

Занятие семинарского типа № 6

ТЕМА ЗАНЯТИЯ: Регуляция биосинтеза антибиотиков в условиях биотехнологического производства

УЧЕБНЫЙ МАТЕРИАЛ

1. Понятие о метаболизме

В переводе с греч. «метаболизм» обозначает перемена, превращение.

В физиологическом смысле метаболизм – это промежуточный обмен, т.е. превращение определенных веществ внутри клеток с момента их поступления до образования конечных продуктов (метаболизм белков, глюкозы, лекарственных препаратов).

С точки зрения промышленной биотехнологии метаболизм представляет собой образование в процессе роста и развития клеток ценных биохимических продуктов – некоторые из них выделяются в культуральную среду (внеклеточные продукты), а некоторые накапливаются в биомассе (внутриклеточные продукты).

С помощью метаболизма получают антибиотики, молочную и лимонную кислоту, пищевые консерванты и др.

В естественных условиях метаболизм сопровождается образованием строго определенных количеств метаболитов, необходимы для обеспечения жизнедеятельности клетки. Промышленное биотехнологическое производство, направленное на извлечение максимальной экономической выгоды, такая ситуация никак не устраивает. В этой связи, для максимизации прибыли необходимо произвести оптимизацию следующих технологических параметров процесса:

- ✓ выхода целевого продукта в расчете на потребленный субстрат;
- ✓ концентрации целевого продукта;
- ✓ скорости образования целевого продукта.

При этом оптимизация технологии биосинтеза метаболитов включает следующие основные этапы:

1. первоначальная селекция штамма микроорганизмов;
2. определение оптимальных значений температуры, рН, потребности в кислороде;
3. определение оптимального режима питания и накопления биомассы;
4. изменение генетической структуры организма с целью увеличения образования целевого продукта.

Разработка третьего этапа процесса непосредственно связана с биосинтезом. Для определения режима питания и накопления биомассы, оптимального для биосинтеза метаболитов необходимо математическое описание процесса. Кроме определения оптимальных условий реализации процесса, мате-

матическая модель используется для автоматизации биосинтеза, что очень важно в современном биотехнологическом производстве.

2. Направленный биосинтез антибиотиков

Как показывает практика, за последние 30 лет обнаружить среди продуктов жизнедеятельности микроорганизмов совершенно новые классы антибиотиков практически не удалось. Выделяемые новые биологически активные вещества (БАВ), как правило, представители уже известных основных групп антибиотиков. В этой связи, в настоящее время ученые многих лабораторий мира изучают пути и способы направленного биосинтеза антибиотиков в целях получения биологическим путем разных модификаций известных антибиотиков с более ценными свойствами.

Под направленным биосинтезом антибиотиков понимают вмешательство исследователя в метаболизм организма-продуцента (главным образом микроорганизма) для получения одного или нескольких антибиотиков, или новых форм антибиотических веществ.

В результате направленного биосинтеза удастся модифицировать известные антибиотики, отличающиеся от исходных соединений рядом ценных свойств, и которые не могут быть синтезированы химическим путем. В этой связи, изучение вопросов, связанных с данной проблемой, имеет большое теоретическое и практическое значение.

Многие микроорганизмы в процессе жизнедеятельности способны одновременно образовывать несколько антибиотиков, как близких по химическому строению и биологическому действию, так и значительно различающихся. Так, *Streptomyces albireticuli* вырабатывает три антибиотика: эйромицин, энтеромицин и карбомицин; *S. showdoensis* – четыре антибиотика: актиномицин в мицелии и три – в культуральной жидкости: макролид, шоудомицин и антибиотик неизвестной природы. В культуре *S. netropsis* одновременно образуются противогрибковые полиеновые антибиотики (смесь тетраена, пентаена и гептаена) и антибактериальное вещество. *B. subtilis* синтезирует более 60 разных антибиотиков; *Penicillium chrysogenum* – 7 пенициллинов, имеющих близкую структуру; *Tolypocladium inflatum* – более 20 циклических полипептидов (циклоспорины).

К числу антибиотиков, близких по своей природе и биологическим свойствам, образуемых организмом одновременно, можно отнести такие соединения, как пенициллины, стрептомицины, тетрациклины, полимиксины, бацитрацины, цефалоспорины, низины, неомицины, родомицины, кандицидины, актиномицины и др.

Примерами одновременного образования одним организмом антибиотиков, отличающихся по химической структуре и биологическим свойствам, служат: *S. griseus*, наряду с биосинтезом стрептомицина, может продуцировать маннозидострептомицин, актидион и гризеин; *Aspergillus fumigatus* – спинулозин, глиотоксин и фумигатин; *S. fradiae* – неомицин и фрадицин и др.

Изучение закономерностей биосинтеза того или иного антибиотика, выяснение условий развития организма, обеспечивающих преимущественное

образование одного из возможных антибиотиков, позволяет вмешиваться в биосинтетическую деятельность микроорганизма, придавая ее необходимое направление. Так, достаточная аэрация культуры *S. griseus* обеспечивает благоприятные условия для преимущественного накопления стрептомицина и тормозит образование маннозидострептомицина. При хорошей аэрации среды создаются условия оптимальной деятельности фермента маннозидострептомициназы, расщепляющего менее активный маннозидострептомицин на стрептомицин и маннозу. Отсутствие в среде ионов хлора, приводит к накоплению в культуре *S. aureofaciens* не хлортетрациклина, а тетрациклина или другого аналога из этой группы антибиотиков.

При этом, наряду с изменением условий культивирования микроорганизма не менее важную роль в проблеме получения того или иного антибиотика играет селекция организмов. В результате обработки продуцентов антибиотиков мутагенами и последующей селекции получены штаммы продуцентов, образующие нежелательный антибиотик в небольшом количестве, а нужный лекарственный препарат составляет при биосинтезе основную часть продукции. Так, продуцент стрептомицина *S. griseus* может вырабатывать одновременно со стрептомицином и большое количество нежелательного антибиотика маннозидострептомицина. В результате селекции получены штаммы *S. griseus*, образующие маннозидострептомицина не более 5% от общего выхода антибиотика.

Для направленного образования преимущественно одного из ряда естественно синтезируемых антибиотиков или их модификации применяют различные методы вмешательства в обмен веществ микроорганизмов.

Во-первых, это достигается соответствующим изменением условий культивирования продуцентов антибиотиков, и прежде всего, изменением состава питательной среды.

Во-вторых, в среду для культивирования микроорганизма – продуцента антибиотика могут вводиться специфические ингибиторы.

В-третьих, характер обмена веществ микроорганизма, связанного с модификацией структуры синтезируемого антибиотика, может быть изменен в результате получения от исходного штамма продуцента соответствующих мутантов.

В-четвертых, свойства известных антибиотиков можно изменить путем воздействия на них одного из микроорганизмов или образуемых ими ферментов.

В-пятых, изменить характер метаболизма, связанный с биосинтезом антибиотика, можно путем применения комбинации выше перечисленных факторов. В частности, используют соответствующие мутанты с одновременным внесением в среду для их развития специфических предшественников или ингибиторов.

Изменение состава питательной среды. Биосинтетической деятельностью микроорганизмов можно управлять путем изменения условий культивирования организма, и, в первую очередь, состава питательной среды.

Основные способы изменения условий культивирования микроорганизмов, позволяющие осуществлять направленный биосинтез антибиотиков:

1. Введение в среду веществ, которые, включаясь в молекулу антибиотика, обеспечивают получение лекарственного препарата с новыми свойствами. Данный способ широко применяется при биосинтезе различных форм пенициллинов. Так, если в среду добавить фенилуксусную кислоту (ФУК), то продуцент преимущественно образует бензилпенициллин, содержащий в качестве радикала молекулы антибиотика ФУК. В случае, если в качестве предшественника ввести в среду феноксипуксусную кислоту, то продуцент начинает синтезировать новый тип пенициллина – феноксиметилпенициллин, отличающийся от бензилпенициллина рядом свойств. В настоящее время в результате такого вмешательства в процесс биосинтеза антибиотика удалось получить несколько десятков пенициллинов.

2. Добавление в среду отдельных аминокислот, органических кислот (в виде солей) или иных компонентов, принимающих участие в обмене веществ организма, позволяет целенаправленно изменять биохимическую деятельность микроорганизма в сторону преимущественного биосинтеза одного из ряда возможных антибиотиков или препарата с новыми свойствами. В этом случае введенное в среду вещество может непосредственно не включаться в молекулу антибиотика, как в случае биосинтеза разных типов пенициллина. Иногда такое вещество способствует изменению характера некоторых реакций обмена, ведущих к образованию антибиотика с измененной структурой. Указанный принцип применяется при направленном биосинтезе ряда антибиотиков, и, прежде всего, антибиотиков, имеющих полипептидную структуру.

Получение новых форм актиномицинов, обладающих противоопухолевым действием с одновременным снижением их токсичности в ходе направленного биосинтеза, имеет важное практическое и теоретическое значение.

При образовании новобиоцина культурой *S. spheriodes* (штамм 35) биосинтез биологически активных и неактивных форм антибиотика зависит от ряда факторов среды. Так, разные концентрации цитрата натрия в среде, содержащей в качестве источника углерода глюкозу (5%) и в качестве источника азота нитрат натрия (0,6%), существенно изменяют биосинтез не только общего количества антибиотика, но и его аналогов. Различные соотношения форм новобиоцина, синтезируемых актиномицетом, можно получить и при добавлении к среде различных органических кислот в количестве 0,25% перед началом развития продуцента антибиотика.

