

Биотехнология производства антибиотиков

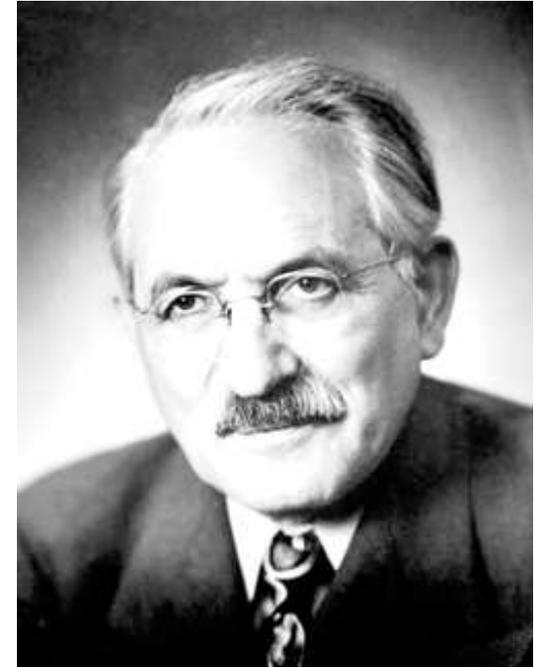


План :

- **1. Общая характеристика антибиотиков. Классификация антибиотиков. Классификация антибиотиков по штаммам-продуцентам.**
- **2. Микроорганизмы – продуценты антибиотиков.**
- **3. Методы получения антибиотиков.**
- **4. Схема промышленного биотехнологического производства антибиотиков.**
- **5. Области применения антибиотиков.**

Общая характеристика антибиотиков

- Термин «антибиотик» был предложен в 1942 г. **Зельман Абрахам Ваксман** для обозначения веществ, образуемых микроорганизмами и обладающих антимикробным действием.
- Разработка и производство **антибиотиков** активно началась в конце XIX века. Первым антибиотиком, выпущенным в промышленное производство, стал **сальварсан** (1910 год).
- **Антибиотики – это группа высокоэффективных биологически активных веществ, которые синтезируются микроорганизмами и способны убивать или подавлять рост живых клеток.**



Классификация антибиотиков

- По характеру воздействия на бактериальную клетку антибиотики можно разделить на три группы:
 - - бактериостатические
 - - бактерициды
 - - бактериолитические



Классификация антибиотиков

- По механизму биологического действия антибиотики делятся:
- 1. Антибиотики, ингибирующие синтез бактериальной стенки
- 2. Антибиотики, нарушающие функционирование цитоплазматической мембраны
- 3. Антибиотики, разрушающие рибосомальные субчастицы и сдерживающие синтез белка
- 4. Антибиотики, избирательно подавляющие синтез нуклеиновых кислот:
 - - ингибиторы синтеза РНК
 - - ингибиторы синтеза ДНК



В зависимости от химической природы антибиотики делят на:

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

Классификация антибиотиков по штаммам-продуцентам:

В зависимости от продуцирующих организмов антибиотики могут быть разделены на следующие группы:

1. Образуемые эубактериями: • бактериями рода *Bacillus*: *граммицидины*, *полимиксины* и др.; • бактериями рода *Pseudomonas*: *мунироцин*, *пиоцианин*, *антифунгин* и др.; • бактериями других родов (*Micrococcus*, *Streptococcus*, *Escherichia*, *Proteus*): *низин*, *колиформин* и др.

2. Образуемые бактериями рода *Streptomyces*: *стрептомицин*, *тетрациклин*, *новобиоцин* и др.

3. Образуемые несовершенными грибами: *пенициллин*, *гризеофульвин* и др.

4. Образуемые грибами классов базидио- и аскомицетов: *термофиллин*, *лензитин*, *хетомин* и др.

