

ЛЕКЦИЯ № 2

БИООбЪЕКТЫ КАК СРЕДСТВО ПРОИЗВОДСТВА АНТИБИОТИКОВ

Для студентов, обучающихся по направлению подготовки «Биология»
(профиль «Биохимия») при изучении дисциплины «Биотехнология в производстве антибиотиков»

ПЛАН ЛЕКЦИИ

1. Способы получения антибиотиков
2. Значение антибиотиков для их продуцентов
3. Продуценты антибиотиков
4. Этапы выделения продуцентов антибиотиков
5. Поиск продуцентов антибиотиков, обитающих в экзотических условиях
6. Методы идентификации микроорганизмов — продуцентов антибиотиков
7. Методы выделения и очистки антибиотиков как целевых биотехнологических продуктов
8. Пути повышения антибиотикообразующей способности микроорганизмов

ПОЛУЧЕНИЕ АНТИБИОТИКОВ

- **Биологический синтез.** Данным способом получают природные антибиотики, представляющие собой натуральные продукты ферментации, когда в оптимальных условиях культивируют микроорганизмы - продуценты, синтезирующие антибиотики в процессе своей жизнедеятельности.
- Биосинтез с последующими химическими модификациями. Таким путем создают полусинтетические антибиотики. При этом вначале путем биосинтеза получают природный антибиотик, а затем его исходную структуру видоизменяют путем химических модификаций, например, присоединяют определенные радикалы, в результате чего улучшаются противомикробные и фармакологические характеристики лекарственного препарата.
- В основном модификация антибиотиков направлена на:
 - - расширение спектра их действия и повышение терапевтической эффективности;
 - - снижение их токсичности и устранение нежелательных побочных эффектов;
 - - создание аналогов, устойчивых к разрушению микроорганизмами и обладающих, в этой связи, большим временем «полужизни»;
 - - усовершенствование способов их введения в организм больного.
- **Химический синтез.** Данным методом получают синтетические аналоги природных антибиотиков, например, хлорамфеникол/ левомецетин.

ЗНАЧЕНИЕ АНТИБИОТИКОВ ДЛЯ ИХ ПРОДУЦЕНТОВ

- Одни исследователи считают, что биосинтез антибиотика обеспечивает определенные преимущества их продуцентам в борьбе за существование в природных популяциях. Многие из них представляют собой своеобразное химическое «оружие» клетки. Кроме того, антибиотики могут участвовать в процессах детоксикации токсичных метаболитов, контролировать некоторые стороны обмена веществ и процессы развития в целом (дифференцировка клеток и др.), служить запасными питательными веществами.
- Некоторые исследователи рассматривают антибиотики в качестве «случайных» веществ, обладающих полезными свойствами. Согласно, другой точки зрения, антибиотики представляют собой «отбросы» обмена веществ микроорганизмов, не имеющие приспособительного значения.
- Кроме того, ряд ученых полагают, что антибиотики являются реликтовыми молекулами, вытесненными в ходе эволюции продуктами рибосомального синтеза. Однако, не утратившими способность вмешиваться в биохимические процессы.

ПРОДУЦЕНТЫ АНТИБИОТИКОВ

- Симбиоз - эти взаимоотношения носят характер взаимной помощи, т.е. образующиеся в процессе жизнедеятельности одних существ химические вещества используются другими, чем и обуславливается их существование
- Антибиоз - антагонистические взаимоотношения, выражающиеся в подавлении одного вида микроорганизмов другим:
- в виде угнетения одних видов микроорганизмов продуктами жизнедеятельности других;
- в виде борьбы за кислород и питательные вещества и др.

