

ЛЕКЦИЯ № 6

МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ БИОСИНТЕЗА ПЕРВИЧНЫХ И ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ (ИСПОЛЬЗУЕМЫХ КАК ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА)

Для студентов, обучающихся по направлению подготовки «Биология» (профиль «Генетика») при изучении дисциплины «Введение в биотехнологию»

- 1.** Понятие о первичных метаболитах
- 2.** Механизмы регуляции биосинтеза первичных метаболитов
- 3.** Частная биотехнология первичных метаболитов. Получение органических кислот
- 4.** Понятие о вторичных метаболитах
- 5.** Понятие об антибиотиках: история, классификация, биологическая роль, механизмы биосинтеза
- 6.** Биотехнология антибиотиков

1. ПОНЯТИЕ О ПЕРВИЧНЫХ МЕТАБОЛИТАХ

ПЕРВИЧНЫМИ МЕТАБОЛИТАМИ - продукты биосинтеза микроорганизмов, необходимые для их дальнейшего роста и развития (аминокислоты, нуклеотиды, белки, нуклеиновые кислоты, углеводы, витамины, коферменты, органические кислоты и т.д.).

Микробные клетки, как и клетки других живых организмов, не производят избыточного количества первичных метаболитов, что было бы расточительно и уменьшало их способность к выживанию, но созданы и создаются микробные штаммы с нарушением регуляции их синтеза.

Одним из важнейших путей интенсификации биотехнологического производства первичных метаболитов является совершенствование применяемого биообъекта.

Основными путями нарушения регуляции обменных процессов, протекающих в клетке, являются:

- ✓ изменение генетической программы организма;
- ✓ нарушение регуляторных систем организма в нем.

Спонтанные изменения генетической природы продуцента основаны на процессах рекомбинации генетического материала *in vivo*.

Более эффективен метод искусственного повреждения генома. К данному методу относится индуцированный мутагенез.

Достижения в области молекулярной биологии и молекулярной генетики позволили биотехнологам, начиная с 70-х гг. XX в. перейти от слепого отбора штаммов мутантов к сознательному конструированию геномов, применяя технологию рекомбинантных ДНК.

2. МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ БИОСИНТЕЗА ПЕРВИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ

РЕТРОИНГИБИРОВАНИЕ. В процессе ретроингибирования активность фермента, стоящего в начале многоступенчатого превращения субстрата, тормозится конечным метаболитом. Таким путем низкомолекулярные метаболиты передают информацию об уровне своей концентрации и состоянии обмена веществ ключевым ферментам метаболизма. С помощью этого механизма конечные продукты саморегулируют свой биосинтез. Ретроингибирование – способ точного и быстрого регулирования образования продукта. На обмен веществ, аналогичный конечным метаболитам, оказывают эффект и их аналоги.

РЕГУЛЯЦИЯ ОБЪЕМА СИНТЕЗА ФЕРМЕНТОВ. Среди большого многообразия ферментов, присущих микроорганизмам, одни синтезируются постоянно и их образование не зависит от состава среды – **конститутивные ферменты**, а другие ферменты – **адаптивные_(индуцибельные)** – возникают только в ответ на появление в среде индукторов – субстратов или их структурных аналогов.

Регуляция объема биосинтеза ферментов осуществляется на опероном уровне путем изменения количества иРНК, образующихся в процессе транскрипции.

Изучение механизмов регуляции новообразования ряда аминокислот у микроорганизмов показало, что конечные продукты метаболических путей не только ингибируют активность ферментов первых стадий процесса, но и тормозят биосинтез ферментов последних стадий, т.е. помимо аминокислот у микроорганизмов регулируется новообразование многих первичных метаболитов (пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, витаминов и др.). Обнаруженный феномен назван **репрессией**, а ферменты, биосинтез которых тормозится под влиянием низкомолекулярных метаболитов, переводящих репрессорный белок в активную форму, способную оккупировать зону первоначального связывания РНК-полимеразы, называется **репрессибельным**.

КАТАБОЛИТНАЯ РЕПРЕССИЯ. Если в среде присутствуют несколько источников углерода, клетка вырабатывает ферменты для усвоения лишь одного, наиболее предпочтительного субстрата. Это явление называется катаболитной репрессией. Ее сущность заключается в подавлении биосинтеза ферментов, обеспечивающих метаболизм одного источника углерода другим. Экспрессия ферментов регулируется белком-репрессором, пространственно удаленным от гена-оператора. Репрессор обладает высоким сродством к соответствующему оператору. Белок-репрессор, будучи присоединен к гену-оператору, препятствует транскрипции структурных генов.

3. ЧАСТНАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ ПЕРВИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ. ПОЛУЧЕНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ

Органические кислоты в системе микробного метаболизма являются продуктами деградации источника энергии и углерода.

Сверхсинтез органических кислот наблюдается при торможении скорости роста продуцента и блокировании процессов биосинтеза, требующих участия кислот в качестве субстрата. Такими условиями являются полное или избыточное содержание в среде источника углерода и энергии и дефицит биогенных элементов.

Микробиологические процессы получения органических кислот являются двухфазными:

- ✓ на первом этапе происходит сбалансированный рост при максимальном накоплении биомассы и потреблении углеродного и энергетического субстрата, а также лимитирующего биогена;
- ✓ на втором этапе – происходит замедление скорости роста клеток.

Важным условием кислотообразования большинства органических кислот (за исключением молочной) является хороший режим аэрации и величина рН среды.

В качестве производственных культур используют специально подобранные штаммы, продуцирующие целевую кислоту в виде монопродукта с высокими выходами и эффективным усвоением углеродного субстрата (*Lactobacillus*, *Arthrobacter*, *Alcaligenes*, *Candida*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*).

