

ЛЕКЦИЯ № 7

БИОТЕХНОЛОГИЯ АНТИБИОТИКОВ

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

ПЛАН ЛЕКЦИИ

1. Биотехнология антибиотиков
2. Частная биотехнология антибиотиков
 - 2.1. Схема производства пенициллина
 - 2.2. Схема производства цефалоспорина
 - 2.3. Схема производства низинов
 - 2.4. Схема биотехнологического получения стрептомицина
 - 2.5. Схема биотехнологического производства грамицидина С
 - 2.6. Схема биотехнологического производства неомицина
 - 2.7. Схема биотехнологического производства тетрациклина
 - 2.8. Схема биотехнологического производства биомицина
 - 2.9. Схема биотехнологического производства бацитрацина
 - 2.10. Схема биотехнологического производства препаратов гризина
 - 2.11. Схема биотехнологического производства препаратов гигромицина В
 - 2.12. Схема биотехнологического производства фитобактериомицина
 - 2.13. Схема биотехнологического производства трихотецина

Общая биотехнологическая схема производства антибиотиков

- **подготовка питательной среды** - среда должна обеспечивать максимальное накопление клеток и биосинтез антибиотиков, содержать экономичные и доступные компоненты, обеспечивать экономичные приемы выделения и очистки целевого продукта, обладать хорошей фильтрующей способностью

Подготовка питательной среды

Стерильность.

- Развитие посторонней микрофлоры опасно во многих отношениях:
- Посторонняя микрофлора, развиваясь в питательной среде, ее видоизменяет и, тем самым, нарушает оптимальные условия биосинтеза, что уменьшает уровень накопления антибиотика.
- Наличие посторонней микрофлоры затрудняет дальнейшую обработку культуральной жидкости, ее отделение от мицелия и приводит к получению некачественного нативного раствора.
- Продукты жизнедеятельности посторонних микроорганизмов могут загрязнять получаемый антибиотик и снижать ее качество.

Подготовка питательной среды

- Условия биосинтеза антибиотиков заключаются в том, что в питательной среде должны присутствовать источники азота, углерода, фосфора, а также предшественники антибиотиков и витамины.
- К источникам азота относятся – аминокислоты, аммонийные соли и иногда нитраты; к источникам углерода – глюкоза и лактоза.
- Помимо этого, в питательной среде должны присутствовать такие элементы как сера, магний, марганец, железо, цинк, кобальт. Кроме того, при производстве антибиотиков в состав среды должны входить соевая мука, кукурузный экстракт и жмых масленичных культур.

Высокое содержание в среде фосфора (в виде неорганических фосфатных солей) неблагоприятно для биосинтеза большинства антибиотиков. Основная причина этого состоит в обогащении клетки макроэргическими соединениями (прежде всего, АТФ), что повышает скорость роста мицелия. Накапливается большое количество биомассы, и очень мало – антибиотика.

Подготовка питательной среды

- Значение рН. Для бактерий значение рН среды составляет приблизительно 7, для грибов – 4,5–5, для актиномицетов – 6,7–7,5.
Для большинства известных антибиотиков оптимальная величина рН близка к нейтральному значению. При значительном закислении или защелачивании среды процесс биосинтеза замедляется. Многие антибиотики в щелочных или кислых средах неустойчивы и легко инактивируются.
- Температура. В процессе ферментации вследствие интенсивно протекающих процессов выделяется большое количество тепла, поэтому для поддержания оптимальной температуры необходимо постоянное охлаждение среды.

Подготовка питательной среды

- Перемешивание и аэрация. В связи с тем, что продуценты антибиотиков являются аэробами, необходимо обеспечить хорошую аэрацию. Кислород необходим для биосинтеза ряда антибиотиков, т.к. он расходуется при замыкании β -лактамного и тиазолидинового колец во время биосинтеза β -лактамной структуры.

Во время ферментации происходит одновременно два процесса – растворение кислорода в среде и его потребление микроорганизмом.

При глубинном культивировании микроорганизмов в промышленных масштабах данный процесс осуществляется путем пропускания воздуха через питательную среду и культуральную жидкость с помощью специальных аэрирующих приспособлений – барботеров. При этом жидкость интенсивно перемешивается.

- Вспенивание. Аэрация и перемешивание среды вызывают образование слоя пены на поверхности жидкости, что ухудшает условия развития продуцента. В связи с интенсивным пенообразованием, сопровождающим процесс биосинтеза антибиотиков, в состав среды вводят пеногасители (растительные и животные жиры, минеральные масла), а также путем добавления поверхностно активных веществ (ПАВ), способствующих снижению стойкости пена и в дальнейшем ее разрушению.

Подготовка посевного материала

- продуценты-мутанты → колба на качалке → первый инокулятор (10 л) → второй инокулятор (100–500 л) → ферментер

Жизнедеятельность суперпродуцентов сохраняется в результате разных причин:

- максимум концентрации антибиотика достигается, когда рост культуры или завершается, или практически уже завершен;
- антибиотик синтезируется в местах клетки, отделенных от мест локализации жизненно важных метаболических процессов;
- после выхода антибиотика из мицелия в среду, вновь в мицелий он не проникает, т.е. транспорт антибиотика через оболочку продуцента имеет одностороннее направление.

Ферментация

- Современная ферментационная установка состоит из нескольких небольших емкостей ферментеров для инокуляции (получения посевного материала) и ферментера большого размера (от 1 л до 1000 м³) для проведения конечной стадии получения целевого продукта. Эти емкости соединены между собой с помощью фиксированных трубопроводов или гибких шлангов. В ферментерах часто используют механическое перемешивание.
- Температура, значение рН среды и ряд других параметров автоматически регулируются в соответствии с регламентом производства конкретного антибиотика. Процесс ферментации осуществляется в строго стерильной, глубинной, аэробной и периодической культуре, носит выраженный двухфазный характер.

