

## Занятие семинарского типа № 2

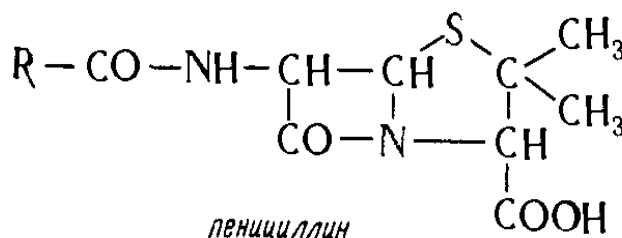
### ТЕМА ЗАНЯТИЯ: Биотехнологии антибиотиков

#### УЧЕБНЫЙ МАТЕРИАЛ

##### 1. Схема биотехнологического производства пенициллина

Пенициллины относятся к  $\beta$ -лактамам, что обусловлено наличием в их структуре общего для всей группы четырехчленного лактамного цикла.

Все пенициллины имеют одинаковое строение основной группы, представленной тиазолидиновым кольцом, соединенным с  $\beta$ -лактамным циклом, и имеющим аминогруппы – 6-аминопенициллановая кислота (6-АПК).



Различные пенициллины (G, X, F, K и др.) отличаются строением радикала молекулы боковой цепи, активностью и спектром действия.

Пенициллины оказывают бактерицидное действие. При этом они влияют только на делящиеся клетки. Механизм их антибактериального действия связан с нарушением синтеза компонентов клеточной стенки. Многие исследователи полагают, что пенициллины нарушают поздние этапы синтеза клеточной стенки, препятствуя образованию пептидных связей за счет ингибирования транспептидазы.

При биотехнологическом производстве пенициллина применяют специально отобранные расы плесневых грибов-суперпродуцентов рода *Penicillium crysogenum*.

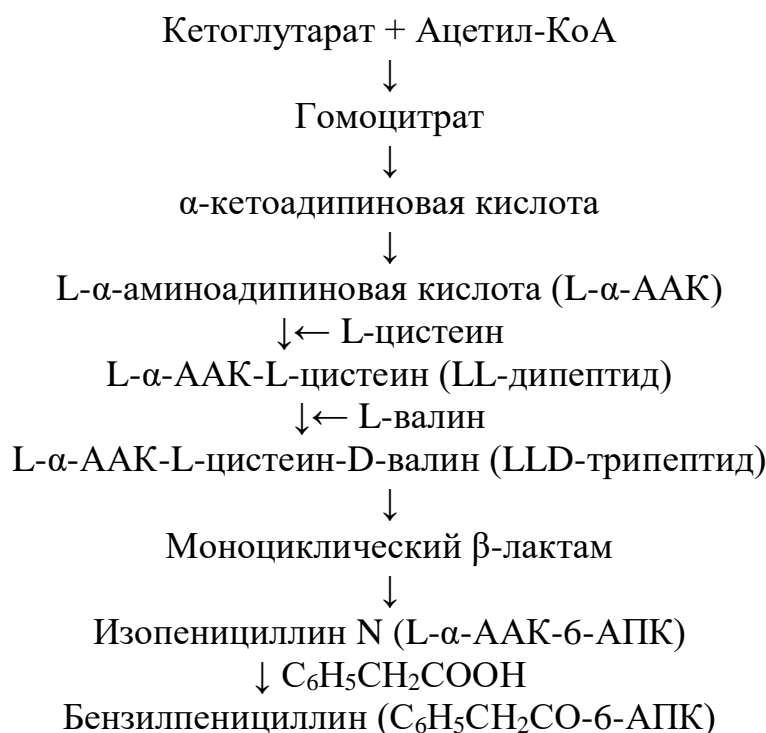
Для промышленного биотехнологического производства пенициллина применяют биореакторы с механическим перемешиванием, объемом более 10000 дм<sup>3</sup>.

