

## Занятие семинарского типа № 1

**ТЕМА ЗАНЯТИЯ:** Биотехнология антибиотиков как сфера производства

### УЧЕБНЫЙ МАТЕРИАЛ

#### 1. Антибиотики

Вторичные метаболиты (идиолиты) – низкомолекулярные соединения, не требующиеся для роста в чистой культуре, производящиеся ограниченным числом таксономических групп, часто представляющие собой смесь близкородственных соединений, относящихся к одной и той же химической группе. К ним относятся: антибиотики, алкалоиды, гормоны роста, токсины и т.п.

Термин «антибиотик» был предложен в 1942 г. Ваксманом для обозначения веществ, образуемых микроорганизмами, обладающих антимикробным действием. Впоследствии многие исследователи предлагали свои формулировки данного термина, вкладывая в них слишком ограниченное содержание или чрезмерно расширяя это понятие.

В настоящее время под антибиотиками понимают химиотерапевтические вещества, полученные из микроорганизмов или иных природных источников, а также их полусинтетические аналоги и производные, обладающие способностью избирательно подавлять в организме больного возбудителей заболеваний и (или) задерживать развитие злокачественных новообразований.

Антибиотики представляют собой одну из самых многочисленных групп лекарственных средств. Они используются для предотвращения и лечения воспалительных процессов, вызванных бактериальной микрофлорой. В настоящее время существуют сотни лекарственных средств, избирательно воздействующих на возбудителей различных заболеваний. Областью воздействия антибиотиков являются: быстро прогрессирующие инфекции или бактериальное заражение жизненно важных органов, с которыми иммунная система не может справиться самостоятельно. Антибиотики незаменимы при остром развитии заболевания – ангины и пневмонии, а также при инфекционном воспалении, которое локализуется в закрытых полостях (отит, гайморит, остеомиелит, абсцесс, флегмона).

В настоящее время осуществляются широкомасштабные исследования по поиску антибиотиков нового поколения, эффективных при лечении вирусных и раковых заболеваний.

Кроме того, антибиотики применяются в сельском хозяйстве, прежде всего в качестве лекарственных препаратов в животноводстве, птицеводстве, пчеловодстве и растениеводстве, а отдельные антибиотические вещества используются как стимуляторы роста животных.

Некоторые из антибиотиков с успехом применяются в пищевом и консервном производствах в качестве консервантов скоропортящихся продуктов (свежей рыбы, мяса, сыра, различных овощей).

### **Классификации антибиотиков**

1. По спектру действия:
  - ✓ антибактериальные препараты, вызывающие гибель грамположительных (бензилпенициллин, ристомицин, новобиоцин) и грамотрицательных (полимиксин) бактерий, а также антибиотики широкого спектра действия (левомицетин, канамицин, мономицин, гентамицин);
  - ✓ противогрибковые антибиотики (нистатин, леворин, гризеофульвин);
  - ✓ противоопухолевые антибиотики, включающие в себя 6 групп: актиномицины, антракциклины, оливомицины, брунегмицины, блеомицины, интерфероны (стоталон, эленин).
2. По химической структуре:
  - ✓ ациклические антибиотики (нистатин, кандицин);
  - ✓ гетероциклические антибиотики (гризеофульвин);
  - ✓ макроциклические антибиотики (макролидазы, эритромицины);
  - ✓ ароматические антибиотики (гигромицин);
  - ✓ аминогликозидные антибиотики;
  - ✓ полипептазы (грамицидин, полимиксин);
  - ✓ пенициллины;
  - ✓ актиномицины;
  - ✓ стрептомицины.
3. По молекулярному механизму действия:
  - ✓ антибиотики, действующие на синтез бактериальной клеточной оболочки (пенициллины, ристомицин);
  - ✓ антибиотики, нарушающие синтез белков (тетрациклины, макролиды, левомицетин);
  - ✓ антибиотики, нарушающие синтез белков и порядок генетического кода (аминогликозиды);
  - ✓ антибиотики, нарушающие синтез нуклеиновых кислот (противоопухолевые);
  - антибиотики, нарушающие целостность цитоплазматической мембраны (противогрибковые).

К причинам поиска новых антибиотиков относятся:

- ✓ многие антибиотики являются незаменимыми лекарственными препаратами, широко применяющимися при лечении целого ряда инфекционных

заболеваний, ранее считавшихся неизлечимыми, сопровождавшихся летальным исходом (туберкулез, чума, холера, брюшной тиф и др.);

✓ антибиотики необходимы в сельском хозяйстве, прежде всего, в качестве лекарственных препаратов, применяющихся в животноводстве, птицеводстве, пчеловодстве и растениеводстве; некоторые антибиотики применяют в качестве стимуляторов роста животных;

✓ в результате широкомасштабного применения 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 (свежей рыбы, мяса, сыра, овощей);

✓ антибиотики – новые, ранее не известные по химическому строению соединения – представляют огромный интерес для специалистов в области химии природных соединений, изучение их структуры, а также синтез некоторых из них способствуют 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 тонких молекулярных механизмов биосинтеза белка, механизма функционирования мембран и других биохимических превращений в качестве специфических ингибиторов определенных реакций. Так, одни антибиотики (хлорамфеникол, пурамицин, тетрациклин) специфически ингибируют отдельные этапы биосинтеза белка на рибосомах, другие – синтез на разных уровнях нуклеиновых кислот (саркомицин подавляет активность полимераз, актиномицин, блеомицин, рубомицин и др. нарушают функции ДНК), третьи – образование клеточных стенок (пенициллины) и т.п.;

✓ изучение путей биосинтеза антибиотиков способствует глубокому проникновению в механизмы синтетической деятельности их продуцентов и раскрытию основных этапов их метаболизма.

