

13 лекция

Технология получения антибиотиков. Микробиологический синтез.



- Технология получения антибиотиков методом микробиологического синтеза (ферментации) — это основной промышленный способ производства большинства классических антибиотиков (пенициллины, цефалоспорины, тетрациклины, макролиды, аминогликозиды и др.).

Основные этапы микробиологического синтеза антибиотиков

- 1. Отбор и поддержание продуцента
- 2. Приготовление посевного материала
- 3. Ферментация
- 4. Накопление антибиотика



I СТАДИЯ

**Выделение штамма-продуцента АБ из
природных условий**

Селекция наиболее активного штамма

**Получение наиболее активного штамма
методами:**

**Индукцированного
мутагенеза**

**Слияния
протопластов**

**Генно-инженерной
манипуляцией**

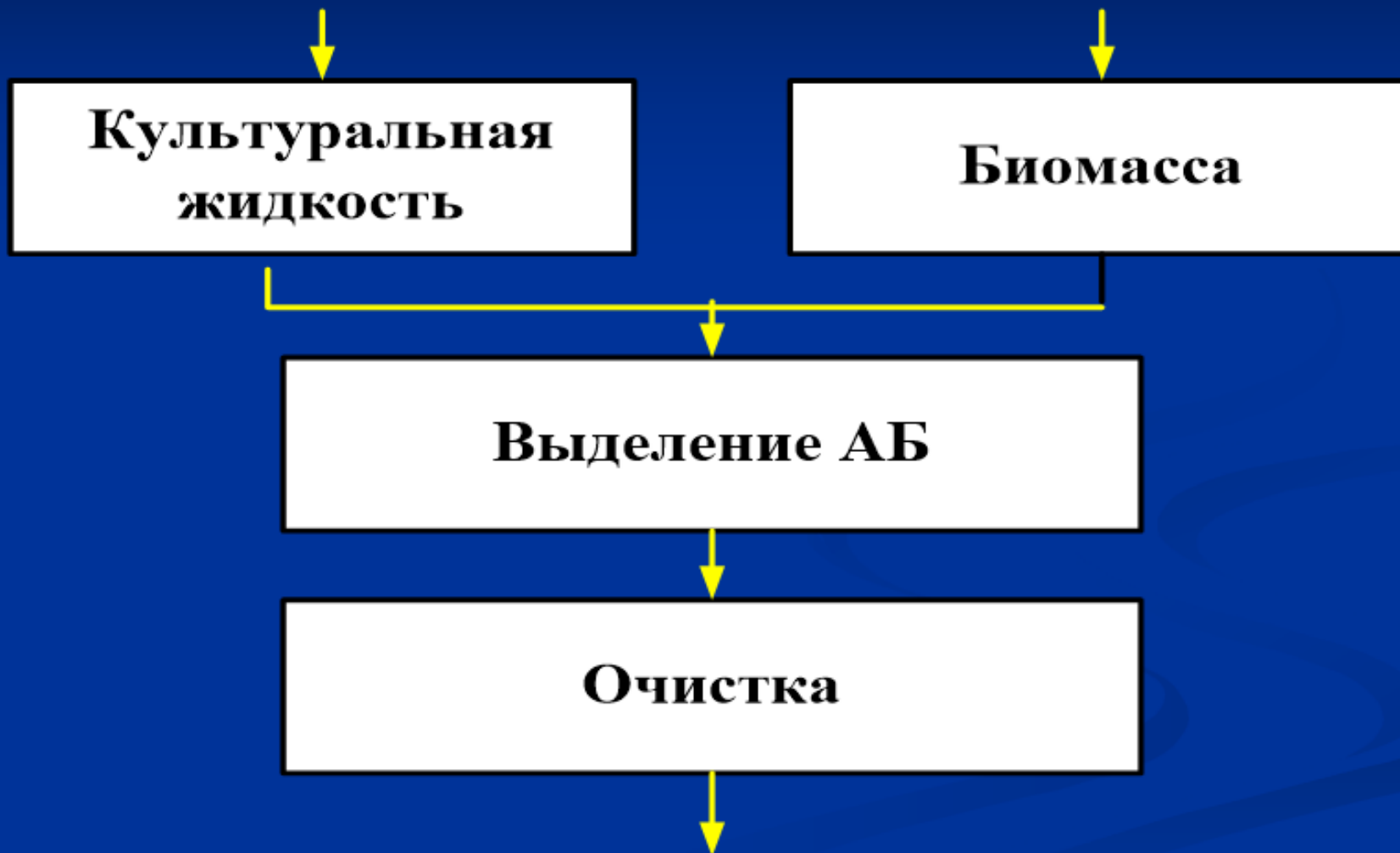
**Высокопродуктивный и технологичный
штамм продуцента**