Питательная среда для биотехнологического производства пенициллина содержит (%): кукурузный экстракт (2–3), глюкозу (2), легко усвояемую лактозу (1), сульфат аммония, фосфаты (0,5–1), производные фенилуксусной кислоты (ФУК) (0,3–0,6), гидрол.

Биосинтез того или иного пенициллина зависит от наличия в среде специфического вещества – предшественника, который микроорганизм включает в молекулу антибиотика без предварительного расщепления. Предшественники биосинтеза пенициллина (ФУК, фенилацетамид, феноксисукусная

кислота) при определенных концентрациях и значении рН среды оказывают токсическое влияние на продуцент.

Схема биосинтеза пенициллина:



При этом ФУК менее токсична. Ее введение в среду в концентрации выше 500 мкг/мл угнетает рост мицелия, особенно в первые 24 ч его развития. ФУК добавляется в концентрации от 100 до 500 мкг/мл через 24 ч развития *Penicillium crysogenum*. При таких условиях обеспечивается наибольший выход бензилпенициллина, который через 72 ч развития может достигать 500–1000 мкг/мл.

При развитии продуцента пенициллина без внесения предшественника образуется около 45% бензилпенициллина (пенициллин G) и около 53% пенициллина K (радикал – n-гептилпенициллин). При добавлении к среде ФУК изменяется соотношение образующихся компонентов в сторону увеличения бензилпенициллина, количество которого в зависимости от возраста продуцента достигает 75–99% от смеси пенициллинов. В процессе культивирования *Penicillium crysogenum* в среде, не содержащей ФУК, в ней накапливаются серосодержащие соединения не β-лактамного характера, близкие к цистеину и метионину. Введение в среду ФУК способствует более интенсивному метаболизму серосодержащих компонентов в соединения β-лактамного характера.

При развитии продуцента пенициллинов – *Penicillium crysogenum* – на кукурузно-лактозной среде выделяют 3 фазы.

Первая фаза – начинается рост мицелия, при этом выход антибиотика очень низок. Молочная кислота, присутствующая в кукурузном экстракте, потребляется продуцентом с максимальной скоростью, лактоза используется

медленно; потребление кислорода высокое. В данном случае усиливается азотный обмен, в результате в среде появляется аммиак и резко увеличивается значение рН среды.

Вторая фаза – максимальное образование пенициллина, что связано с быстрым потреблением лактозы и аммонийного азота. Значение рН среды остается почти без изменений, увеличение массы мицелия незначительное, потребление кислорода снижается.

Третья фаза – снижение концентрации антибиотика в среде в связи с начавшимся автолизом мицелия и выделением в результате этого процесса аммиака, что сопровождается повышением значения рН среды.

Вместо кукурузного экстракта может быть использована арахисовая мука, жмыхи, мука из хлопковых семян и др. При этом возможность использования продуктов растительного происхождения обусловлена тем, что у *Penicillium crysogenum* имеются сильные протеолитические ферменты.

В качестве углеводов часто используют сахарозу или смесь лактозы с глюкозой в соотношении 1:1. Глюкоза может снижать биосинтез антибиотика, тогда как на средах, содержащих лактозу или сахарозу, биосинтез антибиотика протекает активнее.

Важную роль в процессе биосинтеза пенициллина играет сера, содержащаяся в структуре антибиотика. В качестве источников серы используются натрия сульфат и натрия тиосульфат.

Избыток ионов меди не влияет на рост продуцента, но подавляет биосинтез пенициллина. Эффект торможения биосинтеза снимается добавлением в питательную среду ионов железа.

*Penicillium crysogenum* в качестве источника фосфора может использовать не только фосфаты, но и фитаты (соли инозитфосфорных кислот), т.к. продуцент содержит фермент, разрушающий фитин с освобождением неорганического фосфора.

Для стабилизации значения рН среды добавляют мел, а кашалотовый жир используют в качестве пеногасителя.

После стерилизации и охлаждения питательную среду засевают проросшими спорами гриба. В данном случае аэрация осуществляется путем пропускания через среду воздуха. При этом среду постоянно перемешивают с помощью мешалки.

