

Занятие семинарского типа № 1

ТЕМА ЗАНЯТИЯ: Биотехнологическое производство антибиотиков

УЧЕБНЫЙ МАТЕРИАЛ

1. Структура биотехнологического производства антибиотиков

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

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

Процесс развития микроорганизмов – продуцентов антибиотиков имеет двухфазный характер:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Подготовка культуры продуцента. Подготовка посевного материала включает следующие этапы:

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

Подготовка посевного материала является одной из ответственных операций в цикле биотехнологического получения антибиотиков. От количества и качества посевного материала зависит как развитие культуры в ферментере, так и биосинтез антибиотика. Продуцент антибиотика обычно выращивают на богатых по составу питательных средах, обеспечивающих его максимальную физиологическую активность. Подготовка посевного материала представляет собой сложный многоступенчатый процесс (рис. 1).

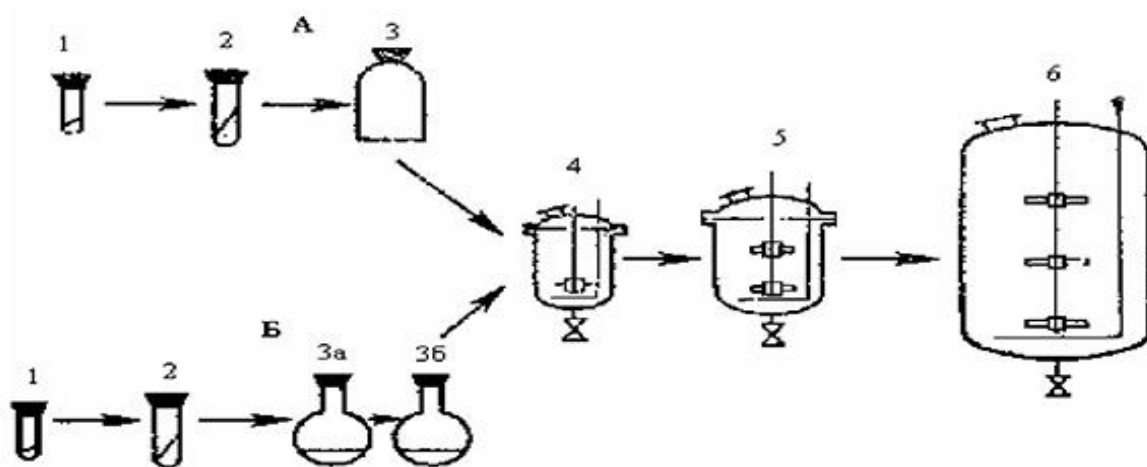


Рис. 1. Схема многоступенчатой подготовки посевного материала

А – выращивание во флаконах; Б – в колбах на качалках: 1 – консервированный исходный материал; 2 – споровая генерация на косом агаре в пробирке; 3 – вторая споровая генерация на твердой среде в сосуде; 3а и 3б – первая и третья генерации на жидкой среде в колбе; 4 – ферментер предварительного инокулирования; 5 – ферментер инокулирования; 6 – основной ферментер

Микроорганизм предварительно выращивают на агаризованной среде в пробирке (1, 2), затем из пробирки производят высев в колбы с жидкой сре-

дой и проводят две генерации при глубинном выращивании на качалках в течение 2–3 сут. для каждой генерации (3а, 3б). Из второй генерации культуры в колбе производят посев в небольшой (10 л) инокулятор 4, после разившуюся культуру переносят в более крупный инокулятор 5 (100–500 л), откуда и осуществляют посев в основной ферментер 6. Для посева в основной ферментер используют 5–10 % посевного материала (инокулята).

При этом подготовка посевного материала включает следующие стадии:

1. выращивание посевного мицелия первой генерации в аппаратах небольшой вместимости (инокуляторах);

2) выращивание посевного мицелия второй генерации в аппаратах большой емкости.

Споровая культура, используемая для засева инокулятора, выращивается на пшенице 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 антибиотика в посевных аппаратах на стадии подготовки инокулята является быстрое получение большой массы мицелия, способного обеспечить при пересеве в ферментер интенсивный рост и высокий выход целевого продукта. Для решения данной задачи продуцент необходимо выращивать на средах, богатых легкоусвояемыми питательными веществами, в условиях хорошей аэрации, при оптимальной для его роста температуре.

Для каждого продуцента антибиотика разрабатывается своя оптимальная по составу питательная среда, которая должна отвечать следующим требованиям:

а) обеспечивать хороший рост продуцента и максимально возможное образование антибиотика;

б) содержать доступные и экономичные компоненты;

в) обладать хорошей фильтрующей способностью;

г) обеспечивать применение наиболее экономичных и эффективных приемов выделения и очистки антибиотика.

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

При биотехнологическом производстве антибиотиков используют поверхностную или глубинную ферментацию.

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

В связи с тем, что продуценты антибиотиков, как правило, являются аэробами, для их нормальной жизнедеятельности необходимо обеспечить оптимальный уровень аэрации. При этом следует отметить, что во время фер-

ментации одновременно наблюдаются два процесса – растворение кислорода в среде и потребление растворенного кислорода культурой продуцента. Микроорганизмы используют для дыхания только растворенный в среде кислород. В этой связи, их обеспеченность кислородом определяется скоростью его растворения в культуральной жидкости. При глубинном культивировании в промышленных масштабах процесс аэрации осуществляется путем пропускания воздуха через питательную среду и культуральную жидкость с помощью специальных аэрирующих приспособлений (барботеров и т.п.). При этом одновременно с аэрацией культуральную жидкость интенсивно перемешивают.

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

Питательные среды, предназначенные для биосинтеза антибиотиков, содержат вещества, способные образовывать довольно стойкие пены. Кроме того, пена может образоваться и в процессе ферментации. Аэрация и перемешивание среды также способствуют образованию слоя пены на поверхности культуральной жидкости, ухудшающего условия развития культуры продуцента. При этом пеногашение, в основном, осуществляется за счет введения поверхностно активных веществ (ПАВ), способствующих снижению стойкости пены и в дальнейшем ее разрушению.

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

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

На стадии предварительной обработки растворенный антибиотик отделяют от суспензии мицелия и компонентов культуральной жидкости, находящихся в коллоидном состоянии. В случае, если часть антибиотика находится в мицелии, то его переводят в водную фазу, например, путем изменения значения рН культуральной жидкости (тетрациклины). В некоторых слу-

чаях, наоборот, растворенный и связанный с мицелием антибиотик объединяют в общем осадке, из которого его экстрагируют.

Нативный раствор отделяют от мицелия и коллоидных частиц путем фильтрации или центрифугирования.

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

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

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

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

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

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

Таким образом, примерная типовая схема выделения целевого продукта – антибиотика из культуральной жидкости представлена на рис. 2. В представленную на рис. 2 схему должны быть внесены соответствующие коррективы в зависимости от физико-химических характеристик получаемого целевого продукта и возможностей аппаратного оснащения процесса.