- Основными продуцентами антибиотиков являются актиномицеты, плесневые грибы, бактерии, главным местом обитания которых является почва.
- Среди актиномицетов наибольший вклад в продукцию антибиотиков вносит род *Streptomyces*, один из видов которого *Streptomyces griseus* синтезирует более 50 антибиотиков.
- пенициллин образуют некоторые штаммы *Penicillium notatum* и *Penicillium chrysogenum*, а стрептомицин - определенный штамм *Streptomyces griseus*
- *Pseudomonas aeruginosa* образует пиоцианазу, пиоцианин, пиолипоевую кислоту и другие пиосоединения; *Bacillus brevis* производит грамицидин и тироцидин (смесь, известную под названием тиротрицин); *P. notatum* - пенициллин и пенатин; *Aspergillus flavus* - пенициллин и аспергилловую кислоту; *Aspergillus fumigatus* - фумигатин, спинулозин, фумигацин (гельволевую кислоту) и глиотоксин; *Streptomyces griseus* - стрептомицин, маннозидострептомицин, циклогексимид и стрептоцин; *Streptomyces rimosus* - окситетрациклин и римоцидин; *Streptomyces aureofaciens* - хлортетрациклин и тетрациклин.

- Неспорообразующие бактерии. Из группы бактерий, ранее называемых *Bacillus pycnosaneus*, а позднее известных, как *Pseudomonas aeruginosa*, выделены в конце XIX в. Р. Эммерихом и О. Лоу пиоцианин и пиоцианаза. Другие не образующие спор бактерии также вырабатывают антибиотики, сильно отличающиеся по своей химической структуре и антибактериальным свойствам. Примером могут служить колицины, синтезируемые разными штаммами кишечной палочки.
- Спорообразующие бактерии. Многие виды спорообразующих бактерий вырабатывают антибиотики. В частности, штаммы *Bacillus subtilis* производят бацитрацин, субтилин и др.; *B. brevis* - тиротрицин, *B. polymixa* (*B. aerosporus*) - полимиксин (аэроспорин). Спорогенные бациллы, в основном продуцируют полипептидные антибиотики определенного класса. Кроме того, с помощью *B. mycooides*, *B. mesentericus* и *B. simplex* получены разнообразные, но еще недостаточно изученные соединения - бациллин, колистатин и др., препятствующие росту микроскопических грибов.

АКТИНОМИЦЕТЫ.

- а) аминогликозиды - стрептомицин (*Streptomyces griseus*), неомицины (*Str. fradiae*, *Str. albogriseolus*), канамицины (*Str. kanamyceticus*), гентамицины (*Micromonospora purpurea*) и др.;
- б) тетрациклины - хлортетрациклин (*Str. aureofaciens*), окситетрациклин (*Str. rimosus*);
- в) актиномицины - большая группа близких по строению лекарственных препаратов, синтезируемых различными микроорганизмами, в том числе *Str. antibioticus*, *Str. chrysomallus*, *Str. flavus*;
- г) макролиды - эритромицин (*Str. erythreus*), олеандомицин (*Str. antibioticus*), магнамицин (*Str. halstedii*), филипин (*Str. filipensis*);
- д) анзамицины - стрептоварицины (*Str. spectabilis*), рифамицины (*Nocardia mediterranea*), галамицины (*Micromonospora halophytica*), нафтамицин (*Str. collinus*) и др.

- Микроскопические грибки являются одним из наиболее важных продуцентов антибиотиков (около 1200). Так, они вырабатывают цефалоспорин (*Cephalosporium acremonium*), фузалгин (*Aspergillus fumigatus*), гризеофульвин (*Penicillium nigricans*, *P. griseofulvum*), трихоцетин (*Trichothecium roseum*), микофеноловую кислоту, пенициллиновую кислоту, глиотоксин, клавацин, аспергилловую кислоту и др.
- Водоросли. Многие водоросли способны вырабатывать вещества, обладающие антибиотическими свойствами. Однако, в настоящее время пока ни одно из них не нашло клинического применения.
- Лишайники. К антибиотикам, вырабатываемым лишайниками, относятся лихенин и усниновая кислота.
- Высшие растения. Высшие зеленые растения также синтезируют антибактериальные вещества, сходные по своим свойствам с истинными антибиотиками. К ним относятся фитонциды - аллицин, томатын и др.
- Животные. Среди продуктов животного происхождения, обладающих антибактериальными свойствами, важное место занимает лизоцим. Многие простейшие, личинки насекомых и некоторые другие животные могут переваривать живые бактерии и микроскопические грибки. Однако, до конца не ясно, в какой степени данная способность связана с выработкой веществ, обладающих антибиотическими свойствами.

ЭТАПЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ПРОДУЦЕНТОВ АНТИБИОТИКОВ

- выделение микроорганизмов-антагонистов из почвы;
- определение антагонистического спектра и активности антибиотиков;
- подбор условий культивирования продуцентов антибиотиков;
- выделение и химическая очистка антибиотиков;
- изучение физико-химических и фармакологических свойств антибиотиков;
- испытание терапевтической эффективности антибиотиков;
- идентификация антибиотиков.

ПОИСК ПРОДУЦЕНТОВ АНТИБИОТИКОВ

- поиск продуцентов уже известных, описанных в литературе и использующихся на практике антибиотиков;
- поиски новых антибиотиков, способных проявлять биологическое действие по отношению к конкретным организмам;
- обнаружение продуцентов антибиотиков, подавляющих в клетке определенную мишень
- *Каждую чистую культуру микроорганизма пересевают на различные по составу среды.*

ВЫСЕВ ПОЧВЫ НА ПИТАТЕЛЬНЫЙ АГАР, ПРЕДВАРИТЕЛЬНО ЗАСЕЯННЫЙ ТЕСТ- ОРГАНИЗМОМ.

- Поверхность питательного агара засевают тест-культурой необходимого организма, после чего на агаровую пластинку помещают небольшие (не более просяного зерна) комочки почвы или почву наносят в виде пыли, распределяя ее по всей поверхности пластинки. Затем чашки помещают в термостат и через определенный промежуток времени (24-48 ч) просматривают кусочки почвы или отдельные ее участки, вокруг которых образовались зоны задержки роста тест-организма. Из этих участков выделяют чистые культуры организмов и их изучают.
- Модифицированный вариант этого метода заключается в том, что на чашки Петри с мясопептонным агаром, предварительно засеянным тест-организмом, микробиологической петлей наносят отдельными каплями взвесь почвы. На каждую чашку наносят 10-20 капель, которые, подсыхая, оставляют после себя изолированные комочки почвы. Через 1-2 сут. инкубации чашек в термостате при температуре 26-35 °С комочки почвы обрастают колониями и вокруг некоторых из них обнаруживаются зоны задержки роста тест-организма. Комочки, окруженные зонами, засевают на чашки с агаром, и после того, как вырастут отдельные колонии, их отсевают для получения чистых культур.

МЕТОД ОБОГАЩЕНИЯ ПОЧВЫ

- почву, из которой предполагают выделить антагонисты, обогащают микроорганизмами тех видов, по отношению к которым хотят получить антагонист. С этой целью к образцам почвы, помещенным в стеклянные сосуды, систематически добавляют отмытую суспензию целевых микроорганизмов. Затем через определенные промежутки времени такая почва высевается в виде отдельных комочков на агаровые пластинки в чашках Петри, предварительно засеянные тем же самым организмом, который использовался для обогащения почвы

МЕТОД ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЯ ПОЧВЕННОЙ СУСПЕНЗИИ.

- Для выделения стрептомицетов из почв, особенно из почв в весеннее время, когда в ней развивается наибольшее число микроскопических грибов и бактерий, применяют метод центрифугирования почвенной взвеси, основанный на различии скоростей оседания отдельных видов микроорганизмов в центробежном поле. При 3000 об/мин. в течение 20 мин. частицы, соответствующие по размерам спорам плесеней или клеткам бактерий, осаждаются на дно пробирки. Частицы, соответствующие по размерам спорам или отдельным обрывкам мицелия стрептомицетов, при данной скорости центрифугирования оказываются в поверхностном слое жидкости.
- Высеваемая надосадочную жидкость, в большинстве случаев (до 92%) на пластинках питательного агара удается получить только колонии актиномицетов.

МЕТОД ЗАМОРАЖИВАНИЯ - ОТТАИВАНИЯ ПОЧВЫ.