Температура в период первой фазы развития продуцента составляет 30 °С, во вторую фазу – 20 °С, оптимальное значение рН для обеспечения роста продуцента – ниже 7,0, потребление углеводов должно быть медленным, что достигается использованием лактозы или дробным внесением глюкозы.

Подготовка посевного материала включает следующие этапы: сначала размножаются споры на пшенице во флаконах при температуре 24–25 °С в течение 4–5 суток. Полученным споровым материалом засевают инокуляторы, затем посевные аппараты (12–18 ч).

В процессе ферментации необходимо соблюдение условий строгой асептики.

После окончания процесса ферментации мицелий гриба отделяют с помощью вакуум-фильтрации или центрифугирования. Осадок на фильтре (мицелий гриба) промывают водой для максимального выхода пенициллина.

Из культуральной жидкости антибиотик, в которой он находится в виде кислоты, выделяют путем экстракции неполярными органическими растворителями (аминоацетатом, хлороформом, бутилацетатом, бутанолом и др.).

Очистку антибиотика проводят путем замены растворителей, т.к. соли пенициллина плохо растворимы в органических растворителях. Экстрагированный пенициллин в виде кислоты переводят в водный раствор в виде соли, добавляя щелочь. Повторяя данные операции, пенициллин концентрируют и очищают. Большинство пенициллинов производят в виде натриевых и калиевых солей. Новокаиновые и бензатиновые соли являются основой пролонгированных препаратов пенициллина для внутримышечного введения.

В сухой кристаллической форме пенициллиновые соли достаточно стабильны в течение длительного времени при температуре 4 °С. Растворы быстро утрачивают свою активность (в течение 24 ч при температуре 20 °С), поэтому их готовят непосредственно перед введением.

## **2. Схема биотехнологического производства цефалоспоринов**

С помощью гриба *Cephalosporium acremonium* был получен ряд антибиотиков, в том числе и цефалоспорин С. Его полусинтетические производные получили название цефалоспорины. К ним относятся цефалотин, цефалексин, цефаклор, цефотаксим, цефуроксим, цефоперазон, цефепим, цефтриаксон и др.

По химическому строению цефалоспорин относится к β-лактамам, но β-лактамное кольцо конденсировано не с пяти-, а с шестичленным гетероциклом.

Цефалоспорины действуют бактерицидно, что связано с их угнетающим влиянием на образование клеточной стенки. Аналогично пенициллину они угнетают активность транспептидазы, участвующей в биосинтезе клеточной стенки бактерий. По противомикробному спектру цефалоспорины относятся к антибиотикам широкого спектра действия. Они устойчивы к стафилококковой пенициллиназе. Цефалоспорины в отличие от пенициллинов устойчивы к β-лактамазе, подавляют развитие грамположительных и грамотрицательных бактерий, однако активность данного антибиотика ниже пенициллина.

Все пенициллины и цефалоспорины являются селективными ингибиторами синтеза клеточной стенки. Первый этап действия данных лекарственных препаратов заключается в их связывании с клеточными рецепторами; такими рецепторами являются пенициллинсвязывающие протеины (ПСП), количество которых составляет 3–6 тыс. у разных бактерий. Отдельные ПСП могут иметь неодинаковый аффинитет к лекарственному препарату, и каждый из них может опосредовать разное действие. В частности, присоединение пенициллина к одному ПСП может вызывать аномальное увеличение клетки, присоединение к другому – приводит к дефекту на поверхности кле-

точной стенки без последующего лизиса клетки. ПСП контролируется хромосомами, мутации могут изменить их количества и аффинитет к отдельным β-лактамным препаратам. После связывания β-лактамного препарата с рецепторами ПСП ингибируется реакция транспептидации и останавливается биосинтез пептидогликана.

Следующий этап – устранение или инактивация ингибитора аутолитических ферментов (гидролаз) в клеточной стенке, что сопровождается активацией литического фермента у некоторых микроорганизмов и может привести к лизису клетки.

