

Слагаемые биотехнологического производства

Цели осуществления биотехнологии :

1. основной этап производства ЛС – получение биомассы (сырья, ЛВ);
2. один или несколько этапов производства ЛС (в составе химического или биологического синтеза) - биотрансформация, разделение рацематов и т.п.;
3. полный процесс производства ЛС – функционирование биообъекта на всех стадиях создания препарата.

Главные особенности БТ производства:

1. два активных и взаимосвязанных представителя средств производства – биообъект и «ферментер»;
2. чем выше темп функционирования биообъекта, тем более высокие требования предъявляются к аппаратурному оформлению процессов;
3. оптимизации подвергают и биообъект и аппараты биотехнологического производства

Условия осуществления биотехнологий при производстве ЛП

1. Генетически обусловленная способность био-объекта к синтезу или специфической трансформации связанной с получением БАВ или ЛС;
2. Защищенность био-объекта в биотехнологической системе от внутренних и внешних факторов;
3. Обеспечение функционирующих в биотехнологических системах био-объектов пластическим и энергетическим материалом в объемах и последовательности, гарантирующих нужную направленность и темп биотрансформации.

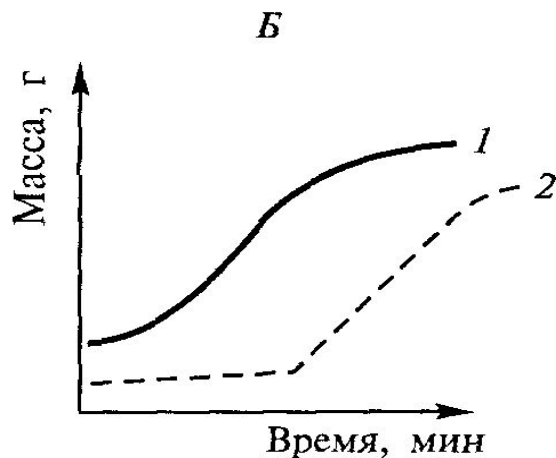
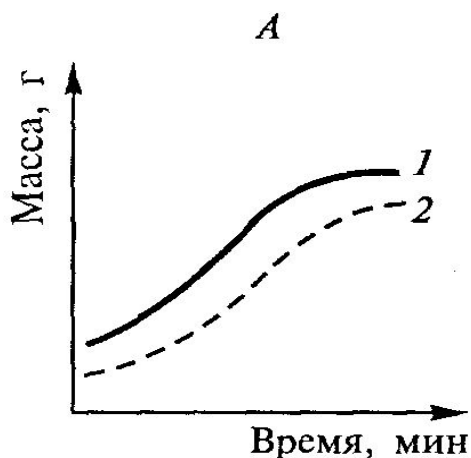
Схема биотехнологического производства



Биообъект – это продуцент, биосинтезирующий нужный продукт, либо катализатор, фермент, который катализирует присущую ему реакцию.

КЛАССИФИКАЦИЯ ПРОДУКТОВ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДСТВ

- типы продуктов получаемых БТ методами:
 - интактные клетки
 - одноклеточные организмы используют для получения биомассы
 - клетки (в т.ч. иммобилизованные) для биотрансформации.
- *Биотрансформация* - реакции превращения исходных органических соединений (предшественников) в целевой продукт с помощью клеток живых организмов или ферментов, выделенных из них. (производство ам-к-т, а/б, стероидов и др.)
- низкомолекулярные продукты метаболизма живых клеток:
 - Первичные метаболиты необходимы для роста клеток. (структурные единицы биополимеров — ам-к-ты, нуклеотиды, моносахариды, витамины, коферменты, органические к-ты)
 - Вторичные метаболиты (а/б, пигменты, токсины) — НМС, не требующиеся для выживания клеток и образующиеся по завершении фазы их роста.