Выделение антибиотиков

- Принцип экстракции органическим растворителем используется при очистке таких важнейших антибиотиков, как пенициллин, эритромицин и др. При переходе в органический растворитель соответствующие антибиотики освобождаются сразу от многих примесей. Варьируя значение pH и изменяя, таким путем растворимость антибиотика в воде (точнее, в буферном растворе), можно многократно его переводить из одной фазы в другую, освобождаясь каждый раз от определенного количества примесей.
- Цель всех процедур постферментационной стадии – получение стерильных лекарственных препаратов высокой степени чистоты.

Очистка антибиотиков

- Данная стадия технологического процесса включает в себя следующие этапы: осаждение, сорбция, сушка. При очистке антибиотиков широко используются ионообменные смолы.
- При обезвоживании лекарственных препаратов антибиотиков в зависимости от свойств антибиотика используют лиофильную или распылительную сушку. В последнем случае раствор антибиотика распыляется с помощью форсунок до частиц диаметром 5–25 мкм в токе нагретого 160 °С воздуха. Сушка происходит в течение долей секунды. Затем препарат фасуют в стерильные флаконы с соблюдением условий, гарантирующих стерильность.

Получение готового продукта (упаковка, фасовка).

- При радиационной стерилизации (в минимальных дозах) загрязняющие лекарственный препарат микроорганизмы теряют способность к размножению и гибнут вследствие повреждения ДНК.
- При термической стерилизации в отличие от радиационной происходит денатурация многих белков клетки, в результате чего ее повреждения становятся более многочисленными. При стерилизации с помощью мембранной фильтрации микробные клетки не погибают, а удаляются из лекарственного препарата.
- Готовый продукт подвергается биологическому и фармакологическому контролю.
- Биологический контроль определяет степень стерильности препарата, которая зависит от степени его чистоты, влажности, температуры, значения рН растворителя.
- В ходе фармакологического контроля проводят всесторонние испытания препарата на токсичность, пирогенность, токсикогенность и др., оценивают антимикробный спектр препарата, действие на лейкоциты крови, устанавливают максимально переносимую дозу антибиотика, дозы, вызывающие полную и 50 % гибель экспериментальных животных.

Схема производства пенициллина

Классификация пенициллинов:

- **I. Препараты пенициллинов, получаемые путем биологического синтеза (биосинтетические пенициллины)**
- *Для парентерального введения (разрушаются в кислой среде желудка)*
- а) непродолжительного действия (бензилпенициллина натриевая соль, бензилпенициллина калиевая соль);
- б) продолжительного действия (бензилпенициллина новокаиновая соль, бициллин-1, бициллин-5).
- *Для энтерального введения (кислотоустойчивы):*
феноксиметилпенициллин.
- **II. Полусинтетические пенициллины**
- *Для парентерального и энтерального введения (кислотоустойчивые)*
- а) устойчивые к действию пенициллиназы (оксациллина натриевая соль, нафциллин);
- б) широкого спектра действия (ампициллин, амоксициллин).
- *Для парентерального введения широкого спектра действия, включая синегнойную палочку (карбенициллина динатриевая соль, тикарциллин, азлоциллин).*
- *Для энтерального введения: карбенициллин инданил натрий, карфециллин.*

Схема производства пенициллина

Различные пенициллины (G, X, F, K и др.) отличаются строением радикала молекулы боковой цепи, активностью и спектром действия.

- Важные, с точки зрения клинического использования, представители пенициллинов можно разделить на несколько групп:
- - обладающие наивысшей активностью в отношении грамположительных микроорганизмов и слабой в отношении грамотрицательных видов, а также гидролизуемые β -лактамазами (пенициллин G);
- - относительно резистентные к действию β -лактамаз стафилококков, но с более низкой активностью в отношении грамположительных микроорганизмов и не действующие на грамотрицательные (нафициллин, метациллин);
- - относительно высокоактивные против грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, но разрушаемых β -лактамазами (карбенициллин, тикарциллин);
- - препараты с относительной кислотоустойчивостью и пригодные для перорального применения (пенициллин V, ампициллин, клоксациллин).

Схема производства пенициллина

Биосинтетические пенициллины

- Их продуцентами являются определенные штаммы рода *Penicillium*.
- Бензилпенициллин – одноосновная кислота, в структуру которой входят β -лактамный и тиазолидиновый циклы. По своей природе это циклический дипептид (L-цистеина и D-валина).
- Бензилпенициллин обладает высокой антибактериальной активностью. Однако, спектр его действия ограничен, он преимущественно действует на грамположительные бактерии (стафилококки, стрептококки, пневмококки), грамотрицательные кокки (менингококки, гонококки), дифтерийные палочки, сибиреязвенные палочки, возбудителей газовой гангрены и столбняка (клостридии), спирохеты, актиномицеты.
- Все соли бензилпенициллина вводят парентерально. Они выводятся из организма в течение 3–4 ч.
- Плохо растворимые в воде соли бензилпенициллина (бициллина) вводят внутримышечно. Они отличаются пролонгированным действием; не проникают через гематоэнцефалический барьер.

Схема производства пенициллина

Полусинтетические пенициллины

- Модификации 6-АПК:
- 1. устойчивые к действию пенициллиназы (β -лактамазы), продуцируемой рядом микроорганизмов (диклоксациллин, нафциллин);
- 2. кислотоустойчивые препараты, эффективные при введении внутрь (оксациллин);
- 3. пенициллины широкого спектра действия (оксациллин).

Схема производства пенициллина

- Полусинтетические пенициллины широкого спектра действия подразделяют на следующие группы:
- 1. Препараты, не влияющие на синегнойную палочку.
 - а) Аминопенициллины (ампициллин, амоксициллин).
- 2. Препараты, активные в отношении синегнойной палочки.
 - а) Карбоксипенициллины (карбенициллин, тикарциллин, карфециллин).
 - б) Уреидопенициллины (пиперациллин, азлоциллин, мезлоциллин).
- *Побочное и токсическое действие пенициллинов.* Пенициллины отличает низкая токсичность и широкий спектр противомикробного действия.
- Побочные токсические эффекты неаллергической природы – глоссит, стоматит, тошнота. Внутримышечное введение – некроз мышцы; внутривенное – флебит и тромбофлебит.
- Чрезмерно высокие дозы натриевой соли бензилпенициллина – энцефалопатия (нейротоксическое действие).
- Иногда – нарушение работы сердца; печень; кандидомикоз.

