

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

ЛЕКЦИЯ 4

FOR MORE INFORMATION...

Доцент, к.ф.н.,
Пархач Маргарита Евгеньевна,
Белорусский государственный
медицинский университет,
кафедра фармацевтической технологии
parkhach_marg@mail.ru

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПРОЦЕСС

Характеристика. Основные этапы

Цель:

обеспечить условия оптимального роста продуцента (рекомбинантного микроорганизма) и получить целевой продукт с наибольшим выходом

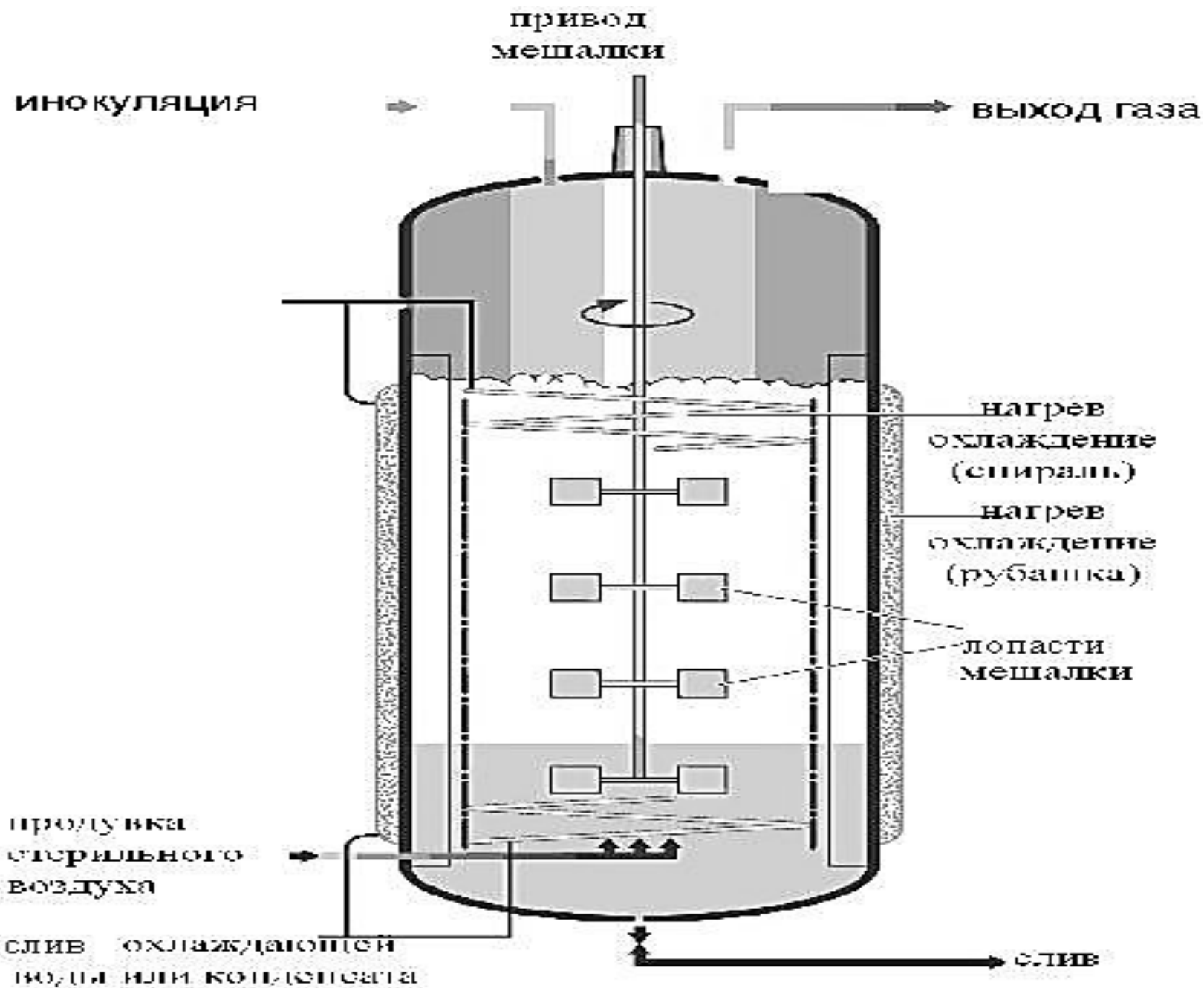
Условия проведения биотехнологического процесса:



- Стерильность;
- Предотвращение утечки генетически модифицированных микроорганизмов;
- Наличие ферментера, обвязки и КИПиА, позволяющих непрерывно отслеживать и корректировать значения как можно большего количества параметров культуральной среды.

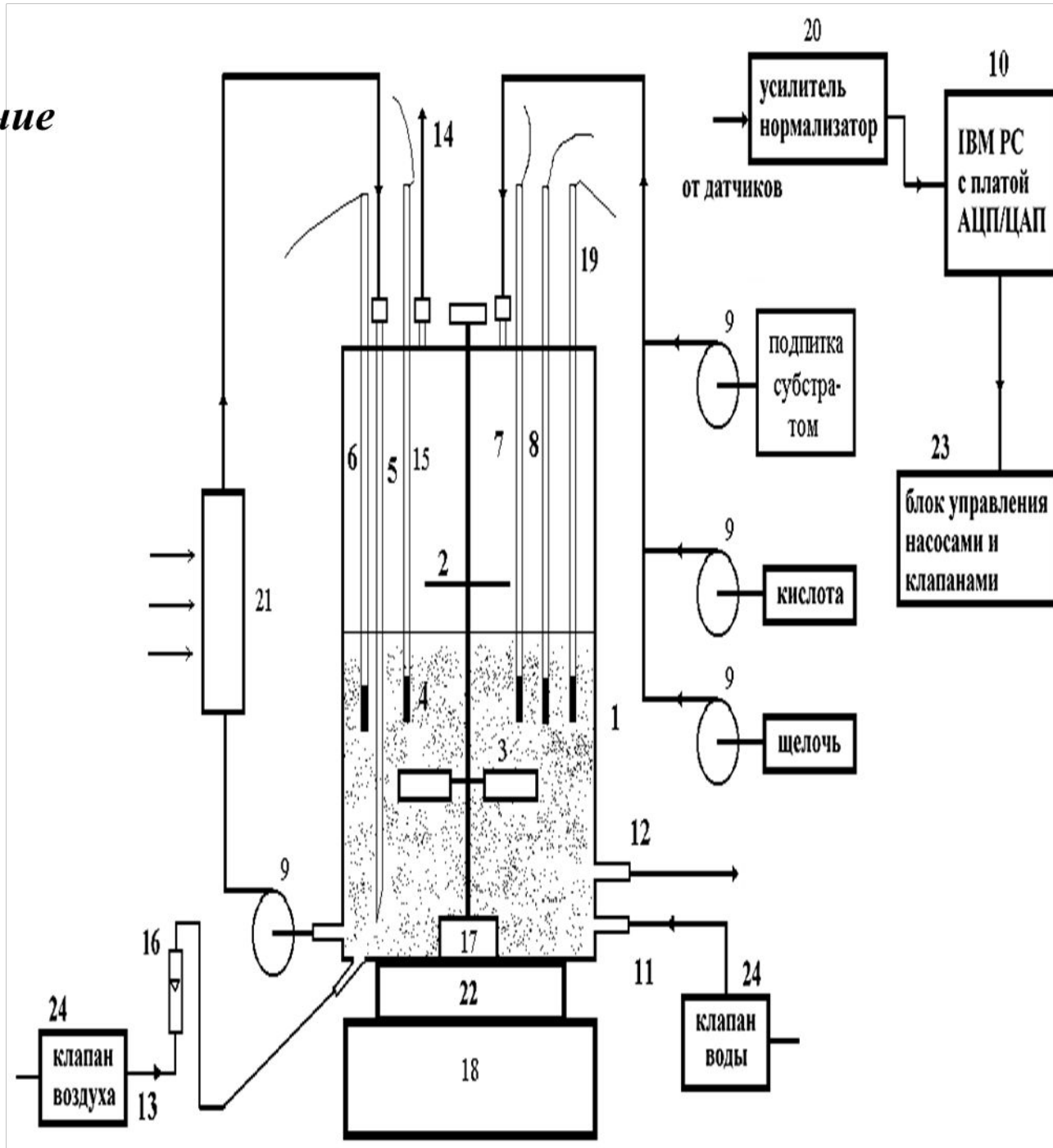
Биореактор = ферментер = ферментатор

Устройство Ферментера с механическим перемешиванием



Обвязка – контактирующее с ферментером оборудование и коммуникации

- 1 – корпус ферментера;
- 2 – дискообразный пеногасит;
- 3 – лопастная мешалка;
- 4 – среда культивирования;
- 5 – сливной патрубок;
- 6 – электрод сравнения;
- 7 – pH-электрод;
- 8 – pO_2 -электрод;
- 9 – перистальтические насосы;
- 10 – IBM PC с платой АЦП/ЦАП;
- 11, 12 – подача охлаждающей воды в теплообменник;
- 13 – подача воздуха;
- 14 – выход воздуха;
- 15 – термосопротивление;
- 16 – ротаметр;
- 17 – магнитный привод;
- 18 – привод двигателя;
- 19 – eH-электрод;
- 20 – усилитель-нормализатор;
- 21 – выносная кювета для измерения биомассы (оптической плотности ферментационной среды);
- 22 – нагревательный элемент;
- 23 – блок управления насосами и клапанами;
- 24 – клапаны



Основные стадии биотехнологического процесса

Приготовление и стерилизация питательных сред

Приготовление посевного материала

Культивирование (ферментация)

Обработка культуральной жидкости

Выделение и очистка биопрепарата

Получение готовой продукции

вспомогательные операции:

- стерилизация оборудования
- стерилизация коммуникаций
- подготовка пеногасителей,
- подготовка газов для барботирования и т.д.

Культивируемые биообъекты

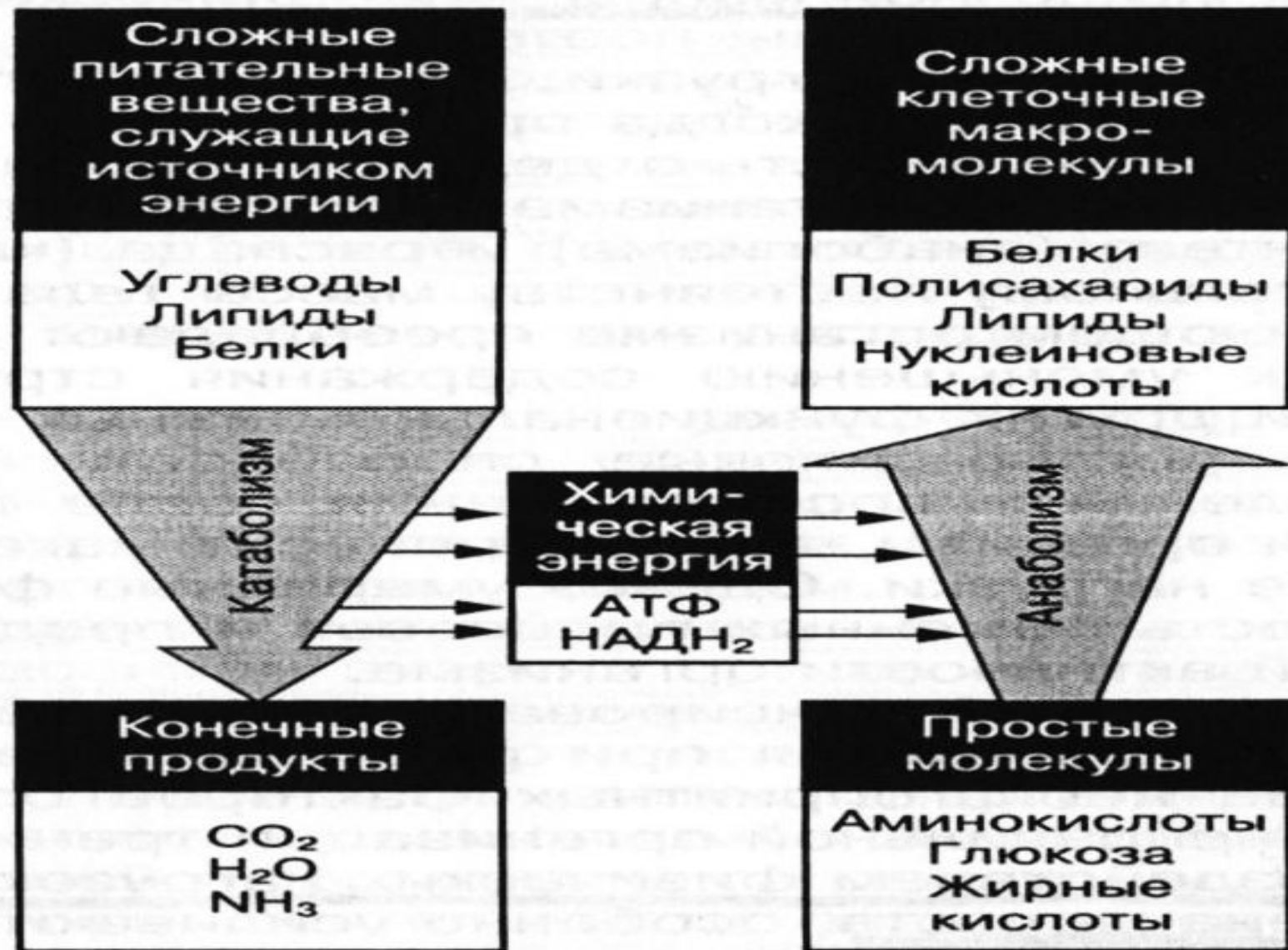
Культуры
одноклеточных
микроорганизмов
(бактерии, грибки)

- Автотрофы
 - Фототрофы (*синезеленые бактерии и др.*)
 - Хемотрофы (*Nitrobacter*)
- Гетеротрофы
 - Прототрофы (*кишечная палочка*)
 - Ауксотрофы (*молочнокислые бактерии*)

Культуры клеток многоклеточных организмов

Вирусы

Взаимосвязь анаболических и катаболических процессов обмена веществ биообъектов



Питательные среды

ТРЕБОВАНИЯ:

- Питат. вещества д.б. в легко усваиваемой форме;
- Высокая буферная емкость ;
- Изотоничность;
- Стерильность;
- рН д.б. оптимальным для клеток;
- оптимальная влажность,
- оптимальная вязкость

Классификация ПС

По составу:

- **Натуральные**
 - пептонные
 - на основе растительного сырья
- **Синтетические**

По назначению:

- **Элективные** (*Китт-Тароци, Петраньяни и др*)
- **Дифференциально-диагностические** (*различные виды микроорганизмов имеют неодинаковый набор ферментов, расщепляющих субстраты ПС*)

По консистенции:

- жидкие,
- полужидкие,
- плотные,
- сыпучие
- сухие

ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

**ОЛИГОПЕПТИДЫ И СВОБОДНЫЕ L-АМИНОКИСЛОТЫ,
ИСТОЧНИКИ УГЛЕРОДА (УГЛЕВОДЫ),
ЛИПИДЫ,
ПУРИНЫ И ПИРИМИДИНЫ,
ВИТАМИНЫ И МИКРОЭЛЕМЕНТЫ,
МАКРОЭЛЕМЕНТЫ (S, P, K, Ca, Mg, H₂O),
ФАКТОРЫ РОСТА (МИТОГЕНЫ),
СЫВОРОТКА КРОВИ,
КИСЛОТНО-ОСНОВНЫЕ ИНДИКАТОРЫ,
АНТИБИОТИКИ,**

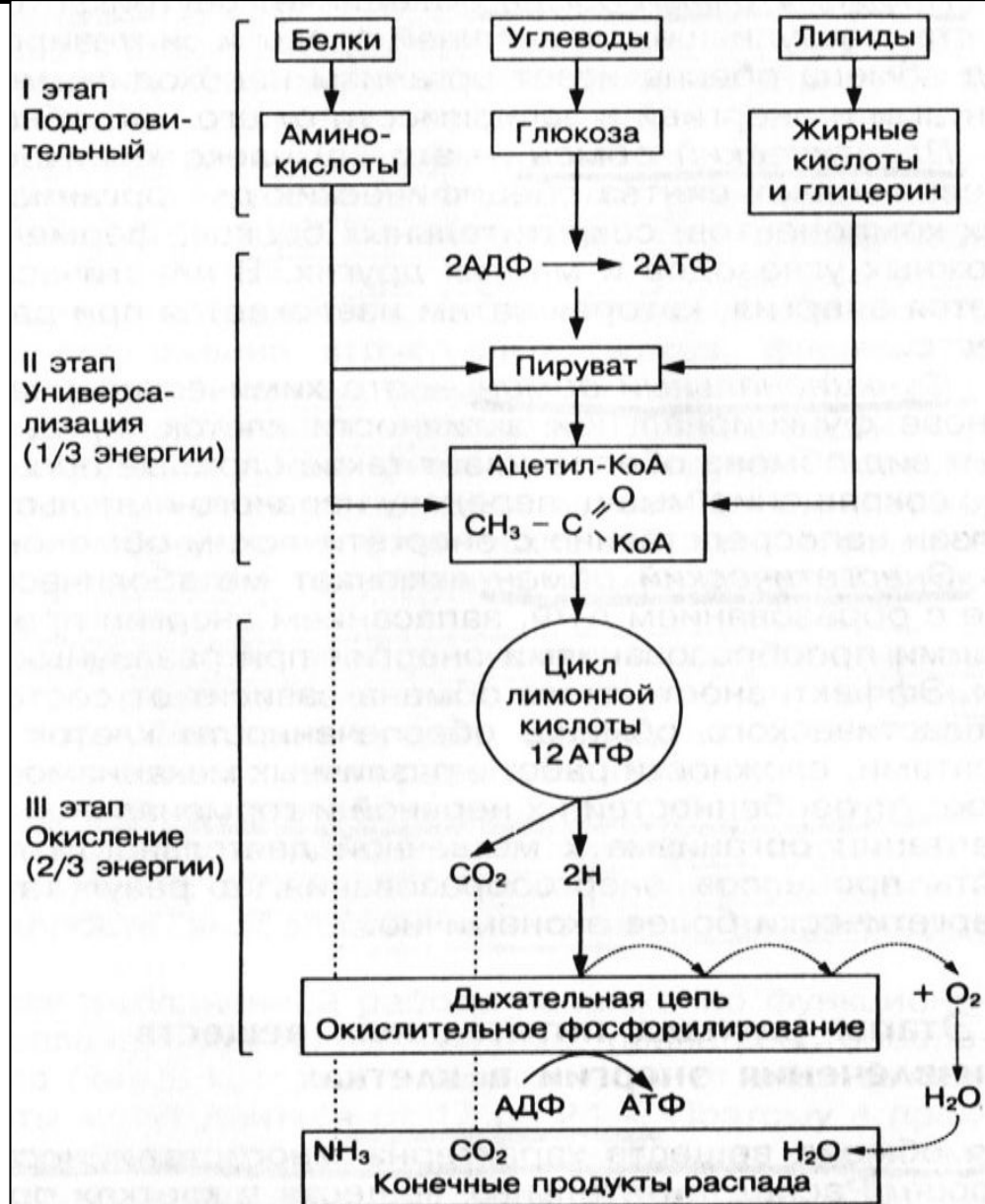
Этапы распада питательных веществ и извлечения энергии в клетках биообъектов

I этап. Сложные молекулы углеводов, белков и жиров распадаются до простых мономеров: моносахаридов, аминокислот, глицерина и жирных кислот

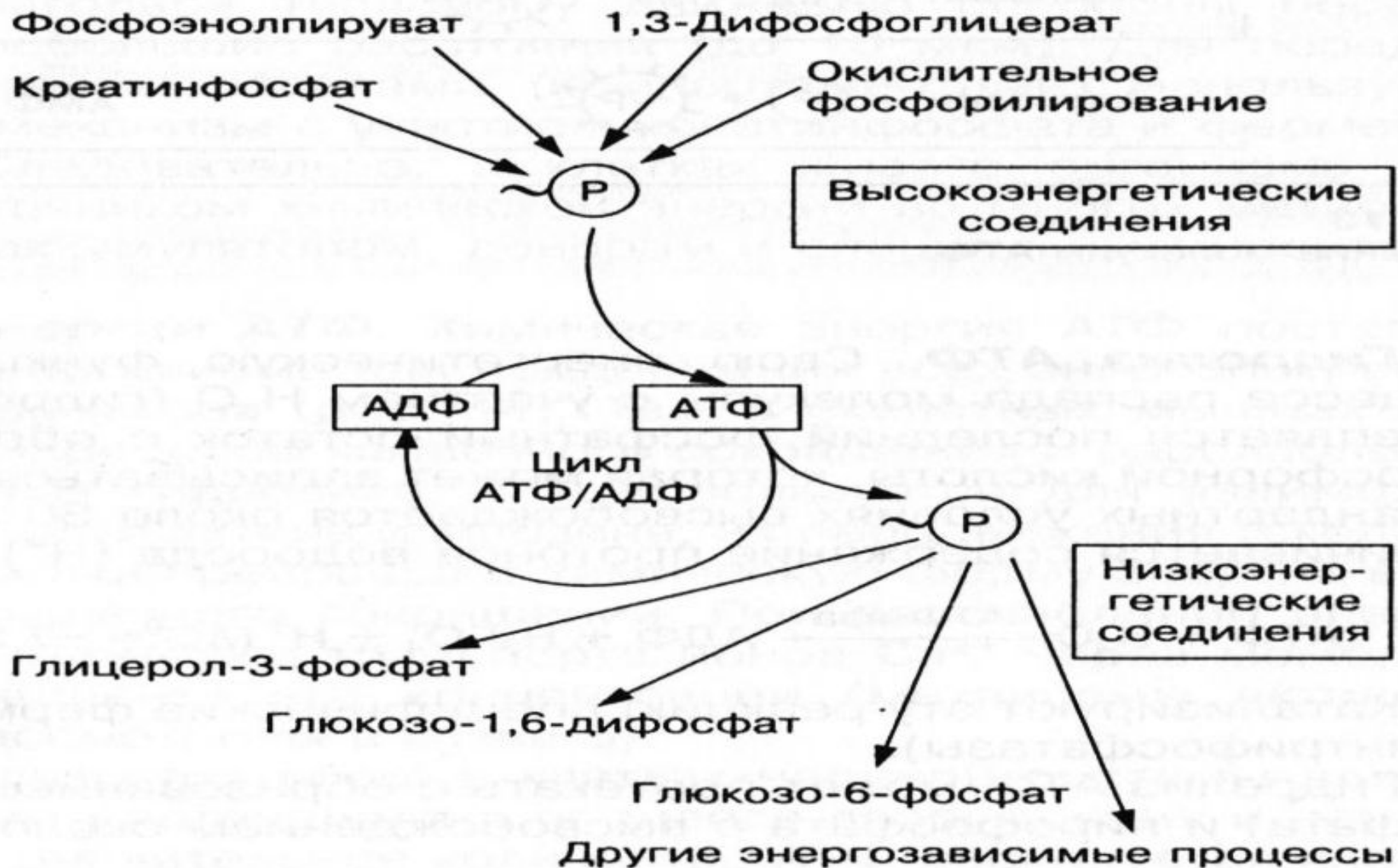
II этап. В-ва, образованные на I этапе, → в ацетил-КоА (активная форма уксусной к-ты), кот. объединяет пути их дальнейшего превращения

III этап. Ацетил-КоА в процессе сложных окислит. превращений распадается до CO_2 и H_2O . Вкл. цикл лимонной к-ты, систему терминального окисления (дыхательная цепь) и окислит. фосфорилирование на мембранах митохондрий (у эукариот).

Часть выделившейся энергии ↑ в виде тепла, другая часть накапливается в макроэргич. связях молекул АТФ, образующихся в рез



Роль цикла АТФ ↔ АДФ в обмене энергии в клетках биообъектов



Макроэргические связи АТФ устойчивы в воде, тогда как более высокоэнергетические вещества (фосфоенолпируват; 1,3-дифосфоглицерат; креатинфосфат) в воде нестабильны.

В связи с этим, в молекулах АТФ накапливается свободная энергия и используется в нужный момент для выполнения биологич. работы. **АТФ играет главную роль в обмене энергии в клетках биообъектов.**

Другие нуклеотиды – ГТФ, УТФ, ЦТФ – также высокоэнергетичны, но исп. как источники энергии лишь в некоторых биохимических процессах: ГТФ – при синтезе внутриклеточного белка; УТФ – при синтезе полисахаридов; ЦТФ – при синтезе липидов.