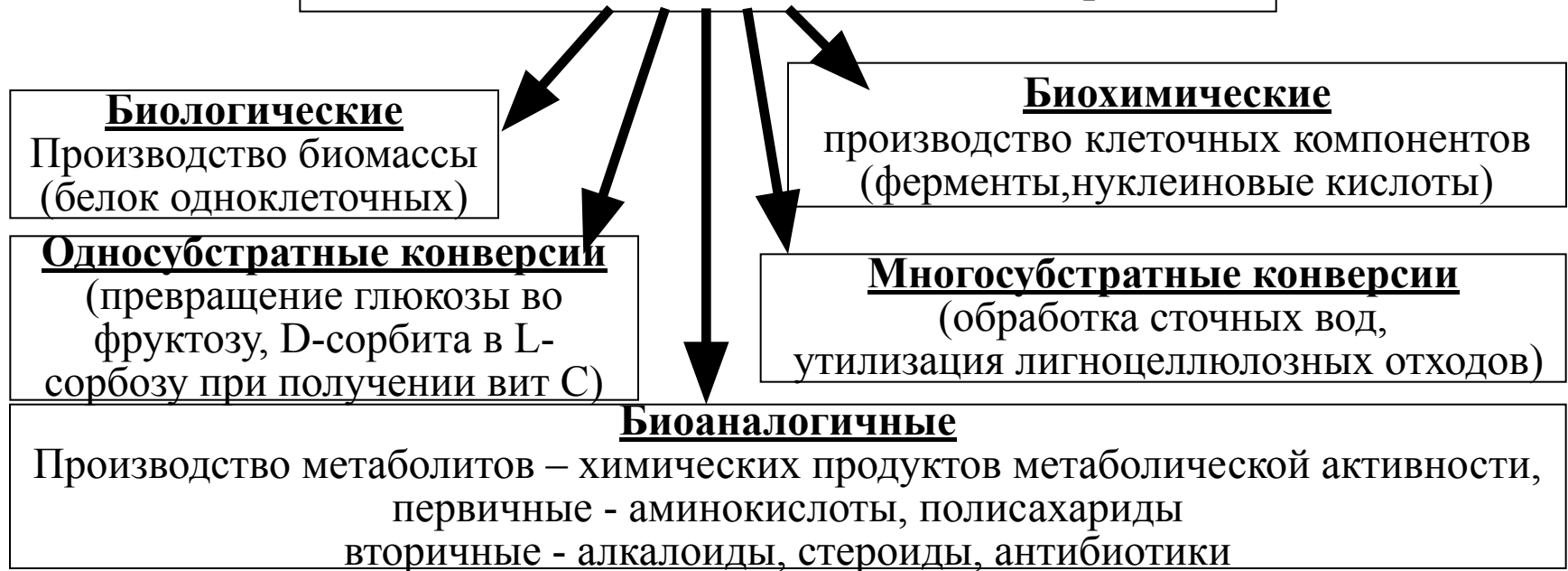


Динамика изменения биомассы и образования первичных (А) и вторичных (Б) метаболитов в процессе роста организма:
1 — биомасса;
2 — продукт

СТРУКТУРА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА



Основные типы биотехнологических процессов



Стадии БТ производства

1. Подготовка сырья (питательной среды) субстрата с заданными свойствами (рН, температура, концентрация)
2. Подготовка биообъекта: посевной культуры или фермента (в т.ч. иммобилизованного) .
3. Биосинтез, биотрансформация (ферментация) - образование целевого продукта за счет биологического превращения компонентов питательной среды в биомассу, затем, если это необходимо, в целевой метаболит.
4. Выделение и очистка целевого продукта.
5. Получение товарной формы продукта
6. Переработка и утилизация отходов (биомассы, культуральной жидкости и т.п.)

1. Вспомогательные операции:

1.1. Подготовка посевного материала (инокулята):

засев пробирок,
качалочных колб (1-3 сут),
инокулятора (2-3 % 2-3 сут),
посевого аппарата (2-3сут).

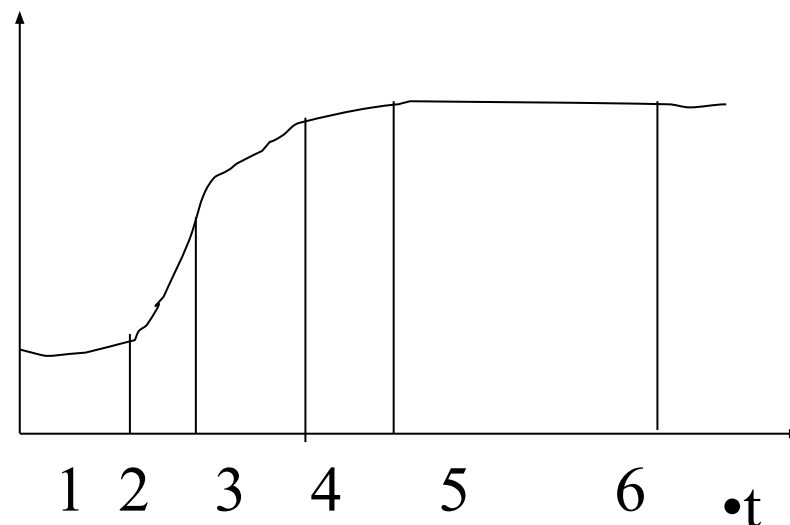
1.2. Подготовка питательной среды

- выбор и реализация рецептуры среды,
- стерилизация гарантирующая сохранность пластических и энергетических компонентов, в исходном количестве и качестве.

Особенностью биообъектов является потребность в многокомпонентных энергетических и пластических субстратах, содержащих O, C, N, P, H – элементы необходимые для энергетического обмена и синтеза клеточных структур.

Кинетические кривые роста

1. индукционный период (лаг-фаза)
2. фаза экспоненциального роста (накопление биомассы и продуктов биосинтеза)
3. фаза линейного роста (равномерный рост культуры)
4. фаза замедленного роста
5. стационарная фаза (постоянство жизнеспособных особей)
6. Фаза старения культуры (отмирания)

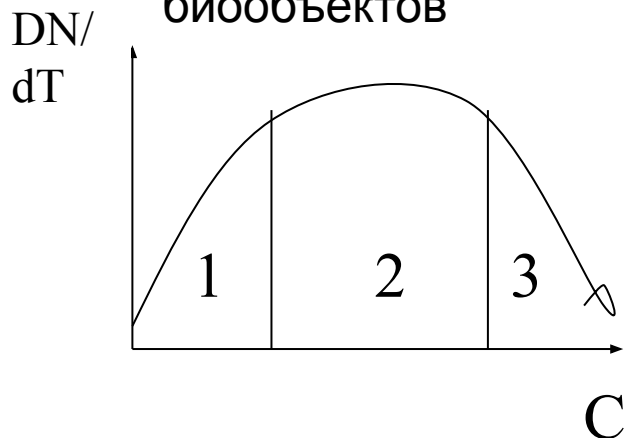


Содержание биогенных элементов в различных биообъектах, в %

- Элементный состав биомассы по химическим элементам позволяет сделать для каждого биообъекта описание

