терапевтических средств наибольший удельный вес занимают три области, которые и потребляют основное количество выпускаемых промышленностью препаратов:

1) заместительная терапия при недостаточной функции пищеварительных желез и ряде наследственных заболеваний;

2) местная (локальная, литическая) терапия для расщепления и удаления из организма некротических масс и экссудатов;

3) парентеральное применение свободных и связанных форм ферментов для лизиса тромбов в кровеносных сосудах и как противовоспалительные средства.

В фармацевтической промышленности ферменты используются в качестве биокатализаторов, биодатчиков и биосенсоров и для биотрансформации.

Путем микробиологического синтеза для медицинских целей получают следующие ферментные препараты:

- солизим (липолитический фермент, гидролизующий жиры), применяется при хронических заболеваниях желудочно-кишечного тракта;
- амилазы (расщепляют крахмал до глюкозы), в составе лечебного препарата «Фестал» используется при недостаточной функции поджелудочной железы;
- террилитин (протеолитический фермент), рекомендуется для лечения гнойных ран, ожогов, трофических язв;
- стрептокииаза (фибринолитический фермент) эффективен при лечении тромбозов;
- β-галактозидаза (расщепляет лактозу), применяется для лечения лактозной недостаточности.

Традиционные биотехнологии, основанные на переработке тканей животных, поставляют в медицинскую практику:

- трипсин, химотрипсин (протеолитические ферменты), используемые для рассасывания рубцов и спаечных процессов;
- урокиназу (протеолитический фермент), предназначенный для лечения тромбозов;
- пепсин (протеолитический фермент), незаменимый при расстройствах пищеварения;
- бромелин, папаин, фицин, которые используются в заместительной терапии при нарушении пищеварения, а также для лечения гнойно-воспалительных процессов.

При энзиматическом очищении ран сроки заживления сокращаются в 1,5-2 раза. Бромелин, папаин, фицин применяются в заместительной терапии при нарушении пищеварения, а также в акушерской практике при выявлении и предотвращении резус-конфликтных ситуаций.

В традиционных технологиях ферментные препараты могут быть получены из животного, растительного сырья и микроорганизмов.

Лекарственные формы на основе ферментов характеризуются большим разнообразием – это таблетки, капсулы, мази, аэрозоли.

В нашей стране и за рубежом первое место по объему выпускаемых ферментных препаратов занимают протеолитические – наиболее глубоко изученные среди всех известных ферментов. Протеазы в числе первых белков были получены в высокоочищенном кристаллическом состоянии.

Ферменты группы ацилаз используются в биотехнологическом производстве медицинских препаратов как реагенты для трансформации биологически активных веществ (например, N-ацилоаминокислот).

Иммобилизацию ферментов можно определить как процесс включения молекул в какую-либо изолированную фазу, которая отделена от фазы свободного раствора, но способна обмениваться с находящимися в ней молекулами субстрата, эффектора или ингибитора.

Химический метод иммобилизации

Иммобилизация ферментов путем образования ковалентной связи с носителем в настоящее время является доминирующим способом получения биокатализаторов пролонгированного действия. Первые работы в этом направлении относятся к 1949 году.

Различают 2 основных метода химической иммобилизации ферментов:

1. Иммобилизация на носителе любого типа за счет образования ковалентных связей;

2. Поперечная сшивка молекул белка без носителя специальными реагентами.

Методы образования ковалентной связи между носителем и белком классифицируют по типам происходящих химических реакций. Наиболее часто используются следующие виды химических реакций: реакции диазосочетания, ацилирования, окислительно-восстановительные и радикальные реакции, а также смешанные методы.

Адсорбционная иммобилизация

Адсорбционная иммобилизация является наиболее разработаным из всех существующих способов иммобилизации ферментов. Еще в 1916г. Дж. Нельсон и Э. Гриффин провели успешную иммобилизацию инвертазы путем адсорбции на активированном угле и геле гидроксида алюминия. В настоящее время адсорбционная иммобилизация благодаря целому ряду преимуществ является наиболее широко распространенным способом получения иммобилизованных ферментных препаратов промышленного значения.

Носителей для адсорбционной иммобилизации можно разделить на два основных класса — *неорганические* и *органические.* В качестве неорганических носителей главным образом используются кремнезем, оксиды алюминия, титана и других металлов, различные природные алюмосиликаты (глины), пористое стекло, керамика, активированный уголь и др. Среди органических носителей наибольшее распространение получили различные полисахариды и полимерные ионообменные смолы, коллаген.

Обычно носители применяются в виде порошков, мелких шариков и гранул. Иногда для снижения гидродинамического сопротивления носители изготавливают в форме монолитов, пронизанных большим числом узких параллельных каналов, разделенных тонкими стенками. Важнейшими характеристиками носителей являются удельная поверхность, размер пор, механическая прочность и химическая стойкость.

Иммобилизация ферментов путем включения в гели

Сущность этого метода иммобилизации состоит в том, что молекулы фермента включаются в трехмерную сетку из тесно переплетенных полимерных цепей, образующих гель. Среднее расстояние между соседними цепями в геле меньше размера молекулы включенного фермента, поэтому он не покидает полимерную матрицу и не выходит в окружающий раствор, т.е. находится в иммобилизованном состоянии. Дополнительный вклад в удерживание фермента в сетке геля могут вносить также ионные и водородные связи между молекулой фермента и окружающими ее полимерными цепями.