- В почве микроорганизмы адсорбированы на частицах. Для обеспечения полноты десорбции микроорганизмов с почвенных частиц применяют химические методы, при которых почвенные образцы обрабатывают разными детергентами, а также физические методы, основанных на механическом растирании образцов почвы. Для лучшей десорбции микроорганизмов с почвенных частиц рекомендуется использовать метод замораживания - оттаивания почвы, заключающегося в том, что образец почвы, отобранный для выделения стрептомицетов, помещают в испаритель холодильника при температуре -8°C . Через 1 ч образец извлекают из холодильника и выдерживают при комнатной температуре до полного оттаивания. Процедуру замораживания - оттаивания повторяют 2 раза. Затем навеску почвы помещают в стерильную водопроводную воду, взбалтывают суспензию в течение 15 мин. на круговой качалке при 230 об/мин., после чего разные разведения суспензии высевают на питательную агаровую пластинку в чашках Петри. Метод замораживания - оттаивания образцов почвы позволяет обнаружить в них в 1,2-3,6 раза больше стрептомицетов, чем в этих же образцах без замораживания.

ОБРАБОТКА ПОЧВЕННОГО ОБРАЗЦА КАРБОНАТОМ КАЛЬЦИЯ.

- Увеличение числа выделенных культур стрептомицетов (примерно на два порядка) наблюдается при обработке почвенного образца карбонатом кальция и при его инкубировании во влажных условиях. Впервые метод был предложен П. Тсао с соавт. в 1960 г., а в 1988 г. он был модифицирован И.В. Алферовой и Л.П. Тереховой. Образец почвы смешивают с порошком карбоната кальция в соотношении 10:1 и инкубируют во влажной камере при температуре 28 °С. Влажность обеспечивается путем помещения в чашки Петри кусочков фильтровальной бумаги, пропитанных очищенной водой и прикрепленных к крышке чашки. Увеличение общего числа выделяемых актиномицетов из таких образцов почвы, по-видимому, связано с тем, что ионы кальция инициируют прорастание спор стрептомицетов.

ПРИМЕНЕНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД, СОДЕРЖАЩИХ АНТИБИОТИКИ.

- Для выделения актиномицетов применяют среды, содержащие в своем составе такие антибиотики, как тетрациклины, неомицин, нистатин, стрептомицин, хлорамфеникол, пенициллин и др.
- При выделении продуцентов новых антибиотиков используют среды, содержащие стрептомицин в концентрациях 25-100 мкг/мл и рубомицин - 5-20 мкг/мл. В случае добавления к среде стрептомицина подавляется рост наиболее часто встречающихся видов *S. griseovariabilis*, *S. flavochromogenes*, *S. griseolis*, *S. aureofaciens*, *S. griseus* и др. и выделяются виды актиномицетов, которые не обнаруживались на той же среде без стрептомицина. С повышением концентрации стрептомицина в среде общее количество выделяемых стрептомицетов уменьшается, но при этом вырастают новые виды актиномицетов.
- Внесение в среду для посева почвенной суспензии рубомицина в значительной степени подавляет рост стрептомицетов и нокардия. Довольно устойчивы к этому антибиотику представители секций *Roseus*, *Helvolo-Flavus* и *Albus*. В данных условиях в большом количестве вырастают виды стрептомицетов, не образующие воздушный мицелий. Продуценты аминогликозидных антибиотиков могут быть обнаружены только среди стрептомицетов, устойчивых к их действию.

ОБРАБОТКА ПОЧВЕННОЙ СУСПЕНЗИИ УФ-СВЕТОМ

- О.А. Галатенко и Л.П. Терехова (1990) для выделения из почвы редких видов актиномицетов (*Mycromonospora*, *Nocardiosis*, *Amycolatopsis*) предложили метод предварительного облучения почвенной суспензии УФ светом. Почвенную водную суспензию, разведенную в зависимости от образца почвы в отношении 1:10², 1:10³, 1:10⁴, в количестве 0,05 мл наносят на поверхность агаровой пластинки в чашке Петри и облучают УФ светом с помощью бактерицидной лампы БУВ-15. Облучение проводят на расстоянии 20 см от источника света в течение 30 с - 2 мин. При такой обработке почвенной суспензии увеличивается развитие представителей редких родов, особенно микромоноспора.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СВЧ (ВОЛН СВЕРХВЫСОКОЙ ЧАСТОТЫ).

