

Антибиотики как биотехнологические продукты

Общая характеристика антибиотиков

- Термин «антибиотик» был предложен в 1942 г. Зельман Абрахам Ваксман для обозначения веществ, образуемых микроорганизмами и обладающих антимикробным действием. Разработка и производство антибиотиков активно началась в конце XIX века. Первым антибиотиком, выпущенным в промышленное производство, стал сальварсан (1910 год).
- Антибиотики – это группа высокоэффективных биологически активных веществ, которые синтезируются микроорганизмами и способны убивать или подавлять рост живых клеток.
- В настоящее время под антибиотиками понимают химиотерапевтические вещества, полученные из микроорганизмов или иных природных источников, а также их полусинтетические аналоги и производные, обладающие способностью избирательно подавлять в организме возбудителей заболеваний и (или) задерживать развитие злокачественных новообразований.

- Антибиотики являются вторичными метаболитами - средствами преодоления стрессовых ситуаций для продуцента
- Предназначены для уничтожения микроорганизмов, конкурирующих с продуцентом за питательные вещества
- биосинтез антибиотиков фазоспецифичен и происходит по завершении роста биомассы.
- кривая накопления биомассы продуцента и кривая накопления антибиотика в культуральной жидкости не совпадают по времени,
- кривая образования вторичного метаболита значительно запаздывает.

- Антибиотики являются «средством преодоления стрессовых ситуаций» для м/о. Антибиотики для почвенных м/о являются не только средствами борьбы, они также являются низкомолекулярными «эффе́кторами» м/о; с их помощью м/о меняет свой метаболизм при неблагоприятных условиях (например, спорообразование).
- Каждый антибиотик - это конечный продукт длинной цепи специфических ферментативных реакций превращения первичных метаболитов в антибиотическую структуру.

Классификация антибиотиков

- По характеру воздействия на бактериальную клетку антибиотики можно разделить на три группы:
- бактериостатические (бактерии живы, но не в состоянии размножаться),
- бактерициды (бактерии умертвляются, но физически продолжают присутствовать в среде),
- бактериолитические (бактерии умертвляются, и бактериальные клеточные стенки разрушаются).

- **По механизму биологического действия** антибиотики делятся:
- 1. Антибиотики, ингибирующие синтез бактериальной стенки (пенициллины, цефалоспорины, бацитрацин, ванкомицин).
- 2. Антибиотики, нарушающие функционирование цитоплазматической мембраны (полипептиды, полиены, грамицидин).
- 3. Антибиотики, разрушающие рибосомальные субчастицы и сдерживающие синтез белка (тетрациклины, хлормицетины, аминогликозиды, макролиды).
- 4. Антибиотики, избирательно подавляющие синтез нуклеиновых кислот:
 - - ингибиторы синтеза РНК (актиномицин, гризеофульвин, канамицин, неомицин, новобиоцин и др.);
 - - ингибиторы синтеза ДНК (брунеомицин, саркомицин).

В зависимости от химической природы антибиотики делят на:

- -лактамы (пенициллины, цефалоспорины);
- -тетрациклины (тетрациклин, морфоциклин, метациклин);
- -макролиды (эритромицин);
- -аминогликозиды (гентамицин);
- -гликопептиды (ванкомицин);
- -амфениколы (левомицетин);
- -линкосамиды (линкомицин);
- -полиеновые (противогрибковые –нистатин);
- -противоопухолевые (блеомицин) и др.

Классификация антибиотиков по штаммам-продуцентам:

- В зависимости от продуцирующих организмов антибиотики могут быть разделены на следующие группы:
- 1. Образуемые эубактериями:
 - бактериями рода *Bacillus*: грамицидины, полимиксины и др.;
 - бактериями рода *Pseudomonas*: мупироцин, пиоцианин, антифунгин и др.;
 - бактериями других родов (*Micrococcus*, *Streptococcus*, *Escherichia*, *Proteus*): низин, колиформин и др.
- 2. Образуемые бактериями рода *Streptomyces*: стрептомицин, тетрациклин, новобиоцин и др.
- 3. Образуемые несовершенными грибами: пенициллин, гризеофульвин и др.
- 4. Образуемые грибами классов базидио- и аскомицетов: термофиллин, лензитин, хетомин и др.
- 5. Образуемые лишайниками, водорослями, низшими растениями:
 - усниновая кислота и др.
- 6. Образуемые высшими растениями: аллицин, рафанин и др.
- 7. Образующиеся в организмах животных: лизоцим, интерферон, круцин и др.

Продуценты антибиотиков

- В качестве продуцентов антибиотиков используются **микроорганизмы, плесневые грибы, актиномицеты, высшие растения и ткани животных.**
- Микроорганизмы одного вида могут синтезировать антибиотики различной природы и, наоборот, один и тот же антибиотик могут продуцировать микроорганизмы различных таксономических групп.
- Из эубактерий наиболее часто продуцентами являются представители родов *Bacillus* и *Pseudomonas* (около 400–600), причем большинство антибиотиков бактериального происхождения – полипептиды.

Микроорганизмы – продуценты антибиотиков.