Количественное содержание компонентов ПС

При разработке количественного содержания компонентов ПС учитывают:

- Химический состав **биомассы** продуцента
- Хим. состав продукта, кот. культура синтезирует и \rightarrow в среду.
- Т.к. гетеротрофы исп. органические в-ва не только для построения своих клеточных структур, но и для энергетического обмена, необходимо учитывать энергетический расход компонентов ПС, который определяют по

Химический состав микроорганизмов, % сухого вещества биомассы

Элемент или соединение	Бактерии	Дрожжи
углерод	46,04	46,6
азот	11,23	11,6
кислород	27,84	29,14
водород	6,19	6,27
P_2O_5	4,52	3,31
K_2O	2,20	2,19
SO_3	0,26	0,04
Na_2O	0,06	-
MgO	0,75	0,39
CaO	0,81	0,35
Fe_2O_3	0,07	0,03
SiO_2	0,03	0,08

Биомасса -
совокупная
масса
растит.,
животных, в
т.ч. одноклет.
организмов,
присутствующих
в биоценозе
в момент
наблюдения

**Явления,
наблюдаемые в
метаболизме
биообъектов
при погрешностях
в составе питательных
сред (ПС)**

Адаптивно-компенсаторные механизмы позволяют биообъектам приспособливаться к погрешностям в составе ПС. Адаптационные изменения в обмене веществ у разных биообъектов выражены по-разному, возможны ввиду:

- взаимного превращения углеводов, жиров, белков;
- интеграции отдельных звеньев обмена благодаря наличию общего продукта их обмена – ацетил-КоА;
- наличия нескольких систем регуляции обмена веществ.

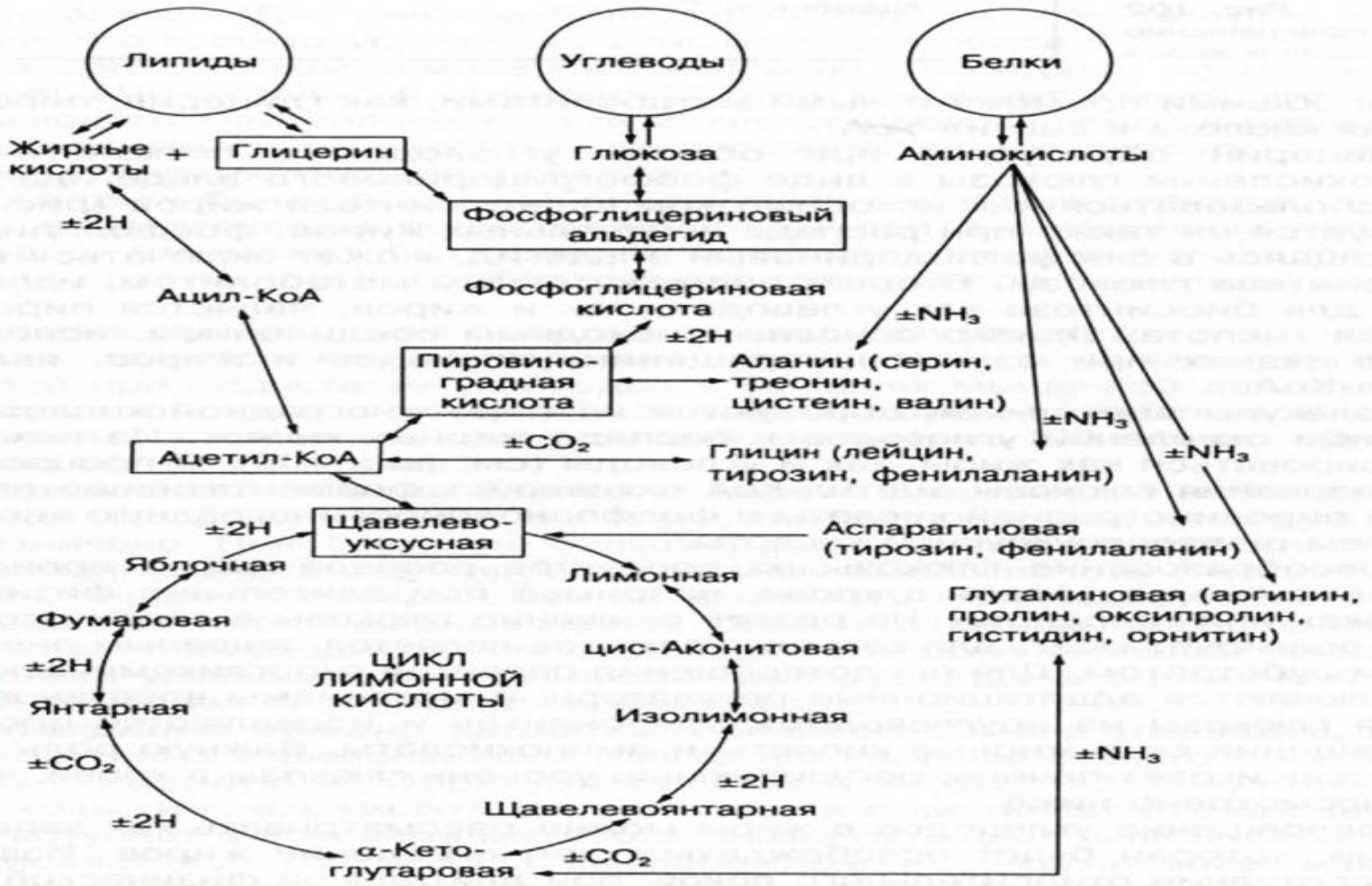
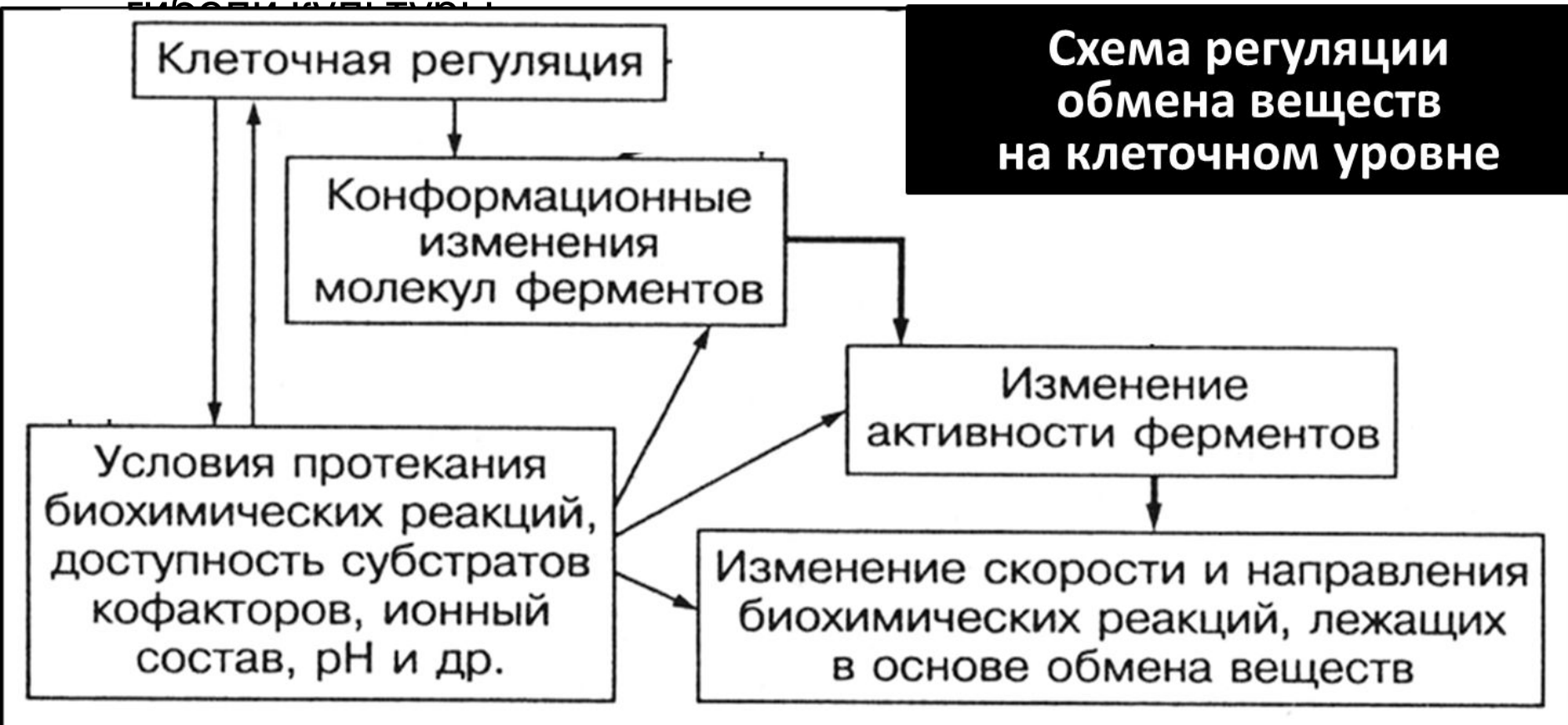


Схема взаимного превращения осн. звеньев белков, углеводов

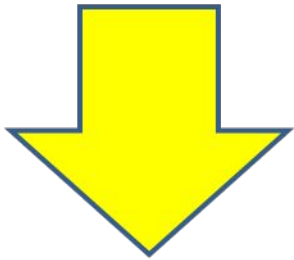
Чем сложнее организм, тем сложнее адаптивные механизмы, а культура его клеток прихотливее:

- микроорганизмы приспосабливаются быстро ввиду частых делений и мутаций, формирования плазмид, конъюгации;
- у сложных многоклеточных эукариотов адаптивно-компенсаторные механизмы во многом обусловлены деятельностью отдельных **специализированных органов и систем**, которые в изолированной культуре клеток не проявляются → любые нарушения состава ПС приводят к гибели культуры



Адаптация к недостатку или
избытку некоторых компонентов
ПС в клетках отсутствует

Вещества, адаптация к **недостатку** которых отсутствует, называются **лимитирующими** компонентами питательных сред.



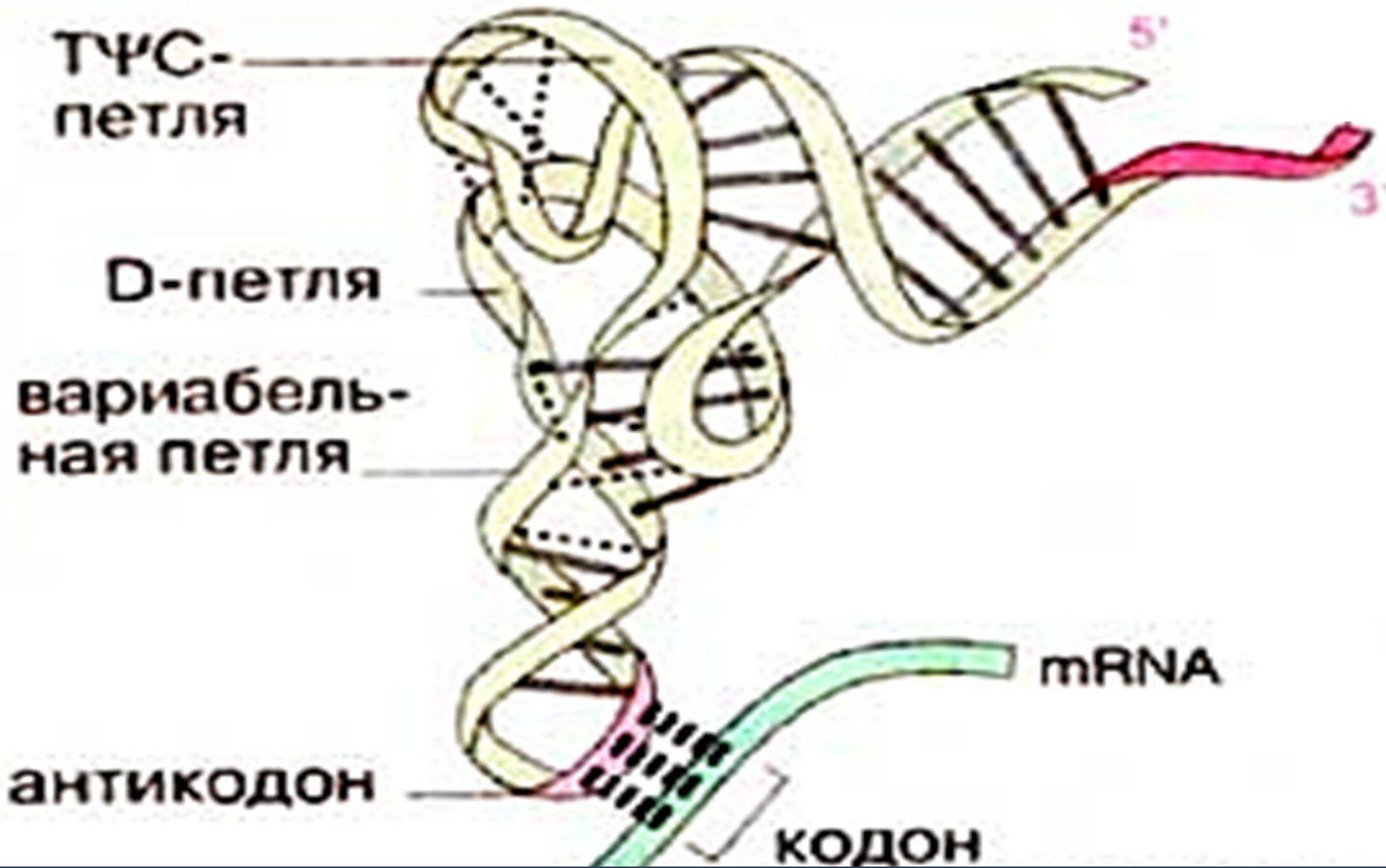
Их недостаток в ПС вызывает

субстратное лимитирование (СЛ) -
ограничение роста и (или) гибель культуры

Недостаток основных компонентов ПС (олигопептидов,

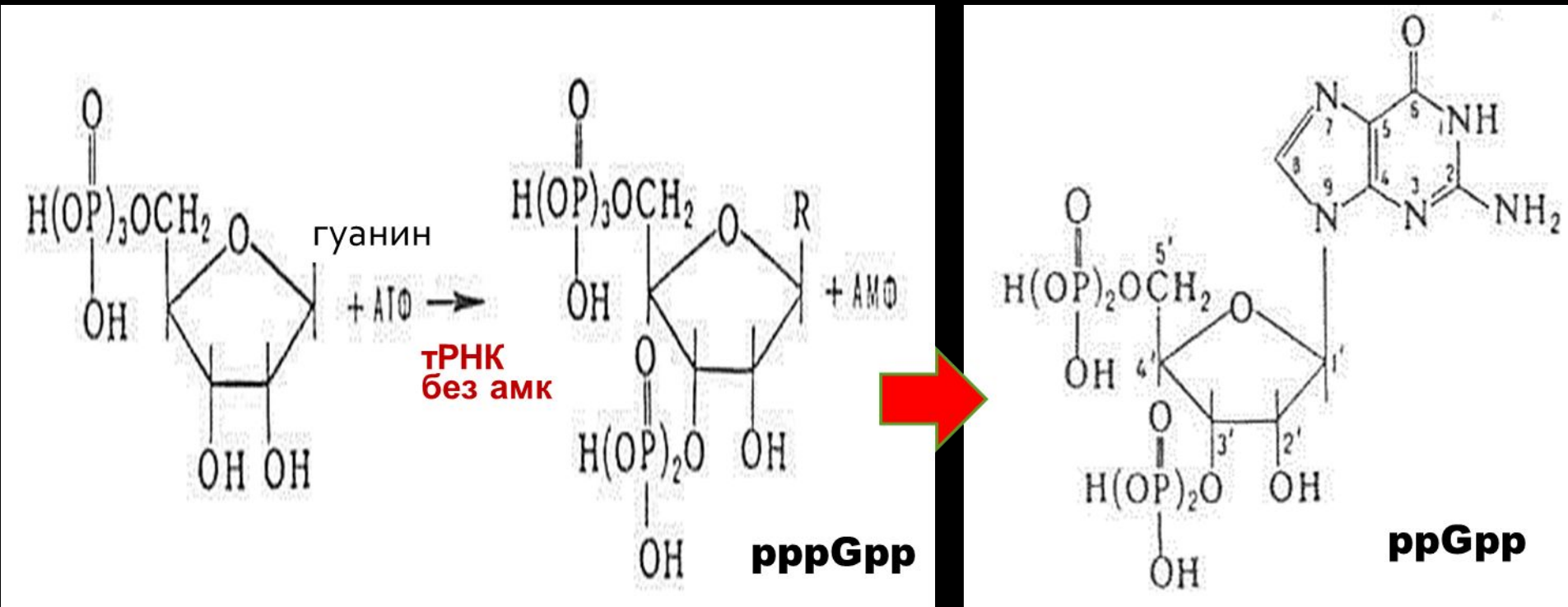
аминокислот, углеводов и др.) **вызывает:**

- нарушение аминоацилирования тРНК;
- связывание фосфора гуанозином → синтез гуанозинтетрафосфата (= ppGpp, =алармон);
- апоптоз



Недостаток аминокислот и глюкозы в ПС → нарушение аминоацилирования тРНК.

При аминокислотном лимитировании происходит связывание фосфора гуанозином



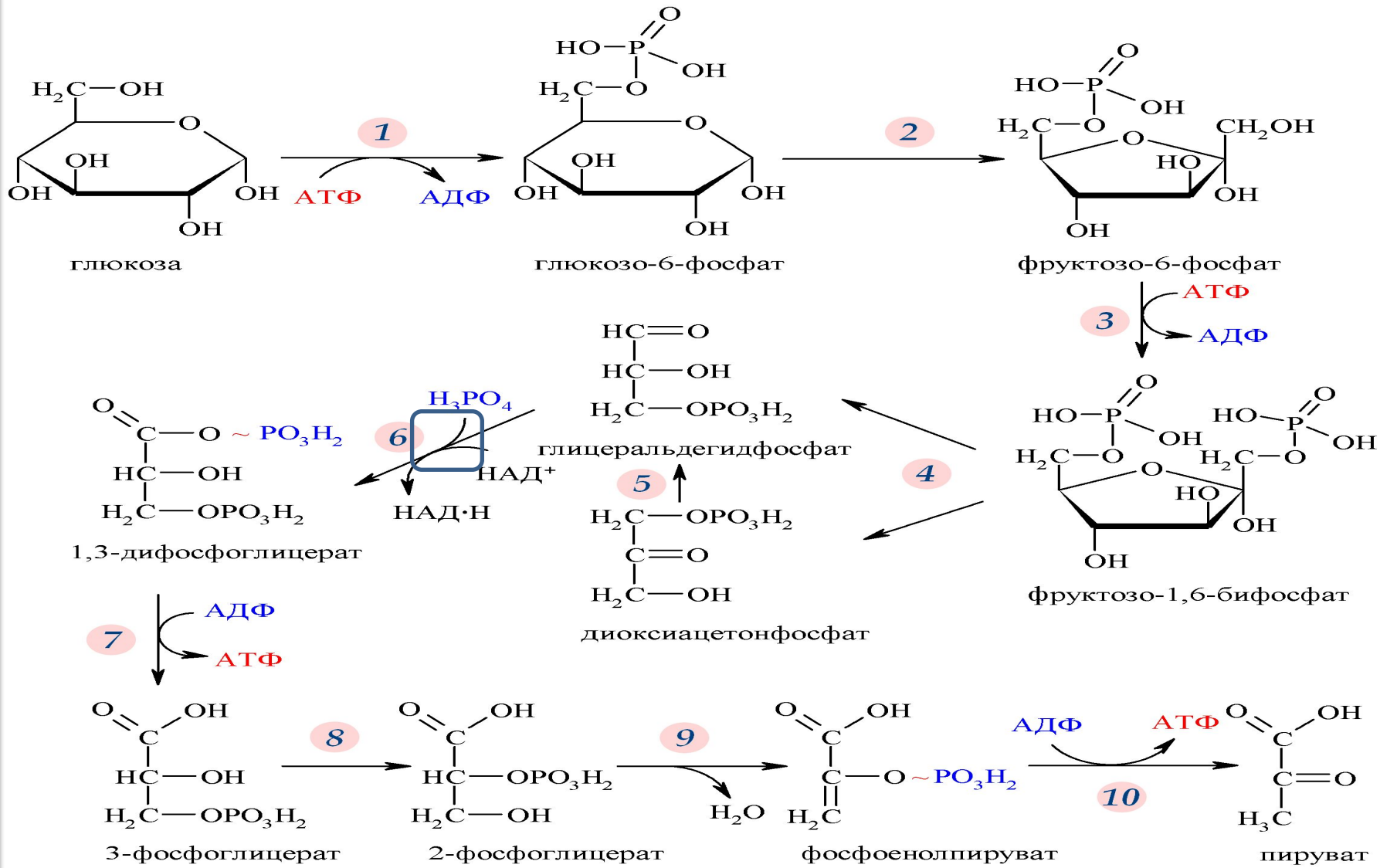
НЕАЦИЛИРОВАННЫЕ тРНК инициируют синтез гуанозинтетрафосфата (ppGpp). ppGpp образуется путем отщепления остатка фосфорной кислоты из положения 5' гуанозинпентафосфата.

ppGpp связывается с РНК-полимеразой → подавляет транскрипцию одних структурных генов и стимулирует транскрипцию других → запуск литической программы апоптоза

Избыток основных компонентов ПС вызывает:

- Явление фосфатной ловушки;
- Закисление ПС;
- Осмотический шок клеток

Г Л И К О Л И З, СХЕМА



Ферменты гликолиза: 1 — Гексокиназа 2 — Глюкозо-6-фосфатизомераза
 3 — 6-Фосфофруктокиназа 4 — Альдолаза 5 —
Триозофосфатизомераза
 6 — **Глицеральдегидфосфатдегидрогеназа (ГАФ-ДГ)**
 7 — Фосфоглицераткиназа 8 — Фосфоглицеромутаза 9 — Енолаза 10 — Пируваткиназа

①

при высоком уровне глюкозы в ПС скорость I этапа **гликолиза** на порядок превышает скорость II этапа. Метаболиты I этапа гликолиза накапливаются в опасном избытке. **Свободный фосфат** отвлекается на образование фосфорилированных гексоз и триоз.

Следствие:

1. Снижение в клетке концентрации **свободного фосфата** → фосфатное голодание и внутриклеточное защелачивание.

2. Снижение уровня адениловых нуклеотидов - **аденин накапливается в виде АДФ?**

3. Ингибирование ферментной системы **глицеральальдегидфосфатдегидрогеназы (ГАФ-ДГ)**, участвующей в синтезе нуклеиновых кислот клетки → погрешности в синтезе РНК и ДНК.

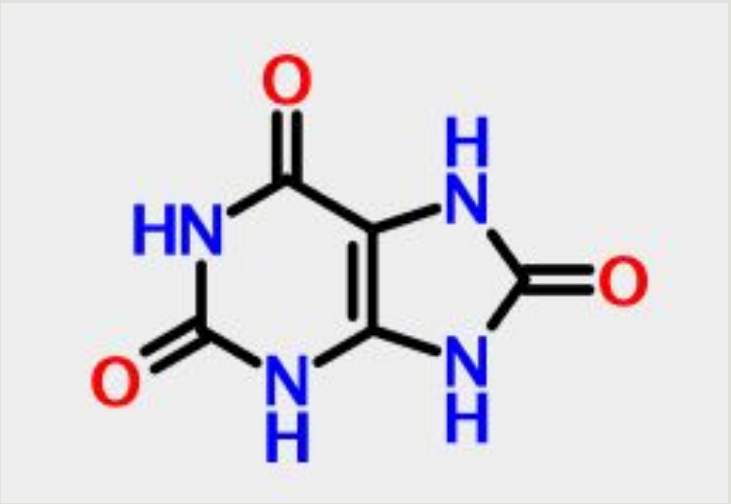
Это состояние называют **«фосфатной**

Мероприятия борьбы с «фосфатной ловушкой» основаны на:

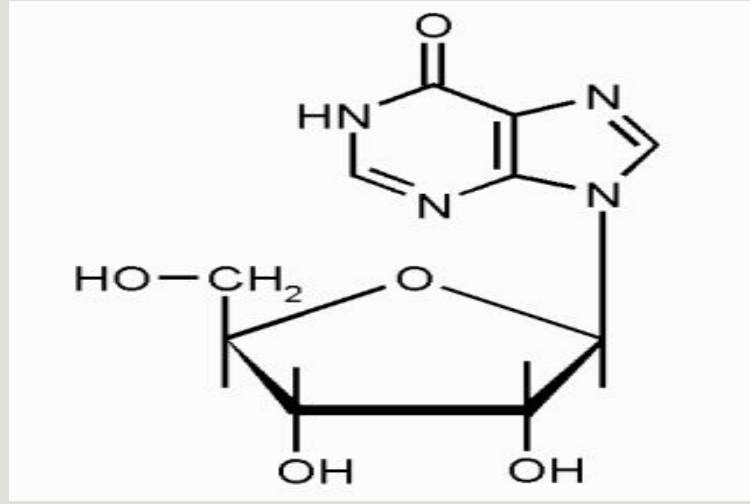
- ограничении потока субстрата в клетку;
- создании условий для поддержания внутриклеточного рН;
- усилении переноса фосфата из ПС в клетки через клеточные стенки и → усилении АТФ-азных реакций в клетке, не имеющих отношения к гликолизу.