Схема производства пенициллина

- Питательная среда для производства пенициллина содержит: кукурузный экстракт (2–3 %), глюкозу (2 %) легко усвояемую лактозу (1 %), сульфат аммония, фосфаты (0,5–1 %), производные фенилуксусной кислоты (ФУК) (0,3–0,6 %), гидрол.

Схема биосинтеза молекулы пенициллина

- Кетоглутарат + Ацетил-КоА
- ↓
- Гомоцитрат
- ↓
- α-кетoadипиновая кислота
- ↓
- L-α-аминоадипиновая кислота (L-α-ААК)
- ↓ ← L-цистеин
- L-α-ААК-L-цистеин (LL-дипептид)
- ↓ ← L-валин
- L-α-ААК-L-цистеин-D-валин (LLD-трипептид)
- ↓
- Моноциклический β-лактам
- ↓
- Изопенициллин N (L-α-ААК-6-АПК)
- ↓ $C_6H_5CH_2COOH$
- Бензилпенициллин ($C_6H_5CH_2CO$ -6-АПК)

Схема производства пенициллина

- При развитии продуцента пенициллинов – гриба *Penicillium crysogenum* – на кукурузно-лактозной среде выделяют 3 фазы.
- Первая фаза – рост мицелия, выход антибиотика низок. Всегда присутствующая в кукурузном экстракте молочная кислота потребляется продуцентом с максимальной скоростью, лактоза используется медленно; потребление кислорода высокое. Усиливается азотный обмен, в результате в среде появляется аммиак и резко поднимается значение pH.
- Вторая фаза – максимальное образование пенициллина, что связано с быстрым потреблением лактозы и аммонийного азота. Значение pH среды остается почти без изменений, увеличение массы мицелия незначительное, потребление кислорода снижается.
- Третья фаза – снижение концентрации антибиотика в среде в связи с начавшимся автолизом мицелия и выделением в результате этого процесса аммиака, что сопровождается повышением значения pH среды.

Схема производства пенициллина

- Для стабилизации значения рН добавляют мел, а кашалотовый жир используют в качестве пеногасителя.
- После стерилизации и охлаждения питательная среда засеивается проросшими спорами гриба, аэрируется путем пропускания через нее воздуха и перемешивается с помощью мешалки.
- Температура в период первой фазы составляет 30 °С, во вторую фазу – 20 °С, значение рН роста гриба – ниже 7,0, потребление углеводов должно быть медленным, что достигается использованием лактозы или дробным внесением глюкозы.
- Подготовка посевного материала: сначала размножаются споры на пшенице во флаконах при температуре 24–25 °С в течении 4–5 суток. Полученным споровым материалом засеивают инокуляторы, затем посевные аппараты (12–18 ч).

Схема производства цефалоспорины

- По химическому строению цефалоспорин относится к β -лактамным соединениям, но β -лактамное кольцо конденсировано не с пяти, а с шестичленным гетероциклом.
- Цефалоспорины действуют бактерицидно, что связано с их угнетающим влиянием на образование клеточной стенки. Аналогично пенициллину они угнетают активность фермента транспептидазы, участвующей в биосинтезе клеточной стенки бактерий. По противомикробному спектру цефалоспорины относятся к антибиотикам широкого спектра действия. Они устойчивы к стафилококковой пенициллиназе. Цефалоспорины в отличие от пенициллинов устойчивы к β -лактамазе, подавляют развитие и грамположительных, и грамотрицательных бактерий, но активность этого антибиотика ниже пенициллина.
- Первый этап действия данных препаратов заключается в их связывании с клеточными рецепторами. После связывания β -лактамного препарата с рецепторами ПСП ингибируется реакция транспептидирования и останавливается синтез пептидогликана.
- Следующий этап – устранение или инактивация ингибитора аутолитических ферментов (гидролаз) в клеточной стенке, что сопровождается активизацией литического фермента у некоторых микроорганизмов и может привести к лизису клетки.

Схема производства цефалоспорины

- Выделяют 4 поколения цефалоспоринов:
- 1. Парентерально – цефазолин; энтерально – цефалексин. Действуют на грамположительных кокков. Не действуют на синегнойную палочку.
- 2. Парентерально – цефуроксим; энтерально – цефаклор. Действуют на грамположительные энтеробактерии.
- 3. Парентерально – цефотаксим; энтерально – цефиксим. Действуют на грамположительные псевдомонады и бактероиды.
- 4. Парентерально – цефепим. Действуют на грамположительные синегнойная палочка и др. грамотрицательные микроорганизмы.

Схема производства цефалоспорины

- В процессе развития *Cephalosporinum acremonium*, наряду с цефалоспорином С, синтезируется и пенициллин N. Его образование идет тем же путем, что и образование изопенициллина N в процессе биосинтеза бензилпенициллина. Через ряд стадий из изопенициллина N образуется цефалоспорин С.
- Продуцент целоспоринов может расти на средах, содержащих белки, например, соевую муку, сухие дрожжи, жмыхи. Кроме того, в питательную среду добавляют аммонийные соли и фосфор, который способствует усвоению углеводов, цинк, марганец, магний, железо, мел.
- Посевной материал сначала готовят в качалочных колбах, переносят в инокулятор, в посевной аппарат большего объема, а после в ферментер (70 ч).
- Процесс ферментации осуществляется глубинным способом, в условиях постоянной аэрации и непрерывного перемешивания, при температуре 26–28°C, в течение 7–8 суток. Процесс культивирования осуществляют в асептических условиях.
- Постферментационная стадия, связанная с выделением и очисткой цефалоспоринов, осуществляется по той же схеме, что и в случае пенициллинов.