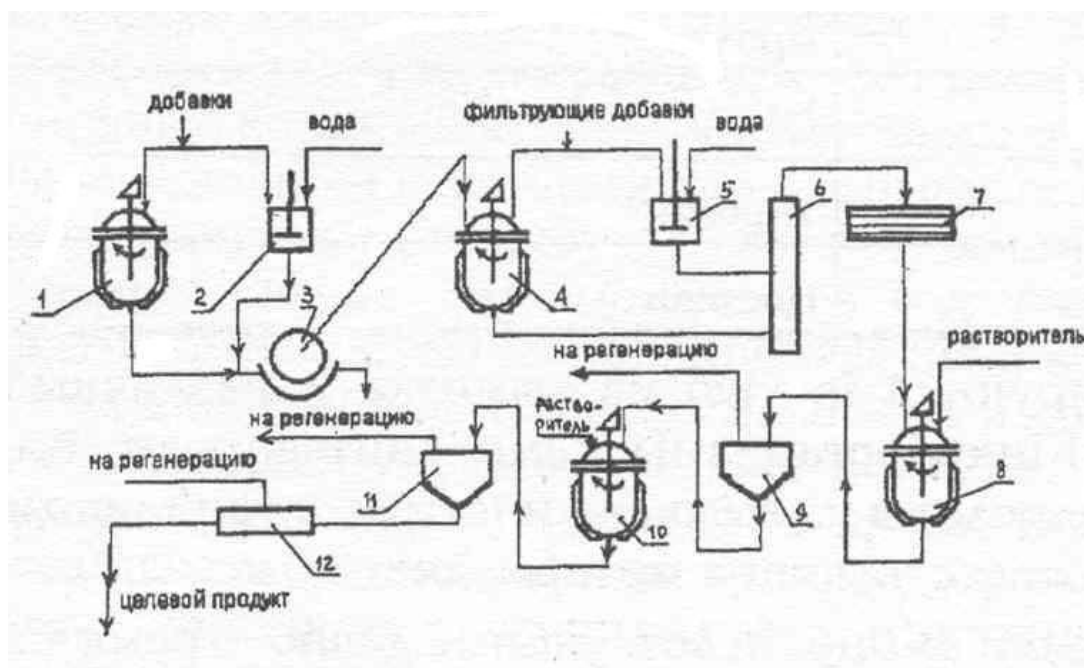


Рис. 2. Примерная технологическая схема выделения антибиотика из культуральной жидкости

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

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

Поскольку биосинтез антибиотиков осуществляется в асептических условиях, то при их выделении, очистке и получении лекарственных форм

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

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

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

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

При определении биологической активности методом диффузии в агар необходимо, чтобы зона задержки роста (ЗЗР) была достаточного диаметра и

имела четкие границы. После завершения инкубации измеряют диаметры ЗЗР тест-культуры микроорганизма стандартным и испытуемым растворами. Для повышения точности измерений находят среднее значение площадей зон диффузии из трех опытов.

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

Единица действия (ЕД) является величиной биологической активности антибиотиков. За ЕД принимают минимальное количество антибиотика, подавляющего развитие тест-культуры микроорганизма в определенном объеме питательной среды. Количественное выражение 1 ЕД отличается для разных антибиотиков. Так, 1 ЕД натриевой соли бензилпенициллина соответствует 0,5988 мкг, а 1 ЕД стрептомицина, тетрациклина и его производных – 1 мкг химически чистого вещества.

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

Среднее значение активности, определенной биологическим методом, как правило, несколько ниже рассчитанной теоретической активности. В соответствующих фармакопейных статьях приводятся значения теоретической активности и нижний допустимый предел активности испытуемого антибиотика в ЕД/мг.

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

Ферментный метод основан на инактивации аминогликозидов в крови с помощью специфических ферментов (аденилтрансфераза, ацетилтрансфераза), продуцируемых грамотрицательными микроорганизмами, устойчивых к лекарственным препаратам данной группы. Эти ферменты катализируют процесс аденилирования или ацетилирования аминогликозидов в присутствии ¹⁴C-аденозинтрифосфата или ¹⁴C-ацетилкоэнзима А. Они являются источником радиоактивности. Инактивированный антибиотик имеет положительный заряд и остаточную радиоактивность, что позволяет адсорбировать его на фосфоцеллюлозной бумаге. После адсорбции, путем подсчета ра-

диоактивности делают вывод о концентрации антибиотика. Продолжительность такого определения составляет 1–2 часа.

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

Сравнительный анализ различных методов количественного определения антибиотиков позволяет заключить, что в настоящее время наиболее простыми и доступными являются метод диффузии в агар-агар и уреазный метод. Ферментативный и радиоиммунный методы определения содержания антибиотика являются наиболее специфичными и точными. Они, как правило, не требуют предварительной обработки сыворотки крови, если в ней присутствуют другие антибиотики. Однако, применение этих методов анализа требует соответствующих условий и оборудования для работы с радиоактивными веществами, труднодоступных реактивов и специфической иммунной сыворотки.

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

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

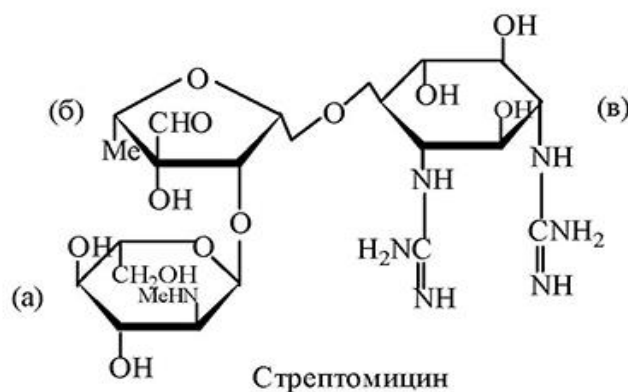
Антибиотики, полученные микробиологическим способом, как правило, подвергают химической модификации, в результате которой возможно получение лекарственных препаратов с более выраженным физиологическим действием.

2. Биотехнология стрептомицина

Стрептомицин принадлежит к группе аминогликозидных антибиотиков.

Выраженной способностью вырабатывать антибиотические вещества обладают, кроме плесневых грибов и микроорганизмов, и лучистые грибки – актиномицеты, обитающие в почве. При этом сравнительно быстрая гибель большинства патогенных микроорганизмов при попадании в почву связана с явлением антагонизма актиномицетов и бактерий.

Изучение данного явления привело к открытию в 1943 г. С. Ваксманом второго по значимости (после пенициллина) антибиотика – стрептомицина, устойчивого не только к грамположительным, но и к грамотрицательным, и кислотостойким бактериям:



В этом отношении он превосходит пенициллин, который почти не активен к последним двум группам возбудителей инфекции. Особенно важным свойством стрептомицина является его высокая активность к возбудителю туберкулеза.

В своей структуре стрептомицин содержит (а) N-метил-D-глюкозамин, (б) стрептозу и (в) стрептидин. Данный антибиотик является сильным органическим основанием.

