

## Занятие семинарского типа № 5

**ТЕМА ЗАНЯТИЯ:** Антибиотики как биотехнологические продукты.  
Методы определения антимикробной активности антибиотиков

### УЧЕБНЫЙ МАТЕРИАЛ

#### 1. Антибиотики как биотехнологические продукты

К настоящему времени выделено и описано более 3000 антибиотиков. Для большинства из них установлена химическая структура. С целью идентификации антибиотиков с неизвестной структурой используют особенности из действия и физико-химические свойства. В химическом отношении антибиотики представляют собой гетерогенную группу.

1. Молекулярная масса антибиотиков варьирует от 150 до 5000.

2. Молекулы антибиотиков состоят из углерода и водорода или чаще всего из углерода, кислорода, водорода и азота. Кроме того, в структуре молекулы некоторых антибиотиков присутствуют атомы серы, фосфора или галогенов.

3. В молекулах антибиотиков представлены почти все виды функциональных групп (гидроксильные, карбоксильные, карбонильные, азотсодержащие и др.), а также структуры, характерные для органических веществ (алифатические и алициклические цепи, ароматические кольца, гетероциклы, углеводы, полипептиды и т.д.).

Общим для большинства антибиотиков является то, что в основном они представляют собой твердые органические вещества. При комнатной температуре в твердом состоянии находятся обычно высокомолекулярные вещества или вещества, молекулы которых содержат несколько полярных групп. Обычно антибиотики действительно содержат полярные группы, участвующие во взаимодействии с макромолекулами бактерий, что и приводит к подавлению роста последних.

Продуценты антибиотиков. Разные антибиотики синтезируются различными микроорганизмами. Однако, таксономическое распределение штаммов – продуцентов антибиотиков не является ни непрерывным, ни случайным. Примерно 80% известных антибиотиков синтезируется штаммами, принадлежащими только к одному порядку бактерий – актиномицетам. Причем главным образом к одному из родов этого порядка – *Streptomyces*. Очень редко синтезируют антибиотики представители эубактерий. Исключение составляют лишь некоторые спорогенные бациллы, продуцирующие полипептидные антибиотики определенного класса. Антибиотики синтезируются многими микроскопическими грибами, но их структура менее разнообразна, чем структура лекарственных препаратов, образуемых актиномицетами.

Способность к биосинтезу антибиотиков не является строго видоспецифичным признаком. Один и тот же антибиотик может образовываться организмами, относящимися к разным видам, родам и даже порядкам. Справед-

ливо и обратное, т.е. штаммы, относящиеся к одному виду, могут синтезировать разные антибиотики. Однако, как правило, чем дальше отстоят друг от друга организмы в таксономическом отношении, тем меньше вероятность, что они образуют одни и тот же антибиотик.

## **2. Биосинтез антибиотиков**

В противоположность широкому разнообразию структур антибиотиков и штаммов, их образующих, биохимические реакции, в ходе которых синтезируются антибиотики, можно отнести к немногим основным биосинтетическим путям. Следует отметить, что пути биосинтеза антибиотиков являются вариантами биосинтетических путей, в норме протекающих в клетке.

Благодаря сравнительно крупным размерам молекул антибиотиков субстратная специфичность ферментов, участвующих в их биосинтезе, по-видимому, менее строгая, чем при других биохимических реакциях. Данный фермент может катализировать одну и ту же реакцию, протекающую с участием не совсем одинаковых субстратов. С другой стороны, одни и тот же промежуточный продукт может служить субстратом для нескольких ферментов. Частичное снижение специфичности приводит к синтезу продуктов, имеющих одинаковую основную структуру, но различающихся, например, степенью окисленности, степенью ненасыщенности или другими свойствами. По этой причине антибиотики часто образуются семействами, т.е. один и тот же штамм продуцирует два или несколько антибиотиков, близких друг другу.

Три основных обстоятельства определяют особенности биосинтеза, общие для всех антибиотиков:

- ✓ антибиотики не относятся к прямым продуктам трансляции или вообще матричного синтеза;
- ✓ антибиотики как вторичные вещества образуются из первичных метаболитов;
- ✓ биосинтез молекулы любого антибиотика происходит с участием ряда ферментов.

Координация действия ферментов, т.е. обеспечение правильной последовательности ферментативных реакций, обеспечивается разными путями. Один путь, доказанный на примере биосинтеза циклопептидных и некоторых других антибиотиков, связан с тем, что синтез или сборка антибиотической молекулы происходит в мультиферментных комплексах с упорядоченно расположенными ферментами. Первичные метаболиты «входят» в мультиферментный комплекс, в котором происходит ряд их превращений. Из комплекса «выходит» или завершена молекула антибиотика, или ее крупный фрагмент, например, специфический агликон того или иного антибиотика и т.п. При «сборке» углеродного скелета молекулы антибиотика могут происходить различные реакции: метилирование или деметилирование, карбоксилирование или декарбоксилирование, аминирование или дезаминирование.

Предшественниками  $\beta$ -лактамовых антибиотиков являются аминокислоты. Началом формирования  $\beta$ -лактамовой молекулы является синтез LLD-трипептида, состоящего из трех L-аминокислот – первичных метаболитов – L-аминоадипиновой кислоты, L-цистеин и L-валин.

В образовании L-валина принимает участие фермент, замыкающий пептидные связи, а также фермент, превращающий L-валин в его оптический изомер – D-валин. Это специфические ферменты биосинтеза антибиотика, не принадлежащие к ферментам, катализирующим превращения первичных метаболитов в обычных метаболических циклах.

Затем LLD-трипептид превращается в моноциклический  $\beta$ -лактам, т.е. происходит замыкание  $\beta$ -лактамового кольца.

Следующим этапом биосинтеза  $\beta$ -лактамовых антибиотиков является появление пятичленного серосодержащего кольца, сконденсированного с  $\beta$ -лактамом. Все это означает участие в биосинтезе антибиотика новых ферментов. В случае образования бензилпенициллина необходимо присутствие фенилуксусной кислоты (в активной форме), в результате чего освобождаются аминокислотная кислота и кофермент А.

Во втором случае происходит «экспансия» – расширение пятичленного кольца до шестичленного, что катализируется специфическим ферментом экспандазой. Затем в результате ряда ферментативных реакций формируется молекула цефалоспоринона С.

На основании анализа структурных формул амингликозидов – стрептомицина и гентамицинов и др. можно предположить, что их предшественником является глюкоза. В результате многочисленных исследований установлено, из глюкозы синтезируются не только остатки сахаров в молекулах амингликозидов, но и их аминокислотный фрагмент. Два других фрагмента молекулы стрептомицина – пентоза (стрептоза) и L-глюкозамин также образуются из глюкозы за счет ряда ферментативных реакций. Наконец, сборка молекулы стрептомицина из трех компонентов – стрептидина, стрептозы и L-глюкозамина (замыкание между ними гликозидных связей) требует специфических ферментов. В биосинтезе стрептомицина и большинства других амингликозидных антибиотиков участвует не менее 20 ферментов.

Описывая ферментативные реакции биосинтеза тетрациклиновой структуры, обычно проводят аналогию с биосинтезом первичных метаболитов (жирных кислот) из остатков ацетатных или пропионатных единиц по принципу «голова к хвосту», когда формируется связь между углеродом карбоксильной группы и углеродом метильной группы (или метиленовой группы) следующей единицы. В этих ферментативных реакциях участвует кофермент А.

Существуют и принципиальные отличия между синтезом жирных кислот и антибиотиков – вторичных метаболитов. При биосинтезе антибиотиков не происходит восстановления карбонильных групп после реакции конденсации или такое восстановление происходит до образования гидроксильной группы, или двойных связей. При полном восстановлении образуются ароматические структуры, а при неполном – макроциклические лактоны. В этой

связи, имеется определенная связь между «биогенезом» таких соединений, как тетрациклины и антибиотики-макролиды. Скелет молекулы тетрациклинов строится из одной малонамидной единицы и восьми малонатных.