II СТАДИЯ



III СТАДИЯ



IV СТАДИЯ

Концентрирование

Стабилизация

Обезвоживание

Измельчение

Сухой препарат

**Жидкий
экстракт**

Фасовка



1. Отбор и поддержание продуцента

Исходный штамм (например, *Penicillium chrysogenum* для пенициллина, *Ascremonium chrysogenum* для цефалоспорины C, *Streptomyces* spp. для большинства других).

Постоянное улучшение штаммов методом мутагенеза и селекции или генной инженерии (повышение титра в 50–100 раз по сравнению с дикими штаммами).

2. Приготовление посевного материала

Хранение штамма в лиофилизированном виде или в криобанке (-80 °C или в жидком азоте).

Размораживание → посев на чашки Петри → конические колбы с качалкой (1–3 ступени) → посевные ферментеры (объем 1–20 м³).

- Требования, предъявляемые к питательной среде:
- 1) обеспечивать хороший рост продуцента и максимально возможное образование антибиотика;
- 2) содержать доступные и легко усваиваемые клетками компоненты;
- 3) обладать способностью к фильтрации;
- 4) обеспечивать применение наиболее экономичных и эффективных приемов выделения и очистки антибиотика.



Стерилизация

*питательных сред в
промышленных условиях
осуществляется двумя
основными методами:*

1) периодическим

2) непрерывным

(5—10 мин при $t = 125 - 130^{\circ}\text{C}$

*охлаждается до $30 - 35^{\circ}\text{C}$ поступает
в ферментер)*



Перспективный метод выращивания
микроорганизмов – продуцентов АБ
метод **глубинного**
культивирования **или**
периодическое культивирование.



В первой фазе развития культуры (тропофазе) идет интенсивное накопление биомассы, сопровождающееся усилением процессов биосинтеза белков, нуклеиновых кислот, углеводов, ферментов.

АБ не синтезируется в 1-ой фазе.

Во второй фазе (идиофаза) накопление биомассы замедляется, т.к. питательная среда обеднена и обогащена продуктами жизнедеятельности продуцента.

Максимум биосинтеза антибиотика наступает в стадии отмирания культуры.

3. Ферментация (собственно биосинтез)

Проводится в аэробных
стальных ферментерах
объёмом 50–300 м³.

Основные параметры процесса:

Температура: 24–28 °С (для большинства актиномицетов и грибов).

рН: строго регулируется (обычно 6,0–7,0).

Аэрация и перемешивание: 0,5–2,0 vvm (объём воздуха на объём среды в минуту), мощное механическое перемешивание.

Давление: 0,5–1,5 атм.

Длительность: 120–200 ч (5–8 суток).

Среда ферментации:

- Источники углерода: глюкоза, сахароза, крахмал, растительные масла, лактоза (для пенициллина — важна медленная подача лактозы).
- Источники азота: соевая мука, кукурузный экстракт, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, аммиак.
- Прекурсоры: для пенициллина — фенилуксусная кислота или фенилацетамид; для цефалоспоринов — метионин или другие серосодержащие соединения.
- Минеральные соли и микроэлементы (Fe, Zn, Cu, Mn, Mo и др.).

Режимы питания:

- Фед-батч (fed-batch) — наиболее распространённый: постепенная подача углеводов и прекурсоров для избежания катаболитной репрессии и повышения титра.



4. Накопление антибиотика

Пенициллин и цефалоспорины С — внеклеточные (в культуральной жидкости).

Эритромицин, тетрациклин — частично внутриклеточные, требуется разрушение мицелия.

