**КАЗАХСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ им. аль-Фараби**

**Факультет Биологии и биотехнологии**

**Кафедра биотехнологии**

**Образовательная программа по специальности «5В070100-Биотехнология»**

**Методические указания к выполнению лабораторных работ по курсу**

**АМP4309 «Антибиотики микробного происхождения»**

**Лабораторная работа №1**

**Тема:** Техника безопасности. Классификация антибиотиков.

*Цель* экспериментальной работы – Изучить правила работы в микробиологической лаборатории, основные приемы микроскопирования и приготовления микробиологических препаратов.

***Задачи*:**

1. Ознакомиться с правилами работы в микробиологической лаборатории, техникой безопасности в микробиологической лаборатории.

2. Освоить навыки микроскопирования. Изучить устройство микроскопа, основные правила микроскопирования, освоить навыки микроскопического исследования микроорганизмов.

I. КЛАССИФИКАЦИЯ АНТИБИОТИКОВ ПО БИОЛОГИЧЕСКОМУ ПРОИСХОЖДЕНИЮ

1. Антибиотики, вырабатываемые микроорганизмами, относящимися к эубактериям. 1) Образуемые представителями рода Pseudomonas: пиоцианин - Ps. aeruginosa, вискозин - Ps. viscosa. 2) Образуемые представителями родов Micrococcus, Streptococcus, Staphy/ococcus, Lactococcus, Chromobacterium, Escherichia, Proteus, Lactobacillus: стрептококцин А - Streptococcus pyogenes, эпидермин - Staphylococcus epidermidis, низин - Lactococcus lactis, продигиозин - Chromobacterium prodigiosum ( Serratia marcescens), колиформин - Е. coli, колицин - Е. coli, протаптины - Р. vulgaris, лактоцин-S - Lactobacillus sake. 3) Образуемые бактериями родов Brevi и Bacillus: грамицидины - Brevi bacillus, субтилин - Bacillus subtilis, полимиксины - В. ро!утуха. 4) Образуемые микроорганизмами, принадлежащими к порядку Actinomycetales: а) образуемые представителями рода Streptomyces: стрептомицин - S. griseus, канамицин - S. kanamyceticus, тетрациклины - S. aureofaciens, S. rimosus, новобиоцин - S. spheroides, актиномицины - S. antibloticus, цефамицины - S. lipmani, S. clavuligerus, карбапенемы - S. cattleya, S. olivaceus, клавулановая кислота - S. clavuligerus и др.; 6) вырабатываемые микроорганизмами рода Saccharopolyspora: эритромицин - Saccharopolyspora erythrae и др.; в) образуемые представителями рода Nocardia: рифамицины - N. mediterranei, ристомицин - N. fructiferi, нокардицины - N. sp.; г) образуемые родом Actinomadura: карминомицин - А. catminata и др.; д) продуцируемые родом Micromonospora: фортимицины - М. olivoasterospora, гентамицины - М. purpurea, СИЗОМИЦИН - м. inyoensis' розамицин - М. rosaria. 5) Образуемые цианобактериями: малинголид - Lyngbya majuscula.

2. Антибиотики, образуемые несовершенными грибами: пенициллины - Penicillium chrysogenum, цефалоспорины - Acremonium chrysogenum, гризеофульвин - Р. griseofulvum, трихоцетин - Trichotecium roseum, фузидиевая кислота - Fusarium coccineum, циклоспорины - Beauveria nivea, Trichoderma polyspora.

3. Антибиотики, образуемые грибами, относящимися к классам базидиомицетов и аскомицетов: термофиллин - Lenzites thermophila (базидиомицет), лензитин - Lenzites sepiaria, хетомин - Chaetomium cochloides ( аскомицет).

4. Антибиотики, образуемые лишайниками, водорослями и низшими растениями: усниновая кислота (бинан) - Usnea florida (лишайник), хлореллин - Chlorella vulgaris (водоросль).

5. Антибиотики, образуемые высшими растениями: аллицин - Allium sativum, госсипол - Gossypium hisutum, фитоалексины: пизатин - Pisum sativum (горох), фазеолин - Phaseolus vulgaris (фасоль).

6. Антибиотики животного происхождения: дефензины, скваламин, экмолин, круцин (Schizotrypanum cruzi), интерферон.

II. КЛАССИФИКАЦИЯ АНТИБИОТИКОВ ПО МЕХАНИЗМУ БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ

1. Антибиотики, ингибирующие синтез клеточной стенки (пенициллины, цефалоспорины, бацитрацин, ванкомицин, D-циклосерин).

2. Антибиотики, нарушающие функции мембран (альбомицин, аскозин, грамицидины, кандицидины, нистатин, трихомицин, эндомицин и др.).

3. Антибиотики, избирательно подавляющие синтез (обмен) нуклеиновых кислот: 1) РНК (актиномицин, гризеофульвин, канамицин, неомицин, новобиоцин, оливомицин и др.); 2) ДНК (актидион, брунеомицин, митомицины, новобиоцин, саркомицин, эдеин и др.).

4. Антибиотики - ингибиторы синтеза пуринов и пиримидинов (азасерин, декоинин, саркомицин и др.).

5. Антибиотики, подавляющие синтез белка (бацитрицин, виомицин, аминогликозиды, метимицин, эритромицин, тетрациклины, хлорамфеникол и др.).

6. Антибиотики - ингибиторы дыхания (антимицины, олигомицины, патулин, пиоцианин, усниновая кислота и др.).

7. Антибиотики - ингибиторы окислительного фосфорилирования (валиномицин, грамицидины, колицины, олигомицин, тироцидин и др.).

8. Антибиотики, обладающие антиметаболитными свойствами (пуромицин, хадацидин, D-циклосерин, ацидомицин и др.).

9. Антибиотики-иммуномодуляторы (циклоспорины, актиномицины С и D, оливомицин, брунеомицин, рубомицин, спергуалин и др.).

III. КЛАССИФИКАЦИЯ АНТИБИОТИКОВ ПО СПЕКТРУ БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ Условно все важнейшие в практическом отношении антибиотики можно разделить на несколько групп.

1. Противобактериальные антибиотики узкого спектра действия, активные преимущественно в отношении грамположительных организмов. Группа пенициллина и цефалоспорина. Биосинтетические пенициллины: бензилпенициллин и его соли (калиевая, натриевая, новокаиновая), бициллин, феноксиметилпенициллин. Полусинтетические пенициллины. Кислотоустойчивые, неактивные в отношении бета-лактамазообразующих стафилококков: пропициллин, фенетициллин. Кислотоустойчивые, активные в отношении бета-лактамазообразующих стафилококков: оксациллин, клоксациллин, диклоксациллин. Полусинтетические цефалоспорины: цефалоридин, цефалотин, цефалоглицин, цефалексин. Бацитрацин. Ванкомицин, ристомицин. Линкомицин. Новобиоцин. Макролиды: эритромицин, олеандомицин, карбомицин, спирамицин, лейкомицин, тилозин. Фузидин.

2. Противобактериальные антибиотики широкого спектра действия. Тетрациклины биосинтетические: хлортетрациклин, окситетрациклин, тетрациклин, деметилхлортетрациклин, деметилтетрациклин. Гlолусинтетические тетрациклины: метациклин, доксициклин, моноциклин. Хлорамфеникол (левомицетин). Аминогликозиды: стрептомицин, неомицины, канамицин, гентамицин, фортимицины, тобрамицин. Полимиксины, колистин. Грамицидин С. Полусинтетические пенициллины: ампициллин, карбенициллин.

3. Противотуберкулезные антибиотики. Стрептомицин, канамицин, виомицин, циклосерин.

4. Противогрибные антибиотики. Нистатин. Гризеофульвин. Амфотерицин В. Леворин. Кандицин. Трихотецин.

5. Противоопухолевые антибиотики. Актиномицин С. Митомицин С. Оливомицин. Брунеомицин. Реумицин. Адриамицин (доксорубицин). Дауномицин, рубомицины.

6. Противоамебные и противомалярийные антибиотики. Фумагиллин. Радицикол.

IV. КЛАССИФИКАЦИЯ АНТИБИОТИКОВ ПО ИХ ХИМИЧЕСКОМУ СТРОЕНИЮ

**Лабораторная работа №2**

**Тема:** Условия, необходимые для проявления микроорганизмами антибиотических свойств при лабораторном культивировании

**Задачи:**

1. Среды для культивирования микроорганизмов (натуральные среды, синтетические среды, качественная характеристика компонентов среды).
2. Источники азота, источники углерода, количественное соотношение источников углерода и азота в среде, сточники минерального питания и их роль в развитии микроорганизмов, макроэлементы и их значение в жизнедеятельности микроорганизмов, роль галогенов в образовании антибиотиков, влияние рН среды. температура, аэрация,

Условия, необходимые для проявления микроорганизмами антибиотических свойств при лабораторном культивировании Микроорганизмы, выделенные из естественных мест обитания и культивируемые затем в лабораториях, попадают, как правило, в не свойственные им условия существования. В лабораториях большинство микроорганизмов поддерживается и изучается в виде чистых культур. В таком состоянии микробы в природе никогда не встречаются. Например, в почве микроорганизмы развиваются зонами, микроколониями, в окружении организмов других видов. Многие клетки микробов адсорбируются почвенными частицами, находятся в иммобилизованном состоянии, приобретая при этом свойства, отличные от свободноживущих клеток. Отличие состоит и в том, что при культивировании организмов в виде чистых культур исключается возможность влияния на них других организмов, не проявляется благоприятное или, наоборот, вредное действие продуктов жизнедеятельности других организмов, продуктов распада отмерших клеток других видов и т.п. При лабораторном культивировании микроорганизмов создаются исключительно благоприятные условия: оптимальные температура развития, влажность, кислотность среды и другие условия, которых в естественных местах обитания организм обычно не имеет. Организмы, вьщеленные из природы и перенесенные в лабораторные условия, - это, по выражению С.Н. Виноградского, «одомашненные, тепличные организмы». При культивировании микроорганизмов в лабораториях обычно имеет место массовое развитие их в ограниченном простр.анстве. Все это способствует тому, что физиологическая деятельность микроорганизмов, находящихся в таких условиях, значительно отличается от их деятельности при развитии, например, в почве. Приведенные примеры показывают, что при лабораторном культивировании микроорганизмов на проявление их антибиотических свойств могут влиять совершенно иные факторы, другие закономерности по сравнению с теми, которые имеют место в природе. Условия, искусственно создаваемые для развития организмов, можно легко контролировать, что позволяет определять роль и влияние отдельных факторов на рост и развитие изучаемого микроба и проявление им различных биохимических, в том числе и антибиотических, свойств. К числу наиболее существенных факторов, оказывающих влияние на проявление антибиотических свойств микроорганизмов, вьщеленных из природных источников, относятся состав среды, ее активная кислотность, окислительно- восстановительные условия, температура культивирования, методы совместного выращивания двух или большего числа видов микроорганизмов и т.д., иными словами, весь сложный комплекс условий культивирования микроорганизмов. Антибиотическая активность у штаммов стрептомицетов, не проявивших ее в обычных условиях лабораторного культивирования, может быть обнаружена в результате активации так называемых «молчащих» генов в процессе обработки указанных штаммов мутагенами. При этой обработке возникают мутанты, у которых может происходить экспрессия молчащих генов, ответственных за биосинтез антибиотика, и такие мутанты начинают синтезировать антибиотические вещества.

**СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ** Выяснение характера определенного физиолого-биохимического процесса, осуществляемого микроорганизмом, возможно только при тщательном подборе соответствующих питательных сред. При этом нельзя иметь какие-то универсальные среды, пригодные для изучения любого явления или всех закономерностей, связанных с развитием микроорганизма.

**ВЛИЯНИЕ рН СРЕДЫ** Активная кислотность (рН) среды существенно влияет на развитие микроорганизмов, на характер их обмена и, следовательно, на процесс образования антибиотиков. Это может быть как непосредственное влияние ионов водорода или гидроксильных ионов на клетку, так и косвенное воздействие через изменение степени диссоциации веществ субстрата. Изменения рН среды заметно сказываются на активности ферментов микроорганизмов, состоянии промежуточных продуктов, их диссоциации, растворимости и т.д. Таким образом, изменение активной кислотности среды значительно воздействует на выход конечных продуктов метаболизма микроорганизмов. Перед посевом микроорганизма необходимо в первую очередь проверить значение рН среды.

**Лабораторная работа №3**

**Тема:** Роль отдельных антибиотиков в жизнедеятельности собственных продуцентов.

**Задачи:**

1. Значение антибиотиков в жизнедеятельности собственных продуцентов? Рассмотрение на примере отдельных антибиотиков.

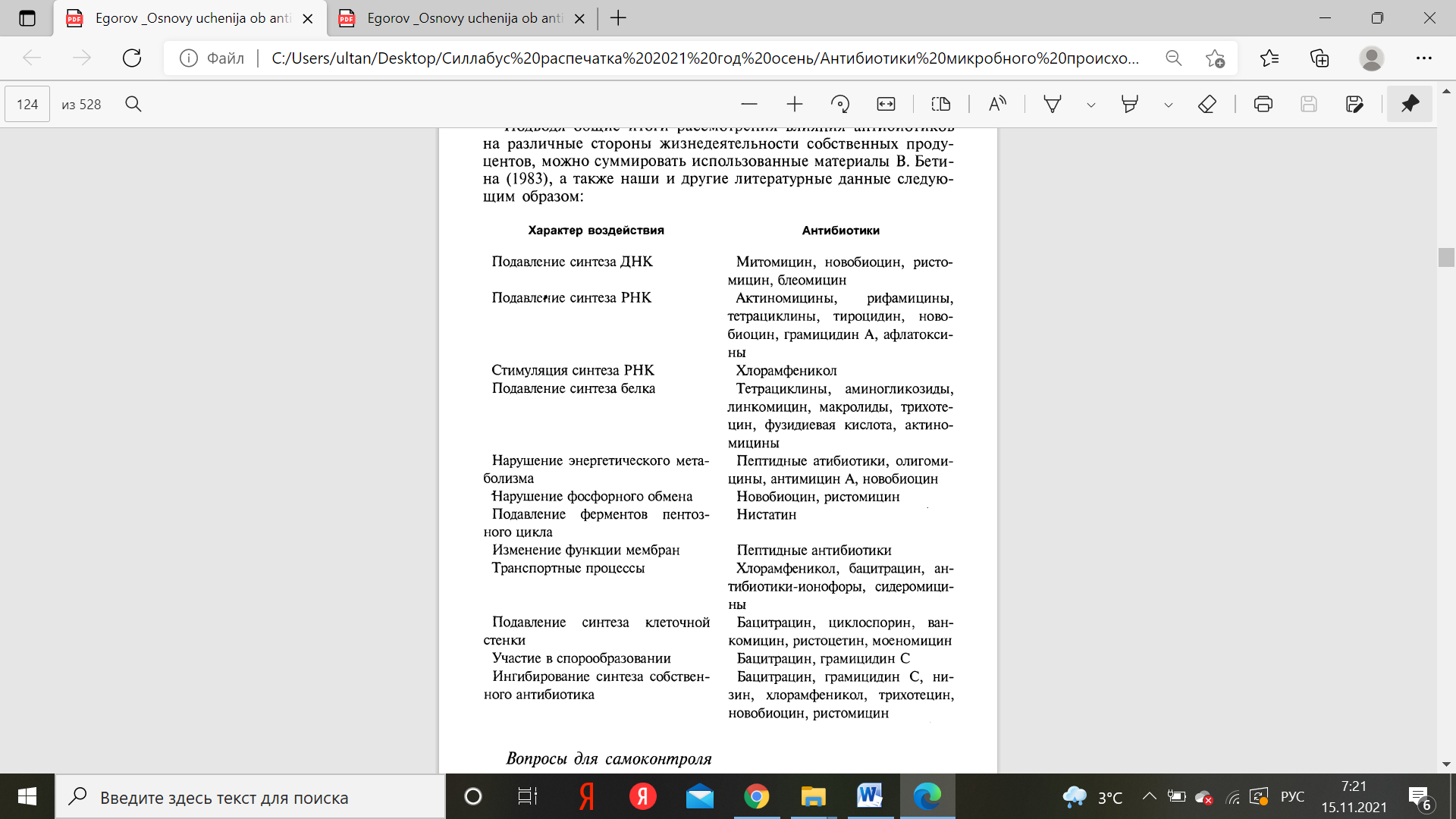
2. Методы изучения влияние антибиотика на собственный продуцент?

3. Основные механизмы защиты продуцента от действия собственных антибиотиков?

**Низин.** При засеве свежей питательной среды культурой Lactococcus lactis вместе с посевным материалом вносят и низин. Отмечено, что общее количество низина (внутриклеточного и содержащегося в культуральной жидкости) в процессе развития бактерий снижается и к концу периода лаг-фазы клетки стрептококка практически не содержат его. Синтез низина происходит после экспоненциального роста бактерий в период ранней стационарной фазы. Снижение концентрации антибиотика в указанный период развития бактерий обусловлено изменением третичной структуры или степени полимеризации антибиотика. Однако не следует исключать в процессе инактивации низина и участие определенных энзиматических систем типа низиназ, так как количество низина уменьшается как в клетках стрептококка, так и в культуральной жидкости. Есть указания на то, что некоторые штаммы бактерий способны разрушать этот антибиотик. Длительность лаг-фазы клеток, взятых в качестве посевного материала в разные периоды их развития, зависит от количества внутриклеточного низина: чем меньше клетки стрептококка содержат антибиотика, тем короче лаг-фаза, и наоборот - с увеличением внутриклеточного низина наблюдается удлинение лагфазы роста бактерий. Снижение общего количества низина в лаг-период развития L. lactis и синтез антибиотика в более поздний период роста подтверждают значение низина как важной части бактериального ростового цикла стрептококка. По-видимому, низин связан с контролирующим механизмом, который не оказывает влияния на скорость роста продуцента антибиотика, но задерживает начало роста новых клеток. Низин в концентрации 1500 и 2000 ед. R/мл среды (37 и 50 мкг/мл) в течение первых двух суток снижает рост биомассы L. lactis в 2,5 и 4 раза соответственно. При этом значительно снижается и биосинтез антибиотика. В средах, содержащих недостаточное для нормального развития количество азота (1-2 мг% NH2 при норме 29 мг%), рост стрептококка и образование антибиотика сильно снижаются. Добавление в этих условиях к среде низина способствует увеличению роста биомассы L. lactis и некоторому повышению выработки антибиотика. Этот факт дает основание предполагать, что в условиях недостатка азота в среде и добавления к ней низина последний потребляется стрептококком как источник азота. Полипептидные антибиотики могут подавлять рост организмов - продуцентов этих биологически активных веществ в тех концентрациях, которые образуются в процессе развития организмов. По-видимому, эти антибиотики выполняют регуляторную функцию в процессе перехода вегетативных клеток в споры, влияя на ДНК-репликацию, синтез клеточной стенки, функцию мембран и другие процессы. У продуцента тироцидина В. bacillus АТСС 8185 ферменты, участвующие в его биосинтезе, обнаруживаются в экспоненциальной фазе развития бактерий, а в стационарной фазе их количество резко снижается. При формировании спор основная часть тироцидинсинтезирующей активности фермента обнаруживается в проспорах В. bacillus, куда фермент переходит из цитоплазмы вегетативных клеток. Это указывает на то, что тироцидин участвует в процессах превращения вегетативных клеток в споры. Высказано предположение (Katz, Demain, 1977), что процессы спорообразования и синтеза антибиотиков независимы друг от друга, но регулируются общими или близкими механизмами, что и определяет их тесную взаимосвязь. Эта интересная гипотеза нуждается, однако, в экспериментальном подтверждении.