Схема биосинтеза низинов

- Низин подавляет развитие ряда грамположительных и некоторых кислотоустойчивых бактерий, не оказывает влияния на грамотрицательные бактерии, дрожжи и плесневые грибы; подавляет развитие многих микроорганизмов таких, как: пневмококки, группу стрептококков, различные виды *Bacillus*, *Clostridium*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, некоторые виды *Streptomyces* и *Micrococcus pyogenes*. Низин не оказывает противомикробного действия на *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Shigella* и некоторые виды *Neisseria*.
- Низин не используется в медицинской практике, но он с успехом применяется в ветеринарии для лечения маститов у коров; активно применяется в пищевой промышленности в качестве консерванта некоторых скоропортящихся продуктов, а также для предупреждения порчи сыров.

Схема биосинтеза низинов

Приготовление посевного материала:

- Штаммы-продуценты
 - из пробирок → в колбы со стерильной питательной средой на качалки, →
 - оптимальные t° и pH 6,5 – 6,8.
-
- →Инокуляторы для наращивания
 - посевного материала
 - (малый посевной аппарат,
 - затем большой посевной аппарат;
 - постоянный долив питательной среды).

Схема биосинтеза низинов

Питательная среда.

- Лучшими азотсодержащими компонентами в средах являются дрожжевой автолизат, пептон, казеиновый гидролизат.
- Источник углерода – глюкоза. Добавление к среде с глюкозой двух-, трех-, четырех- и пятиуглеродных органических кислот способствует повышению роста продуцента антибиотика и некоторому увеличению образования им низина.

Схема биосинтеза низинов

- Ферментация.

У низина, в отличие от других полипептидных антибиотиков, путь биосинтеза сходен с путем образования белков, т.е. связан с рибосомным механизмом. Биосинтез низина происходит через образование низиноподобных белков – предшественников биосинтеза антибиотика, причем превращение пренизина в низин происходит под действием фермента на внешней поверхности клетки стрептококка.

Схема биосинтеза низинов

- Предварительная обработка культуральной жидкости и клеток микроорганизма-продуцента осуществляется методом фильтрации.
Первичной операцией выделения антибиотика является его перевод в фазу, из которой наиболее целесообразно его изолировать, при этом антибиотик, содержащийся в культуральной жидкости, и клетки с антибиотическим веществом, переводят в осадок, из которого антибиотик экстрагируют. Отделение нативного раствора от биомассы и взвешенных частиц проводят методами фильтрации (нутч-фильтр, друк-фильтр, сепараторы) или центрифугирования.

Схема биосинтеза низинов

- Основные методы очистки антибиотика: экстракция, ионообменная сорбция и осаждение.

Также одной из стадий очистки антибиотика является концентрирование полученных растворов (отгонка большей части растворителя в вакууме).

- Сушка, получение готовой продукции, изготовление лекарственных форм (биологический и фармакологический контроль) и фасовка. Виды сушки: лиофильная сушка, распылительная сушилка, сушка в вакуум-сушильных шкафах.

Расфасованный и упакованный антибиотик с указанием показателя биологической активности, даты выпуска и срока годности поступает в продажу.

Схема биотехнологического получения стрептомицина

- Стрептомицин – антибиотик, образующийся в процессе жизнедеятельности лучистых грибов *Streptomyces globisporus*, *Streptomycini* или других родственных микроорганизмов.
- Антибиотик выпускается в виде сульфата. Стрептомицина сульфат – порошок или пористая масса белого или почти белого цвета, без запаха, горьковатая на вкус; гигроскопичен; легко растворим в воде, практически нерастворим в спирте, хлороформе и эфире; устойчив в слабокислой среде, но легко разрушается в растворах крепких кислот и щелочей при нагревании.
- Стрептомицина сульфат обладает широким спектром антимикробного действия. Антибиотик активен в отношении микобактерий туберкулеза и большинства грамотрицательных (кишечная палочка, палочка Фридендлера, палочка инфлюэнцы, возбудители чумы, туляремии, бруцеллеза и некоторых грамположительных (стафилококки) микроорганизмов; менее активен в отношении стрептококков, пневмококков; не действует на анаэробы, риккетсии и вирусы.
- Действует стрептомицин бактерицидно. Эффект связан с подавлением синтеза белка на уровне рибосом в микробной клетке.

Схема биотехнологического получения стрептомицина

- В качестве основы питательных сред применяют гидролизаты растительных и животных белков. Основными компонентами сред, применяющихся при промышленном получении стрептомицина, являются: соевая мука, гидрол и аммонийные соли.
- Среду стерилизуют при температуре 120 °С, охлаждают и засевают посевным материалом.

Схема биотехнологического получения стрептомицина

- При развитии продуцента различают две стадии. На первой стадии происходит быстрый рост и развитие микроорганизма с энергичным потреблением основных компонентов субстрата и кислорода. В цитоплазме вначале высокого содержания РНК, ДНК не наблюдается и обнаруживается лишь через 12 ч развития. В среде происходит увеличение содержания аммонийного азота, обусловленное разложением белков соевой муки. Значение рН вначале несколько снижается, а затем повышается с 6,8 до 7,9. На этой стадии стрептомицин синтезируется в очень незначительном количестве.
- Через 28 ч масса мицелия прекращает увеличиваться, начинается вторая стадия, связанная с образованием стрептомицина. На 3-и сут. значение рН с 7,9 уменьшается до 6,7, на 4–5-е сут. – вновь возрастает до 7,7. Вторая стадия характеризуется медленным потреблением оставшихся в среде питательных веществ, замедлением роста актиномицета, снижением потребления кислорода, автолизом мицелия, максимальным образованием антибиотика.

Схема биотехнологического получения стрептомицина

- Аэрация среды имеет очень большое значение, т.к. *Streptomyces griseus* – высокоаэробный организм и поглощает значительное количество кислорода, которое зависит от состава среды и стадии развития продуцента. В ранний период развития актиномицета потребление кислорода воздуха более интенсивное, а затем оно снижается до нуля. Увеличение степени аэрации повышает выход стрептомицина.
- непрерывной аэрации.
- Оптимальное начальное значение рН для развития актиномицета – 7,0. Стрептомицин образуется при значении рН от 7,5 до 8,0. В кислых средах активность стрептомицина снижается, в щелочных – максимальная. Так, активность стрептомицина при значении рН 5,8 в 20–30 раз ниже, чем при величине рН 8,0. Для проявления максимальной противомикробной активности стрептомицина оптимальное значение рН 7,5–8,0.