Антибиотик выпускается в виде сульфата. Стрептомицина сульфат – порошок или пористая масса белого или почти белого цвета, без запаха, горьковатая на вкус; гигроскопичен; легко растворим в воде, практически нерастворим в спирте, хлороформе и эфире; устойчив в слабокислой среде, но легко разрушается в растворах крепких кислот и щелочей при нагревании.

Стрептомицина сульфат обладает широким спектром противомикробного действия. Антибиотик активен в отношении микобактерий туберкулеза и большинства грамотрицательных (кишечная палочка, палочка Фридендера, палочка инфлюэнцы, возбудители чумы, туляремии, бруцеллеза) и некоторых грамположительных (стафилококки) микроорганизмов. В то же время, он менее активен в отношении стрептококков, пневмококков, не действует на анаэробы, риккетсии и вирусы.

Действует стрептомицин бактерицидно. Эффект связан с подавлением синтеза белка на уровне рибосом в микробной клетке.

Стрептомицина сульфат применяют в качестве основного противотуберкулезного препарата для лечения, главным образом, впервые выявленного туберкулеза легких и туберкулезных поражений других органов. Ранее леченным больным, данный лекарственный препарат целесообразно назначать после лабораторного определения чувствительности к нему выделяемых больным микобактерий.

Стрептомицин также назначают при гнойно-воспалительных процессах разной локализации, вызванных грамположительными и грамотрицательными микроорганизмами, чувствительными к препарату: при пневмонии, вызванной клебсиеллами (в комбинации с левомецетином), при туляремии (в комбинации с тетрациклином), бруцеллезе и эндокардите (в сочетании с другими антибиотиками).

Применяют стрептомицина сульфат внутримышечно, а также в виде аэрозолей, интратрахеально, внутрикавернозно (у взрослых).

При лечении стрептомицином могут наблюдаться разные токсические и аллергические реакции: лекарственная лихорадка, дерматит и др., головокружение, головная боль, сердцебиение, альбуминурия, гематурия. Кроме того, в связи с подавлением микрофлоры кишечника может появиться понос.

Наиболее серьезными осложнениями являются поражение VIII пары черепных нервов и связанные с этим вестибулярные расстройства и нарушения слуха. При длительном применении больших доз может развиваться глухота.

Лечение стрептомицином должно проводиться под врачебным наблюдением. До и систематически в процессе лечения, необходимо следить за функцией VIII пары черепных нервов, вестибулярного и слухового аппаратов, функцией почек, формулой крови.

При нейротоксических осложнениях (головная боль, парестезии, нарушение слуха), лекарственный препарат отменяют и проводят симптоматическую и патогенетическую терапию.

При возникновении аллергических реакций необходимо прекратить введение лекарственного препарата и провести десенсибилизирующую терапию.

Редким, но серьезным осложнением при парентеральном введении данного лекарственного препарата является блокада нервно-мышечной проводимости, вплоть до остановки дыхания, особенно у больных с нервно-мышечными заболеваниями (миастения) или в послеоперационном периоде на фоне остаточного действия недеполяризующих мышечных релаксантов. При первых признаках нарушения нервно-мышечной проводимости следует ввести внутривенно кальция хлорид и подкожно прозерин. При развитии апноэ, больного переводят на искусственную вентиляцию легких.

Противопоказания: заболевания слухового и вестибулярного аппаратов, связанные с воспалением VIII пары и черепных нервов и развившиеся после перенесенного отоневрита; тяжелые формы сердечно-сосудистой недостаточности (III стадия) и почечной недостаточности, нарушения мозгового кровообращения, облитерирующий эндартериит, повышенная чувствительность к стрептомицину, миастения.

Стрептомицина сульфат нельзя принимать одновременно с антибиотиками, оказывающими ототоксическое действие (канамицин, флоримицин (виомицин), ристомицин, гентамицин, мономицин), а также с фуросемидом и курапеподобными препаратами.

Антибиотик получал название «стрептомицин» (от родового названия актиномицетов *Streptomyces*), а микроорганизм, продуцирующий этот антибиотик, был определен как *S. griseus*.

Стрептомицин вырабатывают не только штаммы *S. griseus*, но и другие стрептомицеты: *S. bikiniensis*, *S. raneus*, *S. humidus*, *S. reticuli*, *S. griseocarneus*, *S. mashuensis*. Однако, основным продуцентом стрептомицина признан *S. griseus*.

В результате изменчивости продуцента стрептомицина нередко появляются аспорогенные формы, т.е. формы, лишенные воздушного спороносного мицелия. Эти варианты, как правило, или вообще неактивны, или образуют незначительное количество стрептомицина. Снижение продуцирования антибиотика наблюдается и у вариантов с усиленной споруляцией.

При этом следует отметить, что изменчивость многих видов стрептомицетов – это результат генетической нестабильности данных микроорганизмов, обусловленный существенными перестройками ДНК, которые затрагивают многие гены, в том числе гены биосинтеза антибиотиков и гены устойчивости к ним.

Для стабилизации признаков, связанных с антибиотикообразованием, при хранении и поддержании штамма иногда в среды, на которых хранится и поддерживается продуцент антибиотика, добавляют вещества (антимутагены), способные стабилизировать процессы, приводящие к хромосомным перестройкам и регуляции экспрессии генов. К антимутагенам относятся: пуриновые нуклеотиды, ионы марганца, метионин, гистидин, полиамины, кофеин и др.

В связи с тем, что культуры актиномицетов переменчивы, каждому штамму продуцента должна соответствовать определенная питательная среда и свой режим развития. На их изменчивость влияют условия культивирования и особенно состав питательных сред: на более богатых по составу средах наблюдается и более быстрая изменчивость.

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

В качестве основы питательных сред применяют гидролизаты растительных и животных белков. Основными компонентами сред, применяющихся при промышленном получении стрептомицина, являются: соевая мука, гидролизат аммонийные соли.

Существенную роль в биосинтезе стрептомицина играют жиры соевой муки и ее минеральный состав. Белок сои и его кислотный гидролизат мало пригодны для биосинтеза антибиотика.

При этом следует отметить, что первоначально З. Ваксман рассматривал мясной экстракт не только как источник азота, но как продукт, содержащий определенное «пробиотическое» вещество, без которого стрептомицин не вырабатывается. Однако, уже в 1946 г. было показано, что мясной экстракт можно с успехом заменить дрожжевым, а позднее появились работы, показавшие, что образование стрептомицина происходит в средах, где мясной экстракт заменен соевой мукой или кукурузным экстрактом, или их гидролизатами. Кроме того, было установлено, что биосинтез антибиотика может происходить и на простых по составу синтетических средах.

В этой связи, предположение З. Ваксмана и его коллег о возможности образования стрептомицина только в присутствии определенного «пробиотического» вещества, содержащегося в мясном экстракте, не подтвердилось.