- образец почвы растирают в ступке, просеивают через сито и перемешивают. 1 г почвы суспендируют в 100 мл воды, встряхивают в течение 10 мин. и разводят 1:1000. В стерильные пробирки переносят по 2,5 мл суспензии и обрабатывают волнами СВЧ. Для этого можно использовать микроволновую печь с рабочей частотой 2640 МГц. Наилучший эффект наблюдается при режиме облучения суспензии мощностью 80 Вт в течение 30 с. При этих параметрах обработки суспензии СВЧ волнами споры актиномицетов проявляют наибольшую устойчивость.
- Облученную почвенную суспензию разводят очищенной водой в 10 раз и высевают на поверхность агаровой среды по 0,05 мл на чашку. При этом используют среды с леворином (в концентрации 20 мкг/мл для ингибирования роста грибов) и налидиксовой кислотой, т.е. нефторированным хинолоном (10 мкг/мл - для подавления роста эубактерий, обладающих стелющимся ростом) и без них. В данном случае наблюдается увеличение выделения форм редких родов актиномицетов.

ПОИСК ПРОДУЦЕНТОВ АНТИБИОТИКОВ, ОБИТАЮЩИХ В ЭКЗОТИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ

- Морские организмы. Родерих Зюссмут с сотр. из Тюбингенского университета в Германии в отложениях на дне Японского моря на глубине 289 м обнаружили бактерию *Verrucosi spora* из рода актиномицетов, которая синтезировала новый антибиотик, названный абиссомицином. Брэдли Мур, Уильям Феникал и их коллеги из Океанографического института Скриппса в Ла-Хое - секвенировала геномы двух до недавнего времени неизвестных штаммов актиномицетов и обнаружили в них наборы генов, связанных с синтезом антибиотиков.

- Организмы-симбионты. Симбиоз ведет к строгой специализации партнеров, проявляющейся, том числе и в синтезе ими необычных веществ. Организмы, способные синтезировать антибиотики, можно обнаружить и среди симбионтов, получающих взаимную выгоду от длительного сожительства. Так, жук лубоед сосновый южный служит организмом-хозяином для одного из грибов, который не только помогает насекомому переваривать древесную массу, но и защищает от других грибов. Камерон Карри, Джон Кларди и их коллеги из Висконсинского университета в Мадисоне и Гарвардской медицинской школы обнаружили, что у данного жука есть еще один симбионт - бактерия из рода актиномицетов, которая синтезирует ранее неизвестное противогрибковое вещество, - микангимицин. Оно уничтожает грибы - конкуренты симбионта.

- Невзаимодействующие продуценты.
Некоторые бактерии выступают в качестве мощных продуцентов новых антибиотиков, но не растут в лабораторных условиях. Так, Stigmatella aurantiaca синтезирует антибиотикоподобное вещество миксохромид, но, как и другие представители группы миксобактерий, плохо растет в культуре. Перенеся соответствующие гены в более неприхотливого продуцента, можно с его помощью получать новое ценное вещество.

МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ-ПРОДУЦЕНТОВ АНТИБИОТИКОВ

- Определенную помощь при идентификации стрептомицетов - продуцентов антибиотиков, принадлежащих к одной группе, оказывает метод, основанный на специфическом действии микроорганизмов-антагонистов. Эта специфика состоит в том, что продуценты стрептомицина, выделенные в разных районах земного шара, не подавляют развитие друг друга. Такая закономерность характерна и для других видов стрептомицетов. Исходя из этого для идентификации внешне сходных культур стрептомицетов предложено применять метод перекрестного антагонизма, сущность которого состоит в том, что агаровые блочки с одним видом выращенного стрептомицета помещают на поверхность агаровой пластинки, засеянной другим видом стрептомицета. В качестве тест-культуры наряду с другими используют тот же штамм. При этом обнаруживается, что один вид стрептомицета-антагониста может подавлять рост других видов и не подавляет развитие своего вида.