В процессе развития продуцента *Cephalosporinum acremonium*, наряду с цефалоспорином С, синтезируется и пенициллин N. Его образование происходит тем же путем, что и образование изопенициллина N в процессе биосинтеза бензилпенициллина. Через ряд стадий из изопенициллина N образуется цефалоспорин С.

Продуцент целоспоринов может расти на средах, содержащих белки, например, соевую муку, сухие дрожжи, жмыхи. Кроме того, в питательную среду добавляют аммонийные соли и фосфор, который способствует усвоению углеводов, а также цинк, марганец, магний, железо и мел.

Посевной материал сначала готовят в качалочных колбах, затем переносят в инокулятор, в посевной аппарат большего объема, а после в ферментер. Время подготовки посевного материала при биотехнологическом производстве цефалоспоринов составляет 70 ч.

Ферментация при биотехнологическом получении цефалоспоринов осуществляется глубинным способом, в условиях постоянной аэрации и непрерывного перемешивания, при температуре 26–28°C, в течение 7–8 суток. Процесс культивирования осуществляют в строго асептических условиях.

Постферментационная стадия, связанная с выделением и очисткой цефалоспоринов, осуществляется по той же схеме, что и в случае пенициллинов.

### **3. Схема биотехнологического получения стрептомицина**

Стрептомицин относится к группе аминогликозидных антибиотиков.

Актиномицет *Streptomyces griseus*, синтезирующий стрептомицин, впервые был выделен в лаборатории микробиологии Ратжерского университета в 1943 г. С появлением стрептомицина медицина получила мощное оружие для борьбы с таким тяжелым заболеванием, как туберкулез.

Стрептомицин – антибиотик, образующийся в процессе жизнедеятельности лучистых грибов *Streptomyces globisporus*, *Streptomyces* или других родственных микроорганизмов.

Культуры актиномицетов переменчивы, поэтому каждому штамму 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). Изменчивость продуцентов стрептомицина яв-

ляется результатом генетической нестабильности данных микроорганизмов, обусловленной существенными перестройками ДНК, затрагивающими многие гены, в том числе и гены биосинтеза антибиотиков, а также гены устойчивости к ним.

Данный антибиотик выпускается в виде сульфата.

Стрептомицина сульфат – порошок или пористая масса белого или почти белого цвета, без запаха, горьковатая на вкус, гигроскопичный, легко растворимый в воде, практически нерастворимый в спирте, хлороформе и эфире; устойчивый в слабокислой среде, но легко разрушающийся 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, возбудители чумы, туляремии, бруцеллеза) и некоторых грамположительных (стафилококки) микроорганизмов. При этом он менее активен в отношении стрептококков, пневмококков и не действует на анаэробы, риккетсии и вирусы.

Стрептомицин действует бактерицидно. Такое его действие связано с подавлением биосинтеза 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 больными микобактерий.

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

Стрептомицина сульфат применяют внутримышечно, а также в виде аэрозолей, интратрахеально, внутрикавернозно (у взрослых).

При лечении стрептомицином могут наблюдаться различные токсические и аллергические реакции: лекарственная лихорадка, дерматит и другие аллергические явления, головокружение, головная боль, сердцебиение, альбуминурия, гематурия; 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 (ототоксичность). При длительном применении больших доз может развиваться глухота.

Терапия стрептомицина сульфатом должна осуществляться под тщательным врачебным наблюдением; до и систематически в процессе лечения,

необходимо следить за функцией VIII пары черепных нервов, вестибулярно-го и слухового аппаратов, функцией почек, формулой крови.

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

Недопустимо смешивание стрептомицина сульфата в одном шприце с антибиотиками пенициллинового ряда и цефалоспоринами.

Детям грудного возраста и беременным данный лекарственный препарат назначают только по жизненным показаниям.