- **Актиномицеты – это многоклеточные бактерии.** Актиномицеты не имеют ядра (вместо ядра имеется одна замкнутая нить ДНК), т.е. актиномицеты – прокариоты, не имеют митохондрий, имеют сложный цикл развития.
- Всего имеется 12 тысяч природных антибиотиков, из них 9 тысяч антибиотиков продуцируют актиномицеты.
- **Актиномицеты продуцируют следующие группы антибиотиков:** (не менее 50 % из всех известных),
- **-канамицин** - *Actinomyces kanamycetus*
- **-неомицин** - *Actinomyces iracie*
- **-окситетрациклин** – *Actinomyces ninesus*
- **- линкомицин** – *Streptomyces linconiensis*
- Природный левомецетин (хлорамфеникол) продуцируется *Streptomyces venezuelae*.
- **Рифамицин** – *Streptomyces mediterranei*, на основе рифамицина получен рифампицин.

Мицелиальные грибы, продуцирующие бета-лактамы антибиотики.

- мицелиальные грибы продуцируют (около 10 %) антибиотиков:
- Пенициллины – *Penicillium chrysogenum*, *P. notatum* цефалоспорины *Cephalosporium acremonium chrysogenum* являются известными представителями бета-лактамовых антибиотиков, продуцирующимися мицелиальными грибами. В структуре антибиотика имеется бета-лактамовое кольцо, обладающее способностью ингибирования синтеза пептидогликанов клеточной стенки. Антибиотики используются в лечении инфекций, вызванных грам(-) бактериями.
- **Фторхинолоны – синтетические антибиотики.** Обладают широким спектром антимикробного действия. Некоторые фторхинолоны обладают не только антибактериальной, и но и противоопухолевой, анти-ВИЧ-активностью.

- **Антибиотики животного происхождения.** Экмолин, выделенный из осетровых рыб, эритрин – из эритроцитов, лизоцим и интерферон – обладающие антимикробным и противовирусным действиями.
- **Антибиотики, продуцируемые высшими растениями - фитонциды.** Это аллицин из чеснока – *Allium sativum*, иманин из зверобоя, сальван из шалфея, рафанин из редиса - *Raphanus sativum*, фазеолин из фасоли - *Phaseolus vulgaris* и другие

Значение антибиотиков для сельского хозяйства:

- 1. Антибиотики применяются для лечения животных и птиц;
- 2. Кормовые антибиотики используются для кормления животных и птиц.
- 3. Применяются антибиотики в растениеводстве для борьбы с болезнями растений, антибиотики используются в качестве гербицидов, инсектицидов и имеют ряд преимуществ перед химическими препаратами.
- 4. Антибиотики применяются также в пищевой промышленности для консервирования продуктов питания, для сохранения свежего мяса, молока, рыбы и т.д.

- Из большого числа антибиотиков, испытанных с целью применения для борьбы с различными заболеваниями растений, наибольший эффект наблюдается при использовании **стрептомицина, гризеофульфина, циклогексамида** и некоторых других.
- *Стрептомицин* используется для борьбы с возбудителями, вызывающими бактериальное увядание фасоли и сои; болезнями косточковых (в США); хлопка, риса (в Индии). В некоторых странах выпускают препараты стрептомицина с окситетрациклином, известные как «агримицин», «фитомицин», «фитостреп».
- *Биалофос* – гербицид, полученный в начале 1980-х годов из культуры *S. hydroscopicus*. По своей структуре представляет трипептид, состоящий из двух остатков L-аланина и L-глутаминовой кислоты.
- Антибиотики широко используются в животноводстве как лечебные средства против заболеваний сельскохозяйственных животных, птиц и пчел. Среди наиболее распространенных антибиотиков можно отметить **авермектины**, используемые для подавления развития паразитов, в том числе нематод; **монензин** для лечения кокцидоза домашней птицы; **линкомицин** для лечения дизентерии; **новобиоцин** для лечения холеры индеек.

Применение антибиотиков в пищевой промышленности хозяйства

- Первые сведения об использовании антибиотиков в консервной промышленности относятся к 1943 году. К таким антибиотикам относятся **субтилин**, **низин** и др.
- Так, для консервирования овощей предложено использовать **субтилин**, под действием которого наблюдается гибель клостридиальных и термофильных бактерий.
- Низин – антибиотик, образуемый молочнокислыми бактериями, используется при консервировании не только овощей (томаты, зеленый горошек, цветная капуста), но и рыбы, молока, сыров и др. Антибиотик подавляет развитие ряда термофильных спорообразующих бактерий, не оказывая токсического действия на организм человека.