Таким образом, используя разные концентрации лимонной кислоты в среде или, заменяя ее другими органическими кислотами, можно стимулировать, или, наоборот, тормозить выход как новобиоцина, так и его биологически неактивных форм.

3. Направление биосинтетической деятельности микроорганизма путем изменения соотношения концентрации источников углерода и азота в среде или степени аэрации культуры. Культура *Bacillus licheniformis* продуцирует группу полипептидных антибиотиков лихениформинов. Однако, в зависимо-

сти от состава среды этот микроорганизм может образовывать и другие полипептиды – бацитрацины. В случае, если в составе среды имеется лактат аммония и отношение углерода к азоту невысокое, то бактерии синтезируют лихениформины. Если в субстрате содержится небольшое количество аммония, в основном, аммония минеральных солей, т.е. созданы условия повышенного соотношения углерода и азота, организм начинает продуцировать бацитрацины.

4. Изменение активной кислотности (рН) среды. В результате изменения величины рН среды для культивирования микроорганизмов можно направленно получать различные формы антибиотиков. Так, при изменении значения рН среды для культивирования *Nocardia fructiferi subspristomycini* образуются два антибиотика: ристомицин А и ристомицин В. Биологическая активность ристомицина В примерно в 2 раза выше активности ристомицина А. При этом отклонение биосинтеза в сторону продуцирования ристомицина определенного типа зависит от активной кислотности среды. При реакции среды, близкой к нейтральной, преимущественно образуется ристомицин А, а повышение значения рН среды до 7,4–8,8 способствует одновременному биосинтезу ристомицинов А и В. Дальнейшее подщелачивание среды, происходящее обычно к концу процесса развития нокардий, приводит к выработке биологически менее активных форм антибиотика – ристомицинов I и II, в которые превращаются исходные формы ристомицинов А и В.

Введение специфического ингибитора. При культивировании продуцента антибиотика в среду можно добавлять специфические ингибиторы. Так, добавление к среде сульфадиазина способствует образованию культурой *S. griseus*, наряду с 7-хлортетрациклином, 7-хлор-6-деметилтетрациклина. В данном случае сульфадиазин выступает в качестве ингибиторов метилирования молекулы соответствующих антибиотиков с образованием модифицированных БАВ.

Добавление бромидов к среде, содержащей хлориды, наряду с образованием хлорамфеникола, способствует синтезу ацильных производных, а также биосинтезу других аналогов, содержащих в своем составе ионы брома. В данном случае ионы брома являются ингибиторами биологического хлорирования в процессе биосинтеза молекулы хлорамфеникола.

При выращивании *S. griseus* в среде, содержащей хлориды, в основном происходит биосинтез хлортетрациклина, который составляет 90–95%, и тетрациклина – 5–10%. Однако, если культивировать этот же организм в среде, свободной от хлоридов, то выход тетрациклина увеличивается за счет уменьшения образования хлортетрациклина. Тетрациклин может синтезироваться и на обычных средах с хлоридами, но в присутствии специфических веществ, подавляющих процесс хлорирования (бромиды, тиоцианиты, тиомочевина, тиюрацил и меркаптобензотиазол). При применении веществ, тормозящих процесс хлорирования, наблюдается образование тетрациклина – до 90% и более от общего количества антибиотиков, т.е. соотношение

хлортетрациклина и тетрациклина диаметрально противоположно соотношению этих антибиотиков при развитии стрептомицета на обычных средах.

Использование мутанта исходного штамма. Получение модификации структуры синтезируемого антибиотика возможно в результате выделения из исходного штамма продуцента антибиотика соответствующего мутанта. Применение мутантов от исходных штаммов микроорганизмов позволяет осуществлять направленный биосинтез ряда антибиотиков. Так, от продуцента хлортетрациклина получен мутант, способный синтезировать преимущественно тетрациклин.

Воздействие микроорганизма или его фермента. Направленно изменять свойства антибиотиков в процессе развития продуцента можно за счет воздействия на них определенным микроорганизмом или образуемым им ферментом. Применение микроорганизмов для трансформации различных органических соединений, в том числе и антибиотиков, – широко распространенное явление. Трансформация веществ может осуществляться развивающейся культурой соответствующих микроорганизмов, экстрактами, выделенными из клеток или ферментными системами.

Реакции, которые могут проявлять микроорганизмы в отношении антибиотиков, очень разнообразны: реакции окисления, восстановления, гидролитические реакции, реакции конденсации, изомеризации, образование новых C=C-связей и осуществление гетерофункций.

В большинстве случаев антибиотики, модифицированные биологическим способом, в условиях *in vitro* в значительной степени утрачивают свою биологическую активность. Однако, в организме больного они могут проявлять антибиотические свойства. Клиндамицин-2-фосфат и клиндамицин-3-фосфат не обладают биологической активностью *in vitro*, но, попадая в организм, легко гидролизуются с образованием биологически активного соединения клиндамицина. При его добавлении к среде, в которой развивается *Streptomyces punipolus*, происходит модификация антибиотика, и он в основном превращается в деметилклиндамицин. Сходный процесс происходит и в случае линкомицина, который в результате воздействия *S. punipolus* превращается в деметилсоединение. При этом следует отметить, что активность деметиллинкомицина гораздо ниже активности линкомицина.

Мутасинтез. Использование комбинации мутантов – продуцентов антибиотиков и предшественников позволяет направлять биосинтез антибиотических веществ в нужном направлении и при этом получать вещества с измененными свойствами (мутасинтез).

Мутасинтез – один из перспективных методов получения новых антибиотиков методом направленного биосинтеза. Его сущность состоит в том, что в результате генетических манипуляций получают мутант продуцента, который утратил способность синтезировать один или несколько фрагментов молекулы антибиотика. При внесении в среду для культивирования такого мутанта недостающих фрагментов, синтезированных химическим путем, или

других, близких им по химической структуре соединений, мутант способен включать их в молекулу образуемого антибиотика.

Так, в лаборатории Д. Готтлиба (США) в 1969 г. был получен мутант – продуцент неомицина, способный синтезировать молекулу антибиотика, за исключением ее 2-дезоксидострептамина части. Биосинтез неомицина данным мутантом отмечается только в том случае, если в среду для его развития добавлялся 2-дезоксидострептамиин. При замене этого соединения его аналогами удалось получить новые биологически активные неомицины. Сходный метод был использован и для получения аналогов других антибиотиков (новобиоцина, стрептомицина, гентамицина и др.).

Таким образом, пути регулирования обмена веществ у микроорганизмов, синтезирующих антибиотики, в основном связаны с изменениями условий их культивирования и характером развития. При этом следует иметь в виду, что продукты жизнедеятельности микроорганизмов, или так называемые конечные продукты метаболизма, по-видимому, оказывают на биосинтез антибиотиков значительно большее влияние, чем, например, их предшественники.

Вместе с тем, следует иметь в виду, что направлять биосинтетическую деятельность того или иного организма можно только в пределах его наследственной способности образовывать в процессе своей жизнедеятельности те или иные антибиотики. Иными словами, создание различных условий культивирования, например, для *Penicillium chrysogenum* или другого продуцента пенициллина и введение в субстрат предшественников позволяют ожидать биосинтез только пенициллинов. Такой организм, по-видимому, никогда не сможет синтезировать антибиотики типа стрептомицина, фузагиллина или полимиксина. Аналогичные закономерности имеют место и в отношении любых других продуцентов антибиотиков.

Продуцент хлортетрациклина *S. griseus* под влиянием изменения условий культивирования (состав среды) способен изменять направление биосинтеза, но только в пределах образования тетрациклиновых антибиотиков.

Эти примеры еще раз показывают, что образование антибиотиков носит не случайный характер, зависящий только от условий культивирования организма. Биосинтез антибиотиков – это биологическое свойство организма, возникшее в ходе эволюционного развития вида и наследственно закрепленное. Варьируя условия культивирования, можно стимулировать или, наоборот, подавлять способность к биосинтезу антибиотика, но нельзя вызвать образование вещества, не характерного для обмена определенного организма.

Направить биосинтетическую деятельность организма на получение нового, не свойственного данному штамму антибиотика теоретически возможно лишь в том случае, если под влиянием внешних условий коренным образом будет изменена природа (генотип) организма. В этом случае образуется новый вид микроорганизма с новым типом обмена веществ. С помощью генно-инженерных манипуляций можно сконструировать организм, который будет синтезировать тот или иной не свойственный исходному штамму антибиотик.

3. Особенности биотехнологического получения антибиотиков

Стадии биотехнологического получения антибиотиков (рис. 1):

1. получение соответствующего штамма – продуцента антибиотика, пригодного для промышленного биотехнологического производства;
2. биосинтез антибиотика;
3. выделение и очистка антибиотика;
4. концентрирование, стабилизация антибиотика и получение готового продукта.