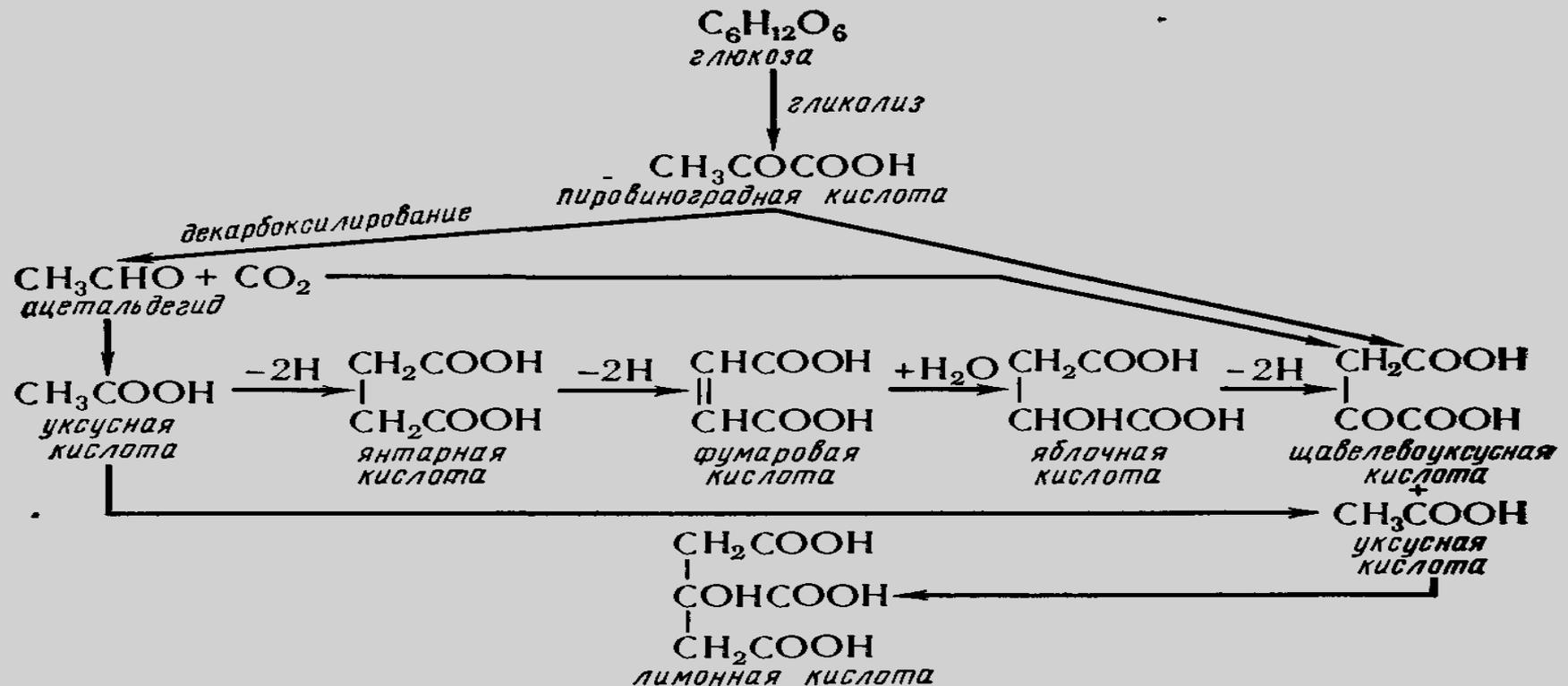
Способы ферментации в биотехнологическом производстве органических кислот: поверхностные жидко- и твердофазные процессы, а также глубинные, включая проточные культуры.

БИОТЕХНОЛОГИЯ ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ

ЛИМОННАЯ КИСЛОТА ($\text{CH}_2\text{--COOH--CONCOOH--CH}_2\text{COOH}$) – трехосновная оксикислота, обнаруженная в плодах и ягодах, применяющаяся в пищевом, фармацевтическом, химическом и текстильном производстве, косметологии и медицине.

В 1893 г. Вемером лимонная кислота идентифицирована в качестве продукта метаболизма плесневых грибов.

СХЕМА БИОСИНТЕЗА ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ

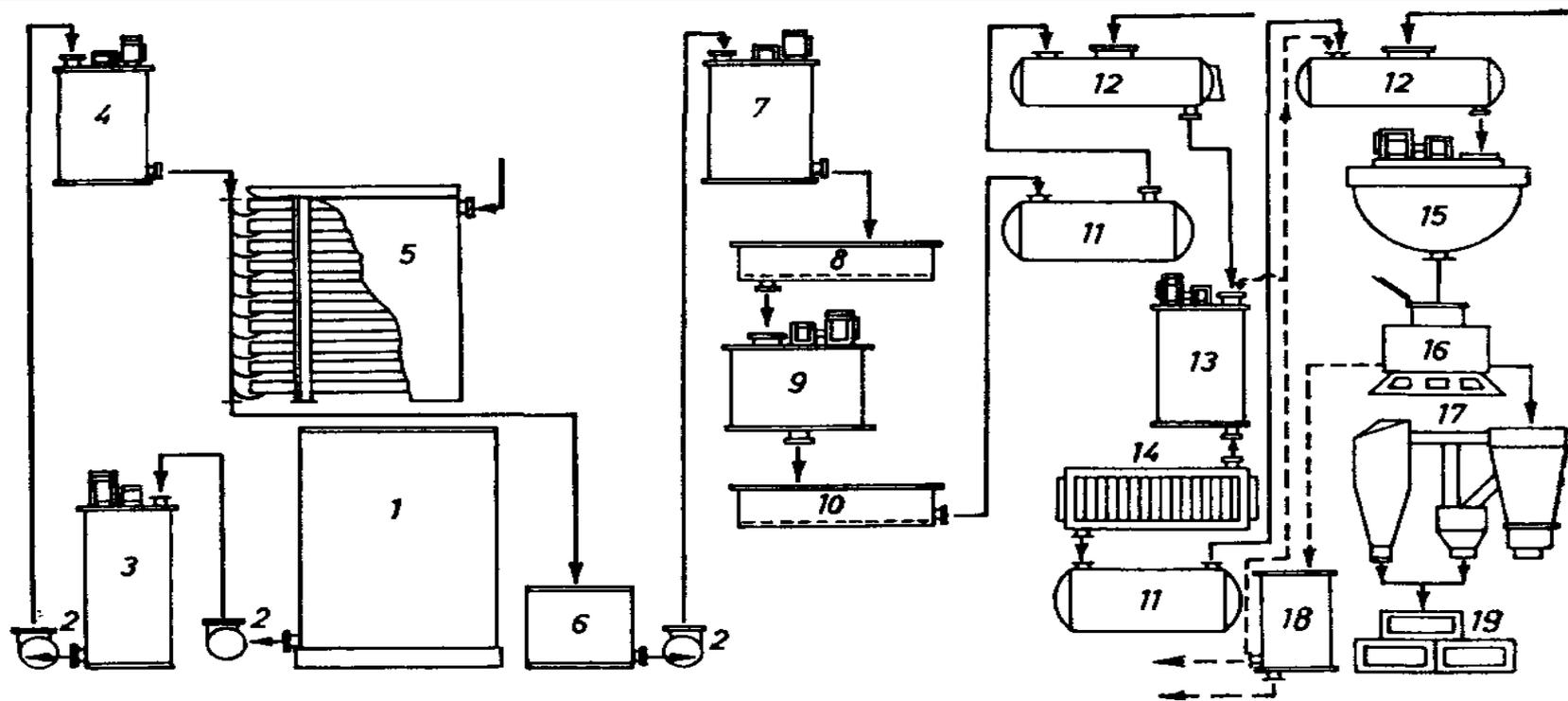


3. ЧАСТНАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ ПЕРВИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ. ПОЛУЧЕНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ

В биопроизводстве лимонной кислоты в качестве продуцента используют *Aspergillus niger* и *Aspergillus wentii*.

Ее сверхсинтез реализуется при высоких концентрациях сахаров в среде (14–24 %) и дефиците фосфора. Оптимум pH на стадии кислотообразования составляет 1,7–2,0. В качестве основы среды используют глюкозный сироп, гидролизаты крахмала или мелассу. Источником азота служат соли аммония (0,2 %); концентрация фосфатов – 0,01–0,2 %; пеногасители – природные масла.

При **ЖИДКОФАЗНОЙ ПОВЕРХНОСТНОЙ ФЕРМЕНТАЦИИ** среду разливают в кюветы, которые размещают на стеллажах в бродильной камере, простерилизованной парами формалина. Через специальные воздухопроводы с током стерильного воздуха поверхность среды засевают исходной культурой. В качестве посевного материала используют предварительно полученные в условиях поверхностной культуры высушенные споры (конидии). Варианты процесса: бессленный, бессленный с доливами и метод пленок.



