

Лекция 13

Селекция продуцентов антибиотиков.

Селекция продуцентов фармацевтически значимых соединений. Селекция продуцентов антибиотиков. Разнообразие антибиотических веществ, продуцируемых микроорганизмами. Антибиотики бактерий, актиномицет и мицелиальных грибов. Использование антибиотиков. Методы создания продуцентов антибиотиков и способы повышения их продуктивности.

13.1 Антибиотики как вторичные метаболиты и их продуценты

История науки об антибиотиках началась с того момента, когда лондонский микробиолог А. Флеминг обнаружил в 1929 г. на агаровой среде в чашке Петри, засеянной стафилококком, колонию плесневого гриба из рода *Penicillium*, образовавшуюся в результате случайно попавшей на агар из воздуха споры этого гриба. Он заметил вокруг колонии зону прозрачного агара. Гриб образовывал антибиотик пенициллин, который не только останавливал размножение стафилококка, но и вызывал последующий лизис его клеток. Однако в очищенном состоянии пенициллин был выделен лишь спустя десятилетие, в начале Второй мировой войны, когда с особой остротой встала проблема борьбы с раневой инфекцией.

Под названием «антибиотики» объединены вещества, образуемые микроорганизмами и избирательно подавляющие рост других микроорганизмов. Позднее это понятие было распространено и на продукты их химической модификации, что получило отражение в наименовании «полусинтетические антибиотики». Некоторые из антимикробных антибиотиков обладают способностью подавлять рост опухолевых клеток, в связи с чем появился еще один новый термин — противоопухолевые антибиотики. Именно антибиотики, использование которых в медицинской практике при инфекционных заболеваниях началось в 1940 г., вызвали (за счет снижения смертности) резкие демографические изменения глобального масштаба, быстрый рост населения в развивающихся странах, увеличение продолжительности жизни в развитых странах и т.д. На мировом рынке годовая стоимость продукции промышленности антибиотиков сейчас превышает 20 млрд долл. И продолжает стремительно возрастать.

Важнейшая характерная черта антибиотиков — их избирательность действия на метаболизм. Обычно из нескольких тысяч метаболических реакций антибиотик подавляет только одну или несколько. В этом отношении антибиотики противопоставляются антисептикам, активность которых значительно ниже (антибиотики угнетают рост микроорганизмов в концентрации порядка 1 мкг/мл и меньше).

Антибиотики принадлежат к самым разным классам химических соединений. Известно около 14 000 природных антибиотиков, образуемых микроорганизмами. Из них в медицинской практике применяют около 200.

К антибиотикам относятся только низкомолекулярные вещества — с молекулярной массой не более нескольких тысяч дальтон. Однако большинство антибиотиков, применяемых в медицине, имеет молекулярную массу в пределах одной тысячи дальтон. Образуемые микроорганизмами литические ферменты, несмотря на их антимикробную активность, к антибиотикам не относятся (белки-токсины).

Антибиотики высокоэффективны при инфекционных заболеваниях, вызываемых большинством грамположительных и грамотрицательных бактерий, многими патогенными грибами. Они с успехом используются при некоторых инфекциях простейших, риккетсий и крупных вирусов.

Успех лечения зависит от выбора антибиотика для индивидуального больного. Антимикробный спектр действия всех применяемых в медицинской практике антибиотиков известен, а вот видовая принадлежность и свойства возбудителя инфекции у конкретного больного, как правило, не известны. В то же время лечение, особенно при тяжело протекающем заболевании, должно быть начато своевременно. Осмотр и опрос больного, предварительные выводы о локализации и характере инфекций обычно позволяют врачу остановиться на одном из так называемых «антибиотиков выбора». Однако независимо от этого рациональная и целенаправленная антибиотикотерапия должна базироваться на тщательной бактериологической диагностике заболевания с выделением, идентификацией возбудителя и оценкой его чувствительности к ряду препаратов, чтобы выбрать наиболее эффективный для лечения антибиотик.

Для определения чувствительности возбудителя используются стандартные, бумажные диски, пропитанные раствором антибиотика и высушенные. Диски раскладываются на поверхности твердой питательной среды, засеянной культурой возбудителя, и после инкубации в термостате определяется величина зоны подавления роста диффундирующим в агар антибиотиком. В настоящее время в клинических микробиологических лабораториях используются автоматизированные системы, позволяющие быстро проводить большое количество таких определений.

Иногда, после сопоставления чувствительности возбудителя к разным антибиотикам, уже применявшийся «антибиотик выбора» заменяют или дополняют другим препаратом, более эффективным в каждом конкретном случае. Частой причиной такой замены является распространение среди патогенных микроорганизмов штаммов, устойчивых (резистентных) к тому или иному антибиотику. Тем не менее набор имеющихся в распоряжении врача антибиотиков, как природных, так и полусинтетических, не гарантирует полного успеха антибиотикотерапии.

Известно, что антибиотики не являются первичными метаболитами. Как правило, их структура резко отличается от первичных метаболитов. Иногда в их молекуле в качестве фрагментов обнаруживаются как необычные для организмов структуры, так и аналогии метаболитов, например, аминоциклитол и аминсахара у аминогликозидов; макроциклические лактоны и аминсахара у макролидов и полиенов. В отличие от первичных метаболитов (предшественников макромолекулярных соединений) антибиотики за редкими исключениями вообще не обнаруживаются во время первых часов роста культуры. Так, образуемые грибами или актиномицетами антибиотики можно выявить в культуральной жидкости или мицелии продуцента только на вторые—третьи сутки роста, причем в незначительных количествах. Максимум их накопления наступает на пятые—шестые сутки.

Несмотря на то, что при синтезе или «сборке» молекулы антибиотика используются первичные метаболиты (аминокислоты, сахара, жирные кислоты, пурины и т.д.), образование антибиотика подчиняется общим законам внутриклеточной регуляции, он становится необходимым для своего продуцента.

Существует несколько предположений о биологической роли антибиотиков. Наиболее распространенной считается гипотеза, что антибиотики являются средством преодоления «стрессовых» ситуаций для продуцента, независимо от того, чем вызвана такая ситуация — истощением питательных веществ в результате роста культуры конкурента или результатом размножения клеток своей же культуры.

Образование антибиотика определенной структуры не является строго видоспецифическим признаком. Принадлежащие к одному виду штаммы, выделенные из природных источников, могут иногда образовывать разные антибиотики. Особенно много таких примеров относится к виду *Streptomyces griseus*. Разные штаммы этого вида могут образовывать резко отличающиеся по структуре антибиотики: например, аминогликозидный антибиотик стрептомицин, полиеновый антибиотик кандицидин, антибиотик пептидной

структуры виридогризеин.

Штаммы микроорганизмов, отнюдь не близкие по своему систематическому положению, могут иногда образовывать сходные структуры. Цефалоспорины образуются не только грибами, но и актиномицетами (в последнем случае они получили название цефамицины). Антибиотики, ключевым компонентом которых является беталактамное ядро, образуются не только грибами и актиномицетами, но и отдельными штаммами бактерий некоторых видов, в том числе даже и неспорообразующих.

Все эти данные трудно объяснить, исходя из того, что каждый антибиотик играет специфическую роль в метаболизме своего продуцента. Японский исследователь Умегава, открывший несколько ценных для практики антимикробных и противоопухолевых антибиотиков, даже выдвинул гипотезу об антибиотиках как о случайных для штамма веществах. Он предположил, что гены биосинтеза антибиотиков могут быть локализованы во внехромосомных генетических элементах — плазмидах и передаваться от одного вида микроорганизма другому путем конъюгации или, например, переноситься с помощью умеренных фагов широкой специфичности. В настоящее время гипотеза Умегавы отвергнута: гены биосинтеза антибиотиков считаются локализованными только в хромосомах.

Внимание привлекла новая концепция: у микроорганизмов, особенно это относится к актиномицетам, часть генов в геноме находится в «молчащем» состоянии. Они не экспрессируются, т.е. продукты, кодируемые этими генами, в том числе антибиотики, не синтезируются. Однако под влиянием различных воздействий тот или иной участок «молчащего» генома начинает работать. В результате получают объяснение причины образования различными штаммами одного вида разных антибиотиков, а также образование близких антибиотиков микроорганизмами разных видов. Конечно, это не означает, что любой актиномицет может образовать любые антибиотики. Однако концепция «молчащих» генов заставляет уже на современном молекулярном уровне вернуться к одному из положений, высказанных классиком науки об антибиотиках американским микробиологом З. Ваксманом. Он утверждал, что, выделив почвенный микроорганизм на искусственных питательных средах и культивируя его в условиях, отличных от природных, нельзя получить представления о полном биосинтетическом потенциале микроорганизма и о перечне образуемых им вторичных метаболитов. Однако моделирование природных условий — исключительно сложная задача. Во-первых, на микроуровне они мало изучены. Во-вторых, их разнообразие должно быть очень велико.

В лабораториях разных стран мира выделены и охарактеризованы десятки тысяч продуцентов антибиотиков. Как правило, продуцентами антибиотиков являются такие почвенные микроорганизмы как плесневые грибы, актиномицеты

и спорообразующие бактерии.

Плесневые или «низшие» мицелиальные грибы отличаются от «высших» грибов отсутствием плодового тела. Плесневые грибы широко распространены в почве. Их относят к микроорганизмам эукариотам, имеющим оформленное, окруженное мембраной ядро. Плесневые грибы имеют также субклеточные структуры — митохондрии, где сосредоточены ферменты, катализирующие биоэнергетические процессы. Клеточная стенка грибом состоит из хитина — полимера, содержащего остатки аминсахаров. В целом клетки грибов отличаются сложной организацией и большими размерами по сравнению с бактериальными клетками.

Плесневые грибы — многоклеточные микроорганизмы со сложным циклом развития. Они формируют разные виды мицелия (например, воздушный — на поверхности водной среды), спороносцы со спорами и другие морфологические образования. Цикл развития грибов 6 — 7 сут. Плесневые грибы образуют сотни разных антибиотиков, однако в медицинской практике применяются лишь отдельные из них. Важнейшая группа антибиотиков, образуемых грибами, — пенициллины и цефалоспорины. Их объединяют под названием беталактамные антибиотики, так как важнейшая часть их молекулы, от которой зависит антимикробная активность, реакционно-способное четырехчленное беталактамное кольцо (5-членный амид):

Беталактамное кольцо получило свое название ввиду того, что при его образовании происходит замыкание связи между углеродом карбоксильной группы аминокислоты и азотом 5-членной группы, находящейся при бетауглеродном атоме. Беталактамные антибиотики образуются двумя родами плесневых грибов: *Penicillium* (отсюда — пенициллины) и *Cephalosporium* (цефалоспорины). В настоящее время предпочитают вместо *Cephalosporium* использовать название *Acremonium*. Широко известны два продуцента беталактамов: *Penicillium chrysogenum* и *Acremonium chrysogenum*. Первый образует бензилпенициллин:

У пенициллинов с беталактамной структурой сконденсировано пятичленное кольцо, содержащее серу, а у цефалоспоринов — шестичленное. К грибам относится продуцент еще одного антибиотика, применяемого в медицинской практике. Представитель рода *Fusidium*, а именно *Fusidium coccineum*, образует антибиотик стероидной структуры — фузидиевую кислоту:

Необходимо отметить еще один ценный лекарственный препарат, образуемый грибами. На рубеже 1970— 1980-х гг. из гриба рода *Tolurocladium* был выделен циклопептид, проявлявший слабую антимикробную активность, поэтому «забракованный» как антибиотик. Однако он оказался высокоэффективным в качестве иммуносупрессора. Циклопептид, получивший название циклоспорин (точнее циклоспорин G), широко используется при пересадке органов и тканей, а также при лечении некоторых аутоиммунных заболеваний.