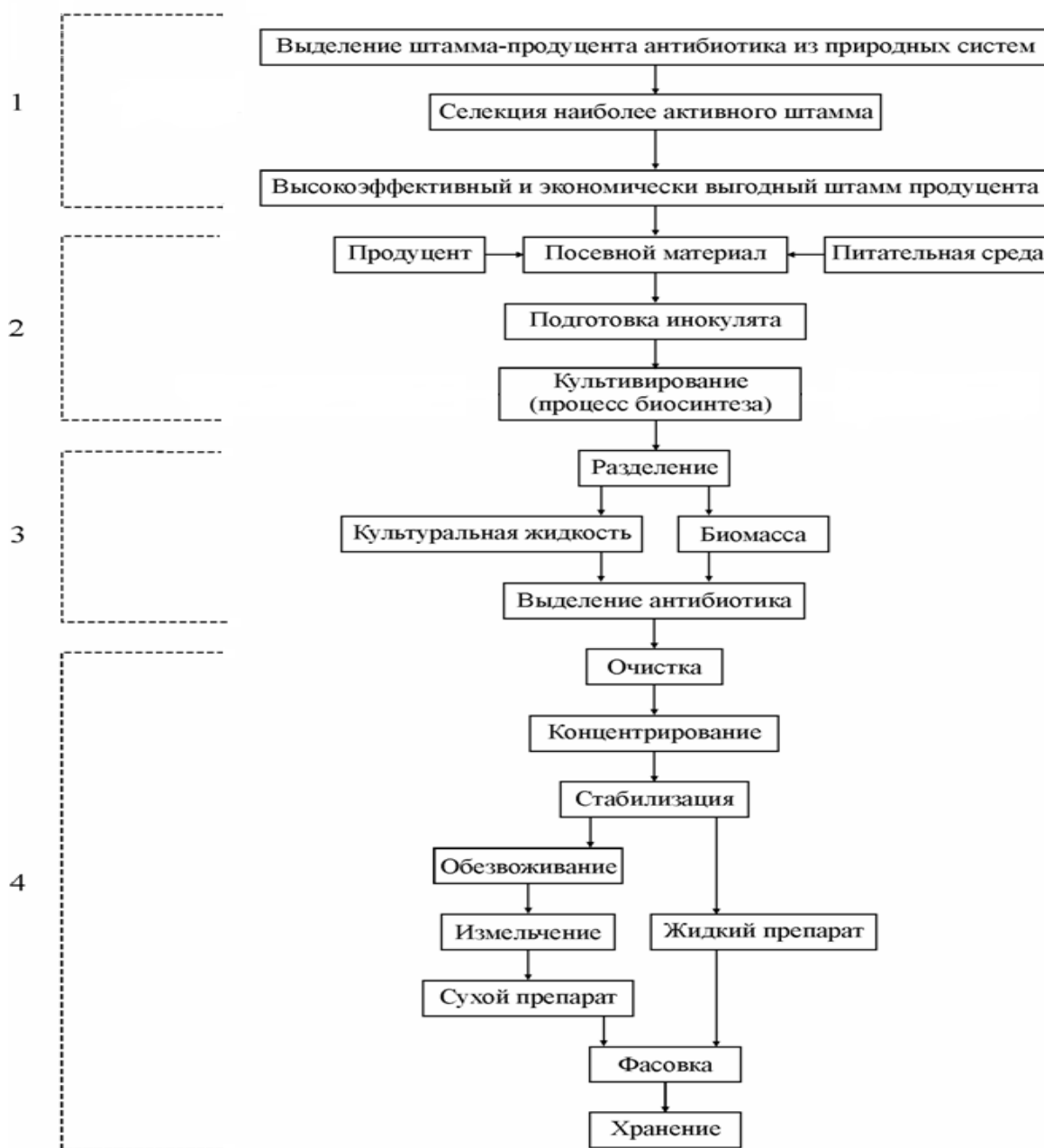


Рис. 1. Схема биотехнологического производства антибиотиков

Первая задача при поиске продуцентов антибиотиков состоит в выделении их из природных источников. Биосинтез антибиотиков является наследственной особенностью организмов, проявляющейся в том, что каждый вид (штамм) способен образовывать один или несколько определенных, строго специфичных для него антибиотических веществ.

Выявление потенциальной способности микроорганизмов образовывать в процессе своей жизнедеятельности антибиотики связано с условиями их культивирования. В одних условиях организм образует антибиотик, а в других условиях этот же организм при хорошем росте не будет обладать способностью синтезировать антибиотическое вещество. Образование антибиотиков будет происходить только при развитии организма в специфической среде и при наличии соответствующих внешних условий. В результате изменения условий культивирования можно обеспечить больший или меньший выход антибиотика, или создать условия, при которых антибиотик вообще не будет образовываться. Кроме того, путем изменения условий культивирования продуцента можно добиться преимущественного биосинтеза одного из антибиотиков, в случае образования изучаемым организмом нескольких антибиотических веществ или получить новые их формы, но только в пределах тех соединений, которые синтезируются данным организмом.

К числу наиболее значимых факторов, оказывающих влияние на проявление антибиотических свойств микроорганизмов, относятся: состав среды, ее активная кислотность, окислительно-восстановительные условия, температура культивирования, методы совместного выращивания двух или большего числа микроорганизмов и др.

Среды для культивирования микроорганизмов. Натуральные (комплексные) среды, состоящие из природных соединений, имеющие неопределенный химический состав (части зеленых растений, животные ткани, солод, дрожжи, фрукты, овощи, навоз, почва и т. д.), содержат все компоненты, необходимые для роста и развития микроорганизмов большинства видов. На практике применяют следующие виды сред:

- ✓ мясопептонная среда, в состав которой, наряду с мясным экстрактом и пептоном, входят хлорид натрия, фосфат калия, иногда глюкоза или сахароза. Данная среда обычно используется в лабораторной практике.

- ✓ картофельные среды с глюкозой и пептоном. Их чаще всего используют в лаборатории для культивирования актиномицетов и бактерий;

- ✓ среды с кукурузным экстрактом, соевой мукой, бардой и др., в состав которых входят сульфат аммония, карбонат кальция, фосфаты, глюкоза, сахароза, лактоза или др. Эти среды успешно применяют в производстве, т.к. они являются доступными и обеспечивают хорошее развитие микроорганизмов с высоким выходом антибиотиков.

Поскольку натуральные среды не позволяют получать строгие количественные данные для изучения физиологических и биохимических особенно-

стей организма – продуцента, применяют синтетические среды, которые подбирают для отдельных продуцентов индивидуально.

Источниками углерода могут быть органические кислоты, спирты, углеводы, сочетания разных углеродсодержащих соединений. При промышленном получении ряда антибиотиков в качестве источников углерода также применяют картофельный крахмал, кукурузную муку или другие растительные материалы.

Источники азота оказывают большое влияние на образование антибиотиков микроорганизмами. Обычно в средах для культивирования микроорганизмов в качестве источников азота используют соли азотной (реже азотистой) кислоты, аммонийные соли органических и неорганических кислот, аминокислоты, белки и продукты их гидролиза.

Обычно наиболее благоприятным для микроорганизмов является соотношение $C/N = 20$. Однако, для образования антибиотика такое соотношение не всегда оптимально. В этой связи, для каждого продуцента антибиотика необходимо подбирать соответствующее соотношение углерода и азота.

Источниками минерального питания служат фосфор, сера и другие макро- и микроэлементы.

Продуценты антибиотиков по отношению к концентрации фосфора в среде можно классифицировать на три группы:

- ✓ высокочувствительные продуценты, для которых оптимальная концентрация фосфора в среде составляет менее 0,01 % (продуценты нистатина, тетрациклинов, флоримицина, ванкомицина);

- ✓ продуценты средней чувствительности, для которых оптимальная концентрация фосфора составляет 0,010–0,015 % (продуценты стрептомицина, эритромицина, циклосерина, неомицина);

- ✓ малочувствительные продуценты, для которых оптимальная концентрация фосфора составляет 0,018–0,020 % (продуценты новобиоцина, грамицидина, олеандомицина).

Сера входит в состав некоторых антибиотиков, образуемых грибами (пенициллин, цефалоспорин, глиотоксин и др.), бактериями (бацитрацины, субтилины, низины) и актиномицетами (эхиномицины, группа тиострептона). Обычно источником серы в среде служат сульфаты. Однако, при биосинтезе пенициллина лучшим источником серы для продуцента служит тиосульфат натрия.

Кроме того, для биосинтеза антибиотиков необходимы микроэлементы. Так, продуцент альбомуцина *S. subtropicus* образует антибиотик при высокой концентрации железа в среде. Железо необходимо для образования хлорамфеникола и др.

Биосинтезу ряда антибиотиков (хлорамфеникола, стрептомицина, пенициллина и др.) способствуют ионы цинка.

Стимулирующее влияние на биосинтез гентамицина, курамицина А, фосфономицина оказывают ионы кобальта.

Влияние pH среды. Многие бактерии, синтезирующие антибиотики, лучше развиваются при значении pH около 7,0, хотя некоторые, например, молочнокислые стрептококки, продуцирующие низин, лучше развиваются в среде при величине pH 5,5–6,0. Большинство актиномицетов хорошо развиваются при начальных значениях pH среды в пределах от 6,7 до 7,8.

Температура. Для большинства бактерий температурный оптимум развития находится в диапазоне 30–37 °С. Для продуцента грамицидина С оптимальная температура для развития и биосинтеза составляет 40 °С.

Актиномицеты, как правило, культивируются при температуре 26–30 °С. Однако, некоторые виды стрептомицетов могут развиваться как при пониженных (от 0 до 18 °С), так и при повышенных (55–60 °С) температурах.

Для многих мицелиальных грибов оптимальная температура составляет 25–28 °С.

Аэрация. Большинство продуцентов антибиотиков являются аэробами. Для биосинтеза многих антибиотиков (пенициллин, стрептомицин и др.) их максимальное накопление происходит при степени аэрации, равной единице, при которой через определенный объем среды за 1 мин. продувается такой же объем воздуха.

В процессе развития продуцента антибиотика в промышленных условиях потребность организма в кислороде изменяется в зависимости от стадии развития, вязкости культуральной жидкости и др. На определенных стадиях могут возникнуть ситуации, связанные с кислородным голоданием продуцента. В этих условиях следует принимать дополнительные меры, например, повышение концентрации окислителя добавлением пероксида водорода.