1 – мелассное хранилище; 2 – насосы; 3 – резервуар для растворения мелассы; 4 – стерилизатор; 5 – камера брожения; 6 – сборник сброженной жидкости; 7 – нейтрализатор; 8 и 10 – нутч-фильтры; 9 – реактор; 11 – сборник; 12 – вакуум-аппарат; 13 – повторный растворитель; 14 – фильтр-пресс; 15 – кристаллизатор; 16 – центрифуга; 17 – сушилка; 18 – сборник; 19 – готовая продукция

ПОВЕРХНОСТНО-ЖИДКОФАЗНЫЙ ПРОЦЕСС (процесс **Коджи**) предусматривает использование в качестве среды пористого материала (пульпа сахарной свеклы, пшеничные отруби), который стерилизуют и после охлаждения инокулируют суспензией спор. Ферментация реализуется в лотках при температуре 25–30 °С в течение 6–7 сут. Полученную лимонную кислоту экстрагируют водой.

Начиная с 1950 г., производство лимонной кислоты осуществляют в условиях **ГЛУБИННОЙ КУЛЬТУРЫ**. Стабильный процесс возможен при его двухстадийной организации.

В качестве посевного материала используют мицелий, выращенный в условиях глубинной культуры. В ферментер мицелий подается по стерильной посевной линии.

Питательная среда содержит 12–15 % сахаров.

Ферментацию проводят при температуре 31–32 °С при непрерывном перемешивании. В ходе процесса кислотообразования (5–7 сут.) реализуют интенсивный режим аэрации с дробным добавлением сахаров (2–3 подкормки).

Выход лимонной кислоты составляет 5–12 %, остаточная концентрация сахаров – 0,2–1,5 %, доля цитрата – 80–98 % от суммы органических кислот.

ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА ЦЕЛЕВОГО ПРОДУКТА. В конце ферментации массу мицелия отделяют фильтрованием и промывают. В сброженных растворах содержатся, кроме целевой кислоты, глюконовая и щавелевая кислоты, остатки несброженных сахаров и минеральные соли.

Для выделения лимонной кислоты ее связывают гидроокисью кальция с образованием труднорастворимого цитрата кальция. Одновременно образуются кальциевые соли глюконовой и щавелевой кислот (глюконат кальция и оксалат кальция). Кальциевые соли лимонной и щавелевой кислот выпадают в осадок, а глюконат кальция и основная часть органических и минеральных компонентов мелассы остаются в растворе. Осадок отделяют с помощью вакуум-фильтра, промывают и высушивают. Для перевода лимонной кислоты в свободное состояние и освобождения от оксалата кальция осадок обрабатывают серной кислотой с последующей фильтрацией. Раствор лимонной кислоты фильтруют, концентрируют, подвергают кристаллизации при медленном охлаждении до 8–10 °С. Полученные кристаллы отделяют от маточного раствора с помощью центрифуги и высушивают в пневматической сушилке при 30–35 °С. Готовый продукт содержит не менее 99,5 % лимонной кислоты (в пересчете на моногидрат), зольность – не выше 0,1–0,35 %.

Высокоочищенные препараты лимонной кислоты получают после дополнительной очистки методом ионообменной хроматографии.

БИОТЕХНОЛОГИЯ МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ

МОЛОЧНАЯ КИСЛОТА ($\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$) – органическая одноосновная кислота, образующаяся в результате анаэробного превращения углеводов молочнокислыми бактериями.

Ферментацию проводят в глубинной культуре при величине рН 6,3–6,5 и температуре 48–50 °С. Продолжительность процесса – 7–11 сут. В ходе брожения для коррекции изменяющейся величины рН в культуру вносят мел (3–4 раза в течение суток). Конечная концентрация лактата кальция – 10–15 %, остаточная концентрация сахаров – 0,5–0,7 %.

На **постферментационной стадии** культуральную среду нагревают до температуры 80–90 °С, нейтрализуют гашеной известью до слабощелочной реакции. После отстаивания в течение 3–5 ч взвешенные частицы декантируют. Затем раствор лактата кальция подают на фильтр-пресс. Фильтрат упаривают до концентрации 27–30 %, охлаждают до температуры 25–30 °С, выдерживают в кристаллизаторах в течение 36–48 ч. Промытый лактат кальция отделяют центрифугированием и подвергают расщеплению серной кислотой при температуре 60–70 °С. Сырую молочную кислоту концентрируют в несколько этапов в вакуум-выпарных аппаратах до 70 % концентрации. Кислоту после фильтр-пресса подают на розлив с внесением небольших количеств мела.

Для отделения ионов железа сырец молочной кислоты при температуре 65 °С обрабатывают желтой кровяной солью, а тяжелые металлы осаждают сульфатом натрия. Для адсорбции красящих веществ используют активированный уголь.

БИОТЕХНОЛОГИЯ УКСУСНОЙ КИСЛОТЫ

УКСУСНАЯ КИСЛОТА (CH_3COOH) широко используется в пищевом, химическом и микробиологическом производстве, а также в медицине.

Уксуснокислое брожение основано на способности уксуснокислых бактерий окислять спирт с помощью алкогольдегидрогеназы в уксусную кислоту в присутствии кислорода воздуха: из 1 моля этанола образуется 1 моль уксусной кислоты, а из 1 л 12 об. (%) спирта получается 12,4 весовых (%) уксусной кислоты.

Уравнение реакции имеет вид:



Данный процесс могут реализовать многие бактерии. Однако в производстве для получения уксуса используют уксуснокислые бактерии рода *Acetobacter* и бактерии рода *Gluconobacter*.

Большую часть уксуса получают, используя разведенный спирт.

В настоящее время процесс реализуют поверхностным и глубинным способами.

3. ЧАСТНАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ ПЕРВИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ. ПОЛУЧЕНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ

ПОВЕРХНОСТНЫЙ РЕЖИМ осуществляют в струйных генераторах, наполненных древесной стружкой или др. наполнителем с большой площадью поверхности. Исходный питательный раствор с бактериями распыляют по поверхности стружек, он стекает, собираясь в нижней части аппарата, а затем жидкость собирают и вновь закачивают в верхнюю часть аппарата. Процедуру повторяют 3–4 раза.

Современные технологии получения уксуса основаны на **ГЛУБИННОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ**. Исходная инокулируемая смесь содержит 5 % этанола и 7 % уксусной кислоты. Процесс – полупроточный, отливно-доливной. Каждые 30–35 ч до 60 % культуры заменяют на свежее сусло.

Процесс реализуется в анаэробных условиях в режиме непрерывного культивирования продуцента. Для роста бактерий рода *Acetobacter aceti* используют среды, содержащие (%): этиловый спирт (6–12), бактериальный гидролизат (1), дигидрофосфат калия (0,05), гидрофосфат аммония (0,1) и сульфат магния (0,05).

Разработан эффективный непрерывный способ получения уксусной кислоты в батарее последовательно работающих пяти ферментеров. Температура культивирования составляет 28 °С для *Acetobacter* и 35 °С для культуры *V. schutzenbachii*.