Название «актиномицеты» отражает распространенное ранее неправильное представление об этих микроорганизмах как о лучистых грибах.

Установлено, что актиномицеты стоят гораздо ближе к бактериям, чем к грибам. Они являются прокариотами. Их геном не заключен в ядро, а представляет кольцевую хромосому, не отделенную от цитоплазмы ядерной мембраной.

Клетки актиномицетов не содержат также и митохондрий. Их клеточная стенка построена из гетерополимера — пептилогликана. Все это сближает актиномицеты с бактериями. Однако актиномицеты в отличие от «истинных» бактерий (эубактерий) являются многоклеточными организмами со сложным циклом развития, обычно за 5 —6 сут. Актиномицеты образуют спораносцы и споры.

Актиномицеты являются продуцентами огромного количества (около 4 000) разнообразных антибиотиков.

Актиномицетами образуется большинство антибиотиков, применяемых в медицинской практике. Ряд видов, относящихся к родам *Streptomyces* и *Micromonospora*, образуют (например, *Streptomyces griseus* и *Micromonospora purpurea*) антибиотики аминогликозидной структуры, к которым принадлежат: стрептомицин, гентамицин, неомицин, канамицин и ряд других антибиотических веществ с широким спектром антибактериального действия, получивших широкое распространение в клинике.

Как видно из структурных формул двух представителей бмииногликозидов — стрептомицина:

и гентамицина (под последним названием промышленностью выпускается не индивидуальное вещество а комплекс трех близких веществ — гентамицина C₁, гентамицина C₂):

в молекуле аминогликозидов обязательно присутствуют:

- остаток шестичленного аминциклитола;
- остатки сахаров и/или аминсахаров.

Кроме природных аминогликозидов в медицинской практике

в настоящее время используются и полусинтетические аминогликозидные антибиотики, т.е. продукты химической модификации природных аминогликозидов.

Виды, относящиеся к роду *Streptomyces* (*Streptomyces aureofaciens*, *Streptomyces griseus* и др.), образуют широко известные антибиотики тетрациклиновой структуры — тетрациклин:

хлортетрациклин (при $C_7—C1$), окситетрациклин (при $C_5—OH$).

Все они близки по спектру антибактериального действия, все всасываются при приеме внутрь, однако некоторыми преимуществами (лучшей переносимостью) обладает тетрациклин. Как видно из их формул, они содержат структуру из четырех циклов и разнятся только по «верхней», но не по «нижней» периферии молекулы.

Верхняя периферия тетрациклиновой молекулы была модифицирована химическим путем, что позволило получить полусинтетические тетрациклины — доксициклин, миноциклин и метациклин (первый из них длительно циркулирует в крови, второй обладает повышенной антибактериальной активностью).

Широко известны образуемые актиномицетами антибиотики макролидной структуры, содержащие макроциклическое лактонное кольцо и сахара и/или аминосахара. В частности, к ним относится эритромицин А (продуцент *Streptomyces erythraeus*):

и близкий к нему олеандомицин, образуемый *Streptomyces antibioticus*:

Эти антибиотики хорошо всасываются при приеме внутрь. Они высокоэффективны только против грамположительных бактерий, так как являются антибиотиками узкого спектра действия.

Из актиномицета, первоначально названного *Streptomyces mediterranei*, а позднее отнесенного к виду *Nocardia mediterranea*, выделены антибиотики сложной анзамициновой структуры. У них имеется нафталиновое «ядро» и длинная алифатическая цепь, соединенная с ароматической частью эфирной и амидной связями. Наибольшую известность из них получил рифампицин, или рифампин, который является, однако, полусинтетическим антибиотиком:

Рифампицин успешно применяется в лечении туберкулеза. Актиномицеты, помимо антибактериальных антибиотиков, образуют также и антибиотики, подавляющие рост грибов и дрожжей, в том числе патогенных.

Представители рода *Streptomyces*, например, *Streptomyces pourasei*, являются продуцентами противогрибковых антибиотиков, относящихся к полиеновым макролидам. Макроциклическое лактонное кольцо содержит у этих антибиотиков ряд сопряженных двойных связей. Наиболее известны амфотерицин В (гептаен): и нистатин (тетраендиен):

В молекулу полиеновых антибиотиков входят и аминокислоты. Полиеновые антибиотики широко известны в медицинской практике. Вследствие их высокой токсичности полиены применяются в основном наружно или перорально.

Нередко при пероральном применении их используют вместе с антибактериальными антибиотиками для того, чтобы предотвратить быстрое размножение дрожжей после подавления роста бактерий. Актиномицеты образуют ряд противоопухолевых антибиотиков. Из них свыше десяти нашли применение при лечении некоторых форм рака. Так, *Streptomyces verticillius* образует антибиотик блеомицин сложного гликопептидного строения. Наиболее важной в настоящее время считается группа антрациклинов,

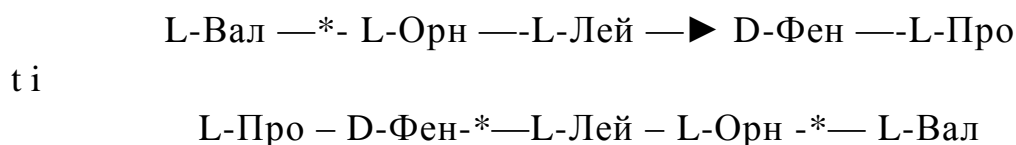
к которой принадлежат дауномицин ($R_1 = R_2 = \text{CH}_3$), адриамицин ($R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = \text{CH}_2\text{OH}$), карминостин¹, ($R_1 = \text{H}$; $R_2 = \text{CH}_3$):

и их полусинтетические производные. Продуцентами антрациклинов являются разные виды рода *Streptomyces*.

Как видно из приведенной формулы, антрациклины содержат структуру частично сходную с таковой у тетрациклинов, а также остаток аминокислоты. Однако ни по спектру антибиотического действия, ни по областям применения в клинике антрациклины и тетрациклины не сходны.

Аэробные спорообразующие грамположительные бактерии (бациллы) относятся к собственно бактериям. Как и все бактерии, они не имеют ядра. Их кольцевая хромосома имеет меньшие размеры, чем у актиномицетов. Их геном соответственно более прост, т.е. содержит меньше, чем у актиномицетов количество генов, и тем более, у грибов. Бактерии не имеют митохондрий. Их клеточная стенка близка по составу к клеточной стенке актиномицетов и состоит из пептидогликана. Жизненный цикл бактерий значительно короче жизненного цикла грибов и актиномицетов — около полутора суток.

Открыто более тысячи антибиотиков бактериального происхождения. Большинство из них представлены пептидами и циклопептидами. Еще во время Второй мировой войны был внедрен в лечебную практику (для обработки ран) циклический декапептид — грамицидин С:



Продуцентом антибиотика является *Bacillus brevis*.

Как видно из приведенной формулы, кроме L-аминокислот (валина, орнитина, лейцина, пролина), антибиотик содержит также и D-фенилаланин.

Позднее из другого вида почвенных споровых бактерий (*Bacillus polymyxa*) был выделен также нашедший применение в медицинской практике антибиотик полимиксин В — представитель ряда полимиксинов, в который входят свыше 20 соединений, различающихся по отдельным аминокислотным остаткам, а также по входящему в их молекулу остатку жирной кислоты. В структуре полимиксина В присутствуют три фрагмента: циклопептид, линейный трипептид, остаток 6-метилоктановой кислоты (непептидная часть молекулы):

В отличие от грамицидина полимиксин В используется не только для местного, но и для внутримышечного введения. В целом антибиотики, образуемые почвенными споровыми бактериями, не столь разнообразны, как антибиотики актиномицетов, и в медицинской практике они играют меньшую роль.

13.2 Механизмы биосинтеза антибиотиков

Три основных обстоятельства определяют особенности биосинтеза, общие для всех антибиотиков:

- антибиотики не относятся к прямым продуктам трансляции или вообще матричного синтеза;
- антибиотики как вторичные вещества образуются из первичных метаболитов;
- биосинтез молекулы любого антибиотика происходит с участием ряда ферментов.

Координация действия ферментов, т.е. обеспечение правильной последовательности ферментативных реакций, обеспечивается разными путями. Один путь, доказанный на примере биосинтеза 10ИК-лопептидных и некоторых других антибиотиков, связан с тем, что синтез или сборка антибиотической молекулы происходит в мультиферментных комплексах с упорядоченно расположенными ферментами. Первичные метаболиты «входят» в мультиферментный комплекс, в котором происходит ряд их превращений. Из комплекса «выходит» или завершённая молекула антибиотика, или ее крупный фрагмент, например, специфический агликон того или иного антибиотика и т. п. При «сборке» углеродного скелета молекулы антибиотика могут происходить различные реакции: метилирование или деметилирование; карбоксилирование или декарбоксилирование; аминирование или дезаминирование.

Предшественниками беталактамных антибиотиков являются аминокислоты. Началом формирования беталактамной молекулы является синтез так называемого LLD-трипептида из трех L-аминокислот — первичных метаболитов — L-аминоадипиновой кислоты, L-цистеина и L-валина:

В образовании последнего принимает участие фермент, замыкающий пептидные связи, а также фермент, превращающий L-валин в его оптический антипод — D-валин. Это уже специфические ферменты биосинтеза антибиотика, не принадлежащие к ферментам, катализирующим превращения первичных метаболитов в обычных метаболических циклах.

Затем LLD-трипептид превращается в моноциклический беталактам, т.е. происходит замыкание беталактамного кольца. Следующий этап — появление пятичленного серусодержащего кольца, сконденсированного с беталактамным. Все это означает участие в биосинтезе антибиотика новых ферментов. В случае образования бензилпенициллина необходимо присутствие фенилуксусной кислоты (в активированной форме), в результате чего освобождаются аминокислота и кофермент А.

Во втором случае происходит «экспансия» — расширение пятичленного кольца до шестичленного, что катализируется специфическим ферментом, получившим название «экспандаза». Далее, в результате еще ряда реакций формируется молекула цефалоспорина С.

Вышеперечисленные реакции биосинтеза демонстрируются как пример, чтобы еще раз подчеркнуть основополагающий тезис: молекула любого антибиотика синтезируется с обязательным участием ряда (5—10 и более) ферментов.

На основании анализа структурных формул аминогликозидов — стрептомицина и гентамицинов и других можно предположить, что их предшественником является глюкоза. Действительно, как показали многочисленные исследования, из глюкозы синтезируются не только остатки сахаров в молекулах аминогликозидов, но и их аминоклитольный фрагмент. Два других фрагмента молекулы стрептомицина — пентоза (стрептоза) и L-глюкозамин также образуются из глюкозы за счет ряда ферментативных реакций. Наконец, сборка молекулы стрептомицина из трех компонентов — стрептидина, стрептозы и L-глюкозамина (замыкание между ними гликозидных связей) требует специфических ферментов. В биосинтезе стрептомицина и большинства других аминогликозидных антибиотиков участвуют не менее 20 ферментов.

Описывая ферментативные реакции биосинтеза тетрациклиновой структуры, обычно проводят аналогию с биосинтезом первичных метаболитов — жирных кислот, из остатков ацетатных или пропионатных единиц по принципу «голова к хвосту», когда формируется связь между углеродом карбоксильной группы и углеродом метильной группы (или метиленовой группы) следующей единицы. В этих ферментативных реакциях участвует кофермент А.

Существуют и принципиальные отличия между синтезом жирных кислот и антибиотиков — вторичных метаболитов. При биосинтезе антибиотиков не происходит восстановления карбонильных групп после реакции конденсации или такое восстановление происходит до образования гидроксильной группы или двойных связей. При полном восстановлении образуются ароматические структуры; при неполном — макроциклические лактоны. Таким образом, имеется определенная связь между «биогенезом» таких соединений, как тетрациклины и антибиотики-макролиды. Скелет молекулы тетрациклинов строится из одной малонамидной единицы и восьми малонатных.