Иммобилизация ферментов с использованием полупроницаемых оболочек (мембран)

Общий принцип, лежащий в основе этого способа иммобилизации, состоит в том, что водный раствор фермента отделяется от водного раствора субстрата полупроницаемой мембраной, которая легко пропускает небольшие молекулы субстрата, но представляет собой непреодолимый барьер для крупных молекул фермента. Существующие модификации этого метода различаются лишь способами получения полупроницаемой мембраны и ее природой.

Микрокапсулирование

Этот способ иммобилизации разработан Т. Чангом (1964 г.). Суть его состоит в том, что водный раствор фермента включают внутрь микрокапсул, представляющих собой замкнутые сферические пузырьки с тонкой полимерной стенкой (мембраной). В зависимости от условий получения размер микрокапсул изменяется от нескольких десятков до нескольких сотен микрометров, а толщина мембраны составляет сотые – десятые доли микрометра при диаметре пор порядка нескольких нанометров.

Включение в волокна

От микрокапсулирования этот способ иммобилизации, предложенный Д. Динелли (1972), отличается главным образом формой получаемых препаратов: в первом случае образуются сферические микрокапсулы, а во втором — нити. Суть состоит в том, что эмульсию водного раствора фермента в органическом растворе волокнообразующего полимера продавливают через фильтры в жидкость (например, толуол), вызывающую коагуляцию полимера. Полученные волокна представляют собой пористые полимерные гели, содержащие гомогенную дисперсию небольших капель водного раствора фермента размером около 1 мкм. Ферментсодержащие волокна обладают высокой механической прочностью, например, из них можно изготовить ткань, которая будет обладать ферментативной активностью. Для дополнительного повышения механической прочности волокна иногда заключают в тонкую полиамидную оболочку.

Вопросы для самоконтроля

1. История инженерной энзимологии как науки.
2. Структура и функции ферментов.
3. Способы получения ферментов.
4. Основные представления о ферментативном катализе.
5. Методы выделения и очистки ферментов.
6. Основные физико-химические свойства иммобилизованных ферментов.
7. Отличия иммобилизованных ферментов от нативных препаратов.
8. Химические методы иммобилизации ферментов.
9. Физические методы иммобилизации ферментов.
10. Носители, применяемые для иммобилизации ферментов.
11. Иммобилизация ферментов путем включения в гели.
12. Иммобилизация ферментов с использованием полупроницаемых оболочек (мембран).
13. Методы иммобилизации клеток.
14. Применение иммобилизованных клеток.
15. Получение аминокислот с использованием иммобилизованных клеток.
16. Получение антибиотиков с помощью иммобилизованных клеток.
17. Основные промышленные технологии с использованием гетерогенных биокатализаторов.
18. Применение иммобилизованных ферментов.
19. Типы связей ферментов с поверхностью носителя.
20. Отличие химических методов иммобилизации ферментов от физических методов.

7. ПРИМЕНЕНИЕ ГЕТЕРОГЕННЫХ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ В ПРОМЫШЛЕННОЙ ТЕХНОЛОГИИ

Одним из ярких примеров применения биокатализатора является его использование в тонком органическом синтезе. Уникальная специфичность и стереоспецифичность действия ферментов, возможность проведения процессов в «мягких» условиях, протекание реакции с высокой скоростью при использовании незначительных количеств катализатора, практическое отсутствие побочных реакций – все это делает биокаталитические процессы чрезвычайно привлекательными при получении лекарственных субстанций. Поэтому в настоящее время биотехнология может успешно конкурировать с тонкими химическими технологиями на отдельных этапах приготовления лекарственного препарата.

Ферментативная модификация β-лактамных антибиотиков

Получение новых, более эффективных аналогов пенициллина, связано с изменением его боковой цепи при сохранении целостности остальной части, так называемого ядра антибиотика – 6-аминопенициллановой кислоты (б-АПК).

Поскольку масштабный химический синтез таких соединений невозможен, самым простым путем проведения необходимого превращения является отщепление боковой цепи биосинтетического пенициллина, выделение 6-АНК и последующее ацилирование ее аминогруппы с получением «полусинтетического» аналога.

Подобное превращение может быть проведено в одну стадию и самых обычных условиях при 10-40°С в водной среде с использованием специфического фермента – пенициллинамидазы.

С использованием иммобилизованной пенициллинамидазы связан еще один процесс инженерной энзимологии – получение 7-аминодезацетоксицефалоспорановой кислоты, ключевого соединения для синтеза новых цефалоспоринов.

Ферментативное превращение рацематов в энантиомеры

Примером практического использования биокатализа служит ферментативное превращение рацематов в энантиомеры аминокислот. При помощи ацилаз можно разделить рацемические смеси большинства аминокислот. Ацилазы аминокислот – широко распространенные ферменты, содержащиеся в тканях животных (ацилаза из почек свиньи хорошо изучена и широко используется), в растениях и микроорганизмах.

Разделять рацемические смеси аминокислот можно, используя не только ацилазы, но также и ряд протеолитических ферментов, обладающих высокой стереоспецифичностью в реакции гидролиза сложных эфиров аминокислот.

К перспективному способу получения оптически чистых аминокислот относится энантиоселективное ферментативное превращение и аминокислоты ряда циклических производных, химический синтез рацематов которых представляет собой более легкую задачу, чем получение рацемата самой аминокислоты

Подобно тому, как аминоацилазы и некоторые протеазы используются для получения энантиомеров аминокислот, многие другие гидролитические ферменты могут применяться для получения различных оптических изомеров сложных органических соединений.