4. Антибиотики, синтезируемые грибами и лишайниками

Значительная группа микроорганизмов, принадлежащая к грибам (около 100 тыс. видов), образует более 2500 разнообразных антибиотиков, отдельные представители которых применяются в качестве лекарственных средств. Хотя, основная часть грибных антибиотиков не нашла еще широкомасштабного практического применения, вследствие высокой токсичности.

Характерная особенность антибиотиков, синтезируемых грибами, состоит в отсутствии азота в их структурах, а также в преобладающем циклическом (гетероциклическом) типе строения. Однако, наиболее ценными антибиотиками (пенициллины, цефалоспорины, фузидиевая кислота, циклоспорины, гризеофульвин, трихотецин, фумагиллин и др.), продуцируемыми этими микроорганизмами, являются соединения, имеющие в своем составе азот. Они находят применение в медицинской и сельскохозяйственной практике.

Среди антибиотиков грибного происхождения наибольший интерес по своим свойствам и уникальным возможностям представляет группа β -лактамных антибиотиков. К этой группе относятся пенициллины и цефалоспорины.

β-Лактамные антибиотики

К β-лактамным антибиотикам относятся соединения, имеющие в своей структуре β-лактамное кольцо. Эти вещества образуются мицелиальными грибами (пенициллины, цефалоспорины, цефемы), стрептомицетами (карбапенемы, клавулановая кислота, цефамицины и др.), некоторыми видами нокардий (монобактамы).

Наряду с антибактериальными свойствами, некоторые соединения этой группы (карбапенемы) способны инактивировать β-лактамазы (ферменты бактерий, участвующие в деструкции β-лактамного кольца пенициллинов и цефалоспоринов).

В настоящее время из природных источников получено примерно 10 тыс. соединений, имеющих β-лактамное кольцо. Из них около 50 веществ применяются в клинике.

β-лактамные антибиотики находят широкое применение в медицинской практике, т.к. обладают такими ценными качествами, как надежность, относительно широкий спектр антимикробного действия, высокая активность, стабильность и эффективность. Эти качества позволяют рассматривать данные антибиотики в качестве высокоэффективных препаратов для лечения многих бактериальных инфекций.

Пенициллин

Известный англ. бактериолог А. Флеминг в 1929 г. опубликовал сообщение о литическом действии зеленой плесени на стафилококки. Он выделил гриб, идентифицированный как *Penicillium notatum*, и установил, что его культуральная жидкость способна проявлять антибактериальное действие по отношению к патогенным коккам. При этом антибактериальное вещество, содержащееся в культуральной жидкости гриба, А. Флеминг назвал пенициллином.

Попытки А. Флеминга и группы химиков во главе с Г. Рейстриком в 1930 г. выделить активное начало, образуемое *Penicillium*, не увенчались успехом. Несмотря на это, А. Флеминг указал на перспективы практического использования обнаруженного им явления.

Спустя примерно десять лет после сообщения А. Флеминга пенициллин начал изучать Е. Чейн. Он был убежден, что это вещество является ферментом. В 1940 г. Х. Флори и Е. Чейн выделили индивидуальное соединение пенициллина, который оказался не ферментом, а низкомолекулярным веществом.

После того как было установлено, что пенициллин обладает ценными терапевтическими свойствами, начались интенсивные поиски его продуцентов. В результате большого числа научно-исследовательских работ удалось установить, что пенициллин могут вырабатывать многие виды *Penicillium* (*P. chrysogenum*, *P. brevicompactum*, *P. nigricans*, *P. turbatum*, *P. steckii*, *P. corylophilurri*), а также некоторые виды *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. flavipes*, *A. janus*, *A. nidulans* и др.). Кроме того, установлено, что пенициллин образуется также термофильным микроорганизмом *Malbranchea pulchella*.

Первые штаммы *Penicillium*, выделенные из естественных субстратов, как наиболее активные продуценты пенициллина образовывали не более 20 ед. (12 мкг) антибиотика на 1 мл культуральной жидкости. Даже его промышленное производство было начато при активности культуральной жидкости не выше 30 мкг/мл. Насколько низка такая активность, можно судить по тому, что в настоящее время в промышленных условиях получают культуральные жидкости с содержанием пенициллина более 50 тыс. ед./мл, а отдельные штаммы способны синтезировать до 55 тыс. ед./мл.

Условия образования пенициллина

Пенициллин относится к группе β -лактамных антибиотиков. Эти антибиотики образуются не только плесневыми грибами, но и некоторыми видами стрептомицетов и нокардий.

С производством этого антибиотика связано создание антибиотической промышленности. В течение ряда лет пенициллин получали путем выращивания гриба в стеклянных матрацах на жидкой среде. Это создавало огромные трудности в поддержании стерильности при засевах каждого матраца и требовало больших затрат рабочей силы. Учитывая, что выход антибиотика составлял всего несколько десятков единиц на 1 мл среды, себестоимость пенициллина была очень высока. Так, 1 кг пенициллина в США, как отмечал Н. Гольдберг, в 1943 г. стоил 227 270 долларов, а в 1953 г. – всего 169 долларов. В настоящее время ежегодно в мире получают около 17 тыс. т пенициллина на общую сумму более 272 млн. долларов, т.е., 1 кг стоит всего 16 долларов.

Для промышленного производства антибиотика используют среду следующего состава (%): кукурузный экстракт (2,5), гидрол (1,5), лактоза (5,0), NH_4NO_3 (0,4), $\text{Na}_2\text{SO}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$ (0,1), $\text{Na}_2\text{SO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (0,05), $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (0,025), $\text{MnSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ (0,002), ZnSO_4 (0,002), KH_2PO_4 (0,4), CaCO_3 (5,0), фенилуксусная кислота (0,5).

Часто для приготовления сред используют сахарозу или смесь лактозы с глюкозой в отношении 1:1.

Следует иметь в виду, что глюкоза может выступать в качестве катаболического репрессора и снижать биосинтез антибиотика. На средах, содержащих лактозу или сахарозу, т.е. в условиях дерепрессии, биосинтез пенициллина протекает активнее. В ряде случаев вместо кукурузного экстракта применяют арахисовую муку, жмыхи, муку из хлопковых семян и другие растительные материалы.

Возможность применения продуктов растительного происхождения в качестве компонентов сред обусловлена тем, что продуцент пенициллина (*P. chrysogenum*) образует высокоактивные протеолитические ферменты. По интенсивности действия могут быть выделены три фермента, различающиеся значением pH среды, обеспечивающим их оптимальное действие: протеиназа (pH 5,0–6,5), протеиназа типа триптаза (pH 7,0–7,5), пептидаза (pH 8,0–8,4).

Протеолитические ферменты гриба способны осуществлять деагрегацию и протеолиз белка. Обычно максимальная протеолитическая активность гриба совпадает с максимумом биосинтеза пенициллина.

В этой связи, благодаря высоким протеолитическим свойствам гриба наличие кукурузного экстракта или другого растительного материала в среде полностью обеспечивает продуцент пенициллина азотом.

В результате изучения обмена азота в связи с продуцированием пенициллина выдвинута гипотеза, что большая часть антибиотика вырабатывается на ранних стадиях роста гриба из азотистых запасов мицелия, а синтез белков может быть конкурирующим фактором, лимитирующим образование пенициллина.

Сравнительное изучение азотного обмена у продуцента пенициллина *P. chrysogenum* и его неактивного мутанта показало, что основная часть азота среды, начиная со 2-х сут. развития, используется продуцентом на биосинтез пенициллина, а у неактивного мутанта азот продолжает поддерживать интенсивный рост биомассы. При этом химический состав мицелия и его отдельных азотсодержащих фракций у этих штаммов существенно не различается.

В качестве основного источника углерода для биосинтеза пенициллина используется лактоза, т.к. она используется грибом медленнее, по сравнению с глюкозой. В результате в период максимального образования антибиотика лактоза еще содержится в среде. Это создает наиболее благоприятные условия для выработки пенициллина.

На среде с глюкозой ускоряются обменные процессы. Максимум образования пенициллина наблюдается приблизительно через 50 ч после начала развития гриба, а глюкоза используется организмом в течение первых 30–40 ч роста. В присутствии лактозы максимальный выход пенициллина наблюдается через 6–7 сут. При этом лактоза потребляется грибом за 6 сут. Однако, в среде для развития *P. chrysogenum* лактозу можно заменять легко усвояемыми углеводами – глюкозой, сахарозой, галактозой, ксилозой, крахмалом (гидролизованным) – при условии их непрерывного введения в среду.

При промышленном получении пенициллина для борьбы со вспениванием среды в основном используют растительные масла. Однако, они не являются инертными компонентами субстрата. Так, определенные концентрации подсолнечного масла влияют на биосинтез пенициллина. Его добавление к среде в концентрации, не превышающей 1%, не влияет на образование антибиотика, а повышение концентрации масла приводит к резкому снижению выхода бензилпенициллина.

Установлено, что добавление органических кислот (малеиновой кислоты в количестве 1 г/л 1 раз в сутки или янтарной кислоты – 1 г/л 2 раза в сутки) стимулирует выработку антибиотика. Ненасыщенные жирные кислоты, этанол, молочная и лимонная кислоты также способствуют повышению образования пенициллина. В ферментерах с перемешиванием после добавления сахара, малеиновой и янтарной кислот, при регулировании вспенивания путем введения небольших количеств смеси растительных и углеводородных масел достигался высокий выход антибиотика.

Важную роль в процессе биосинтеза пенициллина играет сера. Продуценты антибиотика в качестве источников серы хорошо используют сульфаты и тиосульфаты.