Основа структуры лактонного макроциклического кольца эритромицина образуется как результат ферментативной полимеризации одной единицы пропионата и шести единиц метилмалоната. Сахара эритромицина происходят из глюкозы за счет ряда ферментативных превращений. В биосинтезе участвуют ферменты сборки молекулы из макроциклического лактона и сахаров.

Методы генной инженерии с успехом используются при создании продуцентов рекомбинантных белков, так как белки — прямые продукты трансляции. В целом остается справедливым правило: один ген — один белок, т.е. один «структурный» ген определяет структуру (последовательность аминокислот) одного белка.

Антибиотики не являются прямыми продуктами трансляции в отличие от ферментов биосинтеза антибиотиков. Количество таких ферментов достигает нескольких десятков. Таким образом, в биосинтезе молекулы антибиотика принимают участие десятки «структурных» генов.

13.3 Биотехнология антибиотиков

Фактически ни один продуцент, выделенный из почвы или другого природного источника, непосредственно в производстве использован быть не может. Природный штамм образует лишь незначительные количества антибиотиков. Обработкой мутагенами и многоступенчатым отбором (селекцией) активных вариантов обычно удается повысить активность штамма, так как количество образуемого им антибиотика увеличивается в тысячи и даже десятки тысяч раз. Например, у продуцента пенициллина в результате десятков лет селекционной работы во многих лабораториях разных стран мира активность повысилась от десятков микрограммов до десятых долей грамма антибиотика в миллилитре среды.

У промышленных мутантных штаммов (рабочий термин «суперпродуценты») антибиотик, образуемый в огромном количестве, не должен влиять:

- на собственный биосинтез;
- жизнедеятельность своего продуцента.

Как известно, избыточное образование метаболита ведет к прекращению его биосинтеза по принципу обратной связи. В случае суперпродуцентов механизм обратной связи исключен.

Жизнедеятельность суперпродуцентов сохраняется в результате разных причин:

- максимум концентрации антибиотика достигается, когда рост культуры либо завершается, либо практически уже завершен;
- антибиотик синтезируется в местах клетки, отделенных от мест локализации жизненно важных метаболических процессов;
- после выхода антибиотика из мицелия в среду вновь в мицелий он не проникает, т.е. транспорт антибиотика через оболочку продуцента имеет одностороннее направление.

Однако свойство образовывать избыточные количества антибиотиков нестойко. Оно легко теряется полностью или частично, поэтому промышленные продуценты хранят в особых условиях, периодически проверяя их активность. При необходимости их рассеивают на отдельные колонии, из которых затем отираются наиболее активные.

При разработке биотехнологии антибиотиков учитываются общие свойства продуцентов, а также, что каждый антибиотик является конечным продуктом длинной цепи специфических ферментативных реакций.

Продуценты большинства антибиотиков, в том числе важнейших для медицинской практики, являются аэробами или (реже) факультативными анаэробами. В связи с этим в первые годы после получения пенициллина, грамицидина С и некоторых других веществ их продуценты выращивали на поверхности жидкой питательной среды в стационарных условиях в микробиологических матрацах или колбах, помещаемых в термостат или термостатные комнаты. Культура продуцента росла только на поверхности среды. Этот способ был трудоемок, не экономичен и не позволял нарабатывать антибиотик в больших количествах. Очень скоро поверхностная ферментация была заменена на глубинную. Через питательную среду пропускали воздух и среду непрерывно перемешивали. Это позволило использовать для роста продуцента весь объем среды.

Только глубинная ферментация создала возможность современного биотехнологического производства с выпуском конечного продукта в большом количестве.

Кривые накопления биомассы продуцента и антибиотика в культуральной жидкости, а также и в мицелии продуцента, не совпадают во времени. Вторая кривая значительно запаздывает (рис. 13).

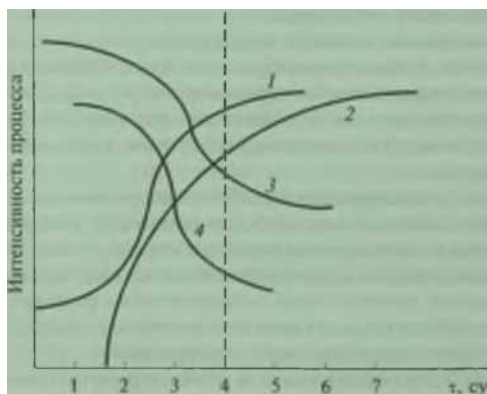


Рис. 13. Особенности ферментационного процесса при получении антибиотиков: I — трофофаза; II — идиофаза; / — биомасса; 2 — антибиотик; 3 — углеводы; 4 — источники азота

Это относится к продуцентам всех важнейших антибиотиков: гри14ол, актиномицетам, споровым бактериям. Первая фаза развития культуры продуцента во время ферментационного процесса была названа «трофофаза» — фаза сбалансированного роста. Вторая — «идиофаза» или фаза несбалансированного роста. В течение трофофазы антибиотик в культуральной жидкости не обнаруживается или обнаруживается в незначительных количествах. Во время идиофазы прирост биомассы замедляется. Наступает быстрое накопление антибиотика в культуральной жидкости. В трофофазе источники углерода и азота в среде быстро потребляются, и количество их в среде уменьшается. В идиофазе их потребление замедляется, а в конце идиофазы происходит частичный лизис густой культуры мицелия.

Одновременно в культуре можно обнаружить и некоторое количество новых нитей молодого мицелия, который находится уже в условиях среды, обедненной питательными веществами, и участвует в биосинтезе антибиотика.

Таким образом, интенсивному биосинтезу антибиотика способствует значительное уменьшение в среде источников углерода и азота, особенно легко усваиваемых. Происходит депрессия ферментов синтеза антибиотика. Однако выращивание продуцентов с самого начала ферментации на обедненных средах нецелесообразно, так как незначительное накопление биомассы в течение трофофазы ведет в конечном счете и к незначительному накоплению антибиотика малым количеством клеток продуцента.

Для высокопродуктивной ферментации необходимо соблюдать определенные условия. Продуценты антибиотиков выращивают на разных средах как относительно простого состава, так и сложного.

Последние получили название комплексных сред. В них могут входить соевая или хлопковая мука, кукурузный экстракт и другие природные многокомпонентные источники питательных веществ. Также в среды вносят индивидуальные органические соединения и минеральные соли. Для каждого штамма-продуцента состав оптимальной для биосинтеза антибиотика среды подбирается отдельно. Это относится даже к штаммам одного вида, продуцирующим один и тот же антибиотик. Существуют и некоторые общие закономерности, учитываемые при работе с большинством продуцентов.

Углеродкатаболическая регуляция является одним из механизмов, воздействующих на биосинтез вторичных метаболитов. Известно, что глюкоза — лучший источник углерода и энергии для любых организмов. Однако быстрый катаболизм глюкозы резко снижает биосинтез антибиотиков. Показано, что глюкоза ослабляет биосинтез бета-лактамов, аминогликозидов и многих других антибиотиков, образуемых разными продуцентами. Относительно биосинтеза антибиотиков отметим, что глюкоза, фруктоза, сахароза и галактоза — сильные репрессоры этого процесса. Необходимо подчеркнуть, что продукты катаболизма глюкозы подавляют не активность ферментов биосинтеза антибиотиков, а сам синтез этих ферментов. Медленно утилизирующиеся полисахариды (крахмал и др.) более благоприятны для биосинтеза антибиотиков. Не является репрессором биосинтеза и лактоза, которая также медленно утилизируется: при ее гидролизе освобождающаяся глюкоза репрессирует бета-галактозидазу и, в результате, гидролиз лактозы (появление в среде глюкозы) замедляется.

Высокое содержание в среде фосфора (в виде неорганических фосфатных солей) неблагоприятно для биосинтеза большинства антибиотиков. Общая причина этого — обогащение клетки макроэргическими фосфорными соединениями (прежде всего АТФ), что повышает скорость роста мицелия. Накапливается много биомассы, но относительно мало антибиотика. Например, высокоактивные штаммы продуцентов тетрациклиновых антибиотиков содержат в мицелии меньше АТФ и растут медленнее, чем исходные низкоактивные продуценты тетрациклинов. Неблагоприятное действие фосфора на биосинтез бета-лактамных антибиотиков объясняется на биохимическом уровне следующим механизмом: образование LLD-трипептида — ключевого соединения, с которого начинается синтез пенициллинов и цефалоспоринов, ингибируется глюкозо-6-фосфатом. Взаимодействие легкоокисляемого сахара и фосфата оказывает отрицательный эффект на биосинтез.

Однако все вышеизложенное не означает, что фосфор может быть полностью исключен из среды. Биосинтез антибиотиков снижается при его избыточном количестве, поэтому для каждого штамма-продуцента подбирается оптимальное содержание фосфора в среде.

Аммоний и другие легкоутилизируемые источники азота подобно легкоокисляемым углеводам усиливают рост продуцентов беталактамных, полиеновых антибиотиков (эритромицина, рифамицинов и др.), но отрицательно влияют на их биосинтез. Соевая и хлопковая мука, БВК (белково-витаминный концентрат) медленно расщепляются в процессе ферментации, т.е. из них медленно высвобождаются аминокислоты и ионы аммония, поэтому их используют в качестве компонентов питательных сред, что позволяет получать высокий выход антибиотиков. Механизм отрицательного действия легкоусвояемых источников азота на биосинтез антибиотиков не ясен. Есть данные, что у продуцентов беталактамов он связан с уровнем глутаминсинтетазы в мицелии. Известно, что глутамин является донором аминокрупп для ряда аминокислот, а сами аминокислоты, в свою очередь, являются предшественниками беталактамных антибиотиков. Вероятно, что у разных продуцентов механизм этого действия на биосинтез различен. В любом случае неблагоприятное действие легкоусвояемых источников азота на биосинтез обязательно учитывается при подборе сред, а также осуществляется контроль количества таких соединений.

Некоторые первичные метаболиты являются прямыми предшественниками антибиотиков, например, валин включается в трипептид, из которого формируются беталактамные структуры. При избытке валина и высокой концентрации его в мицелии происходит подавление валином собственного биосинтеза по принципу обратной связи. Находясь в избытке, он подавляет активность ацетогидроксинтетазы — первого фермента своего биосинтетического пути. Однако в результате снижается и образование трипептида, т.е. в конечном счете и беталактамного антибиотика.

Некоторые же первичные метаболиты являются конечными продуктами разветвленного метаболического пути. Одно «ответвление» или один конец этого пути заканчивается первичным метаболитом, другое «ответвление» — антибиотиком. Так, альфа-аминоадипиновая кислота является, с одной стороны, прямым предшественником лизина, с другой — беталактамного антибиотика, так как включается в исходный для его синтеза трипептид. При избытке лизина происходит подавление образования альфа-аминоадипиновой кислоты по принципу обратной связи и, таким образом, снижается синтез не только лизина, но и беталактамного антибиотика (см. рис. 8).

Эти примеры показывают, что у высокоактивных штаммов продуцентов антибиотиков, полученных генетическими методами, должны быть нарушены механизмы обратной регуляции биосинтеза тех первичных метаболитов, которые необходимы для образования антибиотической молекулы. Можно отметить, например, что лизин подавляет биосинтез пенициллина у низкоактивных продуцентов. Полученные из них же «изогенные» высокоактивные штаммы уже не отвечают на избыток лизина в среде снижением биосинтеза антибиотика.