②

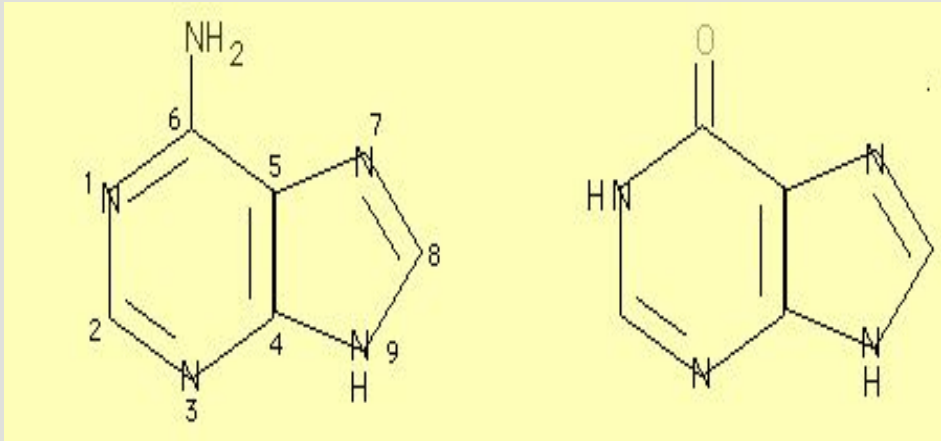
При избыточном потоке углеводного субстрата происходит закисление ПС (накопление в ПС органич. кислот и др. продуктов распада, образующихся в процессе метаболизма)



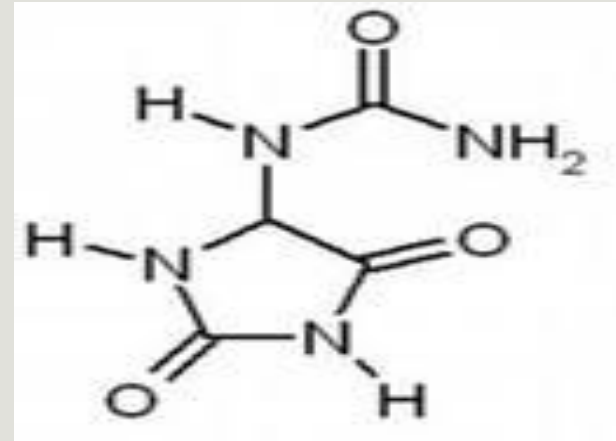
Мочевая кислота



Инозин



Аденин → Гипоксантин



Аллантоин

3

Осмотический шок клетки обусловлен потерей воды и осмотическим повреждением клеточной мембраны



Вещества, избыток которых замедляет рост микроорганизмов

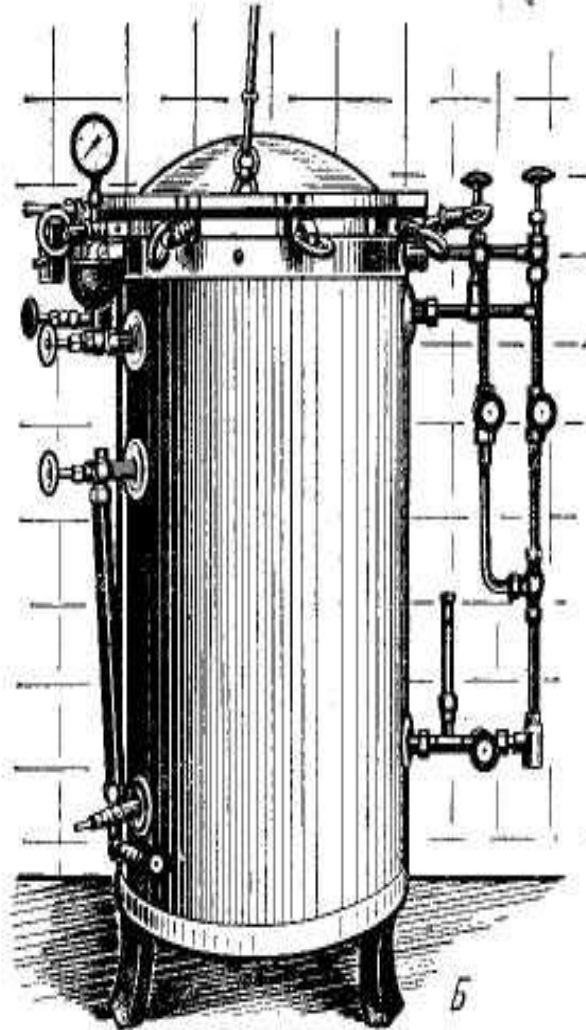
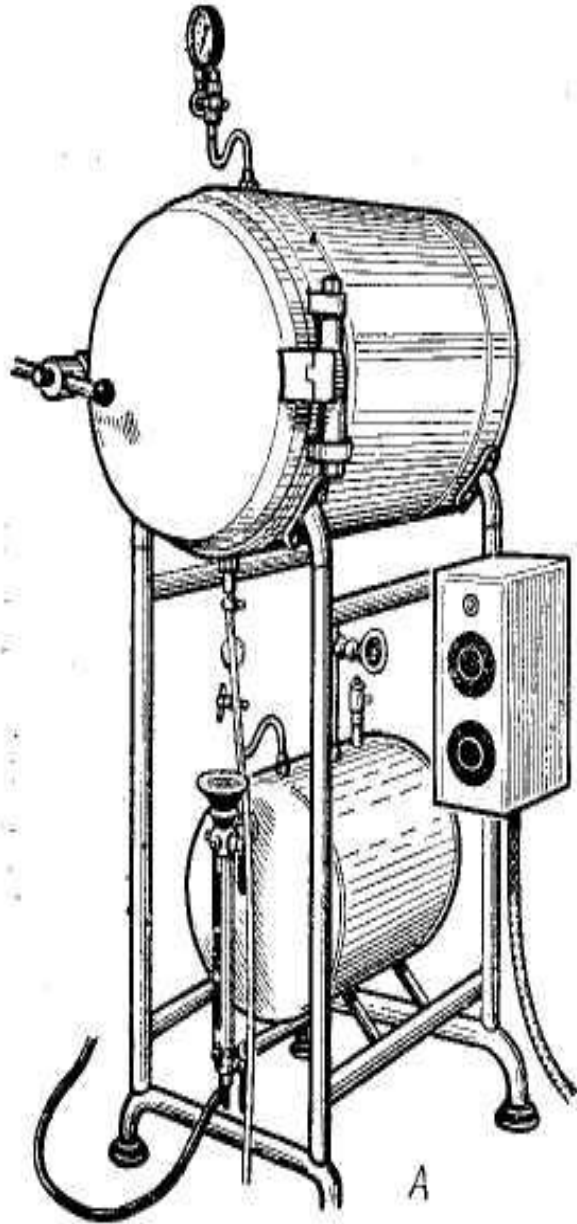
Вещество	Концентрация, подавляющая рост микроорганизмов, г/л
глюкоза	более 50,0
аммиак	более 3,0
железо	более 1,15
магний	более 8,7
фосфор	более 10,0
цинк	более 0,038

Принципы подбора количества компонентов ПС для проведения биотехнологического процесса

- Используют данные химического состава биомассы (предыд.слайд)
- Если культура синтезирует и выделяет в среду какой-либо продукт (БАВ), следует учитывать и хим. состав этого продукта.
- Поскольку гетеротрофы используют орг.вещества не только для построения своих клеточных структур, но и для энергетического обмена, то учитывают и энергетический расход компонентов ПС, который определяют по выходу АТФ.
- Определяют концентрацию **ЛИМИТИРУЮЩЕГО** компонента - вещества, недостаток которого в ПС приводит к ограничению роста культуры (напр., глюкозное голодание → ppGpp → апоптоз)
- Остановка роста культуры м.б. как при недостатке, так и при избытке субстрата в ПС

СТЕРИЛИЗАЦИЯ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

Стерилизация ПС в лабораторных условиях



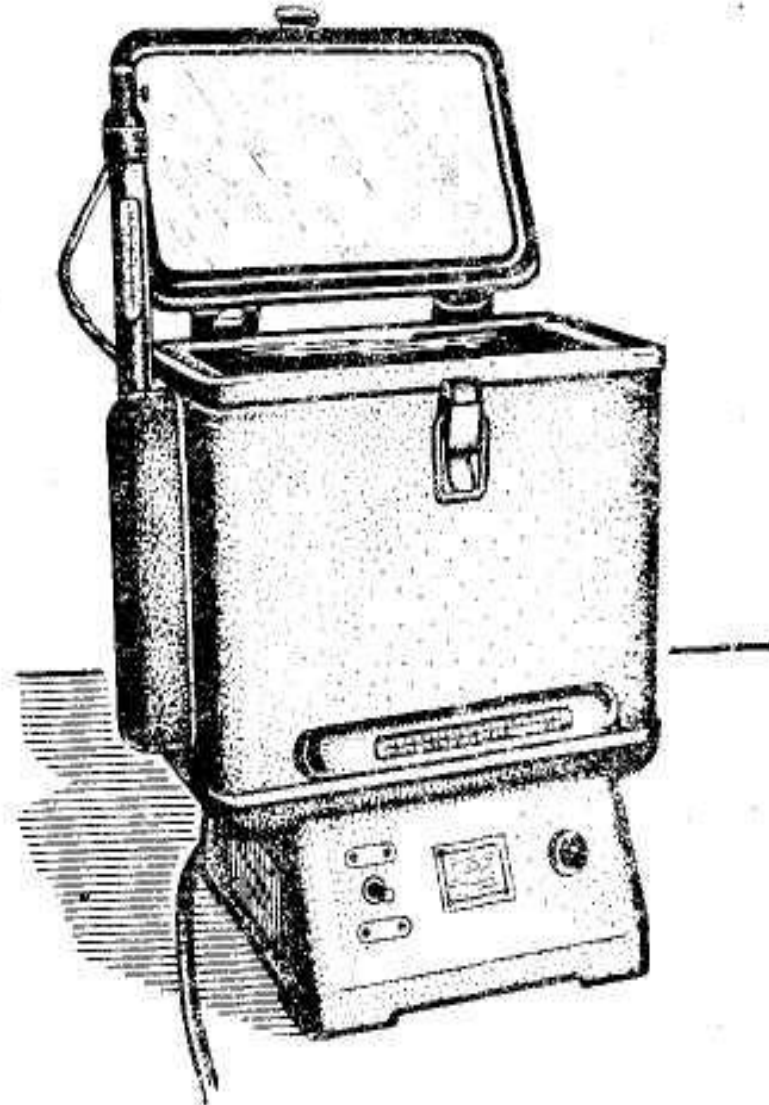
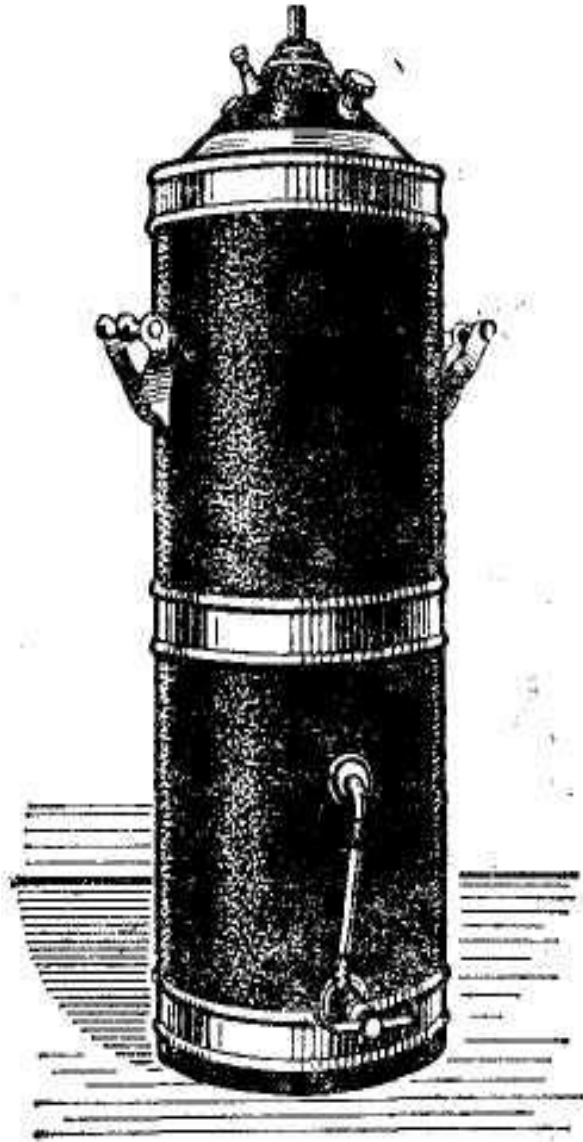
Автоклавы:

горизонтальный;
вертикальный

среды разливают в
контейнеры
емкостью не
более 1 л.
Стерилизуют
насыщенным паром
при 120°C , изб. атм.
давлении 0,1 ати.

Стерилизация ПС в лабораторных условиях

Аппарат Коха



СТЕРИЛИЗАЦИЯ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД В БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКО М ПРОМЫШЛЕННОМ ПРОИЗВОДСТВЕ



В промышленности установлены
спец. режимы непрерывной и
периодической (как в аппарате Коха)
стерилизации ПС при
**разных температурных режимах –
от 100 до 140°С**

РЕЖИМ СТЕРИЛИЗАЦИИ =
= t° (температура стерилизации) + **T** (время стерилизации)

**Стерилизация
ПС:
от 100 до 140°C
в завис. от
свойств
компонентов
ПС**

- 120°C: МПБ или МПА и др. термостабильные среды;
- 112°C: среды, сод. молоко, витамины, сахара, дрожжевой автолизат, дрожжевую воду, среды с желатином.
- сыворотки и факторы роста стерилизуют фильтрованием, доб. асептически к компонентам ПС, простерилизованным термически.
- При выборе температуры стерилизации учитывают значение рН среды.

При стерилизации ПС необх. учитывать рН

В кислой
среде
при
 $t^{\circ} > 100^{\circ}$

Гидролиз полимеров:

- при $pH < 6,0$ - пептонизация желатина;
- при $pH < 5,0$ гидролиз агар-агара → не образуется гель;

В щелочной
среде
при
 $t^{\circ} > 100^{\circ}$

- выпадают в осадок соли железа,
- карамелизуются сахара → недоступны для м/о

Среды, предназначенные для культивирования кислото- или щелочелюбивых микроорганизмов, стерилизуют при *нейтральном значении рН* и только после стерилизации подкисляют или подщелачивают стерильным компонентом

■

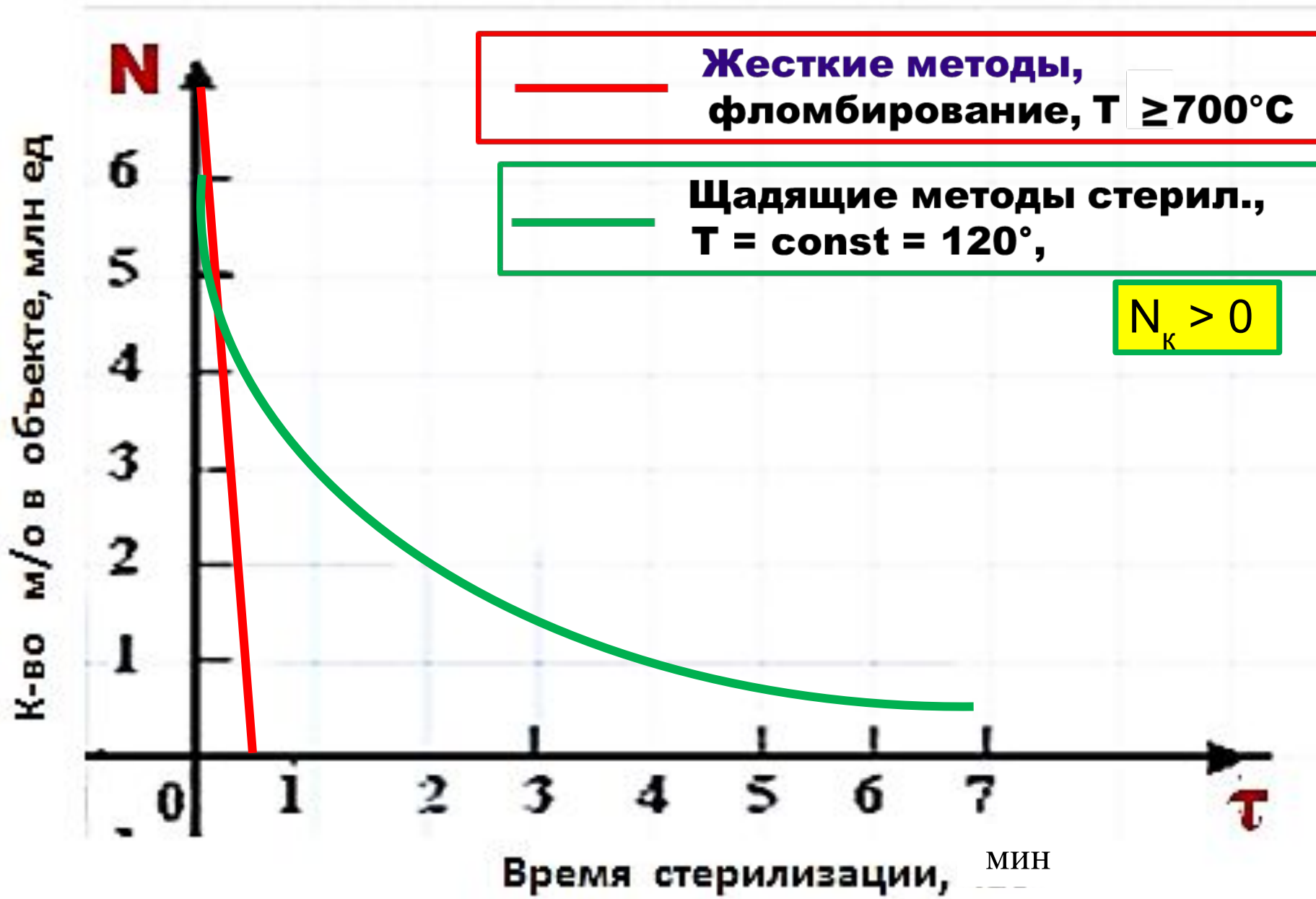


ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВРЕМЕНИ СТЕРИЛИЗАЦИИ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

Время стерилизации (экспозиция) –

T – время, в течение которого в стерилизуемом объекте при заданной температуре погибнут все микроорганизмы, включая **спорообразующие**

Зависимость количества микроорганизмов в объекте от времени стерилизационного воздействия



Время, в течение которого в стерилизуемом объекте при заданной температуре погибнут все микроорганизмы, включая споры –

T – время стерилизационной выдержки.

При изотермических условиях (когда температура стерилизации не изменяется), T рассчитывается по формуле:

$$\tau = \frac{1}{K} \ln \frac{N_0}{N}$$

N_0 - исходное число спорообразующих м/о в стерилизуемом объекте, ед.;

N - конечное число спорообразующих микроорганизмов в стерилизуемом объекте;

K – удельная скорость гибели спор *Bacillus stearothermophilus*

Обсемененность компонентов питательных сред споровыми формами микроорганизмов

Компонент среды	Число спор в 1 г вещества
Глюкоза	$(3,3 - 6,0) \cdot 10^4$
Сахароза	$(1,9 - 6,0) \cdot 10^2$
Зеленая патока	$4 \cdot 10^2$
Кукурузный экстракт	$(3,0 - 6,0) \cdot 10^6$
БВК	$0,7 \cdot 10^4$
Соевая мука	$(8,2 - 8,8) \cdot 10^4$
Кукурузная мука	$(2,1 - 3,0) \cdot 10^6$
Кальция карбонат	$(0,2 - 1,0) \cdot 10^2$
Вода водопроводная	$(2,0 - 4,0) \cdot 10^2$
При отсутствии данных	10^6

N_0
рассчитывается по обсемененности компонентов ПС (концентрации м/о в среде)

N - конечное число спорообразующих микроорганизмов в стерилизуемом объекте

- **В стерильном объекте N д.б. равным 0.**

- Ввиду экспоненциальной зависимости количества микроорганизмов в объекте от времени стерилизационного воздействия, а также из соображений обеспечения гарантии, принимается как вероятность выживания в пределах от 0,01 до 0,001

См. ГФ РБ: SAL для ЛС = 10^{-6}

SAL для питательных сред $\sim 10^{-2} - 10^{-3}$

К – удельная скорость гибели микроорганизмов

Зависит от:

- величины температуры стерилизации (Т°С)
- термической устойчивости микроорганизмов

Для *Vacillus stearrowthermophyllus*
при разных значениях температуры

Т, °С	100	102	104	106	108	110	112
К, мин ⁻¹	0,013	0,023	0,036	0,062	0,109	0,163	0,234

Т, °С	118	120	122	124	126
К, мин ⁻¹	1,002	1,480	2,44	3,770	5,9

При стерилизации ПС с нерастворимыми агломератами необходимо отделять частицы с размером, превышающим R

Для ПС,
содержащих
соевую,
кукурузную
или иную муку

$$R^2 = \frac{\ln \frac{N_{ож}}{N_{отв}}}{\left(\frac{2}{\pi}\right)^2 \cdot \frac{K}{a} \ln \left[\frac{4}{\pi} (t_{ст} - t_0) \right]}, \text{ м,}$$

R – максимальный радиус агломератов, стерилизуемых с ПС;

$N_{ож}$ - содержание м/о в жидкой фазе;

$N_{отв}$ – содержание м/о в агломератах

K – удельная скорость гибели м/о, мин⁻¹;

$t_{ст}$ – температура стерилизации;

t_0 – начальная температура в центре агломерата (при периодической стерилизации равна температуре ОС);

a – коэффициент теплопроводности, м²/с, справочная величина:

для: - пшеничной муки – $0,0835 \times 10^{-6}$ м²/с;

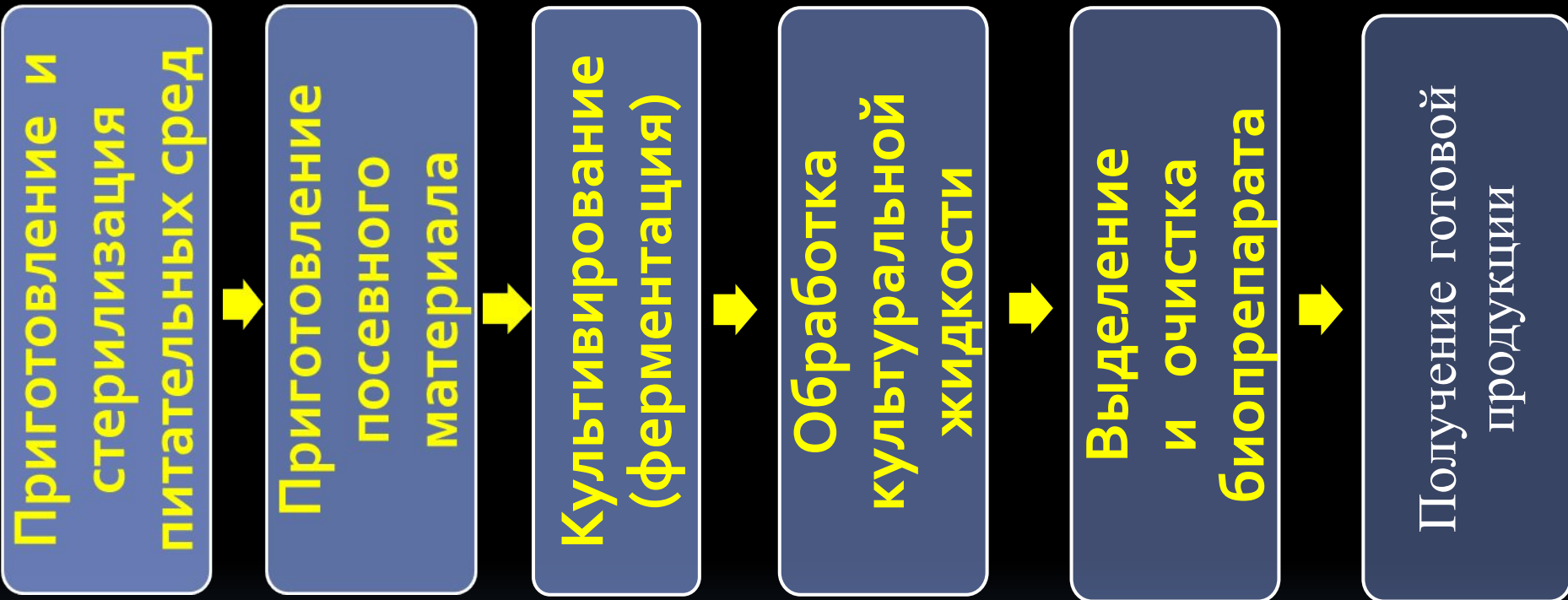
 - кукурузной муки – $0,0744 \times 10^{-6}$ м²/с;

 - соевой муки – $0,19 \times 10^{-6}$ м²/с;

Компоненты ПС измельчают, просеивают, подвергают клейстеризации, экстрагированию и т.п. Для лучшего р-рения Q до 70-80°C и гомогенизируют. Подготовленные компоненты ПС загружают в предварительно простерилизованный ферментер

ПС *максимально быстро* Q в ферментере при перемешивании до температуры стерилизации (**t°**), выдерживают в течение рассчитанного времени (**T**) и быстро охлаждают до температуры ферментации или на несколько градусов выше нее

Основные стадии биотехнологического процесса



Вспомогательные операции:

- стерилизация оборудования
- стерилизация коммуникаций
- подготовка пеногасителей,
- подготовка газов для барботирования и т.д.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПОСЕВНОГО МАТЕРИАЛА