Ионы меди в концентрации более 2 мг/л полностью подавляют образование пенициллина, но не влияют на рост гриба. В случае, если к среде, содержащей медь в концентрации, тормозящей биосинтез антибиотика, добавить железо (1 мг/л), эффект торможения снимается.

В нейтральных и щелочных средах тяжелые металлы вступают в реакцию с фосфатами, образуя нерастворимые соли. Вместе с тем, они могут синтезировать хелаты с аминокислотами, ди- и трикарбоновыми кислотами, присутствующими в среде.

В качестве источников фосфора *P. chrysogenum* может использовать как фосфаты ($\text{KН}_2\text{PО}_4$), так и фитаты (соли инозитфосфорных кислот). Продукт пенициллина содержит фермент, разрушающий фитин, при этом высвобождается неорганический фосфор.

Для развития гриба и биосинтеза пенициллина в первой фазе температурный оптимум составляет 30 °С, во второй фазе – 20 °С.

Большое значение для образования пенициллина имеет аэрация культуры. Установлено, что его максимальное накопление происходит при степени аэрации, близкой к 1.

Уменьшение или увеличение интенсивности аэрации снижает биосинтез антибиотика. При этом значительную роль играет перемешивание культуры. От способа перемешивания культуральной жидкости зависят форма и величина глубинных колоний, состояние которых определяет способность мицелия образовывать пенициллин. В процессе развития *P. chrysogenum* в среде могут накапливаться продукты обмена гриба, ингибирующие биосинтез антибиотика. Причина их образования, вероятно, связана с автолизом мицелия. Добавки питательных веществ в ходе развития продуцента антибиотика уменьшают автолиз мицелия, что способствует минимальному образованию токсических веществ.

Таким образом, для обеспечения высокого выхода пенициллина необходимы следующие условия развития продуцента: хороший рост мицелия, достаточное обеспечение культуры питательными веществами и кислородом, оптимальная температура (в период первой фазы – 30 °С, в период второй фазы – 20 °С), уровень рН ниже 8,0 (но не ниже 7,0), медленное потребление углеводов, подходящий предшественник. В начале фазы роста гриба значение рН среды должно быть ниже 7,0. Кроме того, в среде должен обязательно присутствовать легкодоступный источник углерода. Медленное потребление углеводов во время фазы образования пенициллина достигается за счет использования лактозы или дробным внесением глюкозы или другого сахара.

Предшественники биосинтеза пенициллина

В процессе жизнедеятельности *P. chrysogenum* образует разные типы пенициллинов (пенициллины О, Х, Р, V, О, К), отличающиеся строением радикала молекулы, антибиотической активностью и спектром биологического действия.

Большую роль в биосинтезе пенициллина определенного типа и в увеличении его выхода играют предшественники. Предшественниками могут

служить только те органические вещества субстрата, которые в процессе биосинтеза антибиотика тем или иным путем включаются в его молекулу. Продуцент пенициллина включает в молекулу антибиотика некоторые органические соединения или их часть без предварительного расщепления на отдельные фрагменты и последующего ресинтеза.

Работами Левитова М.М. с сотр. установлено, что в отдельных случаях при введении одного предшественника в среду образуется несколько пенициллинов. Эти наблюдения показывают, что вещества, применяющиеся в качестве предшественников, в процессе развития гриба могут изменяться под действием его ферментов, а затем включаться в биосинтез молекулы пенициллина наряду с другими компонентами среды.

Под воздействием гриба предшественники способны окисляться до CO_2 и воды. При этом разные типы пенициллинов, образуемые грибом, близки по химическому строению. Отличие в их структуре определяется лишь строением радикала.

Фенилуксусная кислота и многие ее производные являются предшественниками биосинтеза пенициллина. Присутствие в кукурузном экстракте фенилэтиламина способствует биосинтезу бензилпенициллина. В данном случае фенилэтиламин выступает и в качестве предшественника бензилпенициллина.

В результате проведенных исследований установлено, что:

1) при развитии гриба в среде без дополнительного внесения предшественника образуется около 45% бензилпенициллина и около 53% пенициллина К, с течением времени биосинтез сдвигается в сторону образования пенициллина К (до 70%);

2) при добавлении к среде производных фенилуксусной кислоты увеличивается общий выход пенициллинов и изменяется соотношение образующихся компонентов в сторону уменьшения концентрации пенициллина К и увеличения концентрации пенициллина В, количество которого в зависимости от возраста мицелия достигает 75–99% от общего содержания в культуральной жидкости смеси пенициллинов.

В процессе культивирования *P. chrysogenum* в среде, не содержащей фенилуксусной кислоты, в культуральной жидкости накапливаются серосодержащие соединения (не β -лактамного характера), которые по своей хроматографической активности близки к цистеину и метионину.

Введение фенилуксусной кислоты в среду для культивирования способствует более интенсивному превращению серосодержащих компонентов в соединения β -лактамного характера. Разные штаммы *P. chrysogenum* по-разному относятся к предшественнику. Так, чем активнее штамм, тем «экономнее» он использует фенилацетамид.

В зависимости от штамма для биосинтеза антибиотика используются разные количества предшественников (от 0,1 до 10%). При этом от 5 до 30% предшественника остается в среде, а большая его часть окисляется организмом до CO_2 и воды, т.е. потребляется в других путях обмена веществ. Одна-

ко, в определенных условиях отдельные штаммы превращают в антибиотик практически весь объем предшественника (фенилацетамид), если его начальная концентрация не превышает 1 мг/мл.

При добавлении к синтетической среде 0,1% феноксиуксусной кислоты *P. chrysogenum* образует феноксиметилпенициллин (пенициллин V). На среде с кукурузным экстрактом в присутствии данного предшественника, наряду с пенициллином V, синтезируются и пенициллины других типов (до 25% от общего выхода антибиотиков).

Предшественники биосинтеза пенициллина (фенилуксусная кислота, фенилацетамид, феноксиуксусная кислота) при определенных концентрациях и значениях pH среды оказывают токсическое действие на культуру продуцента. При этом фенилуксусная кислота наименее токсична. Ее введение в среду в концентрации выше 500 мкг/мл угнетает рост мицелия гриба, особенно в первые 24 ч его развития. Добавление этой кислоты к субстрату в количестве от 100 до 500 мкг/мл, наоборот, стимулирует рост мицелия плесневого гриба. Оптимальная концентрация фенилуксусной кислоты, добавленной через 24 ч после начала развития продуцента, обеспечивающая наибольший выход пенициллина (через 72 ч развития гриба), 500–1000 мкг/мл. Одновременное внесение в среду фенилуксусной кислоты в концентрации 1000 мкг/мл и 1% подсолнечного масла полностью ингибирует биосинтез пенициллина при нормальном росте гриба.

По мнению Левитова М.М., процесс биосинтеза определенного пенициллина при добавлении к среде предшественника с биологической точки зрения представляет собой процесс обезвреживания вещества, токсического для организма, путем его связывания с продуктами обмена гриба в результате «защитного синтеза». Этим и объясняется эффект образования пенициллина при повторном введении в среду, например, фенилуксусной кислоты. Повторное введение предшественника вызывает ответную реакцию организма, характеризующуюся усиленным процессом связывания.

Идея о детоксикации вещества, токсичного для микроорганизма, при образовании некоторых антибиотиков позднее была развита Х. Даром и А. Каном. Такие «двухкомплектные» антибиотики, как актиномицины, макролиды и др., по мнению ученых, синтезируются в результате обезвреживания некоторых веществ, токсичных для организмов, путем связывания их с другими соединениями, что способствует образованию продукта, нейтрального для продуцента. Так, в состав макролидных антибиотиков входит углеводный компонент пираноза. Х. Дар и А. Кан предполагают, что выработка данных антибиотиков обусловлена реакцией обезвреживания этого сахара с образованием дезоаминов. Биосинтез актиномицинов, по их мнению, связан с обезвреживанием гетероциклических фрагментов путем их пептидизации.

В процессе биосинтеза основная масса пенициллина выделяется в окружающую среду, и лишь небольшое его количество содержится в мицелии гриба и клеточной стенке. Так, содержание пенициллина в экстракте из мицелия и стенок клеток по отношению к общему количеству антибиотика остается постоянным и не превышает 0,8%.

Пенициллин необходим не только как химиотерапевтический препарат, но и как исходный материал для получения 6-аминопенициллановой кислоты (6-АПК). Так, из общего количества природного пенициллина, выпускаемого промышленностью (около 17 тыс. т), примерно 35%, используется непосредственно в медицинской практике, а около 65% идет на получение 6-АПК.

Все известные пенициллины подобно бензилпенициллину подавляют синтез клеточной стенки бактерий.

Фазы развития гриба и биосинтеза пенициллина

Изменения, происходящие в мицелии гриба *P. chrysogenum* и культуральной жидкости, в процессе биосинтеза пенициллина, носят фазовый характер.

Согласно положению Шапошникова В.Н. о двухфазности ряда микробиологических процессов, развитие *P. chrysogenum*, биохимические изменения в субстрате и биосинтез пенициллина при условии, что гриб начинает развиваться при засеве среды спорами или мицелием, не перешедшим еще в стадию антибиотикообразования, могут быть разделены на две фазы.

В первой фазе развития наблюдается усиленный рост продуцента, происходит энергичное потребление источников углерода, усиливается азотный обмен, значение рН среды возрастает, потребление кислорода высокое. В этой фазе антибиотик практически не вырабатывается.

Во второй фазе значительно снижается прирост мицелия гриба, уменьшается интенсивность поглощения кислорода, значение рН среды почти не изменяется. Основная масса источника углерода уже использована. В этот период образуется основное количество пенициллина.