Основа структуры лактонного макроциклического кольца эритромицина образуется как результат ферментативной полимеризации одной единицы пропионата и шести единиц метилмалоната. Сахара эритромицина происходят из глюкозы за счет ряда ферментативных превращений. В биосинтезе участвуют ферменты сборки молекулы из макроциклического лактона и сахаров.

Методы генетической инженерии с успехом используют при создании продуцентов рекомбинантных белков, т.к. белки являются прямыми продуктами трансляции. В целом, остается справедливым правило: один ген – один белок, т.е. один «структурный» ген определяет структуру (последовательность аминокислот) одного белка.

Антибиотики не являются прямыми продуктами трансляции в отличие от ферментов биосинтеза антибиотиков. Количество таких ферментов достигает нескольких десятков. Таким образом, в биосинтезе молекулы антибиотика принимают участие десятки «структурных» генов.

В лабораторных условиях биосинтез многих антибиотиков (как и других вторичных метаболитов) происходит во время определенной стадии роста культуры. С этой точки зрения, по предложению Б. Локка, рост популяции продуцентов антибиотиков можно разделить на две стадии: трофофазу и идиофазу. В первой фазе происходит интенсивный синтез таких соединений, как белки, нуклеиновые кислоты, ферменты, некоторые органические кислоты, а во второй – относительно окисленные продукты синтеза первой фазы потребляются, и происходит образование большинства вторичных метаболитов (антибиотиков, пигментов и др.), т.е. относительно восстановленных соединений.

В зависимости от участвующих в процессе биосинтеза веществ антибиотики могут быть образованы следующим образом:

1. из единственного предшественника – первичного метаболита. Их биосинтез – цепь реакций, модифицирующих исходный продукт аналогичным образом, как при биосинтезе аминокислот или нуклеотидов. Примером такого биосинтеза является образование хлорамфеникола через типичный для ароматических соединений путь шикимовой кислоты;

2. из двух - трех различных предшественников, которые модифицируются и конденсируются с образованием сложных молекул. За счет конденсации двух аминокислот происходит биосинтез линкомицина. Антибиотик новобицин образуется из замещенной бензойной кислоты, аминокислоты тирозина (оба – производные тирозина) и сахара новиозы;

3. путем олигомеризации или полимеризации близких по структуре мономеров через образование основной структуры, которая впоследствии может модифицироваться. По такому механизму происходит биосинтез четырех основных групп антибиотиков:

а) из аминокислот образуются полипептидные и депсипептидные антибиотики;

б) из ацетат – пропионатных единиц (по типу синтеза жирных кислот) – тетрациклины, рифамицины, макролиды;

в) из ацетатных единиц при конденсации до изопреновых структур – фузидиевая кислота;

г) из сахаров (по типу синтеза полисахаридов) – аминогликозиды.

### **Биосинтез полипептидных антибиотиков**

Известно не менее 300 соединений, которые относятся к классу антибиотиков с полипептидной структурой. Их образование можно рассматривать как результат конденсации аминокислот с образованием пептидных связей. Они отличаются от обычных белков тем, что их молекулярная масса не превышает 3000, и в их составе обнаруживаются необычные аминокислоты, например, в D-форме, метилированные или оксиаминокислоты. Такие структуры склонны к циклизации или гиперциклизации.

Считается, что в биосинтезе полипептидных антибиотиков не участвует рибосомная система, поэтому данный процесс называется нерибосомным синтезом.

В качестве примера синтеза полипептидных антибиотиков рассмотрим биосинтез грамицидина С – декапептидного циклического соединения, состоящего из двух идентичных пентапептидных цепей.

Биосинтез этого антибиотика катализируется двумя растворимыми ферментными белками – Н (280 тыс.) и L (100 тыс.). В присутствии этих ферментов экстракты клеток *B. brevis* при наличии АТФ, катионов  $Mg^{2+}$ , соответствующих аминокислот могут синтезировать антибиотик. Фермент с большей молекулярной массой связывает четыре молекулы АТФ и четыре аминокислоты, в результате этого образуются тиоэфирные активированные аминокислоты. Затем остатки аминокислот, активированные за счет АТФ, связываются с -SH группами этого фермента, возможно, через остатки цистеина. На молекуле фермента имеется четыре независимых сайта связывания для каждой аминокислоты.

Кроме того, для инициации синтеза полипептида необходимо участие L-фермента. Его роль сводится к связыванию и активации с участием АТФ молекулы L-фенилаланина, в результате такого взаимодействия происходит рацемизация, и в молекулу антибиотика аминокислота включается в D-форме.

Собственно образование пептидных связей начинается с переноса активированного D-фенилаланина, связанного с L-ферментом, на фермент Н и связывания этой аминокислоты с молекулой L-пролина. В дальнейшем происходит образование связи между аминокислотой и карбоксильной группой строящегося пептида. При этом в реакции участвует только фермент Н. Полимеризация двух активированных пентапептидов осуществляется в случае, если два ферментных комплекса, несущих активированные аминокислоты, соединенные пептидными связями, объединяются.

Пептидные антибиотики не содержат более 15–20 аминокислот, т.к. маловероятно, что ферментный комплекс удерживал бы большее их количество. Биосинтез полипептидных антибиотиков осуществляется семействами, отдельные представители которых различаются заменой одной или нескольких аминокислот. Это, возможно, объясняется тем, что происходит ошибочное связывание аминокислот с ферментными комплексами или аминокислоты конкурируют друг с другом за возможность включения в молекулу антибиотика.

### **Биосинтез пенициллинов и цефалоспоринов**

По такому же механизму происходит и образование таких широко известных антибиотиков, как пенициллины и цефалоспорины. Основу молекулы составляют L-цистеин, D-валин и L- $\alpha$ -аминоадипиновая кислота.

Первым этапом биосинтеза считается образование трипептида, который последовательно превращается в моноциклический  $\beta$ -лактам, затем в изопенициллин N и 6-аминипенициллановую кислоту (6-АПК), которая является исходной субстанцией при получении полусинтетических пенициллинов. При биосинтезе цефалоспоринов процесс происходит сходным образом до образования изопенициллина N, после появления этого соединения пути биосинтеза молекул расходятся. Дополнительными этапами являются гидроксирование и ацетилирование молекул.

### **Биосинтез стрептомицина**

Относительно механизма биосинтеза стрептомицина имеются очень ограниченные и подчас противоречивые данные. Пока еще не известны его предшественники. Основные опыты по изучению биосинтеза стрептомицина, проводимые с «мечеными» соединениями, были поставлены с целью выяснения путей образования гуанидиновых групп и аминасахара. Опыты с применением меченных по углероду ( $C^{14}$ ) глюкозы, крахмала или его гидролизата показали, что наиболее интенсивно включается в состав молекулы стрептомицина глюкоза. При этом «метка» распределяется равномерно между стрептозой, стрептамином и N-метил-L-глюкозамином. Радиоактивность гуанидиновых групп оказывается значительно ниже, что, по-видимому, свидетельствует об их образовании из иного источника углерода.

Стрептидиновая часть молекулы стрептомицина богата азотом, отношение N:C составляет 0,9, а во всей молекуле стрептомицина это отношение – 0,38. Для большинства белков, входящих в среды, отношение N:C равно 0,31. Азот стрептидиновой части представлен гуанидиновыми группами. В этой связи, возникло предположение, что увеличить продуктивность культуры можно путем введения в среду компонентов, содержащих гуанидиновые группы при отношении N:C выше, чем в белках. В качестве таких веществ были выбраны аргинин (N:C составляет 0,78), гуанидин (3,0), мочевины (2,0). В связи с тем, что основу структуры стрептидина составляет инозит, параллельно с веществами, содержащими гуанидиновую группировку, в среды вводили и инозит. Все опыты были реализованы на синтетической среде.