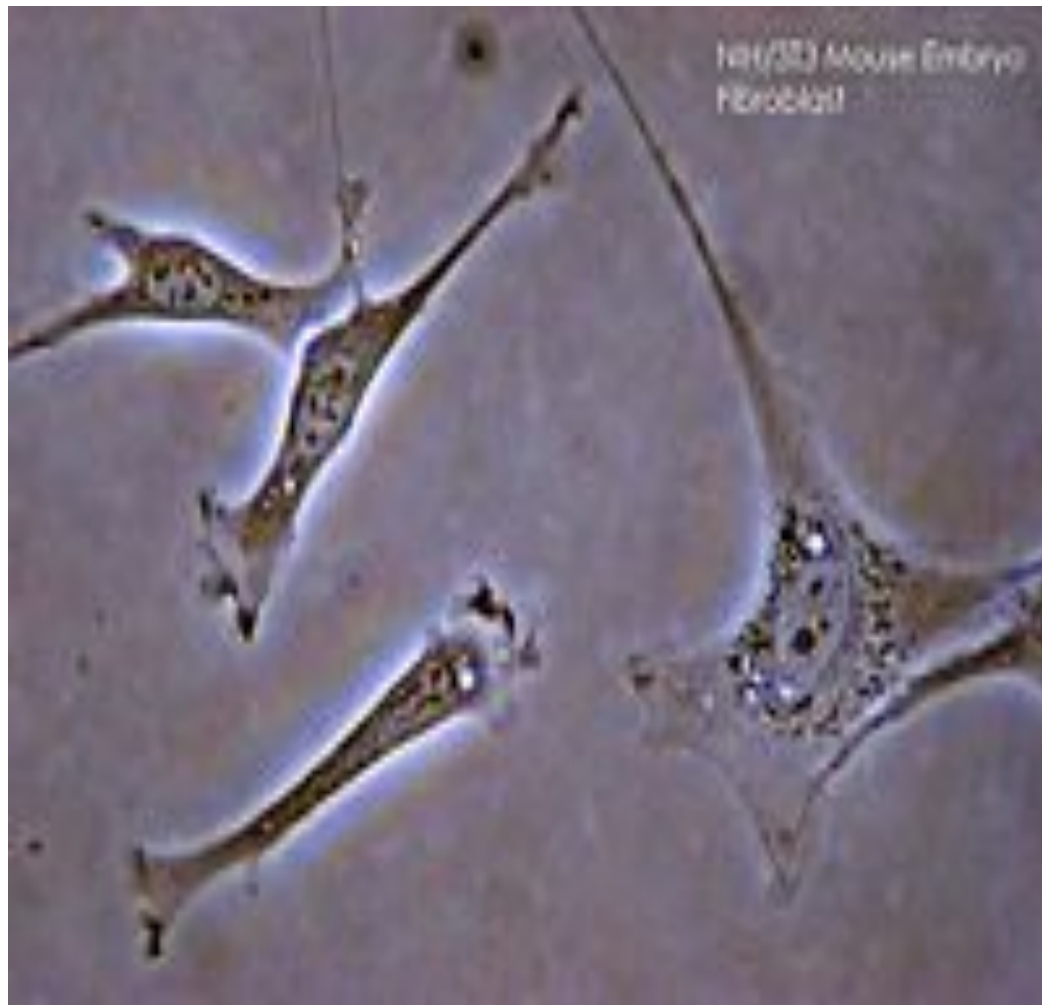
Виды посевного материала

- **Прокариоты** (бактерии и бациллы)
- **Простейшие эукариоты** (дрожжи, плесневые грибки)
- **Вирусы** (строгие внутриклеточные паразиты)
- **Культуры клеток развитых и сложных эукариотов** (растений, насекомых, животных, человека)

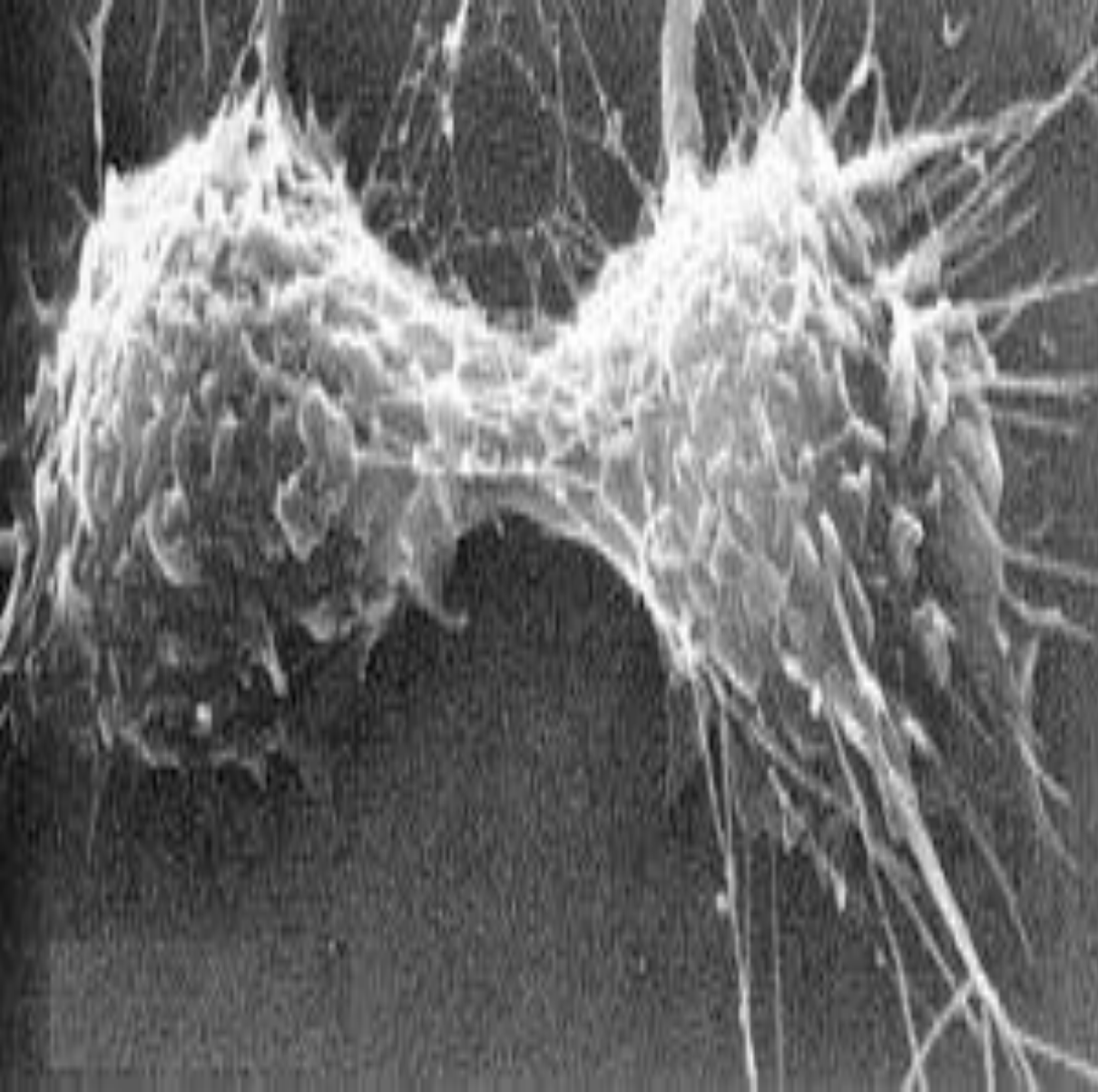
**ОСОБЕННОСТИ
КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК
РАЗВИТЫХ И СЛОЖНЫХ
ЭУКАРИОТОВ**

Культуры клеток развитых и сложных эукариотов

Фибробласты (лат. fibra — волокно и греч. βλάστη — росток) — клетки соединительных тканей организма, Фибробласты секретируют предшественники белков коллагена и эластина, а также мукополисахариды, из которых состоит внеклеточный матрикс.



Форма фибробластов разнообразна, зависит от уровня их активности и локализации в организме. Размер активных фибробластов увеличен, они имеют отростки, овальное клеточное ядро, богаты рибосомами. Неактивные фибробласты (фиброциты) размером меньше, имеют веретенообразную форму.



Животные клетки в культуре в процессе деления

Первичная культура – клетки, взятые непосредственно от организма и помещенные в подходящую, многокомпонентную питательную среду: MEM, Игла, 199.

Суспензия клеток неустойчива и клетки оседают на поверхности сосуда. После прикрепления к субстрату клетки начинают делиться примерно каждые 24 часа.

Вторичные культуры получают путем перенесения первичной культуры в новую порцию подходящей ПС.

Вторичные культуры последовательно перевивают в течение недель или месяцев:

пассажирование клеток.

Пассажирование обычных (соматических) клеток не может длиться вечно.

Теломеры (греч. *telos* — конец и *meros* — часть)

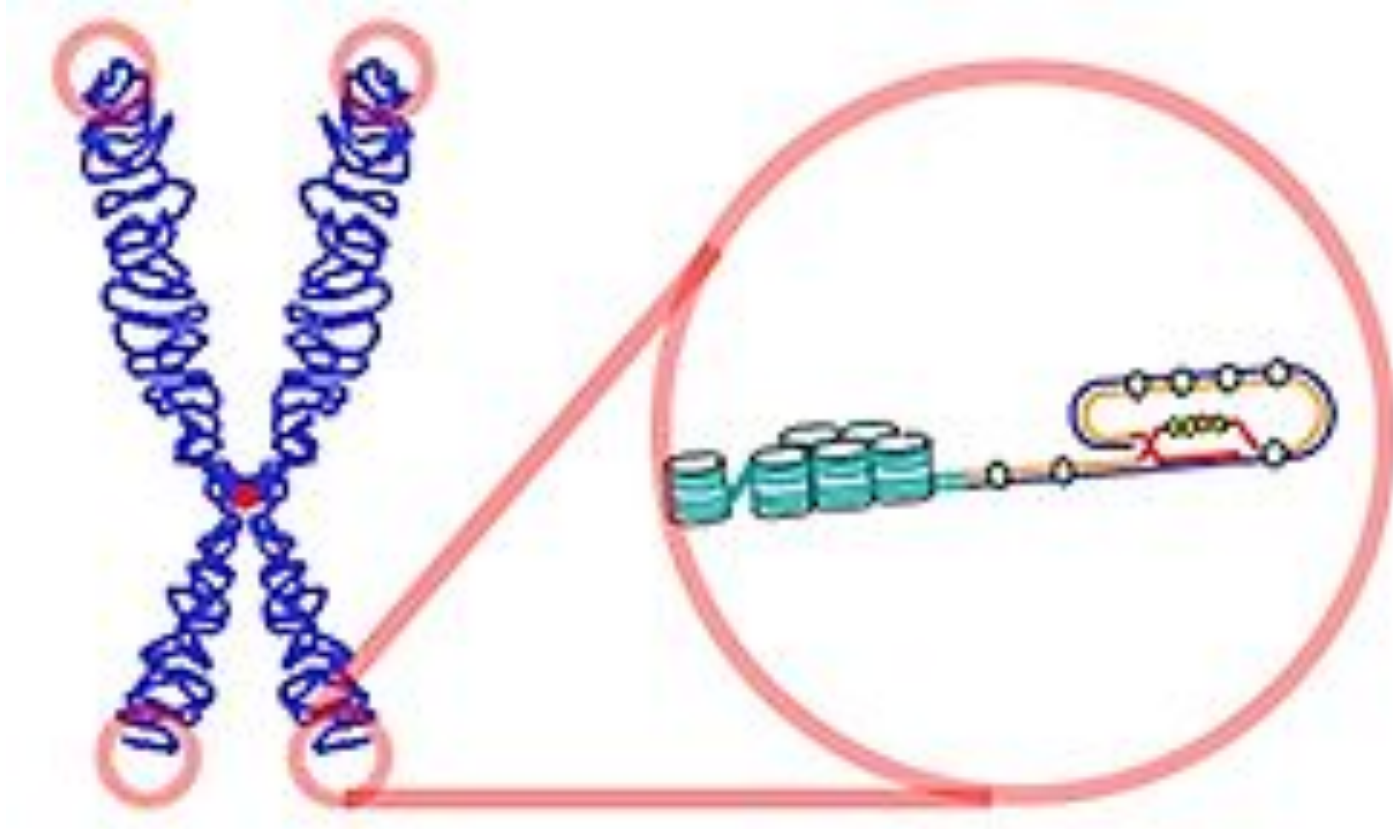
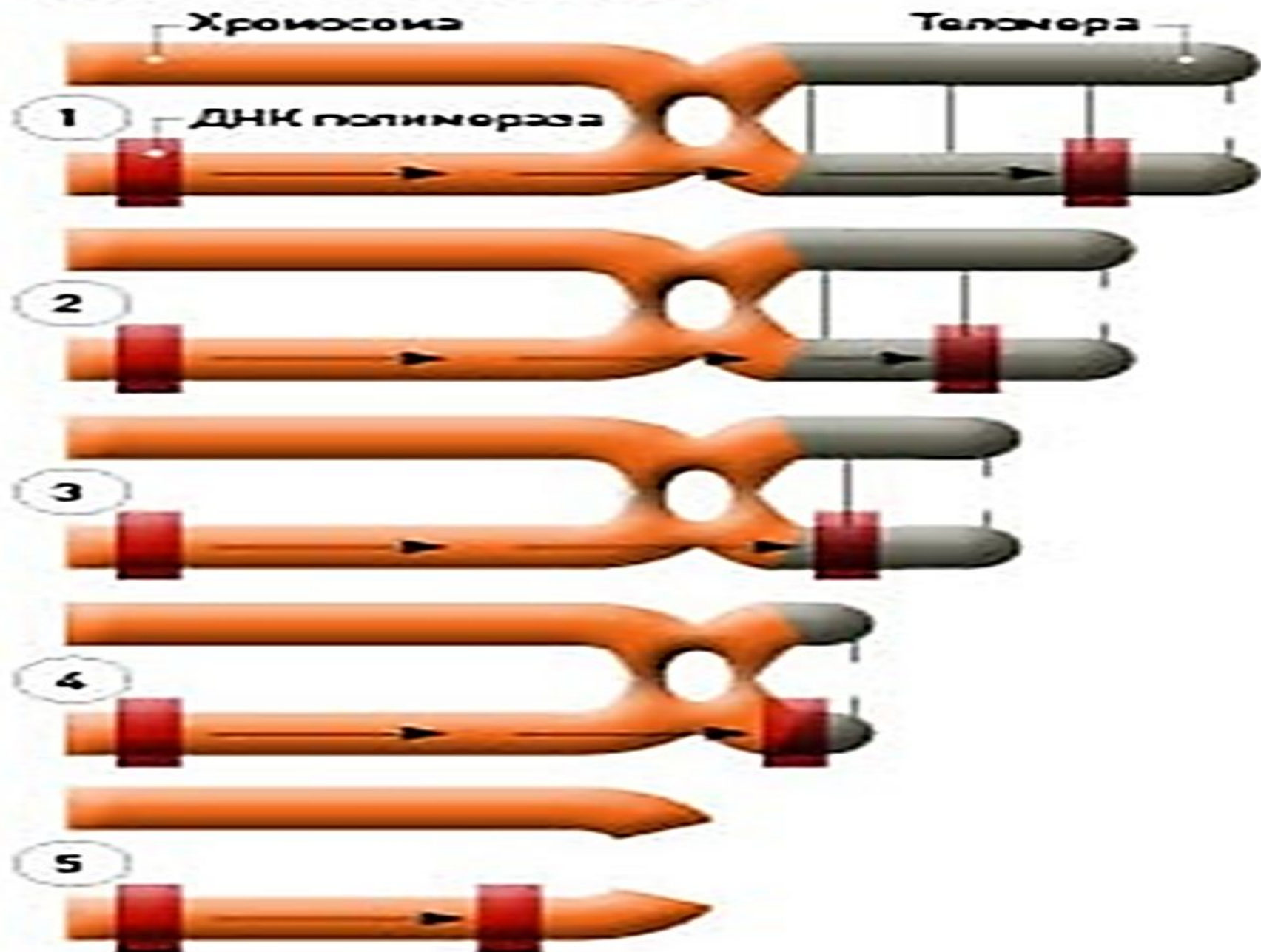
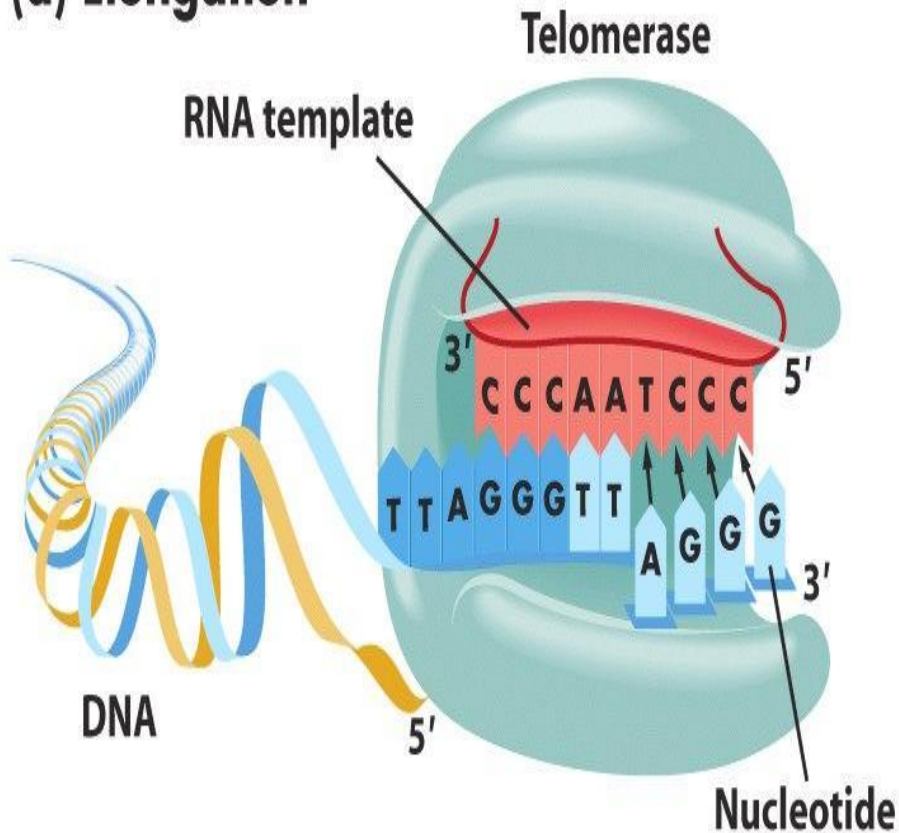


Схема расположения теломер на хромосоме

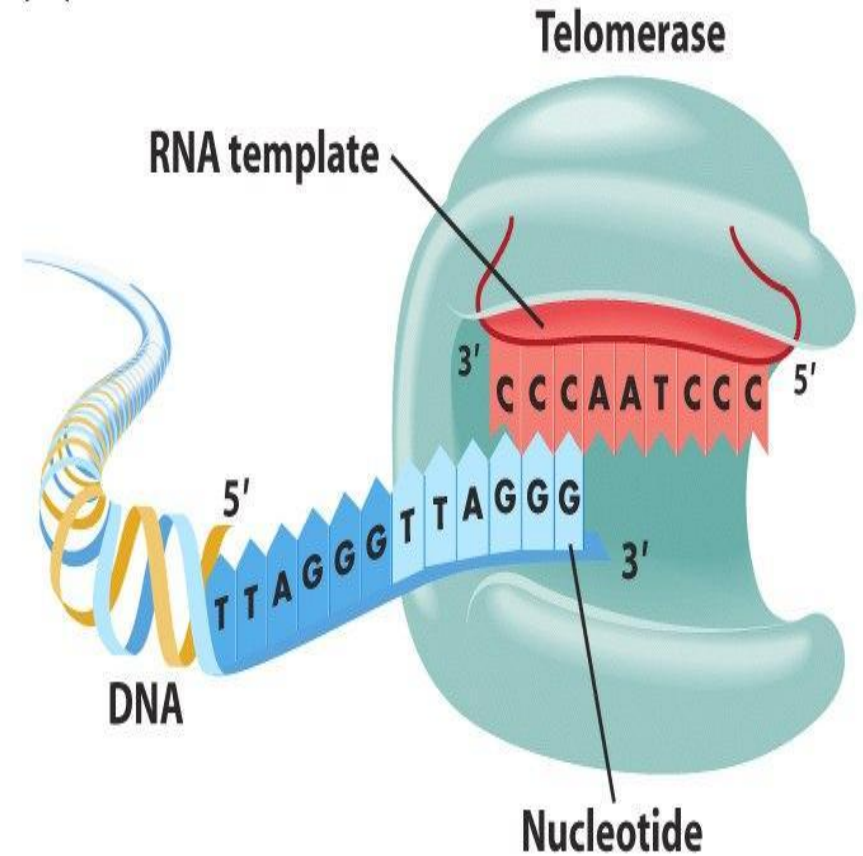
УКОРОЧЕНИЕ ТЕЛОМЕР



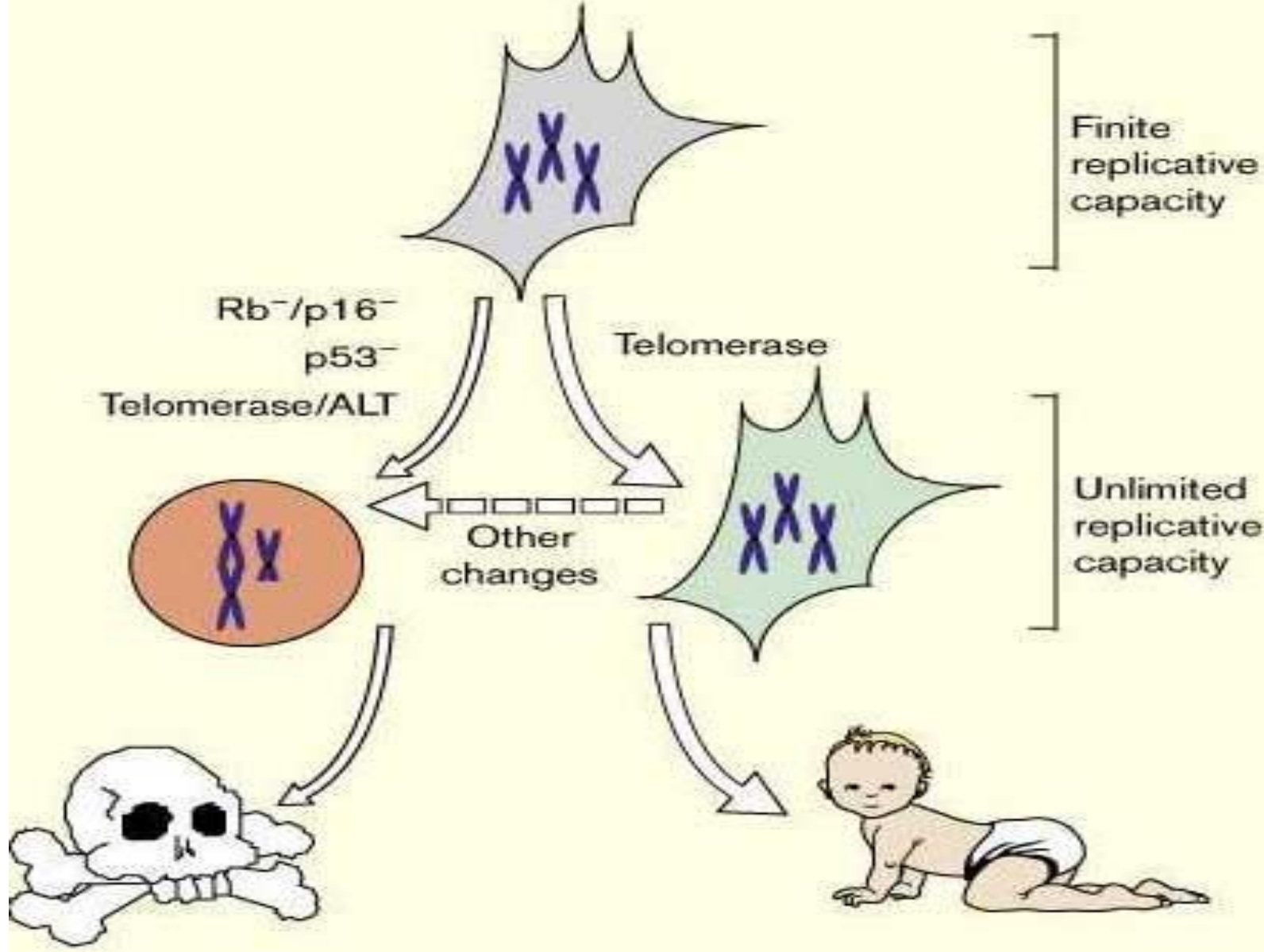
(a) Elongation



(b) Translocation

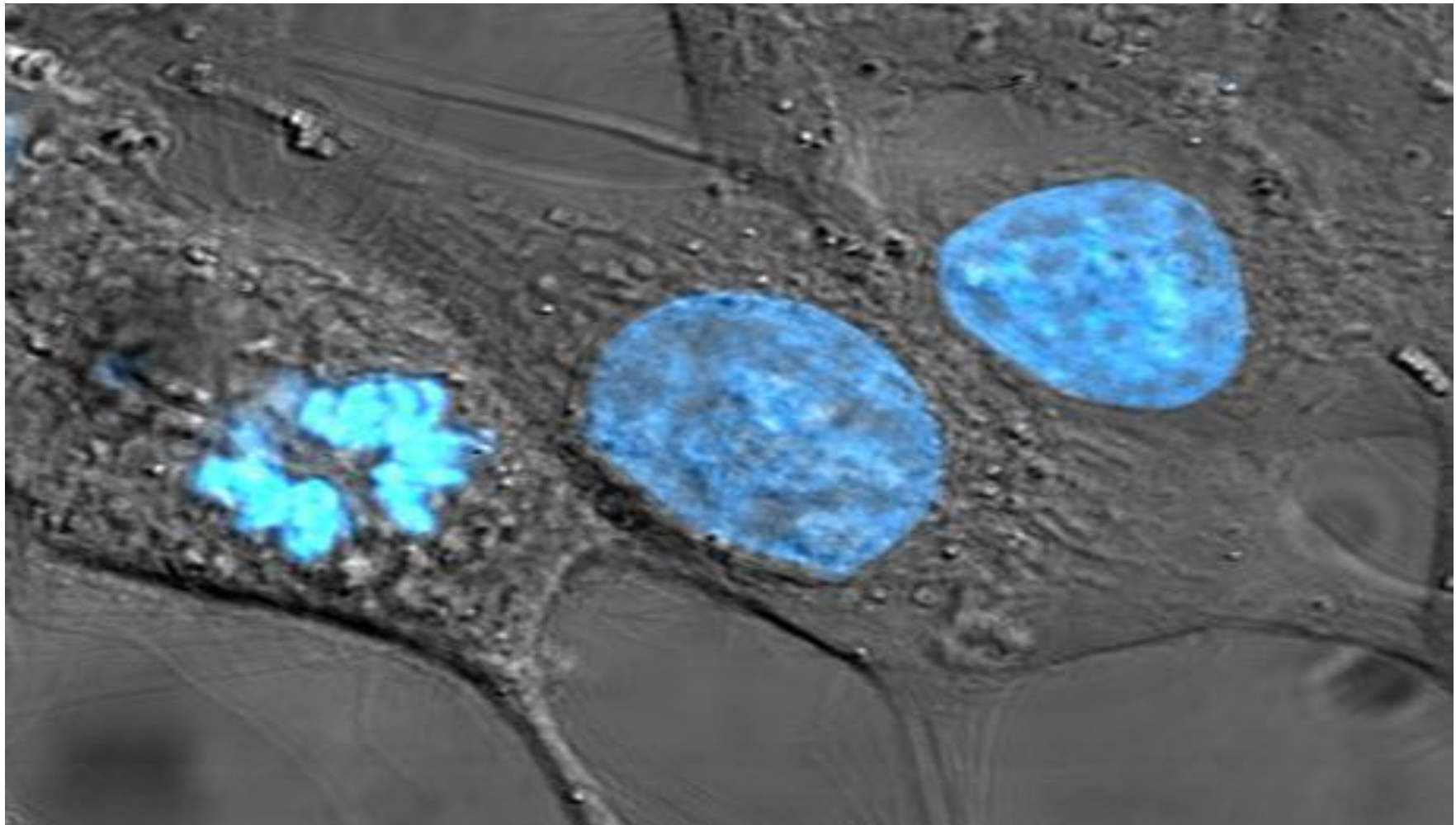


Теломераза – обратная транскриптаза. При помощи собственной РНК-матрицы она достраивает теломерные повторы и удлиняет теломеры в половых и стволовых клетках .