В настоящее время описано свыше 6000 антибиотиков. Однако, только 2–3 % известных антибиотиков применяются в медицинской практике, а остальные вследствие высокой токсичности, инактивации в организме и других причин не используются.

Большинство антибиотиков выделено в ходе систематического скрининга микроорганизмов, а их количество существенно увеличено за счет химической модификации. При этом к основным целям модификации антибиотиков относятся:

✓ расширение спектра и повышение эффективности их действия;

✓ снижение их токсичности и устранение нежелательных побочных эффектов;

✓ создание их аналогов, устойчивых к разрушению микроорганизмами, обладающих большим временем «полужизни»;

✓ усовершенствование способов их введения.

Физиологическое значение антибиотиков для их продуцентов до конца неясно. Одни исследователи считают, что биосинтез антибиотика создает определенные преимущества микроорганизмам – продуцентам в борьбе за существование в природных популяциях. Согласно другой точки зрения, антибиотики представляют собой «отбросы» обмена веществ микроорганизмов, не имеющие приспособительного назначения.

Биосинтез антибиотиков, как и других вторичных метаболитов, как правило, происходит в клетках, прекративших рост (идиофаза). Биологическая роль их в обеспечении жизнедеятельности продуцентов остается до конца не изученной. Специалисты, изучающие перспективы биотехнологии в области микробиологического производства антибиотиков, полагают, что они в неблагоприятных условиях подавляют рост конкурирующих микроорганизмов, обеспечивая, тем самым, более благоприятные условия для выживания микроорганизма – продуцента того или иного антибиотика. Значение процесса антибиотикообразования в жизнедеятельности микробной клетки подтверждается тем, что у стрептомицетов около 1% геномной ДНК приходится на долю генов, кодирующих ферменты биосинтеза антибиотиков, которые в течение продолжительного времени могут не экспрессироваться.

Одним из наиболее богатых источников антибиотиков является почвенная микрофлора. В почвенных микроэкосистемах сильно развита конкуренция между их обитателями. При этом антибиотики входят в тот природный «арсенал», который необходим для захвата экологической ниши. Образцы почв из разных регионов мира постоянно анализируют в поисках новых антибиотиков. Одним из самых активных продуцентов антибиотиков является род *Streptomyces*, к которому принадлежат многие актиномицеты.

При оптимизации любого технологического процесса, протекающего с участием живых организмов, основные усилия, как правило, направлены на улучшение их генетически обусловленных свойств. Традиционно для увеличения продуктивности микробных штаммов используют мутагенез с последующим скринингом и отбором наиболее подходящих вариантов. До «эры» генетической инженерии ценные для производства антибиотиков штаммы с повышенной продуктивностью получали в основном с помощью мутагенеза и селекции природных микроорганизмов. Так, в результате селекции и улучшения техники ферментации выход пенициллина достиг 20 г/л, что в 10 тыс. раз выше уровня, свойственного для исходного «дикого» штамме *Penicillium*.

### **Продуценты антибиотиков**

Большинство антибиотиков были выделены в ходе систематического скрининга микроорганизмов.

Одним из богатых источников антибиотиков являются организмы, обитающие в почве. В почвенных микроэкосистемах очень развита конкуренция между обитателями, а антибиотики входят в тот природный «арсенал», кото-

рый необходим для захвата экологической ниши. Образцы почв из разных районов мира постоянно анализируют в поисках новых антибиотиков.

Одним из продуктивных источников антибиотиков является род *Streptomyces*, к которому относятся многие актиномицеты. У них обнаружено и идентифицировано свыше 500 видов антибиотиков.

К основным этапам поиска антибиотиков относятся:

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

Основными продуцентами антибиотиков являются актиномицеты, плесневые грибы, бактерии. Некоторые из этих микроорганизмов способны продуцировать большое количество антибиотиков. В частности, 6 родов filamentозных грибов производит около 1000 разных антибиотиков, в том числе пенициллин и цефалоспорин, а 3 рода актиномицетов – 3000 антибиотиков.

При этом способностью вырабатывать антибиотики обладают не все микроорганизмы, а лишь некоторые штаммы отдельных видов.

Существуют определенные количественные или качественные различия между штаммами продуцентов антибиотиков. Например, один штамм обеспечивает максимальный выход антибиотика, когда развивается на поверхности плотной среды и находится в стационарных условиях, а другой – лишь, когда его культура погружена в жидкую среду и постоянно встряхивается.

Некоторые микроорганизмы выделяют не один, а несколько антибиотиков. Так, *Pseudomonas aeruginosa* образует пиоцианазу, пиоцианин, пиолипоевую кислоту и другие пиосоединения, *Bacillus brevis* – грамицидин и тиротрицин и т.п.

Один и тот же антибиотик может продуцироваться микроорганизмами разных родов. Так, глиотоксин образуют виды *Gliocladium*, *Trichoderma*, *Aspergillus fumigatus* и др.

Разные микроорганизмы или их штаммы могут вырабатывать разные химические формы одного и того же антибиотика.

В последние годы выделено и описано огромное число антибиотиков, продуцируемых различными микроорганизмами.

