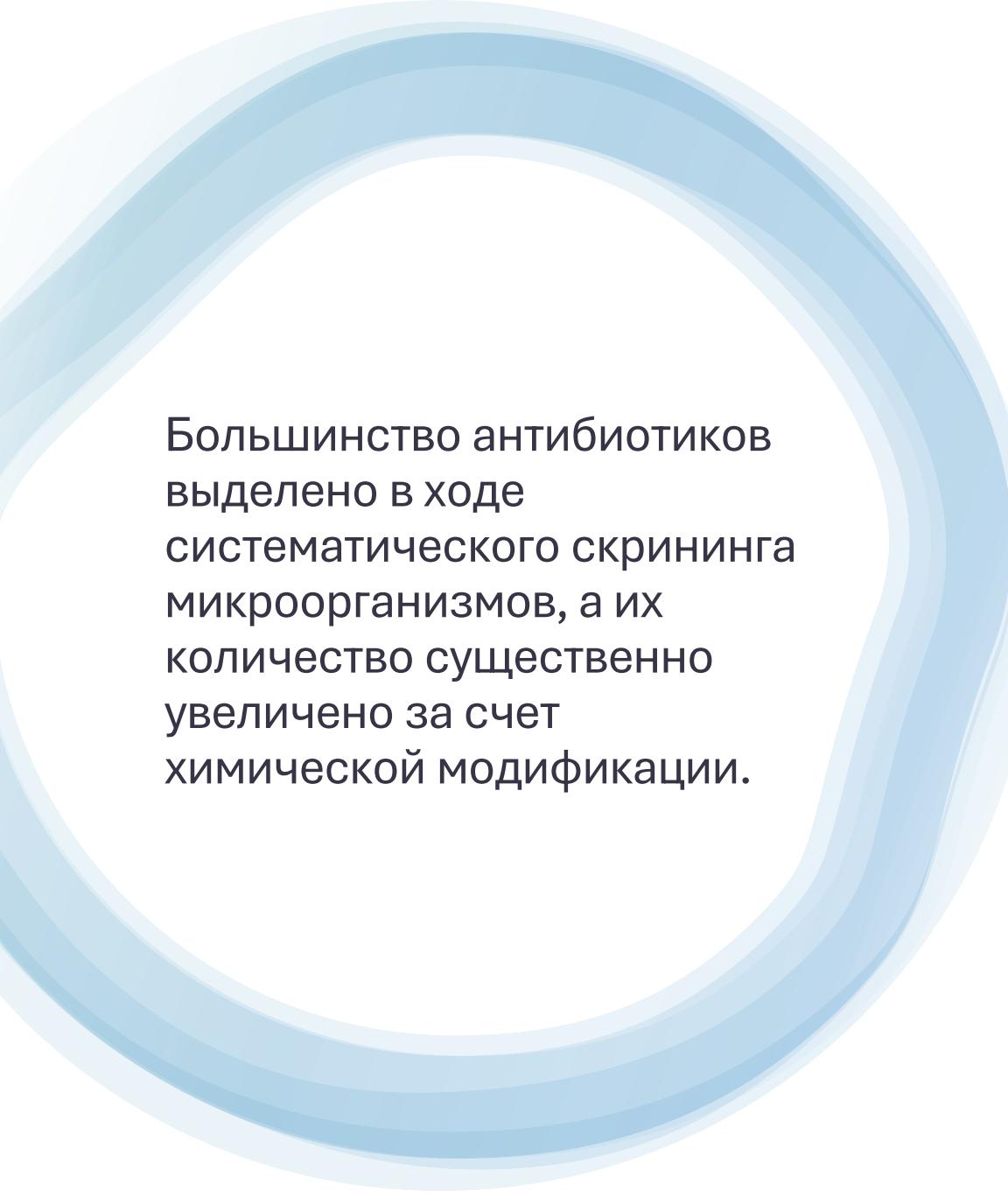


Основы промышленного получения антибиотиков.

12 лекция



- В настоящее время описано свыше 6000 антибиотиков. Однако, только 2–3 % известных антибиотиков применяются в медицинской практике, а остальные вследствие высокой токсичности, инактивации в организме и других причин не используются.



Большинство антибиотиков выделено в ходе систематического скрининга микроорганизмов, а их количество существенно увеличено за счет химической модификации.