Результаты проведенных исследований показали, что комбинация аргинина и инозита положительно влияет на биосинтез стрептомицина и на его накопление в культуральной жидкости. Horner отмечает положительную роль миоинозита в опытах с мечеными соединениями. Наибольшее количество радиоактивного углерода было обнаружено в стрептидиновой части молекулы. По мнению Hunter и Hockenhull, основу углеродного скелета стрептидиновой части молекулы может создать какое-либо производное глюкозы, например, глюкозамин-6-фосфат. Из природных продуктов богата аргинином соевая мука, содержащая до 15,7% аргинина (по азоту). Изучение влияния кислотных гидролизатов богатой аргинином соевой муки и бедного аргинином казеина на содержание стрептомицина в культуральной жидкости показало, что гидролизат белков сои способствует образованию стрептомицина лучше, чем гидролизат казеина при тех же условиях. Если к синтетической среде добавить в качестве единственного источника азота гидролизат белка, в котором удалены основные аминокислоты (аргинин, лизин, гистидин), то стимулирующий эффект при этом резко снижается (до 50%), хотя развитие актиномицета происходит вполне нормально. Не исключена возможность, что одним из положительных моментов, определяющих широкое применение соевой муки в производстве для биосинтеза стрептомицина, является высокое содержание в ней аргинина. При введении меченого  $C^{14}$  аргинина в среду для культивирования продуцента стрептомицина было установлено, что по существу все  $C^{14}$  были локализованы в гуанидиновых группировках молекулы антибиотика. Очевидно, функция аргинина как промежуточного вещества при биосинтезе стрептомицина заключается в переносе гуанидиновых групп, т.е. происходит реакция переамидинирования. Наличие этого фермента обнаружено у многих продуцентов стрептомицина. При этом отмечается повышение ферментативной активности параллельно с увеличением содержания антибиотика в культуре.

Сущность данной реакции заключается в переносе амидиновой группы от молекулы гуанинсодержащего вещества, являющегося донатором, к акцептору. Акцепторами обычно выступают соединения, обладающие аминогруппой. Одним из веществ, имеющих гуанидиновую группировку при  $R_1$ , является аргинин. Для некоторых штаммов продуцентов стрептомицина показано, что наилучшим акцептором является глицил-глицин.

Относительно механизма переноса амидиновой группы существуют две точки зрения. Согласно одной из них, происходит двухступенчатая реакция. На первой ступени образуется в качестве промежуточного продукта фермент-амидиновый комплекс, на второй – перенос амидиновой группы из комплекса на молекулу фермента. По мнению других исследователей, реакция происходит в один этап путем прямого взаимодействия донатора и акцептора на поверхности фермента без образования промежуточного комплекса. Активность трансамидазы продуцента стрептомицина заметно подавляется ионами двухвалентной меди ( $1 \times 10^{-4}$  М).

Другой группировкой молекулы, механизм включения которой изучался, является N-метил-L-глюкозамин. На синтетической среде, в которую вво-

дили «меченый» N-метил-L-(C<sup>14</sup>)-глюкозамин, культивировали продуцент стрептомицина. После выделения и очистки антибиотика, в основных структурных элементах стрептомицина определяли радиоактивность. Результаты опытов показывают, что наивысшей радиоактивностью обладает N-метил-L-глюкозаминная часть молекулы. Предполагают, что N-метил-L-глюкозамин целиком включается в молекулу антибиотика. Первым этапом является аминирование глюкозы с образованием глюкозамина, а затем его метилирование. Включение азота при образовании глюкозамина, вероятно, происходит на уровне глюкозо-6-фосфата. Донатором метильной группы является метионин. Стимулируют реакцию метилирования витамин В<sub>12</sub> и парааминобензойная кислота. Установлено, что биосинтез стрептомицина значительно усиливается при введении в среду для культивирования амидов дикарбоновых аминокислот – глутамина и аспарагина. Одновременно в культурах увеличивается содержание глюкозамина. В этой связи, было высказано предположение, что амиды являются донаторами аминогруппы глюкозамина. Однако, прямых доказательств этого не получено.

Одним из важных теоретических вопросов биогенеза L-глюкозамина является биохимический механизм превращения D-глюкозы в L-форму. Опыты с мечеными соединениями, показали, что превращение возможно путем эпимеризации всех асимметричных атомов углерода глюкозы. Второй структурной единицей стрептобиозаминовой части молекулы стрептомицина является стрептоза, обладающая несвойственной природным углеводам L-конфигурацией. Кроме того, она представляет собой углевод с разветвленной углеродной цепочкой, что усложняет изучение путей ее биогенеза. Известно, что стрептоза, по-видимому, образуется из D-глюкозы. М. М. Шемякиным, А. С. Хохловым и М. Н. Колосовым высказана гипотеза о вероятном механизме превращения углеводов с прямой в углеводы с разветвленной цепью. Согласно этой гипотезе, гексозы с прямой цепью могут переходить в дикарбонильные соединения с разветвленной цепью путем последовательных превращений сначала в кетоальдегиды, а затем циклические ацилоины. Стрептамин, содержащий C<sup>14</sup>, при введении его в среду не включался столь эффективно в стрептомицин, как N-метил-L-глюкозамин. Содержание радиоактивных изотопов в стрептидиновой части молекулы, где можно было ожидать их высокий уровень, оказалось низким. По-видимому, стрептамин, образующийся при щелочном гидролизе стрептидина, не является метаболитом, промежуточным продуктом биосинтеза стрептомицина.

Взаимосвязь между биосинтезом антибиотика и отдельными метаболитами, которые могут иметь значение для его образования, может быть установлена применением ингибиторов ферментативных реакций. Применение атебрина и 2,4-динитрофенола оказало угнетающее воздействие на биосинтез стрептомицина. Атебрин является веществом, угнетающим процесс окислительного фосфорилирования. Введение в состав среды дополнительно к атебрину или 2,4-динитрофенолу диэтилбарбитуровой кислоты снимало их угнетающее воздействие. Барбитураты, очевидно, включаются в некоторые процессы переноса электронов и фосфорилирования. Детальный механизм их



действия не изучен. Однако, очевидно, что биосинтез антибиотика зависит от нормальных окислительно-восстановительных процессов и фосфорилирования.

**Ферментация стрептомицина.** Биосинтез стрептомицина проводят на комплексных средах, содержащих соевую муку, глюкозу, сернокислый аммоний, поваренную соль, мел, фосфаты. В некоторых случаях в среду в дополнение к указанным веществам вводят кукурузный экстракт, в концентрациях меньше соевой муки в 10–15 раз. Вместо соевой муки оказывается пригодной арахисовая мука или ее гидролизат, жмыховый экстракт или его гидролизат; глюкозу можно заменить крахмалом. Для некоторых штаммов глюкоза может быть полностью заменена гидролом. Однако, гидрол подходит не для всех штаммов. Среди углеводов, присутствующих в гидроле, имеется дисахарид – генциобиоза, которая не всеми штаммами используется одинаково хорошо. В этой связи, при наличии в среде генциобиозы рост культур может замедляться. Вместо комплексной среды предложена синтетическая среда, содержащая глюкозу, молочную кислоту, сульфат аммония, однозамещенный фосфат калия, сульфаты магния, железа, марганца и цинка. Синтетическая среда позволяет получать до 2000 ЕД/мл стрептомицина в культуральной жидкости. Существенное значение для биосинтеза стрептомицина имеет концентрация в среде фосфора. Как и при биосинтезе других антибиотиков, его избыточное содержание оказывает отрицательное влияние. В состав среды обычно входит хлористый натрий. В присутствии хлористого натрия увеличивается проницаемость клеточной оболочки и при этом происходит более легкий переход стрептомицина в культуральную среду.

Процесс биосинтеза стрептомицина является двухфазным. Ферментация продолжается около 96 ч. За ходом ферментации осуществляется постоянный контроль. Контрольные показатели в зависимости от состава среды, штамма и технологических особенностей процесса обычно приводятся в регламентах. Существенным звеном в контроле производства стрептомицина, равно как и других антибиотиков, продуцируемых актиномицетами, является отсутствие фагов.

### **Биосинтез антибиотиков-макролидов**

В группе антибиотиков, образующихся путем конденсации ацетатных и пропионатных единиц, обнаруживаются разные по структуре молекулы: изолированные или конденсированные ароматические, хиноны, макролиды, анзамицины. Реакции их образования близки к реакциям биосинтеза жирных кислот. Такие антибиотики образуются микроорганизмами под действием мультиферментного комплекса с участием молекулы-затравки, которая связывается с ним.