Выделение и очистка

- Схема сильно зависит от физико-химических свойств антибиотика.
- Общие стадии:
- Отделение биомассы (фильтр-прессы, сепараторы, центрифуги).
- Подкисление или подщелачивание культуральной жидкости и экстракция органическими растворителями (бутилацетат, метилизобутилкетон, амилацетат) — для пенициллинов и цефалоспоринов.
- Переэкстракция в водный буфер при другом pH.
- Концентрирование и очистка:
 - сорбция на ионообменных смолах и активированном угле;
 - осаждение в виде солей (например, калиевая или натриевая соль пенициллина G);
 - кристаллизация;
 - хроматография (для особо чистых фармацевтических субстанций).
- Сушка (распылительная или лиофильная) и получение стерильной субстанции.

Обезвоживание препаратов (удаление свободной и связанной воды):

1. **Лиофильная сушка АБ (при низких температурах $-8, -12^{\circ}\text{C}$)**
2. **Высушивание с применением распылительной сушилки.**
3. **Сушка в вакуум-сушильных шкафах или методом взвешенного слоя.**

Для полусинтетических
антибиотиков:

Получают «ядро» ферментацией (6-аминопенициллановая кислота (6-АПК), 7-аминоцефалоспоровановая кислота (7-АЦК), 7-аминодезадцетоксицефалоспоровановая кислота (7-АДЦК)).

Затем химически или энзиматически пришивают боковые цепи → амоксициллин, цефалексин, цефуроксим и сотни других.



Биологические методы анализа АБ

1. Препарат изучают на разных видах животных для выявления его острой и хронической токсичности;
2. Устанавливают максимально переносимую дозу (МПД) антибиотика (дозу, вызывающую гибель 50 % подопытных животных (LD50));
3. Дозу, смертельную для всех животных (LD100).

4. Количественное определение

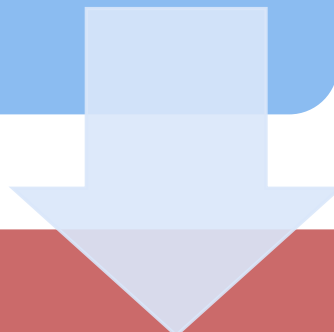
АБ проводят биологическими методами, основанными на сравнительной оценке угнетения роста тест-микроорганизма.

Активность устанавливают *диффузионным* или *турбидиметрическим* методами (согласно ГФ XII изд. метод «диффузии в агар»).

УСКОРЕННЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АБ:

уреазный метод

- (проводят путем сравнения изменений pH в средах испытуемых и стандартных образцов);



ферментативный метод (основан на инаktivации аминогликозидов в крови специфическими ферментами, продуцируемые Гр. «-» микроорганизмами);

Радиоиммунный метод

основан на сравнительной
оценке конкуренции АБ,
меченного тритием, и
испытуемого антибиотика по
отношению к
специфическим антителам
иммунной сыворотки.





**Единица действия
(ЕД) - величина
биологической
активности АБ.**

За ЕД
принимают
минимальное
количество
АБ,
подавляющее



**развитие тест-
микроорганизма в
определенном объеме
питательной среды.**

Современные тенденции

- Генетически модифицированные штаммы с повышенным титром (до 100 г/л пенициллина G).
- Непрерывная ферментация (редко, но применяется для некоторых аминогликозидов).
- Имобилизованные клетки и ферменты для получения 6-АПК и 7-АЦК.
- Переход на растительные источники сырья и снижение использования растворителей (экологически ориентированные процессы).

В производстве
для
безопасного
проведения
технологическог
о процесса
предусматрива
ют выполнение
следующих
требований:

- – автоматизация производственных процессов;
- – дистанционное управление наиболее опасными технологическими операциями;
- – герметизация оборудования;
- – защита от статического электричества;
- – применение эффективных систем очистки газовых выбросов;
- – изолирование наиболее опасных участков производства;
- – использование автоматических газоанализаторов, заблокированных со световой и звуковой сигнализацией и вентиляционными установками, для контроля за содержанием взрывоопасных и токсичных веществ в воздухе производственных помещений;
- – опознавательная окраска трубопроводов;
- – строгое соблюдение правил обслуживания аппаратов, работающих под давлением, и емкостной аппаратуры;
- – использование средств индивидуальной защиты