Методы получения антибиотиков:

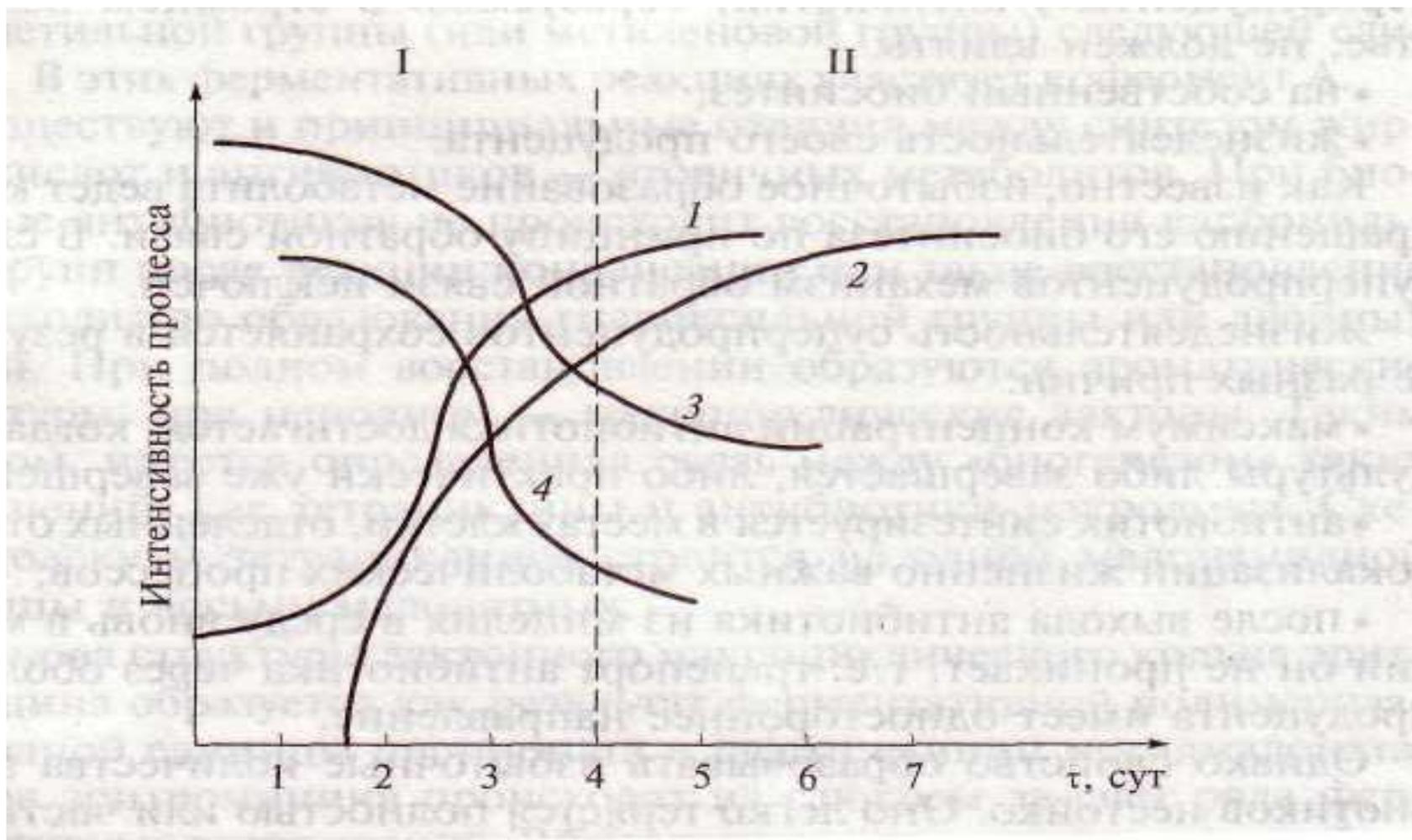
- 1. **Химический синтез.** С помощью этого метода получают основные синтетические антибиотики.
- 2. **Биосинтез** (прямая ферментация микроорганизма – продуцента). Для получения антибиотиков этим способом используют штаммы микроорганизмов, образующие наибольшее количество антибиотика.
- 3. **Мутационный биосинтез** (мутасинтез). Биосинтез антибиотиков с применением блокированных мутантов, у которых отсутствует или блокировано определенное звено в цепи реакций, ведущих к синтезу антибиотиков. Блокированные мутанты не способны образовывать нужный антибиотик. Используя низкую субстратную специфичность ферментов вторичного метаболизма и вводя аналоги предшественников антибиотиков, последние переводят в аналоги самого антибиотика в ходе процесса мутасинтеза.

рДНК-биотехнологии в создании антибиотиков

- 4. **рДНК-биотехнологии** - создание высокоактивных штаммов продуцентов антибиотиков.
- С помощью **рДНК** можно создавать новые антибиотики с уникальной структурой, оказывающие мощное воздействие на определенные микроорганизмы, обладающие минимальными побочными эффектами.

Биосинтез вторичных метаболитов

- Процесс развития микроорганизмов продуцентов вторичных метаболитов носит двухфазный характер:
- *первая фаза развития (тропофаза или фаза сбалансированного роста)* характеризуется тем, что в культуре продуцента антибиотика происходит быстрое накопление биомассы. Биосинтез антибиотика в этот период не происходит или осуществляется в незначительном количестве. Эта фаза должна быть быстрой, а питательная среда – дешевой.
- *вторая фаза (идиофаза или фаза несбалансированного роста)* - во время идиофазы рост биомассы замедляется и происходит быстрое накопление антибиотика в культуральной жидкости.