В данном случае лучшим сырьем является этиловый спирт в концентрации 10 %. Оптимум рН для бактерий – около 3. Процесс проводят в батарее последовательно соединенных аппаратов. При этом первый выполняет роль инокулятора, в него непрерывно подают свежую среду и поддерживают условия, оптимальные для быстрого образования биомассы бактерий. Затем культура из первого аппарата поступает во второй и далее – в последующие. В каждом аппарате условия стабилизируются в соответствии с требованиями ферментации, при постепенном понижении температура от 28 °С в первом аппарате до 25 °С – в последнем. Концентрация спирта со второго по четвертый аппарат стабилизируется на требуемом уровне подачей в них среды с 40 % этанолом. Из последнего аппарата выводится культуральная жидкость с содержанием ацетата не ниже 9 и не выше 9,3 %.

На постферментационной стадии после отделения биомассы раствор уксуса фильтруют, освобождая от окрашенных и взвешенных частиц, и пастеризуют. Для повышения концентрации исходные растворы вымораживают до 20–30 %. Дальнейшее концентрирование до получения ледяной уксусной кислоты (98,0–99,8%) проводят путем перегонки.

БИОТЕХНОЛОГИЯ ПРОПИОНОВОЙ КИСЛОТЫ

ПРОПИОНОВАЯ КИСЛОТА ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$) синтезируется грамположительными пропионовокислыми бактериями. Ее применяют в пищевом и химико-фармацевтическом производстве, при получении косметических средств, а также в качестве фунгицида.

ХИМИЗМ БИОСИНТЕЗА ПРОПИОНОВОЙ КИСЛОТЫ заключается в следующем: пировиноградная кислота при участии биотина и углекислоты карбоксилируется в щавелевоуксусную, которая через яблочную и фумаровую кислоты восстанавливается до янтарной кислоты. Янтарная кислота при участии АТФ и КоА превращается в сукцинил-КоА, который под действием метилмалонил-КоА-изомеразы при участии кофермента В12 превращается в метилмалонил-КоА. При карбоксилировании метилмалонил-КоА расщепляется с образованием свободного КоА и пропионовой кислоты.

Производственные штаммы – бактерии *P. arabinosum*, *P. shermanii*, *P. rubrum*.

В качестве **субстрата** бактерии используют сахара (лактозу, глюкозу, мальтозу, сахарозу) и органические кислоты (яблочную и молочную кислоты).

Получают пропионовую кислоту в глубинной анаэробной культуре на средах, содержащих (в %): сахара – 2, органический азот – 0,4, соли молочной кислоты. Процесс реализуется за 7–12 сут. при температуре 30 °С и значении рН 6,8–7,2.

При этом свыше 70 % сахаров трансформируется в органические кислоты, на образование углекислоты расходуется менее 20 % углеродного субстрата. В процессе брожения накапливается пропионовая и уксусная кислота (5:1) и выделяется углекислый газ.

3. ЧАСТНАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ ПЕРВИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ. ПОЛУЧЕНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ

БИОТЕХНОЛОГИЯ ИТАКОНОВОЙ КИСЛОТЫ

ИТАКОНОВАЯ КИСЛОТА ($\text{CH}_2\text{OH}(\text{CHOH})\text{COOH}$) – ненасыщенная двухосновная кислота. Итаконовая кислота – важный промежуточный продукт при получении полимеров, синтетических волокон и смол, адгезивных средств, ПАВ, красителей и др.

СИНТЕЗ ИТАКОНОВОЙ КИСЛОТЫ связан с реакциями цикла Кребса: исходным продуктом является цис-аконитовая кислота, которая при декарбоксилировании в результате перемещения электронов и перехода двойной связи из положения 2,3 в положение 3,4 превращается в итакановую кислоту.

Получение итаконовой кислоты осуществляют поверхностным и глубинным способами.

В качестве **продуцентов** используют отселектированные грибные штаммы рода *Aspergillus itaconicus* и *A. terreus*.

Среды характеризуются высокими концентрациями сахаров при дефиците фосфора и железа. Особенностью получения данной кислоты является высокая потребность продуцента в солях цинка, магния и меди.

При **поверхностной ферментации** в течение 10–12 сут. образуется около 60 % продукта, доля целевой кислоты в смеси кислот – свыше 90 %.

В отличие от лимонной, итаконовая кислота – токсичный продукт, при ее концентрации около 7 % рост продуцента угнетается, а скорость продукции кислоты снижается. Токсичность кислоты нейтрализуют дробными добавками гидроксида аммония (рН 3,5–3,8).

При **глубинной ферментации** конечная концентрация итаконовой кислоты ниже 4–6 %.

Товарный продукт – кристаллическая итаконовая кислота 92 % концентрации, остальное – влага (3–6 %) и другие кислоты (1–3 %).

БИОТЕХНОЛОГИЯ ГЛЮКОНОВОЙ КИСЛОТЫ

ГЛЮКОНОВАЯ КИСЛОТА — одноосновная пентокислота, получаемая при ферментативном окислении глюкозы с помощью глюкозооксидазы. Данную кислоту применяют в качестве комплексообразователя, для борьбы с ржавчиной, при производстве моющих средств; кальций-, железо- и калийные соли глюконовой кислоты используют в медицине и пищевом производстве.

Продуценты глюконовой кислоты — грибы рода *Penicillium* и *Aspergillus*.

Ферментацию осуществляют поверхностным и глубинным способами.

Применяют **среды** с высоким содержанием углеводов (до 30–35 %): мальтоза, манноза, маннит. При работе с концентрированными растворами глюкозы к среде добавляют соединения бора и мел. Кроме того, в состав среды входят: сульфат магния, фосфат калия, источник азота и углекислый кальций.

Процесс завершается при остаточной концентрации сахара 1 %.

Готовый продукт — кристаллические соли — глюконаты.

БИОТЕХНОЛОГИЯ ФУМАРОВОЙ КИСЛОТЫ

ФУМАРОВАЯ КИСЛОТА (HOOC-CH=CH-COOH) – транс-изомер этилен-дикарбоновой кислоты, легко превращается в ангидрид малеиновой кислоты, имеющий большое значение в производстве синтетических смол, красок, лаков. Смолы данной кислоты применяют при производстве печатных красок. Ее магниевые и натриевые соли используют в медицине.

Фумаровая кислота – метаболит цикла трикарбоновых кислот. Ее образование из глюкозы отражает уравнение:



Продуцентом кислоты являются разные виды плесневых грибов *Penicillium*, *Aspergillus* и *Rhizopus*.

Среды содержат глюкозу в концентрации 5–10 %, а также лимитирующие факторы – азот и цинк.

Ферментация реализуется в условиях интенсивной аэрации поверхностным или глубинным способом на глюкозосодержащих субстратах. Ферментация включает две фазы: в первой фазе при росте мицелия культуру обеспечивают полноценной средой, содержащей азот, а во второй – при образовании кислоты мицелий обеспечивают средой, содержащей только источник углерода. В ходе ферментации проводят нейтрализацию среды углекислым кальцием или раствором щелочи. Максимальный выход кислоты – 58 %.

4. ПОНЯТИЕ О ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТАХ

ВТОРИЧНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ (ИДИОЛИТЫ) – низкомолекулярные соединения, не требующиеся для роста в чистой культуре. Они производятся ограниченным числом таксономических групп биообъектов.