- При этом к основным целям модификации антибиотиков относятся:
- расширение спектра и повышение эффективности их действия;
- снижение их токсичности и устранение нежелательных побочных эффектов;
- создание их аналогов, устойчивых к разрушению микроорганизмами, обладающих большим временем «половизны»;
- усовершенствование способов их введения.

- Одним из наиболее богатых источников антибиотиков является почвенная микрофлора. В почвенных микроэкосистемах сильно развита конкуренция между их обитателями. При этом антибиотики входят в тот природный «арсенал», который необходим для захвата экологической ниши. Образцы почв из разных регионов мира постоянно анализируют в поисках новых антибиотиков. Одним из самых активных продуцентов антибиотиков является род *Streptomyces*, к которому принадлежат многие актиномицеты.



- При оптимизации любого технологического процесса, протекающего с участием живых организмов, основные усилия, как правило, направлены на улучшение их генетически обусловленных свойств. Традиционно для увеличения продуктивности микробных штаммов используют мутагенез с последующим скринингом и отбором наиболее подходящих вариантов. До «эры» генетической инженерии ценные для производства антибиотиков штаммы с повышенной продуктивностью получали в основном с помощью мутагенеза и селекции природных микроорганизмов.

Одним из продуктивных источников антибиотиков является род *Streptomyces*, к которому относятся многие актиномицеты.

У них обнаружено и идентифицировано свыше 500 видов антибиотиков. К основным этапам поиска антибиотиков относятся:

- выделение микроорганизмов-антагонистов из почвы;
- определение антагонистического спектра и активности антибиотиков;
- подбор условий культивирования продуцентов антибиотиков;
- выделение и химическая очистка антибиотиков;
- изучение физико-химических и фармакологических свойств антибиотиков;
- испытание химико-терапевтической эффективности;
- идентификация антибиотиков

- Основными продуцентами антибиотиков являются актиномицеты, плесневые грибы, бактерии. Некоторые из этих микроорганизмов способны продуцировать большое количество антибиотиков. В частности, 6 родов филаментозных грибов производят около 1000 разных антибиотиков, в том числе пенициллин и цефалоспорин, а 3 рода актиномицетов – 3000 антибиотиков. При этом способностью вырабатывать антибиотики обладают не все микроорганизмы, а лишь некоторые штаммы отдельных видов.

К основным продуцентам антибиотиков относятся:

- 1. Неспорообразующие бактерии. Так, из группы бактерий рода *Pseudomonas aeruginosa*, выделены пиоцианин и пиоцианаза.
- 2. Спорообразующие бактерии. Многие виды спорообразующих бактерий вырабатывают различные антибиотики. Так, штаммы *Bacillus subtilis* производят бацитрацин, субтилин и др.; *B. brevis* – тиротрицин, *B. polimixa* – п
- 3. Актиномицеты. Кроме пенициллина, наиболее важные антибиотики, применяющиеся в качестве химиотерапевтических средств, были получены из актиномицетов. К настоящему времени выделено и описано более 200 таких соединений (стрептомицин, тетрациклины, эритромицин, новобиоцин, неомицин и др.).
- 4. Грибы являются одним из наиболее важных продуцентов антибиотиков (цефалоспорин, гризофульвин, мицофеноловая кислота, пенициллиновая кислота, глиотоксин, клавацин, аспергилловую кислоту и др.). олимиксин (аэроспорин).

- 5. Водоросли. Многие водоросли способны вырабатывать вещества, обладающие антибиотическими свойствами. Однако, пока ни одно из них не нашло применения в клинической практике.
- 6. Лишайники. К антибиотикам, вырабатываемым лишайниками, относятся лихенин и усниновая кислота.
- 7. Высшие растения. Высшие зеленые растения также образуют антибактериальные вещества, сходные по своим свойствам с истинными антибиотиками. К ним относятся фитонциды (аллицин, томатин и др.).
- 8. Животные. Среди продуктов животного происхождения, обладающих антибактериальными свойствами, важное место занимает лизоцим. Многие простейшие, личинки насекомых и др. могут переваривать живые бактерии и грибки.

Промышленное получение антибиотиков основано на микробном синтезе, химическом синтезе и полусинтезе.

- Основные этапы включают:
- **культтивирование продуцентов** (актиномицетов, плесневых грибов),
- **выделение и очистку** антибиотика,
- **финишная обработка и стабилизация** для получения лекарственной формы.