**Актиномицины.** Добавление актиномицина к среде одновременно с засевом ее стрептомицетом - продуцентом этого антибиотика - подавляет рост стрептомицета в первые 24 ч. В концентрации 4,2 мкг/мл среды антибиотик подавляет рост стрептомицета на 50%, а в концентрации 50 мкг/мл полностью угнетает развитие S. antibloticus. Активно развивающийся мицелий актиномицета (в возрасте до 20-22 ч) наиболее чувствителен к актиномицину. Антибиотик ингибирует включение в белки ряда аминокислот: L-пролина, L-валина, DL-триптофана, L-треонина и др. 24-часовой мицелий стрептомицета способен осуществлять биосинтез актиномицина, но менее чувствителен к антибиотику, а на 48-часовой мицелий актиномицин не оказывает заметного ингибирующего действия. Если в культуре S. antibloticus подавить биосинтез актиномицина ингибитором (3-метил-DL-пролин), то рост стрептомицета усиливается в 4-5 раз. Это указывает на то, что, с одной стороны, антибиотик ингибирует рост стрептомицета, а с другой - биосинтез актиномицина выступает конкурентом за общий аминокислотный пул, используемый как для построения молекулы антибиотика, так и для белкового синтеза стрептомицета. Аурантин (антибиотик актиномициновой группы), образуя комплекс с ДНК, нарушает репликационный синтез РНК, а затем и синтез белка у продуцента. Все это подтверждает, что актиномицины оказывают заметное действие на различные стороны жизнедеятельности собственных продуцентов.

Подводя общие итоги рассмотрения влияния антибиотиков на различные стороны жизнедеятельности собственных продуцентов, можно суммировать использованные материалы В. Бетина (1983), а также наши и другие литературные данные следующим образом:



Вопросы для самоконтроля

1. Каково значение антибиотиков в жизнедеятельности собственных продуцентов? Рассмотрите на примере отдельных антибиотиков.

2. Какими методами можно изучить влияние антибиотика на собственный продуцент?

3. Каковы основные механизмы защиты продуцента от действия собственных антибиотиков?

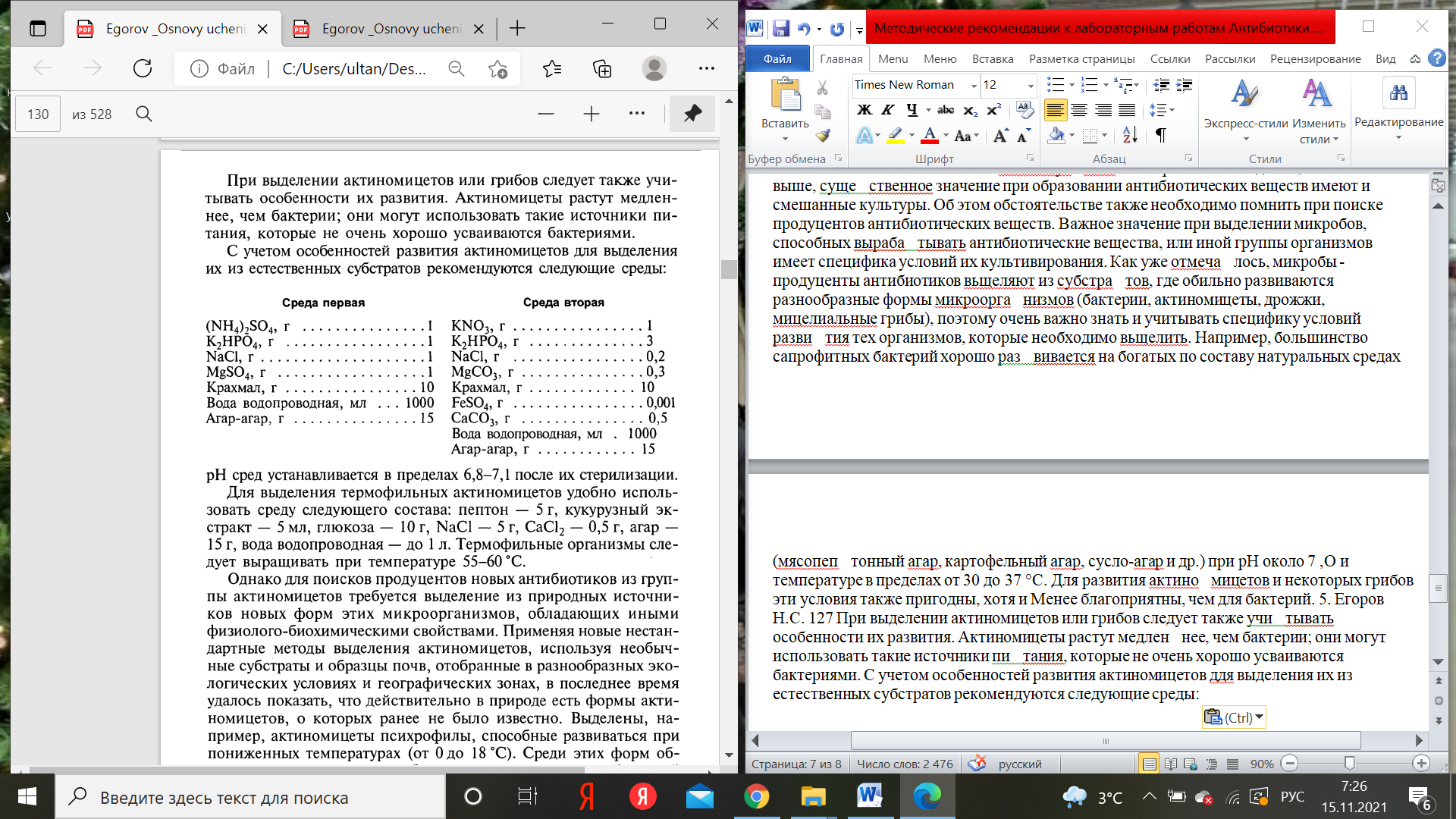
**Лабораторная работа №4**

**Тема:** Выделение микроорганизмов, продуцирующих антибиотики

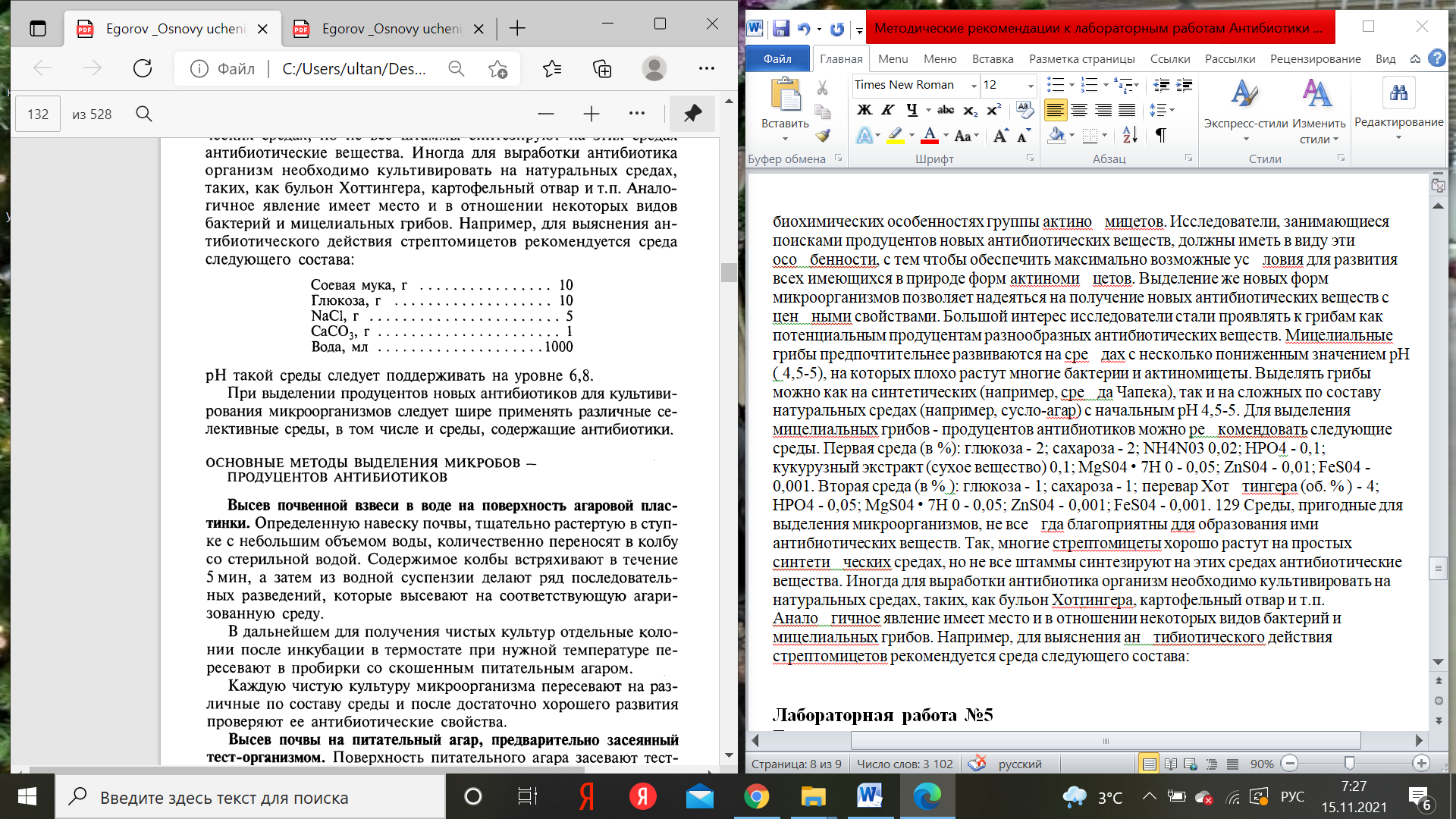
**Задачи:**

1. **Общие положение выделения микроорганизмов, продуцирующих антибиотики**

Для выделения микроорганизмов - продуцентов антибиотиков из естественных мест их обитания применяют разнообразные методы. Здесь же следует остановиться лишь на самой общей характеристике этих методов. В основу большинства приемов положен принцип выделения чистой культуры микроба и непосредственного испытания его по отношению к используемым тест-организмам. Однако, как отмечалось выше, существенное значение при образовании антибиотических веществ имеют и смешанные культуры. Об этом обстоятельстве также необходимо помнить при поиске продуцентов антибиотических веществ. Важное значение при выделении микробов, способных вырабатывать антибиотические вещества, или иной группы организмов имеет специфика условий их культивирования. Как уже отмечалось, микробы - продуценты антибиотиков вьщеляют из субстратов, где обильно развиваются разнообразные формы микроорганизмов (бактерии, актиномицеты, дрожжи, мицелиальные грибы), поэтому очень важно знать и учитывать специфику условий развития тех организмов, которые необходимо вьщелить. Например, большинство сапрофитных бактерий хорошо развивается на богатых по составу натуральных средах (мясопептонный агар, картофельный агар, сусло-агар и др.) при рН около 7,О и температуре в пределах от 30 до 37 °С. Для развития актиномицетов и некоторых грибов эти условия также пригодны, хотя и Менее благоприятны, чем для бактерий. 5. При выделении актиномицетов или грибов следует также учитывать особенности их развития. Актиномицеты растут медленнее, чем бактерии; они могут использовать такие источники питания, которые не очень хорошо усваиваются бактериями. С учетом особенностей развития актиномицетов ддя выделения их из естественных субстратов рекомендуются следующие среды:



рН сред устанавливается в пределах 6,8-7, 1 после их стерилизации. Для выделения термофильных актиномицетов удобно использовать среду следующего состава: пептон - 5 г, кукурузный экстракт - 5 мл, глюкоза - 10 г, NaCl - 5 г, СаС12 - 0,5 г, агар - 15 г, вода водопроводная - до 1 л. Термофильные организмы следует выращивать при температуре 55-60 °С. Однако для поисков продуцентов новых антибиотиков из группы актиномицетов требуется выделение из природных источников новых форм этих микроорганизмов, обладающих иными физиолого-биохимическими свойствами. Применяя новые нестандартные методы выделения актиномицетов, используя необычные субстраты и образцы почв, отобранные в разнообразных экологических условиях и географических зонах, в последнее время удалось показать, что действительно в природе есть формы актиномицетов, о которых ранее не было известно. Вьщелены, например, актиномицеты психрофилы, способные развиваться при пониженных температурах (от О до 18 °С). Среди этих форм обнаружены продуценты антибиотиков, например психрофильный штамм Streptomyces griseus, образующий пептидный антибиотик криомицин. Вьщелены термотолерантные стрептомицеты - продуценты антибиотиков. Так, продуцент гранатицина S. thermoviolaceus образует максимальную биомассу при 30 и 50 °С, но, развиваясь· при 37 и при 55 °С, биомасса стрептомицета значительно снижается. Максимальный биосинтез антибиотика у этого стрептомицета наблюдается при 45 °С, а при 55 °С гранатицин не вырабатывается (J. Edwards, 1989). В природе существуют ацидофильные актиномицеты, которые лучше растут в условиях кислой среды (рН 3,5-6,5). Ацидо128 фильные актиномицеты образуют антибиотические вещества, обладающие противогрибным действием. Выделены новые формы актиномицетов, предпочитающие для своего развития щелочные условия, - так называемые алкалофильные организмы. Среди новых форм актиномицетов встречаются и галофильные виды, способные расти лишь на средах, содержащих высокие концентрации минеральных солей (например, не менее 10% NaCl). В последнее десятилетие в качестве продуцентов антибиотиков активно изучается группа актиномицетов, относящихся к роду Actinomadura. Этот род бьш впервые описан Х. и М. Лешевалье в 1970 г. Известно не менее 45 видов и 6 подвидов названного рода. Из представителей группы Actinomadura выделено более 35 новых антибиотиков. Значительный интерес проявляется к таким родам актиномицетов, как Micromonospora, Nocardiopsis, Amicolactopsis, среди которых выделены продуценты ценных аминогликозидных, макролидных и других антибиотиков, а также Pseudonocardia. Приведенные примеры значительно расширяют представления о физиолого-биохимических особенностях группы актиномицетов. Исследователи, занимающиеся поисками продуцентов новых антибиотических веществ, должны иметь в виду эти особенности, с тем чтобы обеспечить максимально возможные условия для развития всех имеющихся в природе форм актиномицетов. Выделение же новых форм микроорганизмов позволяет надеяться на получение новых антибиотических веществ с ценными свойствами. Большой интерес исследователи стали проявлять к грибам как потенциальным продуцентам разнообразных антибиотических веществ. Мицелиальные грибы предпочтительнее развиваются на средах с несколько пониженным значением рН (4,5-5), на которых плохо растут многие бактерии и актиномицеты. Выделять грибы можно как на синтетических (например, среда Чапека), так и на сложных по составу натуральных средах (например, сусло-агар) с начальным рН 4,5-5. Для выделения мицелиальных грибов - продуцентов антибиотиков можно рекомендовать следующие среды. Первая среда (в %): глюкоза - 2; сахароза - 2; NH4N03 0,02; НРО4 - 0,1; кукурузный экстракт (сухое вещество) 0,1; MgS04 • 7Н 0 - 0,05; ZnS04 - 0,01; FeS04 - 0,001. Вторая среда (в % ): глюкоза - 1; сахароза - 1; перевар Хоттингера (об. % ) - 4; НРО4 - 0,05; MgS04 • 7Н 0 - 0,05; ZnS04 - 0,001; FeS04 - 0,001. 129 Среды, пригодные для выделения микроорганизмов, не всегда благоприятны ддя образования ими антибиотических веществ. Так, многие стрептомицеты хорошо растут на простых синтетических средах, но не все штаммы синтезируют на этих средах антибиотические вещества. Иногда для выработки антибиотика организм необходимо культивировать на натуральных средах, таких, как бульон Хоттингера, картофельный отвар и т.п. Аналогичное явление имеет место и в отношении некоторых видов бактерий и мицелиальных грибов. Например, для выяснения антибиотического действия стрептомицетов рекомендуется среда следующего состава:



рН такой среды следует поддерживать на уровне 6,8. При выделении продуцентов новых антибиотиков для культивирования микроорганизмов следует шире применять различные селективные среды, в том числе и среды, содержащие антибиотики.

**Высев почвенной взвеси в воде на поверхность агаровой пластинки.** Определенную навеску почвы, тщательно растертую в ступке с небольшим объемом воды, количественно переносят в колбу со стерильной водой. Содержимое колбы встряхивают в течение 5 мин, а затем из водной суспензии делают ряд последовательных разведений, которые высевают на соответствующую аrаризованную среду. В дальнейшем для получения чистых культур отдельные колонии после инкубации в термостате при нужной температуре пересевают в пробирки со скошенным питательным агаром. Каждую чистую культуру микроорганизма пересевают на различные по составу среды и после достаточно хорошего развития проверяют ее антибиотические свойства.

**Высев почвы на питательный агар, предварительно засеянный тест-организмом**. Поверхность питательного агара засевают тесткультурой необходимого организма, после чего на агаровую пластинку раскладывают небольшие (не более просяного зерна) комочки почвы или же почву наносят в виде пыли, распределяя ее по всей поверхности пластинки. Затем чашки помещают в термостат и через определенный промежуток времени (24-48 ч, а 130 иногда и более) просматривают кусочки почвы или отдельные ее участки, вокруг которых образовались зоны задержки роста тесторганизма. Из этих участков выделяют чистые культуры организмов и изучают их. Метод можно модифицировать. На чашки Петри с мясопептонным агаром, предварительно засеянным тест-организмом, микробиологической петлей наносят отдельными каплями взвесь почвы. На каждую чашку наносят 10-20 капель, которые, подсыхая, оставляют после себя изолированные комочки почвы. Через 1-2 сут нахождения чашек в термостате при 26-35 °С комочки почвы обрастают колониями и вокруг некоторых из них обнаруживаются зоны задержки роста тест-организма. Комочки, окруженные зонами, рассевают на свежие чашки с агаром, и после того как вырастут отдельные колонии, их отсевают для получения чистых культур, которые исследуют.

**Метод обогащения почвы**. Почву, из которой предполагают выделить антагонисты, обогащают организмами тех видов, по отношению к которым хотят получить антагонист. С этой целью к образцам почвы, помещенным в стеклянные сосуды, систематически добавляют отмытую суспензию нужных микроорганизмов. Затем через определенные промежутки времени такая почва высевается в виде отдельных комочков на агаровые пластинки в чашках Петри, предварительно засеянные тем же самым организмом, который использовался для обогащения почвы.

**Метод центрифугирования почвенной суспензии.** Для вьщеления стрептомицетов из почв, и особенно из почв в весеннее время, когда в ней развивается большое число грибов и бактерий, применяют метод центрифугирования почвенной взвеси. Метод основан на различии скоростей оседания отдельных видов микроорганизмов в центробежном поле. При 3000 об/мин в течение 20 мин частицы, соответствующие по размерам спорам плесеней или клеткам бактерий типа В. mesentericus, В. mycoides, В. subtilis, осаждаются на дно пробирки. Частицы же, соответствующие по размерам спорам или отдельным обрывкам мицелия стрептомицетов, при данной скорости центрифугирования оказываются в поверхностном слое жидкости. Высевая надосадочную жидкость, в большинстве случаев (до 92%) на пластинках питательного агара удается получить только колонии актиномицетов.

**Метод замораживания-отгаивания почвы**. Известно, что в почве микроорганизмы находятся в адсорбированном на частицах состоянии. Для полноты десорбции микроорганизмов с почвенных частиц применяют химические методы, при которых почвенные образцы обрабатывают различными детергентами, и физические, в основе которых лежит метод механического растирания образцов почвы. Для лучшей десорбции микроорганизмов с почвенных частиц рекомендуется использовать метод замораживания-оттаивания почвы. Сугь метода состоит в следующем. Отобранный дЛЯ выделения стрептомицетов образец почвы помещают в испаритель бытового холодильника при температуре -8 °С. Через час образец измекают из холодильника и вьщерживают при комнатной температуре до полного оттаивания. Процедуру замораживания-оттаивания повторяют дважды. Затем навеску почвы помещают в стерильную водопроводную воду, взбалтывают суспензию в течение 15 мин на круговой качалке при 230 об/мин, после чего различные разведения суспензии высевают на питательную агаровую пластинку в чашках Петри. Метод замораживания-оттаивания образцов почвы позволяет обнаружить в них в 1,2-3,6 раза больше стрептомицетов, чем в тех же образцах без замораживания.