1- трофофаза, II-идиофаза, 1- биомасса, 2 – антибиотик, 3-углеводы, 4 – источник азота

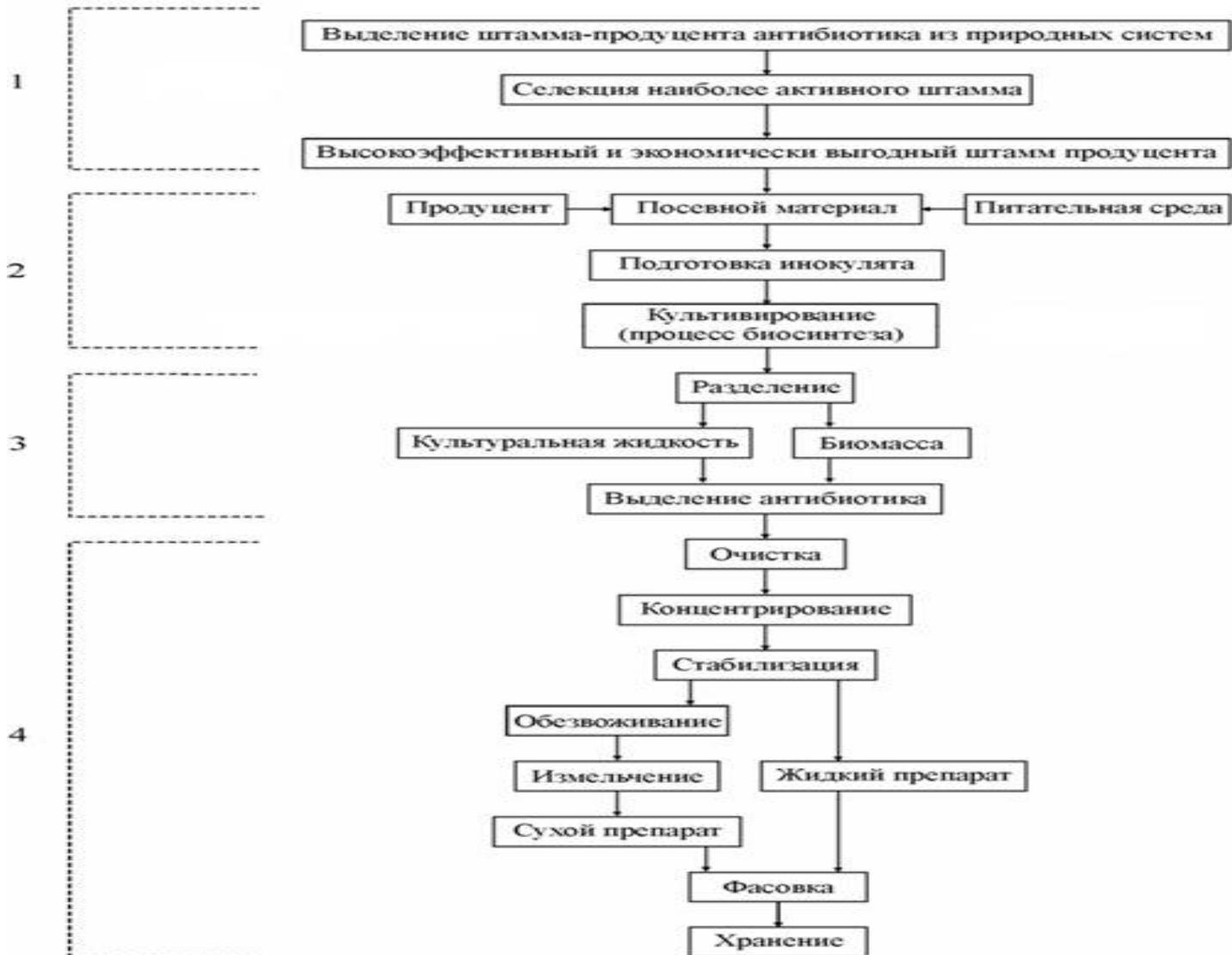
Схема промышленного биотехнологического производства антибиотиков

- **1.** получение соответствующего штамма — продуцента антибиотика, пригодного для промышленного производства;
- **2. подготовка питательной среды:** в технологии получения антибиотиков применяют *твердые питательные среды* – агаризованные или сыпучие субстраты (пшено, ячмень, пшеничные отруби и т.п.) и жидкие питательные среды.
- **3. Подготовка посевного материала** (продуценты-мутанты → колба на качалке → первый инокулятор (10 л) → второй инокулятор (100–500 л) → ферментер).

- **4. Ферментация:** для получения антибиотиков используют **методы поверхностного и глубинного культивирования.**
 - В ходе ферментации культура непрерывно аэрируется стерильным подогретым воздухом. Процесс ферментации осуществляется в строго стерильной глубинной аэробной периодической культуре, носит выраженный двухфазный характер. Температура среды, рН и ряд др. параметров автоматически *регулируются в соответствии с регламентом производства антибиотика.* Антибиотики получают при *глубинной аэробной ферментации периодического действия в асептических условиях. Период ферментации длится 7-10 суток.*
- 5. Выделение антибиотиков.** Если антибиотик находится в клетках, на первом этапе обработки биомассу выделяют из культуральной жидкости (фильтрацией или центрифугированием); после разрушения клеток антибиотик экстрагируют и переводят в растворимую фазу. Затем данный раствор и культуральные среды (если антибиотик выделяется из клеток в среду) подвергают разным методам экстракции, разделения, очистки и концентрирования для получения готового продукта.