Биологический синтез (Микробный синтез)

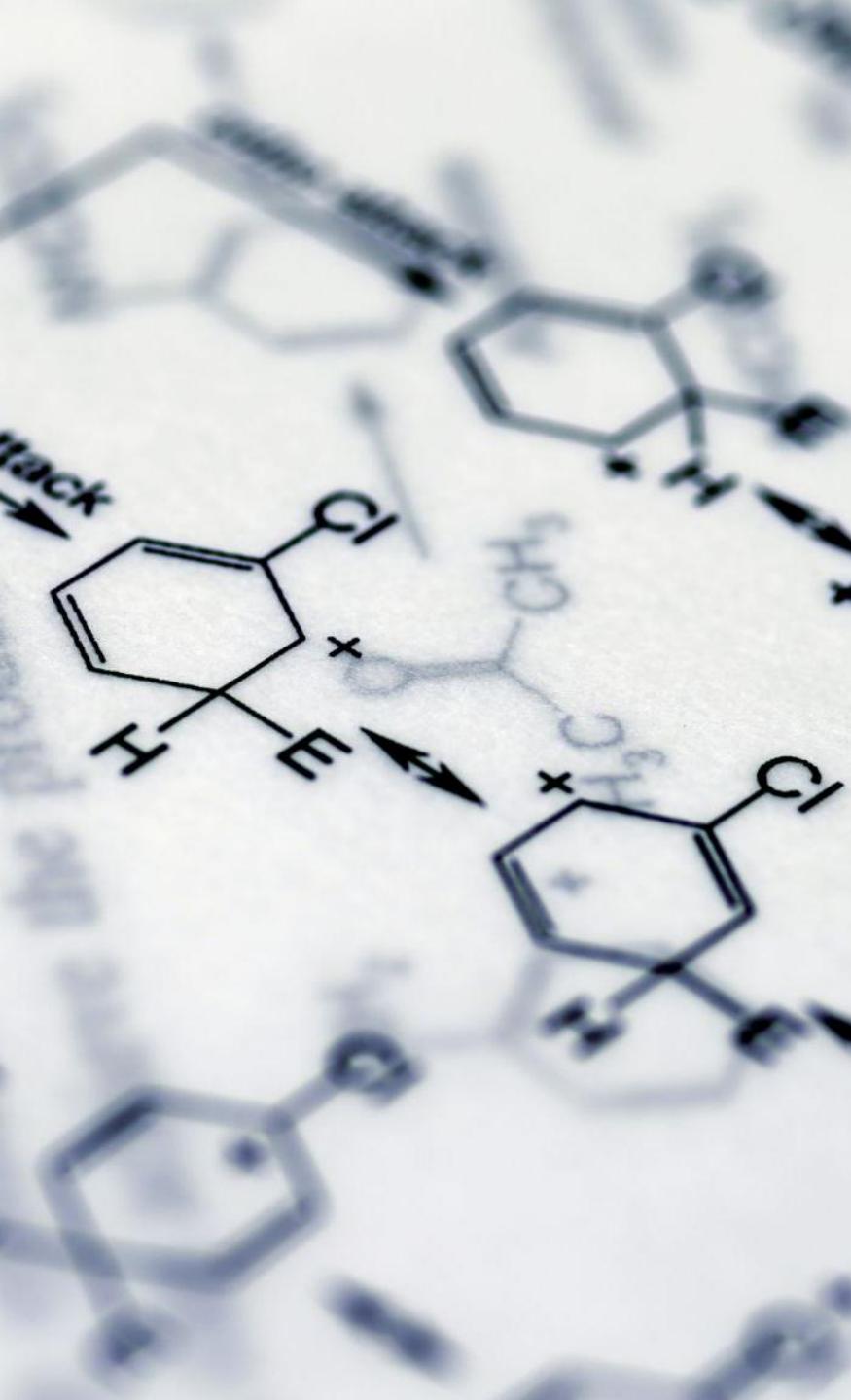
Культивирование: Процесс начинается с выращивания микроорганизмов-продуцентов (например, актиномицетов, дающих около 80 % природных антибиотиков, или плесневых грибов) в больших объемах в специальных ферmentерах (биореакторах).

Использование питательной среды: Микроорганизмы питаются специально подобранный питательной средой, которая стимулирует их рост и выработку антибиотиков.

