

# 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*).

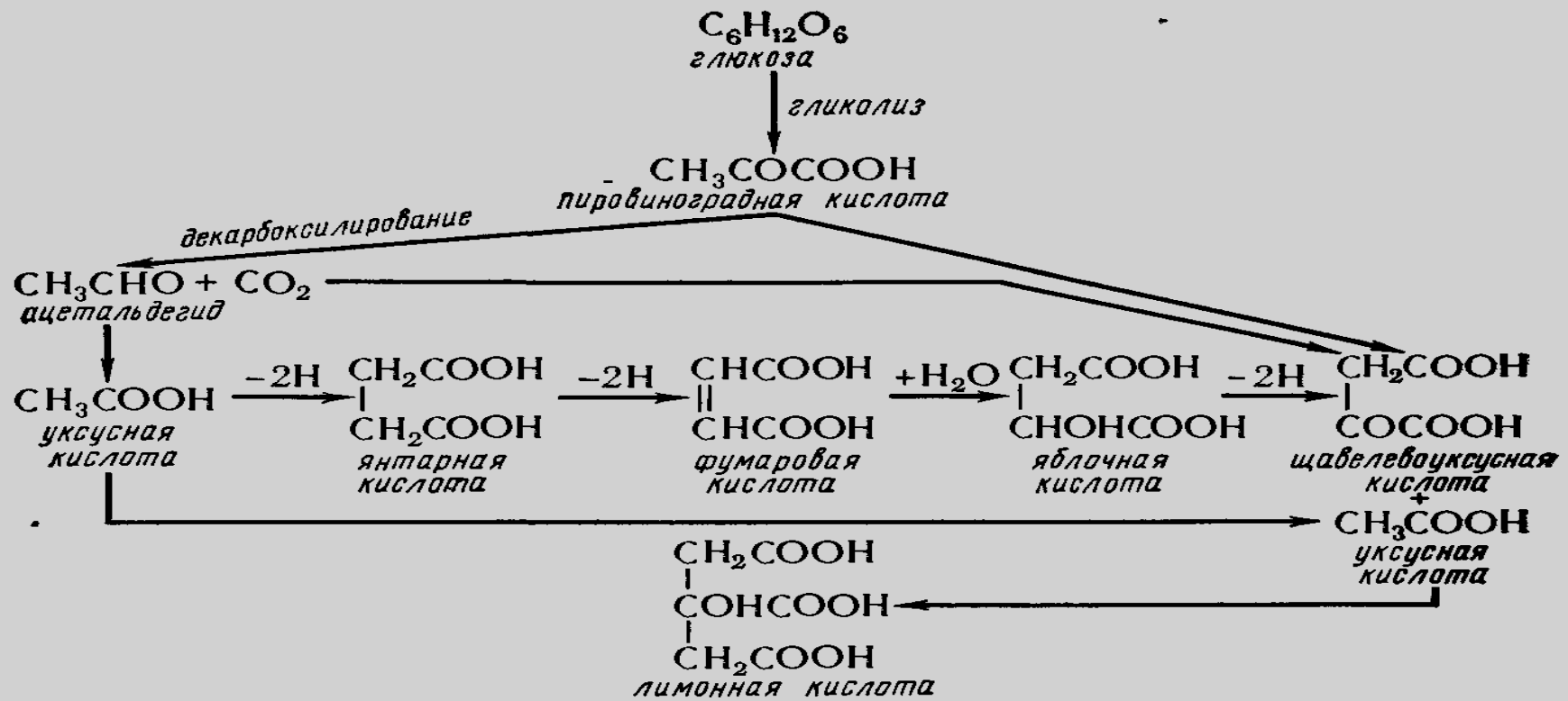
Способы ферментации в биотехнологическом производстве органических кислот: поверхностные жидко- и твердофазные процессы, а также глубинные, включая проточные культуры.

## БИОТЕХНОЛОГИЯ ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ

**ЛИМОННАЯ КИСЛОТА** ( $\text{CH}_2\text{--COOH--CONHCOOH--CH}_2\text{COOH}$ ) – 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

