

Лекция

АНТИБИОТИКИ

КАК БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОДУКТЫ. ПУТИ СОЗДАНИЯ ВЫСОКОАКТИВНЫХ ПРОДУЦЕНТОВ

Лектор

**К.б.н. Караева Альбина
Маирбековна**



ПЛАН:

- 1. Характеристика АБ.
Классификация.**
- 2. Происхождение антибиотиков (АБ).**
- 3. Биологическая роль АБ как вторичных метаболитов.**
- 4. Продуценты, методы их отбора.**
- 5. Пути создания продуцентов АБ.**
- 6. Биосинтез АБ, его особенности в зависимости от конкретного АБ.**

3

АНТИБИОТИКИ (АБ) -

вещества, образуемые микроорганизмами или получаемые из других источников и способные в малых дозах оказывать избирательное токсическое действие на другие микроорганизмы и на клетки злокачественных опухолей.

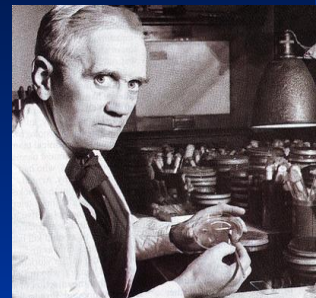


Химиотерапевтические средства — это ЛВ, в том числе используемые для подавления жизнедеятельности и уничтожения микроорганизмов в тканях и средах больного, обладающие избирательным, этиотропным (действующим на причину) действием.

Историческая справка создания антибиотиков (АБ)

5

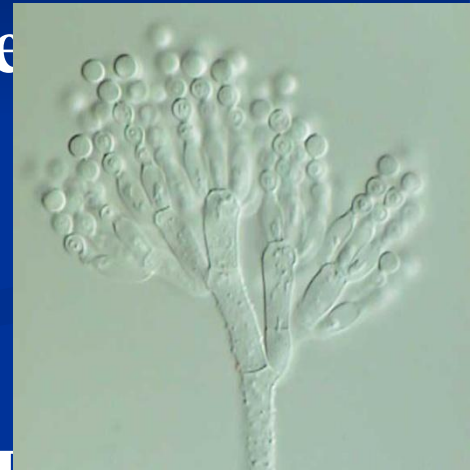
1. Впервые предсказали существование антибиотиков ученые Луи Пастер и И.И. Мечников.



1. В 1928 г. микробиолог (лауреат Нобелевской премии) Флеминг открыл пенициллин.
2. В 1940 г. был выделен первый антибиотик в чистом виде – кристаллический пенициллин.
3. В 1942 г. американский ученый З. Ваксман ввел впервые термин «антибиотик».
4. Проф. З.В. Ермольева внесла большой вклад в исследования и открытие антибиотиков.

Природные АБ в зависимости от химической структуры делятся на:

- I. β -Лактамы (пенициллины, цефалоспорины);
- II. Макролиды (эритромицин, азитромицин);
- III. Аминогликозиды (стрептомицин, гентамицин);
- IV. Тетрациклины (окситетрациклин, доксициклин);
- V. Полипептиды (полимиксины);
- VI. Полиены (нистатин, амфотерицин В);
- VII. Анзамицины (римфапицин);
- VIII. Дополнительный класс – левомецетин, линкомицин.



В зависимости от источника получения различают 6 групп АБ:

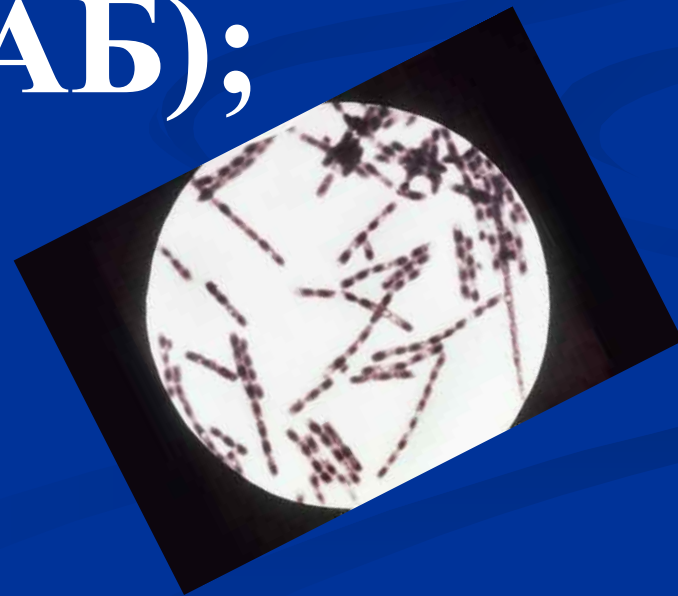
- 1. АБ, полученные из грибов – пенициллины, цефалоспорины;**
- 2. АБ, полученные из актиномицетов – стрептомицин, эритромицин, нистатин;**
- 3. АБ, произведенные собственно бактериями – полимиксины;**
- 4. АБ животного происхождения – эктерицид (получают из рыбьего жира);**
- 5. АБ растительного происхождения – фитонциды;**
- 6. Синтетические АБ.**