Сбор и очистка: По завершении ферментации антибиотик извлекается из культуральной жидкости. Этот процесс включает несколько стадий очистки для удаления примесей, таких как белки, клетки и другие метаболиты.

Химический синтез

- **Создание молекулы:** Антибиотик синтезируется с нуля в химической лаборатории, без использования микроорганизмов-продуцентов.
- **Применение:** Этот метод используется для производства антибиотиков, которые сложно или невозможно получить методом микробного синтеза, например, в случае с некоторыми противомикробными препаратами, такими как фторхинолоны



Полусинтез

- **Гибридный метод:** Этот метод комбинирует микробный синтез и химический синтез.
- **Использование полупродуктов:** Сначала микроорганизмы производят базовое соединение (полупродукт), которое затем модифицируется химически для получения конечного антибиотика.
- **Преимущества:** Этот подход позволяет получать антибиотики с улучшенными свойствами, такими как более широкий спектр действия, повышенная устойчивость к ферментам или улучшенное проникновение в организм.
- **Примеры:** Множество антибиотиков из групп цефалоспоринов и полусинтетических пенициллинов получены этим методом.

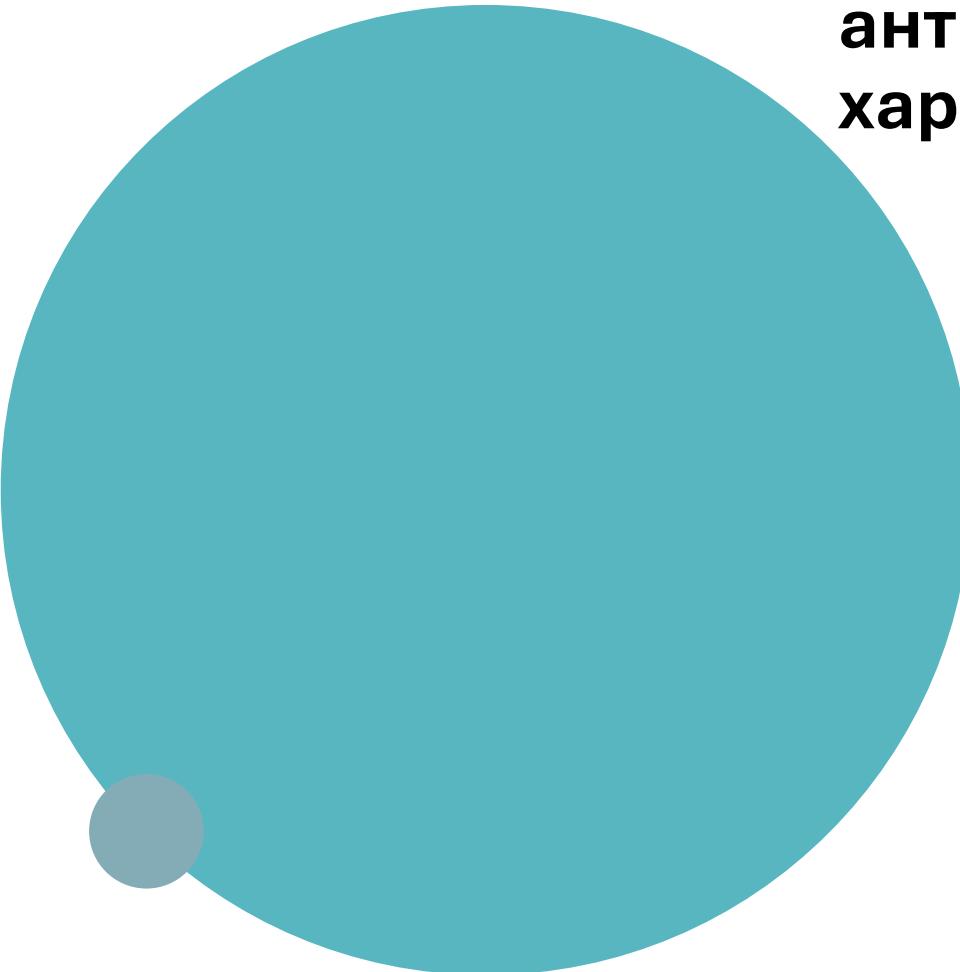
рДНК-биотехнологии в создании антибиотиков

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

- Промышленное получение антибиотиков основано на **ферментации** с использованием микроорганизмов-продуцентов, таких как актиномицеты, плесневые грибы и бактерии. Процесс включает культивирование этих микроорганизмов в контролируемой среде (биореакторе) для максимального выхода антибиотика, за которым следуют стадии **экстракции и очистки** целевого соединения. Также существуют **полусинтетические и синтетические методы**, позволяющие получать модифицированные или совершенно новые антибиотики.