Важность аэрации для обеспечения роста продуцентов на стадии ферментации обусловлена тем, что большинство из них — аэробы. Кислород необходим для биосинтеза ряда антибиотиков, так как последний расходуется при замыкании беталактамного и тиазол идинового колец во время биосинтеза беталактамной структуры. Например, для образования изопенициллина N из LLD-трипептида молекулярный кислород необходим в стехиометрическом отношении 1 : 1 (предельное насыщение кислородом культуральной жидкости 30%). Когда ферментация идет успешно, кислород потребляется со скоростью 170 л/(л ■ мин). И целом потребность в кислороде зависит от концентрации биомассы и ее метаболической активности. Оптимизации снабжения кислородом достигается увеличением скорости его переноса.

Также при очистке антибиотиков широко используются ионообменные смолы (катиониты и аниониты). Особое значение эти сорбционные методы сыграли в свое время в решении проблемы получения в высокоочищенном виде аминогликозидных антибиотиков — стрептомицина и других, имеющих свойства оснований. Аминогликозиды слабо растворимы в органических растворителях, и вследствие этого экстракционный метод применительно к ним не может быть использован. В производстве стрептомицина могут быть, например, успешно использованы карбоксильные катиониты в натриевой форме. Десорбция осуществляется раствором серной кислоты. После дополнительной процедуры, связанной с пропуском стрептомицина через сульфокатионит (для удаления ионов натрия), получают сульфат стрептомицина.

Помимо традиционных экстракционных и сорбционных методов при выделении и очистке антибиотиков все большее значение приобретает комплекс приемов, объединяемых под названием мембранной технологии.

При обезвоживании препаратов антибиотиков в зависимости от свойств антибиотика используют лиофильную или распылительную сушку. В последнем случае раствор антибиотика распыляется из форсунок до частиц диаметром 5 — 25 мкм в токе нагретого до 160°C воздуха. Сушка происходит в течение долей секунды. Затем препарат фасуют в стерильные флаконы с соблюдением условий, гарантирующих стерильность.

Так как биосинтез антибиотиков ведется в асептических условиях, то при выделении, очистке и получении лекарственных форм также соблюдаются максимально возможные предосторожности против контаминации. Тем не менее проблема стерильности инъекционных препаратов и обсемененности препаратов для наружного применения остается одной из самых сложных для производства как антибиотиков, так и лекарственных средств в целом. Поэтому при обнаружении расфасованных, нестерильных серий препаратов иногда применяют метод радиационной стерилизации и, учитывая нестандартность сложившейся ситуации. Определенные виды ионизирующей радиации допустимы для стерилизации лекарственных средств. Соответствующие указания имеются в официальных фармакопейных документах.

Хорошо известно, что ионизирующей радиацией стерилизуются хирургические инструменты, резиновые перчатки шприцы одноразового пользования и т.п. Следует подчеркнуть, что при такой стерилизации (в минимальных дозах) загрязняющие препарат микроорганизмы теряют способность к размножению и гибнут вследствие повреждения ДНК (происходят сшивки между нуклеотидами, а также разрывы ДНК). При термической стерилизации и отличие от радиационной происходит денатурация многих белков клетки, и результате чего ее повреждения становятся более многочисленными; при стерилизации путем мембранной фильтрации микробные клетки не погибают, а удаляются из лекарственного препарата.

Как уже отмечалось, радиационная или лучевая (жаргонный термин) стерилизация используется на отдельных производствах ввиду объективных трудностей при внедрении технологии получения нового препарата, а иногда и по экономическим причинам. Установлено, что стерилизующая доза ионизирующего облучения составляет 2,5 Мрад (1 рад = 100 эрг/г).

Специалист с высшим фармацевтическим образованием должен занимать четкую и грамотную позицию в отношении бытующей радиофобии, выражающейся в том, что радиационная стерилизация может якобы привести к наведенной радиоактивности облученных препаратов. Разрешенные для стерилизации лекарств гамма-лучи изотопа кобальта (^{60}Co) и быстрые электроны с энергией не выше 5 МэВ, получаемые на ускорителях, не могут вызвать наведенной радиации у обработанных ими препаратов независимо от поглощенной дозы облучения, так как неспособны расщепить атомное ядро.

Гамма-лучи (^{60}Co) в воздухе распространяются на несколько десятков метров, в воде — на несколько десятков сантиметров, в свинце — на несколько сантиметров. На промышленной установке защитный слой воды, окружающий герметичную стерилизационную камеру, где находятся стандартные стержни с ^{60}Co длиной до 1 м и упаковки со стерилизуемым лекарственным препаратом, должен составлять несколько метров. Стерилизационная камера снабжена автоматизированным дистанционным управлением, позволяющим вдвигать в нее и удалять из нее стержни с кобальтом, разъединяя таким образом источник облучения и упаковки со стерилизуемым препаратом. Режим стерилизации обычно подбирается с таким расчетом, чтобы стерилизующая доза (2,5 Мрад) набиралась облучаемым препаратом примерно за сутки. При этом следует иметь в виду, что период полураспада ^{60}Co составляет около пяти лет. Естественно, что работа на установках с радиоактивным кобальтом постоянно требует особых мер предосторожности.

Установка, где для стерилизации используются быстрые электроны, во многом принципиально отличается от рассмотренной. Проникающая способность электронов, разогнанных до разрешаемого для стерилизации лекарств показателя, невелика. Электроны не могут «пронизать» несколько рядов флаконов или ампул. Чтобы набрать стерилизующую дозу в 2,5 Мрад, требуются секунды или доли секунд. Поэтому флаконы подают по одному с помощью транспортера к соответствующему «окошку», через которое в них набирается стерилизующая доза. После выключения такая стерилизационная установка становится абсолютно безопасной в радиационном отношении.

Значительный опыт по использованию радиационной стерилизации биотехнологических препаратов накоплен при обработке антибиотиков: стерилизации подвергались расфасованные по флаконам лиофильно высушенные субстанции, соли антибиотиков и их препараты с разными наполнителями.

В ряде случаев препараты искусственно заражали микроорганизмами разных видов и их спорами. Стерилизующая доза в 2,5 Мрад обуславливала гарантированную стерильность. При этом облученные препараты — большинство антибиотиков (природные и полусинтетические пенициллины, аминогликозиды, тетрациклины и ряд других) сохраняли активность и удовлетворяли фармакопейным тестам. Исключение составляли полиены, т.е. структуры с сопряженными двойными связями (например, нистатин, который при облучении заметно терял активность).

При сравнении их с необлученными препаратами можно было выявить некоторые отличия: белые (бесцветные) порошки теряли «блестящий» оттенок, приобретая матовый, а порошки красного (актиномицины) и желтого (тетрациклины) цвета тускнели.

Под влиянием облучения изменяется и кристаллическая решетка стекла. Оно темнеет, мутнеет и приобретает, таким образом, непривлекательный с коммерческой точки зрения вид, хотя полностью сохраняет свои функциональные качества. Потемнение обратимо, но при комнатной температуре исчезает медленно (в течение нескольких месяцев). Не выпускать облученные препараты в течение такого срока в аптечную сеть — значит сократить для потребителя срок годности облученных серий. Теоретически для изготовления флаконов и ампул можно использовать стекло с некоторыми редкоземельными элементами, однако это стекло слишком дорого для изготовления из него сотен миллионов единиц стандартных изделий.

13.4 Механизмы действия антибиотиков

13.4.1. Классификация механизмов

Изучение механизмов действия таких высокоактивных и вместе с тем избирательных ингибиторов метаболизма, как антибиотики, связано с определенными проблемами, так как помимо первичного нарушения метаболизма, вызываемого непосредственно реагированием антибиотика с его внутриклеточной мишенью, наступает «каскад» вторичных реакций, ведущих к бактериостатическому или бактерицидному, а иногда к литическому эффектам.

Применяемые в медицине антибиотики по механизму действия дифференцируются на следующие основные группы:

- ингибиторы образования клеточной стенки бактерий;
- ингибиторы белкового синтеза из бактерий;
- ингибиторы синтеза нуклеиновых кислот;
- ингибиторы функций цитоплазматической мембраны микробной клетки.

13.4.2 Ингибиторы образования клеточной стенки бактерий

Ингибирование происходит вследствие избирательного подавления активности тех или иных ферментов, включенных в многоэтапный синтез основного полимера клеточной стенки — пептидогликана. В число ингибиторов синтеза пептидогликана входят цефалоспорины и другие вещества беталактамной структуры.

Пептидогликан, в соответствии со своим названием, состоит из принципиально разных частей. Его длинные параллельные гликановые нити построены из перемежающихся остатков двух сахаров: N-ацетилглюкозамина и мурамовой кислоты. Мурамовая кислота (ее название — от греч. *μυρον* — стена, так как впервые она была обнаружена в клеточной стенке бактерий) является эфиром N-ацетилглюкозамина и молочной кислоты. Пептидная часть полимера состоит из коротких пептидных цепочек (трех — пяти аминокислотных остатков), отходящих от остатков мурамовой кислоты в гликане.

Пептидные цепочки, ответвляющиеся таким образом от параллельных гликановых нитей, замыкаются пептидной связью. Между параллельными нитями гликана образуются поперечные пептидные «мостики» и формируется законченный или целостный пептидогликан, который жесткой «сетью» охватывает всю бактериальную клетку (рис. 14).

Грамположительные бактерии имеют толстый слой пептидогликана; у грамотрицательных он гораздо тоньше.

Беталактамы (все без исключения) во время биосинтеза пептидогликана подавляют катализируемое ферментами замыкание пептидных цепочек в пептидные мостики. Гликановые нити остаются разъединенными; формирования непрерывной сети пептидогликана, охватывающей клетку, не происходит. Это означает, что пептидогликан теряет свои свойства, жизненно необходимые бактериальной клетке. Бактериальные клетки делятся, увеличиваются в размерах, вновь делятся и т.д., а это требует постоянного синтеза пептидогликана и «вставки» вновь синтезированных фрагментов в полимер, который для этого «разрезается» специфическими гидролизами пептидогликана. В нормальных условиях в клетке сохраняется баланс между действием ферментов, гидролизующих пептидогликан и синтезирующих его.

В присутствии беталактамов этот баланс нарушается. Прекращается синтез пептидогликана, но его ферментативный гидролиз продолжается и даже усиливается из-за того, что клеточная стенка теряет некоторые компоненты «сдерживающие» их активность путем обратимого блокирования гидролаз. Гидролизуются и гликановые нити, и пептидные мостики. Механизм антибиотической активности беталактамов связан с теми ферментами — мишенями, которые не имеют аналогов в животной клетке. В ней нет ни жесткой клеточной стенки, ни пептидогликана, ни, соответственно, ферментов его синтеза. Таким образом, беталактамы не могут быть токсичны для организма человека, а если у некоторых из них при определенных условиях выявляются токсические свойства или аллергия, то это никак не связано с механизмом их антибактериального действия.

13.4.3 Ингибиторы белкового синтеза у бактерий

К ним относятся все аминогликозиды (стрептомицин, гентамицин и др.), а также тетрациклины, эритромицин, левомицетин и некоторые другие антибиотики. Эти антибиотики реагируют с рибосомами бактерий, в результате чего синтез белка в рибосомных системах прекращается. Цитоплазматические рибосомы животной клетки реагируют с ними гораздо слабее или вообще не связывают указанные антибиотики. Рибосомы митохондрий животной клетки (близкие по свойствам к бактериальным) защищены от перечисленных антибиотиков митохондриальной мембраной. Два этих обстоятельства и создают возможность использования этих антибиотиков в клинике, т.е. делают их малотоксичными для человека.

Существуют антибиотики, реагирующие с рибосомами и микроорганизмов, и животной клетки. В медицинской практике они не используются, но производятся как реагенты для биохимических и молекулярно-биологических исследований (например, антибиотик циклогексимид).