К основным продуцентам антибиотиков относятся:

1. Неспорообразующие бактерии. Так, из группы бактерий рода *Pseudomonas aeruginosa*, выделены пиоцианин и пиоцианазу.

2. Спорообразующие бактерии. Многие виды спорообразующих бактерий вырабатывают различные антибиотики. Так, штаммы *Bacillus subtilis* производят бацитрацин, субтилилин и др.; *B. brevis* – тиротрицин, *B. polymixa* – полимиксин (аэроспорин).

3. Актиномицеты. Кроме пенициллина, наиболее важные антибиотики, применяющиеся в качестве химиотерапевтических средств, были получены из актиномицетов. К настоящему времени выделено и описано более 200 таких соединений (стрептомицин, тетрациклины, эритромицин, новобиоцин, неомицин и др.).

4. Грибки являются одним из наиболее важных продуцентов антибиотиков (цефалоспорин, гризеофульвин, микофеноловая кислота, пенициллиновая кислота, глиотоксин, клавацин, аспергилловую кислоту и др.).

5. Водоросли. Многие водоросли способны вырабатывать вещества, обладающие антибиотическими свойствами. Однако, пока ни одно из них не нашло применения в клинической практике.

6. Лишайники. К антибиотикам, вырабатываемым лишайниками, относятся лихенин и усниновая кислота.

7. Высшие растения. Высшие зеленые растения также образуют антибактериальные вещества, сходные по своим свойствам с истинными антибиотиками. К ним относятся фитонциды (аллицин, томатин и др.).

8. Животные. Среди продуктов животного происхождения, обладающих антибактериальными свойствами, важное место занимает лизоцим. Многие простейшие, личинки насекомых и др. могут переваривать живые бактерии и грибки. Однако, до сих пор не ясно, в какой степени данная способность связана с выработкой веществ, обладающих антибиотическими свойствами.

Для выделения микроорганизмов, образующих антибиотики, берут пробу почвы, ее высушивают до воздушно-сухого состояния и делают посевы на специальные среды.

Выделенные культуры микроорганизмов-антагонистов изучают по содержанию в них антибиотиков. При этом хроматографически определяют наличие известных антибиотиков. В случае, если обнаруживают новый антибиотик, то вначале осуществляют его первичное выделение и очистку, определяют токсичность и химико-терапевтические свойства на животных, зараженных возбудителями разных заболеваний.

Выделенные штаммы продуцентов антибиотиков часто вариабельны и нестабильны, поэтому с помощью селекции отбирают наиболее перспективные формы, а затем проводят отбор мутантов. Мутанты культивируют на богатой по составу среде. Процесс контролируют по концентрации биомассы или по концентрации питательных веществ в среде.

После получения антибиотика, проверяют их активность в отношении тест-штаммов. При этом существует большое разнообразие методов определения активности антибиотиков. Однако, основным методом, как правило, является микробиологический.

Способность убивать или тормозить развитие микроорганизмов называют биологической активностью лекарственного препарата. При этом различают цидное и статическое действие веществ. При определении активности выделенного антибиотика обычно в качестве эталона используют химически чистый препарат с заранее известной величиной активности. Опреде-

ление активности антибиотика проводят методом серийных разведений в жидких или плотных средах или методом диффузии антибиотика в агар. Кроме микробиологического метода контроля, применяют химические и физико-химические методы (колориметрический, хроматографический, спектрофотометрический и др.).

## **2. Биотехнологическое производство антибиотиков**

### **Структура биотехнологического производства антибиотиков**

Подготовка питательной среды. При разработке биотехнологического производства антибиотиков учитывают общие свойства их продуцентов, а также то обстоятельство, что каждый антибиотик является конечным продуктом длинной цепи специфических ферментативных реакций.

Продуценты большинства антибиотиков, в том числе и ценных для клинической практики, являются аэробами или реже факультативными анаэробами.

Процесс развития микроорганизмов – продуцентов антибиотиков имеет двухфазный характер:

Первая фаза (трофофаза или фаза сбалансированного роста) характеризуется тем, что происходит быстрое накопление биомассы продуцента антибиотика, сопровождающееся интенсивным потреблением основных компонентов субстрата (источников углерода, азота, фосфора и др.), некоторым снижением значения рН среды вследствие образования кислых продуктов. В этот период биосинтез антибиотика не происходит или осуществляется в очень незначительном количестве.

Вторая фаза (идиофаза или фаза несбалансированного роста) характеризуется снижением общего количества биомассы. В этот период еще происходит образование новых клеток. Однако, в культуре начинают преобладать аутолитические процессы, приводящие к снижению общего количества биомассы. При этом среда обогащается продуктами обмена и аутолиза клеток, возрастает значение рН и наблюдается интенсивный биосинтез антибиотика.

Биосинтезу антибиотиков способствует значительное снижение содержания в среде источников углерода и азота, особенно легко усваиваемых. Однако, выращивание продуцентов с самого начала ферментации на обедненных средах нецелесообразно, т.к. незначительное накопление биомассы в течение трофофазы ведет, в конечном счете, и к невысокому выходу антибиотика.

Продуценты антибиотиков выращивают на простых и сложных (комплексных) средах. В состав комплексных сред могут входить: соевая или хлопковая мука, кукурузный экстракт и другие природные многокомпонентные источники питательных веществ. Кроме того, в состав сред вводят индивидуальные органические соединения и минеральные соли. Для каждого штамма продуцента состав среды, оптимальной для биосинтеза антибиотика, подбирают индивидуально. Это относится и к штаммам одного вида, продуцирующим один и тот же антибиотик.