- Использование организмов, устойчивых к определенному антибиотику. В основу этого метода положены два основных признака, связанных с образованием и действием антибиотиков. Каждый антибиотик вырабатывается одним или несколькими видами микроорганизмов. Микроорганизмы, устойчивые к одному антибиотику, устойчивы и к антибиотическим веществам, близким к нему по химическому строению и биологическим свойствам. Вместе с тем, они могут быть чувствительны к антибиотикам другой химической природы и, следовательно, обладать другим биологическим действием.
- Антибиотик, образуемый неизвестным организмом, может быть определен путем испытания его биологического действия на ряд микроорганизмов, чувствительных и устойчивых к известным антибиотикам. Таким путем можно выяснить сходство или различие биологического действия изучаемого вещества и известных антибиотиков и, тем самым, решить вопрос об их химическом сходстве или различии.
- Для исследования данного явления изучаемый микроорганизм высевают на поверхность питательного агара в виде штриха или в виде отдельной макроколонии в центре чашки Петри. Вырабатываемый микроорганизмом антибиотик диффундирует в окружающий агар и создает определенную зону. Пересекая эту зону чувствительными и устойчивыми к определенному антибиотику микроорганизмами, выясняют сходство биологического действия изучаемого лекарственного препарата с известным антибиотиком.

- Метод хроматографии. Для идентификации антибиотиков и их продуцентов применяют метод хроматографии, открытый русским ученым М.С. Цветом в 1903 г. В настоящее время этот метод очень широко используют в лабораторной практике. Этот метод особенно важен при идентификации антибиотиков на ранних стадиях исследования. Иногда метод хроматографии необходимо дополнить результатами методов электрофореза, позволяющими выяснить ионный характер антибиотика.

- Метод бумажной хроматографии антибиотиков состоит в том, что на полоски хроматографической бумаги длиной 20-30 см и шириной 1 см наносят испытуемый антибиотик. Подсушенные на воздухе полоски с антибиотиком помещают в хроматографический бак или цилиндр с соответствующим растворителем на 10-20 ч. Время выбирают в зависимости от скорости прохождения растворителя и высоты сосуда для хроматографии.
- Для обнаружения антибиотиков на хроматограммах применяют биологические, химические и физические методы.
- Наиболее распространенным методом обнаружения антибиотиков на хроматограммах является биоавтографический метод. В данном случае высушенные в вытяжном шкафу полоски бумаги накладывают на агаровую пластинку, засеянную культурой тест-организма, чувствительной к изучаемому антибиотику. Кюветы с полосками бумаги помещают в термостат на 18-20 ч при температуре, оптимальной для роста тест-организма. По зонам отсутствия роста тест-культуры, образующимся вокруг тех мест на хроматограмме, где находится пятно антибиотика, судят об однородности антибиотика, а также сравнивают полученные хроматограммы с хроматограммами известных антибиотиков.
- Химические методы обнаружения антибиотиков на хроматограммах основаны на реакциях, в результате которых образуются соединения, выявляемые по соответствующей окраске или обесцвечиванию реактива в месте расположения пятна антибиотика. Физические методы обнаружения антибиотиков включают способы, связанные: с выявлением люминесценции антибиотического пятна при воздействии УФ излучения; с поглощением УФ излучения и с определением радиоактивной метки антибиотика.
- Для целей бумажной хроматографии антибиотиков с успехом используют и круговые хроматограммы.