- **6. Очистка антибиотиков.** включает стадии: *осаждение, сорбцию, сушку.* Затем препарат фасуют в стерильные флаконы с соблюдением условий, гарантирующих стерильность.
- **7. Получение готового продукта:** Готовый продукт подвергается биологическому и фармакологическому контролю. ***Биологический контроль определяет степень стерильности препарата.*** При фармакологическом контроле проводят всесторонние испытания препарата ***на токсичность, пирогенность, токсикогенность и др.,*** оценивают антимикробный спектр препарата, действие на лейкоциты крови, устанавливают максимально переносимую дозу антибиотика, дозы, вызывающие полную и 50 % гибель экспериментальных животных.
- Готовая форма лекарственного препарата антибиотического вещества поступает к потребителю с указанием биологической активности и даты выпуска.

Схема производства антибиотиков в процессе микробного биосинтеза



Питательной среды

- Для каждого продуцента разрабатывается оптимальная среда, которая должна соответствовать определенным требованиям:
- а) обеспечивать максимальный выход антибиотика;
- б) состоять из относительно дешевых компонентов;
- в) иметь хорошую фильтрующую способность;
- г) обеспечивать применение наиболее экономичных приемов для выделения и очистки антибиотиков.
- Используются следующие среды:
- **мясопептонная среда**, в состав которой одновременно с мясным экстрактом и пептоном входят хлорид натрия, фосфат калия, иногда глюкоза или сахароза; используется обычно в лабораторной практике;
- **картофельные среды с глюкозой и пептоном**, часто используемые в лаборатории для культивирования многих видов актиномицетов и бактерий;
- **среды с кукурузным экстрактом, соевой мукой, бардой и другими веществами**, в состав которых входят сульфат аммония, карбонат кальция, фосфаты, глюкоза, сахароза, лактоза или иные углеводы и ряд других соединений; среды успешно применяются в промышленности, т. к. являются дешевыми и обеспечивают хорошее развитие микроорганизмов с высоким выходом антибиотиков.

- Большинство сапрофитных бактерий хорошо развивается на богатых по составу натуральных средах (мясопептонный агар, картофельный агар, сусло-агар и др.) при рН около 7,0 и температуре 30–37 °С. В этих же условиях развиваются актиномицеты и некоторые грибы, но для них они менее благоприятны, чем для бактерий.
- Значение рН среды после стерилизации устанавливается в пределах 6,8–7,1.
- Мицелиальные грибы предпочтительнее развиваются на средах с несколько пониженным значением рН (4,5–5,0), на которых плохо растут многие бактерии и актиномицеты.
- Стерилизация питательных сред в промышленных условиях достигается в результате:
 - периодического метода для небольших объемов среды, при котором среда нагревается до 120–130 °С непосредственно в ферментере и выдерживается в течение определенного времени;
 - непрерывного метода для значительных объемов, при котором приготовленная среда подается в стерилизационную колонку, через которую пропускают острый пар. Нагретая до необходимой температуры среда поступает в специальный аппарат, где выдерживается определенное время.

- Источниками минерального питания служат **фосфор, сера и другие макро- и микроэлементы.**
- Продуценты антибиотиков по отношению к концентрации фосфора в среде можно разделить на три группы:
- - высокочувствительные продуценты, для которых оптимальная концентрация фосфора в среде составляет менее 0,01 % (продуценты нистатина, тетрациклинов, флоримицина, ванкомицина);
- - продуценты средней чувствительности, для которых оптимальная концентрация фосфора составляет 0,010–0,015 % (продуценты стрептомицина, эритромицина, циклосерина, неомицина);
- - малочувствительные продуценты, для которых оптимальная концентрация фосфора составляет 0,018–0,020 % (продуценты новобиоцина, грамицидина, олеандомицина).