Отмечают некоторые общие закономерности, которые следует учитывать при работе с большинством продуцентов антибиотиков. Углеродкатаболическая регуляция является одним из механизмов регуляции биосинтеза вторичных метаболитов. Известно, что глюкоза служит лучшим источником углерода и энергии для многих организмов. Однако, быстрый катаболизм глюкозы резко снижает биосинтез антибиотиков. Доказано, что глюкоза ослабляет биосинтез  $\beta$ -лактамов, аминогликозидов и др. Кроме того, установлено, что глюкоза, фруктоза, сахароза и галактоза являются сильными репрессорами биосинтеза антибиотиков. При этом продукты катаболизма глюкозы подавляют не активность ферментов биосинтеза антибиотиков, а синтез этих ферментов. Медленно утилизирующиеся полисахариды (крахмал и др.) более благоприятны для биосинтеза антибиотиков. Медленно утилизирующаяся лактоза также не является репрессором биосинтеза антибиотиков. Глюкоза, высвобождающаяся при ее гидролизе, репрессирует  $\beta$ -галактозидазу, что замедляет гидролиз лактозы.

Высокое содержание в среде фосфора (в виде неорганических фосфатных солей) неблагоприятно влияет на биосинтез большинства антибиотиков. Общая причина этого состоит в обогащении клеток макроэргическими фосфорными соединениями (АТФ), повышающими скорость роста мицелия. При этом накапливается большое количество биомассы и синтезируется небольшое количество антибиотика. Однако, фосфор не может быть полностью исключен из среды. Учитывая, что биосинтез антибиотиков снижается при избыточном содержании источников фосфора, их оптимальное содержание в среде для каждого штамма продуцента определяют индивидуально.

Аммоний и другие легкоутилизирующиеся источники азота подобно легкоокисляющимся углеводам усиливают рост продуцентов  $\beta$ -лактамовых и полиеновых антибиотиков. Однако, они отрицательно влияют на их биосинтез. Соевая и хлопковая мука, белково-витаминный концентрат медленно расщепляется в процессе ферментации, из них медленно высвобождаются аминокислоты и ионы аммония, поэтому их используют в качестве компонентов сред, обеспечивающих высокий выход антибиотиков. Механизм отрицательного действия легкоусвояемых источников азота на биосинтез антибиотиков не ясен. Вероятно, что у разных продуцентов этот механизм различен. В любом случае неблагоприятное действие легкоусвояемых источников азота на биосинтез антибиотиков обязательно учитывают при подборе питательных сред.

Некоторые первичные метаболиты являются прямыми предшественниками антибиотиков. Так, валин включается в трипептид, из которого формируется  $\beta$ -лактамовая структура. При избытке валина в мицелии происходит подавление биосинтеза антибиотика по принципу обратной связи. Избыток валина в среде подавляет активность ацетогидроксиацетилсинтетазы – первого фермента своего биосинтетического пути. В результате снижается образование трипептида, а в конечном счете, и  $\beta$ -лактамового антибиотика.

Кроме того, некоторые первичные метаболиты являются конечными продуктами разветвленного метаболического пути. Одно «ответвление» или



один конец этого пути заканчивается первичным метаболитом, другое «ответвление» – антибиотиком. Так,  $\alpha$ -аминоадипиновая кислота является, с одной стороны, прямым предшественником лизина, с другой –  $\beta$ -лактамного антибиотика, т.к. включается в исходный для его биосинтеза трипептид. При избытке лизина происходит подавление образования  $\alpha$ -аминоадипиновой кислоты по принципу обратной связи и, следовательно, снижается синтез не только лизина, но и  $\beta$ -лактамного антибиотика.

У высокоактивных штаммов продуцентов антибиотиков, полученных методами генетической инженерии, должны быть нарушены механизмы обратной регуляции биосинтеза тех первичных метаболитов, которые необходимы для образования молекулы антибиотика. В частности, лизин подавляет биосинтез пенициллина у малоактивных продуцентов. При этом полученные на их основе «изогенные» высокоактивные штаммы уже не отвечают снижением биосинтеза антибиотика на избыток лизина в среде.

Кроме того, на выход целевого продукта влияет значение рН среды. Для развития бактерий оптимум рН среды составляет около 7,0, для микроскопических грибов – 4,5–5,0, для актиномицетов – 6,7–7,5. Для большинства известных антибиотиков оптимальное значение рН близко к нейтральному. При значительном закислении или защелачивании среды биосинтез целевого продукта снижается. Многие антибиотики в щелочных или кислых средах неустойчивы и легко инактивируются. Для регулирования величины рН в среде для биосинтеза антибиотиков часто добавляют некоторое количество мела, который вступая в реакцию с образующимися в процессе метаболизма кислотами, образует нейтральные соли и углекислый газ, впоследствии удаляемый из среды.

Отсутствие посторонней микрофлоры является одним из важных параметров биотехнологического производства антибиотиков. Для обеспечения асептических условий при реализации биопроизводства антибиотиков, подвергают стерилизации все технологическое оборудование и коммуникации, питательную среду и воздух для аэрации. При этом засев ферментера, отбор проб на анализ осуществляются в асептических условиях.

Развитие посторонней микрофлоры при биотехнологическом производстве антибиотиков опасно в следующих отношениях:

- ✓ посторонняя микрофлора, развиваясь в среде, видоизменяя ее и, тем самым, нарушая оптимальные условия биосинтеза антибиотика;
- ✓ наличие посторонней микрофлоры затрудняет дальнейшую обработку культуральной жидкости, ее отделение от мицелия, приводя к получению некачественного нативного раствора;
- ✓ продукты жизнедеятельности посторонней микрофлоры могут загрязнять целевой продукт, снижая его качество.