БИОСИНТЕЗ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ имеет двухфазный характер:

- ✓ **первая фаза развития (тропофаза или фаза сбалансированного роста):** в культуре продуцента происходит быстрое накопление биомассы, сопровождающееся интенсивным потреблением компонентов субстрата, некоторым снижением значения рН среды в результате образования кислых продуктов. Биосинтез антибиотика в этот период не происходит или осуществляется в незначительном количестве;
- ✓ **вторая фаза (идиофаза или фаза несбалансированного роста)** характеризуется снижением общего количества биомассы. В этот период еще происходит образование новых клеток, но в культуре начинают преобладать автолитические процессы, что приводит к снижению общего количества биомассы. Среда обогащается продуктами обмена и продуктами автолиза клеток, возрастает значение рН среды, происходит бурный процесс биосинтеза антибиотика.

Считают, что в конце трофофазы изменяется энзиматический статус клеток, появляются индукторы вторичного метаболизма, освобождающие гены вторичного метаболизма из-под влияния катаболитной репрессии. В этой связи любые механизмы, тормозящие клеточную пролиферацию и активный рост, стрессовые ситуации, активируют процесс образования антибиотиков. Во второй фазе ферментацию ведут на продуктивной среде.

5. ПОНЯТИЕ ОБ АНТИБИОТИКАХ: ИСТОРИЯ, КЛАССИФИКАЦИЯ, БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ, МЕХАНИЗМЫ БИОСИНТЕЗА

АНТИБИОТИКИ – специфические продукты жизнедеятельности организмов, их модификации, обладающие высокой физиологической активностью по отношению к определенным группам микроорганизмов (бактериям, грибам, водорослям, протозоя), вирусам и злокачественным новообразованиям, избирательно задерживающих их рост или полностью подавляющих развитие.

Термин «антибиотики» предложен А. Вюиеном в 1889 г., для обозначения действующего агента антибиоза.

В конце XIX в. русские ученые Манассея В.А. и Полотебнов А.Г. показали, что грибы из рода *Penicillium* способны задерживать в условиях *in vivo* развитие ряда кожных заболеваний человека.

Первые антибиотики были выделены еще до того, как стала известной их способность угнетать рост микроорганизмов. В 1860 г. получен в кристаллическом виде пиоцианин, вырабатываемый палочковидными бактериями рода *Pseudomonas*, но его антибиотические свойства обнаружены через много лет.

Постепенно выяснилось, что антибиоз имеет химическую природу и обусловлен выработкой специфических химических соединений.

В 1929 г. А. Флеминг, наблюдая антагонизм *Penicillium notatum* и стафилококка в смешанной культуре, открыл пенициллин и предположил возможность его применения в лечебных целях. Только в 1940 г. пенициллин удалось выделить в кристаллическом виде.

В 1937 г. О. Вельш описал первый антибиотик актиномицетного происхождения – актиномицин, в 1939 г. Красильниковым Н.А. и Кореняко А.И. получен линцетин и Дюбо-тиротрицин. К моменту получения пенициллина в очищенном виде было известно 5 антибиотических веществ.

В 1942 г. Х. Флори с сотр. повторно исследовал пенициллин и доказал возможность его клинического применения в терапии многих острых инфекций.

З. Ваксман со своими студентами в Университете Ратджерса (США), занимаясь актиномицетами (*Streptomyces*), в 1944 г. открыл стрептомицин, эффективное средство для лечения туберкулеза.

Изучение антибиотиков в СССР начато под руководством З.В. Ермоловой в 1942 г. в лаборатории биохимии микробов Всесоюзного института экспериментальной медицины (Москва) получен первый отечественный пенициллин – крустозин.

ПРИЧИНЫ ПОИСКА НОВЫХ АНТИБИОТИКОВ

- ✓ многие антибиотики – незаменимые лекарственные средства, широко применяющиеся при лечении разных инфекционных заболеваний, которые ранее считались неизлечимыми или сопровождались высоким летальным исходом;
- ✓ антибиотики – необходимы в сельском хозяйстве как лекарственные препараты животноводстве, птицеводстве, пчеловодстве и растениеводстве, а отдельные антибиотики применяют в качестве стимуляторов роста животных;
- ✓ при широком применении антибиотиков в качестве лекарственных препаратов происходит быстрое накопление резистентных к ним форм микроорганизмов;
- ✓ некоторые антибиотики с успехом применяются в пищевом производстве в качестве консервантов скоропортящихся продуктов;
- ✓ антибиотики – новые, ранее не известные по химическому строению соединения – представляют огромный интерес для специалистов в области химии природных соединений, изучение их структуры, синтез некоторых из них способствовал бурному развитию химии, а, следовательно, и науки об антибиотиках;
- ✓ антибиотики нашли широкое применение в научных исследованиях в качестве веществ, используемых при изучении отдельных сторон метаболизма организмов, расшифровки молекулярных механизмов биосинтеза белка, механизма функционирования мембран и других биохимических превращений как специфические ингибиторы определенных реакций;
- ✓ изучение путей образования антибиотиков способствует глубокому проникновению в механизмы синтетической деятельности их продуцентов, раскрытие основных этапов их метаболизма.

Первая теория исходит из того, что **образование антибиотиков следует рассматривать как специфическую особенность обмена веществ организмов, возникшую и закрепленную у них в процессе эволюционного развития.** Их синтез и выделение в окружающую среду при жизни организмов или после их отмирания – важнейший фактор в борьбе за существования видов. Такая точка зрения о роли антибиотиков широко распространена среди ведущих российских и зарубежных специалистов (Имженецкий, Красильников, Гаузе, Гроссбард, Брайэн, Гаррет, Торнтон и др.).

Биосинтез антибиотиков – наследственная особенность микроорганизмов, проявляющаяся в том, что каждый вид способен образовывать один или несколько вполне определенных, строго специфичных для него антибиотика. Вместе с тем известно, что одинаковые антибиотики могут образовываться несколькими видами организмов, а это нисколько не противоречит мысли о наследственно закрепленном свойстве микроорганизмов синтезировать определенные антибиотики. Выявление потенциальной возможности синтезировать в процессе жизнедеятельности антибиотики связано с условиями культивирования организмов. В одних условиях организм образует антибиотик, а в других – тот же организм при хорошем росте не будет обладать способностью его синтезировать. Однако такие явления наблюдаются в лабораторных условиях культивирования изучаемого организма, в условиях ограниченного или слишком богатого выбора источников питания.

Вторая точка зрения состоит в том, что **антибиотики, синтезируемые микроорганизмами, носят случайный характер, зависящий лишь от условий культивирования.** По мнению авторов (Ваксман и др.), образование антибиотиков – это не закрепленное свойство организма, проявляющееся только при развитии организма в специфической среде и при наличии особых внешних условий, поэтому антибиотики не имеют для продуцентов приспособительного значения, их образование не связано с эволюцией микроорганизмов. Эта точка зрения основывается на двух положениях:

1. не все микроорганизмы образуют антибиотики, что, однако, не мешает их широкому распространению в природе;
2. антибиотики, даже самые устойчивые, довольно быстро инактивируются в почве, в этом естественном местообитании большинства микроорганизмов. Только при максимальном насыщении почвы антибиотиками можно получить соответствующий биологический эффект.