Микро-организмы	элемент				
	углерод	азот	фосфор	кислород	водород
бактерии	50,4	12,3	4,0	30,5	6,8
дрожжи	47,8	10,4	4,5	31,1	6,5
грибы	47,9	5,2	3,5	40,4	6,7

Существует количественная закономерность влияния концентрации элементов питательной среды на скорость роста биомассы, равно как и взаимовлияние тех же элементов на удельную скорость роста биообъектов



C – концентрация лимитирующего компонента
 DN/dT – скорость роста микроорганизмов.
1 -область лимитирования,
2- область оптимального роста,
3 – область ингибирования.

1.3. Стерилизация питательной среды

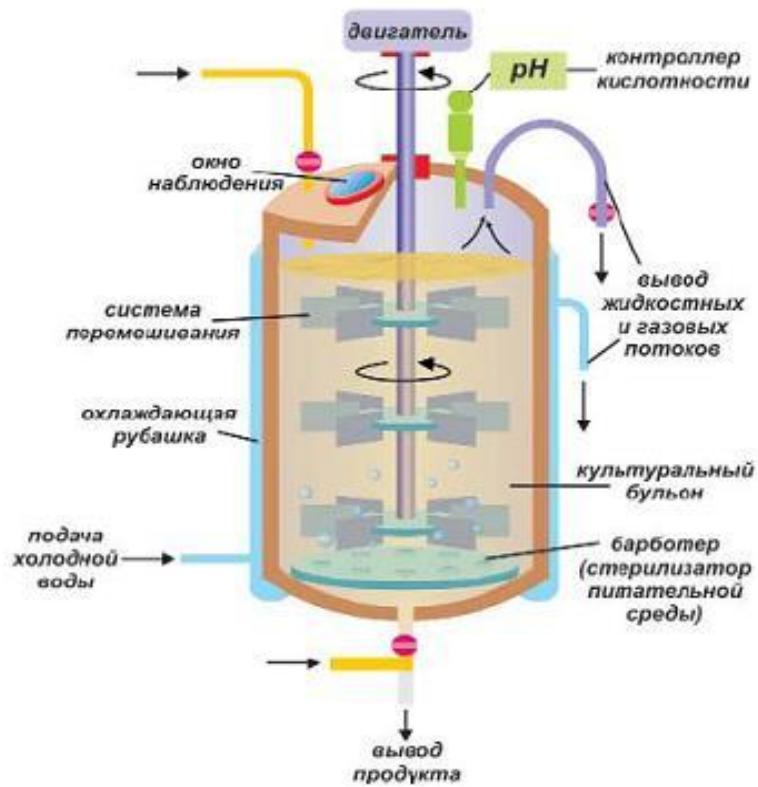
- **необходимо полностью исключить контаминантную флору и сохранить биологическую полноценность субстратов**

чаще автоклавирование, реже химические и физические воздействия.

Эффективность выбранного режима стерилизации оценивают по константе скорости гибели микроорганизмов (берется из специальных таблиц) умноженная на продолжительность стерилизации.

1.4. Подготовка ферментера

- Стерилизация оборудования острым паром. Герметизация с особым вниманием к «слабым» точкам тупиковые штуцера малого диаметра, штуцера датчиков контрольно-измерительной аппаратуры.
- Выбор ферментера осуществляется с учетом критериев дыхания биообъекта, теплообмена, транспорт и превращения субстрата в клетке, скорость роста единичной клетки, время ее размножения и т.п.



- **Ферментация** – основной этап биотехнологического процесса
- Ферментация – это вся совокупность операций от внесения микробов в подготовленную и нагретую до необходимой температуры среду до завершения биосинтеза целевого продукта или роста клеток. Весь процесс протекает в специальной установке – ферментере.
- ❖ Все биотехнологические процессы можно разделить на две большие группы - **периодические и непрерывные**.
- При **периодическом** способе производства простерилизованный ферментер заполняется питательной средой, часто уже содержащей нужные микроорганизмы. Биохимические процессы в этом ферментере продолжаются от нескольких часов до нескольких дней.
- При **непрерывном** способе подача равных объемов сырья (питательных веществ) и отвод культуральной жидкости, содержащей клетки продуцента и целевой продукт осуществляется одновременно. Такие ферментационные системы характеризуются как открытые.