Схема биотехнологического получения стрептомицина

- С целью извлечения стрептомицина из культуры продуцента культуральную жидкость вместе с биомассой обрабатывают минеральной кислотой. При этом весь антибиотик переходит в раствор. Мицелий отделяют фильтрованием или центрифугированием.
- Свободную от мицелия культуральную жидкость обрабатывают щавелевой кислотой. При этом достигается удаление белков и органических оснований, ионов металлов (кальция, магния, железа). Затем осуществляется выделение стрептомицина в чистом виде.
- Стрептомицин – сильно полярное соединение и его основание и соли неорганических кислот хорошо растворимы в воде; соли органических кислот почти во всех органических растворителях.
- Для выделения стрептомицина из культуральной жидкости в чистом виде используются методы адсорбции на активированном угле и метод ионообменной хроматографии
- Стабильность стрептомицина зависит от чистоты препарата, влажности, температуры и значения pH растворителя.

Схема биотехнологического производства грамицидина С

- Продуцент *Bacillus brevis* способен синтезировать полипептидные антибиотики, к числу которых относят грамицидины А, В, С_D, D, С, отличающиеся по аминокислотному составу и пространственной структуре молекулы.
- Для производства грамицидина С предложены среды на основе мясного и дрожжевого гидролизатов, содержащие сбалансированный набор минеральных и органических солей.
- В процессе культивирования необходимо подобрать сбалансированное сочетание интенсивности аэрации среды (от 0,38 до 4,38 г О₂/(л/ч)) и концентрации входящих в нее веществ. Температура культивирования – 40 °С.
- Развитие продуцента и синтез антибиотика может осуществляться и при 28 °С, но в этом случае максимальный биосинтез антибиотика наблюдается в первые 24 ч, в то время, как при температуре 40 °С – между 24 и 48 ч.
- При выделении грамицидина С культуральную жидкость подкисляют кислотой хлороводородной до значения рН 4,5–5,0. В осадок выпадает дихлоргидрат грамицидина С вместе с бактериальными клетками продуцента. Из осадка антибиотик экстрагируют спиртом этиловым.
- Концентрат, содержащий 4 % грамицидина С, используется в медицинской практике.

Схема биотехнологического производства неомицина

- Тетрациклины – амфотерные соединения, способные образовывать соли с кислотами и основаниями, они плохо растворимы в водных растворах в интервале значений pH 4,5–7,5, но хорошо растворимы при значении pH ниже 2,0 и выше 8,0; неустойчивы к воздействию окислителей, в том числе и кислорода воздуха.
- Хлортетрациклин (биомицин) продуцируют штаммы несовершенного гриба *Actinomyces aureofaciens*, а окситетрациклин – *Actinomyces rimosus*.

Схема биотехнологического производства неомицина

- Для биосинтеза окситетрациклина посевной материал используется в виде спор со сроком хранения при температуре 4–6 °С до 3 мес. В заводских условиях его размножают при температуре 26–28 °С в три генерации. Длительность каждой из них составляет 2–3 сут. Культуру продуцента сначала 2 раза размножают в колбах на 750 мл с 200 мл питательной среды на качалке (160–180 об./мин.), затем в посевном аппарате. Мицелиальной массой, полученной в колбах, засевают в посевные аппараты из расчета 700 мл на 1 м³ аэрируемой жидкой фазы (1 объем воздуха на 1 объем среды в 1 мин.). Выращивание продуцента обычно осуществляют в среде состава, %: кукурузная мука – 6,0, кукурузный экстракт – 1,5, аммония сульфат – 0,6, натрия хлорид – 0,4, мел – 0,8, вода – остальное.
- На стадии ферментации используют питательную среду того же состава, только для повышения содержания витамина В₁₂ в нее добавляют хлорид кобальта (из расчета 1 г на 1 м³ среды).
- Полученный посевной материал передают на стадию ферментации в количестве 10–15 % от объема среды основных ферментеров.

Схема биотехнологического производства биомицина

- Доказано, что в биосинтезе биомицина участвует уксусная кислота в виде ацетилкоэнзима А и три молекулы малонилкофермента А, причем каждая из них декарбоксилируется при конденсации. Далее следуют реакции восстановления при участии НАДФ·Н₂ и циклизации.
- В качестве посевного материала используют споры, которые при температуре 2–6 °С можно хранить до 3 мес. Для размножения культуры в колбах используют более простую среду (3% муки, 3% кукурузного экстракта). Процесс осуществляется при значении рН 6,7–6,8, температуре 28–30 °С в течение 24–30 ч. Затем посевной материал размножают в посевных ферментерах до количества, составляющего 11–12 % рабочего объема основного ферментера. Для этого используют среду, состоящую из муки и кукурузного экстракта. Процесс ферментации реализуется в аэробных условиях при температуре 27–28 °С, значении рН 6,6–6,7 в течение 30 ч.
- Хранение посевного материала осуществляется при температуре 16–18 °С допустимо только до 20 ч.

Схема биотехнологического производства биомицина

- Ферментацию проводят в аппаратах с мешалками или эрлифтными воздухораспределительными системами, что обеспечивает снабжение культуры кислородом и перемешивает среду. Используя среду указанного состава и обеспечивая оптимальный температурный режим, реакции среды, аэрации, уже в первые часы культивирования можно наблюдать интенсивный рост мицелия. В течение первых 16 ч в гифах наблюдается гомогенная протоплазма, а через 24 ч появляется фрагментация протоплазмы. В это время культуральная жидкость приобретает желто-коричневый цвет. На этом этапе интенсивно синтезируется биомицин, при этом значение pH среды увеличивается и в конце процесса (через 70–80 ч) достигает 7,0–7,2. Во время ферментации активность достигает величины 1000–1500 ед./мл.