Биокатсиштическое получение простаноидов

Простагландины являются гидроксилированными продуктами превращения в организме полиненасыщенных жирных кислот. Они состоят из 20 атомов углерода и включают циклопентановое кольцо. В зависимости от структуры пятичленного кольца все простагландины делят на четыре группы: A,B,E и F, а в зависимости от числа двойных связей в метильной и карбоксильной боковых цепях в каждой из групп различают индивидуальные простагландины, обозначаемые буквой, выражающей принадлежность к группе, и цифрой, показывающей число двойных связей в боковых цепях (Al, A2 и т.д.). В организме простагландины синтезируются из полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) посредством специальной ферментной, системы (простагландинсинтетаза), фиксированной в

микросомальных мембранах. Источниками субстрата для биосинтеза простагландинов в организме являются фосфолипиды клеточных мембран, триглицериды, этирифицированный холестерин, высвобождающие свободные полиненасыщенные жирные кислоты активированной ферментной системой (ацилгидролазы) в ответ на нейрогуморальную стимуляцию. Наиболее распространённым субстратом простагландинсинтетазы является арахидоновая кислота, содержащаяся в фосфолипидной фракции клеточных мембран практически всех клеток животных организмов.

Переход арахидоновой (5, 8, 11, 14-эйкозатетраеновой) кислоты в простагландины, тромбоксаны и простациклин осуществляют сложные полиферментные системы. Ключевым ферментом синтеза следует считать общий для всех этих соединений первый фермент цепи – простагландинэндопероксидсинтетазу. Этот фермент катализирует образование простагландина H_2 – общего промежуточного соединения при получении всех простагландинов, тромбоксанов и простациклина.

Простагландины и их основные предшественники ПНЖК (арахидоновая, зйкозатетраеновая, эйкозатриеновая) содержатся во всех тканях млекопитающих в очень малых количествах. Наибольшим содержанием характеризуется семенная жидкость млекопитающих и человека, предстательная железа, а также эндометрий матки и яичников. ПГ найдены в мозговой ткани различных животных и человека, слизистой оболочке желудка и кишечника, селезёнке, почках, печени, поджелудочной железе, мышечной ткани, радужной оболочке.

Простагландинэндопероксидсинтетаза – гемсодержащий фермент, катализирующий трехсубстратную реакцию, в ходе которой происходит сопряженное окисление кислородом арахидоновой кислоты и какого-либо донора электронов. Донорами электронов могут служить слабые органические и неорганические восстановители, например ферроцианид, адреналин, триптофан, $НАДН_2$.

Лейкотриены представляют собой соединения, играющие важную роль при протекании воспалительных процессов, бронхиальной астмы, регуляции адгезии и агрегации нейтрофилов, полиморфноядерных лейкоцитов и т.д.

Арахидоновая кислота может быть получена из подходящих масс биокаталитическим путем с использованием специфических фосфолипаз.

Конверсия ПНЖК в организме под влиянием специфической простагландинсинтетазы осуществляется через образование эндоперекисей простаглаидинов с включением двух молекул кислорода. Образующиеся короткоживущие промежуточные соединения (эндоперекиси) под воздействием других ферментных систем могут образовывать не только соответствующие простагландины, но и другие биологически активные вещества специфического спектра действия для ряда тканей. Так, при специфической энзиматической циклизации арахидоновой кислоты образуются эндоперекиси (простагландииы G_2 и H_2, $ПГТ_2$ и $ПГН_2$), которые

далее трансформируются в простагландины E_2, $Д_2$, $F_{2\alpha}$. В случае каталитического воздействия на эндоперекиси фермента тромбоксансинтетазы, локализованной в мембранах микросом тромбоцитов, образуются тромбоксаны (A_2,B_2) – вещества с исключительно выраженными адгезионными свойствами. При воздействии на эти же вещества ферментной системы микросомальной фракции артериальных сосудов биосинтез идет в направлении образования простациклина ($ПГИ_2$ и ПГХ) – веществах, характеризующихся мощным антиадгезионным и деагрегирующим эффектом, в десятки раз превосходящим антитромбическую активность $ПГЕ_1$ и $ПГД_2$

Простагландины синтезируются практически всеми тканями животного организма. Их можно рассматривать как производные «простаноевой кислоты», не существующей в природе, но полученной синтетически.

ПНЖК, непосредственно являющиеся предшественниками биосинтеза простагландинов — арахидоновая и γ – линоленовая кислоты, содержатся в продуктах питания в крайне малых количествах и чаще всего отсутствуют. Эти вещества синтезируются в организме из поступающих с пищей эссенциальных жирных кислот: (γ – линоленовой и линолевой). При этом происходит ферментативное удлинение углеродного скелета ЭЖК на два метиленовых звена за счёт «пристраивания» ацетатного фрагмента с образованием цепочки из 20 углеродных атомов. Все продукты, являющиеся метаболитами ПНЖК с сохранением длины углеродного скелета, обобщённо называются эйкозаноидами по наименованию соответствующего греческого числительного. Нужно отметить, что арахидоновая кислота превалирует в составе ПНЖК, тогда как концентрации γ – линоленовой на порядок, а тиленодоновой (или эйкозапентаеновой)- на два порядка ниже. Вновь синтезированная арахидоновая кислота немедленно связывается в мембранные фосфолипиды, которые и являются депо предшественников простагландинов в организме.