Беккер З.Э. с соавт. описали шесть условно выраженных возрастных фаз, выявляемых при цитологическом и цитохимическом изучении продуцентов пенициллина. При этом установлено, что в заметном количестве пенициллин начинает продуцироваться лишь с IV возрастной фазы гриба. Максимум накопления антибиотика в культуральной среде приходится на VI фазу в период автолиза.

Определение возрастных фаз развития продуцента и связанного с ними биосинтеза пенициллина путем микроскопического контроля за состоянием мицелия позволяет установить:

- 1) характер развития гриба с выяснением его возрастного состояния, пригодного для использования посевного материала, и контроля за ходом образования антибиотика;
- 2) дефекты развития и их возможные причины;
- 3) момент окончания развития гриба в ферментерах.

Процесс биосинтеза пенициллина реализуют при тщательном соблюдении стерильности всех операций, т.к. загрязнение культур посторонней микрофлорой резко снижает накопление антибиотика. Известно, что многие бактерии, обычно встречающиеся в воздухе (*B. subtilis*, *B. mesentericus*, *B. megaterium*, *B. cereus*, *E. coli* и др.), способны образовывать фермент β -

лактамазу, расщепляющий пенициллин. Особенно активно продуцируют этот фермент *B. subtilis* и *B. cereus*. Загрязнение культуры гриба одной из этих бактерий может резко снизить количество антибиотика в культуральной жидкости.

Температурный оптимум действия лактамазы составляет 37 °С. Одним из активных продуцентов названного фермента оказалась туберкулезная палочка *Mycob. tuberculosis*.

Пути биосинтеза пенициллина

Направленный биосинтез разных типов пенициллина обеспечивается добавлением к среде для культивирования *P. chrysogenum* фенилуксусной кислоты или ее производных, а также других соединений – предшественников молекулы пенициллина. В связи с этим, данные соединения, включающиеся в боковую цепь молекулы пенициллина, определяют направленность биосинтеза антибиотика. Установлены пути биосинтеза основной бициклической структуры пенициллина – 6-АПК и молекулы антибиотика в целом.

С этой целью были использованы высокоэффективные методы исследования, в том числе и применение протопластов грибов и их лизатов, мутантов грибов, блокированных на разных этапах биосинтеза молекулы пенициллина, а также меченые соединения, в частности аминокислоты, входящие в структуру молекулы антибиотика.

Молекула пенициллина образуется из L-цистеина, L-валина и неполярных карбоновых кислот – предшественников бокового радикала молекулы антибиотика. Кроме того, обязательным компонентом биосинтеза пенициллина является L-оc-аминоадипиновая кислота (L-оc-ААК), которая образуется из кетоглутарата и ацетил-Ко А при участии гомоцитратсинтетазы.

Однако, в первой фазе развития *P. chrysogenum* на этой стадии биосинтеза может происходить ингибирование гомоцитратсинтетазы конечным продуктом метаболизма лизином.

β -лактам образуется в результате замыкания кольца между C₃-цистеином и ОН-группой валина. Этот процесс является первой стадией циклизации LLD-трипептида в первичный антибиотик – изопенициллин N.

Первоначально возникновение основного ядра молекулы пенициллина – 6-АПК – было показано при культивировании гриба в среде, не содержащей предшественника. Затем 6-АПК выделили из культуральной жидкости продуцента пенициллина и определили ее строение.

Позднее многие исследователи искали у *P. chrysogenum* фермент, превращающий молекулу 6-АПК в пенициллин, т.е. осуществляющий ее ацилирование. В результате в 1968 г. появилось сообщение о том, что в мицелии гриба обнаружен фермент пенициллинацилтрансфераза, способный переносить ацильную группу разных пенициллинов на 6-АПК. Образование фермента совпадает с периодом активного биосинтеза пенициллина, следовательно, он непосредственно участвует в этом процессе.

В этой связи, можно утверждать, что изопенициллин N и 6-АПК являются непосредственными предшественниками образования пенициллина.

Выделение пенициллина

Первый этап выделения пенициллина, накапливающегося в культуральной среде, связан с отделением мицелия гриба от культуральной жидкости путем фильтрации или центрифугирования. Во избежание потерь антибиотика мицелий гриба отделяют и промывают.

В настоящее время пенициллин из культуральной жидкости обычно извлекают путем его экстракции органическими растворителями, не смешивающимися с водой (амилацетат, хлороформ, бутилацетат, бутиловый спирт и др.).

Процесс экстракции антибиотика из культуральной жидкости основан на методе замены растворителей, состоящем в том, что пенициллин в виде свободной кислоты может быть экстрагирован каким-либо растворителем, а затем вновь переведен в водный раствор в виде соли путем добавления определенного количества щелочи. Соли пенициллина плохо растворимы в органических растворителях, поэтому их можно почти количественно перевести из органического растворителя в водный раствор. Повторение этих операций способствует концентрации и очистке лекарственного препарата.

Технологическая схема производства пенициллина

Подготовка инокулята включает следующие стадии:

1. выращивание посевного мицелия первой генерации в аппаратах малой емкости (инокуляторах);
2. выращивание посевного мицелия второй генерации в аппаратах большой емкости.

Споровая культура для засева инокулятора выращивается на пшене в стеклянных флаконах, высушивается и в таком виде хранится при комнатной температуре. Засев производят сухими спорами из 2–3 флаконов.

Основной задачей при культивировании продуцента пенициллина в посевных аппаратах на стадии подготовки инокулята является быстрое получение большого количества биомассы мицелия, способного обеспечить при пересеве в ферментер интенсивный рост и высокий выход антибиотика. Для ее осуществления продуцент необходимо выращивать на средах, богатых легкоусвояемыми питательными веществами, в условиях хорошей аэрации, при оптимальной для роста микроорганизма температуре.

В качестве легкоусвояемого углерода выступает глюкоза, сахароза и т.д. В качестве второго источника углерода применяют в небольших количествах лактозу, присутствие которой в среде для выращивания посевного мицелия необходимо по следующей причине: ее потребление начинается не сразу, а после некоторого периода адаптации, в течение которого происходит образование фермента, расщепляющего лактозу. Посевной мицелий, выращенный на среде, содержащей лактозу, обладает более высокой ферментативной активностью по отношению к трудноусвояемой лактозе и быстрее ее потребляет, что положительно сказывается на ходе ферментации.

Потребность гриба в азоте легко удовлетворяется минеральным (аммонийным или нитратным) азотом. Кроме неорганического азота, в состав посевных сред входит растительное сырье (кукурузный экстракт), богатое органическим азотом. Растительное сырье характеризуется не только наличием органического азота, оно содержит дополнительный углерод, входящий в состав аминокислот, полипептидов и белков, а также минеральные элементы, витамины и ростовые вещества.

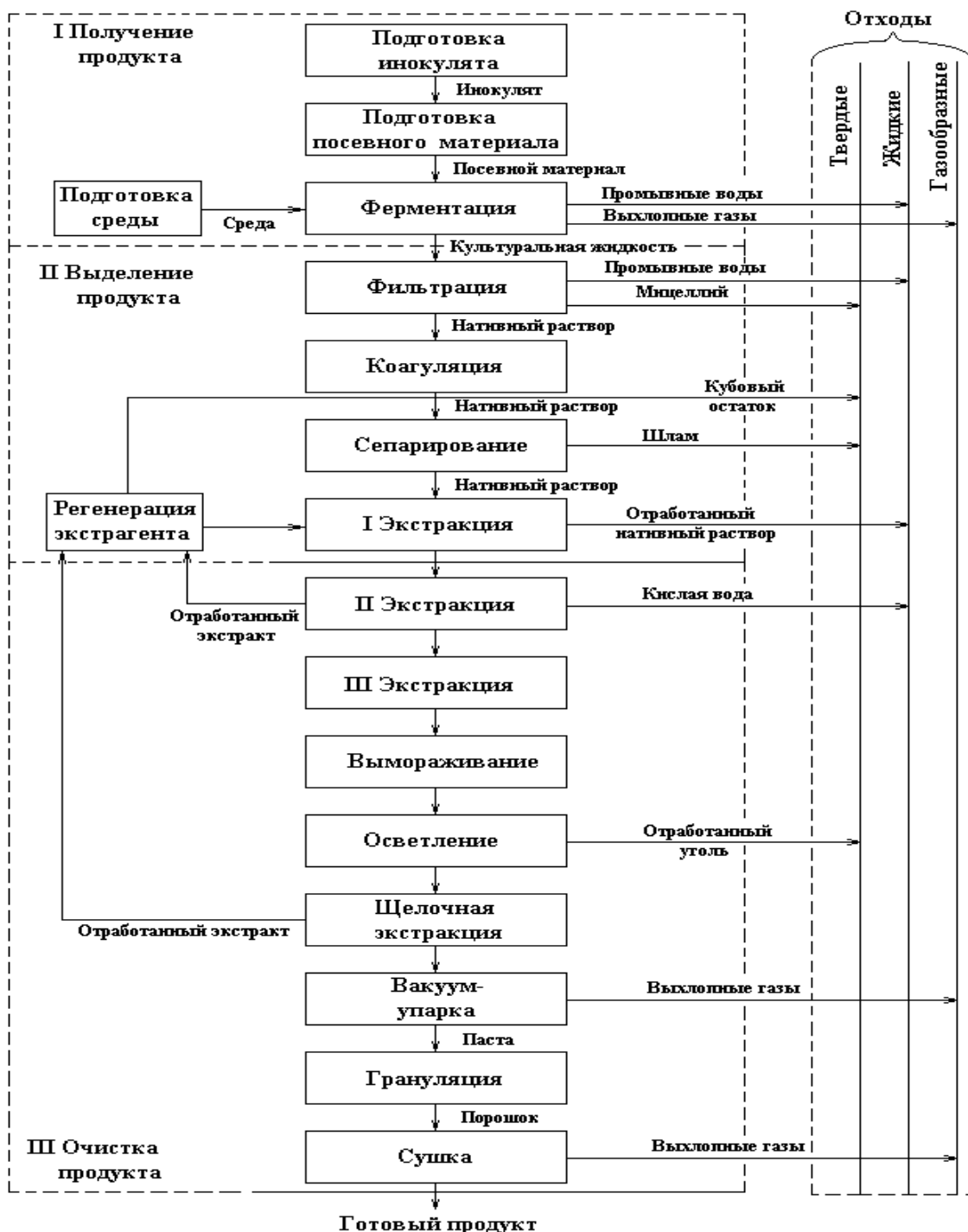


Рис. 2. Схема биотехнологического производства пенициллина

Кроме углерода и азота, для роста микроорганизма необходимы фосфор, сера, магний, калий и микроэлементы (марганец, цинк, железо, медь и др.). Большинство известных посевных сред содержит почти все указанные элементы, но в разных соотношениях. В табл. 1 приведен пример среды, применяемой для выращивания посевного материала.