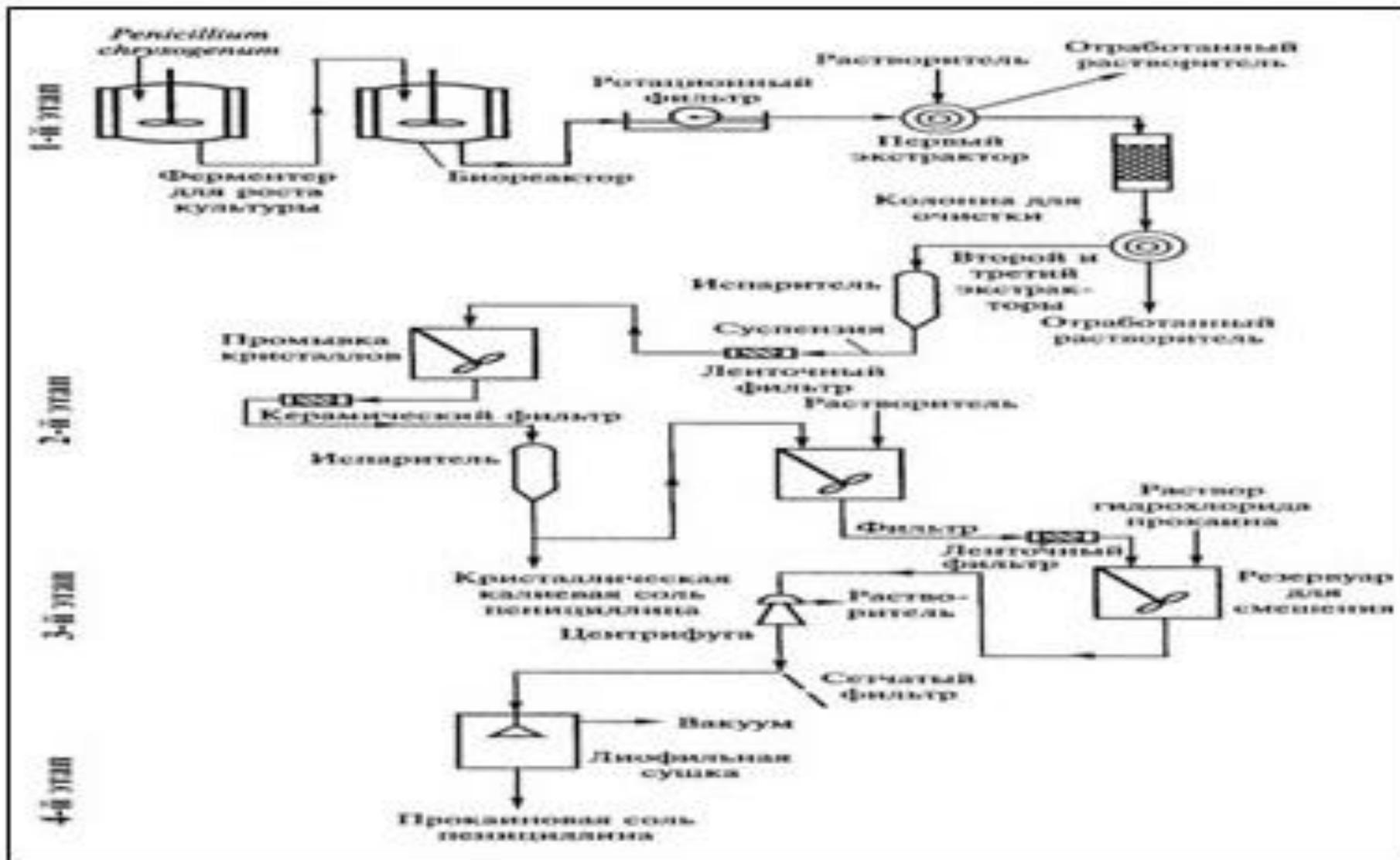
- **Влияние pH среды.** Многие бактериальные организмы, синтезирующие антибиотики, лучше развиваются при pH около 7,0, хотя некоторые, например молочнокислые стрептококки, продуцирующие низин, лучше развиваются в среде при pH = 5,5÷6,0. Большинство актиномицетов хорошо развиваются при начальных значениях pH среды в пределах от 6,7 до 7,8; в большинстве случаев жизнеспособность актиномицетов при pH ниже 4,0–4,5 подавлена.
- **Температура.** Для большинства бактериальных организмов температурный оптимум развития лежит в диапазоне 30–37 °С. Для продуцента грамицидина С оптимальная температура для развития и биосинтеза равна 40 °С.
- Актиномицеты, как правило, культивируются при температуре 26–30°С, хотя некоторые виды стрептомицетов могут развиваться как при пониженных (от 0 до 18 °С), так и при повышенных (55–60 °С) температурах.
- Для большинства мицелиальных грибов оптимальная температура составляет 25–28 °С.
- **Аэрация.** Большинство изученных продуцентов антибиотиков являются аэробами. Для биосинтеза многих антибиотиков (пенициллин, стрептомицин и др.) максимальное их накопление происходит при степени аэрации, равной единице, при которой через определенный объем среды за 1 мин продувается такой же объем воздуха.
- В процессе развития продуцента антибиотика в промышленных условиях потребность организма в кислороде меняется в зависимости от стадии развития, вязкости культуральной жидкости и других факторов. На определенных стадиях могут возникнуть ситуации, связанные с кислородным голоданием продуцента. В этих условиях следует принимать дополнительные меры, например, повышение концентрации окислителя добавлением пероксида водорода.

технологический процесс получения пенициллина

- **Подготовка инокулята**
- Подготовка посевного материала включает следующие стадии:
 - 1) выращивание посевного мицелия 1-й генерации в аппаратах малой емкости (инокуляторах);
 - 2) выращивание посевного мицелия 2-й генерации в аппаратах большой емкости.

Основные биотехнологические этапы получения антибиотика:

- 1 - Экстракция, выделение и очистка антибиотиков подходящими растворителями;
- 2 - Испарение и кристаллизация сырья в специальных средах;
- 3 - Фракционирование в растворе гидрохлорида прокаина;
- 4 - Лиофильная и распылительная сушка готового пенициллина



Состав одной из сред для выращивания посевного материала.