Одним из сложных аспектов изучения простагландинов является выявление их роли в образовании и функциях циклического 3',5'- аденозинмонофосфата (цАМФ), который занимает центральное место во внутриклеточных регуляторных механизмах.

Простагландины в зависимости от вида ткани и разновидности аленилатциклазы могут как стимулировать (наблюдается чаще всего), так и ингибнровать синтез цАМФ. Так, например, именно угнетением аденилатциклазы, катализирующей синтез цАМФ спонтанно или индуцированно норадреналином, глюкагоном и активацией симпатической нервной системы и объясняется антимиоматический эффект $ПГЕ_1$. Имеются данные., указывающие на ингибирующее влияние $ПГЕ_1$ на образование цАМФ под воздействием вазопрессина через систему аденилатциклазы. Простагландины достоверно снижают содержание цАМФ в слизистой оболочке желудка, жировых клетках, тканях собирательных канальцев

почек и в некоторых структурах центральной нервной системы. В большинстве тканей простагландины активируют синтез цАМФ. $ПГЕ_1$ оказывает стимулирующее влияние на синтез гормона роста, вазопрессина, тиреотропина. Простагландины E_1, E_2 и $E_{2\alpha}$ стимулируют биосинтез стероидов; простагландины E_2 и $E_{2\alpha}$ способствуют высвобождению окситоцина и увеличивают содержание в крови пролактина. Таким образом они оказывают влияние на важнейшие эндокринные железы животных и человека: гипофиз, кору надпочечников, щитовидную железу, яичники.

Существующие в настоящее время способы получения простагландинов можно подразделить на три группы: 1)выделение, 2)биосинтез и 3)синтез.

Выделение из животного сырья было единственным способом получения ПГ в незначительных количествах. Первые экстракты, выделенные в 1906 и 1913 гг. из предстательных желез собаки и человека, представляли собой неочищенные фракции. В основе этих способов выделения лежала обработка сырья водно-спиртовым раствором метанола, этанола, изопропанола с последующим переводом извлеченных веществ в неводный растворитель (хлороформ, метиленхлорид, эфир, этилацетат, бензол). В последующем стали применять более полное разделение вытяжек путём распределения между несмешивающимися растворителями, используя неводные растворители и буферные растворы. Получение кристаллических простагландинов осуществляют путём экстракции, концентрирования, фракционирования и других необходимых операций, проводимых в мягких условиях при определенных значениях pH и температуры. Полученные экстракты упаривают в вакууме до сухого состояния и подвергают распределительной хроматографии и кристаллизации.

Биосинтез. С целью получения простагландинов в промышленных масштабах в настоящее время применяется синтез in vitro. Биосинтез in vitro представляет по существу имитацию в замкнутой системе условий его осуществления in vivo. В зависимости от условий проведения биосинтеза и количества вводимых ингредиентов можно получить простагландины массой от нанограммов до сотен граммов.

Основными компонентами осуществления биосинтеза с целью их производства являются: предшественники, ферменты, pH среды и тип буфера, концентрация кислорода, наличие кофакторов и ингибиторов.

Синтез. Первые шаги в направлении осуществления полного химического синтеза простагландинов были разработаны 2 различных способа синтеза ненасыщенного кетона, являющегося продуктом гидрогенизации $ПГЕ_1$ (1963 г). Этот путь получения вещества, имеющего скелет простаноевой кислоты, предшествовал последующим работам и области химического синтеза $ПГЕ_1$ В настоящее время синтетическим путём получают большое количество производных простагландинов – их аналогов и гомологов, в том числе соединения с укороченными алкильными цепями, соединения, этерифицированные в положениях C_{11} и

C_{15}, соединения, содержащие вместо циклопентанового ядра циклогексановое.

Известно, что некоторые микроорганизмы могут трансформировать арахидоновую кислоту в простагландины. Трансформацию арахидоновой кислоты отечественным штаммом Fussarium sambucinum (штамм BKMF-842) проводили на питательной среде, содержащей дрожжевой автолизат, кукурузный экстракт, пептон в стерильных условиях при 26ºС на качалке 240 об/мин в течение 36-48 ч. Выделение целевого продукта проводили жидкостной адсорбционно-распределительной хроматографией. При добавлении арахидоновой кислоты в питательную среду мицелия гриба Fussarium sambucinum происходит трансформация АК в $ПГЕ_2$ и $F_{2\alpha}$, общий выход которой составляет 18%.

Вопросы для самоконтроля

1. Применение ферментов в качестве реагентов для обнаружения различных веществ. Приеимущества биокатализаторов.
2. Ограничения использования природных биокатализаторов.
3. Преимущества использования иммобилизованных ферментов.
4. Биосенсоры, основные типы и их применение.
5. Ферментные электроды, их использование.
6. Вещества, используемые в качестве ферментов в ферментных электродах.
7. «Бактериальные» электроды.
8. Кинетические аспекты катализа иммобилизованными ферментами.
9. Ферментативное превращение рацематов в эпантиомеры.
10. Ферментативная модификация b-лактамных антибиотиков.
11. Биокаталитическое получение простаноидов.
12. Причины и механизмы изменения каталитических и физико-химических свойств иммобилизованных ферментов.
13. Методы определения глюкозы в биоматериале.
14. использование биодатчиков для определения мочевины.
15. использование биодатчиков для определения пенициллина.
16. Использование биодатчиков для определения L-тирозина в биоматериале.
17. Использование биодатчиков для определения нитритов с применением нитритредуктазы.
18. Получение безлактозного молока с помощью иммобилизованной лактазы.
19. Разделение рацематов аминокислот с помощью иммобилизованной аминоацилазы.