**Обработка почвенного образца карбонатом кальция.** Увеличение числа выделенных культур стрептомицетов примерно на два порядка наблюдается при обработке почвенного образца карбонатом кальция и при инкубировании во влажных условиях. Впервые метод был предложен П. Тсао с соавторами в 1960 г. и модифицирован И.В. Алферовой и Л.П. Тереховой в 1988 г. Образец почвы смешивают с порошком карбоната кальция в соотношении 10:1 и инкубируют во влажной камере при температуре 28 °С. Влажность обеспечивается путем помещения в чашки Петри кусочков фильтровальной бумаги, пропитанных дистиллированной водой и прикрепленных к крышке чашки. Увеличение общего числа выделяемых актиномицетов из таких образцов почвы, по-видимому, связано с тем, что ионы кальция инициируют прорастание спор стрептомицетов.

**Применение питательных сред, содержащих антибиотики.** Высев почвенной суспензии на агаровые пластинки вызывает трудности для развития редко встречающихся видов актиномицетов в результате быстрого размножения бактерий и широко распространенных в почвах видов актиномицетов. Поэтому для напраменного выделения определенных групп микроорганизмов в среды для высева почвенной суспензии добавляют различные антибиотики. При добамении антибиотиков к среде для культивирования микроорганизмов обычная микрофлора подавляется и создаются условия для развития устойчивых к этим антибиотикам форм микробов; последние могут оказаться новыми или редкими видами, способными образовывать и новые антибиотики. Дтrя этих целей часто используют антибактериальные и противогрибные препараты. Для выделения актиномицетов применяют среды, содержащие в своем составе такие антибиотики, как тетрациклины, неомицин, нистатин, стрептомицин, хлорамфеникол, пенициллин и др. При выделении продуцентов новых антибиотических веществ используют среды, содержащие стрептомицин в концентрациях от 25 до 100 мкг/мл и рубомицин - от 5 до 20 мкг/мл. В случае добавления к среде стрептомицина значительно подавляется рост наиболее часто встречающихся видов S. griseovariabllis, S. flavochromogenes, S. griseolis, S. aureofaciens, S. griseus и др. и выделяются виды актиномицетов, которые не обнаруживались на той же среде без стрептомицина. С повышением концентрации стрептомицина в среде общее количество выделяемых стрептомицетов уменьшается, однако при этом вырастают новые виды актиномицетов. Внесение в среду для высева почвенной суспензии рубомицина в значительной степени подавляет рост стрептомицетов и нокардиа. Довольно устойчивы к этому антибиотику представители секций Roseus, Helvolo-Flavus и Albus. В указанных условиях в значительном количестве вырастают виды стрептомицетов, не образующие воздушный мицелий. Продуценты, например, аминогликозидных антибиотиков могут быть найдены, как правило, только среди стрептомицетов, устойчивых к действию этих антибиотиков. Большое внимание уделяется поиску новых антибиотиков, образуемых сравнительно небольшим родом актиномицетов Micromonospora. Их редкая встречаемость в природных источниках (почва, илы) потребовала разработки соответствующих методов их выделения. По предложению М.В. Бибиковой, Л.П. Иваницкой и др. (1989) для выделения микромоноспора применяют селективные среды, содержащие 1 мкг/мл гентамицина, который подавляет рост быстрорастущей микрофлоры, в том числе и стрептомицетов. Это дает возможность в 2-3 раза повысить число развивающихся колоний микромоноспора и при этом в 3 раза увеличить число штаммов, способных вырабатывать антибиотики. Представителей рода Actinomadura обычно выделяют из почв на богатых питательных средах, содержащих антибиотики.

**Обработка почвенной суспензии УФ-светом.** Для селективного вьщеления определенных групп актиномицетов наряду с другими методами используют метод предварительной обработки природных субстратов физическими факторами. Известно, что различные группы актиномицетов обладают неодинаковой чувствительностью к ультрафиолетовому (УФ) облучению. О.А. Галатенко и Л.П. Терехова (1990) для преимущественного вьщеления из почвы редких видов актиномицетов (Mycromonospora, Nocardiopsis, Amycolatopsis) предложили метод предварительного облучения почвенной суспензии УФ-светом. Почвенную водную суспензию, разведенную в зависимости от образца почвы в отношении 1: 102 , 1: 103 , 1: 104, в количестве 0,05 мл наносят на поверхность агаровой пластинки в чашке Петри 133 и облучают УФ-светом с помощью бактерицидной лампы БУВ-15. Облучение проводят на расстоянии 20 см от источника света в течение 30 с - 2 мин. При такой обработке почвенной суспензии снижается выделение актиномицетов рода Streptomyces и увеличивается развитие представителей редких родов, особенно Micromonospora.

**МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ - ПРОДУUЕНТОВ АНТИБИОТИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ** После того как микроорганизм, обладающий ценными антибиотическими свойствами, тем или иным способом выделен из субстрата, необходимо определить его приналлежность к определенному 134 виду, установить таксономическое положение этого штамма. Для указанных целей используют большой спектр признаков: культуральные свойства, морфологию и организацию Юiеток, физиологические и биохимические особенности организма, химический состав клеток, содержание гуанина и цитозина (ГЦ) в ДНК, ДНКДНК-гибридизацию и т.д. Определенную помощь при идентификации видов стрептомицетов - продуцентов антибиотических веществ, принадлежащих к одной группе, оказывает метод, основанный на специфическом действии микробов-антагонистов. Эта специфика состоит в том, что, например, продуценты стрептомицина, выделенные в различных районах земного шара, не подавляют развитие друг друга. Такая закономерность характерна и ддя других видов стрептомицетов. Исходя из этого для идентификации внешне сходных культур стрептомицетов предложено применять метод так называемого перекрестного антагонизма.

**Лабораторная работа №5**

**Тема:** Аппаратурное оформление процессов биосинтеза

**Задачи: Лабораторный регламент**

Антибиотическое вещество, имеющее практическую значимость и являющееся новым препаратом, должно выпускаться в промышленных масштабах. Поэтому при изучении продуцента и образуемого им антибиотика в лабораторных условиях разрабатывается так называемый лабораторный регламент. Лабораторный регламент - это технологический документ, которым завершаются научные исследования в лабораторных условиях по разработке метода получения антибиотика. Он служит основой для промышленного регламента. Задача лабораторного регламента - разработка оптимального метода производства антибиотического вещества.

**Лабораторный регламент получения антибиотика включает следующие разделы.**

1. Характеристика антибиотика. Включает название антибиотика, основное назначение, краткое описание свойств препарата, описание организма, образующего антибиотик, методы определения биологической активности, условия хранения.

2. Технологическая схема производства. В схеме указана последовательность работ по производству антибиотика с подразделением на стадии. Технологическая схема - основа будущей технологии промышленного получения препарата.

З. Сырье и материалы. Сообщаются требования, предъявляемые к качеству сырья и материалам, используемым при получении антибиотика в целях его максимального выхода и обеспечения повторяемости результатов. При этом необходимо ориентироваться на сырье и материалы, выпускаемые отечественной промышленностью.

4. Аппаратурная схема производства. Приводится схема процесса получения антибиотика с указанием аппаратов и приборов, их конструкции, размера и других характеристик, которые могут иметь значение при производстве антибиотика.

5. Изложение технологического процесса. Описывается процесс получения антибиотика на основе завершенных научных и экспериментальных исследований, выполненных в лабораторных условиях. Процесс включается в регламент в том случае, если удается получить воспроизводимые результаты по качеству антибиотика и по его выходу. Технологический процесс описывают по стадиям. Подробно указываются объемы, концентрации веществ, входящих в среду, рН среды, степень аэрации, растворители, пеногасители, условия перемешивания, продолжительность процесса развития продуцента, температура и другие показатели.

6. Отходы производства, технологические и вентиляционные выбросы в атмосферу, их использование и обезвреживание. Приводится перечень возможных отходов и выбросов в атмосферу, указывается наличие в отходах ценных веществ, даются рекомендации к их использованию, а также список веществ, вредных с точки зрения загрязнения окружающей среды, и способы их обезвреживания.

7. Контроль производства. Указываются особые требования к оборудованию (герметичность ферментера и всех коммуникаций, исправность и надежность работы мешалки и т.д.). Приводятся анализ качества сырья, соответствующего определенным стандартам; режимы стерилизации сред и отдельных веществ, воздуха; методы анализа процесса биосинтеза антибиотика и готовой продукции.

8. Техника безопасности, пожарная безопасность и производственная санитария. Дается перечень веществ, способных воспламеняться и взрываться. Все вещества, применяемые в процессе получения антибиотика, должны быть изучены с позиций техники безопасности, пожарной опасности и производственной санитарии.

9. Перечень производственных инструкций. Приводятся все инструкции, которые должны быть разработаны на основе лабораторного регламента.

10. Технико-экономические нормативы. Указываются выходы конечного продукта и промежуточных продуктов; удельные нормы расхода сырья и материалов, удельные нормы технологических затрат (пара, воды, электроэнергии, сжатого воздуха).

11. Информационные материалы. В разделе должны быть указаны биологические и физико-химические свойства вещества, степень очистки, фармакологические свойства (преимущества и особенности), сравнение с показателями идентичных зарубежных препаратов, сведения о патентной чистоте антибиотика и методе его получения с перечислением охраняющих авторских свидетельств (патентов), сведения о вредности веществ, применяемых при получении препарата, и мерах предосторожности при работе с ними.

**Вопросы для самоконтроля**

1. Охарактеризуйте основные методы выделения продуцентов антибиотиков из природных условий.

2. Расскажите о специфических методах идентификации микроорганизмов - продуцентов антибиотиков, об идентификации самих антибиотиков.

3. Каковы основные методы выделения и очистки антибиотиков?

4. Каковы принципы разработки лабораторного регламента?

5. Охарактеризуйте основные пути повышения способности микроорганизмов к образованию антибиотиков.

6. Назовите методы сохранения микроорганизмов - продуцентов антибиотиков в активном состоянии.

7. Каковы основные методы определения антибиотической активности микроорганизмов при культивировании их на твердых и в жидких средах?

8. Дайте характеристику основных биологических, химических, физико-химических и иммунохимических методов количественного определения антибиотиков.

**Лабораторная работа №6**

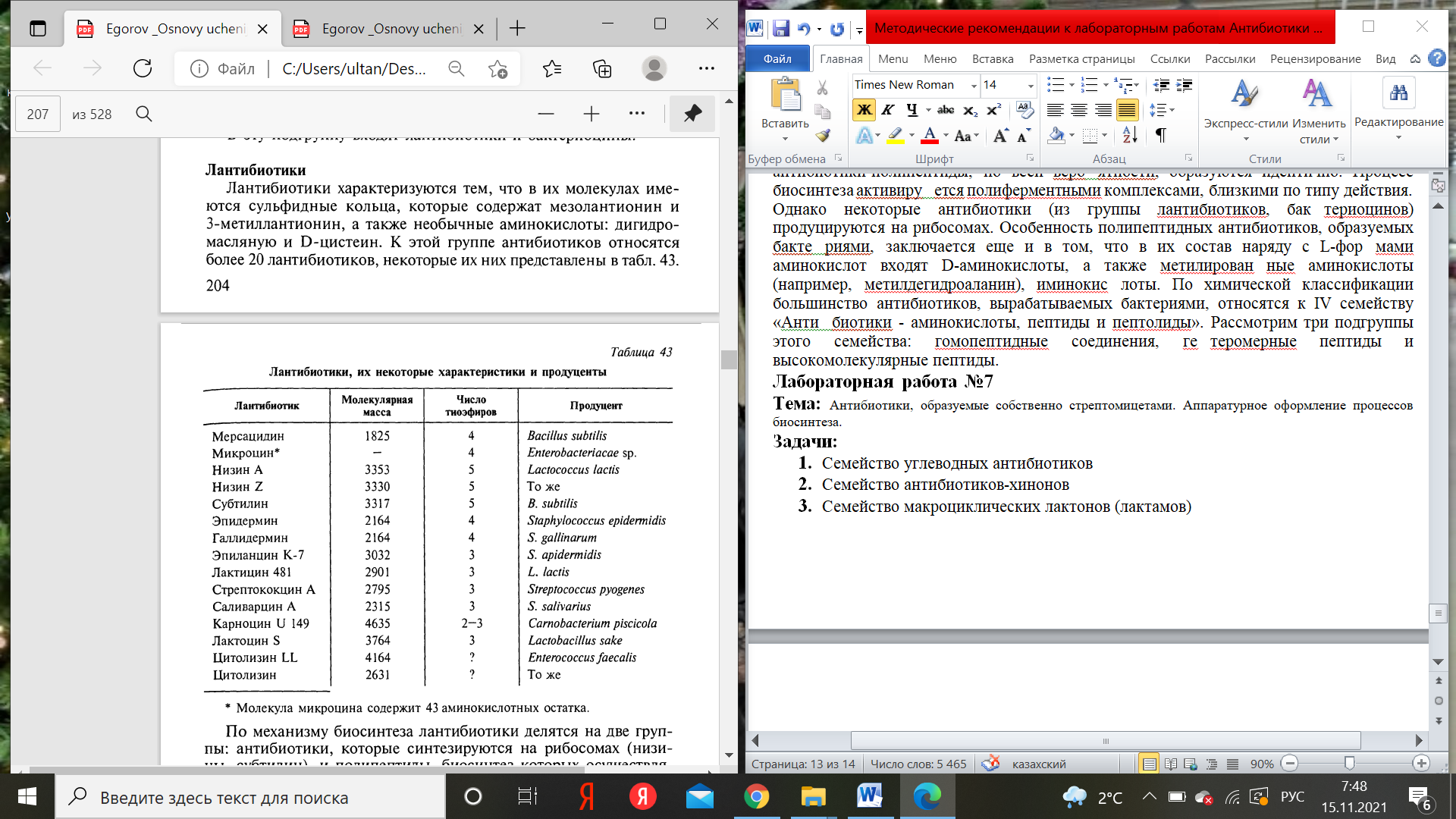
**Тема:** Антибиотики, образуемые собственно бактериями, отбор штаммов продуцентов и работа с ними и параметры роста. Аппаратурное оформление процессов биосинтеза.

**Задачи:**

1. ТИРОТРИЦИН (Tyrothricin). ГРАМИЦИДИНЫ (Gramicidins). Грамицидин С (S). БАЦИТРАЦИНЫ (Bacitracins). Гетеромерные пептиды. ПОЛИМИКСИНЫ (Polymyxins). Высокомолекулярные пептиды.

2. ЛАНТИБИОТИКИ: Низины (Nisins), БАКТЕРИОЦИНЫ (Bacteriocins), Антибиотики цианобактерий, Образование D-аминокислот, входящих в состав поли пептидных антибиотиков.

Большое число антибиотических веществ, образуемых различными группами организмов, являются продуктами жизнедеятельности собственно бактерий. Однако лишь немногие из них нашли практическое применение, так как большинство бактериальных антибиотиков токсично для макроорганизмов. Часть этих антибиотиков (грамицидин С, полимиксины, бацитрацины и др.) используется в медицинской практике, друтие (субтилин, низины) нашли применение в пищевой и консервной промышленности. Они предохраняют от порчи мясные, рыбные, молочные и другие скоропортящиеся продукты. Некоторые из бактериальных антибиотиков, например бацитрацины, употребляют в сельском хозяйстве как добавки к корму домашних животных. Все это указывает на необходимость дальнейшего изучения антибиотиков бактериального происхождения. По химической природе почти все бактериальные антибиотики - полипептиды или белки. Это представляет особый интерес в связи с изучением путей биосинтеза названных веществ и использованием этих путей в качестве моделей для изучения проблем биосинтеза полипептидов вообще, что имеет большое теоретическое значение. К настоящему времени известно около 1000 антибиотиков бактериального происхождения, но мы остановимся лишь на некоторых наиболее характерных представителях этой группы, имеющих практическое или теоретическое значение; к ним относятся тиротрицин, грамицидины, полимиксины, бацитрацины, низины и некоторые другие. В большинстве случаев при изучении бактериальных антибиотиков приходится иметь дело не с одиночными веществами, а с группой близких друг другу по химическим и биологическим свойствам веществ, синтезируемых одним видом бактерий. Известно, что Bacillus subtilis образует около 70 различных полипептидных антибиотиков, В. ро/утуха - более 20 полимиксинов, Brevi bacil/us - 23 антибиотических вещества полипептидной природы и т.д. У разных бактерий антибиотики-полипептиды, по всей вероятности, образуются идентично. Процесс биосинтеза активируется полиферментными комплексами, близкими по типу действия. Однако некоторые антибиотики (из группы лантибиотиков, бактериоцинов) продуцируются на рибосомах. Особенность полипептидных антибиотиков, образуемых бактериями, заключается еще и в том, что в их состав наряду с L-формами аминокислот входят D-аминокислоты, а также метилированные аминокислоты (например, метилдегидроаланин), иминокислоты. По химической классификации большинство антибиотиков, вырабатываемых бактериями, относятся к IV семейству «Антибиотики - аминокислоты, пептиды и пептолиды». Рассмотрим три подгруппы этого семейства: гомопептидные соединения, гетеромерные пептиды и высокомолекулярные пептиды.



По механизму биосинтеза лантибиотики делятся на две группы: антибиотики, которые синтезируются на рибосомах (низины, субтилин), и полипептиды, биосинтез которых осуществляется не рибосомальным механизмом. Из лантибиотиков подробнее рассмотрим низины. Низины (Nisins) Из группы лактококков в 1944 г. был выделен штамм Lactococcus lactis, образующий антибиотик низин. Из культур стрептококка, изолированных из естественных мест обитания (молоко), можно получить более активные штаммы путем высева суспензии клеток продуцента на среды, содержащие в своем составе определенные концентрации низина, а также в результате получения мутантов, образующихся в процессе обработки клеток стрептококка ультрафиолетовым, рентгеновским излучением, у-излучением, и методом слияния протопластов. В группу низинов входит ряд форм антибиотиков - низины А, В, С, D. Низины А, В и С кроме общих для всех вариантов аминокислот имеют по два остатка валина и метионина, а в низине D эти аминокислоты отсутствуют. Иногда низины А, В и С объединяют в низин А, а низин D называют низинам Z. 205 Низин А чувствителен к ферменту низиназе, образуемому культурой В. cereus, а низин Z устойчив к этому ферменту. Наиболее биологически активный вариант - низин А. Низин подавляет развитие ряда грамположительных и некоторых кислотоустойчивых бактерий, не оказывает влияния на грамотрицательные бактерии, дрожжи и плесневые грибы. Антибиотик подавляет развитие многих микроорганизмов: Micrococcus pyogenes, различные виды Bacillus, Clostridium, Lactobacillus, Corynebacterium, некоторые виды Streptomyces. Низин не оказывает антимикробного действия на Escherichia coli, Salmonella typhi, Shigella, некоторые виды Neisseria. Низин влияет на споры чувствительных к нему бактерий, которые более богаты катионами по сравнению с вегетативными клетками, и выступает как катионитный детергент. Антибиотик, адсорбируясь на поверхности спор, в момент прорастания нарушает проницаемость цитоплазматической мембраны и таким образом подавляет рост развивающихся клеток бактерий. Низин способен также реагировать с сульфгидрильными группами биологически важных соединений, выводя их из реакций метаболизма. Первичной мишенью действия низина является цитоплазматическая мембрана. Этот антибиотик впервые был получен в Англии под торговой маркой «Низаплин». Типичный препарат «Низаплин» содержит: низина 1 млн МЕ, или 25 мг, на 1 г препарата (2,5%), хлорида натрия 74,5%, денатурированного молока (сухого) 23,8%. Влажность препарата 1,7%. 1 мкг чистого низина соответствует приблизительно 40 МЕ. Низин нашел применение в пищевой промышленности в качестве консерванта некоторых скоропортящихся продуктов (томаты, зеленый горошек и др.), а также для предупреждения порчи сыров. Консервированный сыр, не содержащий низина, полностью портится в течение 25-50 дней. При добавлении к сыру 50 ед.jг низина за 200 дней хранения было испорчено всего лишь 27% банок с сыром, взятых в опыт. Безопасность использования низина при хранении пищевых продуктов обусловлена тем, что, имея полипептидную структуру, этот антибиотик в организме человека быстро разрушается до аминокислот ферментами пищеварительного тракта. Благодаря этому исключается возможность накопления низина в организме человека и появления резистентных к нему форм микроорганизмов. Низин не используется в медицинской практике, но с успехом применяется в ветеринарии для лечения маститов у коров. Есть сообщения об активности низина в отношении малярийного плазмодия. 206 Строение низина. В конце 60-х гг. началось активное изучение химии низина. Было установлено, что низин имеет молекулярную массу, равную 3500. Причем антибиотик может полимеризоваться и образовывать из мономера димер (молекулярная масса 7000) и тетрамер (молекулярная масса 14 000). Полимеризацию низина связывают с наличием в его молекуле дегидроаланина. В состав молекулы низина входят 34 аминокислотных остатка 15 аминокислот: лизина, гистидина, аспарагиновой кислоты, серина, пролина, глицина, аланина, валина, метионина, изолейцина, лейцина, а также остатки ненасыщенных аминокислот - дегидроаланина и р-метилдегидроаланина и редко встречающихся серосодержащих аминокислот - лантионина и Р-метиллантионина.