Как правило, ингибиторами белкового синтеза являются бактериостатические вещества. Прекращение синтеза белка само по себе не ведет к гибели клетки. В опытах *in vitro* клетки прекращают размножение и постепенно, очень медленно отмирают. Если же антибиотик вызывает бактериостазис в макроорганизме, то прекратившее размножение клетки уменьшаются в количестве гораздо быстрее, так как уничтожаются защитными силами организма хозяина.

Среди ингибиторов белкового синтеза оказались и бактерицидные вещества — большая группа антибиотиков аминогликозидов. Последние реагируют с малой рибосомной субъединицей и связываются именно с тем ее местом, где происходит узнавание кодона информационной РНК антикодонами транспортных РНК. В результате нарушается точность узнавания. В синтезируемый в это время рибосомной (точнее полисомной) системой белок включаются аминокислоты, не соответствующие последовательности аминокислот в этом белке, закодированной в информационной РНК. Это явление получило название «нарушение точности передачи генетического кода на стадии трансляции».

Хотя аминогликозиды быстро прекращают белковый синтез, особенность места их связывания на рибосоме приводит к тому, что до прекращения работы рибосомных систем с них успевает «сойти» некоторое количество белковых молекул с неправильной последовательностью аминокислот.

Эти белки, получившие название «летальных», включаются в цитоплазматическую мембрану бактериальной клетки и нарушают ее молекулярную организацию. Клетка начинает терять низкомолекулярные метаболиты, коферменты, неорганические ионы. Все это ведет к дисбалансу ферментативных реакций и гибели клетки.

13.4.4 Ингибиторы синтеза нуклеиновых кислот

К этой группе антибиотиков (антрациклины, блеомицин, оливомидин и др.) относится ряд ДНК-тропных противоопухолевых веществ. Они подавляют синтез РНК, а некоторые из них — синтез и ДНК, и РНК, поскольку связываются с ДНК (последняя играет роль матрицы как при репликации ДНК, так и при транскрипции, т.е. синтезе РНК).

Такие антибиотики всегда заметно токсичны, потому что связываются с ДНК любого происхождения — бактериального, вирусного, растительного, животного. Возможность их применения как цитостатиков в онкологической практике обусловлена тем, что клетки опухолей растут (размножаются) быстрее клеток нормальной ткани, и антибиотический эффект на опухоли выражается сильнее.

В инфекционной клинике ДНК-тропные препараты не принято употреблять ввиду их токсичности и наличия в распоряжении лечащего врача ряда более избирательно действующих антимикробных антибиотиков.

Ингибиторами синтеза нуклеиновых кислот могут быть не только ДНК-тропные антибиотики. Антибиотик рифампицин — ингибитор синтеза РНК, связывается не с ДНК-матрицей, а с ферментом — РНК-полимеразой, причем связывается избирательно: только с ферментом из бактерий, а не из животных клеток. Рифампицин применяется для лечения ряда инфекций, в том числе туберкулеза, так как может длительно вводиться человеку без проявления токсичности.

К числу ингибиторов ферментов, участвующих в синтезе и превращениях нуклеиновых кислот, относятся и новые синтетические антибактериальные вещества — фторхинолоны, внедряемые в настоящее время в лечебную практику.

Эти препараты обладают широким антибактериальным спектром действия. В качестве примера можно привести пефлоксацин (абактал): преимущественно влияющий на грамотрицательные бактерии и норфлоксацин (нолицин): отличающийся от первого отсутствием метильной группы в пиперазинильном ядре и более высокой антибактериальной активностью.

Отметим, что есть данные о влиянии фторхинолонов на развитие хрящевой ткани (в связи с этим применение фторхинолонов в детской клинике не рекомендуется). Они не являются продуктами биотехнологического производства. Вместе с тем, учитывая их практическую важность а также возможность получения ковалентно связанных цефалоспоринов с фторхинолонами, целесообразно кратко рассмотреть механизм их действия.

Фторхинолоны являются ингибиторами фермента ДНК-гиразы. Функция этого фермента — введение в кольцевую ДНК «супервитков» или «скручивание» ее молекулы. Молекула ДНК становится более компактной, а также приобретает «внутреннее напряжение»: при разрезании ее рестриктазами комплементарные нити быстро расходятся, чем облегчается действие ДНК- и РНК- полимераз при репликации ДНК или транскрипции (синтезе РНК на ДНК-матрице). Фермент ДНК-гираза состоит из нескольких субъединиц и катализирует несколько реакций, в том числе требующих энергии при введении в ДНК супервитков. Фторхинолоны подавляют функции так называемой субъединицы А. Бактериальная ДНК-гираза относится по классификации ферментов к ДНК-топоизомеразам. В реакции с ДНК-шпоизомеразами животной клетки фторхинолоны не вступают.

13.4.5 Ингибиторы функций цитоплазматической мембраны микробной клетки

Среди применяемых в лечебной практике антибиотиков с таким механизмом действия наиболее известны противогрибковые антибиотики полиеновой (т.е. с сопряженными двойными связями) структуры: нистатин, амфотерицин В, леворин. Они реагируют со стеролами в мембране патогенных грибов и дрожжей, в результате чего образуются поры, через которые «вытекают» низкомолекулярные метаболиты, и клетка гибнет. Эргостерол (основной стерол в мембране грибов и дрожжей) реагирует с полиеновыми антибиотиками быстрее и при более низких концентрациях, чем холестерол (холестерин) мембраны животных клеток. Эта реакция лежит в основе избирательного действия полиенов. Тем не менее полиены — препараты в основном только наружного и полостного применений.

Если рассматривать механизм действия антибиотиков на молекулярном уровне, то выявляются различия уже между представителями одной и той же группы, т.е. близкого механизма действия.

Например, разные ингибиторы белкового синтеза реагируют с разными субъединицами рибосом и с разными местами на этих субъединицах. При этом подавляются, естественно, разные реакции такого сложного многоэтапного процесса, как белковый синтез. Указанное обстоятельство объясняет причину применения в клинике не одного, а разных ингибиторов белкового синтеза, поскольку на молекулярном уровне механизм их действия неодинаков.

Второй пример относится к беталактамным антибиотикам. Мишенями в клетке для пенициллинов и цефалоспоринов являются ферменты транспептидазы и D,D-карбоксипептидазы, которые катализируют последние реакции сложного процесса синтеза полимера клеточной стенки бактерий — пептидогликана. Активный центр этих ферментов имеет сродство к остаткам аминокислот, которыми заканчиваются пептидные цепочки.

Почти у всех бактерий последняя и предпоследняя аминокислота в пептидной цепочке — D-аланин. Беталактамное кольцо в молекуле антибиотиков, подавляющих активность транспептидаз и D,D-карбоксипептидаз, имеет сходство с одной из стереоформ, которые принимают попавший в активный центр свободный конец пептидных цепочек, являющийся D-аланил- D-аланином.

Попав в активный центр ферментов-мишеней, беталактамный антибиотик после расщепления своего беталактамного кольца ковалентно связывается с ферментом, ацилируя одну из гидроксильных групп в активном центре. Бактериальная клетка содержит несколько разных по молекулярной массе транспептидаз, например, участвующих в элонгации (удлинении, росте палочковидных клеток) пептидогликана или в формировании полюсов клеток, или в образовании пептидогликановой перегородки при делении клетки.

Сродство у разных беталактамных молекул к разным транспептидазам, получившим название «пенициллинсвязывающие белки» (Penicillin bounding proteins): PBP_{s1}, PBP_{s2}, PBP_{s3} и др., неодинаково. Поэтому фактически неодинаков и механизм действия разных беталактамов. Все это непосредственно сказывается на лечебных свойствах беталактамных антибиотиков.

Важность сведений о механизме действия антибиотиков, в частности беталактамов, для лечащего врача или фармацевта наглядно демонстрируется тем, что в самые короткие по тексту рекламные материалы, рассчитанные на широкие круги практических работников, зарубежные фирмы нередко вставляют строку: новый беталактам реагирует с таким-то «пенициллинсвязывающим белком» (конкретным PBP_s). К сожалению, наши специалисты мало знакомы с этим критерием, определяющим продолжительность антибиотического эффекта препарата, переносимость его определенными категориями больных и другие важные качества.

Изложенное свидетельствует о необходимости знания врачами и фармацевтами основ механизмов действия антибиотиков.

В отличие от первичных метаболитов вторичные метаболиты имеют более сложное химическое строение и образуются, как правило, в длинном пути биохимических превращений, являясь конечным продуктом клеточного метаболизма. Эта особенность обуславливает основной принцип синтеза вторичных метаболитов - двухфазность. Первая фаза развития сопровождается активным ростом и развитием культуры, а вторая - снижением общего количества биомассы, но накоплением продуктами вторичного метаболизма. Такая фаза носит название идиофазы. Функции вторичных метаболитов несущественны для роста микроорганизмов. Однако вторичные метаболиты осуществляют важнейшие физиологические функции, имеющие значение в процессах морфогенеза, адаптации, репродукции, генетического обмена.

Что касается особенностей селекции продуцентов вторичных метаболитов, то основным подходом среди традиционных методов является регуляция углеродного, азотного, фосфорного метаболизма, а также регуляция энергетического состояния клетки. Широко распространено получение мутантов, не чувствительных к катаболитной репрессии, азотной репрессии, а также мутантов, имеющих изменения в системе общей регуляции метаболизма вследствие нарушений процессов транскрипции и трансляции. Продуценты вторичных метаболитов получают как мутанты с нарушенными системами транспорта.

13.5 СЕЛЕКЦИЯ ПРОДУЦЕНТОВ АНТИБИОТИКОВ

Антибиотики - одна из наиболее важных групп биологически активных веществ. Они широко используются не только как антибактериальные агенты, но и как средство химиотерапии злокачественных новообразований, а также в ветеринарии и животноводстве. Рынок антибиотиков составляет значительную долю рынка продуктов ферментации (до 59 %). Первое место среди них по объему продаж занимают цефалоспорины.

Производство антибиотиков традиционно ведется микробиологическим способом. Начало генетико-селекционных работ по получению продуцентов антибиотиков относится к 1940-м гг. В 1950-е гг. начинаются систематические исследования на первом продуценте - *Streptomyces coelicolor* А3. Стрептомицеты - продуценты аминогликозидов - так и остались на долгие годы основным объектом селекции: около 3000 антибиотиков из 6000 описанных продуцируют бактерии этого рода.

Антибиотики широко используются человеком в практике, а в области их применения разнообразны:

1) они обладают высокой физиологической активностью в отношении многих бактерий, вирусов, грибов, водорослей и простейших;

2) задерживают или полностью останавливают развитие злокачественных опухолей;

3) применяются как в гуманных препаратах, так в ветеринарии и животноводстве.

В настоящее время получение ведется в основном микробиологическим способом, но довольно высок процент химически синтезированных антибиотиков. Лишь единичные антибиотики (хлорамфеникол и др.) получают химическим синтезом.

Основные продуценты антибиотиков - бактерии, актиномицеты, мицелиальные грибы. Всего описано 6000 различных антибиотиков и 3000 из них продуцируются стрептомицетами.

13.5.1 Бактериальные антибиотики

В настоящее время известно около 600 различных бактериальных антибиотиков. Промышленное значение имеют немногие:

- грамицидин С (*B. brevis*);
- полимиксины (*B. polymyxa*, *B. circulans*);
- бацитрацины (*B. licheniformis*);
- низины (*Streptococcus lactis*).

Отличительной особенностью бактериальных антибиотиков является их химическая природа: это линейные или циклические полипептиды. Интересно, что один продуцент может образовывать различные антибиотики, однако их строение довольно сходно. Поэтому, когда говорят о бактериальных продуцентах, то говорят скорее о группах антибиотиков, а не о конкретном названии.

Грамицидины – 5 форм – А, В, Сd, Qs), D отличаются аминокислотным составом.