Важность аэрации для обеспечения накопления биомассы обусловлена тем, что большинство продуцентов антибиотиков являются аэробами. Кислород необходим для биосинтеза ряда антибиотиков. При этом он расходуется на замыкание  $\beta$ -лактамного и тиазолидинового колец в процессе биосинтеза

$\beta$ -лактаманной структуры. В целом потребность в кислороде зависит от концентрации биомассы и ее метаболической активности. Оптимизация снабжения кислородом обеспечивается за счет увеличения скорости его переноса.

Для осуществления биосинтеза антибиотиков необходим оптимальный температурный режим. Так, оптимальная температура для биосинтеза пенициллина культурой рода *Penicillium* составляет 25–26 °С. В то время, как при образовании антибиотиков актиномицетами обычно поддерживают более высокую температуру 27–29 °С.

Подготовка культуры продуцента. Подготовка посевного материала включает следующие этапы:

мутантный штамм → колба на качалке → первый инокулятор (10 л) →  
→ второй инокулятор (100–500 л) → ферментер (биореактор).

Ферментация – специализированный процесс получения разных БАВ в химической или родственной отраслях производства с помощью биологических объектов, включая процесс их размножения.

Современная ферментационная установка состоит из нескольких небольших емкостей для инокуляции и ферментера большого размера (от 1 л до 1000 м<sup>3</sup>) для реализации конечной стадии получения целевого продукта, соединенные между собой с помощью фиксированных трубопроводов или гибких шлангов. В ферментерах часто используют механическое перемешивание. Кроме того, ферментационные установки включают в себя установки для обработки сырья, емкости для приготовления питательной среды, оборудование для непрерывной стерилизации, установки для получения пара высокого давления и больших объемов стерильного воздуха.

При биотехнологическом производстве антибиотиков используют поверхностную или глубинную ферментацию.

Ферментация, как правило, сопровождается выделением большого количества тепла, поэтому для поддержания оптимального температурного режима необходимо постоянное охлаждение среды.

В связи с тем, что продуценты антибиотиков, как правило, являются аэробами, для их нормальной жизнедеятельности необходимо обеспечить оптимальный уровень аэрации. Во время ферментации происходит одновременно два процесса – растворение кислорода в среде и потребление кислорода культурой продуцента. Микроорганизмы используют для дыхания только растворенный в среде кислород. В этой связи, их обеспеченность кислородом определяется скоростью его растворения в культуральной жидкости. При глубинном культивировании в промышленных масштабах данный процесс осуществляется путем пропускания воздуха через питательную среду и культуральную жидкость с помощью специальных аэрирующих приспособлений (барботеров и т.п.). При этом культуральная жидкость интенсивно перемешивается.

Основное назначение аэрации и перемешивания заключается в снабжении культуры кислородом. Кроме того, эти процессы способствуют поддержанию мицелия в равномерно взвешенном состоянии и выравниванию концентрации питательных веществ и продуктов обмена в культуральной жидкости.

Питательные среды для биосинтеза антибиотиков содержат вещества, способные образовывать стойкие пены. Кроме того, они могут образоваться в процессе ферментации. Аэрация и перемешивание среды также обуславливают образование слоя пены на поверхности культуральной жидкости, ухудшающего условия развития продуцента. Пеногашение, в основном, осуществляется за счет введения поверхностно активных веществ (ПАВ), способствующих снижению стойкости пены и в дальнейшем ее разрушению.

После завершения ферментации культуральная жидкость содержит растворенный антибиотик, мицелий продуцента, продукты его лизиса, ряд компонентов неиспользованной питательной среды, в том числе высоко- и низкомолекулярные органические вещества и неорганические соли. В некоторых случаях антибиотик содержится не только в культуральной жидкости, но и в мицелии. Культуральная жидкость нередко отличается высокой вязкостью, поэтому выделение антибиотика из такой сложной гетерогенной системы представляет очень трудоемкую процедуру.

Выделение и очистка целевого продукта. Используемые в настоящее время методы выделения и очистки разрабатывается применительно к конкретному антибиотику. Их выбор определяется физико-химическими свойствами антибиотика: локализацией, составом культуральной жидкости, ее реологическими и другими характеристиками.

На стадии предварительной обработки растворенный антибиотик отделяют от суспензии мицелия и компонентов культуральной жидкости, находящихся в коллоидном состоянии. В случае, если часть антибиотика находится в мицелии, то его переводят в водную фазу, например, путем изменения величины рН культуральной жидкости (тетрациклины). Иногда, наоборот, растворенный и связанный с мицелием антибиотик объединяют в общем осадке, из которого его экстрагируют. Нативный раствор отделяют от мицелия и коллоидных частиц с помощью фильтрации или центрифугирования.

При этом следует отметить следующую закономерность – нативная бактериальная масса фильтруется хуже мицелиальной. С учетом того факта, что высшие актиномицеты способны формировать нитчатые структуры, то их отделение при фильтрации происходит несколько легче, в сравнении с другими бактериями. К основным направлениям улучшения фильтрации относятся: обработка ростовых сред электролитами, тепловая или кислотная коагуляция, добавление фильтрующих наполнителей и др.