Клетки с конечным репликативным потенциалом могут быть immortalizованы.

В некоторых типах клеток активация теломеразы может вести к immortalизации клеток, т.е. к потере контроля роста. Это типично для онкогенотрансформированных клеток (в оранжевом фрагменте). Вместе с тем экзогенная экспрессия только теломеразы, напр., **индуктором теломеразы**, может увеличивать репликативный потенциал без онкогенной трансформации (в



Одна из самых ранних культур клеток человека

Получена от [Генриетты Лакс](#), умершей от рака шейки матки. Культура клеток [HeLa](#) окрашена по Хойсту. Измененные [ядра](#) окрашены в синий цвет

Культуры клеток развитых и сложных эукариотов:

– первичные культуры клеток (1 пассаж);

– вторичные культуры:

- **соматических клеток** (конечный репликативный потенциал - лимит Хейфлика, ограниченное число пассажей);

- **стволовых, половых и иммортальных клеток** (длительное пассажирование до 100 и более пассажей)

Разные типы эукариотических клеток при культивировании нуждаются в большом количестве (до 60 ингредиентов) различных питательных веществах и белковых факторах роста. ПС сод. до 90 различных компонентов

КОНСЕРВИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ КУЛЬТУР БИОПРОДУЦЕНТОВ

Разработчик (лаб. молекулярной биологии или биотехнол. лаб. – статус НИИ) консервирует продуцент в виде чистой культуры и ампулирует в асептических условиях. Составляется паспорт культуры

Паспорт культуры

- Название культуры
- Штамм
- описание питательных сред
- Описание микро- и макроморфологических характеристик
- Описание физиологических характеристик
- Описание условий для расконсервации
- Описание условий выращивания
- Срок хранения.

КОНСЕРВИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР

Резкое сокращение или полное прекращение клеточного обмена веществ: охлаждение, замораживание или обезвоживание

ХРАНЯТ:

- **Прокариоты и простые эукариоты**

- *замороженными* от минус 1-5 до минус 20°C.

- Недопустимо повторное оттаивание и замораживание;

- *лиофильно высушенными*

- (лиофилизированными) **в ампулах**. Срок хранения несколько лет

- **Культуры клеток млекопитающих**, в т.ч. и человека при минус 180°C в среде инертного газа (азота или др.) **и криопротекторов**

КРИОПРОТЕКТОРЫ

защитные среды - сост. из веществ двух групп

1. Проникающие в клетки. НМ и буф. комп-ты: глицерин, ДМСО, пропиленгликоль, этиленгликоль, глютамат, трисбуфер.

↓ образ-е кристаллов льда за счет формирования водор. связей с м-лами воды; исп. 5-10% от V ПС

2. Не проникающие в клетки:

- олигосахариды - сахароза и трегалоза;
- ВМС: фикоилл, альбумин, декстран, желатин, пептон, ПВП с м.м. от 2600 до 6400.

Принцип д-я до конца не ясен. Вероятно, ↓ скорость роста кристаллов и защита клеток от осмотич. перепадов.

Доб. к ПС перед замораж-ем.

Для консервирования клеточных линий многоклеточных эукариотов

программированное замораживание в
криоустановках:

- ↓ t° от -10 до -30°C со скоростью $1-3^{\circ}$ в мин
- ↓ t° от -30°C до -120°C со скоростью $10-30^{\circ}$ в мин
- → в жидкий азот (минус $180-196^{\circ}\text{C}$)

Перед началом технологического процесса культуру размораживают в стерильных условиях в подходящей питательной среде.

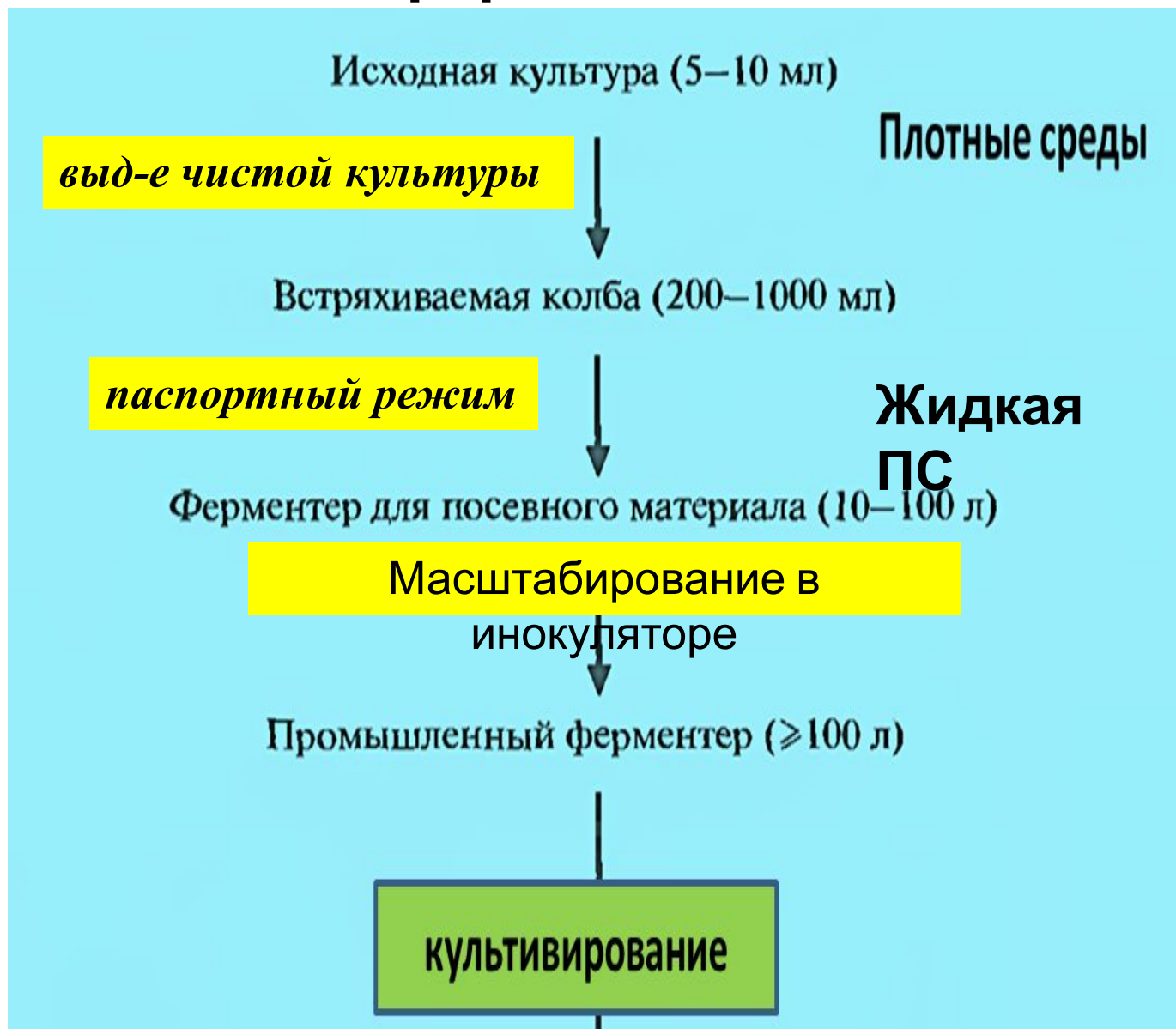
После размораживания живые объекты необх. освободить от криопротекторов.

Проращивают в заданном оптимальном режиме.

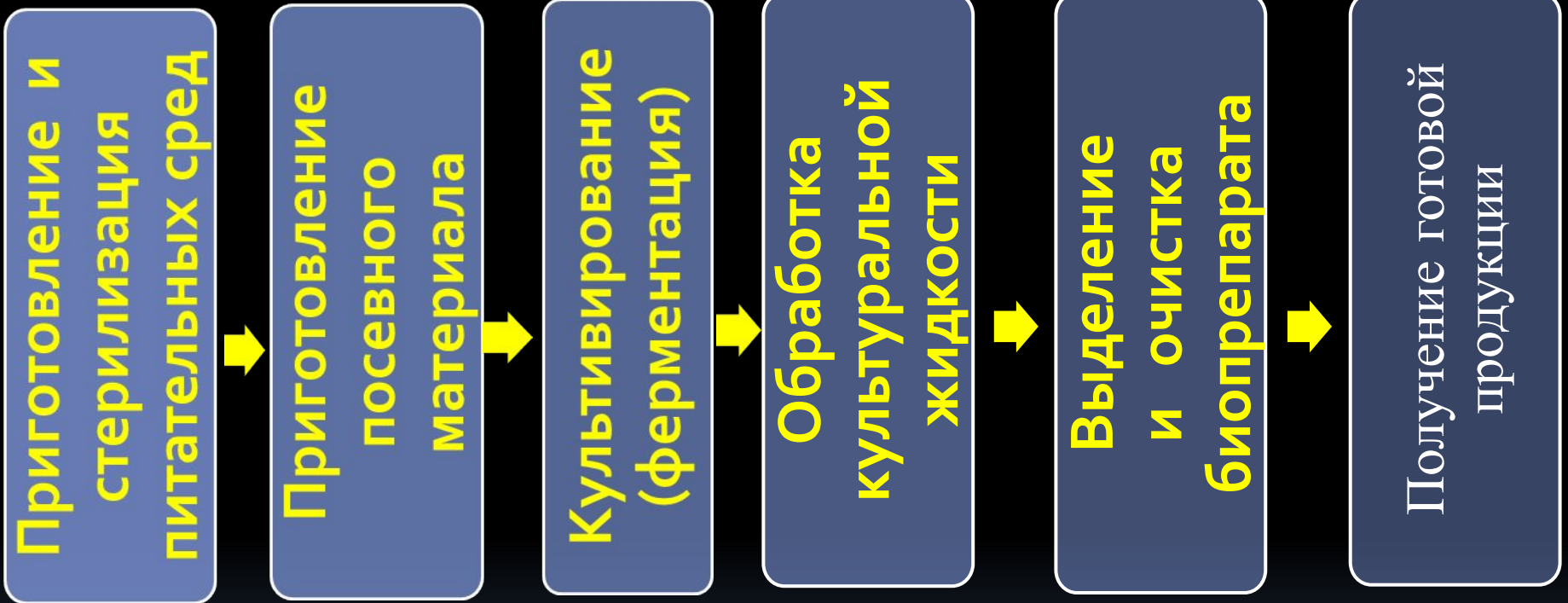
Масштабирование и подготовка посевного материала для пром. ферментации

V посевного материала перед загрузкой в промышл. реактор д.б. $\approx 10\%$ от V ПС

На всех этапах контр. качество посевного материала по морфологическим признакам и продуктивности, отслеживают отсутствие посторонней микробиоты



Основные стадии биотехнологического процесса



вспомогательные операции:

- стерилизация оборудования
- стерилизация коммуникаций
- подготовка пеногасителей,
- подготовка газов для барботирования и т.д.

3. Культивирование (ферментация)

Пром. культивирование продуцентов не сводится к пропорциональному увеличению масштаба лабораторного эксперимента:

Оптимальные условия изменяются

при каждом **десятикратном** увеличении
объема биореактора

Необх. оптимизировать:

- t° ,
- pH,
- интенсивность и способ перемешивания,
- $[O_2]$

Классификация процессов ферментации

Твердофазная ферментация

**на
плотной
или
сыпучей
ПС**

клетки м/о
(прокариоты и
простейшие
эукариоты: бактерии,
дрожжи, грибки)

Жидкофазная ферментация

На (в) жидкой ПС.

Универсальна: **кл. м/о и многоклет. орг.**

**Поверхностная
(контактная)**

На поверхности ПС
(границе с воздухом):
аэробы

На поверхности дна и
стенок сосуда, под
слоем ПС: **анаэробы**

Адгезивные клетки
многоклеточных
организмов

**Глубинная
(аэробы и анаэробы)**

Периодическая
без доб. ПС

Периодическая
с доб. ПС

Непрерывная

ТВЕРДОФАЗНАЯ ФЕРМЕНТАЦИЯ

Исп. для культивирования микроорганизмов. Прокариотические клетки и клетки простейших эукариотов (грибы, дрожжи) высевают **на плотную или сыпучую ПС**, предварительно выделив в виде чистой культуры.

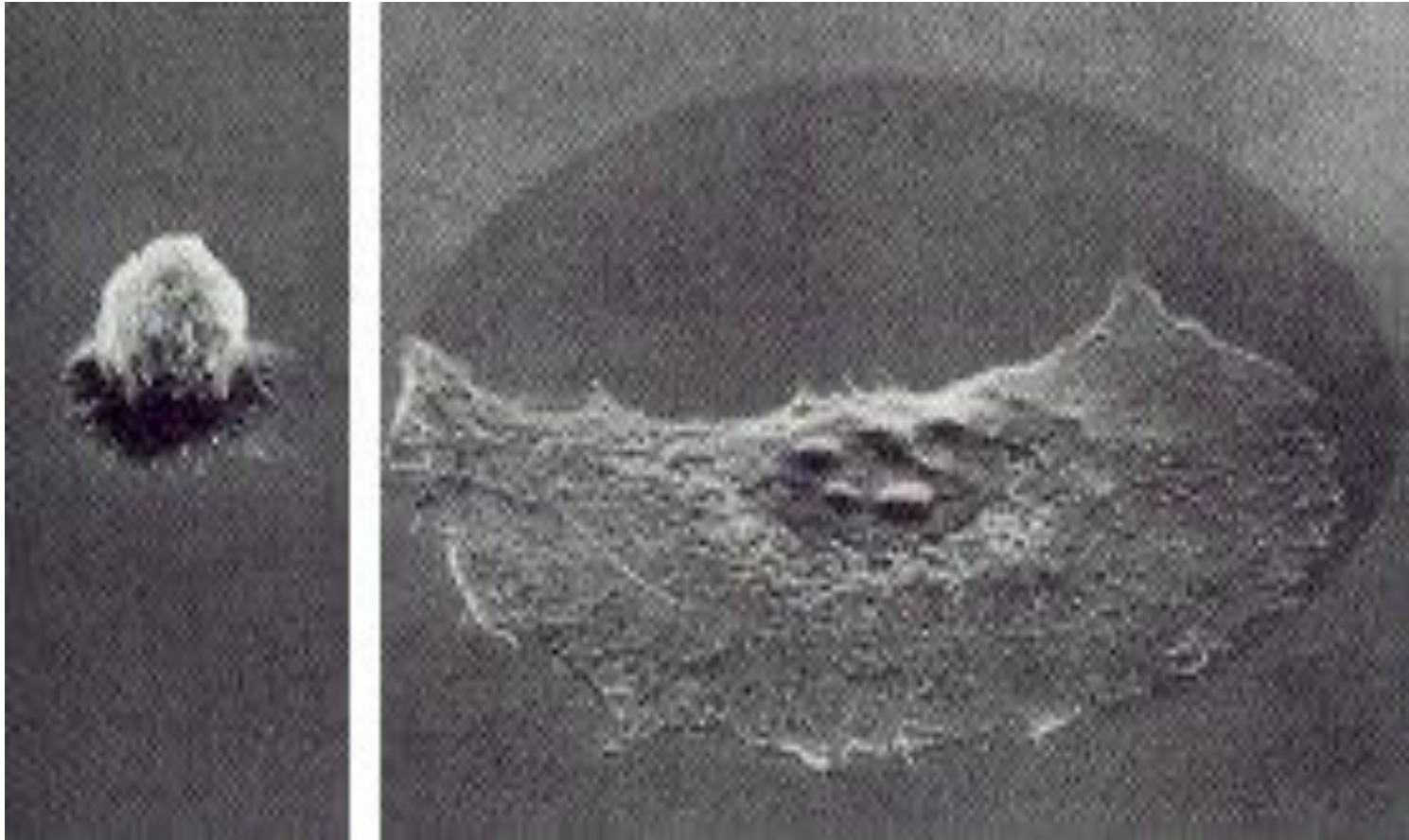
Основу ПС составляют увлажненные пшеничные отруби, увлажненная перловая крупа и др. виды круп.

КУЛЬТИВИРУЮТ актиномицеты, грибы рода *Penicillium*, *Aspergillus* для получения антибиотиков. *Другие продуценты* - для получения ферментных препаратов.

ЖИДКОФАЗНАЯ

ФЕРМЕНТАЦИЯ

ПОВЕРХНОСТНАЯ



**Прикрепление эукариотических
клеток макроорганизма к
субстрату**

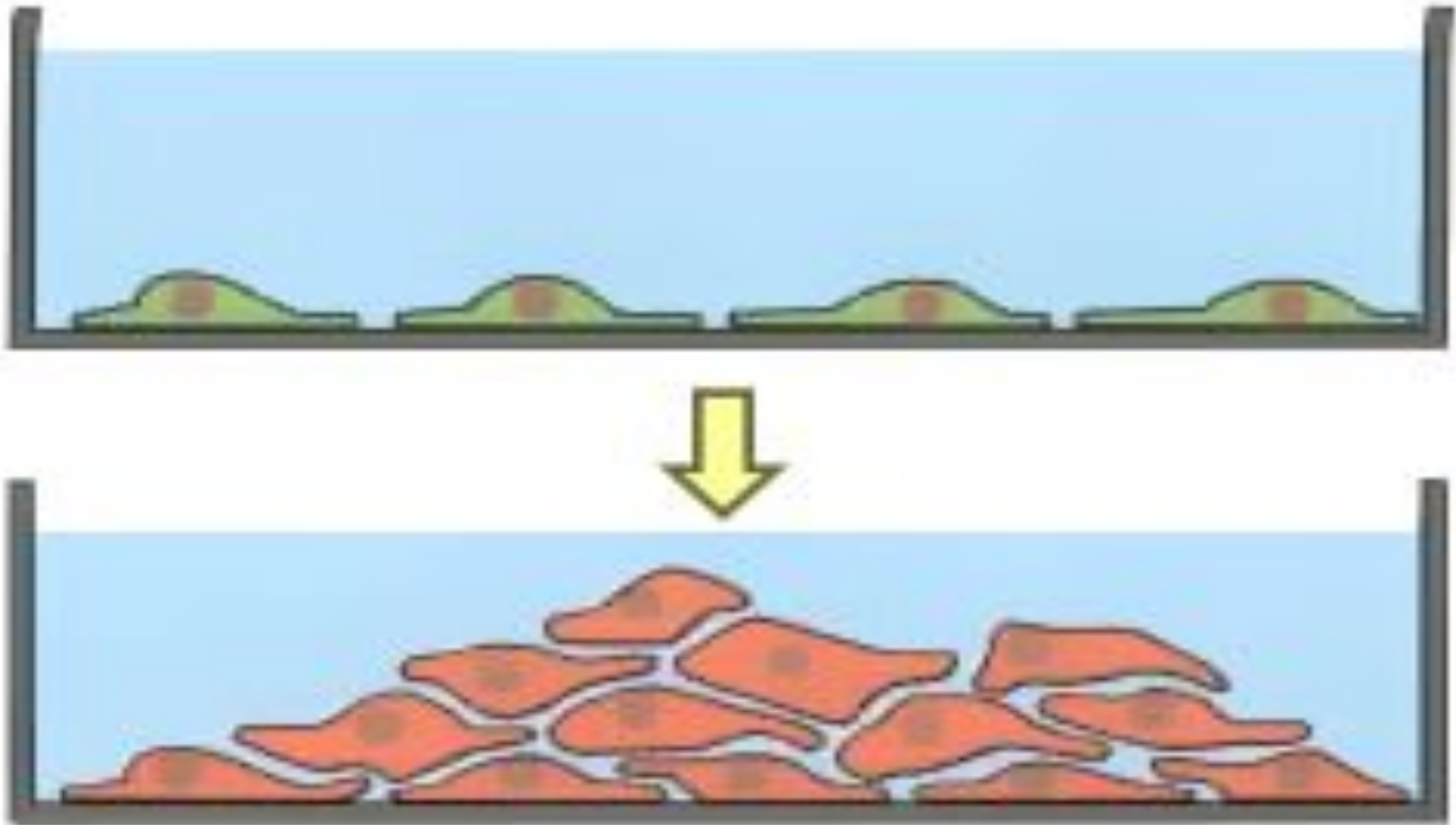


Монослой, образуемый соматическими клетками макроорганизма при культивировании



Монослой эукариотических клеток

Возобновление клеточных делений после
нанесния «раны» клеточному монослою



Раковые (иммортальные) клетки продолжают расти и после того, как заполнят всю поверхность субстрата, образуя мультислой

***CO₂ инкубаторы
клеточных культур
- роллерные
- плоскостные***



**ЖИДКОФАЗНАЯ
ФЕРМЕНТАЦИЯ
ГЛУБИННАЯ**

Глубинная ферментация

- Периодическая без добавления питательного субстрата (ПС);

- Периодическая с добавлением ПС

непрерывная

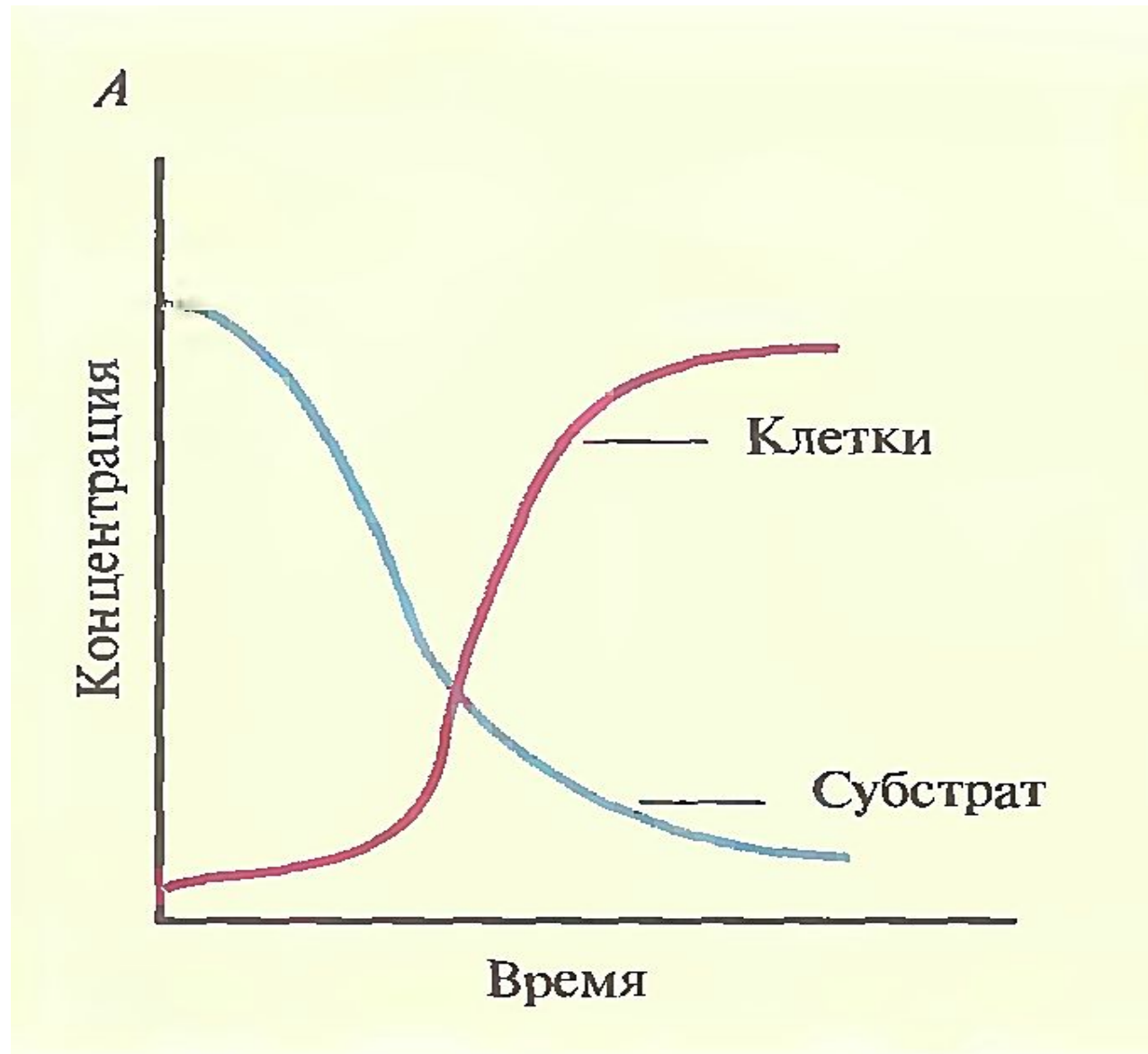
Кинетика периодического культивирования без добавления ПС

В ферментерах периодического действия.