Схема получения кормового биоцина

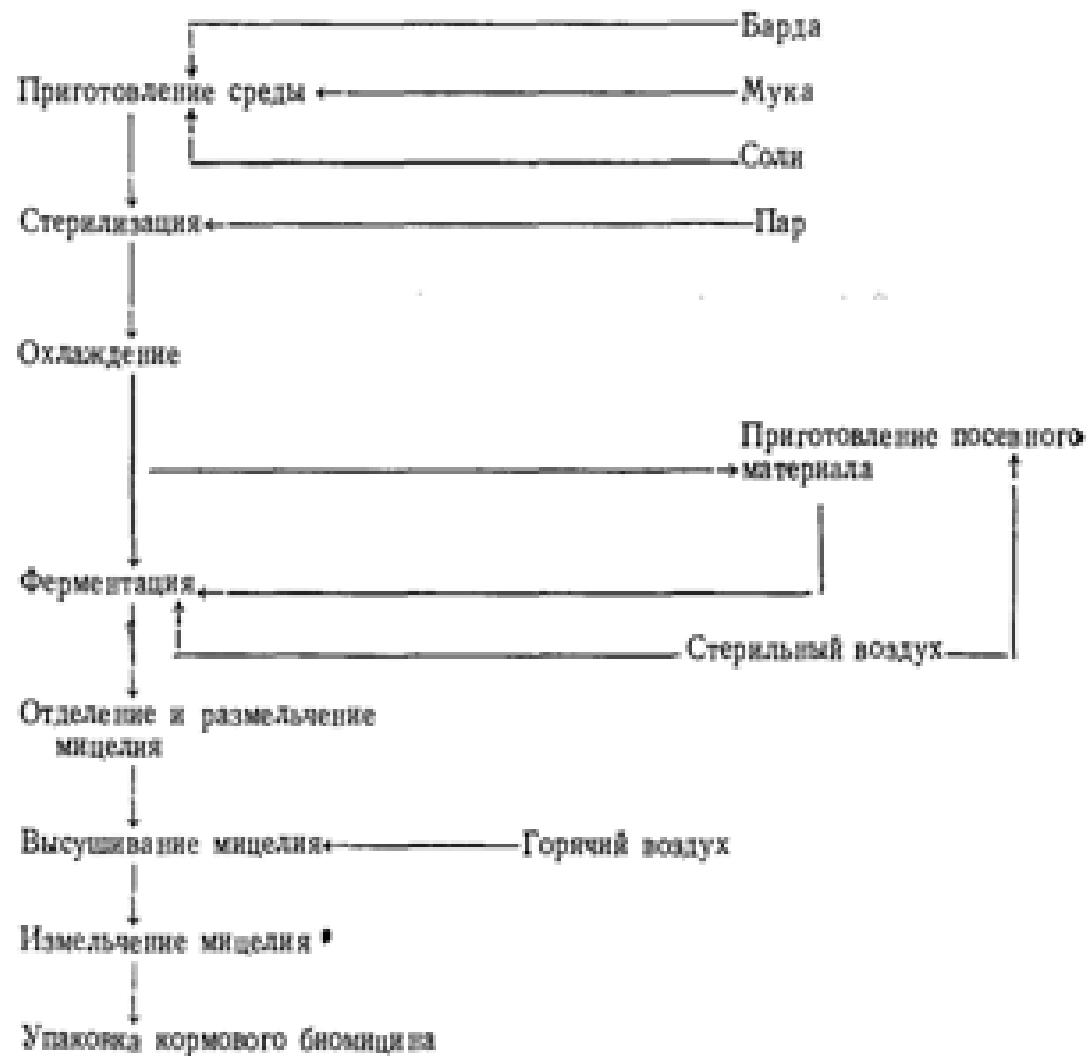


Схема биотехнологического производства бацитрацина

- Кормовые препараты антибиотика бацитрацина, имеющие общее название бацилихины, представляют собой высушенную культуральную жидкость, полученную в результате глубинного выращивания продуцента *Bacillus licheniformis*, содержащую цинкбацитрацины и различные БАВ.
- Бацитрацины – полипептидные антибиотики, среди которых выделено 10 индивидуальных форм (А, А₁, В, С, D, E, F₁, F₂, F₃ и G).
- Готовый препарат на основе бацитрацинов на 37% представлен бацитрацином А.

Схема биотехнологического производства бацитрацина

- Бацитрацины получают при глубинном или поверхностном росте бактерий на соответствующих средах, содержащих глюкозу, лактат аммония и неорганические соли или соевую муку и глюкозу.
- Исходная культура продуцента поступает на предприятие в виде спор. При глубинном культивирования получение посевного материала начинают с проращивания спор при температуре 30 °С на среде, содержащий (в %): крахмал – 2,0; лимонную кислоту – 0,03; сульфат магния – 0,1; соль Мора – 0,025; сульфат марганца – 0,006; хлориды калия и натрия – по 0,4; фосфат калия однозамещенный – 0,45.
- Продолжительность выращивания споровой культуры около 120 ч.
- Размножение производственной культуры осуществляют в колбах и посевных аппаратах при этой же температуре на среде, содержащий (в %): крахмал – 1,8; муку соевую – 7,5; карбонд кальция – 0,02; сульфат аммония – 0,2. Продолжительность получения посевного материала на каждой из стадий составляет 16–18 ч.
- Основную ферментацию реализуют при температуре 37 °С в течение 30–40 ч на среде, содержащий (в %): крахмал – 1,8; муку соевую – 7,5; карбонд кальция – 1,0; сульфат магния – 0,33. На стадиях культивирования продуцента в посевном аппарате и ферментере процесс проводят в условиях принудительной аэрации (1 объем воздуха на 1 объем среды в 1 мин.) и перемешивания с введением стерильного пеногасителя до 0,2 %. На всех этапах выращивания продуцента значение рН среды поддерживают на уровне 7,0 и обеспечивают асептические условия проведения процесса.