Принципиальные отличия синтеза жирных кислот от синтеза вторичных метаболитов-антибиотиков заключаются в следующем:

1. восстановление карбонильных групп может не происходить, и образуются ароматические структуры. В случае, если оно все же осуществляется

частично до стадии гидроксильной группы или двойной связи, то образуется макротетралид;

2. при биосинтезе антибиотиков может использоваться метилмалонат и образуются метилированные цепи;

3. активатором – инициатором процесса может быть не только уксусная кислота, но и пропионат, изовалериановая кислота, малониламид и др.

### **Биосинтез тетрациклинов**

Структура антибиотика определяется, главным образом, длиной цепи и степенью ее восстановленности. В случае, если цепь образована из ацетатных единиц и группы С=О не восстановлены, образуются поликетидные структуры. Согласно стерическим представлениям образуются шестичленные кольца ароматической природы. Если карбонильная группа восстанавливается частично и циклизация затруднена, то получают линейные структуры или макроциклы. Одним из примеров является образование тетрациклинов. Исходными структурными единицами являются восемь молекул малонил-КоА и одна молекула малониламин-КоА. Первым общим предшественником для всех тетрациклинов является метилпрететрамид, для его образования используется примерно 50 ферментных систем, а последующие 11 реакций приводят к образованию молекулы антибиотика. Исключительно важное значение имеет наличие НАДФН<sup>+</sup>, необходимыми являются три молекулы – продукт пентозофосфатного пути утилизации глюкозы. В этой связи, они образуются раньше, чем используются для биосинтеза антибиотика. Был постулирован тот факт, что чем ниже уровень реакций в цикле трикарбоновых кислот (ЦТК), тем более высоким является выход тетрациклина. Считают, что продуктивный штамм имеет дефект в энергетическом обмене, в результате чего усиливается утилизация уксусной кислоты для биосинтеза тетрациклина.

### **Биосинтез эритромицина**

Биосинтез эритромицина является еще более сложным, т.к. в структуру молекулы входят макроцикл, сахара и необходима конденсация этих соединений. Структурной основой является одна молекула пропионил-КоА и шесть молекул метилмалонил-КоА. Первоначально синтезируется эритронолид В, который далее циклизуется и превращается в различные формы эритромицина (А, В, С) после присоединения сахаров – производных глюкозы. Все реакции происходят в мультиферментном комплексе, от которого молекулы отщепляются после полного синтеза. Способность производных пропионовой кислоты и пропилового спирта участвовать в биосинтезе в качестве предшественника молекулы используется на практике: при ферментации их вводят в ферментационную среду, что значительно повышает выход антибиотика.

### **Ферменты в биосинтезе антибиотиков**

Ферменты, участвующие в биосинтезе антибиотиков, могут быть классифицированы на три группы:

1. ферменты, образующие и модифицирующие промежуточные продукты метаболизма, являющиеся исходными для биосинтеза данного антибиотика. Такие продукты образуются путем конденсации первичных предшественников, например АсКоА, который может быть превращен в мевалоновую кислоту, поликетидные структуры;

2. ферменты, катализирующие образование первичных предшественников, например малоната, метилмалоната, их ацилированных производных;

3. ферменты, образующие первичные метаболиты, которые затем включаются в синтез вторичных продуктов, например, ферменты биосинтеза валина и цистеина, аминокислот, составляющих молекулу антибиотика.

Относительно механизма, обуславливающего образование антибиотика в идиофазе, следует отметить, что в период трофофазы синтез ферментов, катализирующих образование антибиотика, подавлен. После окончания трофофазы должна наступить дерепрессия их биосинтеза. При этом возможно несколько механизмов реализации данного процесса.

1. Индуктор, дерепрессирующий гены биосинтеза, должен накапливаться после окончания роста культуры или добавляться извне. В настоящее время описаны несколько химических веществ, которые рассматриваются в качестве регуляторы внутриклеточных процессов, в том числе и антибиотикообразования. Они способны действовать одновременно на несколько процессов. Так, косинтетический фактор I (*Streptomyces aureofaciens*) способен индуцировать образование хлортетрациклина у малоактивного штамма. При этом 1 мкг косинтетического фактора I индуцирует образование 50000 мкг/мл антибиотика. Фактор IM (*Streptomyces virginiae*) индуцирует образование стафиломицина. Наиболее хорошо изученным является фактор А, его продукция и участие в процессах биосинтеза стрептомицина. Продукция данного вещества была обнаружена А. Хохловым в 70-х гг. XX в. Изучение различных по активности мутантов показало, что при их совместном выращивании можно достичь такого же выхода антибиотика, как и при выращивании высокоактивного продуцента. В дальнейшем было обнаружено, что один из неактивных в отношении биосинтеза антибиотика мутантов нуждается в очень небольшом количестве вещества, которое образуется малоактивным штаммом, причем это количество настолько мало, что оно не может рассматриваться как продукт промежуточного метаболизма: 0,001 мкг вещества А, прибавленного к нулевому мутанту, вызывает образование 1000 мкг стрептомицина, т.е. коэффициент индукции равен 10<sup>6</sup>.

Впоследствии было показано, что фактор А относится к неспецифическим регуляторам биосинтеза антибиотиков и других процессов. Его молекулярная масса равна 342. Фактор А представляет собой 2S-изокапроноил-3S-оксиметил-γ-бутирлактон. Для фактора А в клетках существует специфический рецепторный белок, обозначенный как Agr А, действующий как репрессор во время ранних стадий роста. После внутриклеточного накопления фактора А и связывания его с Agr А белком последний высвобождается от ДНК, где он связан с гипотетическим геном Х, который регулирует экспрес-

сию генов *adp* (А-фактор зависимые белки). Морфологические особенности определяет *adp* в ген, в то время, как другие гипотетически влияют на синтез стрептомицина.

Размер белка Arg A составляет 24–29 кДа, также как и других белков данного типа (Bar A и IM-2; гены *barA* и *farA*). Данные белки примерно на 40% имеют сходный состав. На N-концевом участке имеется последовательность спираль – клубок – спираль, которая связывается с ДНК; на C-концевом участке – фрагмент с высокой специфичностью связывания с бутиролактонами. Arg A, Bar A и IM-2 являются транскрипционными регуляторами, которые предотвращают экспрессию определенных генов. После достижения (по мере роста культуры) критических концентраций факторов-лактонов они связываются с белками. Фактор А как неспецифический регулятор принимает участие в образовании мицелия у *Streptomyces griseus*.

Кроме неспецифических, известны и специфические регуляторы процесса образования антибиотиков. Это гены – регуляторы соответствующих оперонов, например, биосинтеза стрептомицина (*strR*) и спектиномицина (*srnR*). Их белковые продукты связываются с ДНК в области промоторов и активируют структурные гены.

2. В трофофазе конечный продукт первичного метаболизма по типу обратной связи вызывает подавление одной или нескольких реакций на пути биосинтеза антибиотика. Истощение этого продукта приводит к дерепрессии генов, ответственных за синтез антибиотиков – продуктов идиофазы. Репрессия биосинтеза антибиотика конечным продуктом возможна в двух вариантах: сам антибиотик является метаболитом, который угнетает активность определенного фермента. Так, при биосинтезе хлорамфеникола, на этапе присоединения азотсодержащего радикала, образующийся продукт может подавлять активность ферментов начальных этапов. Иная ситуация наблюдается при биосинтезе пенициллина. В этом случае ингибитором является лизин, т.е. один из продуктов первичного метаболизма, который ингибирует активность гомоцитратсинтазы – первого фермента, участвующего в образовании аминокислоты, включающейся в молекулу антибиотика.

3. Рост на легкоутилизируемом источнике углерода ведет к подавлению активности генов в идиофазе вследствие катаболитной репрессии. Истощение источника углерода приводит к дерепрессии генов. Так, было отмечено влияние явления катаболитной репрессии на биосинтез пенициллина: добавление глюкозы к культуре *Penicillium* в высоких концентрациях приводит к снижению уровня синтеза антибиотика. На практике для устранения данного явления глюкозу вводят в среду дробно. Катаболитной репрессии подвержен биосинтез многих пептидных антибиотиков.