ВАЖНЕЙШИЕ КЛАССЫ АНТИБИОТИКОВ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ

Класс	Типичные антибиотики	Продуценты	Объект воздействия	Механизм действия	Трудности терапевтического применения
β-Лактамные	Пенициллины, цефалоспорины	Грибы родов <i>Penicillium</i> , <i>Cephalosporum</i>	Грамположительные и грамотрицательные бактерии	Нарушение синтеза клеточной стенки	Аллергические реакции
Аминогликозидные	Стрептомицин, гентамицин, канамицин, тобрамицин, амикацин	Актиномицеты рода <i>Streptomyces</i> , бактерии родов <i>Micromonospora</i> , <i>Bacillus</i>	В основном грамотрицательные бактерии	Необратимое подавление синтеза белка	Токсическое действие на слуховой нерв и почки
Тетрациклины	Одноименные антибиотики	Актиномицеты рода <i>Streptomyces</i>	Грамположительные и грамотрицательные бактерии, риккетсии, хламидии, простейшие	Обратимое подавление синтеза белка	Распространение устойчивых штаммов
Макролиды	Антибактериальные: эритромицин. Противогрибковые и антипротозойные: полиены	Актиномицеты рода <i>Streptomyces</i> . То же	Грамположительные бактерии. Грибы, некоторые простейшие	То же. Нарушение плазматической мембраны	Токсичность
Полипептидные и депсипептидные	Полимиксины, грамицидины, бацитрацины	Различные микроорганизмы	В основном грамотрицательные бактерии	Механизм действия различен	Высокая токсичность

Классификация антибиотиков по направлению действия :

- ✓ антибактериальные, губительно действующие на грамположительные, грамотрицательные бактерии и антибиотики широкого спектра действия;
- ✓ противогрибковые;
- ✓ антипротозойные;
- ✓ противовирусные;
- ✓ противоопухолевые.

Классификация антибиотиков по химической структуре:

- ✓ ациклические;
- ✓ гетероциклические;
- ✓ макроциклические;
- ✓ ароматические;
- ✓ аминогликозидные;
- ✓ полипетазы;
- ✓ пенициллины;
- ✓ актиномицины;
- ✓ стрептоцины.

Классификация антибиотиков по молекулярному механизму действия:

- ✓ антибиотики, действующие на синтез бактериальной клеточной оболочки;
- ✓ антибиотики, нарушающие синтез белков;
- ✓ антибиотики, нарушающие синтез белков и порядок генетического кода;
- ✓ антибиотики, нарушающие синтез нуклеиновых кислот;
- ✓ антибиотики, нарушающие целостность цитоплазматической мембраны.

КЛАССИФИКАЦИЯ АНТИБИОТИКОВ

По биологическому происхождению	По механизму действия	По спектру действия	По химическому строению
Эубактерии род <i>Pseudomonas</i> : пиоционин, вискозин	Ингибирует синтез клеточной стенки (пенициллины, цефалоспорины)	Узкого спектра (пенициллины, цефалоспорины)	Ациклические соединения (микозамин, пирозамин)
Актиномицеты род <i>Streptomyces</i> : тетрациклины, стрептомицины, эритромицин род <i>Micromonospora</i> : гентамицины, сизомицин	Нарушают функцию мембран (нистатин, кандицин)	Широкого спектра (тетрациклины, хлорфеникол, гентамицин, тобрамицин)	Алициклические соединения (актидион, туевая кислота). Тетрациклины
Цианобактерии малинголид	Подавляет синтез РНК (канамицин, неомицин) и синтез ДНК (актидион, эдеин)	Противотуберкулезные (стрептомицин, канамицин)	Ароматические соединения (галловая кислота, хлорамфеникол). Хиноны
Грибы пенициллины	Ингибиторы синтеза пуринов и пиримидинов (азасерин)	Противогрибковые (нистатин, кандицин)	Кислородсодержащие гетерциклические соединения (пеницилловая кислота, карлинаоксид).
Лишайники, растения, водоросли усниновая кислота, хлореллин	Подавляет синтез белка (канамицин, тетрациклины, эритромицин, хлорфеникол)	Противоопухолевые (адриамицин)	Макролиды (эритромицин)
Животного происхождения интерферон, экмолин	Ингибиторы дыхания (усниновая кислота, пиоционин). Ингибиторы окислительного фосфорилирования (валиномицин, олигомицин).	Противоамебные (фумагиллин)	Аминогликозиды (тобрамицин, гентамицин, стрептомицины). Полипептиды (грамицидин)

Классификация антибиотиков по направлению антимикробного действия:

- ✓ Бактерицидное (фунгицидное) действие (лактамы, аминогликозиды)
- ✓ Бактериостатическое (фунгиостатическое) действие (макролиды, тетрациклины, левомецетин)

Классификация антибиотиков в зависимости от источников получения:

1. Антибиотики, полученные из грибов рода *Penicillium* (пенициллины), *Cephalosporium* (цефалоспорины) и т.п.
2. Антибиотики, получаемые из актиномицетов (стрептомицин, эритромицин, левомецетин, нистатин и др.)
3. Антибиотики, продуцентами которых являются собственно бактерии (представители родов *Bacillus* и *Pseudomonas*)
4. Антибиотики животного происхождения
5. Антибиотики растительного происхождения (фитонциды лука, чеснока)
6. Синтетические антибиотики

НАПРАВЛЕНИЯ ПОИСКА НОВЫХ АНТИБИОТИКОВ

1. Испытание новых продуцентов: начиная с 80-х гг. XX в. исследуются миксобактерии, продуцирующие большое количество антимикробных агентов (Н. Thierbach, N. Reichenbach, 1981)

2. Химическая модификация антибиотиков: противомикробные макролиды токсичны для человека. Так, гептаен амфотерицин В, применяющийся при тяжелых микозах, вызывает необратимые поражения почек, поэтому получены метиловые эфиры амфотерицина, менее токсичные и сохраняющие противогрибковую активность.

3. Мутасинтез: применяют мутантные штаммы, у которых блокирован синтез отдельных фрагментов молекулы антибиотика. В среду вносят аналоги этих фрагментов, которые микроорганизм использует для биосинтеза модифицированного антибиотика.

4. Клеточная инженерия: получают гибридные антибиотики, например, с новыми комбинациями агликона и сахаров.

5. Генетическая инженерия: введение в геном микроорганизма информации о ферменте, необходимом для модификации продуцируемого антибиотика.

ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ ПОИСКА АНТИБИОТИКОВ

- ✓ Выделение микробов-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 химико-терапевтической эффективности антибиотиков
- ✓ Идентификация антибиотиков

ПРОДУЦЕНТЫ АНТИБИОТИКОВ

- ✓ Неспорообразующие бактерии (*Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*)
- ✓ Спорообразующие бактерии (*Bacillus subtilis*, *B. polymixa* и др.)
- ✓ Актиномицеты
- ✓ Грибки
- ✓ Водоросли
- ✓ Лишайники
- ✓ Высшие растения
- ✓ Животные

СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ АНТИБИОТИКОВ

- ✓ Биологический синтез.
- ✓ Химический синтез.
- ✓ Комбинированный способ.