Данные примеры показывают, что в начале изучения условий выработки стрептомицина исследователи столкнулись с влиянием на процесс биосинтеза антибиотика различных компонентов сред, и, в первую очередь, источников азота, углерода, фосфора.

Источники азота. Для развития стрептомицета и биосинтеза стрептомицина в синтетических средах наиболее благоприятны аммонийные соли. Нитраты в качестве источников азота продуцентом стрептомицина не используются, но при добавлении к среде дрожжевого экстракта стрептомицет начинает их потреблять. По-видимому, невозможность использования стрептомицетом нитратов связана с отсутствием у него доноров водорода, что восполняется добавлением к среде дрожжевого автолизата.

Вместе с тем присутствие нитрата натрия в среде, содержащей кукурузный экстракт, приводит к изменению обмена веществ у продуцента.

Источники углерода. Лучшим источником углерода для развития *S. griseus* и образования антибиотика, по данным большинства авторов, считается глюкоза. Стрептомицет хорошо растет в средах с глюкозой, фруктозой, галактозой, ксилозой, мальтозой, лактозой или крахмалом, но не растет в средах с арабинозой, рамнозой, сахарозой, рафинозой, сорбитом, дульцитом. Продуцент стрептомицина не может гидролизовать сахарозу и рафинозу.

Способность использовать тот или иной источник углерода и продуцировать антибиотик зависит от штамма стрептомицета.

Почти все штаммы, образующие стрептомицин, могут использовать животные жиры, растительные масла или жирные кислоты (олеиновая, пальмитиновая) в средах, не содержащих глюкозу. Масла способствуют увеличению биомассы стрептомицета, ускоряют потребление источников азота и, вместе с тем, замедляют использование глюкозы. Влияние масел зависит, прежде всего, от вида масла, состава среды и штамма продуцента. Путь использования масла стрептомицетом, по-видимому, тот же, что и для других организмов: гидролиз до глицерина и жирных кислот с последующим их окислением.

Спирты, за исключением маннита и глицерина, непригодны для роста стрептомицета и биосинтеза антибиотика.

Из органических кислот – молочная, пировиноградная и лимонная кислоты в синтетических средах стимулируют образование стрептомицина. Использование смеси яблочной и янтарной кислот в среде, содержащей аминокислоты, способствует увеличению биосинтеза антибиотика. Вместе с тем, винная кислота, не повышая выхода стрептомицина, положительно влияет на рост продуцента.

Источники минерального питания и их роль в процессе биосинтеза стрептомицина. Жизнедеятельность продуцента стрептомицина и его биосинтетическая активность обеспечиваются наличием в среде таких компонентов, как фосфор, железо, кальций и другие минеральные вещества.

Фосфор. Фосфор необходим для развития *S. griseus* и биосинтеза антибиотика.

Увеличение концентрации фосфора в среде до определенного предела усиливает выработку стрептомицина. При этом дальнейшее повышение содержания фосфора в среде, не оказывая заметного влияния на рост мицелия, снижает образование антибиотика. Избыток фосфора в среде влияет на биохимический состав цитоплазмы, изменяет цикл развития продуцента и нарушает некоторые физиологические функции клеток.

Значительное увеличение содержания неорганического источника фосфора ускоряет потребление углеводов и подавляет развитие стрептомицета, а, следовательно, и выработку стрептомицина.

При избытке фосфора в среде, содержащей глюкозу, увеличивается накопление пировиноградной кислоты. Однако, такой закономерности не наблюдается при использовании крахмала.

При недостатке в среде фосфора жизнедеятельность актиномицета значительно изменяется, что связано с нарушением усвоения углеводов, азота и с потребностями в кислороде. Все это ограничивает рост мицелия (он становится физиологически неполноценным). При этом способность к биосинтезу антибиотика также снижается.

Потребление фосфора стрептомицетом в большой степени зависит от его исходной концентрации в субстрате. Так, на среде с исходным количеством фосфора, равным 29 мкг/мл, к 48-му часу потребляется 21 мкг/мл, а при исходной концентрации, равной 128 мкг/мл, количество потребленного фосфора возрастает до 118 мкг/мл за тот же период. Эти данные указывают на то, что в зависимости от начальной концентрации фосфора в среде существенно изменяется качество выросшего мицелия стрептомицета, а следовательно, и условия образования стрептомицина.

Изменения в углеводном и фосфорном питании, в свою очередь, вызывают изменения в нуклеиновом обмене культуры и в общем процессе развития продуцента стрептомицина.

Оптимальное содержание фосфора (0,04-0,07 мг/мл) в среде способствует хорошему росту и развитию стрептомицета и высокому уровню биосинтеза стрептомицина. Однако, наиболее благоприятная для роста продуцента и биосинтеза стрептомицина концентрация фосфора в среде зависит от штамма продуцента, состава среды и способа ее приготовления.

Железо, цинк, медь, магний. Важное значение в процессе развития *S. griseus* и образования антибиотика имеют железо, цинк, медь, магний и др.

Максимальный выход стрептомицина наблюдается при содержании $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ в среде в количестве 0,0007–0,005%. Увеличение концентрации сернокислого железа до 0,05% приводит к подавлению биосинтеза антибиотика, снижению скорости потребления углеводов, а также к задержке развития продуцента. Добавление соответствующего количества фосфора к среде с избытком железа устраняет неблагоприятное влияние ионов железа на биосинтез стрептомицина. Вероятно, отрицательный эффект от избыточного содержания железа в среде обусловлен тем, что он связывает ионы фосфора.

Ионы магния играют важную роль в азотном обмене актиномицета, а также в реакциях фосфорилирования.

Роль меди в жизнедеятельности продуцента стрептомицина и образовании антибиотика не вполне ясна. Однако, известно, что увеличение концентрации меди до 50 мг% не оказывает существенного влияния на образование стрептомицина, однако угнетает рост стрептомицета.

Увеличение концентрации цинка и железа до 50 мг% сильно угнетает образование стрептомицина (до 50% в сравнении с контролем).

Хлорид натрия. В состав всех сред для биосинтеза стрептомицина входит хлорид натрия. Установлено, что без натрия хлорида антибиотическая активность культуральной жидкости значительно снижается.

В присутствии хлорида натрия увеличивается проницаемость клеточной стенки, и стрептомицин легче переходит в окружающую среду. Образующийся стрептомицин не полностью выделяется в среду: определенная часть его прочно связана с клеточными стенками мицелия и может быть извлечена при обработке мицелия кислотой, щелочью или солью. Для выяснения роли натрия хлорида в биосинтеза стрептомицина были проведены опыты по выращиванию *S. griseus* на средах с хлоридом натрия и без него, которые показали, что содержание антибиотика действительно несколько выше в среде, содержащей натрия хлорид. Однако, при кислотной обработке мицелия в целях извлечения связанного стрептомицина оказалось, что общий выход антибиотика выше на среде, не содержащей натрия хлорид.

В связи с этим, наличие хлорида натрия в среде не способствует биосинтезу стрептомицина, а лишь облегчает выделение образовавшегося антибиотика из мицелия в среду.