Структура биотехнологического производства антибиотиков

- *Подготовка питательной среды.* При разработке биотехнологического производства антибиотиков учитывают общие свойства их продуцентов, а также то обстоятельство, что каждый антибиотик является конечным продуктом длинной цепи специфических ферментативных реакций. Продуценты большинства антибиотиков, в том числе и ценных для клинической практики, являются аэробами или реже факультативными анаэробами



- Процесс развития микроорганизмов – продуцентов антибиотиков имеет двухфазный характер:

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

- Вторая фаза (идиофаза или фаза несбалансированного роста) характеризуется снижением общего количества биомассы. В этот период еще происходит образование новых клеток. Однако, в культуре начинают преобладать автолитические процессы, приводящие к снижению общего количества биомассы. При этом среда обогащается продуктами обмена и автолиза клеток, возрастает значение pH и наблюдается интенсивный биосинтез антибиотика. Биосинтезу антибиотиков способствует значительное снижение содержания в среде источников углерода и азота, особенно легко усваиваемых. Однако, выращивание продуцентов с самого начала ферментации на обедненных средах нецелесообразно, т.к. незначительное накопление биомассы в течение трофофазы ведет, в конечном счете, и к невысокому выходу антибиотика.

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

- Отмечают некоторые общие закономерности, которые следует учитывать при работе с большинством продуцентов антибиотиков. Углеродкatabолитная регуляция является одним из механизмов регуляции биосинтеза вторичных метаболитов. Известно, что глюкоза служит лучшим источником углерода и энергии для многих организмов. Однако, быстрый катаболизм глюкозы резко снижает биосинтез антибиотиков. Доказано, что глюкоза ослабляет биосинтез β -лактамов, аминогликозидов и др. Кроме того, установлено, что глюкоза, фруктоза, сахароза и галактоза являются сильными репрессорами биосинтеза антибиотиков.

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

- Аммоний и другие легкоутилизирующиеся источники азота подобно легкоокисляющимся углеводам усиливают рост продуцентов β -лактамных и полиеновых антибиотиков. Однако, они отрицательно влияют на их биосинтез. Соевая и хлопковая мука, белково-витаминный концентрат медленно расщепляется в процессе ферментации, из них медленно высвобождаются аминокислоты и ионы аммония, поэтому их используют в качестве компонентов сред, обеспечивающих высокий выход антибиотиков.

- Некоторые первичные метаболиты являются прямыми предшественниками антибиотиков. Так, валин включается в трипептид, из которого формируется β -лактамные структуры. При избытке валина в мицелии происходит подавление биосинтеза антибиотика по принципу обратной связи. Избыток валина в среде подавляет активность ацетогидроксисинтетазы – первого фермента своего биосинтетического пути. В результате снижается образование трипептида, а в, конечном счете, и β -лактамного антибиотика. Кроме того, некоторые первичные метаболиты являются конечными продуктами разветвленного метаболического пути.