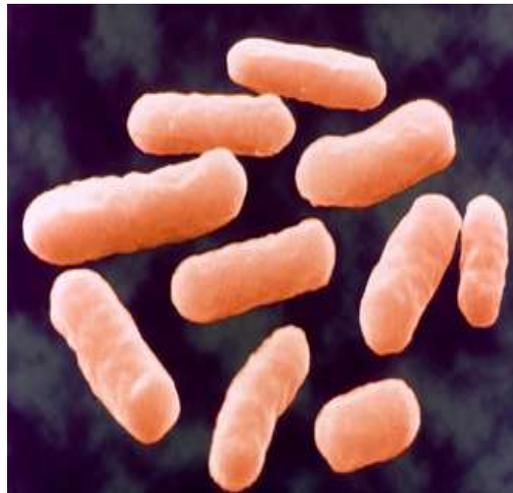
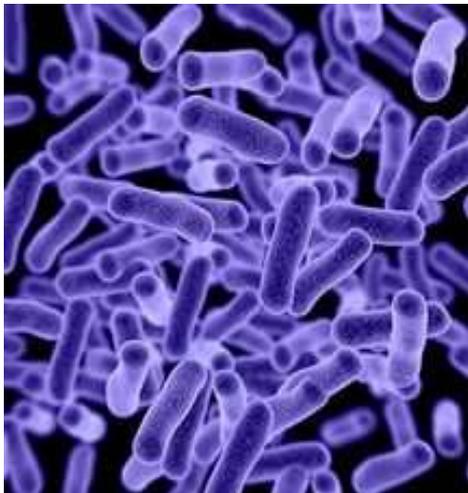
5. Образуемые лишайниками, водорослями, низшими растениями: *усниновая кислота* и др.

6. Образуемые высшими растениями: *аллицин*, *рафанин* и др.

7. Образующиеся в организмах животных: *лизоцим*, *интерферон*, *круцин* и др.

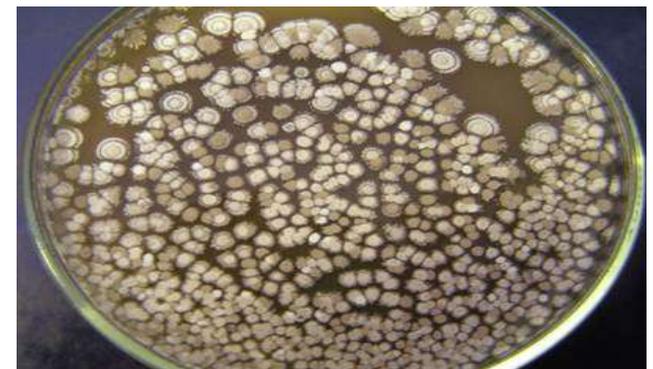
Продуценты антибиотиков

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



Микроорганизмы – продуценты антибиотиков.

- **Актиномицеты – это многоклеточные бактерии.** Актиномицеты не имеют ядра, т.е. актиномицеты – прокариоты, не имеют митохондрий, имеют сложный цикл развития.
- **Актиномицеты продуцируют следующие группы антибиотиков:** (не менее 50 % из всех известных),
- **-канамицин** - *Actinomyces kanamycetus*
- **-неомицин** - *Actinomyces iracie*
- **-окситетрациклин** – *Actinomyces ninesus*
- **- линкомицин** – *Streptomyces linconiensis*
- Природный левомицетин (хлорамфеникол) продуцируется *Streptomyces venezuelae*.
- **Рифамицин** – *Streptomyces mediterranei*, на основе рифамицина получен рифампицин.



Мицелиальные грибы, продуцирующие бета-лактамыные антибиотики.

- **Пенициллины** – *Penicillium chrysogenum*, *P. notatum*
цефалоспорины *Cephalosporium Acremonium chrysogenum*
являются известными представителями бета-лактамыных антибиотиков, продуцирующимися мицелиальными грибами. В структуре антибиотика имеется бета-лактамыное кольцо, обладающее способностью ингибирования синтеза пептидогликанов клеточной стенки. Антибиотики используются в лечении инфекций, вызванных грам(-) бактериями.

- **Фторхинолоны** – *синтетические антибиотики.*

Обладают широким спектром антимикробного действия. Некоторые

фторхинолоны обладают не только антибактериальной, и но и противоопухолевой , анти-ВИЧ-активностью.





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

1. **Химический синтез.** С помощью этого метода получают основные синтетические антибиотики.

2. **Биосинтез** (прямая ферментация микроорганизма – продуцента). Для получения антибиотиков этим способом используют штаммы микроорганизмов, образующие наибольшее количество антибиотика.

3. **Мутационный биосинтез** - Биосинтез антибиотиков с применением блокированных мутантов, у которых отсутствует или блокировано определенное звено в цепи реакций, ведущих к синтезу антибиотиков.