4. Синтез вторичных метаболитов (антибиотиков) подавляется высоким энергетическим зарядом в клетке. Истощение АТФ приводит к дерепрессии генов их биосинтеза.

5. РНК-полимераза во время трофофазы может осуществлять транскрипцию только генов, ответственных за синтез продуктов трофофазы, и не может присоединяться к промоторам генов, активных во время идиофазы.

После завершения трофофазы происходят конформационные изменения РНК-полимеразы, и она способна присоединяться к промоторным участкам соответствующих генов и инициировать синтез ферментов биосинтеза вторичных метаболитов.

### **3. Факторы и условия, влияющие на биосинтез антибиотиков**

Производственная схема биосинтеза антибиотиков включает следующие стадии:

- ✓ ферментацию;
- ✓ выделение антибиотика;
- ✓ химическую очистку антибиотика;
- ✓ сушку антибиотика;
- ✓ получение лекарственной формы антибиотика.

На процесс биосинтеза антибиотика оказывают влияние:

- ✓ вид микроорганизма;
- ✓ особенности обмена веществ у атакуемого им микроорганизма;
- ✓ внешняя среда обитания;
- ✓ степень нарушения у продуцента антибиотика регуляторных механизмов.

В этой связи, основной задачей при реализации процесса биосинтеза антибиотика является создание оптимальных условий для развития его продуцента и обеспечение максимально возможного выхода целевого продукта. Высокая результативность данного процесса зависит от уровня биосинтетической активности продуцента, времени его максимального накопления, стоимости питательных сред для его культивирования.

Для максимального выхода антибиотика при культивировании продуцента используют комплекс мер, включающий подбор наиболее благоприятных для этих целей питательных сред и режимов культивирования микроорганизма. Все это входит в понятие управляемый синтез.

На стадии подготовки инокулята следует обратить внимание на состав среды, в которой выращивается организм, на возраст клеток или мицелия. На этапе биосинтеза целевого продукта (антибиотика), кроме состава питательной среды, большую роль играет скорость потребления тех или иных ее компонентов, регуляция процесса аэрации, поддержание соответствующих значений рН среды, температуры и других показателей культивирования.

Для максимального снижения себестоимости получаемого лекарственного препарата необходимо:

- ✓ внедрение в биотехнологическое производство наиболее высокопродуктивных штаммов микроорганизмов – продуцентов антибиотиков;
- ✓ создание и обеспечение наиболее благоприятных (оптимальных) условий развития продуцента антибиотика на относительно доступных и экономичных питательных средах;
- ✓ широкое использование математических методов планирования процесса развития организма и компьютерной техники с целью оптимизации и

моделирования условий его культивирования, обеспечивающих максимальный выход антибиотика;

✓ применение современного оборудования на всех стадиях технологического процесса с контролем основных параметров развития микроорганизма и стадий биосинтеза антибиотика.

В современных условиях наиболее перспективным методом выращивания микроорганизмов – продуцентов антибиотиков является метод глубинного культивирования, сущность которого заключается в том, что микроорганизмы развиваются в толще жидкой питательной среды, через которую непрерывно пропускается стерильный воздух, и среда перемешивается. При этом наибольшее распространение получила модификация метода глубинного культивирования, названная непрерывным культивированием, при использовании которого возможно поддержание развития микроорганизмов на определенной стадии роста.

Для изучения условий образования антибиотиков и их производства в промышленных условиях используются ферментеры, снабженные приспособлениями для обеспечения оптимальной аэрации, перемешивания культуры, поддержания необходимой температуры, а также контрольно-измерительными приборами.

В зависимости от характера работ используют разные типы ферментеров: лабораторные, полупромышленные, промышленные.

Длительность ферментации варьируется в пределах от 4–5 до 14 суток и дольше, что зависит от особенностей физиологической активности биообъектов. Применительно к биосинтезу антибиотиков периодические ферментации проводят обычно в течение 4–5 суток.

Для каждого продуцента разрабатывается оптимальная среда, которая должна соответствовать определенным требованиям:

- а) обеспечивать максимальный выход антибиотика;
- б) состоять из относительно доступных и экономичных компонентов;
- в) иметь хорошую фильтрующую способность;
- г) обеспечивать применение наиболее экономичных приемов для выделения и очистки антибиотиков.

В связи с тем, что антибиотики являются вторичными метаболитами, их биосинтез сопряжен с переходом культуры продуцента в идиофазу. Следовательно, в данном случае целесообразно лимитирование роста продуцента. В роли таких лимитирующих ингредиентов (факторов) при биосинтезе пенициллина выступает глюкоза, а при биосинтезе антибиотиков стрептомицетами – фосфаты. Все это важно при составлении рецептов питательных сред, подкормке штамма – продуцента в процессе биосинтеза антибиотика. Так, среда для продукции пенициллина (она также пригодна для накопления инокулята) включает глюкозу – 15 %, лактозу – 5 % (лактоза снимает катаболитную репрессию глюкозы), аммония сульфат и фосфаты – 0,5–1 %, кукурузный экс-

тракт – 2–3 %, предшественники антибиотика – фенокси - или фенилуксусная кислота – 0,3–0,6 %, мел – 0,5–1 %, пеногаситель – 0,5–1 %; температуру ферментации поддерживают в пределах 22–26 °С при значении рН среды от 5,0 до 7,5 и уровне аэрации 1 м<sup>3</sup> воздуха на 1 м<sup>3</sup> культуральной среды в 1 мин.

Стерилизация питательных сред в промышленных условиях достигается в результате:

✓ периодического метода для небольших объемов среды, при котором среда нагревается до температуры 120–130 °С непосредственно в ферментере и выдерживается при данной температуре в течение определенного времени;

✓ непрерывного метода для значительных объемов, при котором приготовленная среда подается в стерилизационную колонку, через которую пропускают острый пар. Нагретая до необходимой температуры среда поступает в специальный аппарат, где выдерживается определенное время.

При подготовке посевного материала микроорганизмы предварительно выращивают на агаризованной среде в пробирках, затем осуществляют посевы в колбы с жидкой питательной средой. На следующем этапе делают высев в специальный инокулятор небольшого объема (10 л), из которого хорошо развившуюся культуру переносят в более крупный (100–500 л) ферментер, откуда и переносят в основной ферментер. Для засева используется объемная доля инокулята 5–10 %.

Эффективность предварительной обработки культуральной жидкости, клеток (мицелия) микроорганизма и фильтрации (отделения культуральной жидкости от биомассы продуцента) определяется составом среды для выращивания продуцента антибиотика, характером его роста, локализацией антибиотика (в культуральной жидкости или внеклеточно).

Особенностью выделения и очистки целевого продукта является достигаемое увеличение концентрации антибиотика (примерно от 1 до 20–30 %). В качестве основных методов выделения используют: экстракцию, осаждение, сорбцию на ионообменных материалах, выпаривание, сушку.

В случае, если антибиотик находится в культуральной жидкости, то его выделяют методами экстракции, используя для этого растворители, не смешивающиеся с жидкой фазой, осаждают в виде нерастворимого соединения или сорбируют ионообменными смолами. Если антибиотик содержится в культуральной жидкости и в клетках продуцента, то вначале его переводят в фазу, из которой наиболее целесообразно изолировать.

Цель этапа химической очистки состоит в извлечении антибиотика из нативной жидкости или клеток продуцента, его концентрировании и освобождении от сопутствующих примесей.

Основное требование к этапу получения готовой продукции, изготовления лекарственных форм, расфасовки состоит в получении конечного продукта высокого качества. Готовый антибиотик подвергается биологическому и фармакологическому контролю. В первом случае проводится испытание

стерильности готового лекарственного препарата, которая обеспечивается соблюдением стерильных условий работы на всех стадиях развития продуцента, выделения и очистки целевого продукта. При фармакологическом контроле предполагается исследование токсичности, пирогенности, аллергенности и других свойств лекарственного препарата в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи (ГФ). Расфасованный и упакованный лекарственный препарат с указанием биологической активности, даты выпуска и срока годности поступает в продажу.