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

Процесс ферментации

- В промышленности применяется метод глубинной ферментации, при котором культура микроорганизма выращивается в питательной среде, заполняя весь ее объем.
- Предшественниками называются вещества, непосредственно включающиеся в молекулу получаемого продукта. Предшественником бензилпенициллина является фенилуксусная кислота (ФУК) или ее производные - фенилацетамид (ФАА), фенилэтиламин, фенилацетилглицин и другие вещества. Предшественником феноксиметилпенициллина является феноксиуксусная кислота (ФОУК)

- Основными показателями, свидетельствующими об окончании ферментации, являются полное исчезновение углеводов в культуральной жидкости и прекращение биосинтеза антибиотика. Процесс ферментации в производственных условиях осуществляется при температуре $26 \pm 10^{\circ}\text{C}$ и продолжается обычно 120-125 часов.

Фильтрация

- Обычно для отделения мицелия от культуральной жидкости применяют вакуум-барабанные фильтры непрерывного действия. Фильтрацию начинают до начала автолиза мицелия, поскольку при фильтрации автолизированной культуры мицелий не образует плотной пленки на фильтрующей поверхности барабана, а налипает в виде отдельных тонких комков, которые сами не отходят в зоне «отдувки» фильтра, и их приходится удалять вручную. При этом продолжительность фильтрации увеличивается в 2 - 3 раза, выход фильтрата резко падает, а сам фильтрат получается очень мутным.
- Необходимо тщательно соблюдать условия, препятствующие разрушению пенициллина во время фильтрации, - охлаждение нативного раствора до 4-6°C и систематическая (после каждой загрузки) обработка фильтра, коммуникаций и сборников антисептиками, например хлорамином. Фильтр также должен систематически стерилизоваться острым паром.

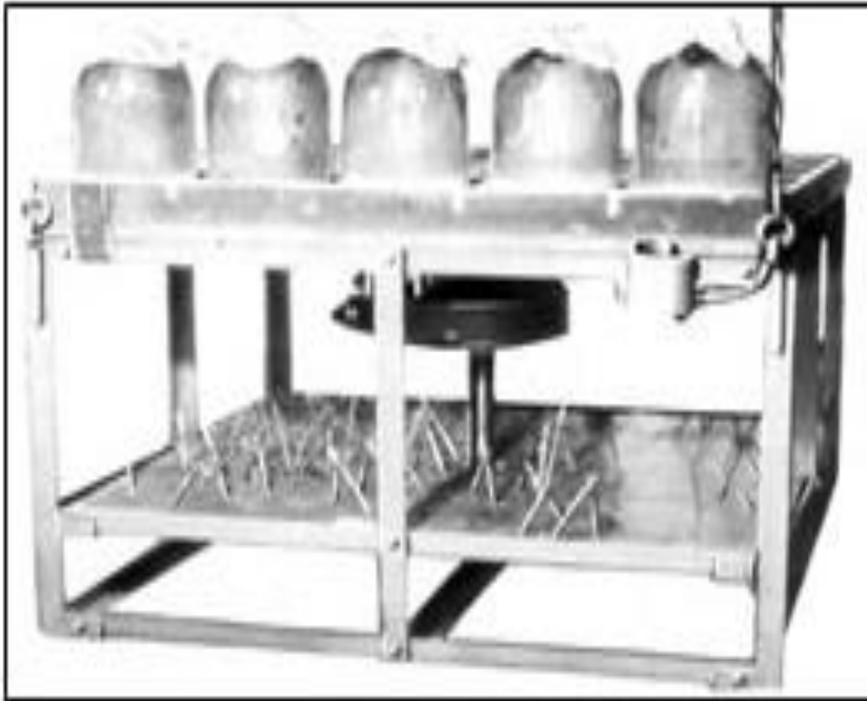
Выделение и очистка

- Процессы экстракции и реэкстракции для пенициллинов и эритромицина
- Ионообменная и адсорбционная хроматографии - для аминогликозидов
- тетрациклины - осаждение, экстракция органическими растворителями и методы ионообменной хроматографии.
- сублимационная или распылительная сушка

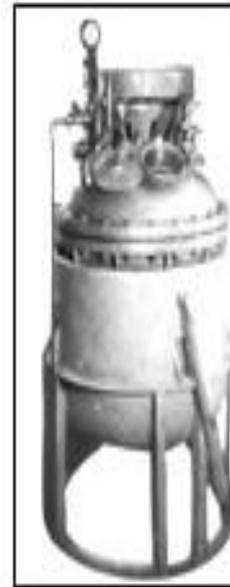
Этапы технологии производства неочищенных антибиотиков:

- 1. Посуду, инструменты, материалы стерилизуют, используя для этой цели автоклаве водяным паром в течение 30-45 минут. Наиболее эффективным способом стерилизации рабочего бокса является ультрафиолетовое облучение его бактерицидной лампой в течение 60 минут.
- 2. Для размножения гриба используют его исходную культуру, расфасованную в стеклянные флаконы. Для расплодки посевного материала производят посев грибка в колбу над пламенем спиртовой горелки. Колбы с посевным материалом ставят на специальную качалку для лучшей аэрации с целью более интенсивного роста грибка при температуре от 26 до 28° С на 18-24 ч.
- 3. Переносят посевной материал в большие бутылки и вновь помещают на качалку и подвергают встряхиванию при температуре 26-28° С в течение 18-24 ч.
- 4. Производят загрузку расплодки гриба и необходимых компонентов питательной среды в специальные реакторы для ферментации.
- При изготовлении кормового нативного антибиотика ферментация протекает 24—36 ч. Через каждые 6-12 ч из ферментатора отбирают пробу для проверки антибиотика на активность. В процессе развития грибка в ферментаторе скапливаются газообразные продукты его жизнедеятельности, которые удаляются через шланг.

- По окончании процесса ферментации антибиотиков культуральную жидкость проверяют на активность преимущественно следующими микробиологическими методами:
- **методом перпендикулярных штрихов на агаре.** Для этого вырезанную в питательной среде канавку заполняют средой с антибиотиком. Перпендикулярно канавке засевают различные виды микроорганизмов. Длина белых полосок указывает на неодинаковую чувствительность микробов к антибиотику.
- **методом бумажных дисков.** Для этого на питательную среду, засеянную микробами, накладывают диски из фильтровальной бумаги, пропитанные антибиотиком. В центре наложен диск без антибиотиков (контрольный). Вокруг диска с антибиотиками роста микроорганизмов не наблюдается (зона угнетения);
- **методом цилиндриков.** Для этого в питательную среду, засеянную бактериями, погружают стеклянные или металлические незапаянные цилиндрики, которые заполняют антибиотиками. Ширина зоны угнетения вокруг цилиндриков указывает на антимикробные свойства антибиотиков.



Аэрация посевного материала с использованием встряхивания на качалке

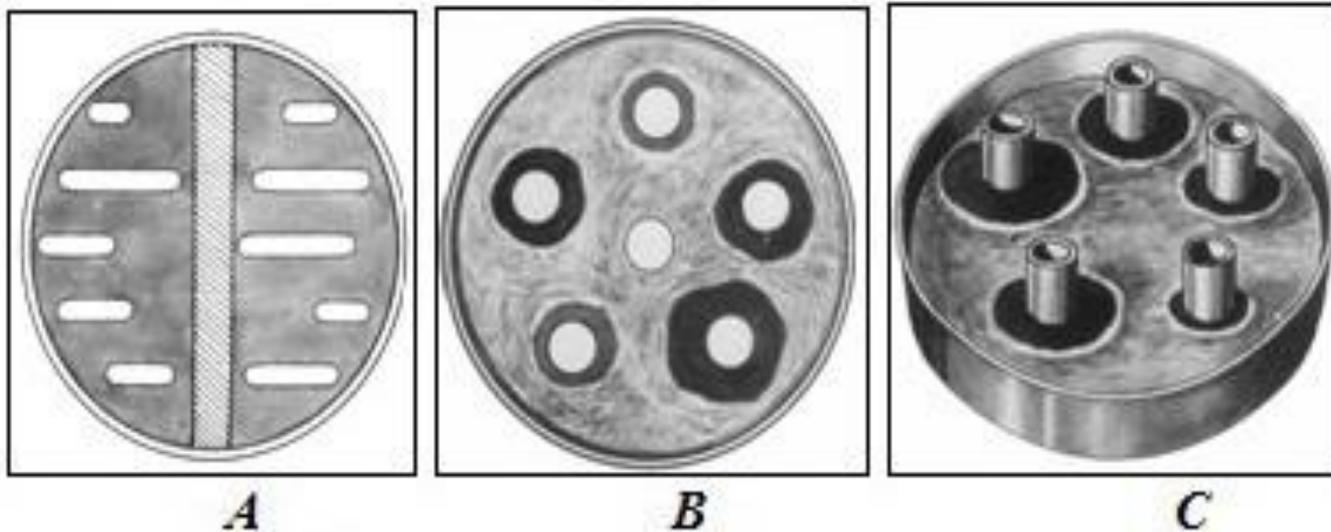


A



B

Реактор для ферментации антибиотиков (A), загрузка расплодки гриба и питательной среды (B)



Оценка антибиотиков на биологическую активность методами:
перпендикулярных штрихов (А), по бумажных дисков (В), незапаянных
цилиндриков (С)

- Что такое антибиотики?
- Характеристика метаболических путей биосинтеза антибиотиков микроорганизмами.
- Характеристика антибиотиков, продуцируемых актиномицетами.
- Характеристика антибиотиков, продуцируемых бактериями.
- Характеристика антибиотиков, продуцируемых мицелиальными грибами.
- Характеристика антибиотиков, продуцируемых животными.
- Характеристика антибиотиков, продуцируемых высшими растениями.
- Принципиальная схема выделения и очистки канамицина.
- Промышленный метод получения полусинтетических антибиотиков.
- Биологические методы анализа качества антибиотиков.
-