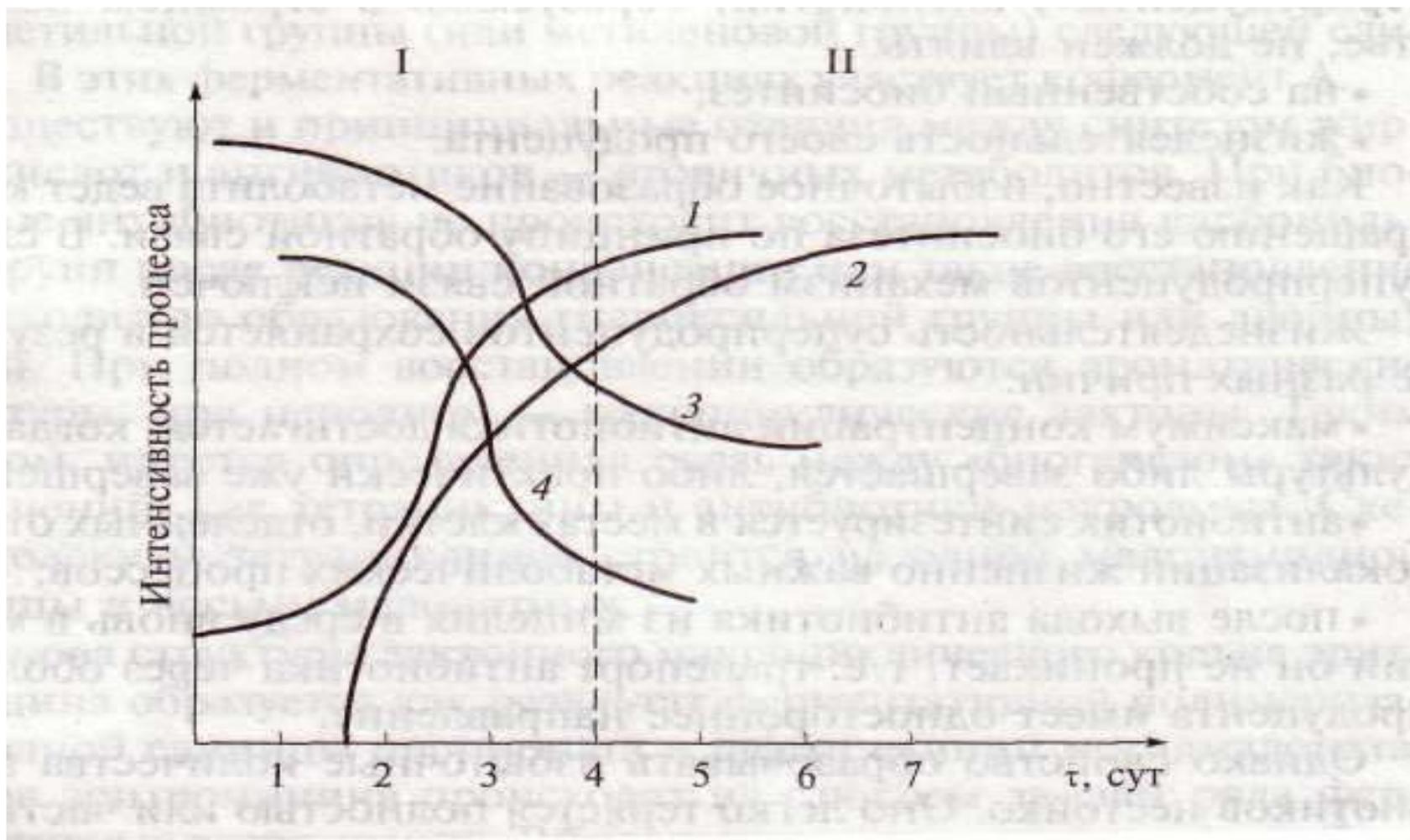
рДНК-биотехнологии в создании антибиотиков