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

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

Следует отметить, что существенную роль в биосинтезе стрептомицина играют жиры соевой муки и ее минеральный состав. При этом белок сои и его кислотный гидролизат мало пригодны для биосинтеза антибиотика.

Для стабилизации признаков, связанных с антибиотикообразованием, при хранении и поддержании производственного штамма в некоторых случаях в питательные среды добавляют антимуагены (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.

Наличие некоторых веществ в составе питательной среды влияет на антибиотическую активность стрептомицина. В случае, если к такой среде добавить 0,5–3 % натрия хлорида, калия хлорида или натрия сульфата, *E. coli* развивается в присутствии 10 мкг/мл стрептомицина. Приводятся два объяснения данному факту: в присутствии натрия хлорида уменьшается скорость и степень диффузии стрептомицина или натрия хлорид снижает адсорбцию антибиотика бактериальной клеткой. При концентрации пировиноградной и фумаровой кислот до 1% продуцент развивается в присутствии 10 мкг/мл стрептомицина, если концентрацию солей повысить до 3%, рост бактерий наблюдается при концентрации антибиотика 150 мкг/мл. Защитные свойства этих кислот по-разному проявляются по отношению к разным микроорганизмам. В отношении *E. coli* защитные свойства проявляются в большей степени, в отношении *Staph. aureus* защитных свойств не наблюдается. Сильно снижается активность стрептомицина в присутствии цистеина и гидроксиламина (цистеин полностью инактивирует антибиотик в течение нескольких часов).

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

В процессе развития продуцента выделяют 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, она обнаруживается только через 12 ч развития продуцента стрептомицина. В среде происходит увеличение содержания аммонийного азота, обусловленное разложением белков соевой муки. Значение рН среды вначале несколько снижается, а затем повышается с 6,8 до 7,9. На данной стадии стрептомицин синтезируется в очень незначительном количестве.

Через 28 ч масса мицелия прекращает увеличиваться, начинается вторая стадия, связанная с образованием стрептомицина. На третьи сутки значение рН среды с 7,9 уменьшается до 6,7, на 4–5-е сутки – 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. При этом 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.

Культивирование продуцента стрептомицина осуществляется при температуре 27–29 °С, сопровождается постоянной аэрацией и перемешиванием, значение рН среды составляет 7,5–8,0.

При этом повышение температуры до 30 °С и выше резко снижается, а в некоторых случаях и полностью прекращает образование антибиотика.

Аэрация среды имеет очень большое значение, т.к. *Streptomyces griseus* – высокоаэробный организм, который в процессе своего развития поглощает значительное количество кислорода, зависящее от состава питательной среды и стадии развития продуцента. В ранний период развития актиномицета потребление кислорода воздуха более интенсивное, а затем оно снижается до нуля. Увеличение степени аэрации повышает выход стрептомицина. В анаэробных условиях продуцент стрептомицина развивается плохо. Мицелий, выращенный в аэробных условиях и перенесенный затем в анаэробные условия, стрептомицина не образует. Для максимального накопления антибиотика культура должна находиться в условиях непрерывной аэрации.

Оптимальное начальное значение рН для развития актиномицета составляет 7,0. Стрептомицин образуется при значении рН от 7,5 до 8,0. В кислых



средах активность стрептомицина снижается, а 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 составляет рН 7,5–8,0.

В культуральной жидкости находятся минеральные вещества, белки, нуклеиновые кислоты, аминокислоты, полисахариды, жиры, стрептомицин и другие компоненты.

Основная часть стрептомицина выделяется в культуральную среду. Однако, часть антибиотика остается в мицелии и на его поверхности. С целью извлечения стрептомицина из культуры продуцента культуральную жидкость вместе с биомассой обрабатывают минеральной кислотой. При этом весь антибиотик переходит в раствор. Мицелий отделяют с помощью фильтрации или центрифугирования.

В основной для этой цели используют фильтр-прессы, обеспечивающие высокую скорость фильтрации. До подачи жидкости на фильтр к ней для улучшения условий 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.