Схема биотехнологического производства препаратов гризина

Антибиотик гризин относится к группе стрептотрицинов, структурную формулу которых можно представить в виде:

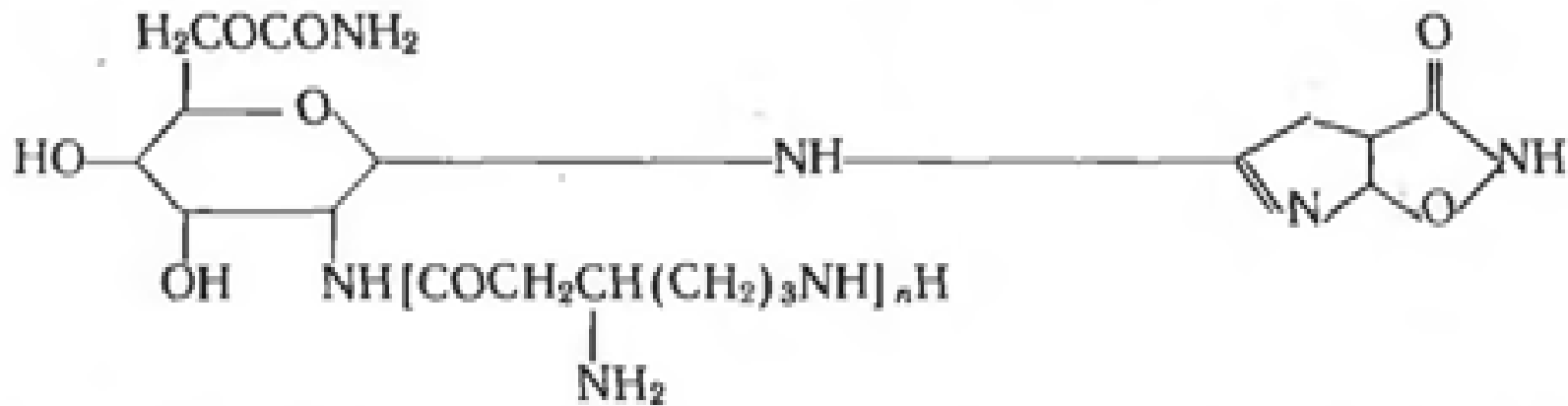


Схема биотехнологического производства препаратов гризина

- Исходную культуру продуцента хранят на агаризованных средах или в виде спорового материала, выращенного на пшене. Посевной материал получают путем последовательного размножения культуры сначала в колбах на качалке в две генерации при температуре 26–28 °С в течение 24 ч на среде, имеющей значение pH 6,8–7,3, содержащей следующие компоненты (%): крахмал – 1,5; кукурузную муку – 2,0; нитрат аммония – 0,5; хлорид натрия – 0,2; фосфат калия однозамещенный – 0,02; мел – 0,3.
- Полученный в колбах посевной материал второй генерации после проверки морфологического состояния культуры, отсутствия свободного фага и посторонней микрофлоры передается в количестве до 0,1 % на засев питательной среды посевного аппарата (третья ступень генерации продуцента). Среда в посевном аппарате содержит те же компоненты и в том же количестве, что и в посевных колбах, в качестве макроэлемента в нее дополнительно вводят 0,05 % сульфата магния, а также вводят 0,2 % стерильного пеногасителя. Культивирование осуществляют в условиях принудительного перемешивания и аэрации (1 объем воздуха на 1 объем среды в 1 мин.). Основные параметры процесса – температура, значение pH среды, длительность культивирования – являются такими же, как и при выращивании продуцента в посевных колбах.

Схема биотехнологического производства препаратов гигромицина В

- Исходной культурой является гриб *Act. hydroscopicus*. Ее хранят при комнатной температуре (20–21 °С) на агаризованной среде до 2 мес. или на пшене до 6 мес., не подвергая дополнительному посеву.
- Посевной материал для засева ферментера готовят в две стадии: сначала его размножают в посевных колбах на качалке, а затем в посевном аппарате. При этом используют питательную среду одного и того же состава (%): соевая мука – 1,5; кукурузный экстракт – 0,2 (по сухой массе); сульфат аммония – 0,2; хлорид натрия – 0,5; карбонат кальция – 0,3; кашалотовый жир – 2,0; вода – остальное.
- В посевных колбах продуцент выращивают при значении рН 7,2 и температуре 27 °С в течение 3 сут. Полученный мицелий гриба передается в посевной аппарат в количестве 1,5–3% от объема среды. В нем осуществляют культивирование на среде, имеющей более высокое значение рН 7,7–7,9, при температуре 28 °С, постоянном перемешивании и переменной аэрации. В первые сутки аэрацию поддерживают на уровне 1 объем воздуха на 0,5 объема среды в 1 мин, во вторые – 1:1, а в третьи – 1:1,5. Готовый посевной материал передают в ферментер в количестве 10 % от объема среды.

Схема биотехнологического производства препаратов гигромицина В

- Производственное культивирование продуцента и биосинтеза антибиотика осуществляют при температуре 28 °С, постоянном перемешивании среды, имеющей значение рН 7,6–7,8, и аэрации (1 объем воздуха на 1 объем среды в 1 мин) в течение 8–9 сут., на среде того же состава, но с добавкой 5% сепарированных пивных дрожжей. Для предупреждения значительного пенообразования в ферментер периодически добавляют раствор стерильного пеногасителя. К концу процесса биосинтеза активность гигромицина в культуральной жидкости достигает 1500–2000 ед/мл.
- Полученную культуральную жидкость подвергают предварительной обработке для удаления ионов кальция. Для этого ее сначала подкисляют серной кислотой до значения рН 4–4,5, затем добавляют щавелевую кислоту. Образовавшийся осадок сульфата и оксалата кальция вместе с мицелием гриба отфильтровывают, а полученный нативный раствор гигромицина В после доведения 20 % раствором гидроксида натрия до значения рН 6,5–7,0 направляют на стадию ионообменной сорбции антибиотика. Процесс сорбции осуществляют в батарее колонн открытого типа, заполненных одним из следующих сорбентов: КБ-4П-2 в натриевой форме, КБ-2 или СР-300.
- Элюат направляют на вакуум-выпаривание, которое осуществляют при температуре 45–60 °С до получения концентрата гигромицина В активностью 150–250 тыс. ед/мл. Перед смешением с сухими отрубями концентрат фильтруют на нутч-филт্রে через слой бязи и шелка. Образующийся фильтрат смешивают с наполнителем из расчета 80–100 мл на 1 кг отрубей. Готовый продукт фасуют по 50 г в полиэтиленовые пакеты.