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



Биосинтез вторичных метаболитов

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



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

Схема производства антибиотиков в процессе микробного биосинтеза

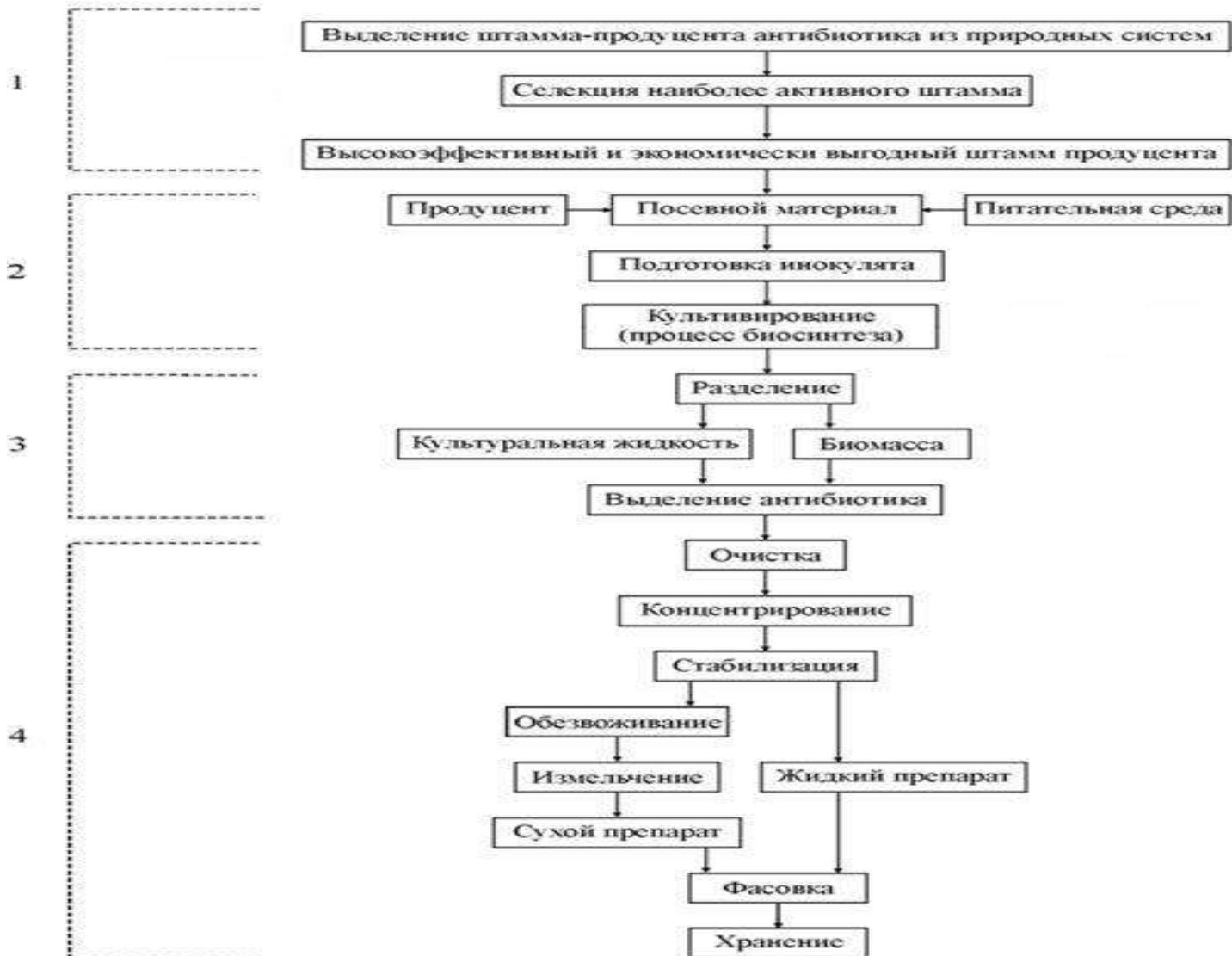


Схема промышленного биотехнологического производства антибиотиков

- **1. получение соответствующего штамма** — продуцента антибиотика, пригодного для промышленного производства;
- **2. подготовка питательной среды:** в технологии получения антибиотиков применяют *твердые питательные среды* – агаризованные или сыпучие субстраты (пшено, ячмень, пшеничные отруби и т.п.) и жидкие питательные среды.



- 3. **Подготовка посевного материала** (продуценты-мутанты → колба на качалке → первый инокулятор (10 л) → второй инокулятор (100–500 л) → ферментер).



4. Ферментация: для получения антибиотиков используют *методы поверхностного и глубинного культивирования.*

В ходе ферментации культура непрерывно аэрируется стерильным подогретым воздухом. Процесс ферментации осуществляется в строго стерильной глубинной аэробной периодической культуре, носит выраженный двухфазный характер.

Температура среды, рН и ряд др. параметров автоматически регулируются в соответствии с регламентом производства антибиотика. Антибиотики получают при глубинной аэробной ферментации периодического действия в асептических условиях. Период ферментации длится 7-10 суток.



5. Выделение антибиотиков. Если антибиотик находится в клетках, на первом этапе обработки биомассу выделяют из культуральной жидкости (фильтрацией или центрифугированием); после разрушения клеток антибиотик экстрагируют и переводят в растворимую фазу.

Затем данный раствор и культуральные среды (если антибиотик выделяется из клеток в среду) подвергают разным методам экстракции, разделения, очистки и концентрирования для получения готового продукта.



6. Очистка антибиотиков. включает стадии: *осаждение, сорбцию, сушку.* Затем препарат фасуют в стерильные флаконы с соблюдением условий, гарантирующих стерильность.

7. Получение готового продукта: Готовый продукт подвергается биологическому и фармакологическому контролю. **Биологический контроль определяет степень стерильности препарата.** При фармакологическом контроле проводят всесторонние испытания препарата **на токсичность, пирогенность, токсикогенность и др.,** оценивают антимикробный спектр препарата, действие на лейкоциты крови, устанавливают максимально переносимую дозу антибиотика, дозы, вызывающие полную и 50 % гибель экспериментальных животных.