Тестовые задания

1. Антибиотики синтезируются микроорганизмами во время:
   а) лаг-фазы;
   б) экспоненциальной фазы;
   в) фазы замедленного роста;
   г) стационарной фазы;
   д) фазы отмирания.
2. Основными стадиями биотехнологического производства являются:
   а) подготовка сырья и биологического объекта;
   б) стерилизация питательной среды;
   в) накопление биомассы и образование цельного продукта;
   г) выделение и очистка целевого продукта;
   д) поддержание чистой культуры продуцента;
   е) получение товарной формы продукта.
3. При непрерывных биотехнологических процессах объект постоянно поддерживается в:
   а) лаг-фазе;
   б) экспоненциальной фазе;
   в) стационарной фазе;
   г) фазе ускорения роста.
4. Назовите основные разделы биотехнологии:
   а) генетическая инженерия;
   б) клеточная инженерия;
   в) микробная биотехнология;
   г) молекулярная генетика;
5. Время генерации культуры продуцента:
   а) время, необходимое для удвоения биомассы;
   б) промежуток времени от лаг-фазы до начала фазы замедления роста;
   в) промежуток времени, за который определенный объем питательной среды поступает в ферментер:
6. При производстве лекарственных веществ используют:
   а) периодическое культивирование;
   б) глубинное культивирование;
   в) метод «ткани-няньки»;
   г) периодическое культивирование с диализом.
7. Витамин B_2 синтезируется дрожжами в:
   а) лаг-фазу;
   б) профазу;
   в) экспоненциальную фазу;
   г) стационарную фазу.
8. Для процессов глубинного культивирования продуцентов ферментов характерны особенности:
   а) высокая степень асепнтики;
   б) рыхлые среды с небольшой высотой слоя;

в) неинтенсивный характер процесса культивирования;
г) Высокая степень перемешивания содержимого ферментера.

9. Непрерывное (проточное) культивирование используется для получения:
   а) аминокислот;
   б) антибиотиков;
   в) белка одноклеточных;
   г) ферментных препаратов.

10. Для культивирования животных клеток используют:
   а) реакторы с механическим перемешиванием;
   б) реакторы с циркуляционным перемешиванием;
   в) реакторы с пневматическим перемешиванием.
   г) Реакторы для поверхностного культивирования.

11. Назовите методы регулирования непрерывного культивирования, применяемые при производстве биологически-активных веществ:
   а) диализ;
   б) микроскопический контроль;
   в) турбидостатный режим;
   г) криоконсервация;

12. Для получения белков путем микробиологического синтеза используют:
   а) поверхностное культивирование;
   б) адсорбционный метод;
   в) включение в гели;
   г) метод обратной транскрипции.

13. В биотехнологии имеют место отклонения от идеальной кривой развития культуры продуцента, называемые:
   а) диауксия;
   б) стерохимическое соотношение;
   в) индукция;
   г) отмирание.

14. К методам хранения посевного материала на биотехнологических предприятиях относят:
   а) криосохранение инокулята;
   б) хранение под вакуумом;
   в) хранение под минеральным маслом;
   г) приодические пересевы .

15. Сущность любого биотехнологического процесса определяется:
   а) спецификой клетки-продуцента;
   б) спецификой питательной ср еды для клетки-продуцента;
   в) особенностями конструкции биореактора;
   г) особенностями выделения и очистки целевого продукта

16. Антибиотики с самопромотированным проникновением в клетку патогена

а) бета-лактамы
б) аминогликозиды
в) макр олиды
г) гликопептиды

17. Появление множественной резистентности опухолей к противоопухолевым агентам обусловлено:

а) непроницаемостью мембраны
б) ферментативной инактивацией
в) уменьшением сродства внутриклеточных мишеней
г) активным выбросом

18. Практическое значение полусинтетического аминогликозида амикацина обусловлено:

а) активностью противанаэробных патогенов
б) отсутствием нефротоксичности
в) устойчивостью к защитным ферментам у бактерий, инактивирующим
г) активностью противопатогенных грибов

19. Защита продуцентов аминогликозидов от собственного антибиотика

а) низкое сродство рибосом
б) активный выброс
в) временная ферментативная инактивация
г) компартментация

20. Выделение и очистка продуктов биосинтеза и оргсинтеза имеет принципиальные отличия на стадиях процесса

а) всех
б) конечных
в) первых
г) принципиальных различий нет

21. Связывание молекулы фермента на поверхности носителя при адсорбции осуществляется за счет:

а) ковалентных связей;
б) электростатических взаимодействий;
в) водородных связей;
г) гидрофобных взаимодействий;
д) гликозидных связей;
е) фосфодиэфирных связей.

21. История иммобилизации ферментов началась в :

а) конце 90-х годов 19 века;
б) конце 60-х годов 20века;
в) конце 40-х годов 20 века;
г) в начале 70-х годов 20 века.

23. Недостаток метода включения ферментов в гели заключается в том, что:

а) фермент непрочно связан с носителем;

б) возникают стерические затруднения для проникновения субстрата в полимерную матрицу геля;
в) невозможны ферментативные превращения высокомолекулярных субстратов;
г) низкая стабильность образовавшегося комплекса фермент-носитель.

24. Химические методы иммобилизации отличаются от физических тем, что:

а) фермент связан с носителем ковалентно;
б) фермент связан с носителем нековалентно;
в) недостаточно высокая прочность связывания фермента с носителем;
г) возможна иммобилизация фермента без носителя.