Выход антибиотиков обычно составляет несколько десятков граммов на 1 л культуральной среды.

#### **4. Методы определения антимикробной активности антибиотиков**

Готовый антибиотик подвергается биологическому и фармакологическому контролю.

К антибиотикам, применяющимся в клинической практике, в соответствии с ГФ предъявляются строгие требования. Каждый новый лекарственный препарат перед применением в клинике, должен пройти всесторонние испытания на токсичность, пирогенность и т.п. Лекарственный препарат изучают на разных видах животных в отношении острой и хронической токсичности (влияние на состав крови, центральную нервную систему, дыхание и др.). Показатели острой токсичности являются одним из критериев качества антибиотика. Устанавливают максимально переносимую дозу (МПД) антибиотика, дозу, вызывающую гибель 50% подопытных животных ( $LD_{50}$ ) и дозу, смертельную для всех животных ( $LD_{100}$ ). Только после всестороннего исследования полученного лекарственного препарата он может быть рекомендован к практическому применению.

Количественное определение большинства антибиотиков проводят микробиологическими методами, основанными на сравнительной оценке угнетения роста тест-штамма. Активность устанавливают диффузионным или турбидиметрическими методами. К преимуществам микробиологических методов определения относятся: их высокая специфичность, т.к. посторонние примеси, содержащиеся в испытуемых образцах, не влияют на результаты анализа, как в случае химических методов. Кроме того, этими методами можно определить содержание таких антибиотиков, химические и физико-химические свойства которых еще не изучены.

К основным требованиям, предъявляющимся к микробиологическим методам количественного определения антибиотиков, относятся:

1. точность;
2. чувствительность;
3. простота техники эксперимента;
4. наиболее короткое время инкубации.

Более или менее совершенное выполнение всех этих требований, прежде всего, зависит от применяемого метода. Кроме того, для достижения максимальной чувствительности немалую роль играет культура, используемая



для определения. Важным критерием данного метода является хорошая воспроизводимость результатов в условиях разных лабораторий.

На точность микробиологических методов оказывают влияние целый ряд факторов – характер питательной среды, условия инкубации, точность измерения зон угнетения роста и т.д.

ГФ рекомендует для количественного определения метод диффузии в агар, заключающегося в сравнении действия определенных концентраций испытуемого и стандартного образцов антибиотика на тест-культуре.

При этом рабочими стандартами при исследовании антибиотиков служат специально изготовленные очищенные образцы препаратов, активность которых устанавливается по международным стандартам.

При отсутствии международного стандарта, например, для нового антибиотика, активность рабочего стандарта устанавливается на основании физико-химического и биологического изучения лекарственного препарата.

Очень важно, чтобы стандартные препараты были одинаковы по качеству и стабильны. Эти условия обычно обеспечиваются только в том случае, если они находятся в сухом состоянии, помещены в запаянные ампулы, лишены доступа влаги и кислорода и постоянно хранятся в темноте при низкой температуре.

В связи с тем, что состав агаризованной среды и условия выполнения анализа одинаковы, величина зоны диффузии, в которой развитие тест-штамма подавляется испытуемым антибиотиком, зависит только от химической природы лекарственного препарата и его концентрации. В данном случае процесс инкубации осуществляется в течение 16–18 ч при температуре 36–38 °С.

При приготовлении растворов испытуемого образца и стандарта для количественного определения антибиотиков методами диффузии в агар серьезной задачей является выбор растворителей. Обычно для растворения образца и стандарта применяют фосфатные буферные растворы, значение рН которых выбирают так, чтобы разложение антибиотика было минимальным, а тест-культура была наиболее чувствительной. Так, для стрептомицина выбирают буфер с величиной рН больше 7,0, для пенициллина и тетрациклиновых антибиотиков – буферный раствор (рН<7,0).

В связи с этим, устанавливают и значение рН агаровой питательной среды. Однако, следует иметь в виду, что значение рН среды влияет на рост тест-культуры, и что фосфатные анионы оказывают стабилизирующее действие на растворы пенициллина.

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

При изучении ЗЗР и четкости краев рационально применять микрофотометры, позволяющие 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 в определенном объеме питательной среды. Количественное выражение 1 ЕД различно у разных антибиотиков. Так, 1 ЕД натриевой соли бензилпенициллина соответствует 0,5988 мкг, а 1 ЕД стрептомицина, тетрациклина и его производных – 1 мкг химически чистого вещества.

Расчет биологической активности 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 (ЕД/мл) на степень разведения.

Среднее значение активности, определенное 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.

Методы серийных разведений. Принципом методов разведений является определение количества антибиотика, которое полностью подавляет рост тест-культуры. При этом раствор анализируемого образца с неизвестным содержанием антибиотика и раствор стандарта с известным содержанием антибиотика разводят в геометрической прогрессии питательной средой, предварительно засеянной тест-культурой. По истечении необходимого времени инкубации определяют максимальное разведение образца и стандарта, которое еще подавляет рост тест-культуры. Путем сравнения этих разведений вычисляют активность исследуемого образца.

Методы серийных разведений могут быть реализованы на плотных и жидких питательных средах.

Основным преимуществом методов разведений является их высокая чувствительность, возможность определения очень малых количеств антибиотиков, а в некоторых случаях – и быстрота анализа (около 3 ч).

При определении содержания антибиотиков в биологических жидкостях организма методом серийных разведений можно использовать индикаторы, реагирующие на изменение значения рН или окислительно-восстановительного потенциала в процессе роста тест-культуры, например, бромкрезоловый красный, метиленовый синий, тимоловый синий, водный синий или феноловый красный и др.

Турбидиметрические методы отличает высокая точность в сравнении с методами серийных разведений.

Данные методы определения основаны на измерении задержки роста тест-штамма, проявляющейся в большем или меньшем помутнении питательной среды. Для измерения помутнения используют фотоэлектрические

нефелометры. Путем сравнения интенсивности задержки роста, вызванной действием неизвестного количества антибиотика со стандартной кривой, выражающей степень задержки, вызываемой известными количествами антибиотика, производят вычисление активности анализируемого образца. Турбидиметрические методы по сравнению с методами диффузии в агар являются менее точными, т.к. микроорганизм, растущий на жидких средах, при рабочих условиях проведения анализа более чувствителен к изменению факторов внешней среды. На результат анализа могут повлиять и сопутствующие вещества, содержащиеся в испытуемом образце. В случае метода диффузии влияние этих веществ, вследствие их меньшего проникновения в агар, устраняется. К таким веществам относятся: жирные кислоты, глюкозодегидрогеназа и др. Данные методы нельзя применять для определения активности антибиотиков в образцах, которые являются окрашенными или образуют мутный раствор, если только это явление нельзя устранить путем соответствующей обработки стандарта.

При этом источником ошибок могут быть и конечные, неспецифические изменения окраски культуры или изменения помутнения, которые могут произойти, например, вследствие изменения значения рН при выращивании микроорганизмов. Несмотря на это, турбидиметрические методы применяются весьма широко, главным образом потому, что по сравнению с методами диффузии в агар они требуют меньшего времени инкубации.

В настоящее время разработаны ускоренные биологические методы определения антибиотиков в биологических жидкостях. К таким ускоренным методам относятся методы, основанные на подавлении изменений значения рН питательной среды в процессе роста тест-культуры. Концентрацию определяют путем сравнения изменений значений рН в средах испытуемых и стандартных образцов через 1,5 ч после инкубации. На этом принципе основан уреазный метод, заключающийся в наблюдении за изменением значения 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 аминокликозидов в крови специфическими ферментами (аденилтрансфераза и ацетилтрансфераза), продуцируемыми грамотрицательными микроорганизмами, устойчивыми к лекарственным препаратам данной группы. Эти ферменты катализируют процесс аденилирования или ацетилирования аминокликозидов в присутствии  $^{14}\text{C}$ -аденозинтрифосфата или  $^{14}\text{C}$ -ацетилкоэнзима А. Они являются источником радиоактивности. Инактивированный антибиотик имеет положительный заряд и остаточную радиоактивность, что позволяет адсорбировать его на фосфоцеллюлозной бумаге. После адсорбции, методом подсчета радиоактивности делают заключение о концентрации антибиотика. Такое определение занимает 1–2 ч.