Методы ферментации

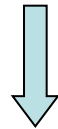
Глубинная

Твердофазная
поверхностная

Ферментация

Периодические

Непрерывная



Клетки

Ферменты

Суспендированные
клетки

Иммобилизованные
ферменты

Иммобилизованные
клетки

Ферменты в растворе

Аппаратное оформление

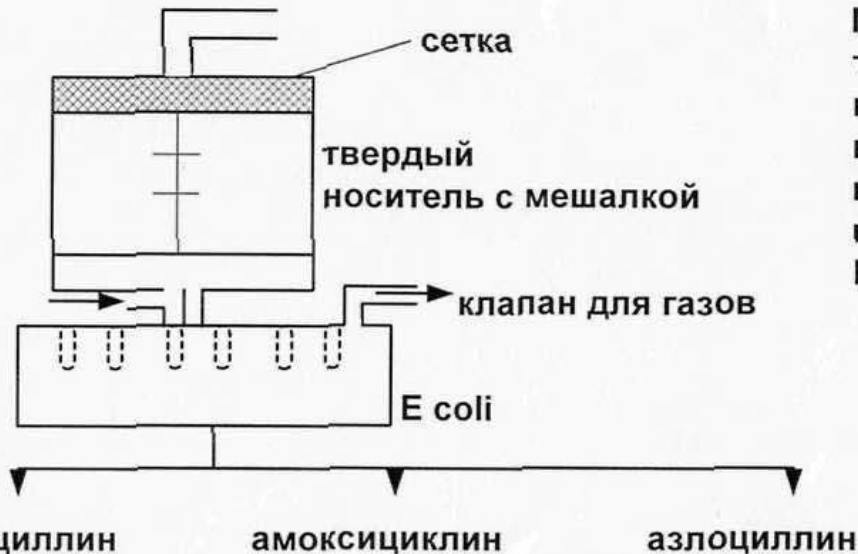
Типы биореакторов.

1. Реактор колоночного типа.



Реактор колоночного типа используется для иммобилизованных ферментов. Если много носителя, то возможно замедление тока растворителя.

2. Модифицированный реактор колоночного типа.



Модифицированный реактор колоночного типа используется для иммобилизованных клеток. Вверху сетка для сдерживания вспучивания при прохождении газа, имеется клапан для выхода газообразных продуктов. В реакторе имеется мешалка. Количество носителя уменьшается.

Аппаратурное оформление биотехнологического процесса - ферментеры:

по объёму:

- лабораторные 0,5 -100 л,
 - пилотные 100л -10 м3,
 - промышленные 10 - 100 м3 и более.
- критерии выбора ферментера:
 - теплообмен,
 - скорость роста единичной клетки,
 - Тип дыхания биообъекта,
 - Вид транспорта и превращения субстрата в клетке
 - время размножения отдельной клетке.

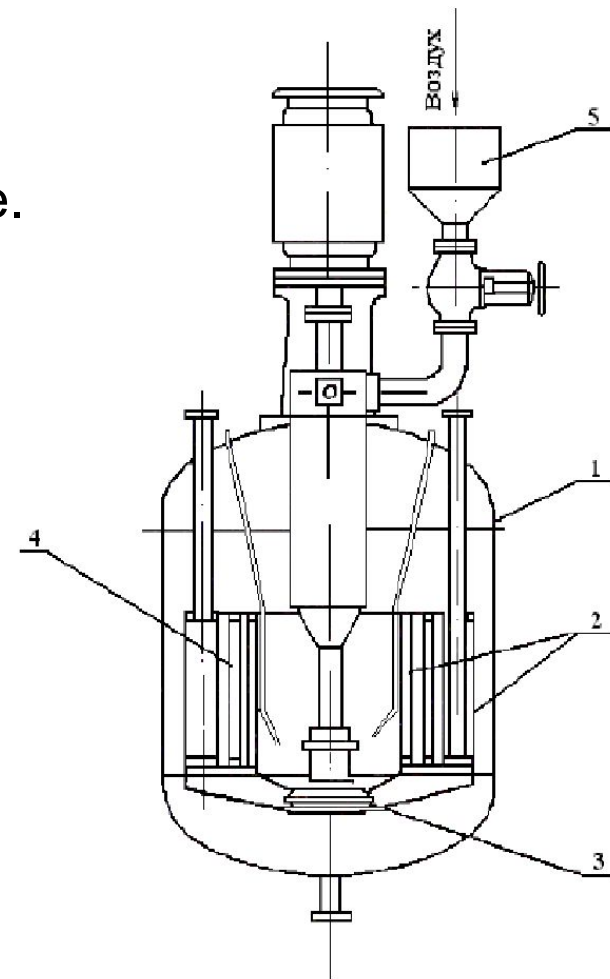


Рис.27. Ферментатор с самовсасывающей мешалкой непрерывного действия:
1- корпус, 2 – диффузор, 3 – самовсасывающая мешалка, 4 – теплообменник,
5 – фильтр

