

Состояние технологии микробиологического производства в РФ



Слева В.В.Кураков С.П.Клыков

Представленный доклад посвящен краткой характеристике состояния технологии микробиологического производства в Российской Федерации и предложению для решения данной проблемы, основанное на инновационном методе модернизации технологии микробного синтеза, позволяющем существенно уменьшить производственные затраты, снизить себестоимость, сделать продукцию микробного синтеза конкурентоспособной на мировом рынке и рынке России.

■ В.В.Кураков, генеральный директор

■ С.П.Клыков, главный специалист «Фарм-Регион»

Всем известны области применения микроорганизмов в биотехнологии - от пищевой промышленности, очистки стоков, бытовой химии до биосинтеза и микробиологической трансформации сложных биомолекул с целью получения вакцин, новых высокоэффективных лекарственных средств и диагностикомов. Практически все в той или иной степени такие производства присутствовали в нашей стране 20 лет назад.

По мере присоединения нашего государства к глобальному мировому рынку ряд производств был закрыт как неконкурентоспособные. Это практически все производство фармацевтических субстанций микробиологическим путем (антибиотики, стероидные препараты, кровезаменители, аминокислоты и другие). Сохранилось по старым технологиям производство вакцин для человека и в ветеринарии и отрасли пищевой промышленности, использующие микроорганизмы, как продуценты. Запуск новых микробиологических производств скорее исключение, чем правило.

Причин этого много и они нам всем известны. Я хотел остановиться только на одной из них, повлиять на которую мы в нашей компании можем, и нам есть, что предложить для этого решения проблемы.

Известно, что микробиологический синтез состоит из двух составляющих:

- штамм продуцент;
- технология производства с помощью этого штамма.

Решение первой проблемы - это задача в большей степени академических учреждений по скринингу и выделению новых высокоэффективных штаммов.

Решение второй задачи - разработка высокоэффективной технологии - является до настоящего време-

ни основным тормозящим фактором и основной причиной неконкурентоспособности микробиологических производств в России, которые использовали разработки 30-летней давности.

Отработка технологий микробиологического синтеза - дорогостоящее наукоемкое дело. И, к сожалению, даже во времена СССР этому уделялось недостаточное внимание, а в период с девяностых годов до настоящего времени и того меньше. В итоге - закрыты ведущие институты по разработке микробиологических технологий, потеряна связь отраслевой науки с производством, нынешние собственники не имеют ни желания, ни возможности развивать новые технологии, внедрять инновации и как результат закрыты сами производства.

Предлагаемый нами инновационный подход преодоления технологического отставания в производстве с помощью микробного синтеза по нашему мнению может решить этот вопрос.

Данная инновационная методология защищена патентом Российской Федерации и Европейским РСТ и основана на точном понимании и учете структуры микробной массы как в качественном, так и в количественном отношении. Разработанная энергопопуляционная теория роста микроорганизмов с моделью структурирования популяций, синтеза продуктов и потребления субстратов позволяет строить математической модели биосинтеза и тем самым точно рассчитывать питательные потребности и продолжительность процесса.

В основе нашей теории лежит разделение клеток по возрастной структуре на клетки нулевого возраста (фаза G, для эукариотов и фаза B для прокариотов) и активно делящиеся. Это состояние клеточной массы достаточно широко известно. Но в прак-

тике применения подобных подходов или мало, или, вообще, неизвестны. Суть нашего метода в том, что физиологические свойства клеток, в т.ч. потребление субстратов и выделение продуктов синтеза, существенно изменяются в разных фазах клеточного цикла.

Разделение биомассы на 2 части - делящиеся клетки (x^{div}) и стабильные клетки (x^{st}), в литературе называемые покоящимися, позволило дифференцировать и идентифицировать для описания процессов синтеза продуктов и потребления субстратов различающиеся скорости потребления и синтезов для делящихся и для стабильных клеток. Поскольку в процессе роста состав популяции изменяется, соответственно колеблется и эффективность биосинтеза продуктов вторичного обмена. Для этого разработаны методы оценки состава популяции и, даже, поддержания его на оптимальном уровне, позволяющем добиться максимальной эффективности биосинтеза. Методы определения параметров роста биомассы и ее фракций, а также констант синтеза и разрушения продуктов синтеза и потребления субстратов показаны нами в ранее представленных работах.