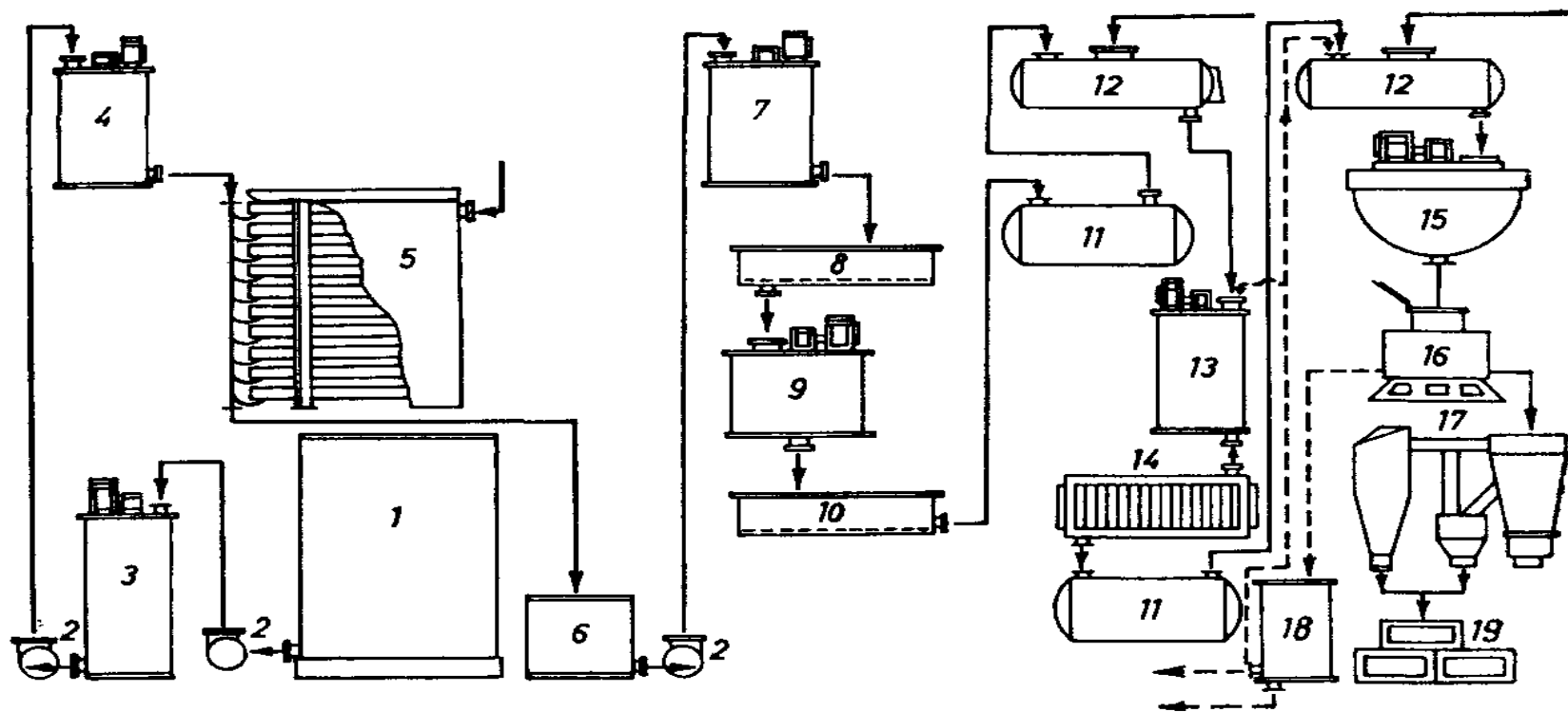


### 3. ЧАСТНАЯ BIOTEХНОЛОГИЯ ПЕРВИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ. ПОЛУЧЕНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ

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: бесменный, бесменный 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** ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) 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 подачи 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** ( $\text{CH}_2\text{OH}(\text{CHON})\text{COOH}$ ) – 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 (pH 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, протозоа), вирусам и злокачественным новообразованиям, избирательно задерживающих их рост или полностью подавляющих развитие.

Термин «антибиотики» предложен А. Вюименом 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
<b>Эубактерии</b> род <i>Pseudomonas</i> : пиоционин, вискозин	Ингибирует синтез клеточной стенки (пенициллины, цефалоспорины)	Узкого спектра (пенициллины, цефалоспорины)	Ациклические соединения (микозамин, пирозамин)
<b>Актиномицеты</b> 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
<b>Цианобактерии</b> малинголид	Подавляет синтез РНК (канамицин, неомицин) и синтез ДНК (актидион, эдеин)	Противотуберкулезные (стрептомицин, канамицин)	Ароматические соединения (галловая кислота, хлорамфеникол). Хиноны
<b>Грибы</b> пенициллины	Ингибиторы синтеза пуринов и пиримидинов (азасерин)	Противогрибковые (нистатин, кандицин)	Кислородсодержащие гетерциклические соединения (пеницилловая кислота, карлинаоксид).
<b>Лишайники, растения, водоросли</b> усниновая кислота, хлореллин	Подавляет синтез белка (канамицин, тетрациклины, эритромицин, хлорфеникол)	Противоопухолевые (адриамицин)	Макролиды (эритромицин)
<b>Животного происхождения</b> 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 (H. 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  $\beta$ -лактамным антибиотикам. Все пенициллины имеют одинаковое строение основной группы, представленной тиазолидиновым кольцом, соединенным с  $\beta$ -лактамным кольцом, имеющим аминогруппы – 6-аминопенициллановая кислота.

### КЛАССИФИКАЦИЯ ПЕНИЦИЛЛИНОВ

- ✓ обладающие высокой активностью в отношении грамположительных микроорганизмов и слабой в отношении грамотрицательных видов, гидролизуются  $\beta$ -лактамазами (пенициллин G);
- ✓ относительно резистентные к действию  $\beta$ -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  $\beta$ -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 усвояемую 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  $\beta$ -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  $\beta$ -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 *Cephalosporium 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,  $\beta$ -метиллантионин) и ненасыщенных аминокислот (дегидроаланин,  $\beta$ -метилдегидроаланин).

Биологическая активность низина обусловлена наличием в его молекуле  $\alpha$ -,  $\beta$ -ненасыщенных аминокислот (дегидроаланин,  $\beta$ -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 неустойчивости, 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  $\alpha$ -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.