Культуральную жидкость, свободную от мицелия, обрабатывают щавелевой кислотой. При этом обеспечивается удаление белков и органических оснований, ионов металлов (кальция, магния, железа). Затем осуществляется выделение стрептомицина в чистом виде.

Стрептомицин представляет собой сильно полярное соединение. При этом его основание и соли неорганических кислот хорошо растворимы в воде, а соли органических кислот – почти во всех органических растворителях.

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

В основу первого метода положена адсорбция стрептомицина из фильтрата на активированном угле при нейтральном или слабощелочном значении рН среды (при значении рН среды 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 с помощью разбавленного спиртового раствора соляной кислоты. Затем его нейтрализуют и концентрируют путем выпаривания. Полученный концентрат обрабатывается ацетоном, осаждающим солянокислый стрептомицин. Смесь отфильтровывают с помощью фильтр-пресса. 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. При хранении солей стрептомицина при комнатной температуре, они инактивируются в незначительной степени на протяжении нескольких лет. Максимальная стабильность растворов стрептомицина сульфата и гидрохлорида достигается при значении рН от 3,0 до 7,0 при температуре от 7 до 25 °С.

#### **4. Схема биотехнологического производства грамицидина С**

Продуцент *Bacillus brevis* способен синтезировать полипептидные антибиотики, к числу которых относят грамицидины А, В, С<sub>D</sub>, D, С, отличающиеся по своим аминокислотному составу и пространственной структуре молекулы.

Для биотехнологического производства грамицидина С предложены питательные среды на основе мясного и дрожжевого гидролизатов, содержащие сбалансированный набор минеральных и органических солей.

В процессе культивирования необходимо подобрать сбалансированное сочетание интенсивности аэрации питательной среды (от 0,38 до 4,38 г О<sub>2</sub>/(л·ч)) и концентрации входящих в ее состав веществ. Оптимальная температура культивирования продуцента составляет 40 °С.

Развитие продуцента и биосинтез антибиотика может осуществляться и при температуре 28 °С. Однако, в данном случае максимальный биосинтез антибиотика наблюдается в первые 24 ч, в то время, как при температуре 40 °С – между 24 и 48 ч.

При выделении грамицидина С содержащую его культуральную жидкость подкисляют хлороводородной кислотой до значения рН 4,5–5,0. В данном случае в осадок выпадает дихлоргидрат грамицидина С вместе с бактериальными клетками продуцента. Из осадка антибиотик экстрагируют этиловым спиртом.

Концентрат, содержащий 4% грамицидина С, используется в медицинской практике.

#### **5. Схема биотехнологического производства неомицина**

В 1949 г. З. Ваксман и Х. Лешевалье выделили неомицин из культуры *Streptomyces fradiae*. Позднее было установлено, что данный лекарственный препарат представляет собой комплекс, состоящий из семи антибиотиков аминокликозидного строения.

Неомицины представляют собой основания, хорошо растворимые в воде и нерастворимые в органических растворителях, их невысокая антибиотическая активность проявляется в щелочной среде.

На синтетической питательной среде актиномицет развивается лучше, чем на среде с соевой мукой. Однако, биосинтез неомицина на синтетической питательной среде почти в 8 раз ниже, чем на натуральных средах неопределенного состава. Следует отметить, что некоторые вещества способствуют

увеличению выхода неомицина на 50%. К ним относятся: ауксин и  $\alpha$ -нафталилуксусная кислота.

В процессе образования антибиотика большое значение имеет цинк.

Степень аэрации культуры должна быть несколько ниже, чем при получении стрептомицина.

Неомициновый комплекс не теряет противомикробных свойств в процессе длительного хранения (до 2 лет) как в виде растворов, так и в твердом состоянии.

Противомикробный спектр данного лекарственного препарата сходен со спектром стрептомицина. Однако, неомицин подавляет развитие устойчивых к стрептомицину штаммов *Mycobacterium tuberculosis*. Он малоактивен в отношении большинства видов *Clostridium*, *Streptococcus*, грибов, вирусов и протозоа.