25. В качестве носителей для иммобилизации используют:

а) нуклеиновые кислоты ;
б) иониты ;
в) воду;
г) солому;

26. Для химической иммобилизации ферментов используют:

а) витамины;
б) глутаровый альдегид;
в) ауксины;
г) микроэлементы .

27. К физическим методам иммобилизации относят:

а) глутаральдегидны й метод;
б) включение в микрокапсулы ;
в) метод электроосаждения;
г) включение в волокна

28. Иммобилизованные ферменты используются для получения:

а) пенициллина;
б) медицинских препаратов;
в) аминокислот;
г) белков.

29. Активирование нерастворимого носителя в случае иммобилизации фермента необходимо

а) для усиления включения фермента в гель;
б) для повышения сорбции фермента;
в) для повышения активности фермента;
г) для образования ковалентной связи.

30. Иммобилизация индивидуальных ферментов ограничивается таким обстоятельством, как

а) высокая лабильность фермента;
б) наличие у фермента кофермента;
в) наличие у фермента субъединиц;

г) принадлежность фермента к гидролазам.

31. Целями иммобилизации ферментов в биотехнологическом производстве являются

а) повышение удельной активности;

б) повышение стабильности;

в) расширение субстратного спектра;

г) многократное использование.

32. Регулируемая ферментация в процессе биосинтеза достигается при способе:

а) периодическом;

б) непрерывном;

в) отъемно-доливном;

г) полупериодическом.

33. Термин «мультиферментный комплекс» означает

а) комплекс ферментных белков, выделяемый из клетки путем экстракции и осаждения;

б) комплекс ферментов клеточной мембраны;

в) комплекс ферментов, катализирующих синтез первичного или вторичного метаболита;

г) комплекс экзо- и эндопротеаз.

34. Предшественник пенициллина, резко повысивший его выход при добавлении в среду

а) бета-диметилцистеин;

б) валин;

в) фенилуксусная кислота;

г) альфа-аминоадипиновая кислота.

35.Предшественник при биосинтезе пенициллина добавляют

а) в начале ферментации;

б) на вторые-третьи сутки после начала ферментации;

в) каждые сутки в течение 5-суточного процесса;

г) экспоненциальной фазы развития культуры.

36. Иммобилизация клеток продуцентов целесообразна в случае, если целевой продукт

а) растворим в воде;

б) нерастворим в воде;

в) локализован внутри клетки;

г) им является биомасса клеток.

37. Целями иммобилизации ферментов в биотехнологическом производстве являются

а) повышение удельной активности;

б) повышение стабильности;

в) расширение субстратного спектра;

г) многократное использование.

38. Целевой белковый продукт локализован внутри иммобилизованной клетки. Добиться его выделения, не нарушая системы, можно

а) усилив системы активного выброса;
б) ослабив барьерные функции мембраны;
в) присоединив к белку лидерную последовательность от внешнего белка;
г) повысив скорость синтеза белка.

39. Колоночный биореактор для иммобилизации целы х клеток должен отличаться от реактора для иммобилизации ферментов

а) большим диаметром колонки;
б) отводом газов;
в) более быстрым движением растворителя;
г) формой частиц нерастворимого носителя.

40. Технология, основанная на иммобилизации биообъекта, уменьшает наличие в лекарственном препарате следующих примесей:

а) следы тяжелы х металлов;
б) белки;
в) механические частицы;
г) следы органических растворителей.

ПРАВИЛА ФОРМЛЕНИЯ И ВЫПОЛНЕНИЯ КОНТРОЛЬНЫХ РАБОТ

Результатом самостоятельной работы студента по изучению дисциплины «Биотехнология» является выполнение контрольных работ. Все вопросы распределены на 2 контрольне работ. Темы контрольных работ и конечные сроки их сдачи приведены ниже в таблице.

№ работы	Тема	Сроки выполнения
1	Проблемы и перспективы микробной биотехнологии и слагаемые биотехнологического производства лекарств и БАД	1 марта 10-го семестра
2	Методы инженерной энзимологии. Иммобилизованные ферменты и их приложение в фармацевтическом производстве	1 июля 10-го семестра

К выполнению контрольной работы следует приступать только после изучения определенной части программы и краткого конспектирования темы в рабочей тетради.

При выполнении контрольной работы студент должен придерживаться следующих требований:

- каждая контрольная работа должна быть выполнена в отдельной тетради, на обложке которой следует разборчиво указать ФИО студента, курс и номер группы, номер и тема контрольной работы, номер варианта, номер зачетной книжки студента. Образец оформления титульного лица приведен в приложении 1;

- условие каждого задания переписывается полностью;

- ответы на теоретические вопросы не должны быть дословно переписаны из учебника;

- работа должна быть написана самим студентом от руки;

- работа должна быть написана аккуратным подчерком и не вызывать затруднений при проверке;

- страницы тетради должны иметь поля (3-4 см) для возможных замечаний преподавателя;

- работа должна быть структурирована и разделена на отдельные задания;

- номера и условия заданий должны быть в том порядке, в котором они указаны в таблице вариантов;

- решение задач следует сопровождать подробными пояснениями;

- в конце каждой контрольной работы необходимо привести список литературы, используемый при ее написании, указать дату выполнения и поставить свою подпись.

NB! Распечатанные на принтере или ксероксе, а также неаккуратно оформленные работы рассматриваться не будут.