Биологическая активность низина обусловлена наличием в его молекуле а, Р-ненасыщенных аминокислот (дегидроаланин, р-метилдегидроаланин). Это подтверждается тем, что аналоги низина, не содержащие дегидроаланинлизина, а также пирувиллизин не активны по отношению к Staphilococcus aureus. Димеры и тетрамеры низина с молекулярной массой соответственно 7000 и 14 ООО, подобно мономеру, обладают биологической активностью. Низин - это кислота, и поэтому он более стабилен в кислых условиях среды. Раствор антибиотика при рН 2 остается стабильным в течение длительного времени в интервале температуры от 2 до 7 °С и выдерживает кипячение до 120 °С без потери активности. Фермент низиназа, образуемый культурой В. polymyxa, инактивирующий низин, по-видимому, специфически действует на пептиды, содержащие дегидроаланин. Условия образования. Изучению условий образования низина культурой Lactococcus lactis (штамм МГУ) посвящен ряд работ, выполненных на биологическом факультете МГУ. Наши исследования показали, что интенсивная аэрация культуры лактококка не оказывает благоприятного влияния ни на рост бактерий, ни на образование низина. Более существенно влияет на развитие продуцента низина и биосинтез антибиотика рН среды. С понижением рН среды увеличивается выделение низина из клеток в культуральную жидкость. Так, при рН 4,3 более 90% низина выделяется в среду, а при рН 6,8 - лишь 40%. Необходимо иметь в виду, что для роста лактококка и образования им низина оптимальное значение рН 6,5-6,8. Быстрый синтез низина культурой лактококка начинается в период ранней стационарной фазы развития продуцента. Изучение влияния источников азота на рост L. lactis и образование низина показало, что лучшие азотсодержащие компоненты в средах - дрожжевой автолизат, пептон или казеиновый гидролизат. Относительно высокий выход антибиотика наблюдается при развитии лактококка на средах, содержащих аммонийные соли органических кислот. Хорошим источником углерода для роста бактерий и биосинтеза низина служит глюкоза. Добавление к среде с глюкозой двух-, трех-, четырех- и пятиуглеродных органических кислот способствует повышению роста продуцента антибиотика и некоторому увеличению образования им низина. Предшественниками биосинтеза лантионина являются серин и цистеин, Р-метиллантионина - треонин и цистеин. В процессе развития L. lactis нередко наблюдается значительная инактивация низина, как находящегося в культуральной жидкости, так и связанного с клетками бактерий, которая, повидимому, обусловлена изменением структуры молекулы антибиотика, степенью его полимеризации или образованием биологически неактивных компонентов низина с солями кальция, входящими в состав клеточных стенок лактококка.

Механизм биосинтеза низина. Механизм биосинтеза таких полипептидных антибиотиков, как актиномицины, грамицидины, полимиксины, бацитрацины и др., принципиально отличается от синтеза белка. Ингибирование синтеза белка у микроорганизмов - продуцентов названных антибиотиков не приостанавливает образования антибиотиков-полипептидов. Ингибиторы белкового синтеза (хлорамфеникол и пуромицин), а также ингибитор синтеза РНК (актиномицин D), добавленные к культуре L. lactis, подавляют как синтез белка независимо от времени их введения, так и синтез низина. Причем биосинтез низина более чувствителен к действию этих ингибиторов, чем белковый синтез. Эти факты дают основание высказать предположение, что в отличие от других полипептидных антибиотиков путь синтеза низина сходен с путем образования белков, т.е. связан с рибосомным механизмом. 209 Синтез низина идет через образование низиноподобных белков - предшественников биосинтеза антибиотика, причем превращение пренизина в низин происходит под действием фермента на внешней поверхности мембраны клетки лактококка. Процесс включения меченой серы (35 S) цистеина в лантионин и р-метиллантионин ингибируется хлорамфениколом в большей степени, чем включение цистеина в белок. Это также указывает на то, что низин синтезируется с участием рибосомного механизма. Биосинтез низина из молекулы-предшественника кодируется геном, находящимся не на плазмиде, а на хромосоме. Механизм биосинтеза низина и его молекулярная масса позволяют рассматривать этот антибиотик как низкомолекулярный основной белок. Это дало основание некоторым авторам отнести низины и всю группу лантибиотиков к бактериоциноподобным веществам. L. lactis кроме низина синтезирует шесть других основных белков, не обладающих антибиотическими свойствами. Низин составляет лишь 20% от основных белков, образуемых лактококком.

**Вопросы для самоконтроля**

1. Охарактеризуйте антибиотики, образуемые бактериями.

2. Грамицидин С и условия его биосинтеза.

3. Характеристика полимиксинов, условия их образования.

4. Бацитрацины, условия их образования и свойства.

5. Характеристика низинов и их практическое применение.

6. Антибиотики цианобактерий.

7. Основные пути синтеза бактериями О-аминокислот, входящих в состав полипептидных антибиотиков.

**Лабораторная работа №7**

**Тема:** Антибиотики, образуемые собственно стрептомицетами. Аппаратурное оформление процессов биосинтеза.

**Задачи:**

1. Семейство углеводных антибиотиков

Наибольшее число антибиотиков (не менее 70%), широко применяемых на практике, относится к веществам, образуемым актиномицетами (порядок Actinomycetales). Этот порядок включает несколько родов: Streptomyces, Nocardia, Actinomadura, Micromonospora, Saccharopolyspora и др. Продуцентом большинства известных к настоящему времени антибиотиков, синтезируемых актиномицетами, является род Streptomyces. 214 Антибиотики, продуцируемые актиномицетами, по химическому строению относятся к различным группам соединений: от относительно простых (саркомицин) до таких сложных структур, как хромопептиды (актиномицины), гликопептиды (блеомицины). Вьщеление и изучение антибиотических веществ актиномицетного происхождения приняло очень широкие размеры. В результате настойчивых поисков получено много ценных препаратов, применяемых в химиотерапии, в сельскохозяйственной практике и в пищевой промышленности. Один из первых антибиотиков стрептомицетного происхождения - ми ц е т и н - открыт советскими учеными Н.А. Красильниковым и А.И. Кореняко еще в 1939 г. К 1940 г. были описаны и сравнительно подробно изучены два антибиотических вещества, образуемых стрептомицетами: акт и н о м и ц е т и н (М. Вельш, 1937) и м и ц е т и н. Следовательно, к моменту получения очищенного пенициллина (1940) и обнаружения его замечательных лечебных свойств уже было известно, что и среди стрептомицетов имеются штаммы, способные образовывать антибиотические вещества, а многие стрептомицеты обладают сильными антагонистическими свойствами в отношении разнообразных микроорганизмов. Указанное обстоятельство, безусловно, не могло не привлечь внимания исследователей к этой группе микроорганизмов. В 1941 г. в лаборатории 3. Ваксмана был выделен антибиотик актиномицин, образуемый Streptomyces antibloiticus. Спустя год под руководством 3. Ваксмана был выделен стр е п тот р и ц и н, образуемый S. lavendulae. Однако эти антибиотические вещества не привлекли к себе широкого внимания ученых и практиков, так как обладали сильными токсическими свойствами. Выделение и изучение этих антибиотиков явились преддверием к открытию 3. Ваксманом и его сотрудниками в 1944 г. замечательного антибиотического препарата стр е п то м и ц и н а, образуемого культурой S. griseus. Открытие стрептомицина и выяснение его ценных лечебных качеств послужили мощным толчком к исследованию стрептомицетов и поискам среди них продуцентов новых антибиотических веществ. Широкие поиски увенчались открытием таких ценных антибиотиков, как хлоромицетин (хлорамфеникол), неомицин, хлортетрациклин, тетрациклин и многие другие. Изучение антибиотических свойств актиномицетов, их распространения в природе продолжается и до настояшего времени, обогащая науку и практику все новыми и новыми антибиотиками, находящими применение в различных областях медицины, сельского хозяйства и промышленности. К настоящему времени описано большое число (более 16 000) антибиотиков, образуемых бактериями, грибами, водорослями, высшими растениями и животными. Актиномицеты продолжают привлекать к себе большое внимание исследователей прежде всего как потенциальный источник продуцентов новых антибиотиков, обладающих антибактериальным, антигрибным и противоопухолевым действием. Кроме того, актиномицеты способны образовывать антибиотические вещества, ингибирующие ферменты, а также являющиеся иммуномодуляторами, гербицидами, инсектицидами. Они могут синтезировать и другие биологически активные соединения. Известно, что стрептомицеты имеют одну существенную особенность: генетическую нестабильность популяций. Причем некоторые признаки популяционной неоднородности коррелируют с антибиотикообразованием. Среди таких признаков можно назвать чувствительность к антибиотикам, споруляцию, образование пигмента, а также электрокинетический потенциал, формирующийся поверхностным зарядом клетки. Ценные антибиотики образуются многими видами рода Streptomyces, а также представителями Nocardia, Actinomadura, Micromonospora и других редко встречающихся родов актиномицетов. Выделение новых антибиотиков, продуцируемых актиномицетами, и их изучение продолжаются. Мы не имеем, естественно, возможности рассмотреть все антибиотики (их к настоящему времени известно более 6000), образуемые этой группой микроорганизмов. Поэтому здесь будут рассмотрены лишь те, которые имеют наиболее важное практическое значение. Как уже отмечалось, одним из первых актиномицетных антибиотиков, завоевавших широкую известность, был стрептомицин, принадлежащий к семейству углеводных антибиотиков, группе аминогликозидов. Семейство углеводных антибиотиков. Из семейства углеводных антибиотиков мы рассмотрим аминогликозиды, или аминоциклитолы. АМИНОГЛИКОЗИДНЫЕ АНТИБИОТИКИ, ИЛИ АМИНОЦИКЛИТОЛЫ В группу аминогликозидных антибиотиков (аминоциклитолов) включают биологически активные соединения, содержащие в молекулах два или более аминосахара, которые связаны гликозидными связями с аминоциклитольным кольцом. К этим ан216 тибиотикам относятся стрептомицины, рибостамицин, неомицины, канамицины, тобрамицин, гентамицины, селдомицины, фортимицины и некоторые другие вещества. Известно более 100 антибиотиков, относящихся к этой группе соединений. Аминогликозиды имеют большое практическое значение. Несмотря на выделение многих новых антибиотиков, в том числе цефалоспоринов третьего и четвертого поколений, аминогликозиды до сих пор широко применяются в медицинской практике для лечения тяжелых инфекционных заболеваний, и в первую очередь различных форм туберкулеза. Открытие новых аминогликозидных антибиотиков продолжается. Установлено, что аминогликозиды образуются не только определенными видами стрептомицетов, но и отдельными представителями родов Micromonospora (фортимицины, гентамицины), Pseudomonas и Streptoverticillum (сорбистины), нового рода актиномицетов - Saccharopolyspora (спорарицины), а также Bacillus (бутирозин). Аминогликозидные антибиотики, исходя из их химического строения, делятся на несколько групп (см. классификацию антибиотиков, с. 35). Мы рассмотрим наиболее значимые аминогликозидные антибиотики, относящиеся к трем группам. К 1-й группе относятся стрептомицин и родственные ему соединения. Стрептомицин (Streptomycin) Актиномицет, образующий стрептомицин, впервые вьщелен в лаборатории микробиологии Ратжерского университета в 1943 г. Первое сообщение о выделении антибиотика было сделано А. Шатц, И. Буги и 3. Ваксманом в январе 1944 г. Антибиотик получал название «стрептомицин» (от родового названия актиномицетов Streptomyces), а организм, образующий этот антибиотик, был определен как S. griseus. Стрептомицин вырабатывают не только штаммы S. griseus, но и другие стрептомицеты: S. blkiniensis, S. raneus, S. humidus, S. reticuli, S. griseocarneus, S. mashuensis. Однако основным продуцентом стрептомицина признан S. griseus, на характеристике свойств которого мы и остановимся. В результате изменчивости продуцента стрептомицина нередко появляются аспорогенные формы, т.е. формы, лишенные воздушного спороносного мицелия. Как правило, эти варианты или вообще неактивны, или образуют незначительное количество стрептомицина. Снижение продуцирования антибиотика наблюдается и у вариантов с усиленной споруляцией. 217 Можно с определенностью отметить, что изменчивость многих видов стрептомицетов - это результат генетической нестабильности названных 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 относится ряд разнообразных по химическому строению веществ. Среди них можно назвать пуриновые нуклеотиды, ионы марганца, L-метионин, гистидин, полиамины, кофеин и др. Стрептомицин - это один из классических, преимущественно противотуберкулезных антибиотиков. К настоящему времени вьщелен рад аминогликозидов, превосходящих по своим свойствам стрептомицин и заменяющих его в медицинской практике. Однако условия образования, механизм биосинтеза и свойства этого антибиотика изучены очень подробно. Поэтому на примере стрептомицина целесообразно более полно рассмотреть основные факторы, влияющие на его биосинтез культурой S. griseus, методы вьщеления и свойства аминогликозидов.

**Лабораторная работа №8**

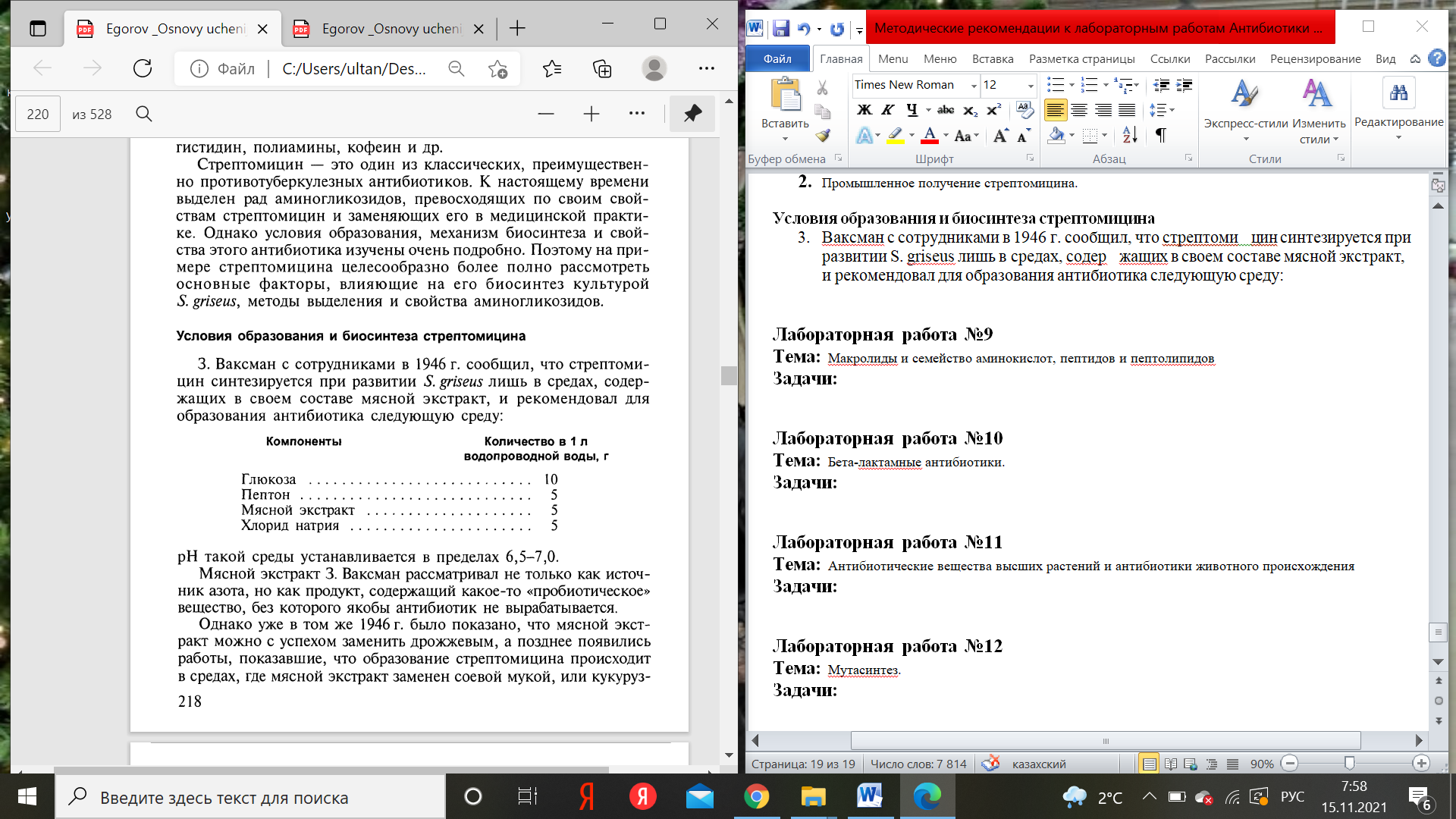
**Тема:** Условия образования и биосинтеза стрептомицина. Промышленное получение стрептомицина.

**Задачи:**

1. Условия образования и биосинтеза стрептомицина.
2. Промышленное получение стрептомицина.