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

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

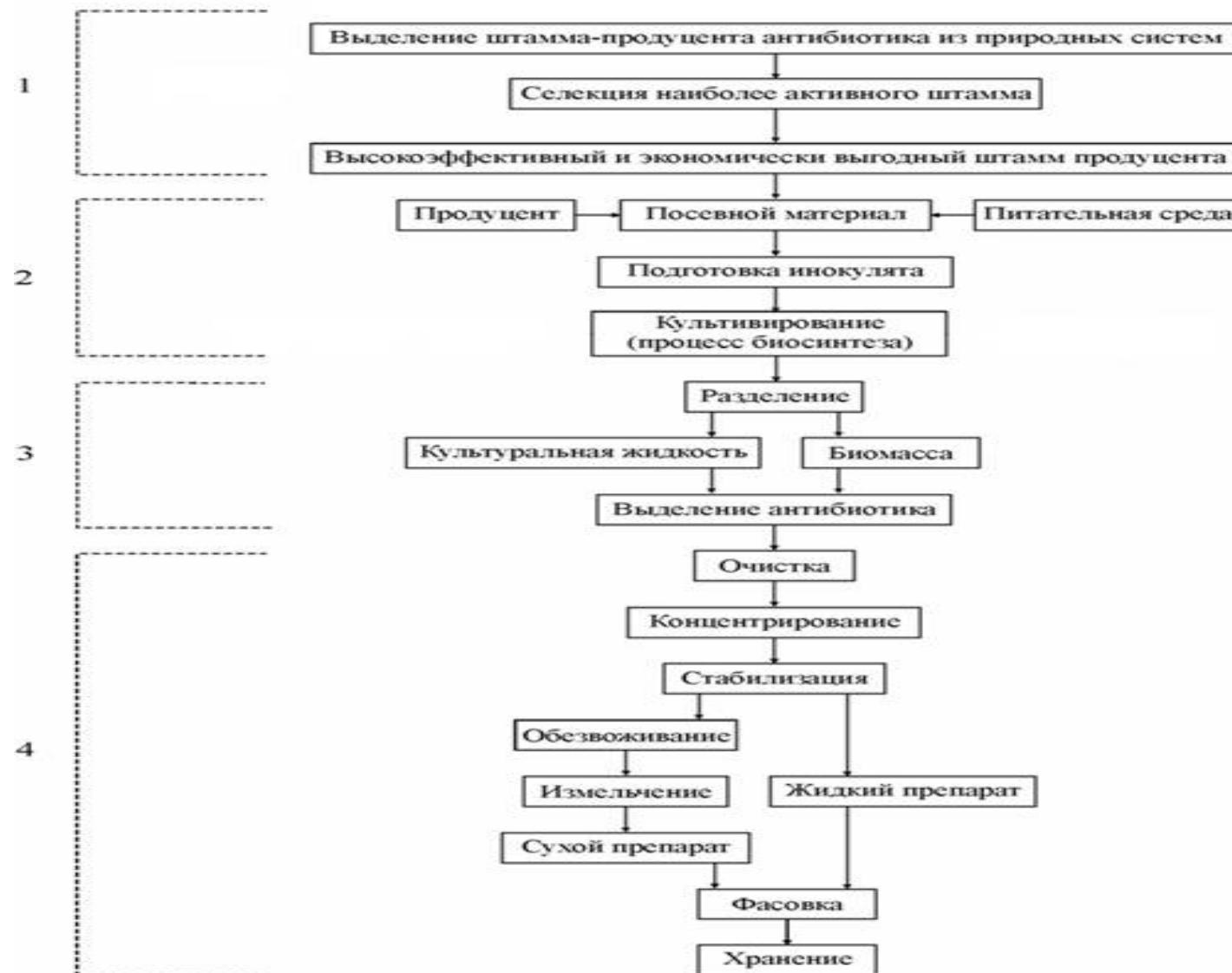
- Важность аэрации для обеспечения накопления биомассы обусловлена тем, что большинство продуцентов антибиотиков являются аэробами. Кислород необходим для биосинтеза ряда антибиотиков. При этом он расходуется на замыкание β -лактамного и тиазолидинового колец в процессе биосинтеза β -лактамной структуры. В целом потребность в кислороде зависит от концентрации биомассы и ее метаболической активности.

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

Подготовка культуры продуцента. Подготовка посевного материала включает следующие этапы:

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

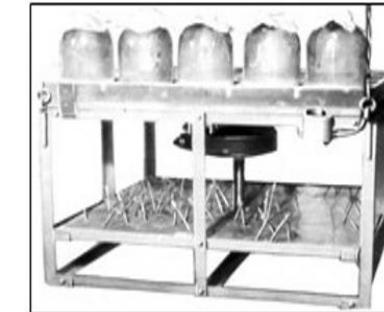
Схема производства антибиотиков в процессе микробного биосинтеза



Ферментация –

- специализированный процесс получения разных БАВ в химической или родственной отраслях производства с помощью биологических объектов, включая процесс их размножения. Современная ферментационная установка состоит из нескольких небольших емкостей для инокуляции и ферментера большого размера (от 1 л до 1000 м3) для реализации конечной стадии получения целевого продукта, соединенные между собой с помощью фиксированных трубопроводов или гибких шлангов. В ферментерах часто используют механическое перемешивание. Кроме того, ферментационные установки включают в себя установки для обработки сырья, емкости для приготовления питательной среды, оборудование для непрерывной стерилизации, установки для получения пара высокого давления и больших объемов стерильного воздуха.