Таблица 1

Состав среды для выращивания посевного материала

| Вещество | Количество, % |
|-------------------------------------|--------------------|
| Кукурузный экстракт | 2,0 (на сухой вес) |
| Глюкоза | 2 |
| Лактоза | 0,5 |
| Азотнокислый аммоний | 0,125 |
| Однозамещенный фосфорнокислый калий | 0,2 |
| Сернокислый магний | 0,025 |
| Сернокислый натрий | 0,05 |
| Мел | 0,5 |

Значительное влияние на рост мицелия оказывает значение рН среды. При этом значение рН среды, наиболее благоприятное для роста мицелия, составляет 6,0–6,5. В более кислой или щелочной среде рост и развитие продуцента замедляются.

Выращивание посевного мицелия продолжается 36–50 ч до получения биомассы средней густоты. Мицелий, выращенный в инокуляторах, передается в количестве 10% (по объему) в посевные аппараты, где культивируется в течение 12–18 ч, а затем ферментеры в количестве 15–20%. Процесс выращивания посевного мицелия первой и второй генерации осуществляется при температуре 24–26 °С.

Продуценты пенициллина являются типичными аэробами и требуют для своего роста и развития наличия кислорода. Для получения высокопродуктивного посевного мицелия наряду с оптимальной питательной средой необходимо обеспечить и достаточное снабжение продуцента кислородом. Выращивание посевного мицелия при производстве пенициллина осуществляют при непрерывном перемешивании и непрерывной подаче воздуха в аппараты.

Ферментация является основной стадией в производстве пенициллина, на которой формируется целевой продукт. В производстве применяют метод глубокой ферментации, при котором культуру продуцента выращивают в питательной среде, заполняя весь ее объем. У разных штаммов потребность в источниках питания неодинакова. В связи с этим, состав сред не является постоянным и универсальным для всех продуцентов, образующих пенициллин, он изменяется с появлением новых штаммов.

Ферментационная среда должна быть составлена так, чтобы развивающаяся культура, потребляя питательные вещества и выделяя продукты обмена, сама создавала необходимые условия и осуществляла переход от фазы роста мицелия к фазе пенициллинообразования. При этом необходимо, чтобы вторая фаза была более продолжительной, процесс ферментации прекращался до наступления автолиза.

Для этого необходимо одновременное присутствие в среде легко- и трудноусвояемого углевода. В данном случае легкоусвояемый углевод обеспечивает быстрый рост и накопление биомассы, а трудноусвояемый углевод создает условия, благоприятные для биосинтеза антибиотика.

При промышленном биосинтезе пенициллина наибольшее распространение в качестве легкоусвояемого углевода получили глюкоза или гидрол. При этом трудноусвояемым углеводом является лактоза, обеспечивающая полноценное протекание фазы пенициллинообразования. Высокий выход антибиотика достигают только при наличии в среде лактозы в качестве основного источника углевода. Лактоза находится в культуральной жидкости на протяжении всего процесса ферментации, благодаря этому мицелий обеспечен сахаром, биомасса в течение пенициллинообразования медленно растет, а накопление антибиотика достигает максимального уровня.

В состав ферментационных сред входит органический и минеральный азот. При этом в качестве источников органического азота используют кукурузный или пшеничный экстракт, различные жмыхи, соевую муку, глютен и другое растительное сырье, богатое азотом.

Источником минерального азота служат нитрат аммония, сернокислый аммоний и некоторые другие соли. При ассимиляции грибом аммонийного азота из этих солей высвобождаются анионы кислот, способствующие незначительному закислению среды.

Важную роль в обмене веществ клетки играет фосфор, который необходим не только для нормального роста и развития продуцента, но и для биосинтеза пенициллина. Для образования пенициллина требуется более высокая концентрация фосфора в среде, чем для роста продуцента.

Обязательным компонентом ферментационной среды является сера, входящая в состав важнейших аминокислот и ферментов. Она необходима еще и потому, что входит в состав молекулы пенициллина. В среды сера вносится в виде солей серной кислоты и гипосульфита.

Из других элементов, необходимых для нормальной жизнедеятельности гриба и образования антибиотика, следует отметить калий, магний, цинк, железо, марганец, медь.

Кроме того, важной составляющей является присутствие в среде предшественников (веществ, непосредственно включающихся в молекулу антибиотика). Так, предшественником бензилпенициллина является фенилуксусная кислота (ФУК) или ее производные – фенилацетамид (ФАА), фенилэтиламин, фенилацетилглицин и др.; предшественником феноксиметилпенициллина – феноксиуксусная кислота (ФОУК). Оптимальная концентрация предшественника в среде устанавливается в зависимости от эффективности его использования данным штаммом для биосинтеза пенициллина.

Для биосинтеза пенициллина наиболее благоприятно значение рН, близкое к 7,0. Для поддержания в культуральной жидкости определенного уровня рН рекомендуется его регулировать с помощью автоматического добавления кислоты или щелочи, или путем установления оптимального соотношения компонентов среды. В синтетических средах в качестве регуляторов значения рН применяют органические кислоты, а в комплексных средах – мел. Своеобразным регулятором значения рН при промышленном получении пенициллина является кашалотовый жир, который добавляется в среду в процессе ферментации в качестве пеногасителя.

Для получения максимального выхода пенициллина основные компоненты среды должны входить в ее состав в строго определенных соотношениях и концентрациях. Состав некоторых сред, применяющихся в производстве пенициллина представлен в табл. 2.

Основными показателями, свидетельствующими об окончании ферментации, являются полное исчезновение углеводов в культуральной жидкости и прекращение биосинтеза антибиотика. Процесс ферментации в производственных условиях осуществляется при температуре 26 ± 10 °С и продолжается обычно 120–125 ч.

Интенсивность биосинтеза пенициллина зависит от количества мицелия, образуемого в процессе ферментации. Большое количество биомассы обеспечивает более высокий выход пенициллина. В связи с этим, содержание углеводов, азота, фосфора и серы в среде должно быть достаточно высоким, чтобы обеспечить максимальное накопление мицелия. Однако, большое количество биомассы еще не гарантирует высокий выхода антибиотика. Продуцент необходимо обеспечить не только достаточным количеством питательных веществ, но и необходимым количеством кислорода. Его питание и аэрация являются двумя сторонами одного процесса: чем больше питательных веществ в среде, тем больше требуется кислорода для их окисления. С другой стороны, повышение концентрации питательных веществ в среде приводит к увеличению биомассы, для дыхания которой требуется пропорционально большее количество кислорода. Состав среды и аэрация взаимообусловлены. Максимальное количество пенициллина может быть получено только на средах с высокой концентрацией компонентов в условиях достаточного снабжения культуры растворенным кислородом.

Важным условием успешного проведения процесса биосинтеза пенициллина является строгое соблюдение условий асептики, т.к. попадание посторонней микрофлоры может снизить выход антибиотика. Многие распро-

страненные микроорганизмы способны образовывать пенициллиназу, расщепляющую пенициллины. При этом попадание даже небольшого числа бактерий, способных вырабатывать пенициллиназу, приводит к полной инактивации пенициллина. В этой связи, следует уделять особое внимание стерильности питательных сред, воздуха и вспомогательных материалов.

Таблица 2

Состав сред для получения пенициллина

| Компоненты | Среда | | |
|--|------------|----------|---------|
| | кукурузная | жмыховая | жировая |
| 1 | 2 | 3 | 4 |
| Кукурузный экстракт | 2,0–3,0 | - | 2,0–3,0 |
| Жмыхи (арахисовый, подсолнечный, соевый и др.) | - | 2,0–4,0 | - |
| Лактоза | 5,0 | 5,0 | 1,0 |
| Глюкоза или гидрол | 1,5 | 1,5 | 1,5 |
| Кашалотовый жир или растительные масла | 0,5–0,1 | 0,5–0,1 | 2,5–3,5 |
| Азотнокислый аммоний | 0,4 | 0,4 | 0,4 |
| Сернокислый натрий | 0,05 | 0,05 | 0,05 |
| Фосфорнокислый калий однозамещенный | 0,4 | 0,4 | 0,4 |
| Сернокислый магний | 0,025 | 0,025 | 0,025 |
| Серноватистокислый натрий (гипосульфит) | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| Мел | 0,5–1,0 | 0,5–1,0 | 0,5–1,0 |
| Предшественник | 0,3–0,4 | 0,3–0,4 | 0,3–0,4 |

Необходимость обеспечения условий стерильности процессов при технологических связях агрегатов между собой коллекторными системами загрузки питательных сред, передачи посевного материала из инокуляторов в ферментаторы обуславливает более высокие требования к уровню автоматизации этих процессов.