Схема биотехнологического производства фитобактериомицина

- Продуцентом фитобактериомицина является *Actinomyces lavendulae*. Исходную культуру продуцента поддерживают на агаризованной среде, содержащей до 1% глюкозы. Размножение культуры продуцента осуществляют сначала в пробирках, потом в посевных колбах и посевном аппарате. На всех этапах культивирования используют питательную среду одного и того же состава (в %): глюкоза – 1; крахмал – 1,5; кукурузный экстракт – 0,5 (по массе сухих веществ); хлорид натрия – 0,5; сульфат аммония – 0,35; карбонат кальция – 0,5; вода – остальное.
- Выделение и очистку фитобактериомицина проводят ионообменным способом. Для этого культуральную жидкость предварительно обрабатывают щавелевой кислотой для удаления ионов кальция, препятствующих нормальному проведению процесса ионообменной сорбции. Образовавшийся осадок оксалата вместе с мицелием отфильтровывают, а полученный нативный раствор направляют на ионообменные колонны, заполненные катионитом КБ-4П-2 в аммонийной форме.
- Адсорбированный на смоле антибиотик элюируют 0,3 М раствором серной кислоты. Средняя активность получаемых элюатов составляет 50–60 тыс. ед/мл. Элюаты сульфата фитобактериомицина, имеющие значение pH 1–2, обрабатывают анионитом ЭДЭ-10 в гидроксильной форме в статических условиях до величины pH раствора 6,0. При этом расход смолы составляет 80–90 г на 1 л элюата. Отработанный анионит отделяют фильтрованием, а элюаты высушивают под вакуумом при температуре 70–80 °С. Выход фитобактериомицина составляет 70–80 % от сорбированного на катионите. Сухой продукт – сульфат фитобактериомицина – обладает активностью 3–4 тыс. ед/мг.

Схема биотехнологического производства трихотецина

- Антибиотик трихотецин относится к группе соединений, содержащих кислородные гетероциклы. Он обладает широким фунгицидным действием и малой токсичностью. Имеет эмпирическую формулу $C_{19}H_{24}O_5$.

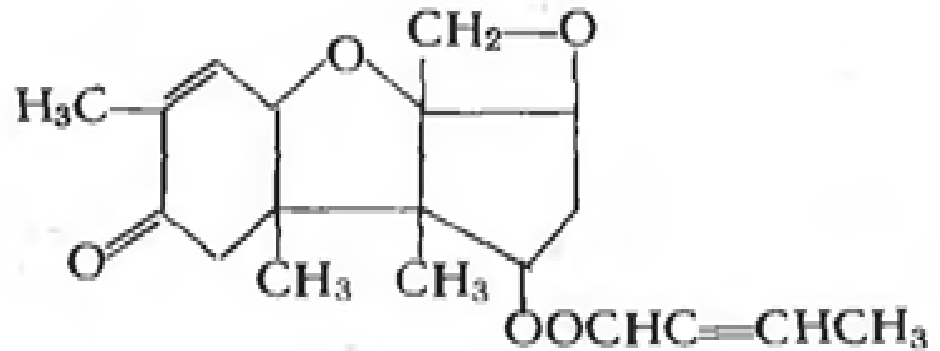


Схема биотехнологического производства трихотецина

- Продуцентом антибиотика являются штаммы плесневого гриба *Trichothecium roseum* L. В производственных условиях данный продуцент размножают в несколько стадий: сначала в маточных колбах, затем в посевных колбах и посевном аппарате. На каждом из этапов получения посевного материала используют одну и ту же питательную среду, содержащую (в %): сахар – 1,0; кукурузный экстракт – 1,0; сульфат аммония – 0,12; калий фосфат двухзамещенный – 0,1. Культивирование проводят при значении pH 5,0–5,2 и температуре 24–26 °С, продолжительность получения посевного материала в колбах первой и второй генерации составляет 1,5–2 сут.
- Выращенную в колбах мицелиальную массу, составляющую 1–3 % от объема среды посевного аппарата, используют для его засева. Культивирование продуцента в посевном аппарате осуществляют при температуре 24–26 °С, постоянном перемешивании и аэрации (1 объем воздуха на 1 объем среды в 1 мин.). Готовым посевным материалом в количестве до 10 % от объема среды ферментера засевают производственный ферментер.

Схема биотехнологического производства трихотецина

- Для производственного культивирования используют питательную среду, содержащую (в %): муку кукурузную – 1; глицерин – 1; калий фосфат однозамещенный или двухзамещенный – 0,24; нитрат калия или сульфат аммония – 0,06; карбондioxide кальция и хлорид магния – по 0,02; жир кашалотовый – 0,1; вода – остальное.
- Путем подтитрования среды соляной кислотой значение pH поддерживают вначале на уровне 5,3–5,6, в остальном культивирование продуцента осуществляют при тех же параметрах процесса, что и в посевном аппарате. Продолжительность биосинтеза составляет 64–90 ч. Процесс заканчивают, когда концентрация сахара снизится до 0,1–0,2 %, значение pH среды повысится до уровня 6,4–6,8, а активность антибиотика в культуральной жидкости достигнет 300–400 мкг/мл.
- Полученную культуральную жидкость отфильтровывают от мицелия и присутствующих в ней взвешенных частиц, а из образовавшегося нативного раствора путем экстракции хлороформом извлекают антибиотик. Выход трихотецина составляет 85 % от его содержания в нативном растворе.
- Экстракт упаривают под вакуумом, смешивают с этанолом из расчета 10 л на 1 кг антибиотика и направляют для получения пасты, которую готовят путем перемешивания спиртового концентрата с эмульгатором ОП-7 и каолином в массовом соотношении 1:0,6:8,5. Полученную пасту высушивают в калориферной сушилке при температуре 65–70 °С. Готовый продукт фасуют по 2–5 кг в четырехслойные бумажные мешки с полиэтиленовыми вкладышами. Общий выход трихотецина составляет 70 % от его содержания в культуральной жидкости.