Микроорганизмы, чувствительные к неомицину, приобретают к нему устойчивость в меньшей степени, чем к стрептомицину.

При использовании неомицина следует учитывать его токсичность. Для человека неомицин более токсичен, чем стрептомицин. Степень его токсичности варьируется в зависимости от состава неомицинового комплекса и чистоты препарата.

## **6. Схема биотехнологического производства гентамицина сульфата**

Гентамицина сульфат – антибиотик, относящийся к группе аминогликозидов, представляющий собой смесь гентамицина сульфатов, продуцируемых культурой *Micromonospora purpurea*.

Данный антибиотик подавляет развитие грамположительных и грамотрицательных бактерий, в том числе и видов *Proteus* и *Pseudomonas*, но не оказывает воздействия на микроскопические грибы.

Данный лекарственный препарат эффективен при инфекциях мочевыводящих путей, респираторных и желудочно-кишечных заболеваниях. В связи с широким спектром действия его часто назначают при смешанной инфекции, а также в тех случаях, когда возбудитель не установлен.

Современное биотехнологическое производство гентамицина сульфата представляет собой сложную многоступенчатую систему, состоящую из ряда последовательных технологических стадий.

Приготовление посевного материала и питательной среды. Исходной при биотехнологическом производстве гентамицина сульфата является культура *M. purpurea* var. *violacea* штамм ВНИИ-7R, выращенная в пробирках на скошенной агаризованной среде Гаузе-1.

Подготовка посевного материала является одной из ответственных операций при биотехнологическом производстве гентамицина сульфата. В данном случае от качества и количества посевного материала зависит как развитие культуры в биореакторе, так и биосинтез целевого продукта в целом.

При получении вегетативного посевного материала второй генерации используют вегетативный посевной материал первой генерации, в том случае, если он отвечает следующим требованиям:

- ✓ биомасса средней густоты от бежевого до розово-сиреневого цвета, при взбалтывании мицелий обволакивает стенки флакона, не оседает на дно и не расслаивается;
- ✓ при микроскопии окрашенного препарата наблюдаются микроколонины, гифы длинные или средней длины, волнистые, протоплазма базофильная, иногда в виде пунктира;
- ✓ посторонняя микрофлора отсутствует.

Выращивание вегетативного посевного материала второй генерации осуществляют в посевном аппарате (инокуляторе) методом глубинного культивирования, снабженного мешалкой, барботером для подачи воздуха, рубашкой для нагрева и охлаждения среды.

Приготовление питательной среды осуществляют непосредственно в биореакторе.

Ферментация (биосинтез гентамицина сульфата). Биосинтез гентамицина сульфата осуществляется методом периодической глубинной ферментации.

Посевной материал вносят в ферментационную среду в количестве 5–10% от ее объема. Время ферментации составляет 6–7 сут. Режимы культивирования продуцента в биореакторе изменяют в процессе роста мицелия (табл. 1).

Таблица 1

Режимы культивирования продуцента гентамицина сульфата

Регулируемые показатели	Продолжительность культивирования, ч		
	0 – 24	24 – 96	96 – до слива
Температура, °С	37±1	33±1	33±1
Расход воздуха на аэрацию, дм <sup>3</sup> /мин.	75	105	75
Частота вращения мешалки, об./мин.	3,5	4,16	35

Изменение режима аэрации в биореакторе осуществляют с учетом массообменных характеристик аппаратов по сульфитному числу.

Давление в процессе биосинтеза поддерживается в пределах 0,05–0,2 кгс/см<sup>2</sup>.

При вспенивании культуральной жидкости в биореактор вводят стерильный пеногаситель.