Полимиксины – А1А2В1В2СD1D2Е1Е2МР1Р2 – всего 22 формы входят в состав полимиксинов диаминомасляная и метилоктановая кислоты.

Бацитрацины – 10 форм: FF1BCDF1F2F3G.

Низины – 7 форм белковой природы.

13.5.2 Антибиотики актиномицет

Наиболее обширная группа антибиотиков, нашедших свое применение в практике.

1. Аминогликозиды – антибиотики, имеющие гликозидные связи:

- стрептомицин (*Streptomyces griseus*);
- неомицин (*Streptomyces fradiae*, *Streptomyces albogriseolus*);
- канамицины (*Streptomyces kanamyceticus*);
- гентамицины (*Micromonospora purpurea*);
- фортимицины (*Saccharopolyspora 28irsute*, *Streptomyces sannanensis*).

Интересно, что один тип аминогликозида могут синтезировать различные микроорганизмы.

2. Тетрациклины – антибиотики, имеющие в своем составе 4 бензольных кольца:

- хлортетрациклин (*Str. aureofaciens*);
- окситетрациклины (*Str. Rimosus*);
- тетрациклины (*Str. aureofaciens*).

Интересно, что деметилированные тетрациклины более устойчивы к действию кислот, щелочей. Такие тетрациклины могут быть получены путем внесения в культуральную среду антиметаболитов метионина – основного поставщика метильных групп.

3. Актиномицины – антибиотики, имеющие в своем составе хромофорную часть, соединенную с двумя полипептидами. Каждый полипептид содержит лактонный цикл, раскрытие которого приводит к потере биологической активности.

Разнообразие антибиотиков связано с различием аминокислот, входящих в состав функции полипептида. Наиболее широко используемыми продуцентами актиномицинов являются *Str. Antibioticus*, *Str. Chrysomallus*, *Str. Flavus*. Отличительная черта актиномицинов – они способны задерживать рост злокачественных опухолей.

4. Макролиды – антибиотики, несущие в своем составе макроциклическое лактонное кольцо, связанное с несколькими углеводными остатками. Среди них различают:

- а) макролиды, подавляющие развитие грамположительных бактерий:
 - эритромицин (*Str. erythreus*);
 - олеандомицин (*Str. antibioticus*);
 - магнамицин (*Str. halstedii*).
- б) антифунгального действия:
 - филиппин (*Str. Filippensis*);
 - пимарицин (*Str. notalensis*).

Эти антибиотики способны подавлять рост бактерий, устойчивых к пенициллинам, тетрациклинам, поэтому они используются в качестве резервных антибиотиков.

5. Анзамицины – антибиотики, имеющие в составе ароматическое ядро и связанную с ним алифатическую цепь. Оказывают антибактериальное, противовирусное действие, а также подавляют рост ряда эукариот:

- стрептоварицины (*Str. Spectabilis*);
- рифампицин (*Nocardia mediterranea*, некоторые *Micromonospora*);
- толипомоцин (*Str tolypophorus*);
- галамицин (*Micromonospora halophilic*);
- майтанзиноиды (*Nocardia*);
- нафтомицин (*Str. Collinus*);
- гельданамицин (*Str. Hygroscopicus*).

Наибольшее практическое использование имеет рифампицин.

13.5.3 Грибные антибиотики

Мицелиальные грибы образуют большое число антибиотиков (описано около 1200 видов). Наибольший интерес представляют собой в-лактамы:

- пенициллины (*P. chrysogenum*, *P. brevicompactum*, *P. nigricans*, *Asp. flavus*, *Asp. flavipes*, *Asp. nidulans*);
- цефалоспорины (*Cephalosporium acremonium*).

Цефалоспорины занимают 1-е место среди всех производимых антибиотиков. Их высокая оценка связана с высокой антибактериальной активностью и низкой токсичностью. Кроме того, они не чувствительны к пенициллиназе. К другим грибным антибиотикам относятся:

- фумагиллин (*Asp. fumigatus*);
- гризофульвин (*P nigricans*, *P. urticae*);
- трихотецин (*Trichothecium roseum*) и др.

Эти антибиотики используют так же, как антифунгальные препараты в сельском хозяйстве.

13.5.4 Селекция продуцентов антибиотиков

Микроорганизмы, выделенные из природных источников обладают невысокой антибиотической активностью (например, различные природные штаммы *Penicillium* продуцируют пенициллин в пределах 10-20 ед/мл). В процессе длительной селекции и отбора эти штаммы становятся сверхпродуцентами. Промышленный штамм *P. chrysogenum* дает до 20-25 ед/мл пенициллина.

Нельзя сказать, что настоящее время традиционные подходы в селекции продуцентов антибиотиков (мутагенез и длительный ступенчатый отбор) исчерпали себя полностью, но они постепенно вытесняются генно-инженерными методами, а также принципиально новым методом - методом мутасинтеза.

В целях создания новых более продуктивных штаммов должны быть решены следующие задачи:

1. Повышение эффективности традиционного мутагенеза за счет его направленности.
2. Создание клонирующих векторов на основе трансмиссивных плазмид или фагов.
3. Разработка методов обнаружения внехромосомной ДНК у продуцентов.
4. Создание рекомбинантного генома путем слияния протопластов продуцентов и путем их трансформации.
5. Получение новых антибиотиков на основе мутасинтеза.

Повышение эффективности мутагенеза при селекции продуцентов антибиотиков современными методами может быть достигнуто за счет уменьшения специфической мишени для мутагена. Из-за преимущественно грибной этиологии продуцентов антибиотиков вегетативные клетки или споры облучают рентгеновским или УФ-облучением, а из химических мутагенов используют азотистый иприт, этиленимин и др. Известно, что число известных генов, участвующих в биосинтезе антибиотиков, например у *S. coelicolor*, приближается к 150 (насыщение генетической карты продолжается). Поэтому вероятность получения мутанта по определенному требуемому гену (например, узкому месту биосинтеза) чрезвычайно мала. Если же обработать мутагеном строго определенный рестрикционный фрагмент ДНК, а затем ввести его в геном через клонирующий вектор, то частоту выделения требуемых мутантов можно поднять на 3-5 порядков.

В связи с этим ключевое значение в современной селекции продуцентов антибиотиков придается конструированию клонирующих векторов на основе трансмиссивных плазмид и фагов. О существенной роли плазмид в антибиотикообразовании свидетельствуют данные по продуцентам аминогликозидов, тетрациклинов, хлорамфеникола, цефамезина и др. Однако гены, непосредственно ответственные за биосинтез антибиотиков, расположены на хромосоме и объединены в кластеры. Эти кластеры включают кроме генов синтеза гены устойчивости к собственным антибиотикам и регуляторные элементы с позитивными и негативными ответами на их синтез. Введение таких фрагментов, содержащих весь кластер генов биосинтеза, в конструируемый штамм позволит получить сверхпродуценты.

Большой вклад в селекцию продуцентов антибиотиков внесло применение

метода слияния протопластов. Особенно эффективно он используется при получении полиауксотрофных мутаций, а также при слиянии геномов близкородственных штаммов. Например, при слиянии протопластов двух промышленных продуцентов тризина *S. griseus*, резко отличающихся в отношении морфологии, продолжительности ферментации и фракционного состава антибиотика, были получены более высокопродуктивные рекомбинанты с измененным составом фракций и устойчивые к актинофагам. Метод слияния протопластов используется в основном на работе с продуцентами в-лактамных антибиотиков.

Что касается нового направления в получении антибиотиков - мутасинтеза, то следует отметить, что это метод, при котором развивается резистентность продуцента к химическим аналогам уже полученных антибиотиков, в результате чего нарушаются регуляторные механизмы антибиотикообразования. Генетики и химики здесь действуют однонаправленно. На первом этапе генетики получают из продуцентов мутанты, которые для образования антибиотиков требуют специфических предшественников. Химики синтезируют разнообразные аналоги фрагментов молекулы антибиотика. В итоге образуются так называемые «мутасинтетические антибиотики». Мутасинтез в области аминогликозидов обещает расширение возможностей их модификаций, например, варьирование структуры наиболее консервативной части молекулы этих антибиотиков - аминоциклитола. Так получены мутанты разных штаммов *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Bacillus*, не способные его продуцировать, но не потерявшие способности его включать в состав молекулы. Это дало возможность выделить десятки мутасинтетических производных неомицина, гентамицина, бутирозина и др.

Огромное значение для максимального образования антибиотиков имеет подбор благоприятных условий культивирования. При разработке состава сред должно учитываться то обстоятельство, что азот усваивается многими продуцентами антибиотиков только в окисленной форме (в виде нитратов). Концентрация фосфора в среде строго видоспецифична и для продуцентов тетрациклина, например, не должна превышать 10 %, стрептомицина - 15 %, а новобиоцина и грамицидина. - 20 %. Источники углерода также подбираются индивидуально для каждого штамма. Например, для производства пенициллина культурой *P. chrysogenum* оптимальным источником углерода является сочетание глюкозы и лактозы. Для *Str. griseus* (продуцент стрептомицина) - глюкоза. Для *Str. fradiae* (продуцент неомицина) - синтетическая среда с глюкозой. Концентрация источника углерода различна для различных продуцентов. Так, для продуцента тетрациклина *Str. aureofaciens* - 50 мг/мл глюкозы, причем увеличение этой концентрации до 80 мг/мл вызывает явление катаболитной репрессии.

13.6. Технологический процесс производства антибиотиков

В основе промышленного производства антибиотиков лежит ряд последовательных этапов: получение высокопродуктивных штаммов-продуцентов, разработка наиболее благоприятных условий культивирования продуцента антибиотика с максимальным биосинтезом этого вещества, подбор и внедрение в практику соответствующих методов выделения и очистки антибиотика, создание готовых препаратов и контроль их качества. Каждый из этих этапов должен обеспечиваться соответствующими специалистами (генетиками, микробиологами, технологами и др.). Производство антибиотиков представляет ныне мощную, хорошо развитую отрасль, входящую в фармацевтическую промышленность. Она занимает одно из ведущих мест в производстве лекарственных препаратов. Особенно широко она развита в США, Англии, Японии, Франции, Италии и других странах. Например, в США ежегодно выпускается антибиотиков и их производных на сотни миллионов долларов.

По общему производству антибиотиков наша страна занимает ведущее место в мире.

Технологический процесс производства антибиотиков состоит из пяти стадий.

2- На первой стадии осуществляется подготовка питательной среды и посевного материала (инокулята).

Для каждого продуцента антибиотика и вновь полученного штамма разрабатывается своя оптимальная среда, которая должна отвечать следующим основным требованиям: а) обеспечивать хороший рост продуцента и максимально возможное образование антибиотика; б) содержать доступные и дешевые компоненты; в) обладать хорошей фильтрующей способностью; г) обеспечивать применение наиболее экономичных и эффективных приемов выделения и очистки антибиотика. Стерилизация питательных сред в промышленных условиях осуществляется двумя основными методами: периодическим и непрерывным.

Периодический метод стерилизации применяется при использовании небольших объемов среды и состоит в том, что среда нагревается до определенной температуры (120—130°C) непосредственно в ферментерах или в специальных котлах-стерилизаторах, выдерживается при этой температуре в течение 30 – 60 мин (в зависимости от объема среды и ее состава), после чего среда охлаждается до 27—30°C.

Непрерывный метод стерилизации целесообразно применять при использовании больших объемов среды. Приготовленная среда из специального

сосуда с помощью насоса подается в стерилизационную колонку, через которую сверху по внутренней трубе, имеющей щелевидные прорези, пропускается острый пар (давление пара около 5 атм.). Питательная среда в колонку поступает снизу и движется по спирали вокруг внутренней трубы.