ПУТИ ПОВЫШЕНИЯ ВЫХОДА АНТИБИОТИКОВ

1. Прямая ферментация – продуцента с подходящим предшественником, что индуцирует синтез ферментов вторичного метаболизма в идиофазе. Точный механизм индуцирования первичными метаболитами генов, кодирующих синтез ферментов вторичного метаболизма, не расшифрован, но установлено, что молекулы предшественника необходимо добавлять в среду в период фазы роста продуцента. Вводимый предшественник должен лимитировать скорость биосинтеза антибиотика.

2. Биосинтез антибиотиков с помощью блокированных мутантов, у которых отсутствует определенное звено в цепи реакций, ведущих к синтезу антибиотиков. Блокированные мутанты не способны образовывать нужный антибиотик. Используя низкую субстратную специфичность ферментов вторичного метаболизма и вводя аналоги предшественников антибиотиков, последние переводят в аналоги самого антибиотика в ходе процесса, известного как **мутационный биосинтез (мутасинтез)**.

3. Пути создания высокоактивных штаммов продуцентов антибиотиков с помощью рДНК-биотехнологии. Большой эффект в получении антибиотиков обеспечивает технология рДНК. С ее помощью можно создавать новые антибиотики с уникальной структурой, оказывающие более сильное воздействие на определенные микроорганизмы и обладающие минимальными побочными эффектами. Кроме того, генно-инженерные подходы могут применяться для увеличения выхода антибиотика и соответственно для снижения его стоимости.

БИОТЕХНОЛОГИЯ ПЕНИЦИЛЛИНА

Пенициллины относятся к β -лактамным антибиотикам. Все пенициллины имеют одинаковое строение основной группы, представленной тиазолидиновым кольцом, соединенным с β -лактамным кольцом, имеющим аминогруппы – 6-аминопенициллановая кислота.

КЛАССИФИКАЦИЯ ПЕНИЦИЛЛИНОВ

- ✓ обладающие высокой активностью в отношении грамположительных микроорганизмов и слабой в отношении грамотрицательных видов, гидролизуются 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 разрушаемые β -лактамазами (карбенициллин, тикарциллин);
- ✓ относительно кислотоустойчивые, пригодные для перорального применения (пенициллин V, ампициллин, клоксациллин).

БИОТЕХНОЛОГИЯ ПЕНИЦИЛЛИНА

Для производства пенициллина применяют специально отобранные расы плесневых грибов рода *Penicillium crysogenum*.

Среда для производства пенициллина содержит (%): кукурузный экстракт (2–3), глюкозу (2) легко усваиваемую лактозу (1), сульфат аммония, фосфаты (0,5 – 1), производные фенилуксусной кислоты (0,3–0,6), гидрол, натрия сульфат. После стерилизации и охлаждения среду засевают проросшими спорами гриба.

Температуру культивирования поддерживают в пределах 24–25 °С.

Подготовка посевного материала: споры размножают на пшене во флаконах при температуре 24–25 °С в течении 4–5 сут. Полученным споровым материалом засевают инокуляторы, затем посевные аппараты (12–18 ч).

При **ферментации** необходимо соблюдение условий асептики, аэрации и перемешивания.

После окончания ферментации мицелий гриба отделяют фильтрованием или центрифугирование. Осадок на фильтре (мицелий гриба) промывают водой для максимального выхода пенициллина.

Из культуральной жидкости антибиотик в виде кислоты выделяют экстракцией неполярными органическими растворителями (аминоацетатом, хлороформом, бутилацетатом, бутанолом и др.).

Очистку антибиотика проводят путем замены растворителей. Выделенный пенициллин в виде кислоты переводят в водный раствор в виде соли, добавляя щелочь. Повторяя эти операции, пенициллин концентрируют и очищают.

Большинство пенициллинов производят в виде натриевых и калиевых солей. Новокаиновые и бензатиновые соли являются основой пролонгированных препаратов пенициллина для внутримышечного введения.

В кристаллическом виде пенициллиновые соли стабильны в течение длительного времени при температуре 4 °С. Растворы быстро теряют активность (в течение 24 ч при 20 °С), поэтому их готовят непосредственно перед введением.

БИОТЕХНОЛОГИЯ ЦЕФАЛОСПОРИНА

По химическому строению цефалоспорины относятся к β -лактамным соединениям, конденсированное с шестичленным гетероциклом.

Цефалоспорины действуют бактерицидно, что связано с их угнетающим влиянием на образование клеточной стенки.

По противомикробному спектру цефалоспорины относятся к антибиотикам широкого спектра действия. Цефалоспорины, в отличие от пенициллинов, устойчивы к β -лактамазе, подавляют развитие грамположительных и грамотрицательных бактерий, но активность этого антибиотика ниже пенициллина.

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 бактерииды

4. Парентерально – цефепим. Действуют на грамположительные синегнойная палочка и другие грамотрицательные микроорганизмы

БИОТЕХНОЛОГИЯ ЦЕФАЛОСПОРИНА

В процессе развития *Cephalosporinum acremonium* наряду с цефалоспорином С синтезируется и пенициллин N. Его образование происходит тем же путем, что и изопенициллина N при биосинтезе бензилпенициллина. Через ряд стадий из изопенициллина N образуется цефалоспорин С.

Продуцент целоспоринов может расти на средах, содержащих белки (соевую муку, сухие дрожжи, жмыхи). Кроме того, в среду добавляют аммонийные соли и фосфор.

Посевной материал сначала готовят в качалочных колбах, затем переносят в инокулятор, а после в ферментер (70 ч).

Ферментация осуществляется глубинным способом, в условиях асептики, постоянной аэрации и непрерывного перемешивания, при температуре 26–28 °С, в течение 7–8 сут.

Постферментационная стадия, связанная с выделением и очисткой цефалоспоринов, осуществляется по той же схеме, что и в случае пенициллинов.

БИОТЕХНОЛОГИЯ НИЗИНОВ

Низин выделяют из культуры молочнокислого стрептококка (*Streptococcus lactis*).

Низин подавляет развитие ряда грамположительных и некоторых кислотоустойчивых бактерий, не оказывает влияния на грамотрицательные бактерии, дрожжи и плесневые грибы; не оказывает действия на *E. coli*, *Salmonella typhi*, *Shigella* и некоторые виды *Neisseria*. Получены данные о его активности в отношении малярийного плазмодия.

Низин не используется в медицине, но с успехом применяется в ветеринарии, в пищевом производстве в качестве консерванта.

Низин имеет мол. м. 3500, может полимеризоваться с образованием димера (мол. м. 7000) и тетрамера.

В состав его молекулы входят 30 аминокислотных остатков : лизина, гистидина, аспарагиновой кислоты, серина, пролина, глицина, аланина, валина, метионина, изолейцина, лейцина, остатков редко встречающихся серосодержащих аминокислот (лантионин, β -метиллантионин) и ненасыщенных аминокислот (дегидроаланин, β -метилдегидроаланин).

Биологическая активность низина обусловлена наличием в его молекуле α -, β -ненасыщенных аминокислот (дегидроаланин, β -метилдегидроаланин). Низин влияет на споры чувствительных к нему бактерий, которые более богаты катионами по сравнению с вегетативными клетками, выступая в качестве катионитного детергента. Низин, адсорбируясь на поверхности спор, в момент их прорастания нарушает проницаемость цитоплазматической мембраны и подавляет рост развивающихся клеток. Он способен реагировать с сульфгидрильными группами биологически важных соединений, выводя их из реакций метаболизма.