Контрольная работа должна быть сдана строго в указанные сроки методисту заочного отделения в деканат или отправлена по почте с описанием содержимого (квитанцию о почтовом отправлении необходимо сохранить и при необходимости предъявить в деканат). На контрольную работу преподаватель, закрепленный за данным курсом, дает краткую рецензию с указанием недочетов и обнаруженных ошибок, если таковые имеются. Преподаватель оценивает контрольную работу по четырехбальной шкале: «отлично», «хорошо», удовлетворительно», «неудовлетворительно». В случае неудовлетворительной оценки контрольная работа возвращается студенту для доработки, после чего она должна быть в кратчайшие сроки сдана на повторную проверку.

NB! Студенты не сдавшие контрольные работы в указанный срок или получившие за нее неудовлетворительную оценку, не допускаются к аудиторным занятиям и экзаменационной сессии.

Номера заданий для каждой контрольной работы студент находит по таблице вариантов. Каждая контрольная работа состоит из 5 вариантов. Номер варианта контрольных работ №1 студент находит по первой букве фамилии, №2 по первой букве имени.

NB! Контрольная работа, выполненная не по-своему варианту, не рецензируется и не зачитывается.

Материалы, необходимые для выполнения контрольных работ приводятся в учебниках и методических пособиях, рекомендованных учебной программой.

При выполнении контрольных работ можно использовать нормативную базу Интернет-ресурса.

ФИО студента	№ контрольной работы	
	1	2
А-Д	1	5
Е-Л	3	4
М-С	2	3
Т-Ч	4	2
Ш-Я	5	1

КОНТРОЛЬНАЯ РАБОТА №1

Вариант 1

1. Проанализируйте определение биотехнологии как науки.
2. Основные стадии производства пенициллина.
3. Характеристика эмпирического периода развития биотехнологии.
4. Слагаемые биотехнологического производства лекарственных веществ.
5. Характеристика генотипического периода развития биотехнологии.

Вариант 2

1. Периодическое культивирование продуцентов при производстве фармацевтической продукции.
2. Характеристика этиологического периода развития биотехнологии.
3. Основные модификации периодического культивирования. Применение при производстве лекарственных веществ и БАД.
4. Биогеотехнология: проблемы и перспективы.
5. Твердофазное культивирование и его применение при производстве фармацевтической продукции.

Вариант 3

1. Инженерная энзимология и ее применение при производстве новых лекарственных средств.
2. Кинетическая кривая роста популяции при периодическом культивировании.
3. Основные направления развития инженерной энзимологии и получение новых лекарственных препаратов и БАВ на основе иммобилизованных ферментов.

4. Непрерывное культивирование продуцентов, применяемых при производстве фармацевтической продукции.
5. История биотехнологии и перспективы ее развития в XXI веке.

Вариант 4

1. Хемостатный и турбидостатный методы регулирования непрерывного культивирования продуцентов при фармацевтическом производстве.
2. Молекулярная медицина и перспективы развития этого направления.
3. Особенности приготовления питательных сред для промышленного получения пенициллина.
4. Методы хранения продуцентов, использование на фармацевтических предприятиях.
5. Метод очистки при производстве антибиотиков (пенициллина, конамицина).

Вариант 5

1. Бактерии как основные продуценты БАВ и лекарственных препаратов.
2. Основные этапы биотехнологического производства антибиотиков.
3. Охарактеризуйте основные группы биопрепаратов, выпускаемых на фармацевтических предприятиях с применением биотехнологических подходов.
4. Классификация антибиотиков по механизму их действия на бактериальную микрофлору.
5. Методы оценки качества фармацевтической продукции, соответствующее правилам GMP.

КОНТРОЛЬНАЯ РАБОТА №2

Вариант 1

1. Особенности непрерывного культивирования продуцентов при производстве лекарственных препаратов.
2. Особенности биологического контроля антибиотиков.
3. Методы иммобилизации ферментов.
4. Носители, применяемые при производстве гетерогенных биокатализаторов для фармацевтической промышленности.
5. Методы определения клинических параметров роста популяции клеток продуцентов на фармацевтическом производстве.

Вариант 2

1. Проблемы и перспективы развития фармацевтической технологии.

2. применение ферментов как лекарственных препаратов и составных компонентов БАД.

3. Структура, функции и физико-химические свойства ферментов.
4. Предшественники, добавляемые на стадии культивирования при производстве пенициллина и их характеристики.
5. Механизмы действия β-лактамов.

Вариант 3

1. Микромицеты как продуценты БАВ.
2. Биотехнологическое производство антибиотиков цефалоспоринового ряда.
3. Требование к продуцентам БАВ и лекарственных препаратов, применяемых при непрерывном культивировании.
4. Биотехнологическое производство полусинтетических антибиотиков цефалоспоринового ряда.
5. Методы приготовления инокулята, используемые в фармацевтическом производстве.

Вариант 4

1. Приведите экологические аспекты производства и основные направления совершенствования биотехнологического производства.
2. Дайте схему биологической очитки жидких отходов.
3. Объясните термин «активный ил» и «штаммы-деструкторы».
4. Приведите основные виды микроорганизмов для создания препаратов пробиотиков.
5. Приведите примеры использования иммобилизованных микроорганизмов и растительных клеток для биотрансформации стероидных субстратов.