Что касается генно-инженерных штаммов, то разделение клеток на 2 типа - стабильные (неделяющиеся, нулевого возраста) и делящиеся, которые существенно различаются по свойствам, в том числе, - по синтезу продуктов, позволяет утверждать, что чувствительность таких культур к индуктору, способность к экспрессии чужеродного гена, сохранение плазмид и, в конечном итоге, биосинтез целевого продукта, существенно зависят от структуры клеточной популяции, которая в нашей модели выражается через показатель соотношения концентрации покоящихся неделяющихся клеток, называемых нами ста-

бильными, к общей концентрации клеток. Согласно разработанной теории делящиеся и стабильные клетки противоположным образом оказывают влияние на динамику любого продукта, синтезируемого биомассой любого микроорганизма. Как правило, продукт синтезируется делящимися клетками, а клетками, находящимися в нулевом возрасте (покоящиеся), разрушается, т.к. может использоваться и как дополнительный источник углерода и энергии, и как дополнительный источник азота. Минимизация этого негативного процесса разрушения стабильными клетками является, в конечном счёте, целью любой оптимизации по нашему методу. Динамика изменения структуры популяции R может быть рассчитана для любого момента времени по динамике изменения биомассы продуцента во времени. Изменение динамики биосинтеза от времени и сопоставление её с изменением динамики структуры популяции продуцента всегда даёт ответ на вопрос - каков вклад каждой из субкомпонентов популяции - делящихся и стабильных клеток - на синтез полезного продукта P . Далее изыскиваются способы преодоления или минимизации негативного вклада.

Метод, разработанный для простых процессов, в полной мере применим и для сложных. В основу легло вышеупомянутое представление о разделении всех популяций на две принципиально значимые части - делящиеся и неделяющиеся (стабильные) клетки. Впервые авторами патента выведены три принципа, позволившие развить теорию и являющиеся ее основными положениями:

1) В любой популяции, развивающейся под отрицательным давлением какого-либо фактора, ускорение изменения общего числа особей этой популяции или общего числа закончивших поступательное развитие форм прямо пропорционально скоростям соответствующих изменений, а коэффициент пропорциональности равен абсолютной величине A_{DK} .

2) В любой популяции, развивающейся под отрицательным давлением какого-либо фактора, ускорения изменений для общего числа особей и форм, закончивших поступательное развитие, разнонаправлены, т.е. скорости процессов обратно пропорциональны.

3) Абсолютная скорость потребления или синтеза любого вещества популяцией складывается из слагаемых, вносимых делящимися и неделяющимися клетками, причем каждое из слагаемых есть произведение соответствующей удельной скорости потребления (синтеза) на концентрацию соответствующей компоненты популяции.

Используя три этих правила, можно получить любые необходимые уравнения и параметры для анализа и планирования любых процессов биосинтеза и биоутилизации.

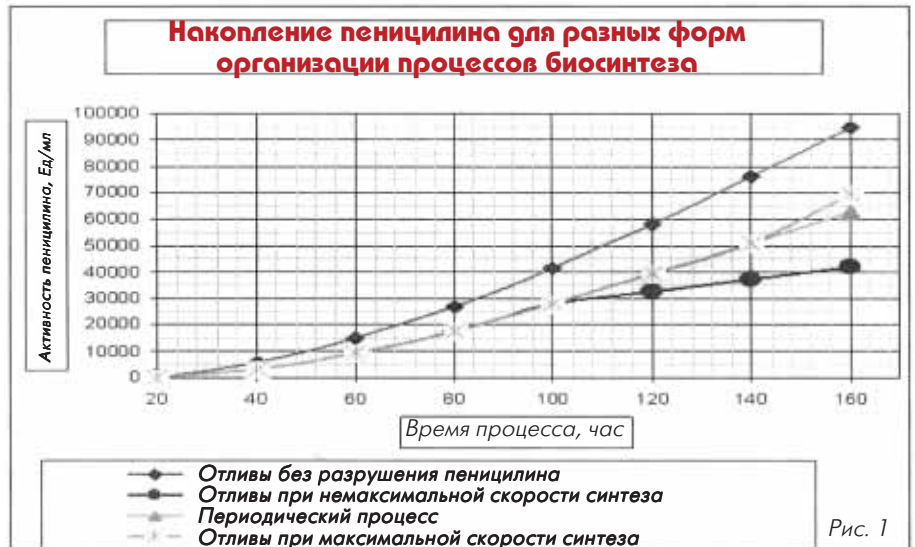


Рис. 1

Модель построена на 2-х главных уравнениях:

$$Q = -dS/d\tau = adX/d\tau + mX \quad (1)$$

именуемое в литературе уравнением Перта;

и $dP(\text{или } S)/d\tau = k^{div}X^{div} + k^{st}X^{st} \quad (2)$, отражающее различные влияния на потребление субстратов и биосинтез продуктов разных групп клеток.