Кальций. В качестве элемента минерального питания кальций не оказывает значительного влияния на биосинтез стрептомицина, однако в зависимости от состава среды он может играть положительную или отрицательную роль. Так, при стерилизации сред, содержащих фосфаты, в присутствии ионов кальция обычно ионы фосфорной кислоты связываются с кальцием в виде нерастворимых соединений. В случае, если в среде фосфор находится в ограниченном количестве, это снижает биосинтез стрептомицина, но при использовании сред с избыточным содержанием фосфатов внесение кальциевых солей перед стерилизацией может перевести часть фосфора в нерастворимые кальциевые соединения, т.е. создаются условия, благоприятные для биосинтеза антибиотика. Кроме того, ионы кальция и магния регулируют значение рН среды при ее подкислении за счет остатков серной, фосфорной или других минеральных кислот при использовании аммонийных солей, например $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$.

Ионы Ca^{2+} активируют такие ферменты, как липазы, аденозинтрифосфатазы и др. Они могут также ингибировать функции ферментов, активируемые магнием.

Для стабилизации признаков, связанных с антибиотикообразованием, при хранении и поддержании штамма иногда в среды добавляют антимутагены (пуриновые нуклеотиды, ионы марганца, L-метионины, гистидин, полиамины, кофеин и др.). В контроле биосинтеза стрептомицина *Streptomyces*

griseus принимает участие плазмидная ДНК, в процессе биосинтеза – 20–30 генов.

С учетом роли отдельных компонентов субстрата в образовании антибиотика был разработан ряд синтетических сред, которые используются для исследований особенностей развития продуцента стрептомицина, но пока еще не пригодные для промышленного получения антибиотика. Невозможность использования синтетических сред в промышленных условиях в основном связана с тем, что они, как правило, дороже натуральных и при развитии на них стрептомицета выход целевого продукта ниже.

Для промышленного биотехнологического получения антибиотика среда должна быть доступной, экономичной и, вместе с тем, обеспечивать высокий уровень биосинтеза целевого продукта и легкость его выделения. С этой целью эмпирически были предложены среды, в состав которых входят такие вещества, как соевая мука, кукурузный экстракт, сухая барда с нитратом натрия или другим неорганическим источником азота, жмыхи, земляные орехи, отходы пенициллинового производства и другие компоненты. Выбор основного компонента среды зависит от региона, где производится антибиотик, а также от сырья, которое может быть в данном случае наиболее подходящим. Однако, в большинстве случаев производство стрептомицина осуществляется в средах с соевой мукой следующего состава (%): глюкоза – 2,0; соевая мука – 2,0; сульфат аммония – 0,3; фосфат калия однозамещенный – 0,05; хлорид натрия – 0,25; карбонат кальция – 0,3.

Приготовленную среду стерилизуют при температуре 120 °С, охлаждают и засевают посевным материалом.

При развитии продуцента различают две стадии. На первой стадии происходит быстрый рост и развитие микроорганизма с энергичным потреблением основных компонентов субстрата и кислорода. В цитоплазме вначале высокого содержания РНК, ДНК не наблюдается и обнаруживается лишь через 12 ч развития. В среде происходит увеличение содержания аммонийного азота, обусловленное разложением белков соевой муки. Значение рН вначале несколько снижается, а затем повышается с 6,8 до 7,9. На этой стадии стрептомицин синтезируется в очень незначительном количестве.

Через 28 ч масса мицелия прекращает увеличиваться, начинается вторая стадия, связанная с образованием стрептомицина. На 3-и сут. значение рН с 7,9 уменьшается до 6,7, на 4–5-е сут. – вновь возрастает до 7,7. Вторая стадия характеризуется медленным потреблением оставшихся в среде питательных веществ, замедлением роста актиномицета, снижением потребления кислорода, автолизом мицелия, максимальным образованием антибиотика. Максимальное накопление стрептомицина наблюдается, когда автолитические процессы начинают преобладать над процессами роста. Количество аммонийного азота продолжает возрастать, что, вероятно, связано с разложением белков соевой муки и автолизом мицелия.

Streptomyces griseus при определенных условиях развития культуры образует еще один антибиотик – маннозидострептомицин (стрептомицин В), в чистом виде выделенный в 1947 г. из культуры актиномицета с помощью

противоточной хроматографии. Маннозидострептомицин отличается от стрептомицина наличием в молекуле маннозы; он менее активен в сравнении со стрептомицином. Культура *Streptomyces griseus* содержит фермент, превращающий маннозидострептомицин в стрептомицин. При соответствующем контроле развития культуры актиномицета можно добиться минимального образования маннозидострептомицина.

Температура. В развитии продуцента и биосинтезе им стрептомицина большое значение имеет температура культивирования организма. Повышение температуры выше 30 °С практически прекращает образование антибиотика. Пределы температурного оптимума для биосинтеза антибиотика – 27–29 °С.

Оптимальную температуру для биосинтеза стрептомицина изменяют в зависимости от штамма стрептомицета и состава питательной среды.

Значение рН среды. Оптимальным начальным значением рН среды для развития стрептомицета является рН 7,0. Стрептомицин синтезируется при значении рН 7,5–8,5. В кислых средах активность стрептомицина снижается, в щелочных – максимальная. Так, активность стрептомицина при значении рН 5,8 в 20–30 раз ниже, чем при величине рН 8,0. Для проявления максимальной противомикробной активности стрептомицина оптимальное значение рН 7,5–8,0.

Таблица 1

Данные о влиянии температуры культивирования на биосинтез стрептомицина и время его максимального выхода

Температура, °С	25	27	29	31
Максимальный выход стрептомицина, мкг/мл	1180	2041	2194	414
Время максимального образования антибиотика, ч	118	118	104	72

Аэрация. *S. griseus* является высокоаэробным организмом, он поглощает значительное количество кислорода, которое зависит от состава питательной среды и стадии его развития.

В начальном периоде развития продуцента потребление кислорода воздуха происходит интенсивно, а затем снижается почти до нуля. Увеличение степени аэрации повышает выход стрептомицина.

Метаболизм у молодого и старого мицелия стрептомицета различен: молодой мицелий содержит, как правило, в 2–3 раза больше нуклеиновых кислот, чем более старый мицелий.

При увеличении уровня аэрации культуры повышается значение рН среды, т.е. быстрее разрушаются протеины.

В анаэробных условиях продуцент стрептомицина развивается плохо. Мицелий, выращенный в аэробных условиях, и перенесенный затем в анаэробные, стрептомицина не образует. Для максимального накопления антибиотика культура должна находиться в условиях непрерывной аэрации.

Ферментативная деятельность продуцента стрептомицина. Способность продуцента стрептомицина использовать сложные белковые и крахмалсодержащие соединения связана с его возможностью превращать данные соединения в более простые азот- и углеродсодержащие вещества с помощью ферментного аппарата.