**Условия образования и биосинтеза стрептомицина**

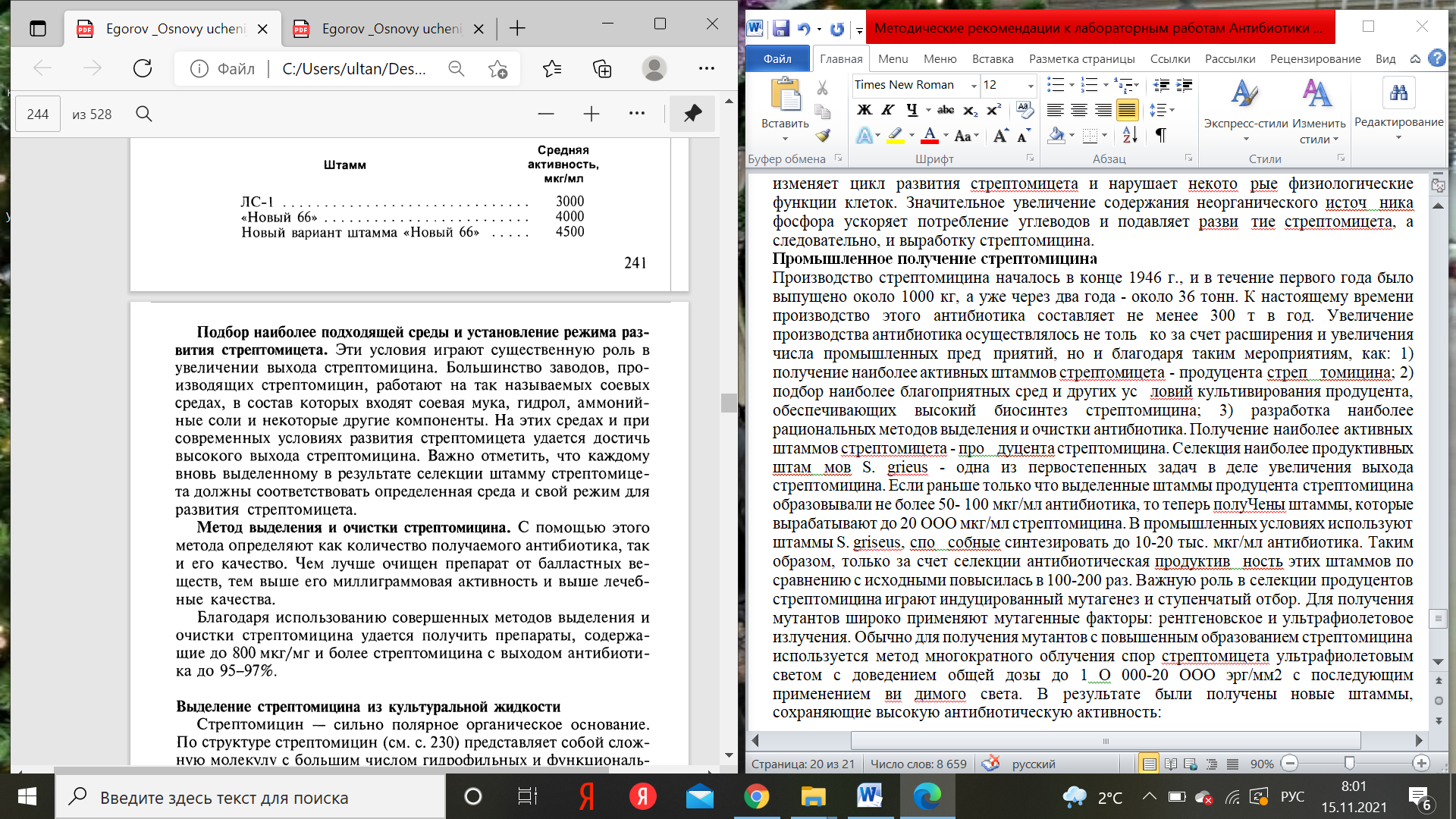
1. Ваксман с сотрудниками в 1946 г. сообщил, что стрептомицин синтезируется при развитии S. griseus лишь в средах, содержащих в своем составе мясной экстракт, и рекомендовал для образования антибиотика следующую среду:



рН такой среды устанавливается в пределах 6,5-7,0. Мясной экстракт 3. Ваксман рассматривал не только как источник азота, но как продукт, содержащий какое-то «пробиотическое» вещество, без которого якобы антибиотик не вырабатывается. Однако уже в том же 1946 г. было показано, что мясной экстракт можно с успехом заменить дроюкевым, а позднее появились работы, показавшие, что образование стрептомицина происходит в средах, где мясной экстракт заменен соевой мукой, или кукуруз218 ным экстрактом, или гидролизатами, полученными из этих веществ. Более того, было установлено, что синтез антибиотика может происходить и на простых по составу синтетических средах. Таким образом, предположение 3. Ваксмана и его коллег о возможности образования стрептомицина только в присутствии некоего «пробиотического» вещества, содержащегося в мясном экстракте, не подтвердилось. Эти примеры показывают, что в самом начале изучения условий выработки стрептомицина исследователи столкнулись с влиянием на процесс биосинтеза антибиотика различных компонентов сред, и в первую очередь источников азота, углерода, а также концентрации фосфора. Источники азота. Для развития стрептомицета и биосинтеза стрептомицина в синтетических средах наиболее благоприятны аммонийные соли. Нитраты в качестве единственных 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 автолиза та. Вместе с тем присутствие нитрата натрия в среде, содержащей кукурузный экстракт, приводит к изменению всего процесса обмена веществ стрептомицета. Так, концентрация KN 0 3, равная 0,25%, препятствует вовлечению в обмен веществ стрептомицета молочной кислоты, находящейся в кукурузном экстракте; при 0,5% KN03 кислота потребляется, а при 1 % - она не только используется организмом, но и образуется им вновь. Источники углерода. Наилучшим 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 антибиотическое вещество 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 стрептомицета. Путь 219 использования масла стрептомицетом, по-видимому, тот же, что и для других организмов: гидролиз до глицерина и жирных кислот с последующим ~-окислением их. Спирты, за исключением маннита и глицерина, непригодны для роста стрептомицета и синтеза антибиотика. Из органических кислот молочная, пировиноградная и лимонная в синтетических средах стимулируют образование стрептомицина. Использование смеси яблочной и янтарной кислот в среде, содержащей основные аминокислоты, способствует значительному увеличению продуцирования антибиотика. Вместе с тем винная кислота, не повышая выхода стрептомицина, положительно влияет на рост стрептомицета. 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 имеет важное значение в развитии S. griseus и образовании антибиотика. Увеличение концентрации фосфора в среде до определенного предела усиливает выработку стрептомицина, дальнейшее же повышение содержания фосфора, не оказывая заметного влияния на рост мицелия, снижает образование антибиотика. Избыток фосфора в среде влияет на биохимический состав цитоплазмы, изменяет цикл развития стрептомицета и нарушает некоторые физиологические функции клеток. Значительное увеличение содержания неорганического источника фосфора ускоряет потребление углеводов и подавляет развитие стрептомицета, а следовательно, и выработку стрептомицина.

**Промышленное получение стрептомицина**

Производство стрептомицина началось в конце 1946 г., и в течение первого года было выпущено около 1000 кг, а уже через два года - около 36 тонн. К настоящему времени производство этого антибиотика составляет не менее 300 т в год. Увеличение производства антибиотика осуществлялось не только за счет расширения и увеличения числа промышленных предприятий, но и благодаря таким мероприятиям, как: 1) получение наиболее активных штаммов стрептомицета - продуцента стрептомицина; 2) подбор наиболее благоприятных сред и других условий культивирования продуцента, обеспечивающих высокий биосинтез стрептомицина; 3) разработка наиболее рациональных методов выделения и очистки антибиотика. Получение наиболее активных штаммов стрептомицета - продуцента стрептомицина. Селекция наиболее продуктивных штаммов S. grieus - одна из первостепенных задач в деле увеличения выхода стрептомицина. Если раньше только что выделенные штаммы продуцента стрептомицина образовывали не более 50- 100 мкг/мл антибиотика, то теперь полуЧены штаммы, которые вырабатывают до 20 ООО мкг/мл стрептомицина. В промышленных условиях используют штаммы S. griseus, способные синтезировать до 10-20 тыс. мкг/мл антибиотика. Таким образом, только за счет селекции антибиотическая продуктивность этих штаммов по сравнению с исходными повысилась в 100-200 раз. Важную роль в селекции продуцентов стрептомицина играют индуцированный мутагенез и ступенчатый отбор. Для получения мутантов широко применяют мутагенные факторы: рентгеновское и ультрафиолетовое излучения. Обычно для получения мутантов с повышенным образованием стрептомицина используется метод многократного облучения спор стрептомицета ультрафиолетовым светом с доведением общей дозы до 1 О 000-20 ООО эрг/мм2 с последующим применением видимого света. В результате были получены новые штаммы, сохраняющие высокую антибиотическую активность:



Подбор наиболее подходящей среды и установление режима развития стрептомицета. Эти условия играют существенную роль в увеличении выхода стрептомицина. Большинство заводов, производящих стрептомицин, работают на так называемых соевых средах, в состав которых входят соевая мука, гидрол, аммонийные соли и некоторые другие компоненты. На этих средах и при современных условиях развития стрептомицета удается достичь высокого выхода стрептомицина. Важно отметить, что каждому вновь выделенному в результате селекции штамму стрептомицета должны соответствовать определенная среда и свой режим для развития стрептомицета. Метод выделения и очистки стрептомицина. С помощью этого метода определяют как количество получаемого антибиотика, так и его качество. Чем лучше очищен препарат от балластных веществ, тем выше его миллиграммовая активность и выше лечебные качества. Благодаря использованию совершенных методов вьщеления и очистки стрептомицина удается получить препараты, содержащие до 800 мкг/мг и более стрептомицина с выходом антибиотика до 95-97%. Вьщеление стрептомицина из культуральной жидкости Стрептомицин - сильно полярное органическое основание. По структуре стрептомицин (см. с. 230) представляет собой сложную молекулу с большим числом гидрофильных и функциональных групп. Гуанидиновые группы в стрептидиновой части молекулы и метилиминная группа в N-метилглюкозаминной части молекулы антибиотика обусловливают его сильные основные свойства. Стрептомицин в виде свободного основания или в виде солей неорганических кислот хорошо растворим в воде. Однако соли неорганических кислот стрептомицина нерастворимы почти во всех органических растворителях. Это обстоятельство имеет важное значение при разработке метода выделения антибиотика. Так, попытки экстрагировать стрептомицин из водных растворов при рН от 2 до 9 бутиловым спиртом или другими известными не смешивающимися с водой растворителями не увенчались успехом. Поэтому метод экстракции данного антибиотика не нашел применения. Основная масса антибиотика выделяется в культуральную жидкость. Однако часть стрептомицина остается в мицелии и на его поверхности. Поэтому культуральную жидкость вместе с биомассой обрабатывают минеральной кислотой, для того чтобы весь антибиотик перевести в раствор. После этого мицелий отделяют 242 с помощью фильтр-прессов или центрифуг, а свободную от мицелия культуральную жидкость обрабатывают щавелевой кислотой для удаления белков и органических оснований, а также ионов металлов (кальция, железа, магния и др.). Из полученных таким образом растворов вьщеляют стрептомицин. Метод адсорбции на активированном угле. Метод основан на том, что при кислой реакции раствора (рН 2-4) стрептомицин не адсорбируется на частицах активированного угля, в то время как ряд примесей при таком значении рН адсорбируется. Стрептомицин садится на уголь при нейтральном или слабощелочном значении рН. Концентрирование стрептомицина методом адсорбции на угле проводят следующим способом. Культуральную жидкость подкисляют до рН 2-4 и смешивают с активированным углем. Затем уголь отделяют, а обесцвеченную жидкость нейтрализуют щелочью до рН 7-7,5 и снова смешивают с новой порцией активированного угля, который после этого автоматически подается на фильтр-пресс. Остатки неактивной жидкости отделяют, а адсорбированный на угле стрептомицин промывают при нейтральной реакции водой и нейтральным спиртом для удаления растворимых в спирту примесей. Десорбцию (элюцию) стрептомицина с угля осуществляют с помощью кислого спирта, приготовленного с соляной кислотой. В этих условиях многие примеси остаются адсорбированными на угле. После элюции к раствору добавляют сухой серный эфир - в осадок выпадает солянокислая соль стрептомицина. Существуют и другие модификации адсорбционного метода вьщеления стрептомицина. Метод с применением ионообменных смол. Стрептомицин и другие аминогликозиды вьщеляют из культуральной жидкости, как правило, сорбционным методом с использованием карбоксильных катионитов. Метод основан на использовании катионообменных смол (катионитов) типа сополимеров акриловой или метакриловой кислот и дивинилбензола. Раствор стрептомицина пропускают через ряд колонн, заполненных катионитом. Стрептомицин садится на смолу. Адсорбированный антибиотик обычно вытесняют водными растворами минеральных кислот. В растворе содержится высококонцентрированный и весьма очищенный препарат стрептомицина. Дальнейшая очистка препаратов стрептомицина осуществляется разными методами. Один из наиболее эффективных методов очистки антибиотика - хроматографический с использованием оксида алюминия или ионообменных смол. Нередко применяют хлорид кальция с последующей перекристаллизацией. 243 Метод превращения стрептомицина в хлоркальциевый комплекс позволяет полностью освободиться от примесей маннозидострептомицина; последний как нежелательный компонент обычно появляется (до 5 % ) при развитии S. griseus. Стрептомицин образует комплексную соль с СаС1 , а маннозидострептомицин этой соли не образует. Стабильность стрептомицина Стабильность стрептомицина зависит от чистоты препарата, влажности, температуры, кислотности растворителя. Установлено, что химически чистый стрептомицин устойчив как в сухом состоянии, так и в виде растворов. Соли стрептомицина при хранении их при комнатной температуре инактивируются лишь в незначительной степени, и притом на протяжении нескольких лет. Даже при температуре 50 °С соли стрептомицина сохраняются в течение длительного времени. Максимум стабильности растворов гидрохлорида и сульфата стрептомицина находится при значении рН в пределах от 3,0 до 7,О при температуре ОТ 7 ДО 25 °С. Соли стрептомицина, поступающие в продажу, содержат менее 3% влаги и устойчивы при хранении в условиях комнатной температуры в течение длительного времени - до трех лет, считая со дня их выпуска, а растворы сульфата стрептомицина - до 1,5 года.

**Антибиотические свойства стрептомицина** По отношению к стрептомицину все микроорганизмы условно можно разделить на три группы. 1. Весьма чувствительные микроорганизмы, которые подавляются в большинстве случаев при концентрации стрептомицина 10 мкг/мл. Сюда можно отнести организмы родов Bacillus, Bordetella, Brucella, Klebsiel/a, Mycobacterium, Staphylococcus и некоторые другие. 2. Умеренно чувствительные микроорганизмы, для подавления которых in vitro необходима концентрация стрептомицина в пределах 10-100 мкг/мл. К этой группе относят многие бактерии из родов Enterobacter, Corynebacterium, Proteus, Streptococcus, Vibrio. 3. Устойчивые формы микробов, для подавления которых необходима концентрация антибиотика, превышающая 100 мкг/мл. К этой группе относятся роды Bacteroides, Clostridium, некоторые виды Proteus, многие виды грибов, дрожжей, вирусы. Итак, различные организмы неодинаково реагируют на присутствие в среде стрептомицина. Степень антимикробного действия антибиотика неодинакова и в отношении разных видов организмов. Наряду с тем, что стрептомицин подавляет рост многих видов микроорганизмов, к нему довольно легко появляется устойчивость; возникают формы бактерий, резистентные к стрептомицину. Повышение устойчивости к стрептомицину в 1000 раз возникает у золотистого стафилококка всего лишь через три пассажа на бульоне с возрастающими концентрациями антибиотика, а у Salmonella typhi повышение устойчивости в 22 600 раз наблюдалось после 14 пассажей. Устойчивые к стрептомицину формы бактерий образуются также in vivo.

**Лабораторная работа №9**

**Тема:** Макролиды и семейство аминокислот, пептидов и пептолипидов

**Задачи:** 1. Макролиды.

1. Семейство аминокислот.
2. Пептиды и пептолипидвы.

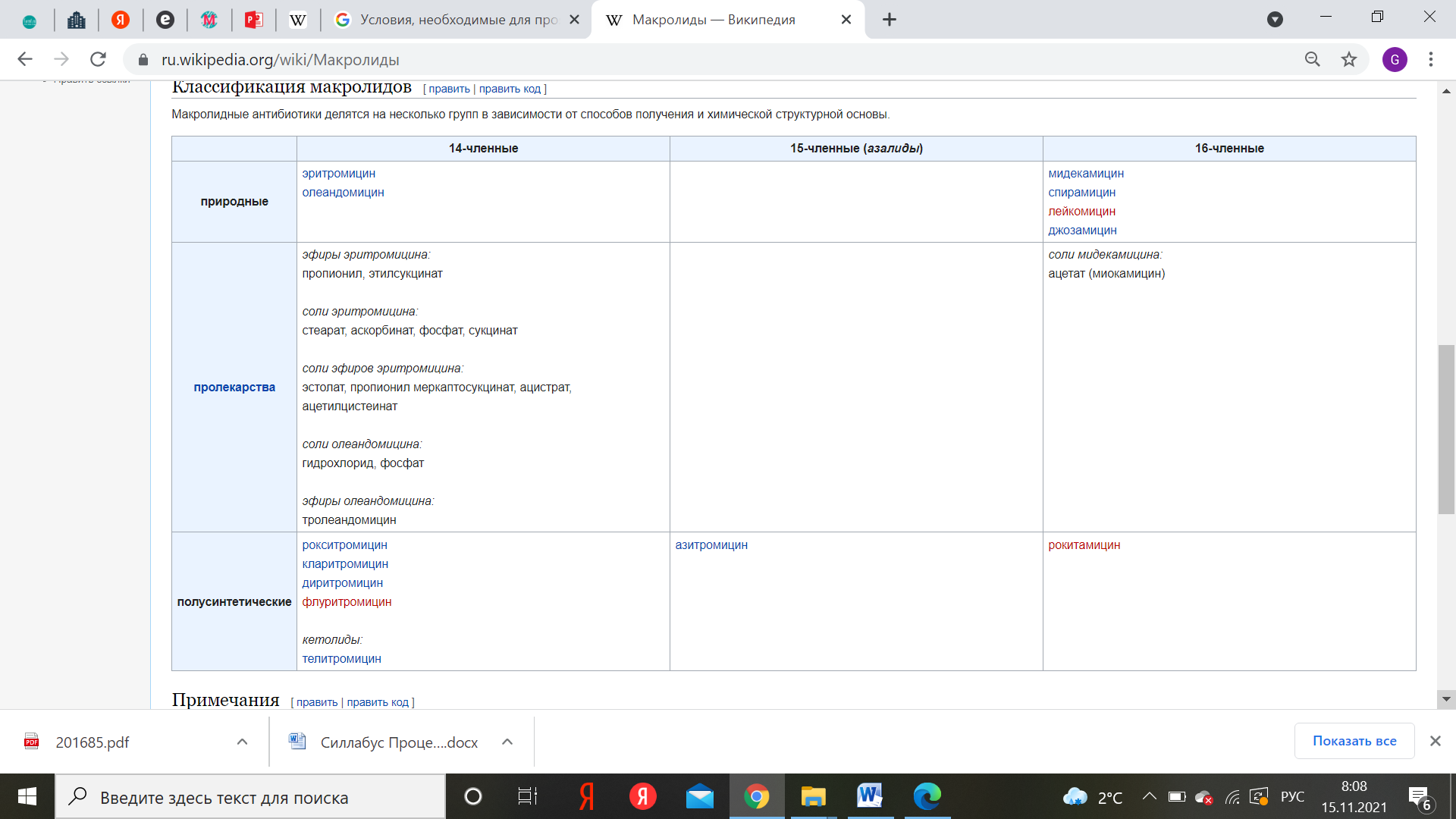
**Макролиды** — группа лекарственных средств, большей частью [антибиотиков](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%90%D0%BD%D1%82%D0%B8%D0%B1%D0%B8%D0%BE%D1%82%D0%B8%D0%BA%D0%B8), основой химической структуры которых является макроциклическое 14- или 16-членное [лактонное](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9B%D0%B0%D0%BA%D1%82%D0%BE%D0%BD%D1%8B) кольцо, к которому присоединены один или несколько [углеводных](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A3%D0%B3%D0%BB%D0%B5%D0%B2%D0%BE%D0%B4%D1%8B) остатков. Макролиды относятся к классу [поликетидов](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9F%D0%BE%D0%BB%D0%B8%D0%BA%D0%B5%D1%82%D0%B8%D0%B4), соединениям естественного происхождения.

Также к макролидам относят:

* **азалиды**, представляющие собой 15-членную макроциклическую структуру, получаемую путём включения атома азота в 14-членное лактонное кольцо между 9 и 10 атомами углерода;
* **кетолиды** — 14-членные макролиды, у которых к лактонному кольцу при 3 атоме углерода присоединена [кетогруппа](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9A%D0%B5%D1%82%D0%BE%D0%BD%D1%8B).

Кроме этого, в группу макролидов номинально входит относящийся к [иммунодепрессантам](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%98%D0%BC%D0%BC%D1%83%D0%BD%D0%BE%D1%81%D1%83%D0%BF%D1%80%D0%B5%D1%81%D1%81%D0%B8%D0%B2%D0%BD%D1%8B%D0%B5_%D0%BF%D1%80%D0%B5%D0%BF%D0%B0%D1%80%D0%B0%D1%82%D1%8B) препарат [*такролимус*](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A2%D0%B0%D0%BA%D1%80%D0%BE%D0%BB%D0%B8%D0%BC%D1%83%D1%81), химическую структуру которого составляет 23-членное лактонное кольцо.