На следующей стадии решается задача выделения антибиотиков в виде индивидуального вещества. При этом следует учитывать высокую лабильность многих антибиотиков, что ограничивает условия их выделения.

Проблемы выделения антибиотиков обусловлены многокомпонентностью культуральных жидкостей и низким содержанием в них целевых про-

дуктов. Так, пенициллин может накапливаться примерно до 30 г/л (выход 8% от субстрата). При этом содержание сухих веществ после отделения мицелия обычно составляет около 3–6%, из них 15–30% приходится на долю антибиотика. В этой связи, любую культуральную среду необходимо обрабатывать так, чтобы антибиотик переходил в ту фазу, из которой он будет наиболее полно выделен. В ряде случаев этого можно добиться подкислением (тетрациклины) или, напротив, подщелачиванием культуральной жидкости (новобиоцин), добавлением солей, щавелевой кислоты (эритромицин) и т.п. до или после коагуляции и осаждения белков из нативных растворов.

Экстракция с помощью органических растворителей используется при очистке таких антибиотиков, как пенициллин, эритромицин и др. При переходе в органический растворитель соответствующие антибиотики освобождаются от многих примесей. Варьируя значение рН и, изменяя таким путем растворимость антибиотика в воде (точнее, в буферном растворе), можно многократно переводить антибиотик из одной фазы в другую, освобождая его каждый раз от определенного количества примесей.

При очистке антибиотиков широко используются ионообменные смолы. Особую роль сорбционные методы в свое время сыграли при решении проблемы получения высокоочищенных аминогликозидных антибиотиков (стрептомицина и др.), имеющих свойства оснований. Аминогликозиды плохо растворимы в органических растворителях, поэтому для их выделения экстракционный метод не используют. В производстве стрептомицина могут быть успешно использованы карбокислые катиониты в натриевой форме. При этом десорбция антибиотика с колонки осуществляется раствором серной кислоты. После дополнительной процедуры, связанной с пропусканием стрептомицина через сульфокатионит (для удаления ионов натрия), получают сульфат стрептомицина.

Помимо традиционных экстракционных и сорбционных методов при выделении и очистке антибиотиков все большее значение приобретает комплекс приемов, объединяемых под названием мембранной технологии.

Таким образом, примерная схема выделения целевого антимикробного продукта из культуральной жидкости представлена на рис. 1. В представленную на рис. 1 схему должны быть внесены соответствующие коррективы в зависимости от физико-химических характеристик целевого продукта и возможностей аппаратного оформления процесса.

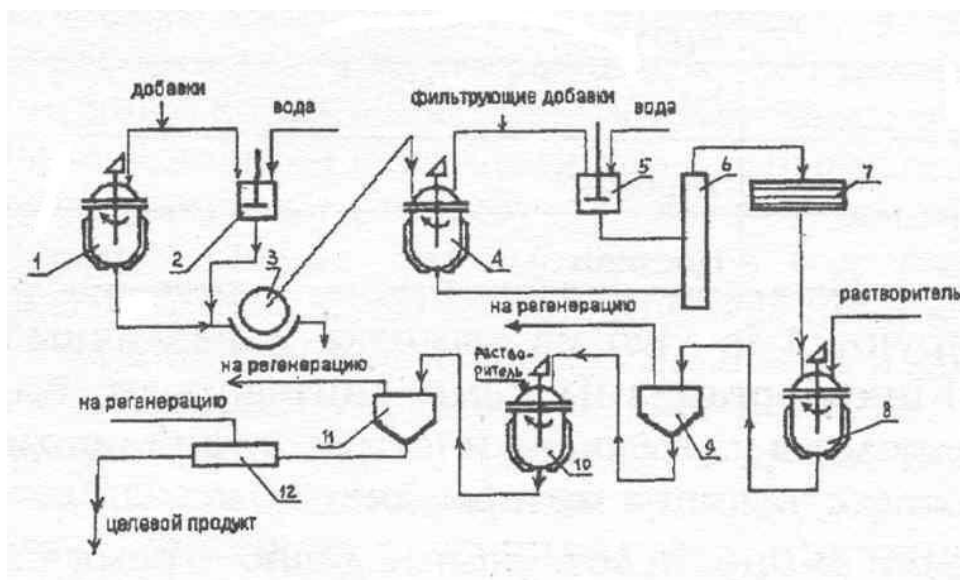


Рис. 1. Примерная технологическая схема выделения антибиотика из культуральной жидкости

1 – предварительная обработка культуральной жидкости; 2 – подготовка раствора; 3 – первый фильтр; 4 – сборник первого фильтра; 5 – подготовка раствора для фильтрации; 6 – дополнительная фильтрация; 7 – стерилизующая фильтрация; 8 – химическая коагуляция; 9 – предварительное осаждение; 10 – промывание осадка; 11 – вторичное осаждение; 12 – высушивание

При обезвоживании препаратов антибиотиков в зависимости от их свойств применяют лиофильную или распылительную сушку. В последнем случае раствор антибиотика распыляется с помощью форсунок до частиц диаметром 5–25 мкм в токе воздуха, нагретого до температуры 160 °С. При этом сушка реализуется в течение долей секунды. Затем полученный лекарственный препарат фасуют в стерильные флаконы с соблюдением условий, гарантирующих стерильность.