Изучение ферментативной системы *S. griseus* показало, что она включает амилазу, образующуюся как на среде с глюкозой, так и на среде с крахмалом. Однако, на среде, содержащей крахмал, активность амилазы несколько выше, чем на среде с глюкозой.

Использование сложных белковых соединений, находящихся в растительных и животных продуктах (соевая мука, жмых, казеин и др.), обусловлено действием протеолитических ферментов, образующихся стрептомицетом в значительных количествах одновременно с синтезом стрептомицина.

Наряду с выработкой протеолитических (казеинолитических) ферментов *S. griseus* синтезирует фибринолитические вещества – специфические протеиназы, способные лизировать тромбы крови.

Образование протеолитических ферментов зависит от скорости роста стрептомицета, состава применяемой среды и от штамма продуцента. Так, в среде с крахмалом протеиназ вырабатывается больше, чем в среде с глюкозой. При наличии в среде 4% глюкозы протеолитическая активность культуральной жидкости стрептомицета в течение всего процесса развития остается на более высоком уровне, чем в среде с 1% глюкозы.

При глубинном выращивании *S. griseus* выделяет значительно больше протеиназ в среде с низким содержанием азота. Это, вероятно, связано со специфической реакцией продуцента на снижение содержания усвояемых форм азота в среде. Кроме того, выделение протеиназ зависит от источника азота. В присутствии в среде белка образование протеиназ наиболее низкое, в среде с пептидами – высокое, в средах, содержащих аминокислоты, – еще выше.

В процессе развития продуцента основная масса этих ферментов выделяется в окружающую среду.

Оптимальное значение pH среды для проявления активности протеолитических ферментов 8–8,2. Кислая реакция (pH 4,5–5,5), а также сильнощелочная (pH около 9) подавляют активность ферментов.

Катионы калия стимулируют рост актиномицета и образование протеиназ. Выделенные из культуральной жидкости *S. griseus* протеолитические ферменты содержат трипсин и пепсин. Из продуцента стрептомицина удалось получить протеиназу, способную гидролизовать почти все пептидные связи белков вплоть до свободных аминокислот. Следует отметить, что пря-

мая зависимость между образованием стрептомицина и накоплением продуцентом гидролитических ферментов – протеиназ и амилаз – отсутствует.

При выращивании продуцента на средах, содержащих мочевины или на соевых средах без мочевины, обнаруживается фермент уреазы.

Культура *S. griseus*, кроме указанных ферментов, образует фенилманнозидазу, гидролизующую α -О-фенилманнозу. В основном фенилманнозидазы выделяется в среду, окружающую стрептомицет, хотя в небольших количествах может содержаться и в мицелии продуцента. Она способна гидролизовать в культуре стрептомицета маннозидострептомицин с отделением от него маннозы.

Оптимальное значение pH, необходимое для активации фенилманнозидазы – 8,0, температурный оптимум – около 40 °C (при 50 °C фермент почти полностью инактивируется). Кроме того, фермент чувствителен к условиям аэрации: ухудшение аэрации культуры приводит к заметному снижению его активности.

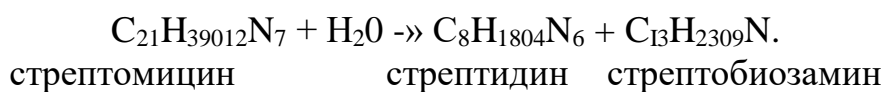
Способность фенилманнозидазы гидролизовать маннозидострептомицина существенно влияет на выход стрептомицина в процессе развития продуцента.

Процесс превращения маннозидострептомицина в стрептомицин может осуществляться в аэробных и в анаэробных условиях. Однако, в связи с тем, что анаэробноз снижает активность фермента, то, по-видимому, и процесс превращения маннозидной формы стрептомицина в стрептомицин будет затруднен. При биосинтезе антибиотика маннозидострептомицин не является предшественником стрептомицина.

Другой фермент трансамидиназа способен переносить группы мочевины от аргинина или канаванина к орнитину или гидроксилламину. При этом специфическая активность трансамидиназы, выделенной из мицелия стрептомицета, прямо пропорциональна скорости образования им стрептомицина.

В 1956 г. была описана система дегуанидаз у продуцента стрептомицина, проявляющая активность при значении pH 7,5. Данная ферментная система способна отщеплять гуанидиновые группировки от L-аргинина, гуанидоуксусной, гуанидопропионовой и гуанидомасляной кислот, а также от стрептидина и стрептомицина. По-видимому, эта система принимает участие в разрушении стрептомицина, которое иногда происходит в конце развития продуцента антибиотика.

Пути биосинтеза стрептомицина. При гидролизе стрептомицина разбавленными кислотами он распадается на стрептидин и стрептобиозамин:



Стрептидин (II) – 1,3-дигуанидино-2,4,5,6-тетраоксициклогексан – сильное основание, не обладающее антибиотической активностью. Стрептобио-

Результаты опытов, проведенных на синтетической среде с малоактивным штаммом *S. griseus* ВНИИП-10, показали, что при добавлении к среде 0,05% L-аргининмоногидрохлорида биосинтез стрептомицина возрастает более, чем в 2,3 раза. Однако, если аргинин добавлять одновременно с инозитом, то биосинтез антибиотика увеличивается в 3 раза. Усиление биосинтеза стрептомицина происходит и в случае, если в среду добавить креатин, гуанидин или мочевины, равноценные аргинину по количеству азота. Во всех случаях лучший стимулирующий эффект наблюдался при добавлении к среде указанных веществ совместно с инозитом.

В этой связи, добавляя к среде для культивирования *S. griseus* меченые гуанидинсодержащие соединения (аргинин, гуанидин), мочевины и инозит, удалось показать, что они значительно повышают выход стрептомицина.

В результате дальнейших исследований в опытах с мечеными соединениями были расшифрованы основные пути биогенеза молекулы стрептомицина. Так, прежде всего, было показано, что все углеродные атомы молекулы антибиотика за исключением атомов углерода гуанидиновых групп образуются за счет глюкозы. При культивировании *S. griseus* на среде с соевой мукой и меченой глюкозой было установлено, что радиоактивная (^{14}C) глюкоза включается в молекулу стрептомицина. Разложение полученного таким путем стрептомицина на составляющие его группировки показало, что радиоактивность наблюдается в стрептаме, стрептозе и в N-метил-L-глюкозамине.

Глютамин и D-глюкозамин являются источниками аминокетов стрептамина. D-стрептоза образуется из D-глюкозы в результате ряда ее превращений. N-метил-L-глюкозамин в молекуле стрептомицина образуется из O-глюкозы.

При применении 0-1- ^{14}C -глюкозы основная часть меченой глюкозы включалась в углеродную цепь аминсахара по первому углероду. При использовании 0-6- ^{14}C -глюкозы накопление метки наблюдалось в шестом углеродном атоме аминсахара. Таким путем можно предположить, что возможный механизм превращения асимметричных углеродов O-глюкозы – один из многочисленных способов эимеризации. Применение меченого метионина ($^{14}\text{C}\text{H}_3$ -L-метионин) показало, что N-метил группы глюкозамина синтезируются из L-метионина.