Макролиды относятся к числу наименее токсичных антибиотиков. Макролидные антибиотики являются одной из самых безопасных групп антимикробных препаратов и хорошо переносятся пациентами. При применении макролидов не отмечено случаев гемато- и нефротоксичности, развития хондро- и артропатий, токсического влияния на центральную нервную систему, фотосенсибилизацию, а ряд нежелательных лекарственных реакций, свойственных другим классам антимикробных препаратов, в частности анафилактические реакции, тяжёлые токсико-аллергические синдромы и антибиотик-ассоциированная диарея, встречаются крайне редко[[1]](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9C%D0%B0%D0%BA%D1%80%D0%BE%D0%BB%D0%B8%D0%B4%D1%8B#cite_note-1).



Семейство аминокислот, пептидов и пептолипидов В составе этого семейства рассмотрим группу актиномицинов. АКТИНОМИЦИНЫ (ACTINOMYCINS) Актиномицин принадлежит к числу первых антибиотиков стрептомицетного происхождения, полученных в кристаллическом виде. Он был открыт и частично изучен 3. Ваксманом и 312 Х. Вудруфом еще в 1940 г. Этими же учеными антибиотик, выделенный из культуральной жидкости Streptomyces antibloiticus, был назван актиномицином. Актиномицин - красно-оранжевое вещество с высокой антибиотической активностью в отношении грамположительных бактерий и в меньшей степени - в отношении грамотрицательных. Открытие актиномицина и получение его в кристаллическом виде в 40-х гг. не привлекло большого внимания, так как антибиотик был чрезвычайно токсичен в отношении экспериментальных животных. Однако спустя примерно 15 лет после открытия актиномицина было выяснено, что это не единственное соединение, а большая группа близких по своим свойствам антибиотических веществ, образуемых разными видами стрептомицетов. Эти антибиотики в концентрации О, 1 мкг/мл подавляют развитие грамположительных и в концентрации 1-10 мкг/мл - грамотрицательных бактерий. Некоторые из них обладают противоопухолевым действием. В качестве продуцентов актиномицинов описано более 50 видов стрептомицетов: S. chrysomallus, S. flavus, S. flaveolus, S. parvus, S. parvulus, S. griseus, S. fradiae, S. melanochromogenes и др., а также некоторые виды Micromonospora и Actinoplanes. В 1949-1950 гг. Х. Брокман вьщелил из культуры S. chrysomallus актиномицин С. Затем он же с сотрудниками в 1952 г. описал актиномицин Х. В 1954 г. Р. Манакер с соавторами выделил актиномицин D из культуры одного штамма стрептомицета. К настоящему времени получено и описано более 100 актиномицинов, однако установлено, что многие препараты, имеющие разные названия, являются одними и теми же соединениями. Следует отметить, что образование различных типов актиномицинов зависит от вида (штамма) продуцента, состава среды, на которой он развивается, и от времени культивирования. В процессе биосинтеза образуются не единичные актиномицины, а смеси этих антибиотиков. Все актиномицины принадлежат к группе очень сходных между собой хромопептидов, состоящих из феноксазиновой хромофорной группировки (одинаковой для всех актиномицинов), называемой актиноцином, и двух депсипептидных боковых цепей, являющихся, как правило, пентапептидами. Каждый полипептид содержит лактонный цикл, образуемый гидроксильной группой L-треонина, который входит в состав всех актиномицинов, и карбоксилом С-концевой аминокислоты. Раскрытие лактонного цикла в молекуле антибиотика приводит к потере его биологической активности. 313 Разнообразие типов актиномицинов обусловлено неодинаковым аминокислотным составом их депсипептидных цепочек. У всех известных актиномицинов в 1-м положении от хромофорной части молекулы находятся два остатка L-треонина. Наиболее лабильны 2-е и 3-е положения от гетероцикла. Во 2-м положении могут быть D-аминокислоты: D-валин или D-аллоизолейцин либо их сочетания. В 3-м положении - L-пролин, гидроксипролин, L-кетопролин, саркозин. В 4-м положении всегда два остатка саркозина и в 5-м - два остатка L-N-метилвалина.

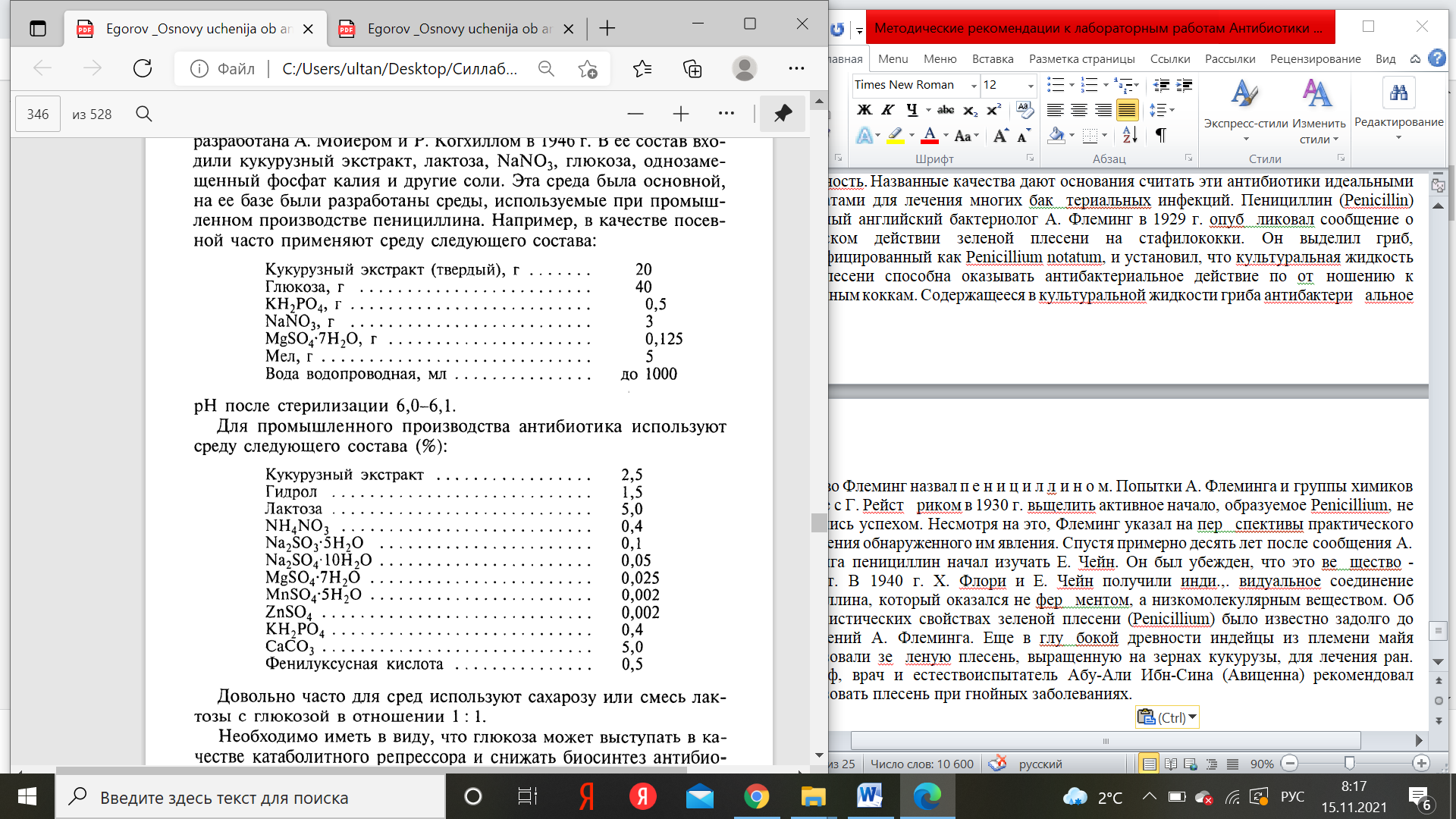
**Лабораторная работа №10**

**Тема:** Бета-лактамные антибиотики.

**Задачи:** ПЕНИЦИЛЛИН (Penicillin)

В соответствии с классификацией антибиотиков по их химическому строению Р-лактамы относятся к семейству антибиотических веществ, включающих в свои структуры производные аминокислот. К Р-лактамным антибиотикам относятся соединения, имеющие в своей структуре р-лактамное кольцо. Эти вещества образуются мицелиальными грибами (пенициллины, цефалоспорины, цефемы), стрептомицетами (карбапенемы, клавулановая кислота, цефамицины и др.), некоторыми видами нокардий (монобактамы). Наряду с антибактериальными свойствами некоторые соединения этой группы (карбапенемы) способны инактивировать р-лактамазы - ферменты бактерий, участвующие в деструкции Р-лактамного кольца пенициллинов и цефалоспоринов. По приблизительным подсчетам, из природных источников частичным или полным синтезом получено примерно 1О тыс. соединений, имеющих р-лактамное кольцо. Из этого числа соединений около 50 веществ применяется в клинике. Бета-лактамные антибиотики находят широкое применение в медицинской практике, так как обладают такими ценными качествами, как надежность, относительно широкий спектр ан ... тимикробного действия, высокая активность, стабильность и эффективность. Названные качества дают основания считать эти антибиотики идеальными препаратами для лечения многих бактериальных инфекций. Пенициллин (Penicillin) Известный английский бактериолог А. Флеминг в 1929 г. опубликовал сообщение о литическом действии зеленой плесени на стафилококки. Он выделил гриб, идентифицированный как Penicillium notatum, и установил, что культуральная жидкость этой плесени способна оказывать антибактериальное действие по отношению к патогенным коккам. Содержащееся в культуральной жидкости гриба антибактериальное вещество Флеминг назвал п е н и ц и л л и н о м. Попытки А. Флеминга и группы химиков во главе с Г. Рейстриком в 1930 г. вьщелить активное начало, образуемое Penicillium, не увенчались успехом. Несмотря на это, Флеминг указал на перспективы практического применения обнаруженного им явления. Спустя примерно десять лет после сообщения А. Флеминга пенициллин начал изучать Е. Чейн. Он был убежден, что это вещество - фермент. В 1940 г. Х. Флори и Е. Чейн получили инди.,. видуальное соединение пенициллина, который оказался не ферментом, а низкомолекулярным веществом. Об антагонистических свойствах зеленой плесени (Penicillium) было известно задолго до наблюдений А. Флеминга. Еще в глубокой древности индейцы из племени майя использовали зеленую плесень, выращенную на зернах кукурузы, для лечения ран. Философ, врач и естествоиспытатель Абу-Али Ибн-Сина (Авиценна) рекомендовал использовать плесень при гнойных заболеваниях.

**Условия образования пенициллина** Пенициллин относится к группе ~-лактамных антибиотиков. Антибиотики этой группы образуются не только плесневыми грибами, но и некоторыми видами стрептомицетов и нокардий. Получение пенициллина - замечательная веха в развитии микробиологии, химии и медицины. С производством этого антибиотика связано создание вначале довольно скромной, а затем весьма мощной антибиотической промышленности, формирование современной биотехнологии. В течение ряда лет пенициллин получали путем выращивания гриба в стеклянных матрацах на жидкой питательной среде. Это создавало огромные трудности в поддержании стерильности при засевах каждого матраца и требовало большой затраты рабочей силы. Учитывая, что выход антибиотика составлял всего несколько десятков единиц на 1 мл среды, себестоимость пенициллина была чрезвычайно высокой. Так, 1 кг пенициллина в США, как отмечал в 1959 г. Н. Гольдберг, стоил в 1943 г. 227 270 долларов, а в 1953 г. - всего 169 долларов, т.е. за десять лет его стоимость снизилась более чем в 1340 раз. В настоящее время ежегодно в мире получают около 17 тыс. т пенициллина (К. Кieslich, 1984) на общую сумму более 272 млн долларов (Р. Lowe, R.P. Elander, 1983), иными словами, 1 кг стоит всего 16 долларов. 343 Важным этапом в увеличении выхода пенициллина было изучение условий образования антибиотика. Первая среда для глубинного образования пенициллина была разработана А. Майером и Р. Когхиллом в 1946 г. В ее состав входили кукурузный экстракт, лактоза, NaN03, глюкоза, однозамещенный фосфат калия и другие соли. Эта среда была основной, на ее базе бьши разработаны среды, используемые при промышленном производстве пенициллина. Например, в качестве посевной часто применяют среду следующего состава:



**Лабораторная работа №11**

**Тема:** Антибиотические вещества высших растений и антибиотики животного происхождения

**Задачи:**

1. Антибиотические вещества высших растений
2. Антибиотики животного происхождения

Антибиотические вещества высших растений. Многие отечественные исследователи, изучавшие высшие растения, обращали внимание на то, что сок некоторых из них обладает бактерицидными свойствами или инактивирует токсическое действие других организмов. Однако наиболее подробно антибиотические вещества высших растений были изучены Б.П. Токиным. Еще в 1928 г. он обратил внимание на то, что если под стеклянный колпак поместить ветку черемухи (весной или летом) и рядом с ней поставить стакан с Protozoa в воде, то через 15-20 мин все простейшие погибают. Следовательно, летучие вещества, выделяемые черемухой, обладают антипротозойным действием. Биологически активные вещества высших растений Б.П. Токин назвал фитонцидам и. Фитонциды - продукты жизнедеятельности растений, обнаруженные у представителей всех групп высших растений. Наибольшим антибиотическим свойством обладают фитонциды лука, чеснока и некоторых других растений. Известно, что фитонциды представляют собой не отдельные вещества, а комплексы соединений. Фитонцидными свойствами обладают бальзамы, смолы, вещества хиноидного строения, дубильные вещества, содержащие лактонное кольцо, глюкозиды, антоцианы и другие соединения. Фитонциды некоторых растений способны стимулировать или подавлять развитие других растений на расстоянии. Обнаружены летучие фитонциды, способные убивать пыльцу других растений или стимулировать ее развитие. Внешние повреждения растений (ранения) способствуют образованию летучих фитонцидов. Этот факт указывает на их приспособительное значение. Растения одного вида, выращенные в разных условиях, образуют несколько отличные друг от друга фитонциды. Биологическая активность фитонцидов одного и того же растения зависит от сезона года: например, осенью хвоя сосны менее бактерицидна, чем хвоя, собранная в мае или июне. К настоящему времени из высших растений вьщелено более 700 антибиотических веществ, способных подавлять развитие бактерий, вирусов, угнетать рост опухолевых клеток. Антибиотики, выделенные из высших растений, имеют разнообразное химическое строение и относятся к различным группам соединений. Среди них встречаются алифатические соединения, алкалоиды и хиноны, эфирные масла и терпеновые соединения, полифенолы, кумарины и др. К числу наиболее изученных растительных антибиотиков относятся аллицин, берберин, госсипол, хинин и многие другие.

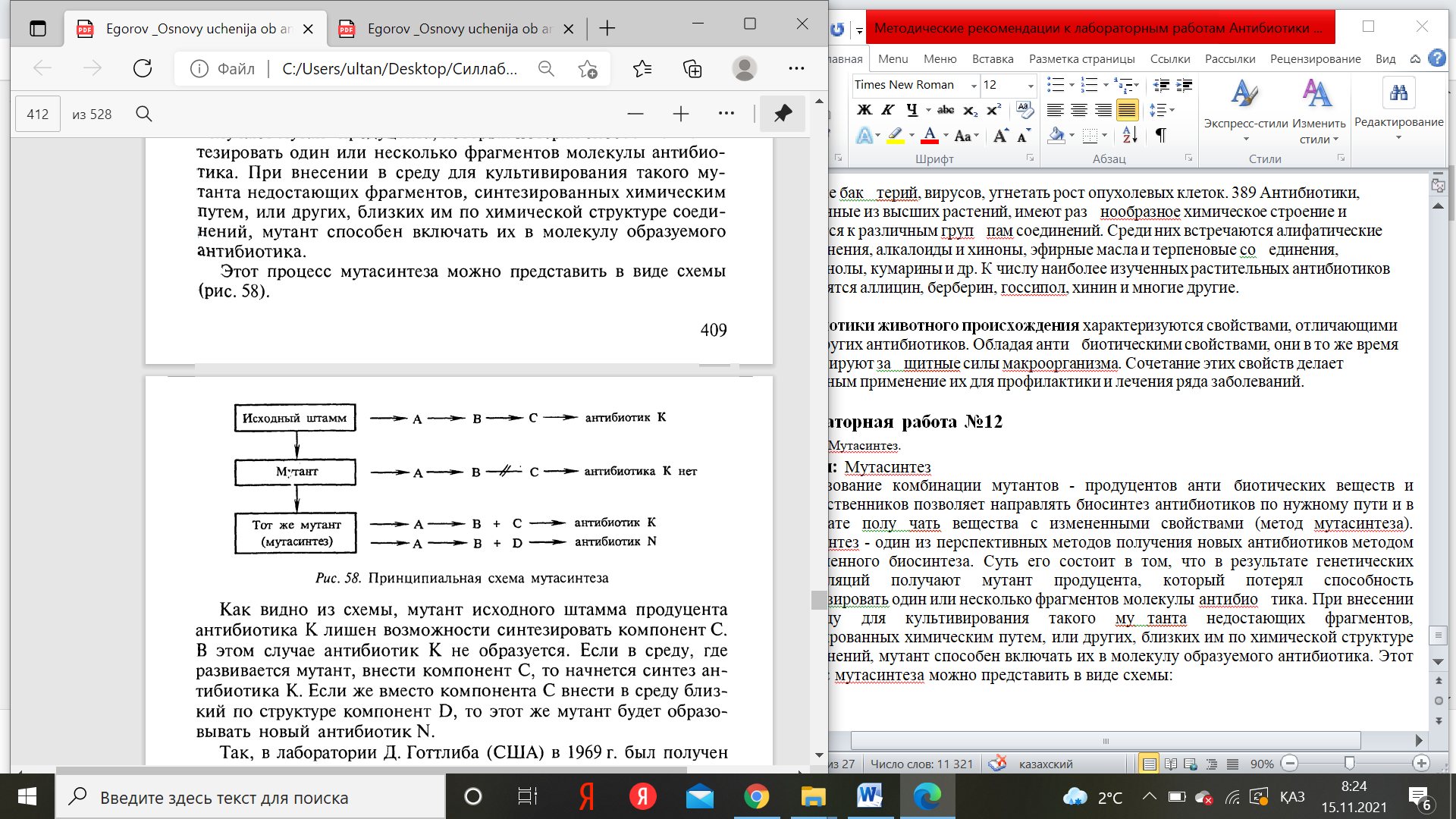
**Антибиотики животного происхождения** характеризуются свойствами, отличающими их от других антибиотиков. Обладая антибиотическими свойствами, они в то же время активизируют защитные силы макроорганизма. Сочетание этих свойств делает возможным применение их для профилактики и лечения ряда заболеваний.

**Лабораторная работа №12**

**Тема:** Мутасинтез.

**Задачи:** Мутасинтез

Использование комбинации мутантов - продуцентов антибиотических веществ и предшественников позволяет направлять биосинтез антибиотиков по нужному пути и в результате получать вещества с измененными свойствами (метод мутасинтеза). Мутасинтез - один из перспективных методов получения новых антибиотиков методом направленного биосинтеза. Суть его состоит в том, что в результате генетических манипуляций получают мутант продуцента, который потерял способность синтезировать один или несколько фрагментов молекулы антибиотика. При внесении в среду для культивирования такого мутанта недостающих фрагментов, синтезированных химическим путем, или других, близких им по химической структуре соединений, мутант способен включать их в молекулу образуемого антибиотика. Этот процесс мутасинтеза можно представить в виде схемы:



Как видно из схемы, мутант исходного штамма продуцента антибиотика К лишен возможности синтезировать компонент С. В этом случае антибиотик К не образуется. Если в среду, где развивается мутант, внести компонент С, то начнется синтез антибиотика К. Если же вместо компонента С внести в среду близкий по структуре компонент D, то этот же мутант будет образовывать новый антибиотик N. Так, в лаборатории Д. Готтлиба (США) в 1969 г. был получен мутант S.fradiae - продуцент неомицина, который способен синтезировать молекулу антибиотика, за исключением ее 2-дезоксистрептаминовой части. Биосинтез неомицина этим мутантом отмечается только в том случае, если в среду для его развития добавлялся 2-дезоксистрептамин. При замене этого соединения его аналогами удалось получить новые биологически активные неомицины. Сходный метод был использован и для получения аналогов других антибиотиков (новобиоцина, стрептомицина, гентамицина и некоторых других).