Фильтрация. Обычно для отделения мицелия от культуральной жидкости применяют вакуум-барабанные фильтры непрерывного действия. Фильтрацию начинают до начала автолиза мицелия, поскольку при фильтрации автолизированной культуры мицелий не образует плотной пленки на фильтрующей поверхности барабана, а налипает в виде отдельных тонких комков, которые сами не отходят в зоне «отдувки» фильтра, и их приходится удалять вручную. При этом продолжительность фильтрации увеличивается в 2–3 раза, выход фильтрата резко снижается. При этом фильтрат получается очень мутным.

Необходимо тщательно соблюдать условия, препятствующие разрушению пенициллина во время фильтрации, – охлаждение нативного раствора до 4–6 °С и систематическая (после каждой загрузки) обработка фильтра, коммуникаций и сборников антисептиками. Фильтр должен систематически стерилизоваться острым паром.

Предварительная обработка нативного раствора. Нативный раствор (фильтрат культуральной жидкости) представляет собой более или менее мутную, окрашенную в желто-коричневый или зеленовато-коричневый цвет жидкость. Величина рН среды в зависимости от штамма продуцента, состава среды и продолжительности процесса ферментации варьируется от 6,2 до 8,2.

Важной характеристикой нативного раствора является содержание в нем белковых веществ, определяемых осаждением трихлоруксусной кислотой или другим методом.

Применяется несколько способов предварительной обработки нативного раствора с целью освобождения от белковых примесей: осаждение солями многовалентных металлов (Al^{3+} , Fe^{3+} , Zn^{2+}), коагуляция танином, термическая коагуляция при температуре 60–75 °С и величине рН 5,5–6,0, осаждение примесей катионными детергентами типа четвертичных аммониевых оснований (цетилпиридиний бромидом, додецилтриметиламмоний хлоридом и др.). Применение этих методов приводит к потерям антибиотика. Обычно в результате коагуляции и последующей фильтрации или сепарирования теряется от 5 до 15% пенициллина. При этом коагуляция солями металлов позволяет удалять не более 50% общего количества белковых веществ.

Экстракция и очистка пенициллина. Нативный раствор содержит 3–6% сухих веществ. На минеральные вещества приходится 30–40% сухого остатка, от 15 до 30% приходится на пенициллин, а остальное представляет сложную смесь органических веществ, включая белки, полипептиды, низкомолекулярные азотистые соединения, углеводы, различные органические

кислоты. Для выделения пенициллина из этой сложной смеси используют адсорбцию, экстракцию или осаждение.

В биопроизводстве извлечение активного вещества из нативного раствора основано на экстракции растворителем, не смешивающимся с водой, при подавленной диссоциации карбоксильной группы пенициллина. В растворитель, кроме пенициллина, переходит большая часть органических кислот. Минеральные примеси, большая часть азотистых соединений и других органических веществ остаются в водной фазе, так что в результате экстракции чистота продукта увеличивается в 4–6 раз.

К растворителям, используемым для экстракции пенициллина, предъявляются следующие требования:

1. малая растворимость в воде;
2. отсутствие взаимодействия с пенициллином;
3. низкая упругость пара при температуре 5–30 °С;
4. возможность регенерации при температуре не выше 120–140 °С;
5. низкая стоимость.

С учетом этих и ряда других показателей в качестве экстрагентов при получении пенициллина чаще всего используют бутилацетат и амилацетат.

В кислой среде пенициллин нестабилен, поэтому при его экстракции в органический растворитель следует контролировать значение рН, поддерживая его на уровне 1,9–2,0.

При экстракции пенициллина из нативного раствора образуются стабильные, трудноразделяемые эмульсии, что обусловлено наличием в нативном растворе поверхностно-активных веществ (ПАВ). Это обуславливает необходимость применения специальных дезэмульгаторов. Обычно для этой цели применяют анионные детергенты (сульфированные жирные или нафтенновые кислоты). Обычно выбор детергента определяется его доступностью и экономичностью. Для разделения эмульсии в экстракторах-сепараторах, как правило, достаточно добавить к нативному раствору 0,05–0,1% детергента.

На стадии экстракции пенициллина из нативного раствора используют многоступенчатые экстракторы-сепараторы или двухступенчатую схему экстрагирования (контактирование подкисленного нативного раствора с бутилацетатом в специальных смесителях и разделение полученной эмульсии на центробежных сепараторах). Применение центробежных экстракторов-сепараторов (с производительностью 4000–5000 л/ч), обеспечивающих возможность реализации, по крайней мере, двух ступеней экстракции в одном аппарате и эффективное разделение фаз, снижает до минимума время пребывания пенициллина в кислой среде и, следовательно, повышает выход целевого продукта. Применение двухступенчатой схемы при экстракции пенициллина из нативного раствора нежелательно не только вследствие более длительного времени пребывания пенициллина в неблагоприятных условиях, но и вследствие того, что применение сепараторов (производительность которых варьируется в пределах 800–1000 л/ч) не всегда обеспечивает достаточно полное разделение фаз. Это влечет за собой ухудшение качества бути-

лацетатного экстракта (загрязнение нативным раствором) и увеличение потерь бутилацетата с отработанным нативным раствором. Соотношение фаз при проведении бутилацетатной экстракции пенициллина из нативного раствора составляет 1,0:0,3–0,45, температура – 4–3 °С.

После осуществления бутилацетатной экстракции пенициллина из нативного раствора, осуществляют его извлечение из бутилацетатного экстракта водным раствором бикарбоната натрия или буферным раствором при значении рН 6,6–7,2. На этой стадии также применяют многоступенчатые экстракционные аппараты или используют двухступенчатую противоточную экстракцию с разделением эмульсии на сепараторах с отношением растворитель – водная фаза 1,0:0,35. Выход целевого продукта при бутилацетатной и буферной видам экстракции составляет около 90–92%.

С целью дальнейшей очистки пенициллин повторно извлекают из буферного экстракта органическим растворителем (чаще всего бутилацетатом или хлороформом) при значении рН 2,0. Процесс осуществляется аналогично бутилацетатной экстракции из нативного раствора. Данная стадия технологически оформляется с использованием многоступенчатых экстракционных аппаратов или осуществляется в виде двухступенчатой противоточной экстракции с разделением фаз на сепараторах. В данном случае выход составляет около 86% от количества пенициллина, содержащегося в нативном растворе.

При этом в биотехнологическом производстве экстракционный процесс извлечения и химической очистки пенициллина реализуется по непрерывной схеме.

Выделение кристаллических солей пенициллина. Наиболее надежным методом, обеспечивающим возможность получение кристаллического пенициллина, является выделение бензилпенициллина из бутилацетатного экстракта в виде концентрированного водного раствора калиевой соли с последующим упариванием воды с бутанолом под вакуумом, что приводит к кристаллизации калиевой соли из бутилового спирта.

Данный процесс включает следующие технологические стадии:

1. Обезвоживание бутилацетатного экстракта путем охлаждения до температуры -16 – -18 °С с последующим освобождением от льда путем фильтрования. При этом удаление пигментных загрязнений осуществляется путем обработки активированным углем с последующей фильтрацией на охлажденном друк-фильтре.

2. Получение концентрата калиевой соли бензилпенициллина экстракцией 0,56–0,6 н. раствором едкого кали.

3. Стерилизующая фильтрация концентрата калиевой соли и упаривание под вакуумом с бутиловым спиртом при температуре 16–26 °С и остаточном давлении 5–10 мм рт. ст. Объем кубового остатка должен составлять не более 60–80% объема загруженного концентрата. Добавление бутилового спирта к концентрату при упаривании под вакуумом связано с тем, что бутанол с водой образует смесь, кипящую при более низкой температуре по сравнению с

температурой кипения воды. Отгонка воды проводится в сравнительно мягких условиях, вследствие чего возможность инактивации пенициллина уменьшается. После удаления воды и большей части бутилового спирта калиевая соль бензилпенициллина кристаллизуется.

4. Фильтрация осадка калиевой соли бензилпенициллина с использованием фильтрующей центрифуги и промывка осадка безводным бутиловым спиртом.

5. Гранулирование полученной пасты и сушка калиевой соли в вакуум-сушильных шкафах при температуре 75–80 °С и остаточном давлении 10–20 мм рт. ст. При этом образуется калиевая соль бензилпенициллина в виде белого мелкокристаллического порошка с содержанием бензилпенициллина около 95% и выходом 70% от количества антибиотика в нативном растворе.

Важным требованием, предъявляемым к получаемому сухому порошкообразному лекарственному препарату пенициллина, является его стерильность. При этом термическая обработка данного лекарственного препарата невозможна, вследствие его термолабильности. В данном случае стерильность лекарственного препарата антибиотика может быть обеспечена лишь при осуществлении заключительных стадий процесса его получения в строго асептических условиях, исключающих возможность заражения продукта посторонними микроорганизмами и их спорами. В связи с этим, начиная со стерилизующей фильтрации концентрата и бутанола, все технологические операции процесса реализуются в изолированных стерильных помещениях с использованием специализированного оборудования. Для обеспечения условий асептики осуществляется весь комплекс необходимых санитарных и технологических мероприятий.

Перед регенерацией бутилацетат и бутанол, применяющиеся в процессе выделения и химической очистки пенициллина, промывают раствором щелочей для удаления примесей кислот (продуктов инактивации пенициллина, фенилуксусной кислоты).