Углерод гуанидиновых групп стрептомицина образуется из углерода CO_2 . При использовании радиоактивного CO_2 установлено, что почти весь углерод CO_2 включается в гуанидиновые боковые цепочки.

Кроме того, при этом было установлено, что более интенсивное включение радиоактивного углерода CO_2 происходит в том случае, если CO_2 добавляется через 2 или 3 суток после посева стрептомицета.

При добавлении к среде хлоргидрата L-аргинина (по 200 мг на колбу) заметно снижается включение ^{14}C в молекулу стрептомицина, хотя выход стрептомицина существенно не увеличивается. Последнее подтверждает выводы о том, что присутствие аргинина в богатых по составу средах может не существенно стимулировать биосинтез антибиотика.

По-видимому, аргинин играет роль донора гуанидиновых групп или групп мочевины при биосинтезе стрептомицина. Возможно, что L-аргинин – промежуточное соединение при биосинтезе гуанидиновой части молекулы стрептомицина.

В опытах с отмытым мицелием стрептомицета показано, что вещества, содержащие гуанидиновые группировки (L-аргинин, креатин, креатинин, гуанидин) или легко превращающиеся в такие соединения (цитруллин, орнитин), переводятся клетками *S. griseus* в соединение, содержащее, по крайней мере, одну гуанидиновую группировку. Затем это соединение используется продуцентом в процессе биосинтеза стрептомицина.

Гуанидиновые группы L-аргинина, меченные по углероду, принимают непосредственное участие в биосинтезе молекулы стрептомицина.

По данным ряда исследователей, у продуцента стрептомицина обнаружена трансамидиназная активность, связанная с биосинтезом антибиотика. При этом трансамидиназную активность имеют лишь штаммы, способные синтезировать стрептомицин или гидроксистрептомицин.

Сходная ситуация наблюдается при биосинтезе некоторых пирольных производных антибиотиков, например ундецилпродигиозина, продуцируемого отдельными штаммами стрептомицетов.

У мутанта *S. griseus* – одного из продуцентов антибиотика с нарушенным процессом катаболизма пролина – происходит значительное снижение образования ундецилпродигиозина. Так, установлено, что биосинтез продигиозина служит потенциальной «ловушкой» для пролина, т.е., если при развитии продуцента антибиотика не происходит использование в процессе метаболизме пролина, он остается невостребованным и находится в избытке, то данная аминокислота расходуется на биосинтез ундецилпродигиозина, повышая его выход. И, наоборот, при снижении образования пролина и его интенсивном включении в конструктивные процессы стрептомицета наблюдается снижение биосинтеза антибиотика.

Участие инозита (мезоинозита) в биосинтезе молекулы стрептомицина установлено прямыми опытами; использование в опытах инозита, меченного ^{14}C , который добавлялся к 96-часовой культуре *S. griseus*, показало, что в стрептомицине, образовавшемся за 24 ч, основное количество ^{14}C концентрируется в циклогекситоловом кольце стрептидина. В гуанидиновых цепочках ^{14}C полностью отсутствовал. Эти выводы подтверждаются данными ряда исследователей, которые показали, что инозит (особенно инозит в комбинации с аргинином) увеличивают выход стрептомицина, следовательно, это позволяет предположить, что инозит является предшественником стрептидина.

Установлено, что хинная и шикимовая кислоты подобно инозиту стимулируют биосинтез стрептомицина.

Повышение биосинтеза стрептомицина при добавке аргинина к синтетической среде происходит и у высокоактивного штамма стрептомицета ЛС-1. Однако, такое повышение в сравнении с контролем меньше, чем у слабоактивного продуцента.

Гидролизат белка мицелия стрептомицета, синтезирующего антибиотик, содержит значительно меньше основных аминокислот (особенно аргинина), чем гидролизат белка мицелия с низкой способностью к биосинтезу антибиотика. Аргинин используется преимущественно на построение молекулы стрептомицина, а не на построение белка мицелия.

Кислотный гидролизат белка сои, являющийся единственным источником азота в среде, способствует образованию определенного, хотя и не очень высокого по сравнению с соевой мукой количества стрептомицина. При удалении из гидролизата гексоновых оснований (аргинина, лизина, гистидина) биосинтез антибиотика при нормальном росте стрептомицета снижается примерно на 50%.

При использовании высокоактивного штамма продуцента стрептомицина фракция основных аминокислот кислотного гидролизата белка сои более благоприятно влияет на биосинтез стрептомицина, чем фракция моноаминокислот.

При этом по влиянию на процесс образования стрептомицина аминокислоты можно разделить на три группы:

1 – аминокислоты, не влияющие на рост стрептомицета, но стимулирующие биосинтез антибиотика (аргинин, гистидин, лизин, глицин, аланин, валин, фенилаланин, изолейцин);

2 – аминокислоты, не влияющие на образование антибиотика (аспарагиновая кислота, серии, треонин, метионин, тирозин, лейцин);

3 – аминокислоты, подавляющие рост стрептомицета и тормозящие биосинтез стрептомицина (цистин, триптофан).

Энзиматический экстракт, выделенный из разрушенного лизоцимом мицелия *S. griseus*, способен образовывать глюкозамин в опытах *in vitro*. В данном экстракте обнаружена уреазная активность, чем, по-видимому, объясняется стимулирующее влияние мочевины как донора аминогрупп в синтезе глюкозамина.

Образование N-метильной группы в глюкозамине связано с процессом метилирования. Известно, что основным донором метильной группы при биосинтезе многих БАВ является аминокислота метионин.

Вместе с тем, установлено, что витамин В₁₂ стимулирует процесс биосинтеза ряда веществ, содержащих метильную группу. Витамин В₁₂ в сочетании с метионином способствует повышению выхода стрептомицина культурой *S. griseus* (штамм ЛС-1) до 25%.

При изучении путей биосинтеза ряда антибиотиков широко применяются мутантные штаммы с измененными свойствами, связанными с блокированием некоторых звеньев в цепи образования молекулы антибиотика. Такой подход к изучению биосинтеза антибиотиков позволяет исследовать системы регуляции биосинтетической активности микроорганизмов.

При изучении биогенеза стрептомицина были использованы разные мутанты *S. griseus*: неактивные (не способные образовывать антибиотик) и малоактивные варианты высокопродуктивного штамма *S. griseus*.

При этом совместное культивирование неактивного мутанта 1200 и малоактивного мутанта 1211 способствует восстановлению нарушенной в процессе мутагенеза биосинтетической активности у мутанта 1200 стрептомицета.

Полученные результаты исследования показывают, что у неактивного мутанта 1200 биосинтез стрептомицина осуществляется под влиянием определенного вещества (или веществ), содержащегося в культуральной жидкости малоактивного мутанта 1211. Это вещество неферментной природы, т.е. при кипячении оно не инактивируется.