- Важное значение при оценке результатов хроматографии имеет положение пятен исследуемых веществ, характеризующееся коэффициентом R_f , который определяется отношением расстояния, которое проходит пятно изучаемого вещества от линии старта за определенное время, к расстоянию, пройденному фронтом растворителя от линии старта. Воспроизводимость значений R_f зависит от постоянства следующих факторов: качества бумаги, температуры, степени чистоты растворителей, состава газов атмосферы, в которую помещена бумага, однотипности процедур и аппаратуры.
- Хроматографический спектр представляет собой ломаную линию, характеризующую подвижность антибиотика при хроматографировании с использованием определенного набора систем растворителей. По спектру значений или хроматографическому спектру, можно различать группы химически родственных антибиотиков и до некоторой степени отличать антибиотики внутри групп.
- При этом сущность схемы хроматографической идентификации антибиотиков из культур на стадии культуральных жидкостей состоит в следующем. Культуральную жидкость с антибиотическими свойствами фильтруют и измеряют значение pH. Точно взятый объем фильтрата подвергают лиофильной сушке, затем лиофилизат взвешивают и разделяют на две части, одну из которых растворяют в воде, а другую экстрагируют безводным этанолом при встряхивании в течение 1 ч. Растворители берут в количестве, которое позволяет получить 5-10-кратные концентрации по сравнению с исходной культуральной жидкостью. Антибиотическую активность водного раствора и спиртового экстракта определяют методом бумажных дисков.

- Антибиотики, относящиеся к группе макролидов, наиболее детально идентифицируются с помощью нисходящей хроматографии в системах типа Заффарони: бензолформамаид и хлороформформамаид. В случае, если антибиотик принадлежит к другим группам соединений, то используют групповые системы.

МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ АНТИБИОТИКОВ

- К основным методами выделения антибиотиков из нативных растворов (культуральная жидкость, освобожденная от биомассы продуцента) относятся: осаждение антибиотика, экстракция органическими растворителями, сорбционные методы с использованием поверхностно-активных веществ (активированный уголь, активированный оксид алюминия и др.) или ионообменных материалов (ионообменные смолы). При использовании сорбционных методов выделения антибиотиков наиболее проблематичной является десорбция (элюирование) лекарственного препарата. Выделение антибиотика из клеток продуцента осуществляют методом экстракции.
- Антибиотик, выделенный одним из указанных способов, представляет собой лишь технически чистый препарат, который не может быть использован в медицинской практике. Дальнейшая его очистка осуществляется путем повторной сорбции, перекристаллизации, растворения антибиотика в органических растворителях или иными методами.

ПУТИ ПОВЫШЕНИЯ АНТИБИОТИКООБРАЗУЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ

- Перед наукой была поставлена задача разработать пути повышения биосинтеза клинически ценных антибиотиков. При решении этой задачи необходимо применять 3 взаимосвязанных метода:
- естественной изменчивости;
- индуцированного мутагенеза и ступенчатого отбора наиболее активных форм продуцентов антибиотиков;
- генно-инженерных манипуляций

- Важным этапом подготовки продуцента к биосинтезу антибиотика является подготовка посевного материала, т.к от его количества и качества зависит как развитие микроорганизма в ферментере, так и биосинтез антибиотика. Продуцент антибиотика обычно выращивают на богатых по составу натуральных средах, способных обеспечить наивысшую физиологическую активность микроорганизмов. Подготовка посевного материала является многоступенчатым процессом.
- В данном случае микроорганизм предварительно выращивают на агаризованной среде в пробирке. Затем из пробирки делают высеv в колбы с жидкой средой и проводят две генерации при глубинном выращивании на качалках в течение 2-3 сут. для каждой генерации. Из второй генерации культуры в колбе делают посев в небольшой инокулятор, после чего хорошо развившуюся культуру переносят в более крупный инокулятор (100-500 л), откуда и делают посев в основной ферментер. Для посева в ферментер используют 5-10 об.% посевного материала (инокулята). Однако, при получении пенициллина споровый материал гриба, приготовленный на отрубях, рисовых зернах или пшене, засевают в инокулятор сразу.

БИОСИНТЕЗ АНТИБИОТИКА В ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ УСЛОВИЯХ