Далее нагретая в колонке среда поступает в специальный аппарат – выдерживатель, где она при температуре 125-130°C находится определенное время (5-10 мин). Затем она поступает в змеевиковый холодильник, охлаждается до 30 – 35°C (на выходе) и поступает в ферментер. Непрерывный метод стерилизации имеет ряд преимуществ перед периодическим методом: возможность автоматического регулирования процесса, быстрый и равномерный нагрев среды, обеспечение более полной стерильности среды и другие факторы. При применении в качестве отдельных компонентов субстрата термолабильных веществ их, как правило, следует стерилизовать отдельно в условиях более мягкого режима.

2- Стадия биосинтеза – основная биологическая стадия в процессе получения антибиотика, обеспечивающая для продуцента такие условия развития, которые бы способствовали максимальному уровню образования БАВ.

Эффективность стадии биосинтеза определяется генетическими особенностями организма, составом питательной среды, режимом развития продуцента и зависит от времени максимального образования антибиотика, стоимости компонентов среды, пеногасителей, энергетических затрат, связанных с процессом развития организма-продуцента. В энергетические затраты включаются расходы энергии при стерилизации среды, ферментера и коммуникаций, а также систем перемешивания культуральной жидкости и продувания воздуха через нее.

В производстве антибиотиков используют методы *периодического, непрерывного культивирования*, а также методы, занимающие промежуточное положение между периодическим и непрерывным культивированием – *полунепрерывный отъемно-доливной метод*.

При непрерывном культивировании клетки продуцента размножаются со скоростью, зависящей от притока питательных веществ и некоторых других условий, при этом часть объема культуральной жидкости постоянно вытекает с той же скоростью, с какой подается питательная среда в аппарат.

Метод непрерывного проточного культивирования может быть организован как процесс полного вытеснения и как процесс полного смешения.

Применение *процесса полного вытеснения* возможно при культивировании анаэробных микроорганизмов в ферментере, представляющем собой трубу, в которую с одной стороны непрерывно подается питательная среда и посевной

материал, а с другой стороны производится отбор культуральной жидкости. Процесс происходит без перемешивания и аэрации. Когда среда и посевной материал попадают в ферментер, популяция продуцента находится в лаг-фазе, а на выходе из ферментера культура может находиться в любой фазе в зависимости от скорости подачи среды. При этом воспроизводится кинетика роста продуцента, но не во времени, а в пространстве.

В процессе полного смешения размножение культуры происходит в ферментере при интенсивном перемешивании и аэрации. Во всем объеме культуральной жидкости условия должны быть одинаковыми. Процесс полного смешения по типу системы «турбидостат» и «хемостат».

В системе «турбидостат» в ферментере плотность популяции поддерживают постоянной. При быстром потоке среды в данной системе создаются условия, близкие к тем, которые соответствуют экспоненциальной фазе, а при медленном – приближаются к условиям, соответствующим стационарной фазе. В установившемся режиме удельная скорость потока среды равна удельной скорости размножения культуры. Повышение скорости протока или воздействие, замедляющее рост, приводит к тому, что скорость размножения оказывается меньше скорости протока, и клетки культуры будут «вымываться» из ферментера.

В системе «хемостат» величину клеточной популяции контролируют с помощью отдельных компонентов питательной среды. Среда составляется так, чтобы один из компонентов, необходимый для роста биомассы клеток, был в недостаточном количестве или лимитировал рост, поддерживая тем самым культуру в нужном состоянии. Используя батарею ферментеров, можно в каждом аппарате постоянно поддерживать продуцент в определенной фазе размножения.

Применение отъемно-доливного метода удается в 2 – 3 раза увеличить время пребывания продуцента в активной форме. Недостаток этого метода заключается в том, что доливы осуществляются питательной средой плотного состава. Сущность этого метода заключается в том, что в определенное время, начиная с экспоненциальной фазы, по специально отработанной программе, в культуральную жидкость добавляют отдельные компоненты питательной среды – раствор сахара, сульфат аммония, жир и т.д., поддерживая их концентрацию на постоянном оптимальном уровне – в начале для роста биомассы клеток, а затем – для синтеза целевого продукта.

Периодически из ферментера отбирают определенные объемы культуральной жидкости, все возрастающей концентрацией целевого продукта. Ферментацию прекращают после того как активность продуцента достигнет максимума. Этим способом удается не только продлить активную фазу, в которой находится

продуцент, но и повысить степень использования им субстрата, а в конечном итоге – продуктивность всего процесса, то есть увеличить выход конечного продукта в расчете на потребленный субстрат.

Из всего разнообразия используемых в биотехнологии способов наиболее сложными являются регулируемые ферментации с соблюдением условий асептики. Асептические условия предполагают введение дополнительных стадий, обеспечивающих стерилизацию питательных сред и подаваемого в ферментер воздуха.

Стерильную питательную среду в инокуляторе первой ступени засевают с соблюдением правил асептики через специальное устройство посевным материалом, который предварительно был выращен в колбах в лабораторных условиях. В аппарате поддерживаются необходимые режимы для размножения клеток продуцента – температуру, аэрацию, скорость перемешивания, а также контролируют и оценивают развитие культуры.

При достижении требуемых стадий развития и количества биомассы посевной материал передавливают стерильным сжатым воздухом по посевному коллектору перемещают в посевной аппарат большей вместимостью. На этой второй ступени выращивания посевного материала стремятся получить больше биомассы клеток, чтобы в ферментере можно было создать необходимую для данного штамма продуцента исходную плотность популяции. Если это требование может быть выполнено без второй ступени, то ферментационную среду засевают непосредственно из инокулятора.

При получении пенициллина с помощью микробиологического синтеза используют питательную среду (она же пригодна для приготовления инокулята), включающую глюкозу – 1,5%, лактозу – 5%, сульфат аммония и фосфаты – 0,5 -1%, кукурузный экстракт – 2-3%, «предшественники антибиотика – фенокси- или фенилуксусная кислота – 0,3-0,6%, мел – 0,5-1%, пеногаситель – 0,5-1%. Температуру ферментации поддерживают на уровне 22 – 26°C при рН от 5,0 до 7,5 и постоянной аэрации (1 м³ воздуха на 1 м³ среды в 1 минуту), продолжительность процесса – 4 суток.

В современных условиях развития фармацевтической промышленности наиболее перспективным методом выращивания микроорганизмов-продуцентов антибиотиков и других биологически активных соединений является метод глубинного культивирования, хотя используют и периодическое культивирование продуцентов.

Для получения антибиотиков в промышленных масштабах применяются специальные герметически закрытые емкости или ферментеры, обеспечивающие глубинное выращивание продуцентов.

Аэрирование культуры в ферментере происходит в результате подачи подогретого до необходимой температуры стерильного воздуха через специальные приспособления — барботеры, а также благодаря перемешиванию культуральной жидкости различного типа мешалками (пропеллерными, турбинными и др.).

В последнее время при производстве антибиотиков применяют низкочастотное вибрационное перемешивание культуральной жидкости как наиболее экономичный способ.

Поддержание температуры, оптимальной для хорошего роста продуцента антибиотика и проявления им повышенной физиолого-биохимической активности, обеспечивается рубашкой ферментера или системой змеевиков, которые необходимы также для подачи пара в процессе стерилизации и для охлаждения.

Наблюдение за основными процессами жизнедеятельности организма осуществляется контрольно-измерительной аппаратурой (КИП), позволяющей регулировать скорость перемешивания культуральной среды, 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 по ходу развития организма. Ферментеры снабжены приспособлениями для переноса инокулята, внесения дополнительных питательных веществ, необходимых для лучшего развития культуры, пеногасителя и устройством для взятия проб.

В промышленных условиях получения антибиотиков применяют ферментеры различной емкости — от 500 л до 50, 100 м³ и более. Стерилизацию производственных ферментеров, а также всех обслуживающих их коммуникаций проводят перегретым паром. Воздух, необходимый для аэрации, стерилизуется через специальные фильтры, заполненные стеклянной ватой или активированным древесным углем.

Использование волокнистых фильтров (типа стеклянной ваты) — широко распространенный и экономически наиболее выгодный механический способ стерилизации воздуха (чем меньше диаметр волокна, тем лучше их фильтрующая способность).

Проникновение в фильтр бактериальных клеток или спор, перемещающихся с воздушным потоком, зависит от скорости движения воздуха. Проникновение увеличивается с увеличением скорости воздуха. В зависимости от плотности упаковки фильтра скорость движения воздуха не должна превышать 1,5 м/с.

Процесс развития микроорганизма в ферментерах проходит при строгом контроле всех стадий, очень точном выполнении разработанного регламента условий развития организма-продуцента антибиотика. Большое внимание уделяется поддержанию заданной температуры культивирования, кислотности среды, степени

аэрации и скорости работы мешалки. Учи-тывается потребление организмом основных питательных компонентов субстрата (источников углерода, азота, фосфора), внимательно контролируется образование антибиотика.

Особенность второй стадии производства антибиотиков является двухфазный характер стадии ферментации. В первой фазе развития культуры (тропофазы) идет интенсивное накопление биомассы, сопровождающееся усилением процессов биосинтеза белков, нуклеиновых кислот, углеводов, ферментов. Причем на этом этапе антибиотик, как правило, не синтезируется. Во второй фазе (идиофаза) накопление биомассы замедляется, так как питательная среда уже обеднена рядом компонентов и обогащена продуктами жизнедеятельности продуцента. Максимум биосинтеза антибиотика наступает в стадии отмирания культуры.

Особое внимание при развитии продуцента в ферментерах обращают на процесс пеногашения. При продувании воздуха через культуру микроорганизма часто происходит обильное образование пены, которая существенно нарушает протекание всего процесса развития продуцента в ферментере. Основная причина появления большого количества пены наличие белковых веществ в среде и ее высокая вязкость, обусловленная обильным накоплением биомассы.

Для борьбы с пеной в ферментерах при антибиотикообразовании используют различные поверхностно-активные вещества: растительные масла (соевое, подсолнечное), животный жир, а иногда минеральные масла (вазелиновое, парафиновое), спирты и высшие жирные кислоты. Нередко в качестве пеногасителей используют специально синтезированные вещества (силиконы, диазобуталкарбомил и другие соединения).

Многие вещества (масла, жиры, спирты и др.) – пеногасители, потребляются продуцентами антибиотиков как дополнительные источники углеродного питания. При этом часто наблюдается повышение выхода антибиотика. Однако внесение пеногасителя снижает скорость растворения кислорода, что в свою очередь может отрицательно сказаться на развитии микроорганизма и его биосинтетической активности.

Иногда используются механические способы пеногашения (отсасывание пены через специальные трубы, разрушение пузырьков пены сильными струями жидкости, пара или газа) и аэродинамические методы.

В процессе развития микроорганизмов-продуцентов антибиотика в большинстве случаев почти полностью выделяются из клеток в окружающую среду.

Однако в некоторых случаях лишь часть антибиотика выделяется в культуральную жидкость, а другая часть сохраняется внутри клеток. У ряда продуцентов антибиотик почти полностью содержится в клетках организма.

В процессе образования антибиотика в культуральную жидкость, наряду с присутствием в ней различных неиспользованных компонентов среды, выделяются

и разнообразные продукты обмена, она обогащается продуктами автолиза клеток. Удаление примесей – первая и весьма важная стадия химической очистки антибиотика.

3- Стадия выделения и химической очистки включает ряд процессов: от обработки нативного раствора до сушки готового очищенного препарата. На этой стадии в зависимости от свойств антибиотика, его химического строения и места основного накопления применяют различные методы выделения и очистки. В качестве основных методов используют экстракцию, осаждение, сорбцию на ионообменных материалах, упаривание, сушку.

В зависимости от того, где антибиотическое вещество сосредоточено, применяют соответствующие методы его извлечения. Так, если антибиотик находится в культуральной жидкости, его выделяют методами экстракции растворителями, не смешивающимися с жидкой фазой, или осаждают в виде нерастворимого соединения, а также путем сорбции на ионообменных смолах.