Важнейший параметр, который лежит в основе математических расчетов является параметр равный отношению энергии поддержания (m) к затратам на собственный рост (a), т.е. $A = m/a$, где m - удельный коэффициент затрат энергии на поддержание жизнедеятельности клеток; a - удельный коэффициент затрат энергии на направленной на рост клеток и который является показателем:

- распределения энергетических потоков в клетках,
- замедления скорости роста,
- удельной скорости увеличения концентрации стабильных (неделяющихся) форм клеток, отражающим разделение популяции на две категории клеток - делящиеся и стабильные.

Ниже приведены различные примеры, подтверждающие правильность инновационной теории.

1. Биосинтез антибиотиков пенициллина и грамицидина (Рис. 1, 2).

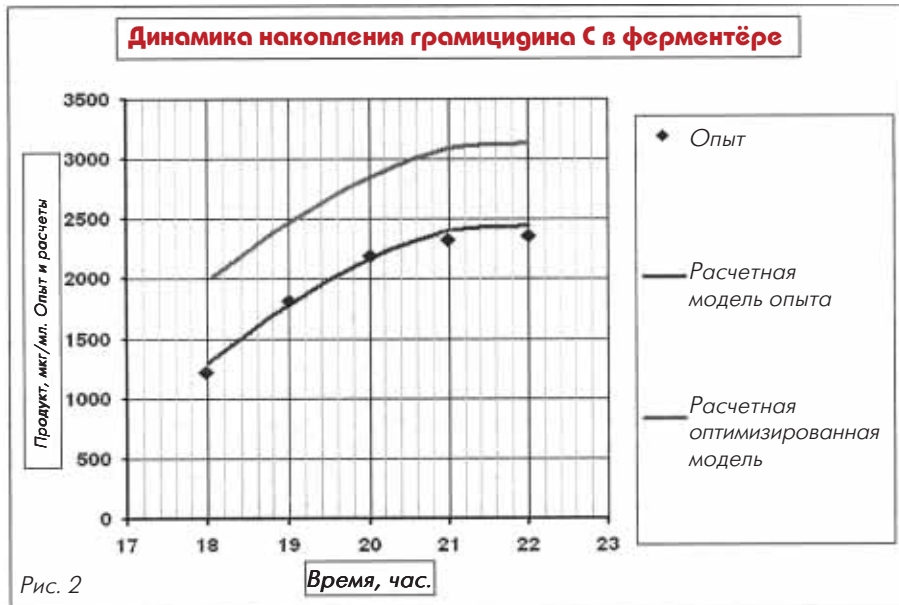
2. Биосинтез рекомбинантным штаммом *E. coli*, шт. BL-21 (DE3) [pProPlnHis₆] металлопротеиназы (Рис.3).

Основная цель данных работ заключалась в создании и отработке таких условий культивирования, которые бы позволили минимизировать и, даже, свести к нулю негативное воздействие группы покоящихся клеток в популяции на биосинтез требуемого продукта. Эта цель достигалась созданием сбалансированных условий для роста продуцентов и биосинтеза ими продуктов. Это приводило к закономерному изменению возрастной структуры популяции таким образом, что негативное воздействие клеток нулевого возраста на уровень накопления продуктов минимизировано с

одной стороны, а возможность реализовать свои биосинтетические способности была дана практически всем 100% делящихся клеток - с другой стороны.