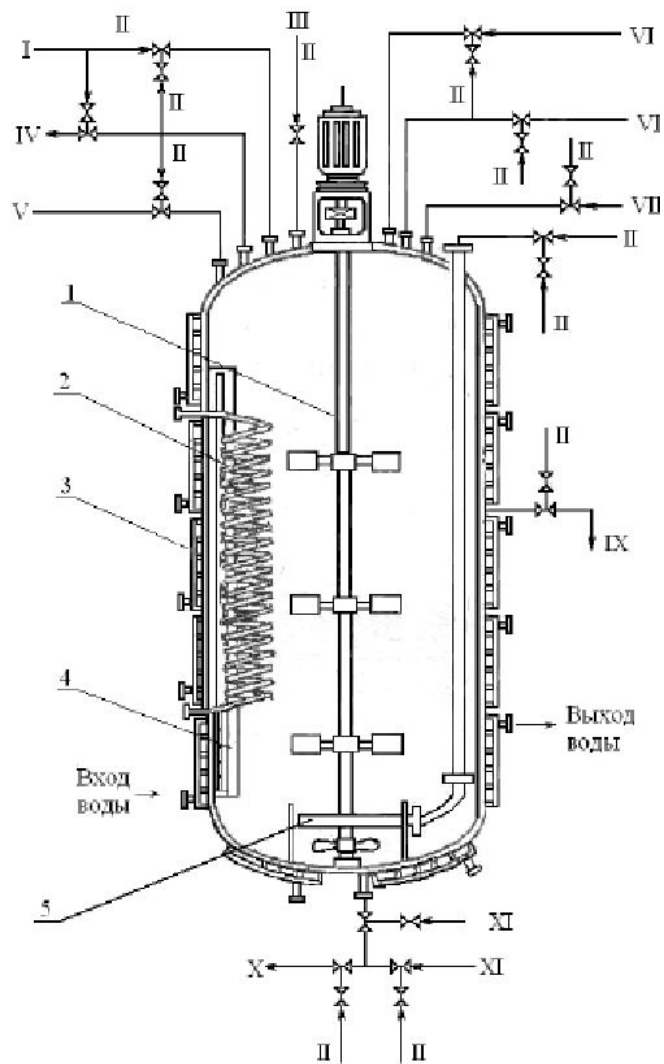


Рис.25. Ферментатор периодического действия: 1- турбинная трехъярусная мешалка, 2 – охлаждающий змеевик, 3 - секционная рубашка, 4 – отражательная перегородка, 5 – барботер, П-пар; I –XI – материальные и вспомогательные трубопроводы с запорно-регулирующими устройствами (I – посевная линия, II – подача стерильного сжатого воздуха, III – подача пара, IV – удаление отработанного воздуха, V – загрузочная линия, VI – линия введения добавок, VII – подача пеногасителя, VIII – подача моющего раствора, IX – пробоотборник, X – выдача продукта, XI – выдача в канализацию через нижний спуск)

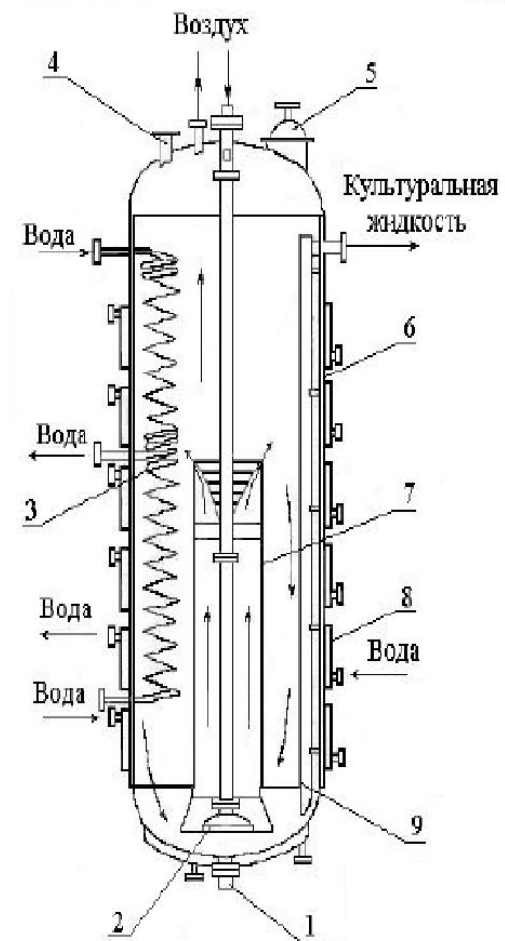


Рис.26. Ферментатор с эрлифтом: 1- штуцер для слива; 2 – аэратор; 3 – змеевик; 4 – штуцер для загрузки; 5 – люк; 6 – корпус аппарата; 7 – диффузор; 8 – рубашка; 9 – руба передавливания