- При биотехнологическом производстве антибиотиков используют поверхностную или глубинную ферментацию. Ферментация, как правило, сопровождается выделением большого количества тепла, поэтому для поддержания оптимального температурного режима необходимо постоянное охлаждение среды.



Аэрация посевного материала с использованием встраивания на качалке



A



B

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

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

- Питательные среды для биосинтеза антибиотиков содержат вещества, способные образовывать стойкие пены. Кроме того, они могут образоваться в процессе ферментации. Аэрация и перемешивание среды также обусловливают образование слоя пены на поверхности культуральной жидкости, ухудшающего условия развития продуцента. Пеногашение, в основном, осуществляется за счет введения поверхностно активных веществ (ПАВ), способствующих снижению стойкости пены и в дальнейшем ее разрушению.

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

Фильтрация

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

Выделение и очистка целевого продукта

- . Использующиеся в настоящее время методы выделения и очистки разрабатываются применительно к конкретному антибиотику. Их выбор определяется физико-химическими свойствами антибиотика: локализацией, составом культуральной жидкости, ее реологическими и другими характеристиками.

- На стадии предварительной обработки растворенный антибиотик отделяют от суспензии мицелия и компонентов культуральной жидкости, находящихся в коллоидном состоянии. В случае, если часть антибиотика находится в мицелии, то его переводят в водную фазу, например, путем изменения величины рН культуральной жидкости (тетрациклины). Иногда, наоборот, растворенный и связанный с мицелием антибиотик объединяют в общем осадке, из которого его экстрагируют. Нативный раствор отделяют от мицелия и коллоидных частиц с помощью фильтрования или центрифугирования.

- На следующей стадии решается задача выделения антибиотиков в виде индивидуального вещества. При этом следует учитывать высокую лабильность многих антибиотиков, что ограничивает условия их выделения. Проблемы выделения антибиотиков обусловлены многокомпонентностью культуральных жидкостей и низким содержанием в них целевых продуктов.