Поскольку биосинтез антибиотиков осуществляется в асептических условиях, то при их выделении, очистке и получении лекарственных форм также соблюдаются все возможные меры против микробной контаминации. Тем не менее, проблема стерильности инъекционных препаратов и обсемененности лекарственных препаратов для наружного применения остается одной из самых сложных для производства, как антибиотиков, так и лекарственных средств, в целом. В этой связи, в некоторых случаях при обнаружении расфасованных нестерильных серий лекарственных препаратов применяют метод радиационной стерилизации. При такой стерилизации микроорганизмы, загрязняющие лекарственный препарат, утрачивают способность к размножению и гибнут вследствие повреждения ДНК. Радиационная стерилизация используется на отдельных производствах в виду объективных трудностей при внедрении технологии получения нового лекарственного препарата, а иногда и по экономическим причинам.

К лекарственным препаратам антибиотиков, используемых в медицинской практике, в соответствии с Государственной фармакопеей (ГФ) предъявляются очень строгие требования. В этой связи, готовый продукт – антибиотики медицинского назначения – подвергается биологическому и фармакологическому контролю. Биологический контроль позволяет определить степень стерильности лекарственного препарата. При фармакологическом контроле проводят всесторонние испытания лекарственного препарата на токсичность, пирогенность, токсикогенность и др., устанавливают максимально переносимую дозу антибиотика, дозы, вызывающие 50 % и полную гибель экспериментальных животных. Только после всестороннего и тщательного изучения лекарственный препарат может быть рекомендован к применению в клинической практике.

Количественное определение большинства антибиотиков проводят биологическими методами, основанными на сравнительной оценке угнетения роста тест-культуры микроорганизма. В частности, активность лекарственных препаратов антибиотиков устанавливают диффузионным или турбидиметрическим методами.

Количественное определение антибиотиков согласно ГФ XII рекомендуется осуществлять методом диффузии в агар. Его сущность заключается в сравнении действия определенных концентраций испытуемого и стандартного образцов антибиотика на тест-культуру микроорганизма. Стандарты, отвечающие требованиям международных стандартов, готовят в Государственном научно-исследовательском институте стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича. При этом они, как правило, выпускаются в запаянных ампулах нейтрального стекла и хранятся при температуре не выше 0 °С. В связи с тем, что состав агаризованной среды и условия выполнения биологического испытания одинаковы, величина зоны диффузии, в которой развитие тест-культура микроорганизма подавляется испытуемым антибиотиком, зависит только от химической природы лекарственного препарата и его концентрации. Процесс инкубации осуществляется в течение 16–18 ч при температуре 36–38 °С.

При определении биологической активности методом диффузии в агар необходимо, чтобы зона задержки роста была достаточного диаметра и имела четкие границы. После завершения инкубации измеряют диаметры зон задержки роста (ЗЗР) тест-культуры микроорганизма стандартным и испытуемым растворами. Для повышения точности измерений находят среднее значение площадей зон диффузии из трех опытов.

При изучении ЗЗР и четкости краев рационально использовать микрофотометры. Это позволяет получать более объективные количественные оценки результатов микробиологического анализа.

Единица действия (ЕД) является величиной биологической активности антибиотиков. За ЕД принимают минимальное количество антибиотика, подавляющего развитие тест-культуры микроорганизма в определенном объеме питательной среды. Количественное выражение 1 ЕД отличается для разных антибиотиков. Так, 1 ЕД натриевой соли бензилпенициллина соответствует

0,5988 мкг химически чистого вещества, а 1 ЕД стрептомицина, тетрациклина и его производных – 1 мкг химически чистого вещества.

Расчет биологической активности антибиотика производят по стандартной кривой, предварительно построенной на основании результатов определения пяти концентраций стандартного препарата. Степень активности антибиотика в 1 мг лекарственного препарата вычисляют, умножая полученную концентрацию в ЕД/мл на степень разведения.

Среднее значение активности, определенной биологическим методом, несколько ниже, чем рассчитанная теоретическая активность. В соответствующих фармакопейных статьях приводятся значения теоретической активности и нижний допустимый предел активности испытуемого антибиотика в ЕД/мг.

В настоящее время разработаны ускоренные биологические методы определения количественного содержания антибиотиков в биологических жидкостях. К таким ускоренным методам относят методы, основанные на подавлении изменений величины рН питательной среды в процессе роста тест-культуры микроорганизмов. В данном случае концентрацию антибиотика определяют путем сравнения изменений величины рН в средах испытуемых и стандартных образцов через 1,5 ч после инкубации. На этом принципе основан уреазный метод, заключающийся в наблюдении за изменением величины рН жидкой питательной среды, содержащей 2% мочевины. При этом аммиак, выделяющийся в процессе роста микроорганизма, вызывает изменение значения рН среды.

Ферментный метод основан на инактивации аминогликозидов в крови специфическими ферментами (аденилтрансфераза, ацетилтрансфераза), продуцируемые грамотрицательными микроорганизмами, устойчивыми к лекарственным препаратам данной группы. Эти ферменты катализируют процесс аденилирования или ацетилирования аминогликозидов в присутствии 14С-аденозинтрифосфата или 14С-ацетилкоэнзима А. Они являются источником радиоактивности. Инактивированный антибиотик имеет положительный заряд и остаточную радиоактивность, что позволяет адсорбировать его на фосфоцеллюлозной бумаге. После адсорбции, путем подсчета радиоактивности делают заключение о концентрации антибиотика. Продолжительность такого определения составляет 1–2 часа.