**Вопросы для самоконтроля**

1. Что такое направленный биосинтез антибиотиков? Его значение в процессе получения антибиотических веществ.

2. Охарактеризуйте основные пути достижения целенаправленного биосинтеза антибиотиков.

**Лабораторная работа №13**

**Тема:** Основные механизмы биологического действия антибиотиков

**Задачи:** Общие сведения о действии антибиотиков

Основные механизмы биологического действия антибиотиков. По механизму биологического действия антибиотические вещества условно подразделяют на несколько основных групп.

1. Антибиотики, ингибирующие синтез клеточной стенки бактерий, а точнее, синтез пептидогликана (пенициллины, бацитрацин, ванкомицин, цефалоспорины, 0-циклосерин) и грибов (полиоксины, никкомицин).

2. Антибиотики, нарушающие функции мембран (альбомицин, аскозин, грамицидины, кандицидины, нистатин, трихомицин, эндомицин и др.).

3. Антибиотики, избирательно подавляющие синтез (обмен) нуклеиновых кислот: а) ингибирующие синтез РНК (актиномицин, гризеофульвин, канамицин, неомицин, новобиоцин, оливомицин и др.); б) подавляющие синтез ДНК (актидион, брунеомицин, новобиоцин, саркомицин, эдеин и др.).

4. Антибиотики - ингибиторы синтеза пуринов и пиримидинов (азасерин, декоинин, саркомицин и др.).

5. Антибиотики, подавляющие синтез белка (бацитрацин, виомицин, канамицин, метимицин, неомицин, тетрациклины, хлорамфеникол, эритромицин и др.).

6. Антибиотики - ингибиторы энергетического метаболизма (антимицины, олигомицины, патулин, пиоцианин, усниновая кислота и др.).

7. Антибиотики - ингибиторы окислительного фосфорилирования (валиномицин, грамицидины, колицины, олигомицин, тироцидин и др.).

8. Антибиотики с антиметаболитными свойствами (пуромицин, ациодомицин, D-циклосерин и др.).

9. Антибиотики с иммуномодуляторными свойствами (актиномицины С и D, оливомицин, брунеомицин, рубомицин, циклоспорин, макролидный антибиотик К-506 и др.). Кроме перечисленных процессов антибиотики могут подавлять и другие жизненно важные реакции в клетке. Антибиотик, включенный в ту или иную группу на основе специфики механизма биологического действия, в зависимости от концентрации препарата и других условий может выступать в роли ингибитора других процессов. Например, тетрациклин в небольших концентрациях оказывает специфическое действие на биосинтез белка бактериями. Но если концентрацию антибиотика увеличить в 100 и 1000 раз то он будет выступать в качестве разобщителя окислительного фосфорилирования. Следовательно, приведенное деление антибиотиков на группы условно. Ниже рассматриваются наиболее полно изученные механизмы действия антибиотиков.

**Лабораторная работа №14**

**Тема:** Продуценты вторичных метаболитов антибиотиков. Моечные машины, оборудование и машины для розлива. Этикетирование. Упаковка.

**Задачи:** 1. Продуценты вторичных метаболитов антибиотиков (Подготовка посевного материала, предварительная обработка культуральной жидкости, выделение и химическая очистка антибиотиков)

1. Моечные машины, оборудование и машины для розлива. Этикетирование. Упаковка.

Методы культивирования продуцентов антибиотиков. В современных условиях наиболее перспективным методом выращивания микроорганизмов - продуцентов антибиотиков или других биологически активных соединений признан метод глубинного культивирования. Метод состоит в том, что микроорганизм развивается в толще жидкой питательной среды, через которую непрерывно пропускается стерильный воздух и среда перемешивается.

Существует четыре основные модификации глубинного способа выращивания микроорганизмов.

1. Периодическое культивирование. При этом способе весь процесс развития микроорганизмов полностью завершается в одном ферментере, после чего ферментер освобождается от культуральной жидкости, тщательно промывается, стерилизуется и вновь заполняется свежей питательной средой. Среда засевается изучаемым микроорганизмом, и процесс возобновляется.

2. Отъемный метод. Культивирование микроорганизмов осуществляется в ферментерах с периодическим отбором части объема культуральной жидкости (от 30 до 60% общего объема). При этом объем культуральной жидкости в ферментере доводится свежей питательной средой до исходного уровня.

3. Батарейный способ. Микроорганизмы развиваются в ряду последовательно соединенных ферментеров. Культуральная жидкость на определенной стадии развития микроорганизма перекачивается из первого ферментера во второй, затем из второго - в третий и т.д. Освобожденный ферментер немедленно заполняется свежей питательной средой, засеянной микроорганизмом. При этом способе выращивания микроорганизмов емкости используются более рационально.

4. Непрерывное культивирование. Метод принципиально отличен от указанных модификаций глубинного культивирования продуцентов антибиотиков. В основе метода лежит принцип непрерывного протока питательной среды, что позволяет поддерживать развитие микроорганизма на определенной стадии его роста. Стадия развития микроорганизма определяется тем, что в этот период происходит максимальный биосинтез антибиотика или другого биологически активного соединения. При обычном процессе непрерывного культивирования продуцентов антибиотиков интенсивность биосинтеза антибиотического вещества, как правило, снижается по сравнению с периодическим культивированием. Несмотря на это, исследования по применению непрерывного культивирования для производства антибиотиков продолжаются. В условиях непрерывного процесса биосинтеза некоторых антибиотиков можно получить хорошие результаты, если процесс вести в две стадии: в первом аппарате батареи поддерживают высокую скорость потока, обеспечивающую большую скорость роста продуцента антибиотика, с тем чтобы получить молодую высокоактивную биомассу, а во втором аппарате обеспечивают низкую скорость потока и соответственно небольшую скорость роста. Процесс непрерывного культивирования - перспективное направление современной биотехнологии.

ФЕРМЕНТЕРЫ.

Для изучения условий образования антибиотиков и их производства в промышленных масштабах применяют ферментеры - специальные герметически закрытые емкости, в которых создаются хорошие условия для глубинного развития продуцента и биосинтеза им антибиотика. Ферментер снабжен приспособлениями для достаточной аэрации и перемешивания культуры, поддержания 11 10 7 б необходимой температуры, а также контрольно-измерительными приборами (рис. 65). Аэрирование культуры происходит в результате подачи стерильного, подогретого до необходимой температуры воздуха через специальные приспособления - барботеры - и перемешивания культуральной жидкости различного типа мешалками (пропеллерными, турбинными и др.), а также использования отбойников. Аэрация культуры повышается при использовании мешалок новых конструкций. Поддержание температуры, оптимальной для хорошего роста продуцента антибиотика и проявления им повышенной физиолога-биохимической активности, обеспечивается рубашкой ферментера или системой змеевиков. Змеевики используются таюке для подачи пара в процессе стерилизации или воды для охлаждения. Наблюдение за основными процессами жизнедеятельности организма осуществляется контрольно-измерительной аппаратурой, позволяющей поддерживать на заданном уровне температуру внутри ферментера, рН среды, количество пропускаемого воздуха, давление внутри ферментера и другие параметры. Применяются установки, позволяющие автоматически определять содержание азота в среде в ходе развития организма. Ферментеры снабжены приспособлениями для переноса инокулята, внесения дополнительных питательных веществ, необходимых для лучшего развития продуцента, пеногасителем и устройством для взятия проб. В современных ферментерах контрольно-измерительная аппаратура соединена с компьютером, что позволяет автоматически контролировать весь биосинтетический процесс по заданной программе. В зависимости от характера работ используют разные типы ферментеров: лабораторные, полупроизводственные, производственные. Лабораторные ферментеры изготовляются из стекла или нержавеющей стали и имеют, как правило, емкость не более 30 л. Стерилизуют такие ферментеры обычно в автоклавах. Питательную среду, как правило, стерилизуют отдельно, а затем переносят в стерильный ферментер. Полупроизводственные ферментеры имеют емкость 100 л, выполнены из нержавеющей стали. Промышленные ферментеры. В промышленных условиях получения антибиотиков применяют ферментеры различной емкости - от 0,5 до 100 .

ПОДГОТОВКА ПОСЕВНОГО МАТЕРИАЛА Подготовка посевного материала - одна из ответственейших операций в биотехнологическом цикле получения антибиотиков. От количества и качества посевного материала зависит как развитие микроорганизма в ферментере, так и биосинтез антибиотика. Продуцент антибиотика обычно выращивают на богатых по составу натуральных средах, способных обеспечить наивысшую физиологическую активность микроорганизмов.

**Подготовка посевного материала – процесс многоступенчатый рисунок смотрим ниже.**

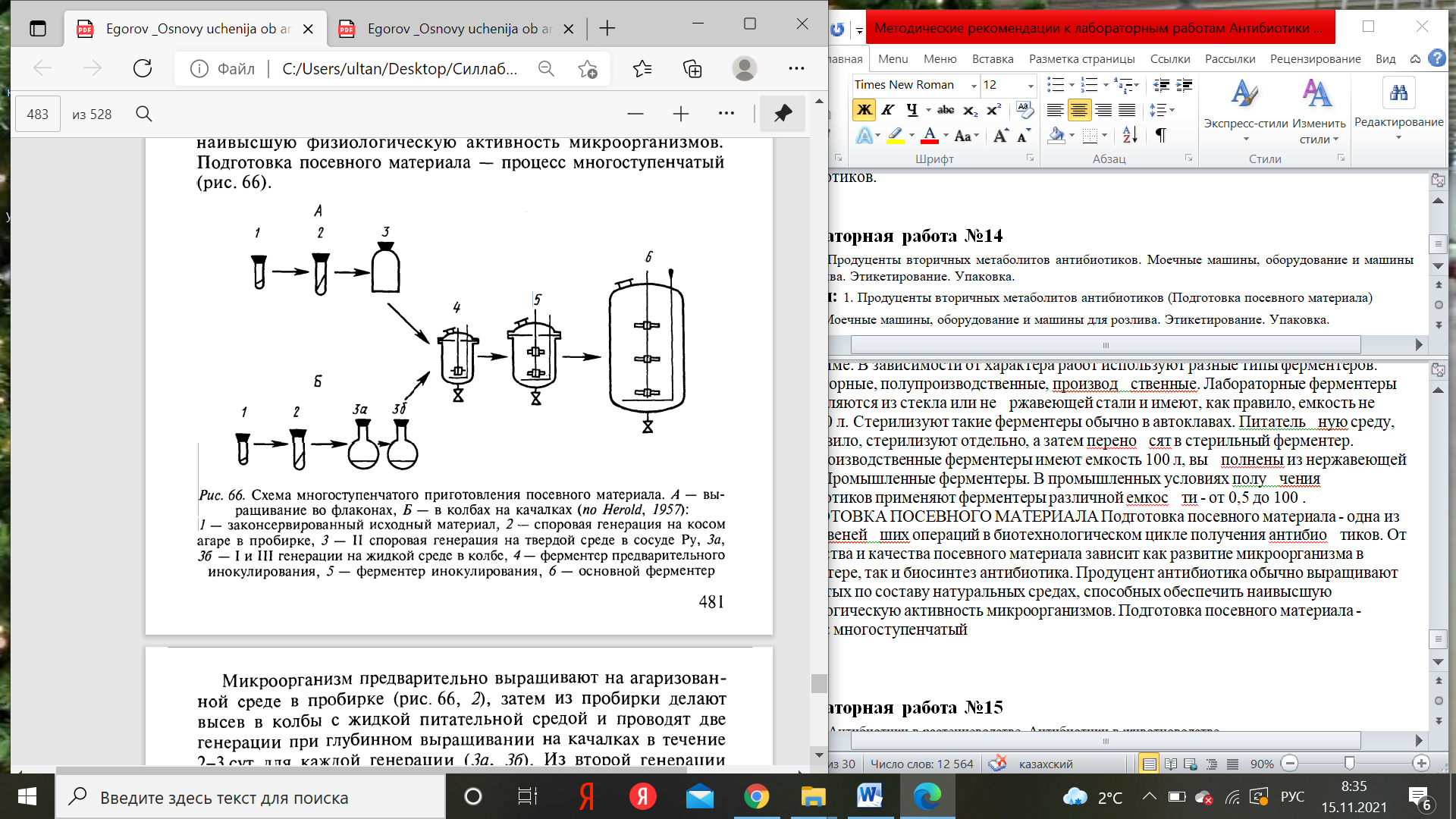
IIредварительная обработка культуральной жидкости, выделение и химическая очистка антибиотиков. В процессе развития микроорганизмов образуемые ими антибиотики в большинстве случаев почти полностью вьщеляются из клеток в окружающую среду. Однако в ряде случаев в культуральную жидкость попадает лишь часть антибиотика, а другая часть сохраняется внутри клеток. У ряда продуцентов антибиотик почти полностью содержится в клетках организма. В зависимости от того, где антибиотическое вещество сосредоточено, применяют соответствующие методы его извлечения. Так, если антибиотик находится в культуральной жидкости, его вьщеляют методами экстракции, используя для этого растворители, не смешивающиеся с жидкой фазой, осаждают в виде нерастворимого соединения или сорбируют ионообменными смолами. Из клеток микроорганизмов антибиотик выделяют с помощью экстракции органическими растворителями. Если антибиотик содержится и в культуральной жидкости, и в Юiетках продуцента, то сначала антибиотик переводят в фазу, из которой наиболее целесообразно его изолировать. Например, антибиотик, содержащийся в культуральной жидкости, и клетки с антибиотическим веществом переводят в осадок, из которого антибиотик экстрагируют. Отделение нативного раствора от биомассы и взвешенных частиц проводят методами фильтрации или центрифугирования. Для фильтрации применяют фильтр-пресс, нутч-фильтр, друк-фильтр, центрифуги, сепараторы. Фильтр-прессы употребляют для обработки больших объемов культуральной жидкости. Аппараты состоят из ряда чередующихся плит и рам и фильтрующих перегородок между ними. Процесс фильтрации осуществляется под давлением. Для фильтрации небольших объемов культуральной жидкости обычно используют нутч-фильтры или друк-фильтры. Первый аппарат работает под вакуумом, а во втором процесс фильтрации осуществляется благодаря поддержанию давления над фильтрующейся жидкостью. Широко распространен и способ центрифугирования. Хорошие результаты получают в том случае, если при правильном выборе скорости подачи жидкости скорость вращения центрифуги достигает 15 ООО об/мин. Отделять мицелий или другие взвешенные частицы можно также в сепараторах. При скорости вращения барабана сепаратора 7000-7 500 об/мин благодаря центробежной силе твердые частицы устремляются к стенкам барабана 484 и осаждаются там, а отсепарированная жидкость стремится к центру барабана и поднимается вверх в специальную камеру. Цель химической очистки - извлечение антибиотика из нативной жидкости или из клеток продуцента, его концентрация и освобождение (собственно очистка) от сопутствующих примесей и в конечном счете получение высокоочищенного препарата, пригодного для соответствующего применения. В ряде случаев антибиотические вещества под влиянием жестких внешних факторов (повышенная температура, высокая кислотность или щелочность и др.) теряют свои свойства, инактивируются. Поэтому при их выделении и очистке необходимо соблюдать максимум осторожности. Например, полиеновые макролидные антибиотики содержат ряд чувствительных к внешним воздействиям группировок: сопряженные двойные связи, аминосахара, макролактонное кольцо. Все это делает их нестабильными при выделении и очистке. Нестабильность названных групп антибиотиков обусловлена, как правило, их термоокислительной инактивацией. Причем начальная стадия инактивации связана с образованием свободных радикалов, пероксидов и некоторых других соединений на стадии вьщеления и очистки. Применение антиоксидантов способствует стабилизированию полиенов при экстракции их из мицелия. Основные методы очистки антибиотиков следующие. Метод экстракции. Нередко для очистки антибиотика от различных примесей его многократно переводят из одного растворителя в другой с предварительным осаждением (кристаллизацией). Такой прием носит название перекристаллизации. Ионообменная сорбция. Водные растворы антибиотиков, являющихся по химической природе кислотами, основаниями или амфотерными соединениями, пропускают через колонки с соответствующими ионообменными смолами, на которых антибиотики сорбируются, а раствор с частью примесей, имеющих противоположный антибиотику заряд, проходит через колонку. Смолы в зависимости от положительного или отрицательного заряда их ионов называют катионитами или анионитами. Антибиотик (как отрицательно заряженный ион) будет сорбироваться на катионитной смоле, и наоборот. Адсорбированный на смоле антибиотик элюируют (десорбируют), в результате чего получают значительно очищенный и концентрированный препарат. Затем раствор этого препарата можно вновь пропустить через ионообменную смолу, но имеющую противоположный заряд. При этом на смоле осядут примеси, а раствор более очищенного антибиотика пройдет через колонку. 485 Метод осаждения. Антибиотик связывают с органическими или неорганическими веществами для получения соединения, выпадающего в осадок, последний с помощью фильтров или центрифугирования отделяют от нативного раствора, промывают и в ряде случаев высушивают. Образовавшееся соединение растворяют и антибиотик экстрагируют или вновь осаждают (кристаллизуют). Одна из стадий химической очистки антибиотиков - концентрирование полученных растворов; достигается это отгонкой большей части растворителя, как правило, в высоком вакууме. Применяемые методы выделения и химической очистки, а также качество оборудования и используемых реактивов имеют большое значение прежде всего для улучшения качества получаемого антибиотика и увеличения выхода препарата. Сушка, контроль и расфасовка препарата После выделения и химической очистки антибиотика его необходимо высушить, т.е. удалить из препарата свободную и связанную воду. Поскольку большинство антибиотиков в той или иной степени термолабильны, для их высушивания применяют методы, не приводящие к потере биологической активности, не изменяющие цвета препарата. На этапе промышленного получения антибиотиков используют следующие методы обезвоживания. Лиофильная сушка антибиотиков - широко распространенный прием; проводится при сравнительно низких температурах (от -8 до -12 °С). Высушивание с применением распылительной сушилки - прогрессивный метод при работе с большими количествами антибиотика; раствор антибиотика пневматически распыляется до мельчайших капель в камере с потоком нагретого воздуха. Процесс высушивания антибиотиков занимает несколько секунд. При этом даже термолабильные препараты не меняют свойств. Метод взвешенного слоя или сушка в вакуум-сушильных шкафах применяется для высушивания зернистых и пастообразных антибиотических препаратов. Контроль препарата. Готовый антибиотик подвергается тщательному контролю: биологическому и фармакологическому. При биологическом контроле ставится задача выяснения стерильности готового препарата. Для этого обычно используют два метода. Первый связан с инактивацией антибиотика и высевом его в соответствующую питательную среду. Например, биологический контроль бензилпенициллина и полусинтетических препаратов, 486 полученных на его основе, проводится следующим образом. В пробирки, содержащие тиогликолевую среду, вносят фермент ~-лактамазу в количестве, способном полностью инактивировать пенициллин. Пробирки с ферментом вьщерживают 2-3 сут при температуре 37 °С для контроля его стерильности, затем в них вносят раствор пенициллина. Пробирки разделяют на две группы: одну выдерживают при 37, а другую - при 24 °С в течение 5 сут. Ведут ежедневное наблюдение за возможным развитием микроорганизмов. Второй метод выяснения стерильности антибиотиков определяется тем, что для большинства этих соединений не имеется инактиваторов их биологической активности. Поэтому выявляют устойчивые к изучаемым препаратам формы микроорганизмов и определяют возможное присутствие в таких препаратах чувствительной к ним микрофлоры, мя чего раствор антибиотиков пропускают через мембранные фильтры с диаметром пор не более 0,75 мкм. Необходимо подчеркнуть, что стерильность готового антибиотика обеспечивается соблюдением стерильных условий работы на всех стадиях процесса развития продуцента, вьщеления и очистки препарата. Фармакологический коптроль. К антибиотическим веществам, используемым в медицинской практике, в соответствии с Государственной фармакопеей СССР предъявляются очень строгие требования. Каждый новый лекарственный препарат, прежде чем он будет разрешен к практическому применению, должен пройти всесторонние испытания на токсичность, пирогенность и другие свойства, жизненно важные для организма. Препарат изучают на разных видах животных в отношении его острой и хронической токсичности (влияние на кровь, центральную нервную систему, дыхание и т.д.). Показатели острой токсичности - один из критериев качества антибиотического вещества. Устанавливают максимально переносимую дозу (МПД) антибиотика, дозу, вызывающую гибель 50% подопытных животных (LD50), и смертельную дозу (LD100). Только после всестороннего и тщательного изучения препарата он может быть рекомендован к практическому применению. Расфасовка и упаковка аптибиотика - завершающий этап работы. Расфасованный и упакованный антибиотик с указанием показателя биологической активности, даты выпуска и срока годности поступает в продажу. Обобщая весь многостадийный и многоступенчатый процесс получения антибиотика, можно отметить, что он включает четыре основные стадии.