Выделение антибиотика из клеток микроорганизмов осуществляют с помощью экстракции органическими растворителями. Если антибиотик содержится в культуральной жидкости и в клетках продуцента, первичной операцией его выделения является перевод антибиотика в фазу, из которой наиболее целесообразно его изолировать. Для этого антибиотик, содержащийся в культуральной жидкости, и клетки с антибиотическим веществом переводят в осадок, а затем антибиотик экстрагируют.

Отделение нативного раствора от биомассы и взвешенных частиц проводят методами фильтрации или центрифугирования. При этом применяют меры для обеспечения лучшей фильтруемости культуральной жидкости (кислотную или тепловую коагуляцию, обработку электролитами, внесение различных добавок и т. П.). Для процесса фильтрации применяют различные фильтрующие аппараты: фильтр-пресс, нутч-фильтр, друк-фильтр, центрифуги, сепараторы.

Фильтр-прессы применяются для обработки больших объемов культуральной жидкости. Эти 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, второй – в условиях повышенного давления над фильтрующейся жидкостью.

Для получения жидкости, освобожденной от взвешенных частиц, широкое распространение нашел способ центрифугирования. Хорошие результаты достигаются при правильном выборе скорости подачи жидкости (лучший вариант – 15000 об/мин). Отделение мицелия или других взвешенных частиц может также происходить в сепараторах. При скорости вращения барабана сепаратора, равной

7000—7500 об/мин, благодаря центробежной силе твердые частицы устремляются к стенкам барабана и осаждаются там, а отсепарированная жидкость стремится к центру барабана и переходит в специальную камеру.

Одной из особенностей стадии выделения и химической очистки является то, что при выделении антибиотиков приходится иметь дело с весьма невысокими концентрациями выделяемого вещества (не превышающими одного процента). В конце стадии химической очистки концентрация антибиотика увеличивается и достигает 20-30%.

Цель химической очистки – извлечение антибиотика из культуральной жидкости или из клеток продуцента, концентрирование его и освобождение от сопутствующих примесей и в конечном счете получение высоко очищенного препарата, пригодного для соответствующего применения.

Антибиотики под влиянием повышенной температуры, высокой кислотности или щелочности среды инактивируются. Поэтому при их выделении и очистке необходимо соблюдать максимум осторожности.

Метод экстракции. Нередко в целях очистки антибиотика от различных примесей его многократно переводят из одного растворителя в другой с предварительным осаждением (кристаллизацией). Такой прием носит название перекристаллизации.

Ионообменная сорбция. Метод состоит в том, что при пропускании водных растворов антибиотиков, являющихся по химической природе кислотами, основаниями или амфотерными соединениями, через колонки с соответствующими ионообменными смолами они сорбируются на них, а раствор с частью примесей, имеющих противоположный антибиотику заряд, проходит через колонку. Смолы в зависимости от положительного или отрицательного заряда иона в них называют катионитами или анионитами. Антибиотик в виде отрицательно заряженного иона будет сорбироваться на катионитной смоле, положительно заряженный – на анионите. Далее его элюируют (десорбируют) и получают значительно очищенный и сконцентрированный препарат. Затем раствор препарата можно вновь пропустить через ионообменную смолу, но имеющую противоположный заряд. При этом примеси осядут на смоле, а раствор более очищенного антибиотика пройдет через колонку.

Метод осаждения основан на том, что антибиотик связывают с органическими или неорганическими веществами с целью получения соединения, выпадающего в осадок. Полученный осадок с помощью фильтров или центрифугирования отделяют от нативного раствора, промывают и в ряде случаев высушивают, после чего образовавшееся соединение разлагают и антибиотик экстрагируют или вновь осаждают (кристаллизуют).

Одной из стадий химической очистки антибиотиков является концентрирование полученных растворов путем отгонки большей части растворителя, как правило, в 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 для увеличения его выхода.

Известно, что к антибиотикам, используемым в медицинской практике, предъявляются очень высокие требования (высокая степень очистки, стерильность препарата и др.). Поэтому на указанной стадии работы, а также при химической очистке препарата необходимо соблюдать высокую степень чистоты на всех операциях. Для этого поддерживают в исключительной чистоте не только используемое оборудование, но и помещение, где производят работу.

Антибиотики, предназначенные для инъекций, должны быть стерильными. Поэтому получение таких препаратов, приготовление различных лекарственных форм, расфасовка и упаковка осуществляются в асептических условиях.

После выделения и химической очистки антибиотика его необходимо высушить – удалить из полученного препарата свободную и связанную воду. Поскольку большинство антибиотиков в той или иной степени термолабильны, для их высушивания необходимо применять методы, не приводящие к потере биологической активности и не изменяющие цвета препарата.

На современном этапе промышленного получения антибиотиков используют различные методы обезвоживания препаратов.

Широкое распространение получила лиофильная сушка антибиотиков, которая проводится при сравнительно низких температурах (-8, -12°C).

Прогрессивным методом при работе с большими количествами антибиотика является высушивание с применением распылительной сушилки. Раствор антибиотика пневматически распыляется до мельчайших капель в камере потоком нагретого воздуха. Процесс высушивания антибиотиков протекает в течение нескольких секунд. При этом даже термолабильные препараты не меняют своих свойств.

Сушка зернистых и пастообразных антибиотических препаратов производится в вакуум-сушильных шкафах или методом взвешенного слоя.

Готовый антибиотик подвергается тщательному биологическому и фармакологическому контролю.

К антибиотическим веществам, используемым в медицинской практике, в соответствии с Государственной фармакопеей 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 жизненно важные функции организма.

Препарат изучают на разных видах животных в отношении его острой и хронической токсичности (влияние на состав крови, 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 дозу, смертельную для всех животных (LD₁₀₀). Только после всестороннего и тщательного изучения препарата он может быть рекомендован к практическому применению.

Количественное определение большинства антибиотиков проводят биологическими методами, основанными на сравнительной оценке угнетения роста тест-микроорганизма. Активность устанавливают *диффузионным* или *турбидиметрическим* методами.

Государственная Фармакопея XI издания рекомендует для количественного определения метод диффузии в агар, сущность которого заключается в сравнении действия определенных концентраций испытуемого и стандартного образца антибиотика на тест-микроорганизм. Стандарты, отвечающие требованиям международных стандартов, готовят в Государственном контрольном институте медицинских биологических препаратов им. Л.А.Тарасевича, они выпускаются в запаянных ампулах нейтрального стекла и хранятся при температуре не выше 0°C.

Так как состав агаровой среды и условия выполнения биологического испытания одинаковы, величина зоны диффузии, в которой развитие тест-микроорганизма подавляется испытуемым антибиотиком, зависит только от химической природы препарата и его концентрации. Процесс инкубации осуществляется в течение 16-18 часов при 36-38°C.

При определении биологической активности методом диффузии в агар необходимо, чтобы зона задержки роста была достаточного диаметра и имела четкие границы. После завершения инкубации измеряют диаметры зон задержки роста (ЗЗР) тест-микроорганизма стандартным и испытуемым растворами. Для повышения точности измерений находят среднее значение площадей зон диффузии из трех опытов.

При изучении зон задержки роста и четкости краев рационально применяют микрофотометры (например, марки, ИОФ-451), что позволяет получать более объективные количественные оценки результатов микробиологического анализа.

Единица действия (ЕД) является величиной биологической активности антибиотиков. За ЕД принимают минимальное количество антибиотика, подавляющего развитие тест-микроорганизма в определенном объеме питательной среды. Количественное выражение 1 ЕД различно у различных антибиотиков. Например, у натриевой соли бензилпенициллина 1 ЕД соответствует 0,5988 мкг

химически чистого вещества, а у стрептомицина, тетрациклина и его производных 1 ЕД соответствует 1 мкг химически чистого вещества.

Расчет биологической активности производят по стандартной кривой, предварительно построенной на основании результатов определения пяти концентраций стандартного препарата. Степень активности антибиотика в 1 мг препарата вычисляют, умножая полученную концентрацию в ЕД/мл на степень разведения.

Среднее значение активности, найденной биологическим методом, несколько ниже, чем рассчитанная теоретическая активность. В соответствующих фармакопейных статьях приводятся значения теоретической активности и нижний допустимый предел активности испытуемого антибиотика в ЕД/мг.

В настоящее время разработаны ускоренные биологические методы определения антибиотиков в биологических жидкостях.

К ускоренным микробиологическим методам относят методы, основанные на подавлении изменений рН питательной среды в процессе роста тест-микроорганизмов. Концентрацию определяют путем сравнения изменений рН в средах испытуемых и стандартных образцов через 1,5 часа после инкубации. На этом принципе основан так называемый *уреазный метод*, заключающийся в наблюдении за изменением рН жидкой питательной среды, содержащей 2% мочевины. Выделяющийся в процессе роста микроорганизма аммиак вызывает изменение рН среды.

Ферментный метод основан на инактивации аминогликозидов в крови специфическими ферментами (аденилтрансфераза и ацетилтрансфераза), продуцируемые грамотрицательными микроорганизмами, устойчивыми к препаратам этой группы. Эти ферменты катализируют процесс аденилирования или ацетилирования аминогликозидов в присутствии ^{14}C -аденозинтрифосфата или ^{14}C -ацетилкоэнзима А. Они являются источником радиоактивности.

Инактивированный антибиотик имеет положительный заряд и остаточную радиоактивность, что позволяет адсорбировать его на фосфоцеллюлозной бумаге. После адсорбции, методом подсчета радиоактивности делают заключение о концентрации антибиотика. Определение занимает 1-2 часа.

Радиоиммунный метод основан на сравнительной оценке конкуренции антибиотика, меченого тритием, и испытуемого антибиотика по отношению к специфическим антителам иммунной сыворотки.

Метод отличается очень высокой чувствительностью (0,003-0,01 мкг/мл), результаты получают в течение 1-2 часов, точность данного метода довольно высока – коэффициент вариации составляет 4 – 5%. Анализируя различные методы анализа антибиотиков можно прийти к заключению, что наиболее простыми и доступными в настоящее время являются метод диффузии в агар-агар и уреазный метод

Ферментативный и радиоиммунный метод – наиболее специфичные и точные. Они не требуют предварительной обработки сыворотки крови, когда в ней присутствуют другие антибиотики. Однако применение этих методов требует соответствующих условий и оборудования для работы с радиоактивными веществами, труднодоступных реактивов и специфической иммунной сыворотки. На точность биологических методов оказывают влияние целый ряд факторов – характер питательной среды, условия инкубации, точность измерения зон угнетения роста и т.д.

Вопросы для самоконтроля

1. Назовите основные группы антибиотиков, учитывая механизм их действия и спектр влияния на клетки возбудителей инфекционных болезней.
2. β -лактамы, их структура и механизм действия.
3. Напишите радикалы, входящие в состав антибиотиков цефалоспоринового ряда.
4. Методы получения антибиотиков на фармацевтических предприятиях.
5. Структура и механизм действия антибиотиков – полиенов.
6. Структура и механизм действия антибиотиков – депсипептидов.
7. Схема производства антибиотиков в процессе микробного биосинтеза.
8. Методы культивирования продуцентов, применяемых при производстве антибиотиков.
9. Питательные среды, используемые на фармацевтических предприятиях при производстве антибиотиков.
10. Методы выделения и очистки антибиотиков, применяемых при производстве антибиотиков.
11. Методы получения 6-аминопенициллиновой кислоты, применяемые в промышленной технологии.
12. Основные способы получения 7-аминоцефалоспориновой кислоты.
13. Схема выделения антибиотика из культуральной жидкости.
14. Принципиальная схема выделения и очистки канамицина.
15. Промышленный метод получения полусинтетических антибиотиков.
16. Биологические методы анализа качества антибиотиков.