Ферментеры



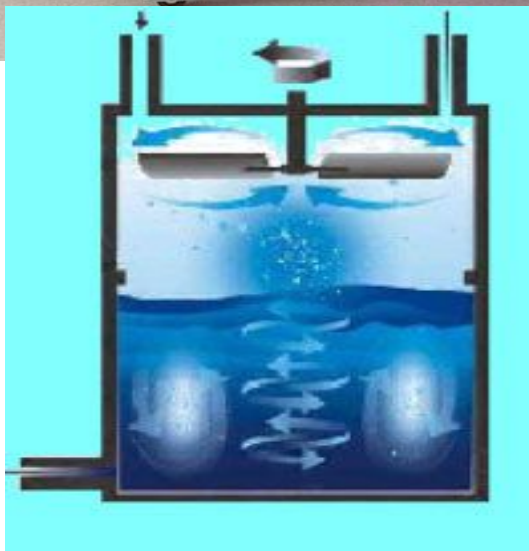
Ферментационный цех



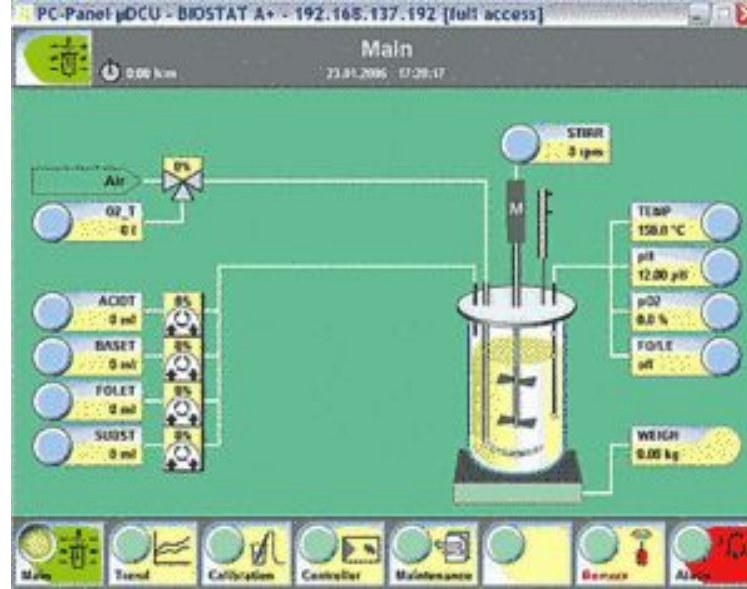
Инкубационная качалка



Лабораторный
газовихревой



Производственный

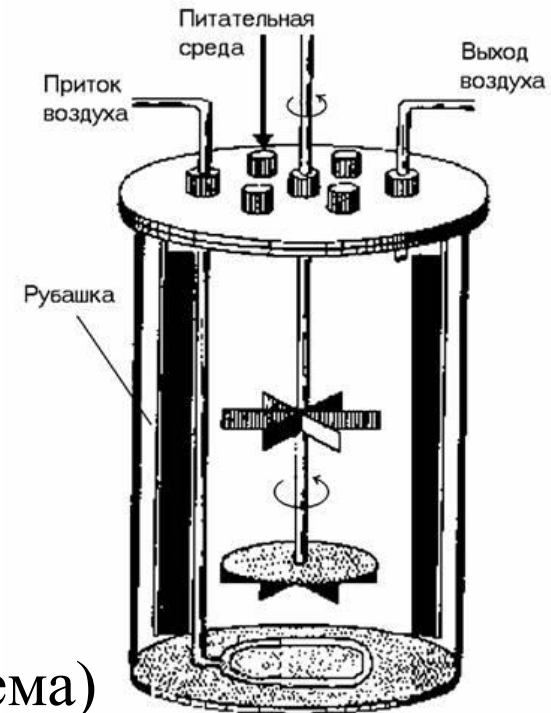


Biostat A plus - автоклавируемый ферментер со сменными сосудах (рабочий объем 1,2 и 5 л) для культивирования микроорганизмов и культур клеток и является полностью масштабируемым при переходе к большим объемам.

Единый корпус с интегрированным оборудованием измерения и управления, насосами, системой температурного контроля, подачи газа и мотором

Ноутбук с заранее установленным Windows совместимым программным обеспечением MFCS / DA для управления процессами ферментации и их документирования

Лабораторный (схема)



Биосинтез БАВ (биологически активные вещества) в условиях производства

БИОСИНТЕЗ

- **Стерильное оборудование**
- **Стерильная питательная среда**
- **Стерильный воздух**

Параметры, влияющие на биосинтез (физические, химические, биологические)

1. Температура
2. Число оборотов мешалки (для каждого м/о (микроорганизмы) – разное число оборотов, разные 2х, 3х, 5-ти ярусные мешалки).
3. Расход подаваемого на аэрацию воздуха.
4. Давление в ферментере
5. рН среды
6. Парциальное давление растворенного в воде кислорода (количество кислорода)
7. Концентрация углекислого газа при выходе из ферментера
8. Биохимические показатели (потребление питательных веществ)
9. Морфологические показатели (цитологические) развитие клеток м/о, т.е. надо следить в процессе биосинтеза за развитием м/о
10. Наличие посторонней микрофлоры
11. Определение в процессе ферментации биологической активности

2 . Основные операции:

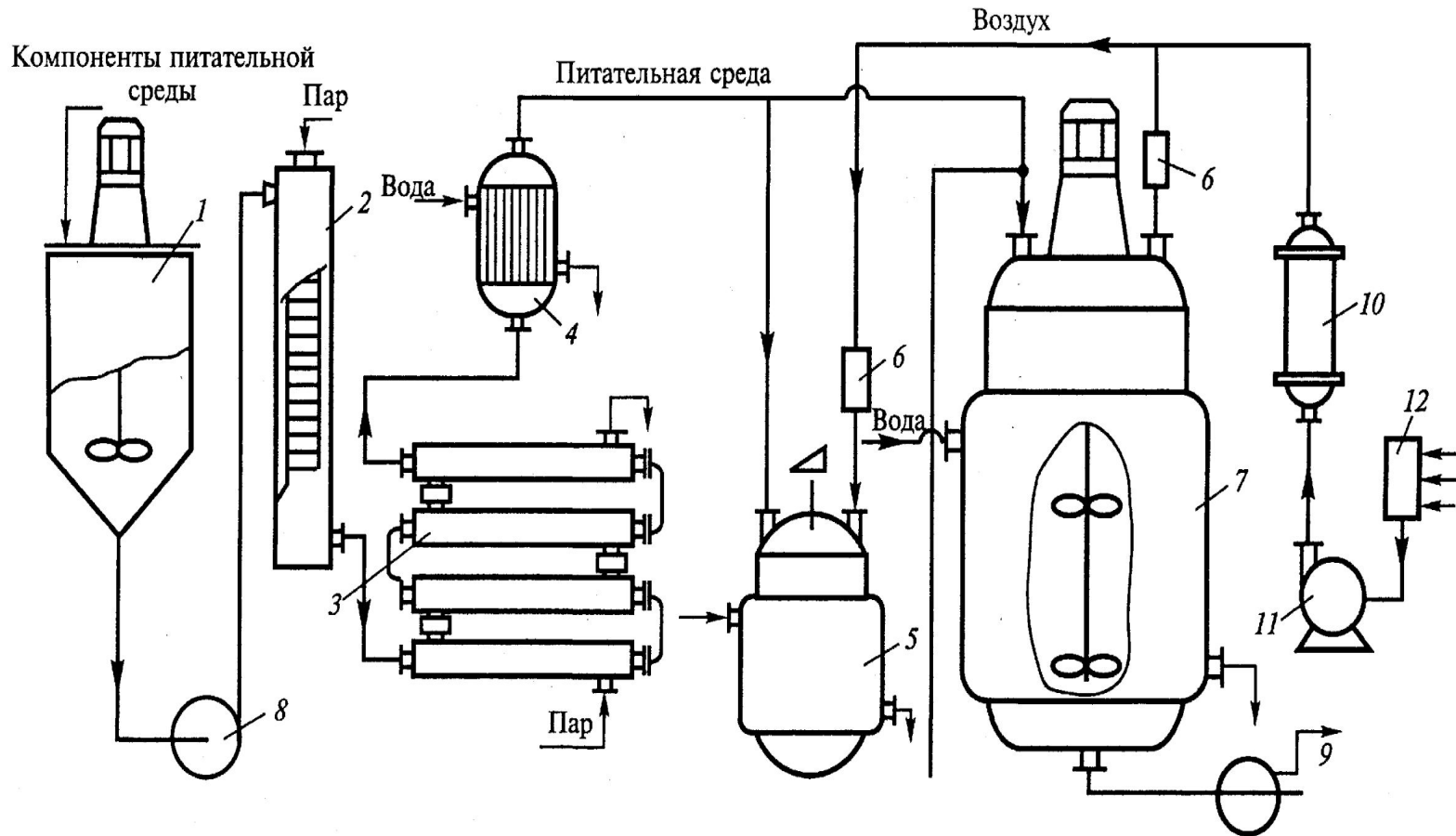
- 2.1. Стадия биосинтеза, где в максимальной степени используются возможности биообъекта для получения лекарственного продукта (накапливается внутри клетки или секретирется в культуральную среду).
- 2.2. Стадия концентрирования, одновременно предназначена для удаления баласта.
- 2.3. Стадия очистки, реализующая за счет повтора однотипных операций или за счет набора различных препаративных приемов (ультрафильтрация, экстракция, сорбция, кристаллизация и т. п) повышение удельной специфической активности лекарственного продукта.
- 2.4. Стадия получения конечного продукта (субстанции или готовой лекарственной формы) с последующими операциями фасовки и упаковки.

Схема биотехнологического производства



ГЛУБИННОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ

Технологическая схема глубинного культивирования микроорганизмов.



Фармацевтические препараты требуют высокой степени чистоты



Стоимость очистки тем выше,
чем ниже концентрация вещества в клетках.

Этапы очистки:

1. Сепарация.
2. Разрушение клеточных оболочек (дезинтеграция биомассы)
3. Отделение клеточных стенок.
4. Отделение и очистка продукта.
5. Тонкая очистка и разделение препаратов.

Этапы очистки

Этап 1. СЕПАРАЦИЯ - отделение массы продуцента от жидкой фазы. Предварительно для повышения эффективности может проводиться:

- изменение pH,
- нагревание,
- добавление коагулянтов белков или флокулянтов.

СПОСОБЫ СЕПАРАЦИИ

1. Флотация (буквально – плавание на поверхности воды) – разделение мелких частиц и выделение капель дисперсной фазы из эмульсий.

Основана на различной смачиваемости частиц (капель) жидкостью (преимущественно водой) и на их избирательном прилипании к поверхности раздела, как правило, жидкость – газ (очень редко: твердые частицы – жидкость).

Основные виды флотации:

- **пенная** (культуральную жидкость с биомассой микроорганизмов непрерывно вспенивают воздухом, подаваемым снизу вверх под давлением, клетки и их агрегаты «прилипают» к пузырькам тонкодиспергированного воздуха и всплывают вместе с ними, собираясь в специальном отстойнике)
- **масляная**
- **пленочная.**

СПОСОБЫ СЕПАРАЦИИ

2. Фильтрация - используется принцип задержки биомассы на пористой фильтрующей перегородке.

Используются фильтры:

- однократного и многократного использования;
- периодического и непрерывного действия (с автоматическим удалением слоя биомассы, забивающего поры);
- барабанные,
- дисковые,
- ленточные,
- тарелочные,
- карусельные вакуум-фильтры,
- фильтры-прессы различной конструкции,
- мембранные фильтры.

СПОСОБЫ СЕПАРАЦИИ

3. Физическое осаждение. Если биомасса содержит заметных количеств целевого продукта, она осаждается добавлением извести или других твердых компонентов, увлекающих клетки или мицелий на дно.

4. Центрифугирование. Осаждение взвешенных частиц происходит под действием центробежной силы с образованием 2 фракций: биомассы (твердая) и культуральной жидкости.