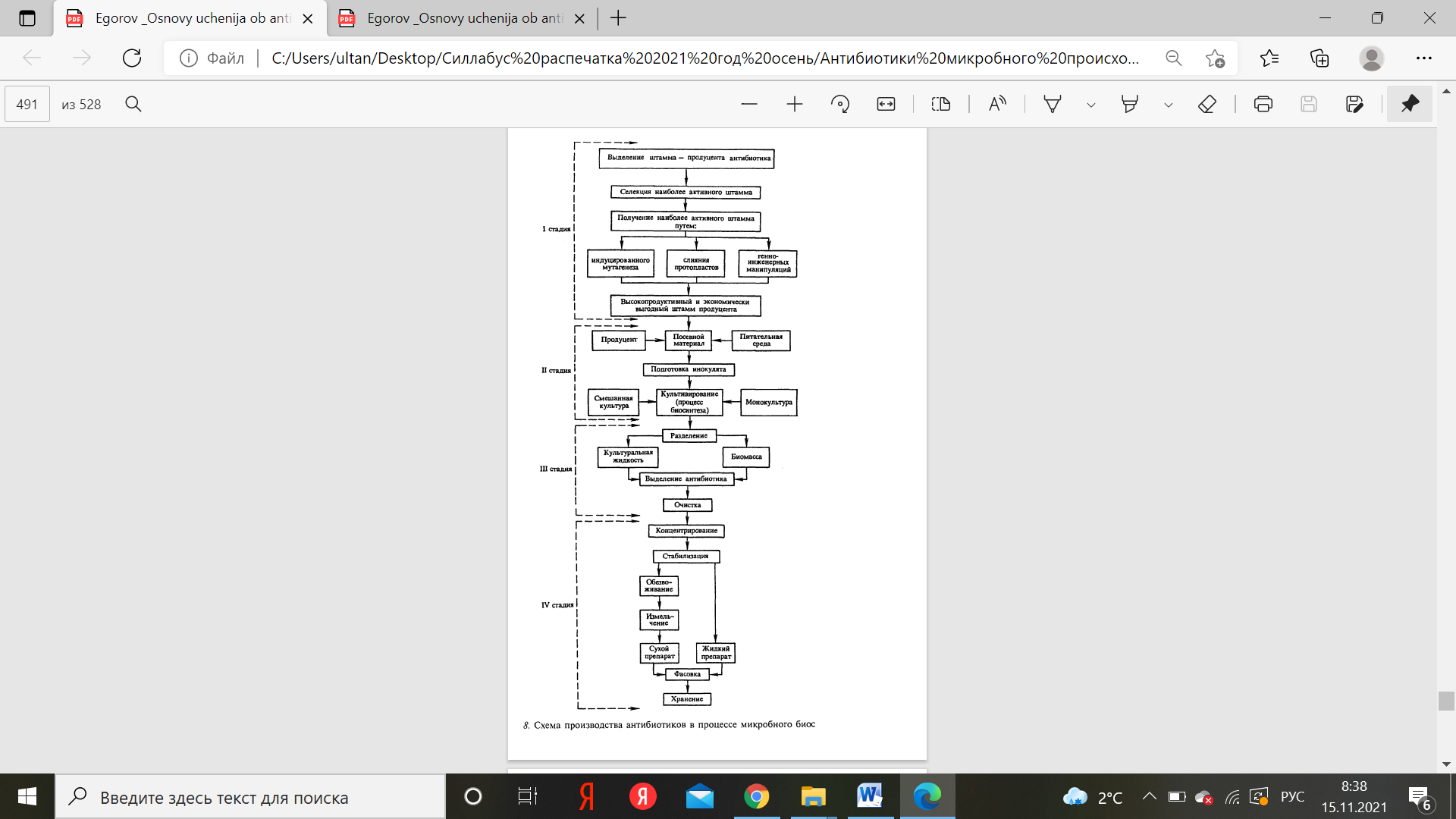
1 стадия - получение соответствующего штамма - продуцента антибиотика, пригодного для промышленного производства.

II стадия непосредственно связана с процессом биосинтеза антибиотика.

III стадия - это процессы выделения и очистки образовавшегося в ходе биосинтеза антибиотика.

IV стадия включает операции, связанные с концентрацией антибиотика, его стабилизацией и получением готового продукта. Важно подчеркнуть, что на всех стадиях получения антибиотика должна строго соблюдаться технологическая дисциплина, все процессы должны осуществляться только в стерильных условиях. Строгое соблюдение технологического процесса на II стадии обеспечивает возможность максимального биосинтеза антибиотика и наибольший выход конечного продукта. Особое внимание должно быть обращено на III стадию, связанную с выделением и очисткой антибиотика. При нарушении технологической дисциплины и использовании не соответствующего тем или иным операциям оборудования или его неисправности происходят большие потери антибиотика, которые могут нанести предприятию существенный экономический урон.





**Лабораторная работа №15**

**Тема:** Антибиотики в растениеводстве. Антибиотики в животноводстве.

**Задачи:**

Антибиотики в растениеводстве Проведено много исследований, посвященных использованию антибиотиков в борьбе с фитопатогенными организмами, наносящими ущерб сельскому хозяйству. Известно, что заболевания растений вызываются разньrми группами фитопатогенных организмов: вирусами, бактериями, грибами, простейшими и др. Поражение растений происходит как при развитии в полевых условиях, в садах, так и в теплицах и оранжереях. Источниками заражения растений фитопатогенными организмами могут быть семена (с наружной и внутренней инфекцией), растительные остатки, посадочный материал (черенки, саженцы, клубни, корнеплоды) и сама почва. Биологические средства защиты растений по сравнению с химически синтезированными препаратами (пестицидами) экологически более чистые и безвредные. Поэтому им в последнее время отдается предпочтение. При выборе антибиотика для борьбы с возбудителем заболевания и очагом его распространения, а также способа применения препарата основное внимание обращают не только на биологический эффект, но и на экономическую сторону, и на экологические аспекты. Назначение препарата и метод его применения должны быть экономически выгодны и экологически безвредны. Основные требования, предъявляемые к антибиотикам, используемым в борьбе с фитопатогенными организмами, сводятся к следующему: 1) антибиотик должен быть активным в отношении возбудителя заболевания, т.е. обладать специфичностью биологического действия; 2) легко проникать в ткани растений; 3) лечебные дозы должны быть безвредными для растения; 4) антибиотик на поверхности и внутри растения должен медленно инактивироваться, но, попадая в почву, легко разлагаться там; 5) обладать биологическим действием внутри тканей растения; 6) не наносить ушерба окружающей среде. Одно из существенных требований к антибиотикам, применяемым в сельском хозяйстве, то, что они не должны использоваться в медицинской практике во избежание возникновения и распространения резистентных к ним форм микроорганизмов. Методы использования антибиотиков выбирают в зависимости от вида заболевания (сосудистый вилт, поражение листьев и др.), стадии развития растения, размеров растения, места произрастания и способа посадки. Наиболее широкое применение имеют непосредственная обработка почвы, обрызгивание или опьшение антибиотиком наземных частей растений, смачивание семян, корней или других органов растворами антибиотиков и др. Все приемы использования антибиотиков основаны на том, что препарат, нанесенный на поверхность листьев, ствола (стебля), семян или же внесенный в почву, задерживает рост фитопатогенных организмов, находящихся как на поверхности, так и внутри органов и тканей растения, или убивает эти микроорганизмы. Антибиотики, нанесенные на наземные части растений или внесенные в почву, проникают в растение через корневую систему, стебель или листья и довольно быстро расходятся по растению. Однако такие антибиотики, как гризеофульвин, распространяются по тканям и органам растения очень медленно. Попав в растение, антибиотики сохраняются в его тканях сравнительно долго - от 5 до 20 сут.

Антибиотики в животноводстве Антибиотики начали применять в животноводстве вскоре после их открытия. Прежде всего они нашли широкое применение в ветеринарии как лечебные средства против многих заболеваний сельскохозяйственных животных (копытная болезнь оленей, мыт лошадей, рожа поросят, мастит крупного рогатого скота, сибирская язва, пневмония и многие другие). Антибиотики используют при лечении заболеваний птиц и пчел. Так, для лечения индеек, больных синуситами, применяют стрептомицин, хлорамфеникол, хлортетрациклин, при ларинготрахеите цыплят - карбомицин. Для лечения пчелиных семей, пораженных американским или европейским гнильцом, применяют окситетрациклин, а при ноземе (понос) пчел - фумагиллин. Среди антибиотиков, используемых в ветеринарии, очень эффективным препаратом оказался гр и з е овир иди н, применяемый при лечении маститов у рогатого скота и бронхитов у 498 цыплят. Мет им и ц ин подавляет развитие возбудителя бруцеллеза, но полностью не излечивает его. А в е р м е к т и н ы - новая группа антибиотиков, образуемая стрептомицетом S. avermitilis, по строению относится к макроциклическим лактонам. Авермектины обладают способностью подавлять развитие паразитов животных, в том числе нематод. М о н е н с и н - антибиотическое вещество, образуемое S. cinnamonensis, - обладает широким спектром антипротозойной активности. Этот антибиотик наряду с с ал и но м и ц и - но м, образуемым культурой определенного штамма S. albus, применяется при лечении кокцидоза домашней птицы. Его употребляют также в качестве добавок к кормам рогатого скота. Он способствует ускорению роста животных и улучшению использования кормов. Салиномицин обладает также антибиотической активностью в отношении грамположительных бактерий, микобактерий и грибов. Моненсин и салиномицин относятся к полиэфирным антибиотикам с ионофорными свойствами. Л и н к о м и ц и н показал хорошие результаты при лечении дизентерии у свиней, а комбинация этого антибиотика со спектиномицином (относится к аминогликозидным антибиотикам) дает положительный эффект при бактериальных инфекциях у собак. Н о в о б и о ц и н оказался эффективным •средством при лечении птичей холеры индеек. Намечается применение ц е ф о к с азол а (полусинтетический цефалоспорин) совместно с бензилпенициллином для лечения мастита у дойных коров. Антибиотики используются в животноводстве как стимуляторы роста ряда сельскохозяйственных животных и птиц. Небольшие концентрации антибиотиков, применяемые в качестве добавок к корму животным, не оказывают отрицательного влияния на организм и качество продукции. Использование антибиотиков в кормлении животных дает положительный эффект в птицеводстве, свиноводстве, привыращивании телят и других сельскохозяйственных животных. Добавление этих веществ к рациону птиц способствует ускорению их роста, снижению отхода молодняка; антибиотики стимулируют яйценоскость и повышают оплодотворяемость птиц. Введение небольшого количества антибиотиков в корм способствует повышению массы тела за период выращивания на 200-250 г на каждого цыпленка и до 350 г на каждого утенка. При использовании антибиотиков в птицеводстве можно заметно увеличить яйценоскость и от 1 ООО кур получить в год дополнительно 15 тыс. яиц. 499 Аналогичные результаты отмечаются при использовании антибиотиков в кормлении свиней, телят и других животных. Так, поросята, получавшие с кормом антибиотики, в двухмесячном возрасте весят на 1,5-1, 7 кг больше, чем контрольные. Антибиотик нор се отри ц и н выделен из культуры S. noursei и относится к группе стрептотрицинов. Он используется в качестве кормовой добавки при выращивании свиней и обеспечивает прирост живой массы поросят в пределах 5-15% при снижении затрат корма на 3-5% (Кемнициус и др., 1989). Применение антибиотиков при откорме свиней способствует получению дополнительно 100-120 ц свинины от каждой тысячи животных. В качестве стимулятора роста сельскохозяйственных животных используется моненсин. Он понижает образование метана метаногенными бактериями, размножающимися в рубце жвачных животных, в результате чего увеличивается количество летучих кислот, особенно пропионовой, легко и быстро усваиваемых животными. По данным Е. Липинской (1981), в качестве стимулятора роста молодняка сельскохозяйственных животных можно использовать полипептидный антибиотик н из и н, образуемый L. lactis. Для сельскохозяйственных нужд организовано производство кормовых антибиотиков на базе отходов (барда) спиртовых заводов с добавкой развара пшеничной муки. Получаемые препараты называются БКВ (биомицин\* кормовой витаминизированный). Вопросам влияния низких концентраций антибиотиков на рост животных посвящено большое число исследований. Однако механизм стимулирующего действия этих веществ до конца не выяснен.

По-видимому, стимулирующий эффект низких концентраций антибиотиков на организм животного связан в основном с двумя факторами:

1) с действием на микрофлору кишечника

2) с непосредственным влиянием на организм животного. Стимулирующее действие суббактериостатических доз антибиотиков на организм животных, и особенно молодняка, связано со многими факторами. Специфической же особенностью этих физиологически активных веществ следует считать их действие на микробный метаболизм пищевого тракта животных. Но эффективность антибиотиков и других микробных продуктов метаболизма обусловлена особыми веществами роста, или стимуляторами. Применение антибиотиков в животноводстве неуклонно расширяется. Однако такая тенденция способствует увеличению числа микроорганизмов, несущих множественную антибиотика Биомицин - хлортетрациклин, выпускаемый в СНГ. 500 резистентность, что, в свою очередь, создает условия для передачи устойчивости микроорганизмов от животных к человеку. Поэтому к проблеме использования антибиотиков в животноводстве следует подходить очень осторожно, учитывая возможные отрицательные последствия. Антибиотики в пищевой и консервной промышленности Сохранение скоропортящихся продуктов питания - одна из важнейших проблем пищевой и консервной промышленности. Различные методы сохранения продуктов (консервирование, сквашивание, кипячение, замораживание и охлаждение) применялись человеком издавна. Эти методы широко используются и теперь. Однако известно, что при кипячении, консервировании, сквашивании и в меньшей мере при охлаждении и замораживании продуктов питания изменяются их полезные свойства, особенно аромат, структура, питательная ценность и др. Порча пищевых продуктов при хранении может вызываться развитием микроорганизмов (мицелиальных грибов, дрожжей, бактерий), действием ферментов и влиянием окислительных процессов, стимулируемых кислородом воздуха. Наибольшую роль в порче продуктов играют микроорганизмы, выделяющие разнообразные продукты обмена, из которых многие или нарушают качество продуктов, или делают их совершенно непригодными для употребления в результате образования сильных ядов (ботулин и др.). Таким образом, борьба с микроорганизмами, участвующими в порче продуктов питания, - одна из основных задач создания рациональных методов сохранения этих продуктов без изменения их качества и свойств. Для борьбы с вредной микрофлорой используются разнообразные физические и химические методы. К числу физических методов уничтожения микроорганизмов относятся: термическая обработка (автоклавирование, пастеризация и др.), замораживание, действие ультрафиолетовых и рентгеновских излучений и др. При химических методах борьбы с микробами, вызывающими порчу продуктов, применяются различные бактериостатические или бактерицидные вещества (сернистый ангидрид, бензойная кислота, сорбиновая кислота и др.). В этом отношении идеальным можно считать соединение, которое в очень низких концентрациях обладало бы мощным биологическим действием, не проявляя токсичности в отношении человека и животных и не вызывая порчи продуктов. Такие свойства присущи некоторым антибиотикам.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АНТИБИОТИКОВ ПРИ КОНСЕРВИРОВАНИИ. Первые сведения об использовании антибиотиков в консервной промышленности относятся к 1943 г. К таким антибиотикам относят субтилин, низин и некоторые другие. Фитонциды высших растений также нередко используются при консервировании ряда продуктов питания. Антибиотические вещества применяют в консервной промышленности, при сохранении свежего мяса, рыбы и птицы, при хранении сыра и молочных продуктов, фруктов и овощей. Известно, что при консервировании продуктов питания стерилизация - один из самых важных этапов технологии этого процесса. Продолжительность действия высоких температур при стерилизации зависит от вида продукта и сопутствующей микрофлоры. Под действием термической обработки погибает большинство видов микроорганизмов, но одновременно с этим происходит потеря некоторых ценных свойств продукта: разрушаются витамины, изменяются вкусовые качества и консистенция и т.п. Применение антибиотиков при консервировании позволяет значительно снизить время термической обработки того или иного продукта. Так, для консервирования овощей предложено использовать субтилин. Применение этого антибиотика дает возможность проводить мягкую термическую обработку. Под действием субтилина гибнут клостридиальные и термофильные бактерии, устойчивые к нагреванию. Хорошие результаты получены при использовании в консервной промышленности низина - антибиотика, образуемого молочнокислым стрептококком. Этот антибиотик в медицинской практике не употребляется. Его применяют при консервировании томатов, зеленого горошка, цветной капусты, мяса, рыбы, молока, сыров и других продуктов. Низин подавляет развитие ряда термофильных спорообразующих бактерий, не оказывая токсического действия на человека. Применение низина при консервировании позволяет уменьшить продолжительность термической обработки продуктов в 2 раза.

**Литература**

1. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках.- М.: Изд-во МГУ; Наука, 2004. - 528 с.

2. Клец О.П., Минакина Л.Н. Антибиотики: учебное пособие для студентов всех факультетов.- Иркутск. - 2013. – 72с.

3. Краснапольский Ю.М. Фармацевтическая биотехнология: Производство биологически активных веществ.-Харьков.- 2013.-304 с.

4. Баранова И.П., Егоров Н. С., Стоянова Л.Г. Низин, условия образования и получения препарата: Обзор// Антибиотики и химиотерапия. 1997. Т. 42, № 3. - С. 37-46.

5. Кольцов В. Б., Кондратьева О. В.; Под общ. ред. Каракеяна В.И. - Процессы и аппараты защиты окружающей среды в 2 ч. Часть 2. 2-е изд., пер. и доп. Учебник и практикум для академического бакалавриата - М.:Издательство Юрайт - 2019 - 311с. -

6. Процессы и аппараты биотехнологической очистки сточных вод: Учебное пособие/Луканин А.В. - М.: НИЦ ИНФРА-М, 2016. - 242 с.

Интернет ресурсы:

1. https://elibrery.kaznu.kz/ru

2. <http://znanium.com/catalog/product>

3. [https://urait.ru/book/processy-i-apparaty-biotehnologii-fermentacionnye-apparaty](https://urait.ru/book/processy-i-apparaty-biotehnologii-fermentacionnye-apparaty-431495)

4. [https://urait.ru/book/processy](https://urait.ru/book/processy-i-apparaty-zaschity-okruzhayuschey-sredy-v-2-ch-chast-1-434568)

5. [https://urait.ru/book/processy](https://urait.ru/book/processy-i-apparaty-zaschity-okruzhayuschey-sredy-v-2-ch-chast-2-434569)

6. [http://znanium.com/catalog/product](http://znanium.com/catalog/product/519990)