## Постферментационная обработка

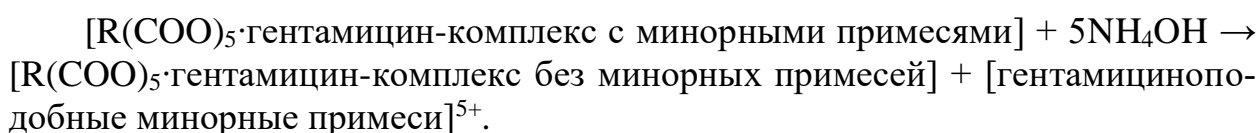
Предварительная обработка и ультрафильтрация культуральной жидкости. Культуральную жидкость из биореактора выгружают в приемную емкость, включают насос на перемешивание и проводят предварительную обработку за счет последовательного введения реагентов (растворы щавелевой кислоты и цетилперидиний бромид) для коагуляции белков и удаления поливалентных металлов.

При ультрафильтрации культуральной жидкости происходит одновременное концентрирование растворов высокомолекулярных соединений (ВМС), в том числе и антибиотиков, и их очистка от низкомолекулярных примесей путем пропускания данного раствора через мембрану.

Сорбция гентамицина на катионите КБ-2 в аммонийной форме и десорбция. Процесс выделения и очистки гентамицина сульфата на катионите КБ-2 включает следующие операции: сорбцию из раствора, вымывание минорных компонентов и десорбцию целевого продукта.

Для сорбции гентамицина его нативный раствор из сборной емкости подают с помощью насоса снизу вверх на ионообменную колонку, заполненную катионитом КБ-2 в аммонийной форме.

В колонке десорбции осуществляют химическую очистку (удаление гентамициноподобных и окрашивающих примесей) и десорбцию гентамицина сульфата. Вымывание минорных компонентов примесей проводят 0,043N раствором аммиака, пропуская его через слой катионита в ионообменной колонке сверху вниз:



Десорбцию гентамицина сульфата проводят 5% раствором аммиака, пропуская его через колонку с катионитом сверху вниз.

Получение концентрата гентамицина. Полученный элюат гентамицина сульфата упаривают на роторном испарителе при температуре 50–55 °С и давлении 0,085 МПа для удаления аммиака и концентрирования гентамицина до 60000–70000 мкг/см<sup>2</sup>.

Осветление концентрата гентамицина основания углем и перевод его в сульфат форму. Очищенный и сконцентрированный гентамицина основание помещают в колбу, подкисляют раствором 20% серной кислоты до значения рН 6–6,5, добавляют уголь активированный (7% от объема концентрата) и нагревают до температуры 40–45 °С в течение 30 мин. при постоянном перемешивании, затем уголь отфильтровывают.

Распылительная сушка водных растворов гентамицина сульфата. Распылительную сушку осветленного концентрата гентамицина сульфата проводят с помощью сушилки, предназначенной для распылительного обезвоживания растворов в асептических условиях. В данном случае осушителем является очищенный воздух. Перед началом работы все детали сушильной камеры моют, обрабатывают дезинфицирующим средством и высушивают горячим воздухом при температуре 108 °С. Затем устанавливают значения температур воздуха-теплоносителя на входе – 175–185 °С и на выходе из сушильной камеры – 103–105 °С. Раствор антибиотика, подаваемый в сушильную камеру, распыляется в токе нагретого воздуха до мелких капель.

Фасовка, упаковка и маркировка лекарственного препарата гентамицина сульфата. Загрузку, выгрузку лекарственного препарата антибиотика из сушилки, а также его фасовку проводят в помещениях, в которых поддерживаются асептические условия.

В данном случае фасовка осуществляется в ламинарном боксе. Порошок гентамицина сульфата переносят из приемной тары распылительной сушилки во флаконы из оранжевого стекла с винтовой горловиной и навинчивающейся крышкой.

На каждый флакон наклеивают этикетку, на которой указывают министерство, предприятие-изготовитель, его товарный знак, название лекарственного препарата, активность в 1 мг, содержание действующего вещества в млрд. ЕД, массу нетто, регистрационный номер, номер серии, срок годности, условия хранения (при комнатной температуре, в темном сухом месте).