Радиоиммунный метод основан на сравнительной оценке конкуренции антибиотика, меченого тритием, и испытуемого лекарственного препарата по отношению к специфическим антителам иммунной сыворотки. Данный

метод отличается очень высокой чувствительностью (0,003–0,01 мкг/мл). При этом результаты исследования получают в течение 1–2 ч, точность метода довольно высока – коэффициент вариации составляет 4–5%.

В этой связи, анализируя разные методы анализа антибиотиков, можно прийти к заключению, что наиболее простыми и доступными являются метод диффузии в агар-агар и урезный метод

Ферментативный и радиоиммунный метод являются наиболее специфичными и точными. Они не требуют предварительной обработки сыворотки крови, когда в ней присутствуют другие антибиотики. Однако, применение этих методов требует соответствующих условий и оборудования для работы с радиоактивными веществами, труднодоступных реактивов и специфической иммунной сыворотки.

Химические методы. Главными преимуществами химических методов являются их быстрота и сравнительно высокая точность.

Данные методы очень редко используют для анализа антибиотиков (в основном для определения пенициллина). Химические методы основаны на поглощении йода продуктами гидролиза пенициллина. Кроме того, пенициллин можно определять ацидометрически после его расщепления до пенициллоиновой кислоты. При этом из  $\beta$ -лактамного кольца пенициллина освобождается одна свободная карбоксильная группа, которую можно титровать.  $\beta$ -лактамное кольцо пенициллина можно расщепить щелочью или пенициллиназой. Однако, этот метод, нельзя применять для нативного раствора, который содержит большое количество посторонних веществ, снижающих точность ацидометрического титрования.

Хроматографические методы. Многие антибиотики (пенициллин, стрептомицин, эритромицин, бацитрацин, неомицин, полимиксин и т.д.) не являются химически индивидуальными веществами, а представляют собой смесь нескольких структурно сходных веществ. Бумажная хроматография и электрофорез на бумаге позволяют выделить эти составные части и отделить их количественно.

Для изучения антибиотиков применяют нисходящую, восходящую и горизонтальную хроматографию. Выбор системы растворителей зависит от химической природы антибиотика.

Зоны отдельных антибиотиков на хроматограммах или электрофотограммах чаще всего выявляются биоавтографически. Хроматограмму на узкой полоске фильтровальной бумаги после ее высушивания помещают на лоток с твердой агаровой средой, засеянной суспензией тест-культуры. Лоток помещают на несколько часов в термостат при 37 °С. В ходе инкубации микроорганизм, посеянный на агар, вырастает, а агар мутнеет и становится молочно-белым. При этом он не растет вокруг мест, где находятся антибиотически активные вещества. В этих местах остаются чистые прозрачные округлые зоны, которые указывают на расположение антибиотически активных составных частей исходной смеси. Измеряя диаметр прозрачной зоны, можно установить и количество соответствующей составной части путем сравнения

этого диаметра с диаметром зоны стандарта, хроматографируемого одновременно с анализируемыми образцами.

Достоинством биоавтографии является высокая чувствительность, превосходящая чувствительность всех цветных реакций. В этом отношении она сопоставима с методом флюоресценции.

Кроме того, при хроматографировании антибиотиков для их обнаружения применяют цветные реакции. Этот способ применяют в том случае, когда хотя бы определить составную часть антибиотика, химически подобную ему, но биологически неактивную.

Оптические методы. Колориметрия и спектрофотометрия в видимом свете. К основным преимуществам колориметрических методов определения относятся: простота, высокая скорость и точность. Их недостатком является низкая специфичность.

Для колориметрического определения антибиотики превращают в окрашенные производные. При этом используют цветные реакции с антибиотиками или продуктами их расщепления. Так, тетрациклиновые антибиотики образуют окрашенные комплексы с хлорным железом в кислой среде. Стрептомицин расщепляют едким натром до мальтола, который дает цветную реакцию с хлорным железом или с реактивом Фелинга. Антибиотики группы фенола или ароматических аминов со свободным орто- или пара-положением можно обычно перевести в азокрасители путем реакции с диазониевыми солями.

Спектрофотометрия в ультрафиолетовом свете. Большинству антибиотиков свойствен характерный спектр поглощения в ультрафиолетовой области, поэтому их можно определять непосредственно спектрофотометрически. Недостатком данного метода является то, что присутствие посторонних веществ ухудшает качество определения в большей степени, чем при колориметрии или спектрофотометрии в видимом свете, поэтому определять антибиотики данным методом можно лишь в чистых образцах.

Следует отметить, что увеличить специфичность данного метода и повысить его применимость в случае менее чистых препаратов можно путем измерения экстинкции при двух различных длинах волн, из которых одна находится на максимуме, а другая – при соседнем минимуме кривой экстинкции антибиотика. Важно, чтобы все измерения проводились при строго определенном значении рН, поскольку спектр поглощения антибиотика в ультрафиолетовом свете очень сильно от него зависит.

Инфракрасная спектроскопия. Данный метод является специфичным для качественного определения антибиотика. Однако, его можно использовать и для количественного определения антибиотиков. При реализации данного метода определения, как правило, достигается точность, равная точности спектрофотометрии в ультрафиолетовом свете, а в некоторых случаях и более высокая. В данном случае можно проводить количественный анализ как растворов, так и твердых веществ. При анализе веществ в растворах необходимо выбрать подходящий растворитель, который бы не поглощал инфракрасные лучи в данной области. Для этой цели обычно используют сероугле-

род или галоидопроизводные углеводов. В случае, если подходящий растворитель найти не удастся, можно провести спектрофотометрическое определение вещества в твердом состоянии. При этом твердые вещества таблетуют с бромистым натрием или суспендируют в масле. В последнем случае измерение поглощения производят в тонких слоях такой суспензии. Для количественного определения необходимо знать плотность слоев этой суспензии. Ее определяют путем добавления известного количества кристаллического вещества, например, аланина, к суспензии антибиотика и измерения экстинкции при одном из максимумов поглощения введенного вещества.

Флюорометрия является одним из наиболее чувствительных методов определения антибиотиков, приближающихся по своей чувствительности к биологическим методам. Главной областью ее применения являются тетрациклиновые антибиотики, которые сами по себе флюоресцируют желтым светом в умеренной щелочной среде. Однако, обычно измеряется синяя флюоресценция их продуктов разложения (в щелочной среде). Хлортетрациклин инактивируют щелочами, например, 0,2 М тринатрийфосфатом, оставив смесь на 30 мин. при комнатной температуре, в то время, как тетрациклин кипятят в течение более продолжительного времени. Антибиотики, которые не флюоресцируют и не образуют флюоресцирующих продуктов разложения, можно, тем не менее, определять данным методом в результате их соединения с подходящим флюоресцирующим веществом и выделения подходящего дополнительного соединения.

Поляриметрические методы позволяют получить надежные результаты применительно к концентратам оптически активных антибиотиков, если только они не слишком сильно окрашены. Вследствие удобства работы, они получили широкое применение в качестве методов контроля. Однако, для определения антибиотиков в культуральной жидкости они непригодны, поскольку в этих случаях они малочувствительны.

Электрохимические методы. Антибиотики, являющиеся кислотами или основаниями, можно титровать потенциометрически. Эти методы применяют очень редко. Их, как правило, используют для определения пенициллина.

Хлоргидраты тетрациклиновых антибиотиков имеют сильно кислотные свойства, а их основность очень слаба. В связи с этим, хлоргидраты можно титровать непосредственно алкалометрически. После подтитровки хлоргидрата на кривой потенциометрического титрования можно четко различить резкое изменение потенциала.

При этом более высокая точность и более широкие возможности отличают потенциометрическое титрование в неводных растворителях. Так, такие слабоосновные антибиотики, как тетрациклины, эритромицин и карбомицин, можно определять с помощью титрованного раствора хлористой кислоты в диоксане. Напротив, антибиотики с кислотными свойствами (даже очень слабыми), удастся титровать в среде безводных оснований, например, в триэтаноламине. Эти методы универсальны для ряда антибиотиков. Однако, они применимы лишь для чистых веществ и готовых лекарственных препаратов.