Вариант 5

1. Укажите отличие получения вакцины по Пастеру от способа получения выкцины по Дженнеру.
2. Рассмотрите антибиотики с точки зрения их бактерицидных свойств.
3. Приведите обоснования биологической активности сульфаниламидов.
4. укажите добавление какого вещества и в какое время от начала ферментации резко повышает выход пенициллина в среду.
5. Приведите примеры антибиотиков-полиенов и опишите механизм действия этих антибиотиков.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бекер М.Е. и др. Биотехнология / М.Е. Бекер, Г.К. Лиепеньш, Е.П. Райпулис. – М.: Агропромиздат, 1990. – 334 с.
2. Биотехнологическое использование отходов растениеводства / под ред. В.С. Подгорского, В.Н. Иванова. - Киев: Наукова думка, 1990. – 93 с.
3. Биотехнология лекарственных средств : учеб. пособие / под ред. В.А. Быкова, М.В. Данилина. – М. : Медбиоэкономика, 1991. – 303 с.
4. Биотехнология растений: культура клеток / под ред. Р.Г. Бутенко. – М .: Агропромиздат, 1989. – 279 с.
5. Биотехнология: Принципы и применение / под ред. И.Хиггинса, Д. Беста, Дж. Джойса ; пер с англ. – М. : Мир, 1998. – 485 с.
6. Биотехнология: Учеб. пособие для вузов. В 8 кн. / под ред. Н.С. Егорова, В.Д. Самуилова. 1987-1988.
7. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. - М.: Мир, 2002. – 589 с.
8. Дебабов В.Г. современные методы создания промышленных штаммов микроорганизмов. Биотехнология. Кн. 2 : учеб. пособие для вузов / В.Г. Дебабов, В.А. Лившиц. – М. : Высш. шк. – 1988. – 208 с.
9. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках / Н.С. Егоров. – М. : Наука, 2004. – 525 с.
10. Егорова Т.А. Основы биотехнологии / Т.А. Егорова, С.М. Клунова, Е.А. Живухина. - М.: Издат. центр «Академия», 2003. – 208 с.
11. Елинов Н.П. Основы биотехнологии / Н.П. Елинов. – С.-Пб: Наука, 1995. – 553 с.
12. Иммобилизованные клетки и ферменты / под ред. Дж. Вудворта ; пер. с англ. – М. : Мир, 1998. – 321 с.
13. Иммобилизованные клетки микроорганизмов / А.П. Синицын и др. - М.: Изд-во МГУ, 1994. – 288 с.
14. Иммобилизованные ферменты. Биотехнология. Кн. 7 : учеб. пособие для вызов / [И.В. Березин и др.]. – М. : Высш. шк. – 1987. – 159 с.
15. Инженерная энзимология. Биотехнология. Кн. 8 : учеб. пособие для вузов / [И.В. Березин и др.]. – М. : Высш. шк. – 1987. – 143 с.
16. Квасников Е.И. Дрожжи. Биология. Пути использования / Е.И. Квасников, И.Ф. Щелкова. - Киев: Наукова думка, 1991. – 332 с.
17. Микробиологическое производство биологически активных веществ и препаратов. Биотехнология. Кн. 6 : учеб. пособие для вузов / [В.А. Быков и др.]. – М. : Высш. шк. – 1987. – 143 с.
18. Основы сельскохозяйственной биотехнологии / Муромцев Г.С. и др. – М .: Агропромиздат, 1990. – 383 с.
19. Производство белковых веществ. Биотехнология. Кн. 5 : учеб. пособие для вузов / [В.А. Быков и др.]. – М. : Высш. шк. – 1987. – 142 с.
20. Промышленная микробиология / под ред. Н.С. Егорова. – М. : Высш. шк., 1989. – 687 с.
21. Сазыкин Ю.О. Антибиотики как биохимические реагенты / Ю.О. Сазыкин. – М. : ВИНИТИ, 1984. – 203 с.

22. Саруханов А.В. Оборудование микробиологических производств : справочник / А.В. Саруханов, В.А. Быков. – М. : Колос, 1993. – 384 с.

23. Сельскохозяйственная биотехнология / под ред. В.С. Шевелухи. – М . : Высш. шк., 1998. – 416 с.

24. Сидоров В.А. Биотехнология растений. Клеточная селекция / В.А. Сидоров. - Киев: Наукова думка, 1991. – 279 с.

25. Учебно-методическое пособие по “Основам биотехнологии” для студентов 4 курса дневного отделения / сост. Т.А. Ковалева. - Воронеж, 1997. – 34 с.

26. Фармацевтическая биотехнология : [учебное пособие для студ., обуч. по специальности 060108 - "Фармация"] / [В.А. Быков и др.] ; под общ. ред. В.А. Быкова .— Воронеж : Изд-во Воронеж. гос. ун-та, 2009 .— 429, [1] с.

27. Шабарова З.А. Химические основы генетической инженерии / З.А. Шабарова, А.А. Богданова, А.С. Золотухин. – М.: Изд-во МГУ, 1994. – 224 с.

28. Шилова С.В. Организация производства лекарственных средств с учетом правил GMP. Химико-фармацевтическое производство, обзорная информация / С.В. Шилова, С.М. Пузакова. – М. : ВНИИСЭНТИ, 1990. – 36 с.

29. Щелкунов С.Н. Генетическая инженерия / С.Н. Щелкунов. - Новосибирск: Изд-во Новосиб. ун-та, 1997. ч. 1-2.

30. Экологическая биотехнология / под ред. К.Ф. Форстера и Р.А. Дж. Вейза. - Л.: Химия, 1990.-382 с.