6. БИОТЕХНОЛОГИЯ АНТИБИОТИКОВ

В средах, содержащих недостаточное для нормального развития количество азота, сильно снижается рост стрептококка и образование антибиотика. Лучшими азотсодержащими компонентами в средах являются дрожжевой автолизат, пептон и казеиновый гидролизат.

Источник углерода – глюкоза. Добавление к среде с глюкозой двух-, трех-, четырех- и пятиуглеродных органических кислот способствует повышению роста продуцента и увеличению образования низина.

При засеве свежей среды культурой *Streptococcus lactis* вместе с посевным материалом вносится и низин.

Снижение общего количества низина в лаг-период развития *S. lactis* и синтез антибиотика в более поздний период роста подтверждает значение низина в качестве важной части бактериального ростового цикла стрептококка. Снижение синтеза антибиотика к концу периода лаг-фазы обусловлено изменением третичной структуры или степени полимеризации антибиотика. Инактивации низина можно избежать путем введения в среду казеина.

У низина в отличие от других полипептидных антибиотиков путь синтеза сходен с путем образования белков. Синтез низина идет через образование низиноподобных белков. Причем превращение пренизина в низин происходит под действием фермента на внешней поверхности клетки стрептококка.

Предварительная обработка культуральной жидкости и клеток продуцента осуществляется путем фильтрации.

Антибиотик почти полностью переходит из клеток в культуральную жидкость, из которой его выделяют путем экстракции растворителями, не смешивающимися с жидкой фазой, осадения в виде нерастворимого соединения или сорбции ионообменными смолами.

Первичной операцией выделения низина является перевод в фазу, из которой целесообразно его изолировать. При этом антибиотик, содержащийся в культуральной жидкости, и клетках, переводят в осадок, из которого его экстрагируют. Отделение нативного раствора от биомассы и взвешенных частиц проводят путем фильтрации или центрифугирования.

К методам очистки низина относятся: экстракция, ионообменная сорбция и осаждение.

Еще одной стадией очистки является концентрирование полученных растворов. Заключительная стадия получения низина – сушка, получение готовой продукции и фасовка. Расфасованный и упакованный антибиотик с указанием показателя биологической активности, даты выпуска и срока годности поступает в продажу.

БИОТЕХНОЛОГИЯ СТРЕПТОМИЦИНА

Стрептомицин относится к группе аминогликозидных антибиотиков.

Стрептомицин образуется в процессе жизнедеятельности лучистых грибов *Streptomyces globisporus*, *Streptomycini* или других родственных микроорганизмов. Культуры актиномицетов переменны и каждому штамму должна соответствовать определенная среда и свой режим развития. На их изменчивость влияют условия культивирования и особенно состав сред. Изменчивость продуцентов стрептомицина – результат генетической их нестабильности, обусловленный перестройками ДНК, затрагивающих многие гены, в том числе гены биосинтеза антибиотиков и гены устойчивости к ним.

Стрептомицина сульфат обладает широким спектром антимикробного действия. Он активен в отношении микобактерий туберкулеза и большинства грамотрицательных микроорганизмов; менее активен в отношении стрептококков, пневмококков; не действует на анаэробы, риккетсии и вирусы. Стрептомицин действует бактерицидно.

Стрептомицина сульфат применяют в качестве противотуберкулезного препарата для лечения туберкулеза легких и туберкулезных поражений других органов.

Стрептомицин назначают при гнойно-воспалительных процессах разной локализации, вызванных грамположительными и грамотрицательными микроорганизмами.

При лечении стрептомицином могут наблюдаться токсические и аллергические реакции. Наиболее серьезными осложнениями являются поражение VIII пары черепных нервов и связанные с этим вестибулярные расстройства и нарушения слуха. При длительном применении больших доз может развиваться глухота.

6. БИОТЕХНОЛОГИЯ АНТИБИОТИКОВ

Для производства стрептомицина применяют штамм *Streptomyces griseus*, образующего воздушный мицелий и споры.

Основными компонентами сред при получении стрептомицина являются: соевая мука, гидрол и аммонийные соли. Среду стерилизуют при температуре 120 °С, охлаждают и засевают посевным материалом.

При развитии продуцента различают 2 стадии. На первой стадии происходит быстрый рост и развитие продуцента. В среде происходит увеличение содержания аммонийного азота, обусловленное разложением белков соевой муки. Величина рН вначале снижается, 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. величина рН с 7,9 уменьшается до 6,7, на 4–5-е сут. – вновь возрастает до 7,7. Вторая стадия характеризуется максимальным образованием стрептомицина.

Ферментация проводится при температуре 27–29 °С, сопровождается аэрацией, и перемешиванием.

В культуральной жидкости находятся минеральные вещества, белки, нуклеиновые кислоты, аминокислоты, полисахариды, жиры, стрептомицин и др. Основная часть стрептомицина выделяется в культуральную среду, но часть его остается в мицелии и на его поверхности. 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, а культуральную жидкость обрабатывают щавелевой кислотой. При этом достигается удаление белков и органических оснований, ионов металлов.

Для выделения стрептомицина из культуральной жидкости используют адсорбцию или ионообменную хроматографию. В основу первого метода положена адсорбция стрептомицина из фильтрата на активированном угле при нейтральном или слабощелочном значении рН среды. Десорбцию антибиотика проводят разбавленным спиртовым раствором соляной кислоты. Затем его нейтрализуют и концентрируют. Полученный концентрат обрабатывают ацетоном, осаждающим солянокислый стрептомицин. Смесь фильтруют. К безводному спиртовому раствору соли стрептомицина добавляют спиртовой раствор хлористого кальция, чтобы получить кристаллическую соль.

В асептических условиях соль стрептомицина растворяют в воде, пропускают через бактериальный фильтр, лиофильно высушивают, измельчают в порошок и фасуют.

БИОТЕХНОЛОГИЯ НЕОМИЦИНА

Неомицины – основания, хорошо растворимые в воде и нерастворимые в органических растворителях, наибольшая активность проявляется в щелочной среде.

На синтетической среде актиномицет развивается лучше, чем на среде с соевой мукой. Однако, его биосинтез на синтетической среде почти в 8 раз ниже, чем на натуральной. К веществам, способствующим повышению выхода неомицина на 50 % относятся: ауксин и α -нафталилуксусная кислота.

Степень аэрации культуры должна быть несколько ниже, чем при выработке стрептомицина.

Неомициновый комплекс не теряет антимикробных свойств при длительном хранении (до 2 лет) в виде растворов и в твердом состоянии.

Антимикробный спектр сходен со спектром стрептомицина, но неомицин подавляет развитие штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, устойчивых к стрептомицину; малоактивен в отношении большинства видов *Clostridium*, *Streptococcus*, грибов, вирусов и протозоа.

Чувствительные к неомицину микроорганизмы приобретают устойчивость к нему в меньшей степени, чем к стрептомицину.

При применении неомицина следует учитывать его токсичность. Степень токсичности колеблется в зависимости от состава неомицинового комплекса и чистоты лекарственного препарата.