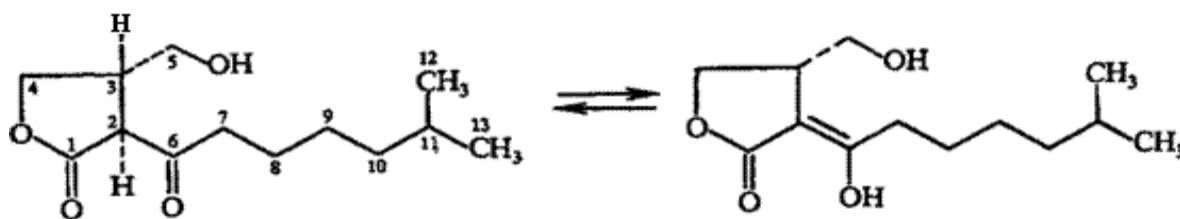
Стимулирующий эффект со стороны штамма 1211 наблюдается в том случае, если 24–48-часовая культуральная жидкость добавляется к односуточному мицелию стрептомицета (штамм 1200).

Используя метод совместного культивирования активных и неактивных мутантов продуцента стрептомицина, А.С. Хохлов с сотр. в первой половине 60-х гг. XX в. впервые открыли и подробно изучили А-фактор, а затем и другие биорегуляторы метаболизма стрептомицетов.

А-фактор специфически стимулирует биосинтез стрептомицина антибиотически неактивным мутантом, принимает участие в образовании стрептидиновой части молекулы стрептомицина и оказывает влияние на процесс спорообразования, восстанавливая споруляцию стрептомицета. Добавление стимулирующего фактора к мутанту, не образующему стрептомицин, способствует началу процесса трансамидинирования

Трансамидиназная активность мицелия предшествует биосинтезу стрептомицина примерно на 10 ч. По-видимому, действие активатора связано с индукцией трансамидиназы.

А-фактор выделен из культуральной жидкости *S. griseus* (штамм 751), для которого определены молекулярная масса (342) и эмпирическая формула ($C_{13}H_{22}O_4$).



В 1976 г. Е.М. Клейнер с сотр. установили структурную формулу А-фактора, обеспечивающего нормальное развитие *S. griseus* и биосинтез им стрептомицина, а в 1977 г. осуществили химический синтез рацемического А-фактора и его гомологов. Эти же авторы показали, что синтезированный биорегулятор обладает такой же биологической активностью, как и природный фактор.

А-фактор представляет собой 28-изокаприлоил-38-оксиметил-7-бутиролактон. Стрептомицет одновременно синтезирует два гомолога. А-

фактор у стрептомицетов – это своеобразный авторегулятор метаболизма, он не только стимулирует биосинтез стрептомицина у недостающих по А-фактору мутантов *S. griseus*, но и принимает участие в выработке стрептомицина активными продуцентами данного антибиотика.

Механизм его действия связан с дерепрессией определенных участков ДНК стрептомицетов, осуществляющих запуск разнообразных процессов, необходимых, в конечном счете, как для морфогенеза, так и для биосинтеза антибиотика.

Нарушение образования А-фактора влияет на процессы, связанные с биосинтезом молекулы стрептомицина: резко снижается активность амидинотрансферазы (фермента, участвующего в образовании стрептомицина).

В цитоплазме *S. griseus* обнаружен белок, связывающий А-фактор. У других видов стрептомицетов, не образующих стрептомицин, обнаружить данный белок не удалось.

К настоящему времени у разных родов актиномицетов определено более 10 регуляторов развития – аналогов или гомологов А-фактора. Причем у разных видов актиномицетов гены, ответственные за биосинтез А-фактора, локализованы на хромосоме или на плазмиде.

Ауторегуляторы, подобные А-фактору стрептомицетов, обнаружены у представителей других видов микроорганизмов, которые способны регулировать разные процессы.

Получен мутант продуцента стрептомицина, блокированный по биосинтезу стрептидина (такие мутанты называют идиотрофами). Выработка антибиотика таким мутантом происходит лишь в случае, если к среде добавлен стрептидин. С увеличением концентрации введенного стрептидина биосинтез стрептомицина возрастает. Все это указывает на то, что стрептидин целиком включается в молекулу стрептомицина, т.е. является ее предшественником.

Постферментационная стадия. В культуральной жидкости находятся минеральные вещества, белки, нуклеиновые кислоты, аминокислоты, полисахариды, жиры, стрептомицин и др.

Остальная часть стрептомицина выделяется в культуральную среду, но часть его остается в мицелии и на его поверхности. Для извлечения стрептомицина из культуры продуцента культуральную жидкость совместно с биомассой обрабатывают минеральной кислотой. При этом антибиотик переходит в раствор. Мицелий отделяют фильтрованием или центрифугированием.

С помощью фильтр-прессов, обеспечивающих высокую скорость фильтрования, для удаления мицелия. До подачи культуральной жидкости на фильтр к ней для улучшения фильтрации добавляют наполнитель, не поглощающий стрептомицин. После первичной фильтрации значение рН фильтрата доводят до определенной величины, а затем его окончательно отфильтровывают с помощью второго фильтра. После фильтрации осадок утилизируют.

Свободную от мицелия культуральную жидкость обрабатывают щавелевой кислотой. При этом обеспечивается удаление белков и органических ос-

нований, ионов металлов (кальция, магния, железа). Затем осуществляется выделение стрептомицина в чистом виде.

Стрептомицин – сильнополярное соединение, его основание и соли неорганических кислот хорошо растворимы в воде; соли органических кислот – почти во всех органических растворителях.

Для выделения стрептомицина из культуральной жидкости в чистом виде используются методы адсорбции на активированном угле и метод ионообменной хроматографии

В основу первого метода положена адсорбция стрептомицина из фильтрата на активированном угле при нейтральном или слабощелочном значении рН среды (при значении рН 2–4 стрептомицин остается в растворе, в то время, как примеси адсорбируются на сорбенте). После удаления примесей, на активированный уголь адсорбируют из подщелоченной среды антибиотик, который далее десорбируют с сорбента разбавленным спиртовым раствором соляной кислоты, после его нейтрализуют и концентрируют путем выпаривания. Полученный концентрат обрабатывается ацетоном, осаждающим солянокислый стрептомицин. Смесь фильтруется через фильтр-пресс. Причем фильтрат поступает на регенерацию растворителя. К безводному спиртовому раствору соли стрептомицина добавляют спиртовой раствор хлористого кальция, чтобы получить кристаллическую соль стрептомицина.

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

Стабильность стрептомицина зависит от чистоты препарата, влажности, температуры и значения рН растворителя. Химически чистый стрептомицин устойчив в сухом состоянии и в виде растворов. Соли стрептомицина при хранении при комнатной температуре инактивируются в незначительной степени на протяжении нескольких лет. Максимальная стабильность растворов стрептомицина сульфата и гидрохлорида находится при значении рН от 3,0 до 7,0 при температуре от 7 до 25 °С.