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

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

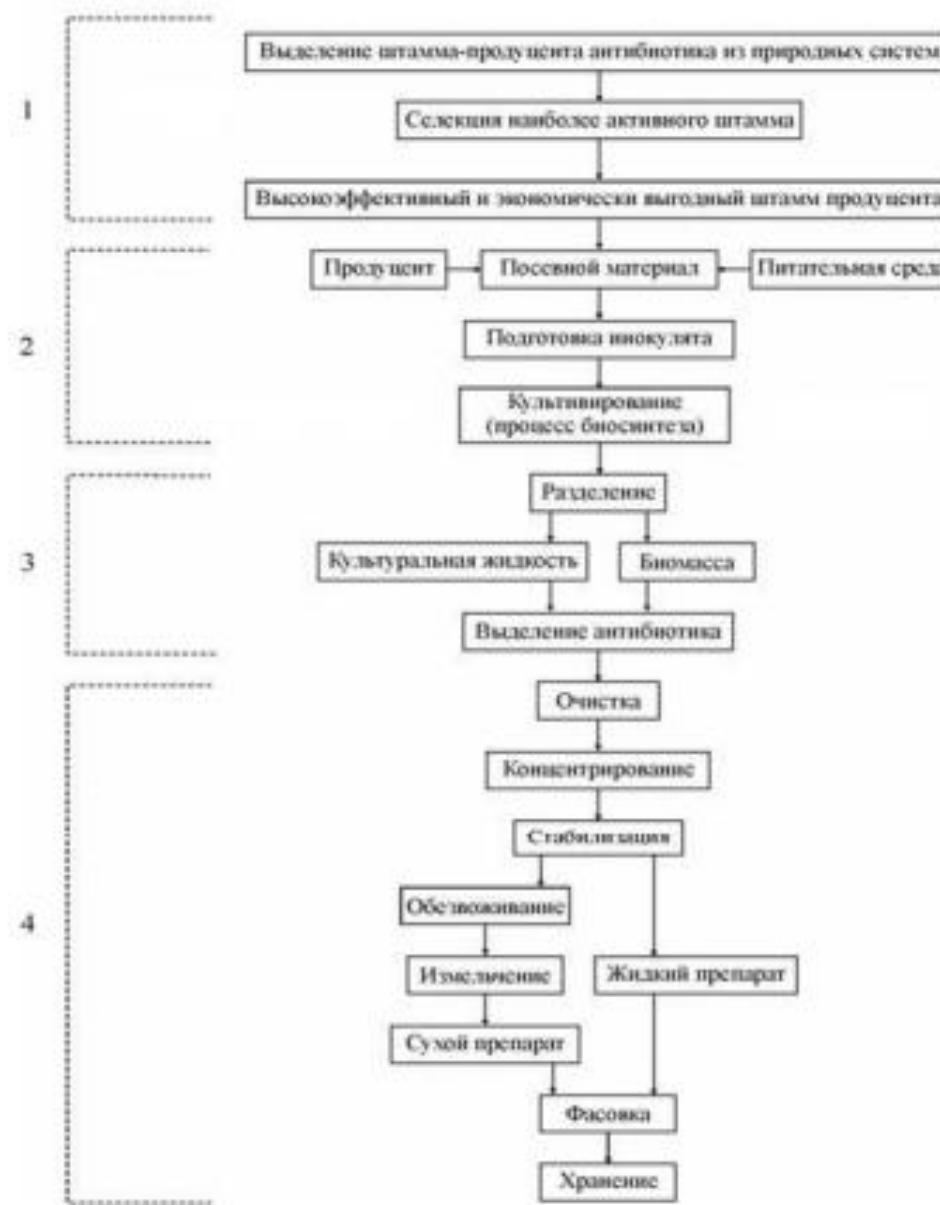
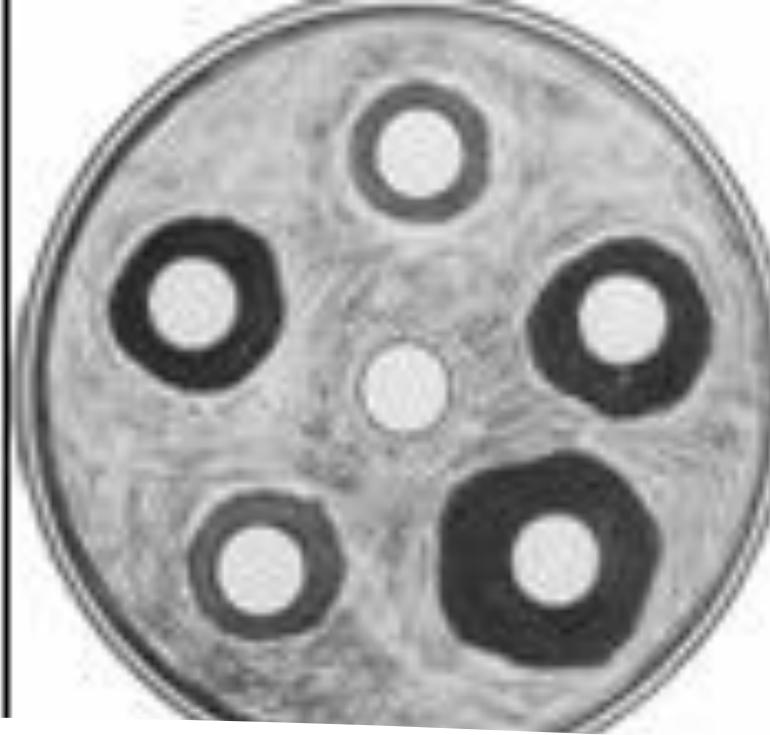


Рис. 1. Схема биотехнологического производства антибиотиков

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

- 
- Готовый продукт – антибиотики медицинского назначения – подвергается биологическому и фармакологическому контролю. Биологический контроль позволяет определить степень стерильности лекарственного препарата. При фармакологическом контроле проводят всесторонние испытания лекарственного препарата на токсичность, пирогенность, токсикогенность и др., устанавливают максимально переносимую дозу антибиотика, дозы, вызывающие 50 % и полную гибель экспериментальных животных. Только после всестороннего и тщательного изучения лекарственный препарат может быть рекомендован к применению в клинической практике.

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



- Оценка антибиотиков на биологическую активность методами: перпендикулярных штрихов (A), по бумажных дисков (B), незапаянных цилиндриков (C)