Радиоиммунный метод основан на сравнительной оценке конкуренции антибиотика, меченого тритием, и испытуемого антибиотика по отношению к специфическим антителам иммунной сыворотки. Данный метод отличается очень высокой чувствительностью (0,003–0,01 мкг/мл). В данном случае продолжительность определения составляет 1–2 ч, точность метода – довольно высока (коэффициент вариации составляет 4–5%).

При этом анализ различных методов количественного определения антибиотиков позволяет заключить, что в настоящее время наиболее простыми и доступными являются метод диффузии в агар-агар и уреазный метод. Ферментативный и радиоиммунный методы определения содержания антибиотика являются наиболее специфичными и точными. Они не требуют предвари-

тельной обработки сыворотки крови, в случае, если в ней присутствуют другие антибиотики. Однако, применение этих методов анализа требует соответствующих условий и оборудования для работы с радиоактивными веществами, труднодоступных реактивов и специфической иммунной сыворотки.

Следует отметить, что на точность биологических методов определения антибиотиков оказывает влияние целый ряд факторов: характер питательной среды, условия инкубации, точность измерения зон угнетения роста и т.д.

Антибиотики немедицинского назначения (биовит, биомицин, гризин, бацитрацин, гигромицин и др.), используемые в сельском хозяйстве, также получают в строго стерильной культуре. Однако, готовый продукт представляет собой высушенную биомассу продуцента или культуральную среду. В таком продукте, кроме антибиотика, содержатся и другие БАВ (витамины, ферменты, аминокислоты и др.).

Антибиотики, полученные микробиологическим способом, как правило, подвергают химической модификации, в результате которой возможно получение лекарственных препаратов с более выраженным физиологическим действием.



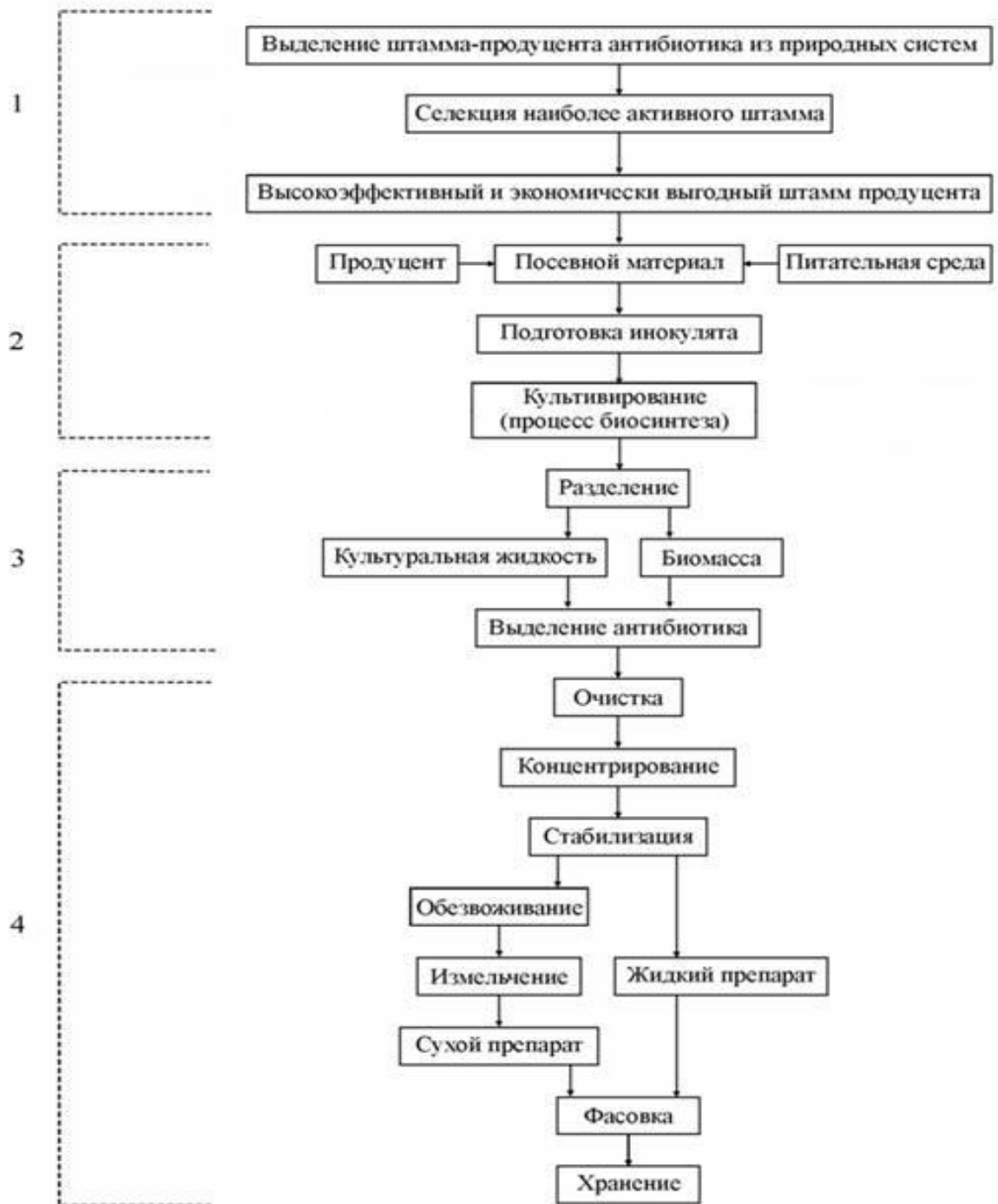


Рис. 1. Схема биотехнологического производства антибиотиков