Состав культуральной среды, концентрация микроорганизмов (биомассы) изменчивы и зависят от фазы роста.

Количество продукта изменчиво и зависит от фазы роста.

Исп. для культивирования Т-КО м/о



ФАЗЫ РОСТА КУЛЬТУРЫ!

периодическая ферментация БЕЗ добавления ПС.

1 – лаг-фаза

2 – фаза

ускорения. Скорость прироста клеток увеличивается

3 –

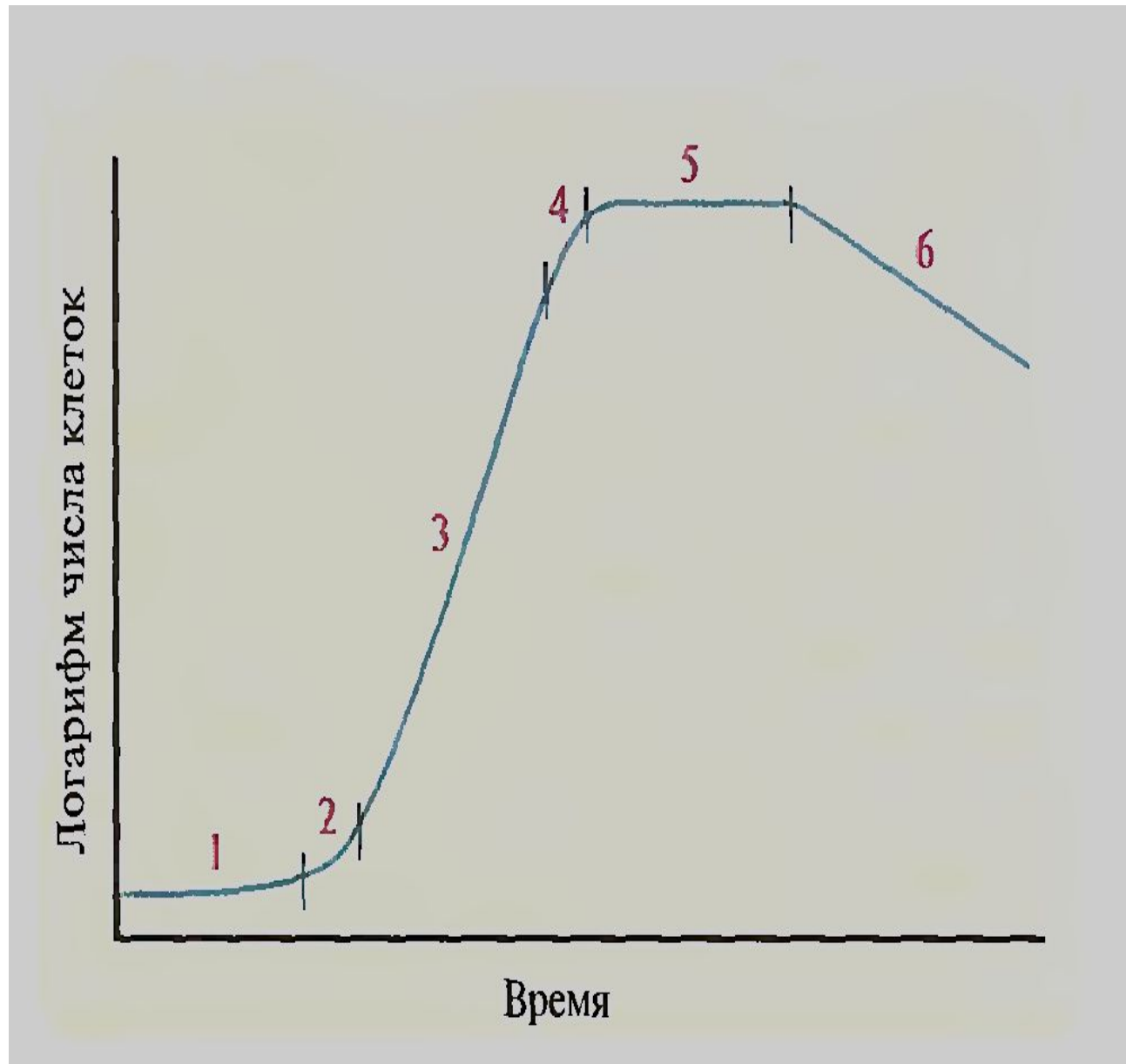
экспоненциальная фаза. Скорость прироста стабилизируется

4 – фаза

замедления.

5 - стационарная фаза.

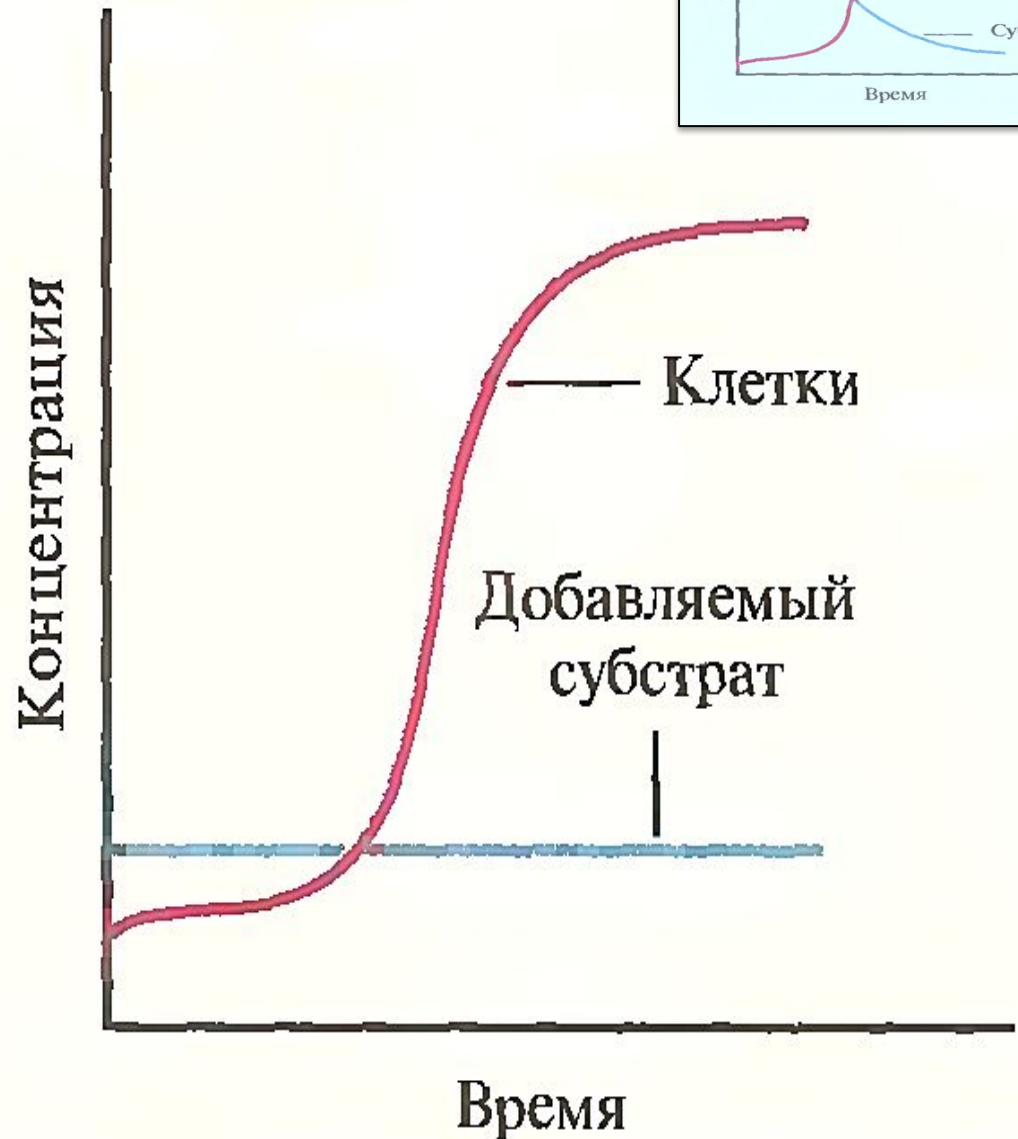
Прироста клеток нет, кол-во делений равно кол-ву отмираний клеток.



ферментация с добавлением субстрата

В ферментерах периодического действия.

- периодически вносят доп. кол-во ПС;
- культуральную среду не удаляют до окончания процесса;
- исп. для культивирования клеток м/о, **развитых многоклет. эукариотов** и др.



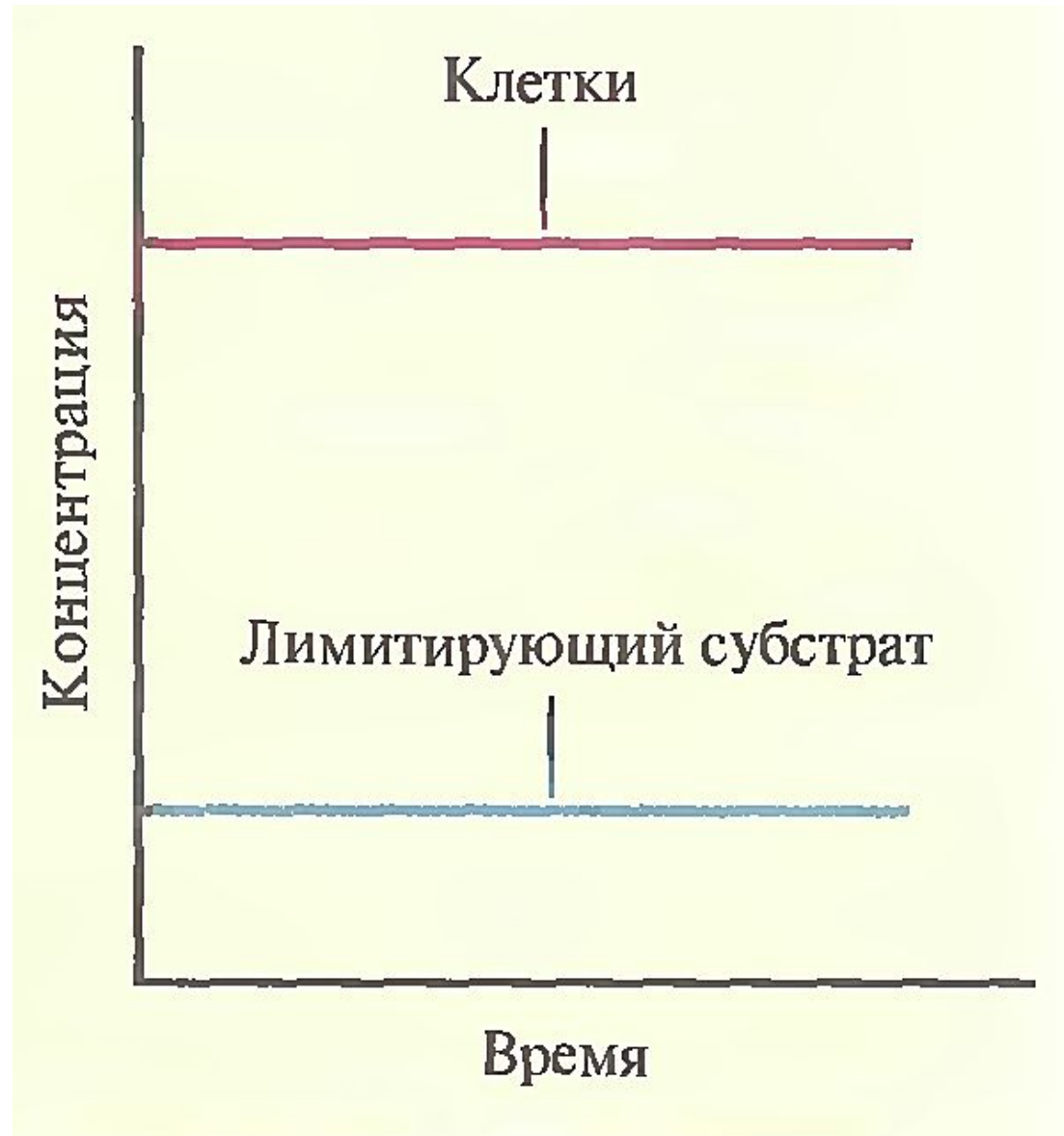
3. Непрерывная ферментация

В ферментерах непрерывного действия:

- свежая ПС поступает непрерывно;
- параллельно отводится такой же объем культуральной жидкости;
- продолжительность достигает 1000 часов;
- более экономична

Затруднения:

- ввиду большой длительности клетки могут терять рецДНК и выход целевого продукта снижается;
- поддержание стерильности в течение длительного времени проблематично



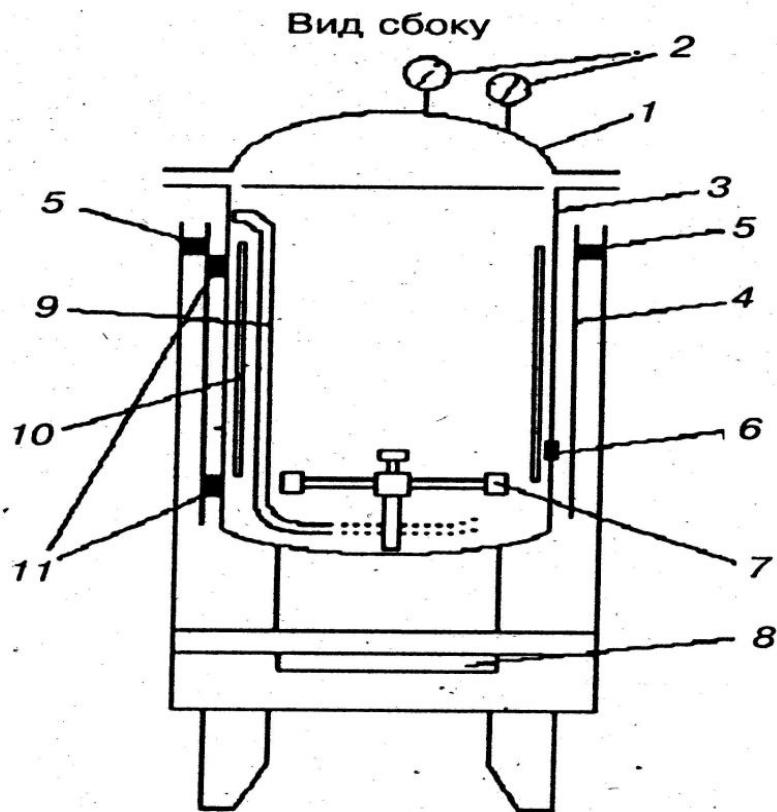
**АППАРАТУРА
БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО
ПРОЦЕССА**

АППАРАТУРА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА

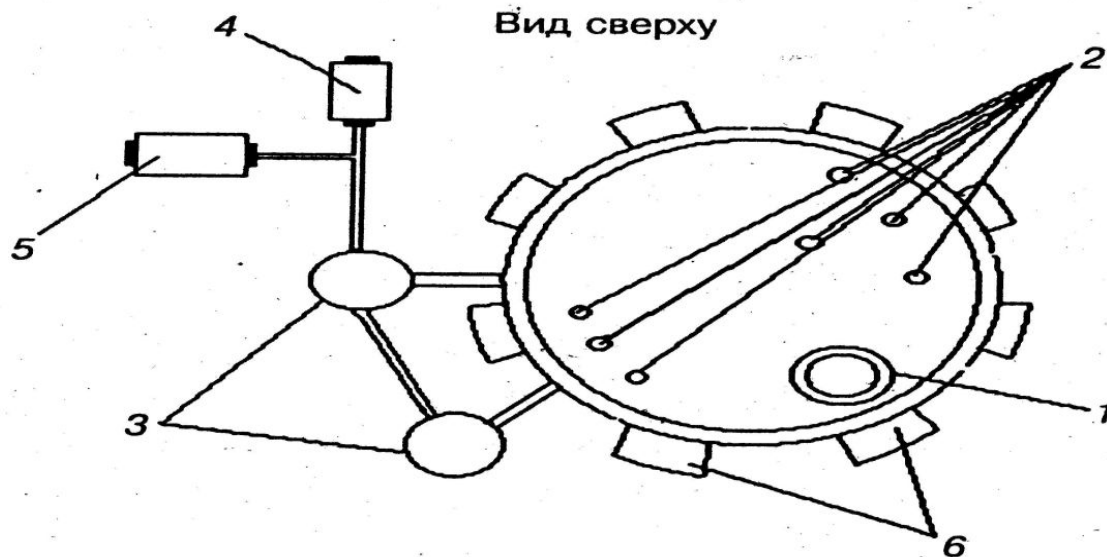


Ферментер-биореактор Bio-Flo/Cell

СХЕМА БИОРЕАКТОРА



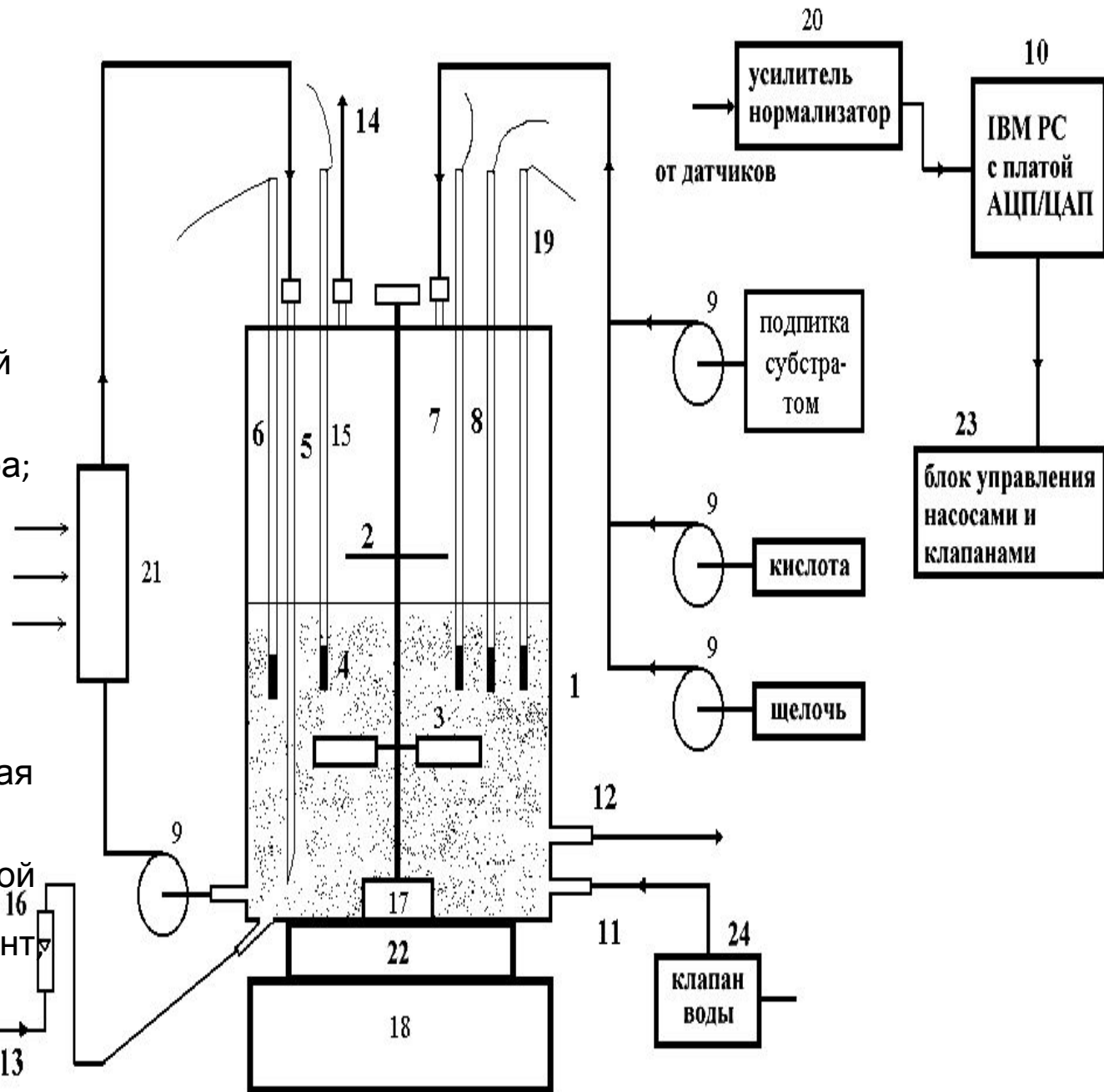
- 1 – крышка;
- 2 – манометры паровой и воздушный;
- 3 – сосуд;
- 4 – паровая рубашка;
- 5 – узел крепления и поворота биореактора;
- 6 – датчик температуры;
- 7 – турбинная лопастная мешалка;
- 8 – двигатель с магнитным приводом;
- 9 – газораспределительный барботер;
- 10 – отжатая перегородка (отбойники);
- 11 – вход и выход теплоносителей из паровой рубашки



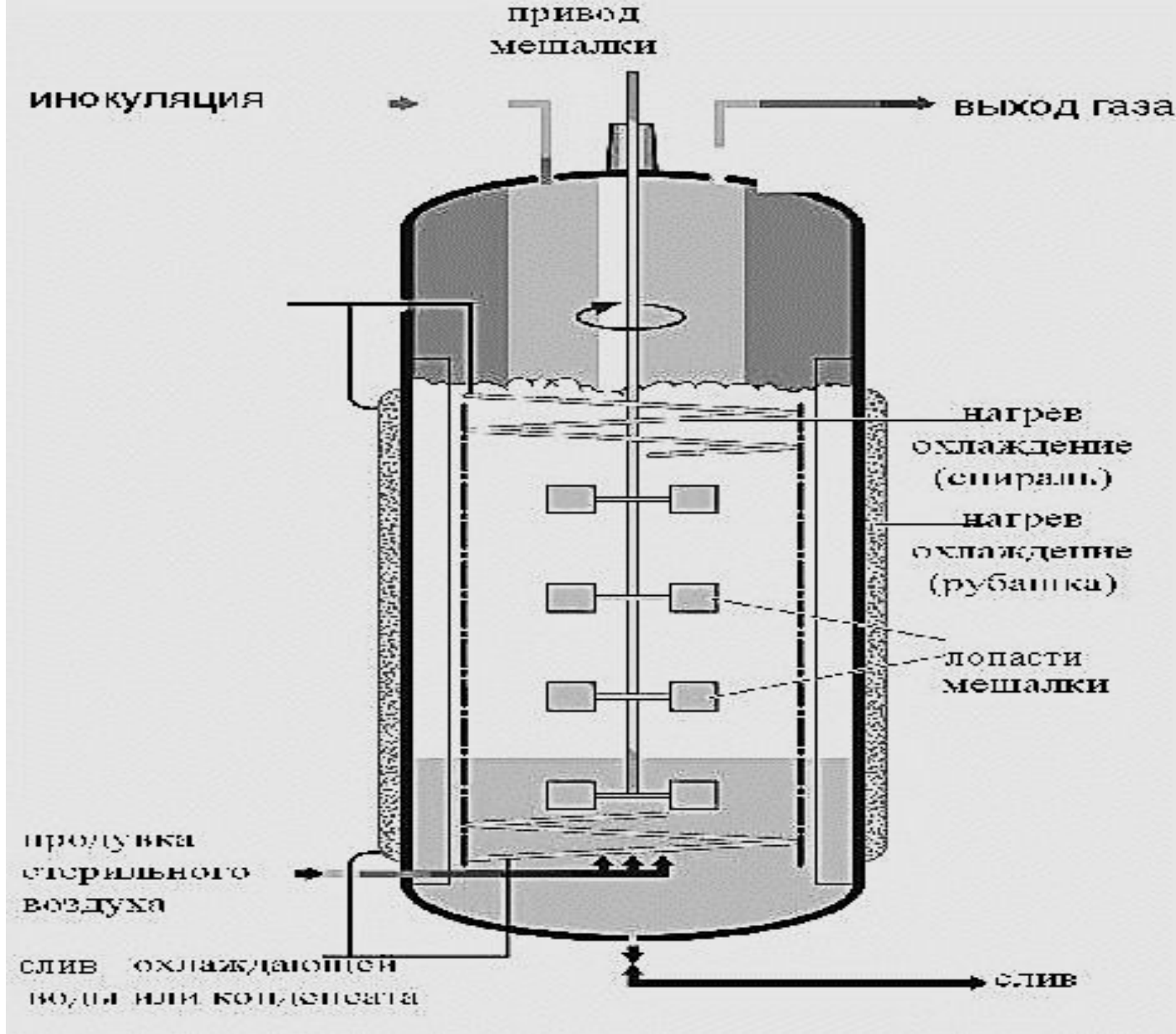
- 1 – смотровое окно;
- 2 – штуцеры с заглушками для дробного введения ингредиентов;
- 3 – входной и выходной стерилизующие воздушные фильтры;
- 4 – клапан для выхода воздуха из биореактора;
- 5 – предохранительный клапан;
- 6 – запорные приспособления

Схема комплекса для культивирования микроорганизмов

- 1 – корпус ферментера;
 2 – дискообразный пеногасит.;
 3 – лопастная мешалка;
 4 – среда культивирования;
 5 – сливной патрубков;
 6 – электрод сравнения;
 7 – рН-электрод;
 8 – рО₂-электрод;
 9 – перистальтические насосы;
 10 – IBM PC с платой АЦП/ЦАП;
 11, 12 – подача охлаждающей воды в теплообменник ферментера;
 13 – подача воздуха;
 14 – выход воздуха;
 15 – термосопротивление;
 16 – ротаметр;
 17 – магнитный привод;
 18 – привод двигателя;
 19 – еН-электрод;
 20 – усилитель-нормализатор;
 21 – выносная кювета для измерения биомассы (оптической плотности ферментационной среды);
 22 – нагревательный элемент;
 23 – блок управления насосами и клапанами;
 24 – клапаны.