Подбор питательной среды

Для каждого продуцента разрабатывается оптимальная среда, которая должна соответствовать определенным требованиям:

- а) обеспечивать максимальный выход антибиотика;
- б) состоять из относительно дешевых компонентов;
- в) иметь хорошую фильтрующую способность;
- г) обеспечивать применение наиболее экономичных приемов для выделения и очистки антибиотиков.

Используются следующие среды:

мясопептонная среда, в состав которой одновременно с мясным экстрактом и пептоном входят хлорид натрия, фосфат калия, иногда глюкоза или сахароза; используется обычно в лабораторной практике;

картофельные среды с глюкозой и пептоном, часто используемые в лаборатории для культивирования многих видов актиномицетов и бактерий;

среды с кукурузным экстрактом, соевой мукой, бардой и другими веществами, в состав которых входят сульфат аммония, карбонат кальция, фосфаты, глюкоза, сахароза, лактоза или иные углеводы и ряд других соединений; среды успешно применяются в промышленности, т. к. являются дешевыми и обеспечивают хорошее развитие микроорганизмов с высоким выходом антибиотиков.

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

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

Влияние рН среды. Многие бактериальные организмы, синтезирующие антибиотики, лучше развиваются при рН около 7,0, хотя некоторые, например молочнокислые стрептококки, продуцирующие низин, лучше развиваются в среде при рН = 5,5÷6,0. Большинство актиномицетов хорошо развиваются при начальных значениях рН среды в пределах от 6,7 до 7,8; в большинстве случаев жизнеспособность актиномицетов при рН ниже 4,0–4,5 подавлена.

Температура. Для большинства бактериальных организмов температурный оптимум развития лежит в диапазоне 30–37 °С. Для продуцента грамицидина С оптимальная температура для развития и биосинтеза равна 40 °С.

Актиномицеты, как правило, культивируются при температуре 26–30°С, хотя некоторые виды стрептомицетов могут развиваться как при пониженных (от 0 до 18 °С), так и при повышенных (55–60 °С) температурах.

Для большинства мицелиальных грибов оптимальная температура составляет 25–28 °С.

Аэрация. Большинство изученных продуцентов антибиотиков являются аэробами. Для биосинтеза многих антибиотиков (пенициллин, стрептомицин и др.) максимальное их накопление происходит при степени аэрации, равной единице, при которой через определенный объем среды за 1 мин продувается такой же объем воздуха.

В процессе развития продуцента антибиотика в промышленных условиях потребность организма в кислороде меняется в зависимости от стадии развития, вязкости культуральной жидкости и других факторов. На определенных стадиях могут возникнуть ситуации, связанные с кислородным голоданием продуцента. В этих условиях следует принимать дополнительные меры, например, повышение концентрации окислителя добавлением пероксида водорода.

Применение антибиотиков в пищевой промышленности хозяйства

Первые сведения об использовании антибиотиков в консервной промышленности относятся к 1943 году. К таким антибиотикам относятся **субтилин**, **низин** и др.

Так, для консервирования овощей предложено использовать **субтилин**, под действием которого наблюдается гибель клостридиальных и термофильных бактерий.

Низин – антибиотик, образуемый молочнокислыми бактериями, используется при консервировании не только овощей (томаты, зеленый горошек, цветная капуста), но и рыбы, молока, сыров и др. Антибиотик подавляет развитие ряда термофильных спорообразующих бактерий, не оказывая токсического действия на организм человека.



Значение антибиотиков для сельского хозяйства:

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



Стрептомицин используется для борьбы с возбудителями, вызывающими бактериальное увядание фасоли и сои; болезнями косточковых (в США); хлопка, риса (в Индии). В некоторых странах выпускают препараты стрептомицина с окситетрациклином, известные как «агримицин», «фитомицин», «фитостреп».

Биалофос – гербицид, полученный в начале 1980-х годов из культуры *S. hydroscopicus*. По своей структуре представляет трипептид, состоящий из двух остатков L-аланина и L-глутаминовой кислоты.

Антибиотики широко используются в животноводстве как лечебные средства против заболеваний сельскохозяйственных животных, птиц и пчел. Среди наиболее распространенных антибиотиков можно отметить **авермектины**, используемые для подавления развития паразитов, в том числе нематод; **монензин** для лечения кокцидоза домашней птицы; **линкомицин** для лечения дизентерии; **новобиоцин** для лечения холеры индеек.