«-»: необходимо дорогостоящее оборудование;

«+»: позволяет максимально освободить культуральную жидкость от частиц;

Центрифугирование и фильтрация могут проходить одновременно в *фильтрационных центрифугах*.

Высокоскоростное центрифугирование разделяет клеточные компоненты по размеру: более крупные частицы при центрифугировании движутся быстрее.

Этап 2. РАЗРУШЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ ОБОЛОЧЕК (ДЕЗИНТЕГРАЦИЯ БИОМАССЫ)

Стадия используется, если искомые продукты находятся внутри клеток продуцента.

МЕТОДЫ ДЕЗИНТЕГРАЦИИ

- механические,
- химические
- комбинированные.

Физические методы - обработка ультразвуком, вращение лопасти или вибратора, встряхивание со стеклянными бусами, продавливание через узкое отверстие под давлением, раздавливание замороженной клеточной массы, растирание в ступке, осмотический шок, замораживание-оттаивание, декомпрессия (сжатие с последующим резким снижением давления).

«+»: экономичность методов.

«-»: избирательность методов, обработка может снижать качество получаемого продукта.

МЕТОДЫ ДЕЗИНТЕГРАЦИИ

Химические и химико-ферментативные методы - клетки могут быть разрушены толуолом или бутанолом, антибиотиками, ферментами.

«+»: более высокая избирательность методов

Примеры:

- клетки грамотрицательных бактерий обрабатывают лизоцимом в присутствии этилендиаминтераксусной кислоты или других детергентов,
- клетки дрожжей – зимолиазой улитки, ферментами грибов, актиномицетов.

ЭТАП 4. ОТДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА ПРОДУКТА

Выделение целевого продукта из культуральной жидкости или из гомогената разрушенных клеток проводят путем его осаждения, экстракции или адсорбции.

Осаждение:

- физическое (нагревание, охлаждение, разбавление, концентрирование);
- химическое (с помощью неорганических и органических веществ - этанол, метанол, ацетон, изопропанол).

Механизм осаждения органическими веществами: снижение диэлектрической постоянной среды, разрушение гидратного слоя молекул.

Высаливание:

Механизм высаливания: гидратируются диссоциирующие ионы неорганических солей.

Реагенты: сульфат аммония, сульфаты натрия, магния, фосфат калия.

Экстракция – процесс избирательного извлечения одного или нескольких растворимых компонентов из твердых тел и растворов с помощью жидкого растворителя – экстрагента.

Типы экстракции:

- Твердо-жидкостная (вещество из твердой фазы переходит в жидкую) - например, хлорофилл из спиртовой вытяжки переходит в бензин
- Жидко-жидкостная (вещество переходит из одной жидкости в другую (извлечение антибиотиков, витаминов, каротиноидов, липидов)).
- Экстрагенты: фенол, бензиловый спирт, хлороформ, жидкий пропанили бутан и др.

Способы повышения эффективности экстракции:

- повторная экстракция свежим экстрагентом;
 - выбор оптимального растворителя;
 - нагревание экстрагирующего агента или экстрагируемой жидкости;
 - понижением давления в аппарате для экстракции.
-
- Для экстракции хлороформом в лабораторных условиях используется аппарат «Сокслет», что позволяет многократно использовать растворитель.

ЭТАП 4. ОТДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА ПРОДУКТА (продолжение)

Адсорбция – частный случай экстракции, когда экстрагирующий агент является твердым телом - идет по ионообменному механизму.

Адсорбенты: иониты на основе целлюлозы:

- катионит – карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ);
- анионит – диэтиламиноэтилцеллюлоза (ДЭАЭ),
- сефадексы на основе декстрана и т.д.

МЕТОДЫ ТОНКОЙ ОЧИСТКИ И РАЗДЕЛЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ

Хроматография (от греч. *chroma* – цвет, краска и *-графия*) – физико-химический метод разделения и анализа смесей, основанный на распределении их компонентов между двумя фазами – неподвижной и подвижной (элюент), протекающей через неподвижную.

Виды хроматографии по технике выполнения:

- колоночная - разделение веществ проводится в специальных колонках
- плоскостная:
 - тонкослойная (ТСХ) – разделение проводится в тонком слое сорбента;
 - бумажная – на специальной бумаге.



Для крупномасштабного отделения и очистки продуктов биотехнологических процессов применимы:

- *аффинная преципитация* - лиганд прикрепляют к растворимому носителю, при добавлении смеси, содержащей соответствующий белок, образуется его комплекс с лигандом, который выпадает в осадок сразу после его формирования или после дополнения раствора электролитом.
- *аффинное разделение* - основано на применении системы, содержащей два водорастворимых полимера – наиболее высокоэффективный из аффинных методов очистки.

Гидрофобная хроматография основана на связывании белка в результате взаимодействия между алифатической цепью адсорбента и соответствующим гидрофобным участком на поверхности белковой глобулы.

Система **аффинной** очистки рекомбинантных белков Prof



- *Электрофорез* – метод разделения белков и нуклеиновых кислот в свободном водном растворе и пористом матриксе, в качестве которого можно
- использовать полисахариды, например, крахмал или агарозу.

Модификацией метода является электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН-ПААГ)



Gel electrophoresis is a common method for separating protein or DNA

Гель-электрофорез - распространенный метод разделения белков или ДНК