Полярграфия. Антибиотики, содержащие в своей молекуле восстанавливающиеся группы (нитрогруппы, кетогруппы, примыкающие к одной или более двойной связи, альдегидные группы, карбоксильные группы, примыкающие к двойным связям) или имеющие хиноподобную структуру, могут быть восстановлены на ртутном капельном электроде. В связи с этим, они могут определяться полярографическим методом. К таким антибиотикам, прежде всего, относятся хлорамникол, тетрациклиновые антибиотики, стрептомицин, все хиноновые антибиотики, цитринин и туяплацины. Другие антибиотики, напротив, окисляются на ртутном капельном электроде, и поэтому могут давать анодную волну, которая также может служить для их количественного определения. Полярографически неактивные антибиотики можно перевести в полярографически активные вещества несколькими способами. Так, пенициллин гидролизуется сначала щелочью или пенициллиназой, а далее в кислой среде до диметилцистеина, содержащего SH-группу, и дающего хорошо измеряемую волну в кобальтовом растворе Брдишки.

С аналитической точки зрения очень ценна полярография хлорамникола. Этот антибиотик можно количественно определять полярографическим методом в биологическом материале (в крови и моче), а также в культуральной жидкости.

Еще одной областью применения полярографии являются определение тетрациклиновых антибиотиков. При этом данным методом их можно определять количественно в готовых продуктах и в фармацевтических препаратах. В культуральной жидкости тетрациклиновые антибиотики данным методом определить нельзя, поскольку в этом случае определению мешает выделение водорода, катализируемое белками и другими веществами, присутствующими в фильтрате культуральной жидкости.

Амперметрическое (полярометрическое) титрование. Каждый антибиотик, который осаждается полярографически активными веществами, можно титровать амперметрически. Такое определение антибиотиков является более точным, но гораздо менее специфичным, чем непосредственная полярография.

Кондуктометрия. Для прямого определения активности антибиотиков можно использовать кондуктометрическое титрование. До настоящего времени этот метод применялся очень редко, хотя несомненно, что на его основе возможно обогатить анализ антибиотиков несколькими точными микроопределениями. Чаще кондуктометрия используется для определения зольности готовых антибиотических препаратов или для контроля десорбции антибиотиков из ионообменных колонн (особенно стрептомицина).

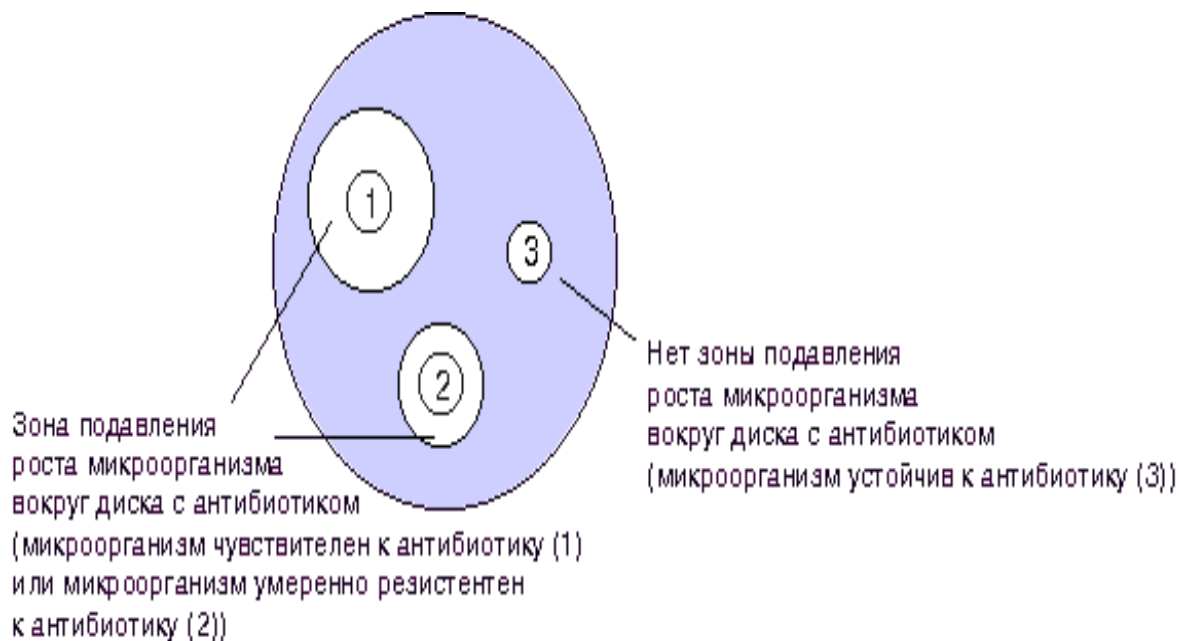


Рис. 1. Определение чувствительности микроорганизмов диско-диффузионным методом

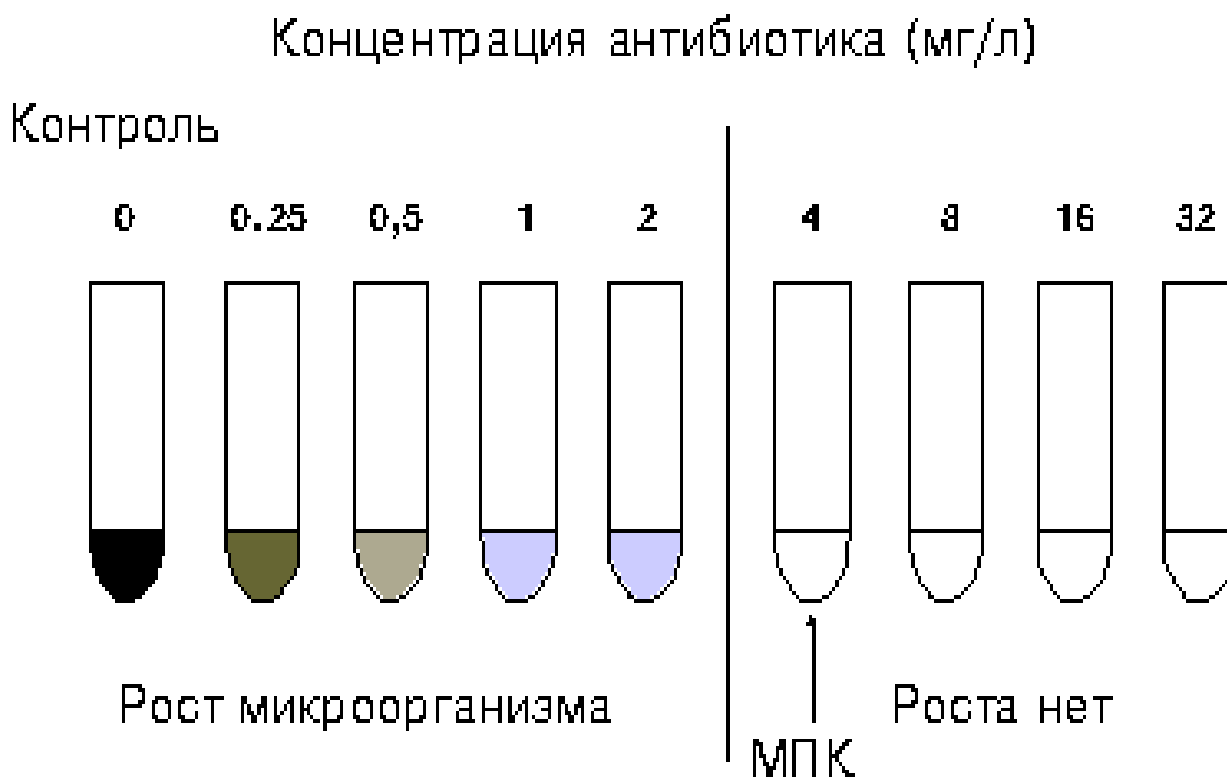


Рис. 2. Определение значения минимальной подавляющей концентрации методом разведения в жидкой питательной среде