Ферментер с механическим перемешиванием



Г-сакторы с механическим перемешиванием

- Воздух подается через разбрызгиватель;
- мешалки диспергируют воздух;
- характерно вспенивание



Барботажные КОЛОННЫ

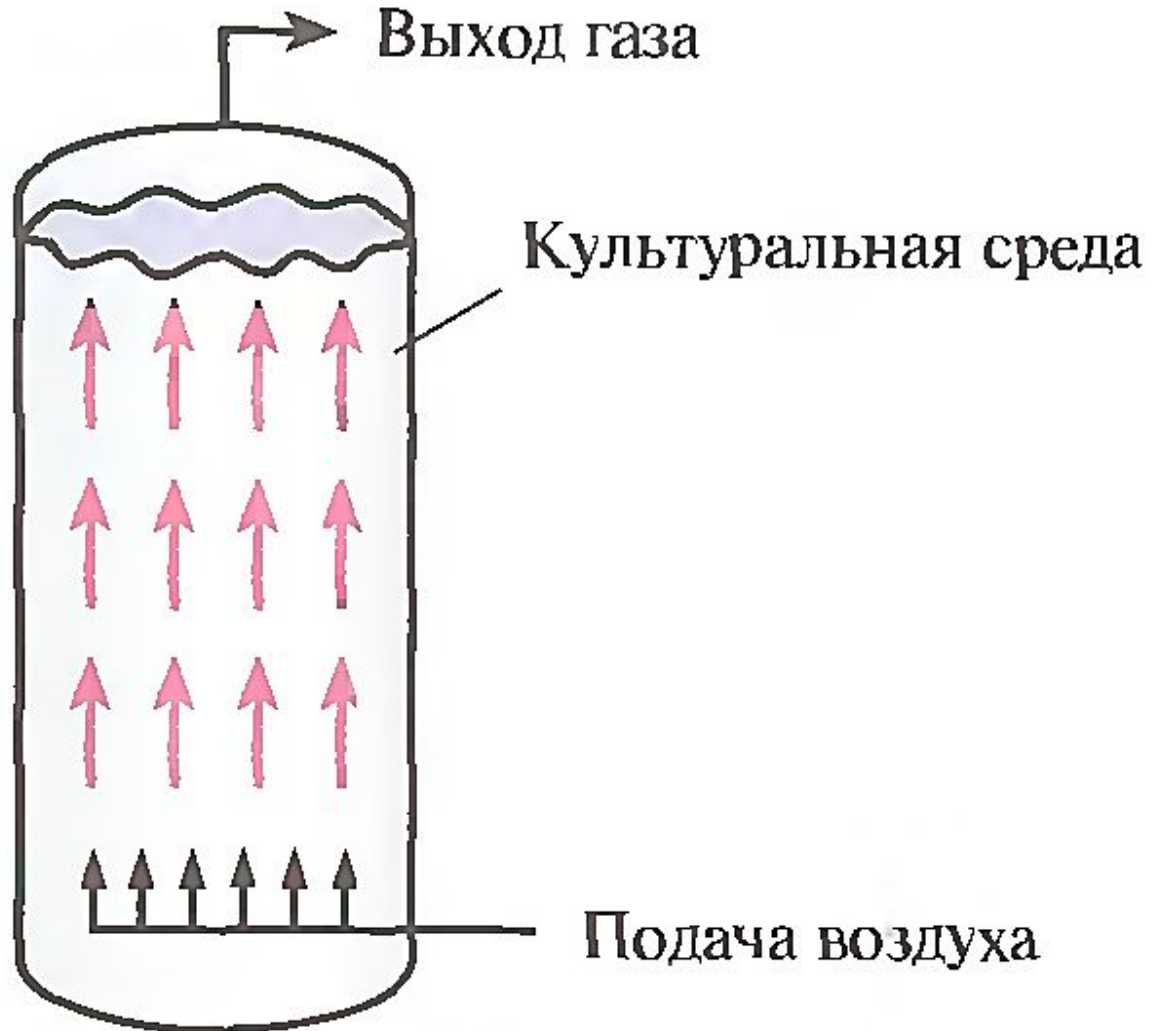
Воздух подается **под давлением** через барботер в нижней части ферментера.

Перемешивание происх. восходящим потоком воздуха равномерно по всему объему.

Мешалка отсутствует, что уменьшает риск механического разрушения кл. и попадания посторонних м/о.

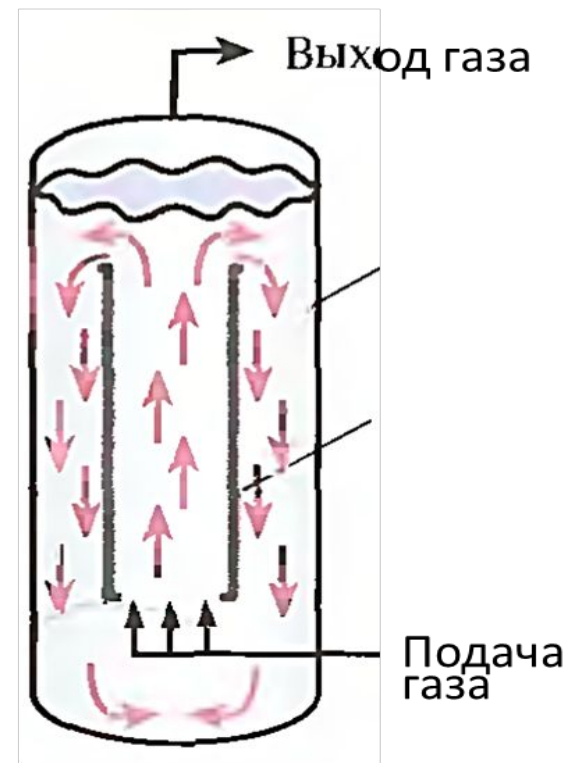
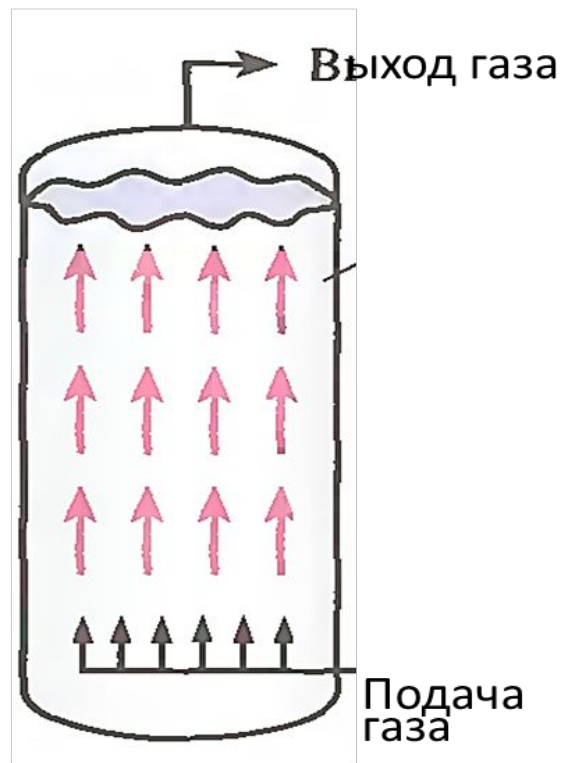
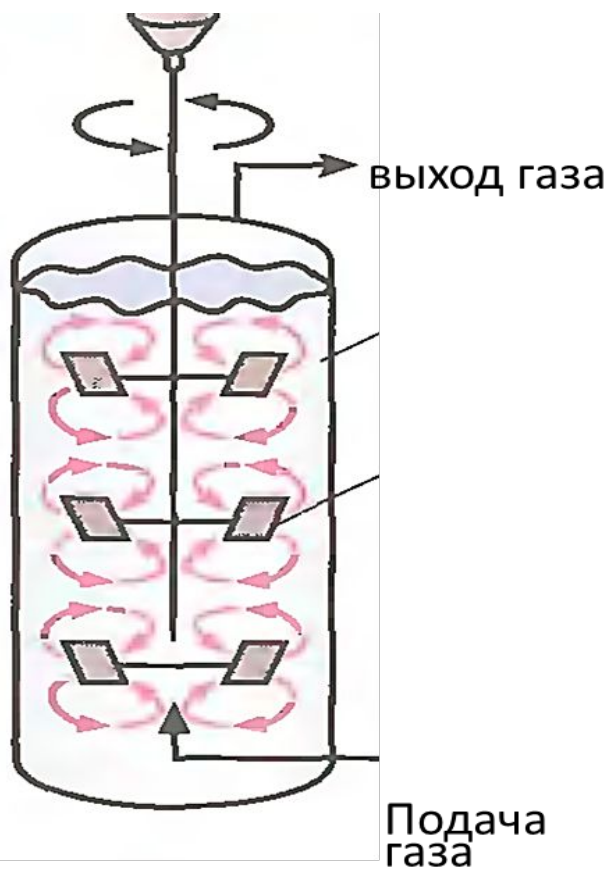
Отсутствуют сильные сдвиги слоев культуральной жидкости, она более спокойна.

Характерно пенообразование.



Эрлифтные биореакторы





Очистка газа (воздуха) от м/о и аэрозольных ч-ц осущ. как на входе (для предотвр. загрязнения содержимого биореактора), так и на выходе из биореактора (для предотвр. загрязнения ОС м/о, в т.ч. и рекомбинантными) через:

- фильтры предварит. очистки от пыли;
- фильтры грубой очистки от частиц 15 мкм и более
- фильтры тонкой очистки и стерилизации (до 0,25 мкм).

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТАЦИИ

Оценивается:

- По концентрации (плотности) клеточной культуры.
 - *Концентрация клеток в ПС называется биомассой.*
 - Измеряется в граммах сухого вещества клеток на 1 л среды.

КОНТРОЛЬ БИОМАССЫ в культуральной жидкости

Прямые методы:

- подсчет числа клеток *при помощи микроскопа*. При этом определяют линейные размеры или число жизнеспособных клеток методом окрашивания. Наиболее чувствительный метод.
- по объему осаждения клеток при центрифугировании культуральной жидкости;

Косвенные методы:

- по интенсивности дыхания (измерение концентрации CO_2 с помощью ИК газоанализатора),
 - по содержанию накопленного белка (бромсульфалеиновая проба, основанная на связывании бромсульфалеина основными группами белка);
- и т.д.

На рост и развитие микроорганизмов и клеточных линий влияют

Внутриклеточные факторы:

- структура клетки
- механизмы метаболизма
- генетические характеристики
- адаптивно-компенсаторные свойства клеток

Внеклеточные (внешние) факторы:

- состав питательной среды,
- концентрация растворенного кислорода,
- рН среды
- температура,
- давление,
- режим перемешивания,
- время культивирования и т. д.

Являются основными регуляторными факторами биотехнологии.

Основные стадии биотехнологического процесса

Приготовление и стерилизация питательных сред

Приготовление посевного материала

Культивирование (ферментация)

Обработка культуральной жидкости

Выделение и очистка биопрепарата

Получение готовой продукции

вспомогательные операции:

- стерилизация оборудования
- стерилизация коммуникаций
- подготовка пеногасителей,
- подготовка газов для барботирования и т.д.

4. Обработка культуральной жидкости

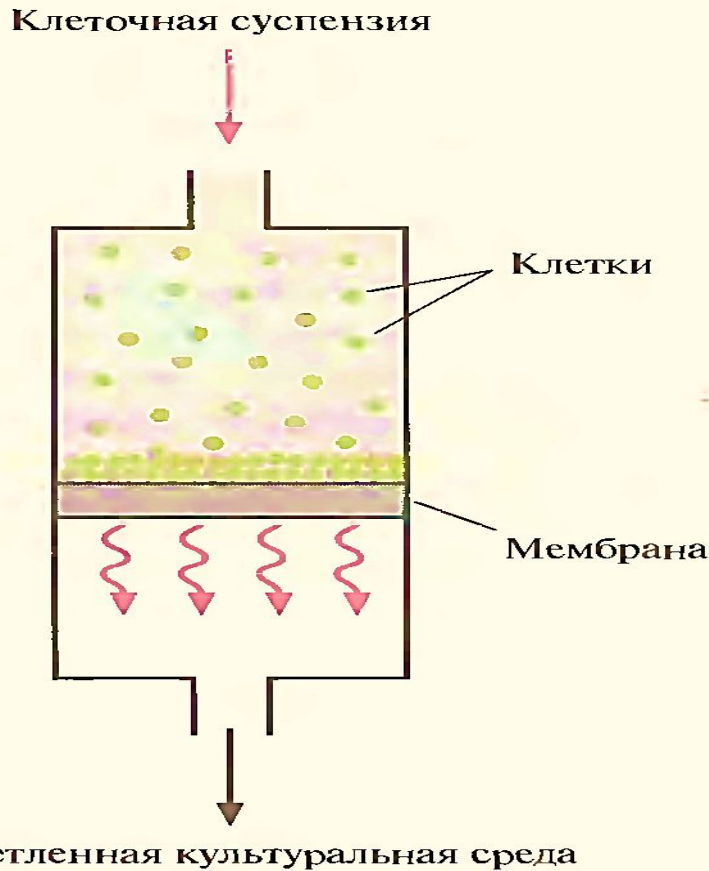
После культивирования и накопления биомассы клетки отделяют от культуральной жидкости

СЕПАРАЦИЮ ОСУЩЕСТВЛЯЮТ:

- **фильтрацией;**
- **высокоскоростным центрифугированием**

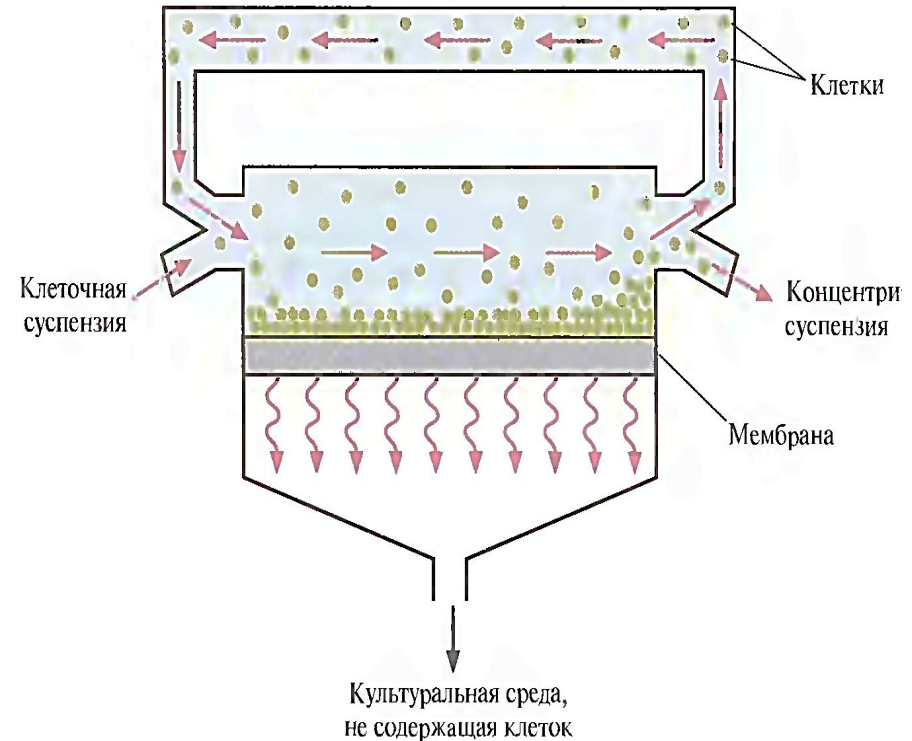
СПОСОБЫ ФИЛЬТРАЦИИ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ ДЛЯ СБОРА КЛЕТОК

ОБЫЧНАЯ ФИЛЬТРАЦИЯ ЧЕРЕЗ МЕМБРАНУ



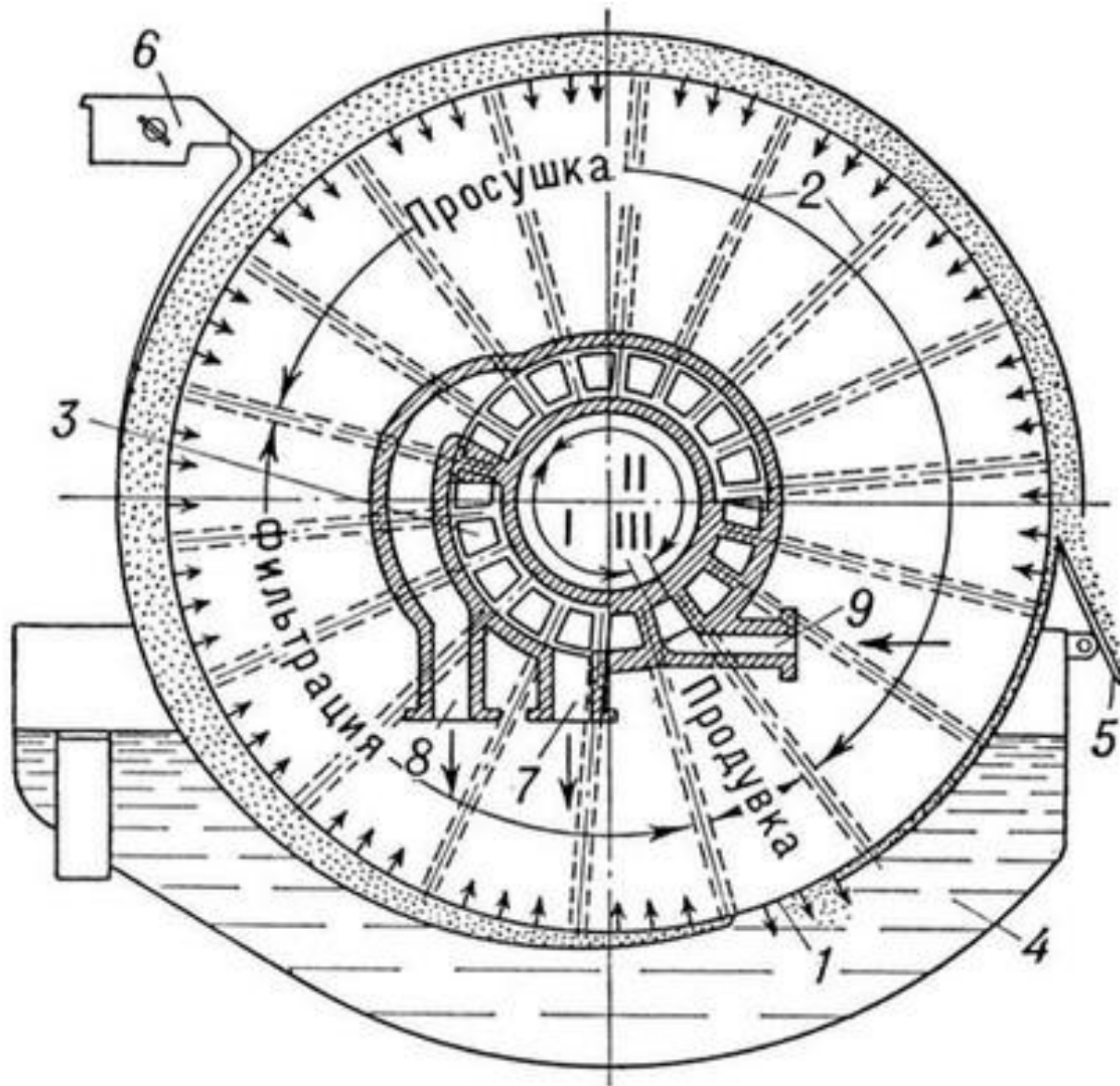
клетки забивают поры,
проходимость уменьшается,
скорость отделения клеток от КЖ
резко и быстро падает

ФИЛЬТРАЦИЯ С ПАРАЛЛЕЛЬНЫМ ПОТОКОМ КЛЕТОЧНОЙ СУСПЕНЗИИ

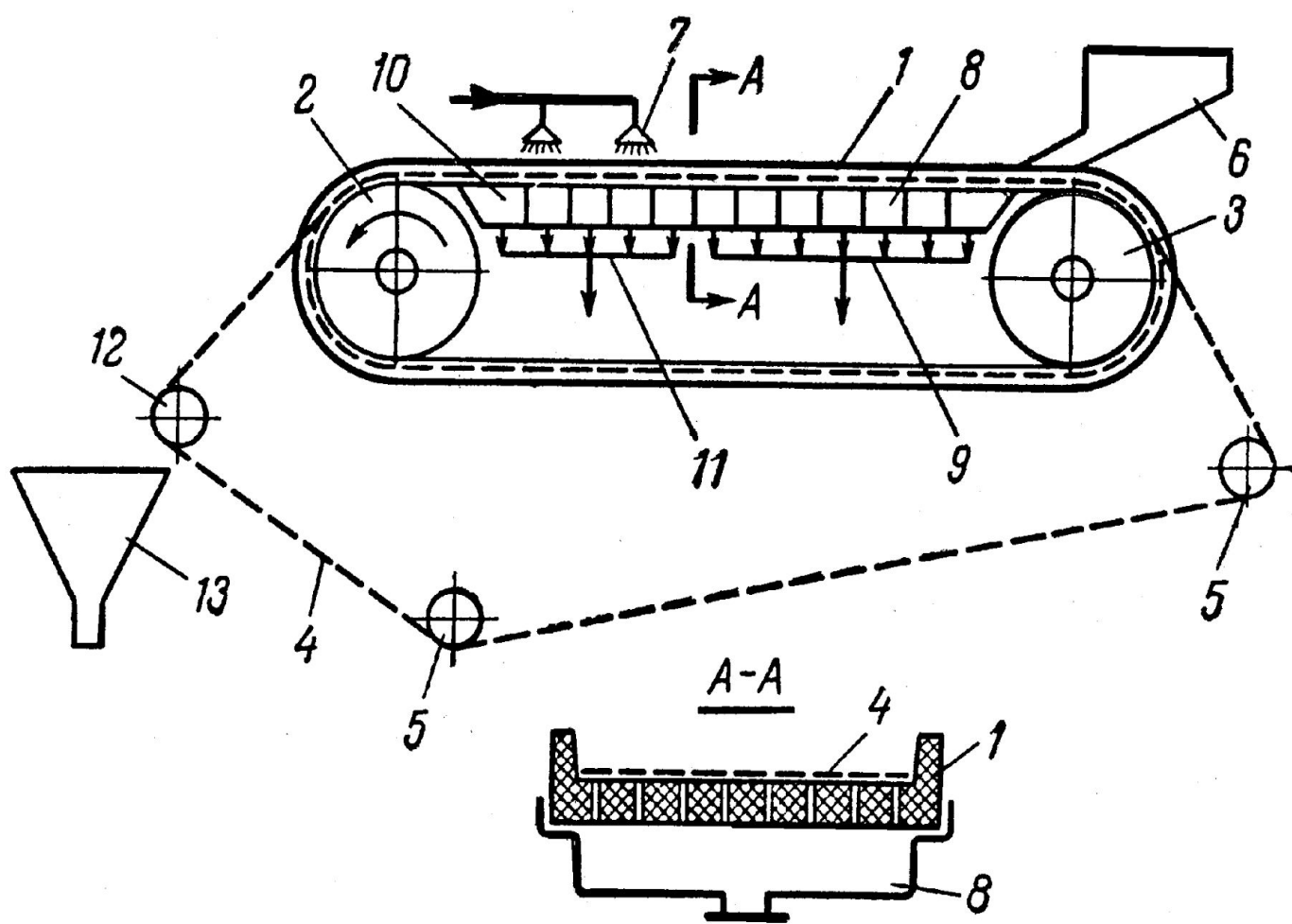


Клет. сусп. → под давлением параллельно
поверхности мембраны - циркуляция
вокруг мембраны. За один раунд 4-3
мембр. → т-ко часть ж-ти, а остальная
очищает мембр. от осевших кл-к. Скорость
фильтрации не падает. После многих
раундов фильтруется вся жидкость.