На Рис.1 представлены кривые концентрации пенициллина, рассчитанные по значениям показателей энергопопуляционной модели, полученным в результате наших исследований. Были спрогнозированы разные режимы формы организации синтеза пенициллина во время культивирования: периодический процесс (желтый), отливы при неоптимальной скорости синтеза (красный) и отливы при максимальной скорости синтеза (светло-зеленый). Во всех этих случаях пенициллин не только синтезировался, но и частично разрушался. Четвертый случай - отливы при максимальном синтезе без разрушения продукта (темно-зеленый). Эффективность процесса неодинакова и зависит от его продолжительности. Однако, даже при разрушении частично продукта, организация оптимального технологического режима культивирования позволяет в 1,5-2,0 раза увеличить выход пенициллина по сравнению с другими процессами. В ранее проведенных работах мы показали возможность значительного повышения синтеза микробных продуктов при недостатке некоторых факторов питания. Исследования биосинтеза пенициллина также позволяют предполагать возможность снижения скорости деградации пенициллина при лимите по некоторым факторам. Поэтому мы считаем возможным синтез без разрушения пенициллина, что позволит дополнительно увеличить выход продукта на 30-40%. Таким образом, использование энергопопуляционной модели для управления биосинтезом продуктов позволяет значительно увеличить их выход.

На Рис.2 показаны кривые изменения содержания антибиотика грамицидин С, синтезируемого бактерией *Bacillus brevis*. Синие точки соответствуют значениям антибиотика, полу-



чаемым по технологии, взятой за базовый контрольный уровень. На основании этого была рассчитана модель, описывающая динамику процесса (красная линия). Анализ по расчетной модели показал, что данные процессы имеют достаточно большие скорости разрушения грамицидина С клетками нулевого возраста. Был рассчитан прогноз получения антибиотика, если данное разрушение удастся предотвратить (Рис.2- зеленая линия).

В дальнейшем, на основании этого прогноза и в соответствии с техническим заданием от заказчика, была разработана полупромышленная технология биосинтеза грамицидина С, которая позволяла **стабильно** получать концентрации антибиотика в диапазоне 3-4 г/л, то есть в 1,5-2 раза выше базой технологии. Максимальная удельная скорость биосинтеза q_{\max} продукта при этом возросла в 4 раза с 25-30 (мг грамицидина С/

л*час) до 40-60 (мг грамицидина С/л*час).

Результаты экспериментов с рекомбинантным штаммом представлены на рис.3, где показаны активности ферментов для трёх опытов - «контроль 1» (красные точки и линия), «контроль 2» (жёлтые точки и линия) и «эксперимент» (синие точки и линия), проведённого по предлагаемой методологии с учётом характеристик первых двух.

Отмеченная серым областью в центре рис.3, представляет собой математическое ожидание активности для «эксперимент» проведённого при повышенной массопередаче кислорода и скорректированном содержании питательных веществ.

Также здесь изображены данные активностей фермента, полученные ранее в контрольных процессах «контроль 1» и «контроль 2» с пониженными значениями массопередачи кислорода и пониженным содержанием

питательных веществ, послужившие основой для моделирования процесса «эксперимент».

Как видно из рисунка, данные для «эксперимент» удовлетворительно вписываются в область ожидания активности, предсказываемую прогнозом.

В процессе «эксперимент» была предпринята успешная попытка предотвратить нежелательную деградацию белка за счет использования инновационного технологического решения ведения процесса культивирования. При этом, константу деградации продукта удалось снизить примерно в 4 раза, что, соответственно, привело к увеличению содержания целевого белка в 4 раза.

Таким образом, доказана на практике энергопопуляционная теория роста микроорганизмов с моделью структурирования популяций, что может служить основой для разработки инновационных технологий и моделей управления процессами биосинтеза, которые существенно увеличивают продуктивность (от нескольких десятков процентов до нескольких раз), снижают себестоимость производства субстанций и позволяют не только возобновить микробиологический синтез в Российской Федерации, но с ее помощью разработать инновационные технологии получения новых высокоэффективных субстанций.

Область применения

Наши разработки универсальны и могут быть использованы в следующих сферах:

- производство антибиотиков, стероидов, органических кислот, спиртов, полисахаридов и других продуктов микробного синтеза и трансформации;
- увеличение выхода и выживаемости микробных клеток в вакцинах, пробиотиках (бифидо- и лактобактерии), дрожжах, экологических препаратах и средствах защиты растений;
- получение высоко-активных инсектицидных препаратов;
- оценка ростовых свойств питательных сред и сложнорганоческих субстратов, в том числе и исходного сырья, для их приготовления и стандартизации.

Для реализации и внедрения технологии в производство отсутствуют научно-исследовательские и инженерные проблемы, т.к. с одной стороны уже разработана теоретическая база, которую как показали исследования и проверки, можно применять на самых различных объектах, с другой стороны - имеющееся на рынке технологическое оборудование, средства контроля и управления позволяют уже сейчас внедрять разработку в производство.