- Периодическое культивирование. При этом способе весь процесс развития микроорганизмов полностью завершается в одном ферментере, после чего ферментер освобождается от культуральной жидкости, промывается, стерилизуется и вновь заполняется свежей средой. Среда засеивается изучаемым микроорганизмом, и процесс возобновляется.
- Отъемный метод. Культивирование микроорганизмов осуществляется в ферментерах с периодическим отбором части культуральной жидкости (30-60 % общего объема). При этом объем культуральной жидкости в ферментере доводится свежей средой до исходного уровня.
- Батарейный способ. Микроорганизмы развиваются в батарее ферментеров. Культуральная жидкость на определенной стадии развития микроорганизма перекачивается из первого ферментера во второй, затем из второго – в третий и т.д. Освобожденный ферментер немедленно заполняется свежей средой, засеянной микроорганизмом. При этом способе выращивания микроорганизмов емкости используются более рационально.
- Непрерывное культивирование. Метод принципиально отличается от рассмотренных модификаций глубинного культивирования продуцентов антибиотиков. В основе данного метода лежит принцип непрерывного потока питательной среды, что позволяет поддерживать развитие микроорганизма на определенной стадии его роста. Стадия развития микроорганизма определяется тем, что в этот период происходит максимальный биосинтез антибиотика.

РАЗВИТИЕ ПРОДУЦЕНТА АНТИБИОТИКА В ФЕРМЕНТЕРАХ

- ⦿ большое внимание уделяют :
- ⦿ температуре культивирования
- ⦿ значению рН среды
- ⦿ степени аэрации
- ⦿ скорости работы мешалки
- ⦿ процессу пеногашения

ПЕНОГАШЕНИЕ

- При продувании воздуха через культуру продуцента образуется обильная пена, которая существенно нарушает ее развитие в ферментере. Появление большого количества пены обусловлено белковыми веществами, находящимися в среде, а также ее высокой вязкостью, что связано с интенсивным накоплением биомассы.
- Для борьбы с пенообразованием в ферментерах используют ПАВ: растительные масла (соевое, подсолнечное), животный жир (лярд, кашалотовый жир), в некоторых случаях минеральные масла (вазелиновое, парафиновое), спирты и высшие жирные кислоты. Нередко в качестве пеногасителей используют пеногасители (силиконы, diazobutancarbamyl и др.), полученные путем химического синтеза.
- Многие вещества (масла, жиры, спирты и др.), применяющиеся в качестве пеногасителей, потребляются продуцентами антибиотиков в качестве дополнительных источников углеродного питания. При этом часто наблюдается повышение выхода антибиотика. Однако, внесение пеногасителя может снижать скорость растворения кислорода, что, в свою очередь, отрицательно сказывается на развитии микроорганизма и его биосинтетической активности.
- В некоторых случаях используют механическое пеногашение: отсасывание пены через специальные трубы, разрушение пузырьков пены сильными струями жидкости, пара или газа и т.п.

ВЫДЕЛЕНИЕ АНТИБИОТИКОВ

- Выбор методов выделения антибиотиков зависит от их локализации. Так, если антибиотик находится в культуральной жидкости, его выделяют путем экстракции, используя для этого растворители, не смешивающиеся с жидкой фазой, осаждают в виде нерастворимого соединения или сорбируют ионообменными смолами. Из клеток микроорганизмов антибиотик выделяют с помощью экстракции органическими растворителями. В случае, если антибиотик содержится и в культуральной жидкости, и в клетках продуцента, то его сначала переводят в фазу, из которой наиболее целесообразно его изолировать. В частности, антибиотик, содержащийся в культуральной жидкости, и клетки с антибиотическим веществом переводят в осадок, из которого его экстрагируют.

ОЦЕНКА АНТИБИОТИКОВ

- После того, как выделения и очистки антибиотика, проводят оценку его биологической активности по отношению к ряду микроорганизмов, т.е. оценивают его антимикробный спектр
- Целью выяснения стерильности готового лекарственного препарата антибиотика является установление отсутствия в нем спор микроорганизмов, прежде всего, патогенных. Для этого необходимо, если, возможно, инактивировать антибиотик, а затем нанести его на разные по составу питательные среды (мясопептонный бульон, печеночный бульон, кровяной агар и т.п.)
- Токсичность антибиотика проверяют на опытных животных, которым в определенный период внутривенно, внутрибрюшинно, внутримышечно, подкожно или другими путями вводят его разные дозы. За такими животными ведут тщательное наблюдение. При отсутствии внешних изменений в поведении животных в течение 12-15 сут. считают, что антибиотик не обладает заметным токсическим действием