Барабанный вакуум-фильтр непрерывного действия:



- 1 — [барaban](#);
- 2 — перегородки;
- 4 — корыто;
- 5 — нож для срезания осадка;
- 6 — распределитель [ВОДЫ](#) для промывания осадка;
- 7, 8 — трубы для откачки отфильтрованной [ЖИДКОСТИ](#) и промывной [ВОДЫ](#);
- 9 — труба для подачи сжатого [ВОЗДУХА](#).



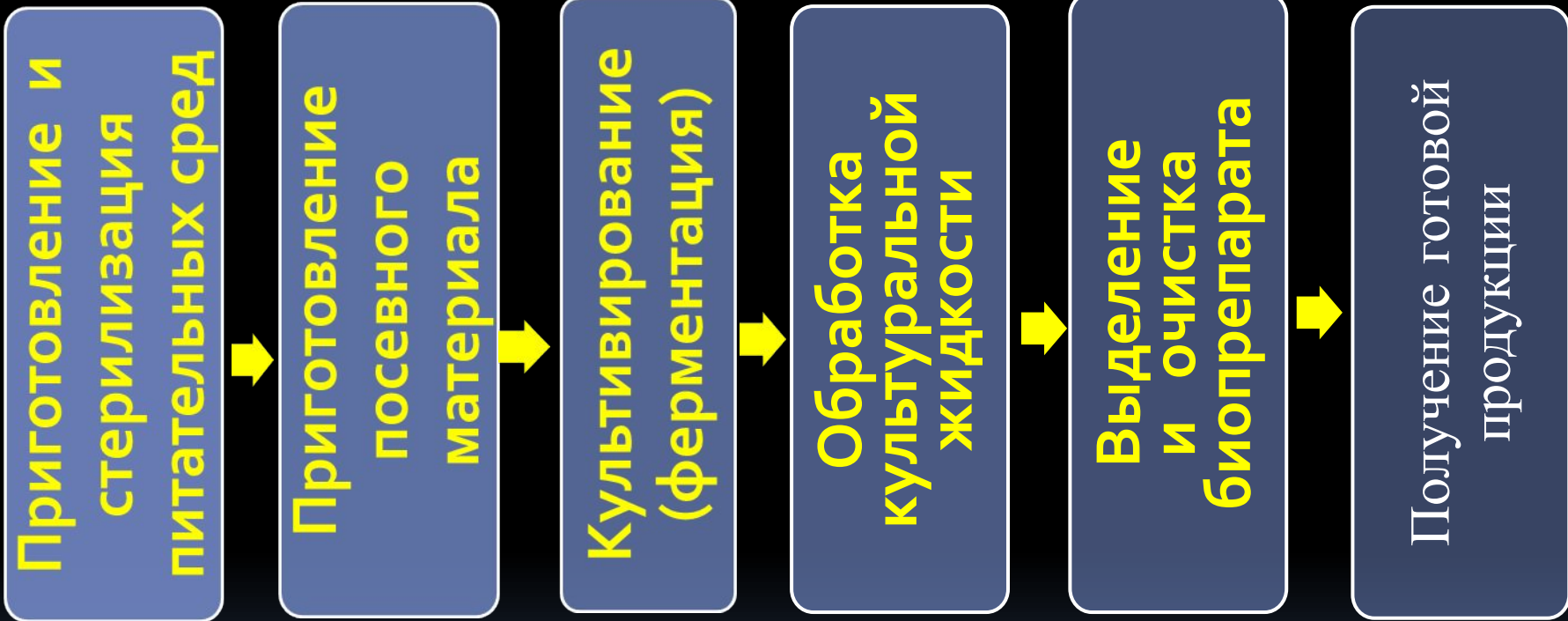
Ленточный вакуум-фильтр:

1 — опорная резиновая лента; 2 — приводной барабан; 3 — натяжной барабан; 4 — фильтровальная ткань; 5 — натяжные ролики; 6 — лоток для подачи суспензии; 7 — форсунки для подачи промывной жидкости; 8 — вакуум-камеры для фильтрата; 9 — коллектор для фильтрата; 10 — вакуум-камеры для промывной жидкости; 11 — коллектор для промывной жидкости; 12 — направляющий ролик; 13 — бункер для осадка.

Сбор клеток осуществляют высокоскоростным центрифугированием

- Суспензию клеток непрерывно подают в барабан вращающейся центрифуги, в нем клетки концентрируются, а осветленная жидкость удаляется.
- Недостатки метода:
 - вероятно утечка м/о в ОС,
 - невозможность полного удаления клеток из культуральной среды.

Основные стадии биотехнологического процесса



вспомогательные операции:

- стерилизация оборудования
- стерилизация коммуникаций
- подготовка пеногасителей,
- подготовка газов для барботирования и т.д.

5. ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА БИОПРЕПАРАТА

Возможны два варианта:

- 1. Продукт локализован внутри клеток. В этом случае клетки (биомассу) разрушают, удаляют клеточные осколки (сепарация) и выделяют продукты из осветленной среды.**
- 2. Желаемый продукт экскретируется, т.е. выделяется клетками в культуральную среду. В этом случае его получают из культуральной среды после отделения клеток.**

ВЫДЕЛЕНИЕ ПРОДУКТОВ БИОСИНТЕЗА



В процессе разрушения клеток необходимо сохранить конечный продукт - исключить денатурацию белка.

Методы разрушения клеток

Химические;

Физические;

Биохимические;

Разрушение клеток

Химические методы

обработка
щелочью

Обработка
органическими
растворителям
и

Обработка
детергентами

Физические методы

Температурный , осмотический
шок

Обработка УЗ

Механическое истирание

баллистическая дезинтеграция (для
клеточных суспензий высокой
вязкости)

экструзия

Разрушение клеток

- Биохимические методы** - лизис с помощью ферментов
- **Gr+** бактерии разрушают с помощью мурамидазы – лизоцима яичного белка. Фермент разрушает пептидные связи между N-ацетилглюкозамином и остатками N-ацетилмурамовой кислоты – осн. элементы клет. оболочки.
 - **Gr-** бактерии клеточная стенка тоньше, но покрыта фосфо-липопротеидным комплексом. Лизоцим не справляется со слоем липидов, поэтому его используют в сочетании с ЭДТА.
 - **Дрожжи.** клет. стенки образованы частично фосфорилированными маннатами и β -глюканами
 - **Плесневые (низшие) грибы.** Клет. стенки из α - и β -глюканов, гликопротеидов и хитина.
 - используют комплексы ферментов, разрушающих эти конструкции: фосфоманназу, β -глюканазу-1,3

Обработка среды после разрушения клеток

Сепарация продуктов разрушения клеточных стенок и лизата:

**низкоскоростное
центрифугирование
микрофильтрация**

Выделение белкового продукта из лизата:

**высаливание нейтральными солями высокой
концентрации: Li_2SO_4 , Na_2SO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$**

Выделение высокомолекулярных веществ (ВМС) небелковой природы из лизата:

**седиментация под воздействием орг.
дегидратантов: этанола, ДМСО, глицерина и т.д.
Возможно осаждение в рез. замены р-рителя
(ацетоном, хлороформом или другими
органическими растворителями).**

Осаждение биополимеров

- **1. Осмотическое (высаливание)** – использование для осаждения высококонцентрированных солевых растворов (с высокой ионной силой) – сульфат аммония, хлорид натрия, калия и др. *Как вариант – комплексообразование – осаждение солями d-элементов.*
- **2. При смене pH среды** - органическими кислотами (растворы трихлоруксусной, сульфасалициловой и др. кислот).
- **3. Изменение диэлектрической проницаемости среды** – осаждение органическими растворителями (метанол, ацетонитрил, пропанол-2, ацетон и др.).

Осаждение биополимеров

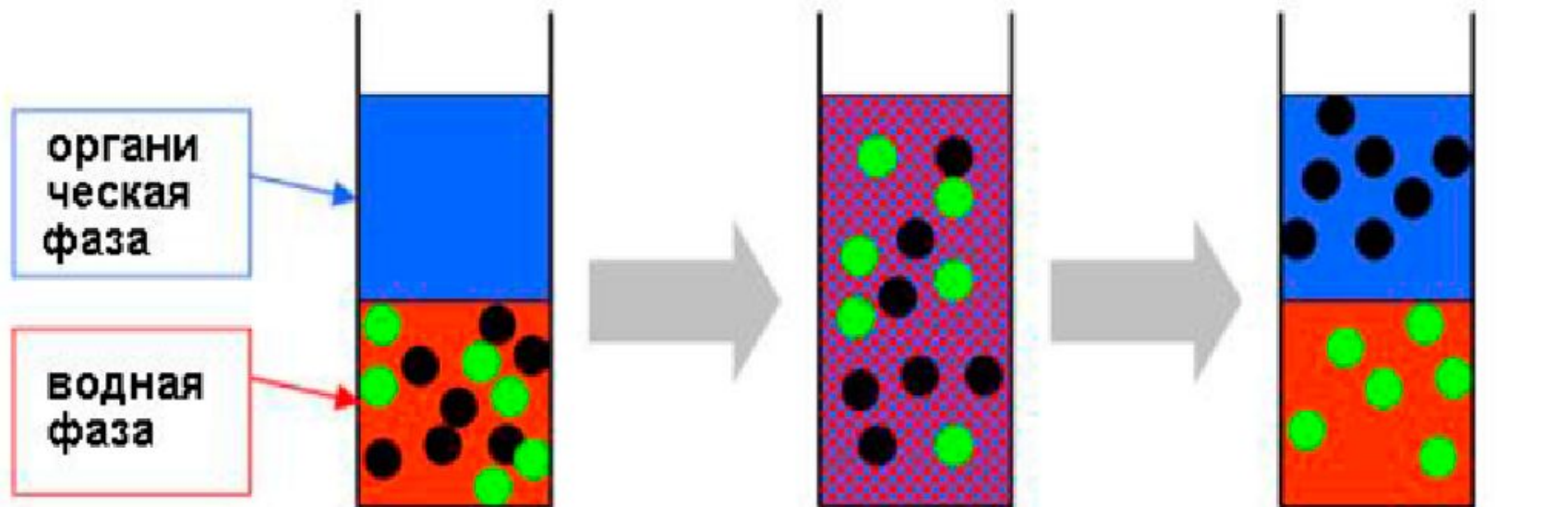
- **Дополнительные стадии:**
- удаление растворителя (в токе инертного газа) - концентрирование
- - дополнительная стадия очистки образца (ТФЭ, ЖЖЭ)
- - фильтрование через мембранный фильтр
- - ТФМЭ, высаливание органического растворителя и др.

ЖИДКОСТЬ-ЖИДКОСТНАЯ ЭКСТРАКЦИЯ

- **Экстракция** – процесс перевода вещества из водной фазы в органическую.
- Экстракция – сложный физико-химический процесс. При смешивании водного раствора вещества А с каким-нибудь растворителем, который не смешивается или ограниченно смешивается с водой, растворенное вещество А будет распределяться между двумя растворителями и спустя некоторое время в такой системе установится равновесие:



ОБЩАЯ СХЕМА ЖИДКОСТЬ-ЖИДКОСТНОЙ ЭКСТРАКЦИИ



прибавление органического растворителя (экстрагента)

разделение фаз

смешивание (распределение молекул вещества между двумя фазами)

Требования к органическим растворителям

- Органический растворитель должен обладать способностью эффективно и по возможности избирательно извлекать экстрагируемое вещество из исследуемого раствора.
- Растворитель должен мало растворяться в воде и мало растворять воду, не гидролизоваться. Плотность органических растворителей по возможности должна отличаться от плотности воды.
- Растворитель должен быть нелетучим и достаточно высококипящим (температура кипения при атмосферном давлении должна быть выше 50°C).
- Органические растворители должны быть неогнеопасными, нетоксичными и дешевыми.

ТВЕРДОФАЗНАЯ ЭКСТРАКЦИЯ

- Процесс распределения выделяемых веществ между жидкой (образец) и твердой (сорбент) фазами, с последующей десорбцией выделяемых веществ жидкой фазой (элюент).
- **Включает стадии:**
- 1. Подготовка образца (д.б. гомогенный), прибавление раствора IS, органического растворителя для десорбции веществ с биополимеров, прибавление буферный растворов для создания необходимого рН, центрифугирование (при необходимости)
- 2. Подготовка сорбента (кондиционирование).
- 3. Сорбция (пропускание через слой сорбента).
- 4. Промывка, сушка сорбента.
- 5. Элюирование (десорбция).
- 6. Концентрирование.

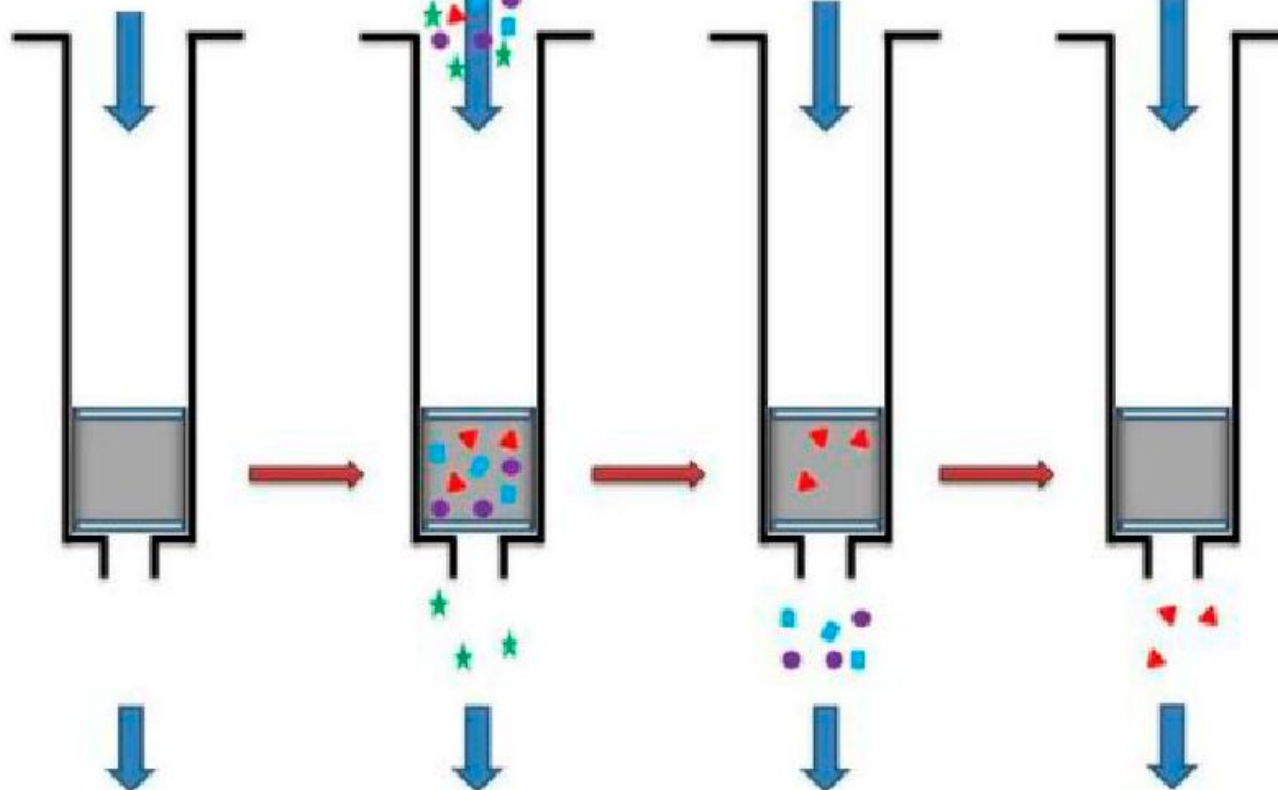
ТВЕРДОФАЗНАЯ ЭКСТРАКЦИЯ

кондиционирование сорбента

прибавление образца

промывка от мешающих веществ

элюирование

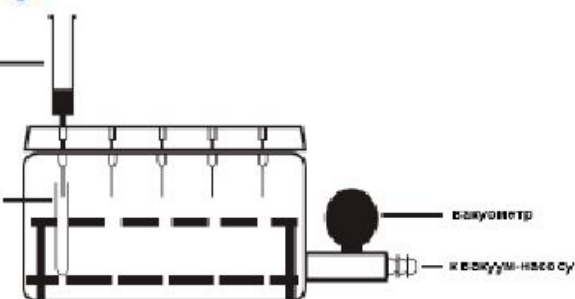


аналит

мешающие вещества

сервисный патрон

пробирка для сбора элюата

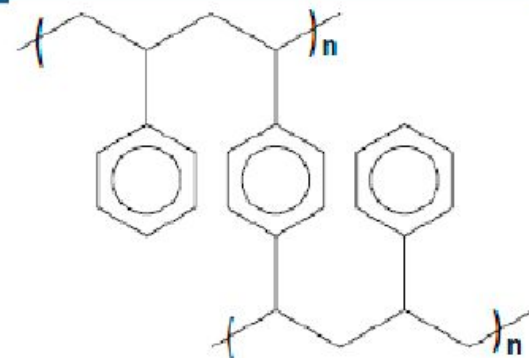


КЛАССИФИКАЦИЯ СОРБЕНТОВ

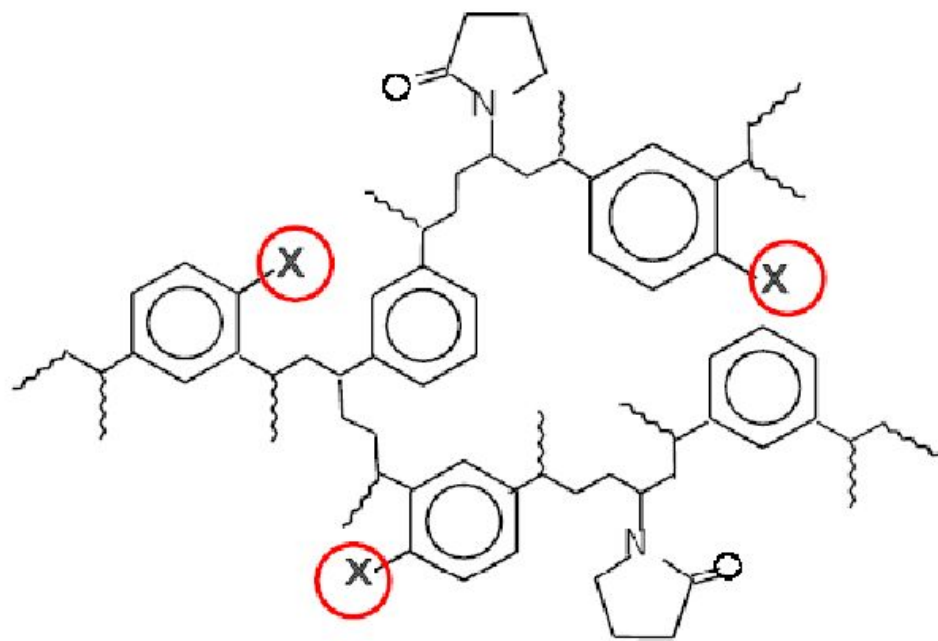
- По полярности, механизму и сродству к адсорбату (селективные и универсальные):
 - 1. Полярные
 - 2. Неполярные
 - 3. Среднеполярные
 - 4. Ионообменные
 - 5. Аффинные (иммуноаффинные)
 - 6. Комплексообразующие
 - 7. Специфичные сорбенты, полученные методом «впечатывания» молекул (молекулярного импринтинга).

Синтетические (полимерные) сорбенты

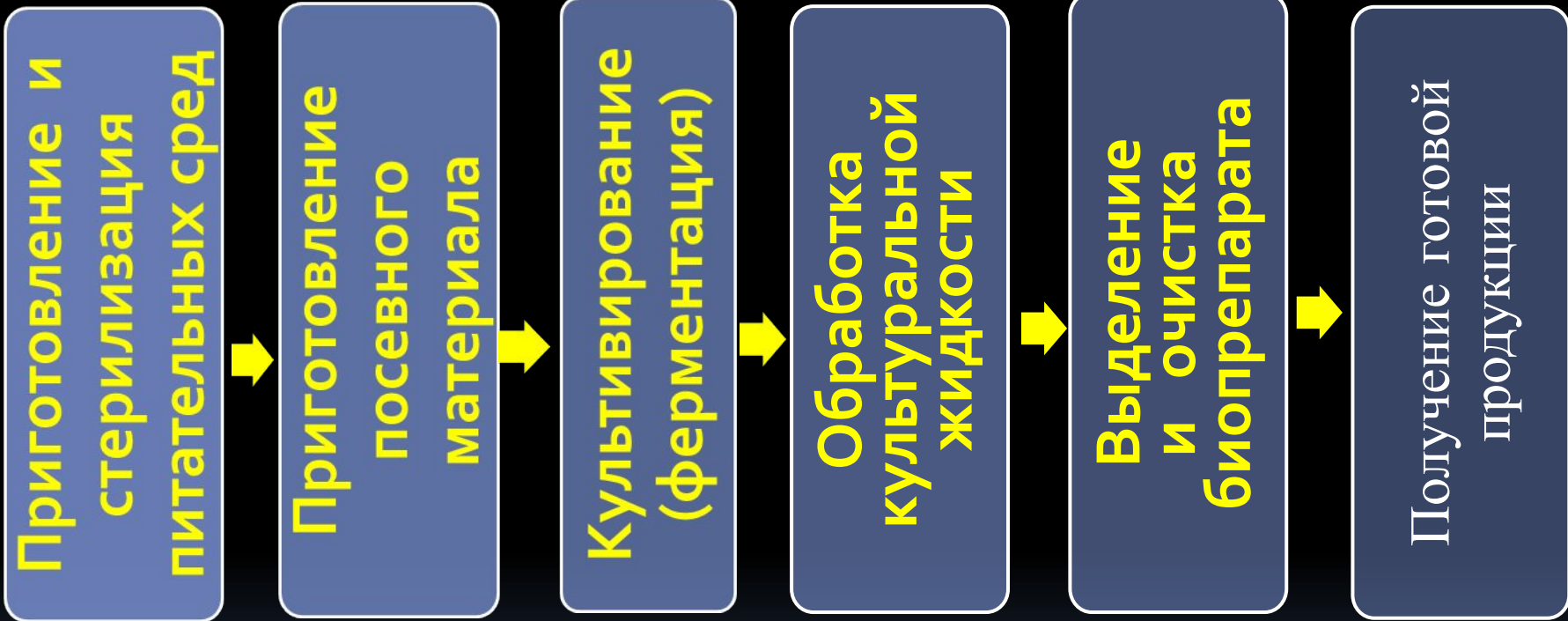
- Сополимеры стирола (СТ) и дивинилбензола (ДВБ), СТ/ДВБ/винилпирролидона и др.



- $X=H$ – универсальный сорбент
С гидрофобными свойствами
- $X=SO_3^-$ - ионообменные свойства
(сорбция катионов)
- $X=N(CH_3)_3^+$ - ионообменные свойства
(сорбция анионов)



Основные стадии биотехнологического процесса



вспомогательные операции:

- стерилизация оборудования
- стерилизация коммуникаций
- подготовка пеногасителей,
- подготовка газов для барботирования и т.д.

6. ПОЛУЧЕНИЕ ГОТОВОЙ ПРОДУКЦИИ

- Очистка биопрепарата от орг. примесей (хроматография, электрофорез, диализ и т.д.)
- Высушивание. Исп. щадящие методы сушки: **сублимационная** сушка на установках типа «Иней» (РФ), «Юзефрау» (Фр.), «Heto – Helton» (Дания). Исп. **криопротекторы** (среды высушивания).
- **Розлив (рассыпка) и укупорка** продукта - в асептических условиях или в помещениях класса А (В) по GMP.
- **Этикетирование, упаковка** по общепринятой схеме.