По механизму действия
можно выделить следующие
группы АБ:

1) нарушающие синтез
биомакромолекул в клетке
(циклосерин, гликопептиды,
ванкомицин);

2) изменяющие функции цитоплазматической мембраны

(циклические полипептиды,
полиеновые АБ);



**3) оказывающие
воздействие на синтез белка
в рибосомах**

**(группа левомицетина,
тетрациклина, макролиды,
аминогликозиды);**

**4) ингибиторы синтеза РНК
и ингибиторы метаболизма
фолиевой кислоты
(рифампицины);**

**5) ингибиторы синтеза
мРНК (актиномицин).**

По типу действия на бактериальные клетки различают:

- 1) АБ с бактерицидным
действием, приводящие к
гибели бактерий путем
влияния на клеточную стенку
и цитоплазматическую
мембрану;*

2) Антибиотики с бактериостатическим действием, влияющие на синтез макромолекул и останавливающие размножение бактерий.

По способу получения АБ
подразделяют на 3 группы:

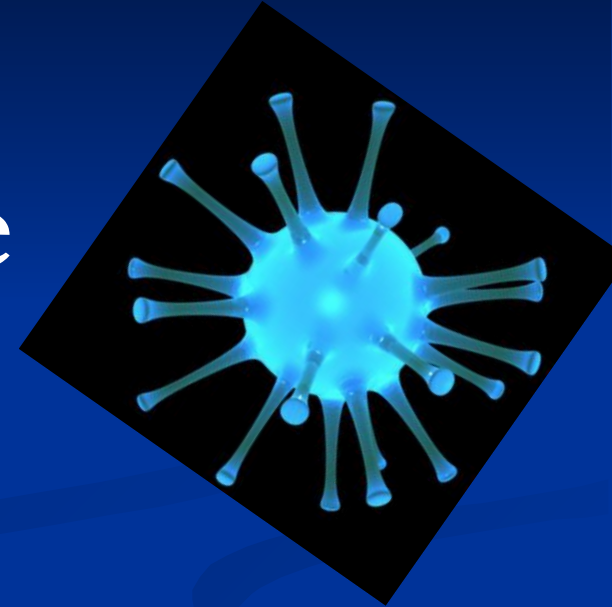
1. АБ, получаемые **путем микробиологического синтеза** на основе плесневых грибов или актиномицетов (тетрациклины, пенициллины, антибиотик-гликозиды, макролиды и др.);

2. АБ, образующиеся за счет химического синтеза из простых органических веществ (левомицетин и его производные);

3. АБ, получаемые путем сочетания микробиологического и химического синтеза - полусинтетические АБ (полусинтетические пенициллины, цефалоспорины, тетрациклины и др.).

Существуют также АБ с преимущественным действием на:

- 1) грамположительные микроорганизмы;
- 2) грамотрицательные микроорганизмы;
- 3) АБ широкого спектра действия.



Основные этапы промышленного производства АБ:

- 1) получение высокопродуктивных штаммов-продуцентов;
- 2) разработка наиболее благоприятных условий культивирования продуцента АБ с максимальным биосинтезом этого вещества;

3) подбор и внедрение в практику методов выделения и очистки АБ;

4) создание готовых препаратов (АБ);

5) контроль качества АБ.

Основные этапы получения природных АБ на основе биосинтеза в клетках микроорганизмов-продуцентов:

- 1) поиск и селекция высокопроизводительных штаммов продуцентов;
- 2) подбор оптимального состава питательных сред;
- 3) разработка и аппаратурное оформление процесса ферментации;
- 4) выделение и очистка целевого продукта.

ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ СХЕМА ПОЛУЧЕНИЯ АБ МЕТОДОМ МИКРОБНОГО БИОСИНТЕЗА

I СТАДИЯ

Выделение штамма-продуцента АБ из
природных условий

Селекция наиболее активного штамма

Получение наиболее активного штамма
методами:

Индукцированного
мутагенеза

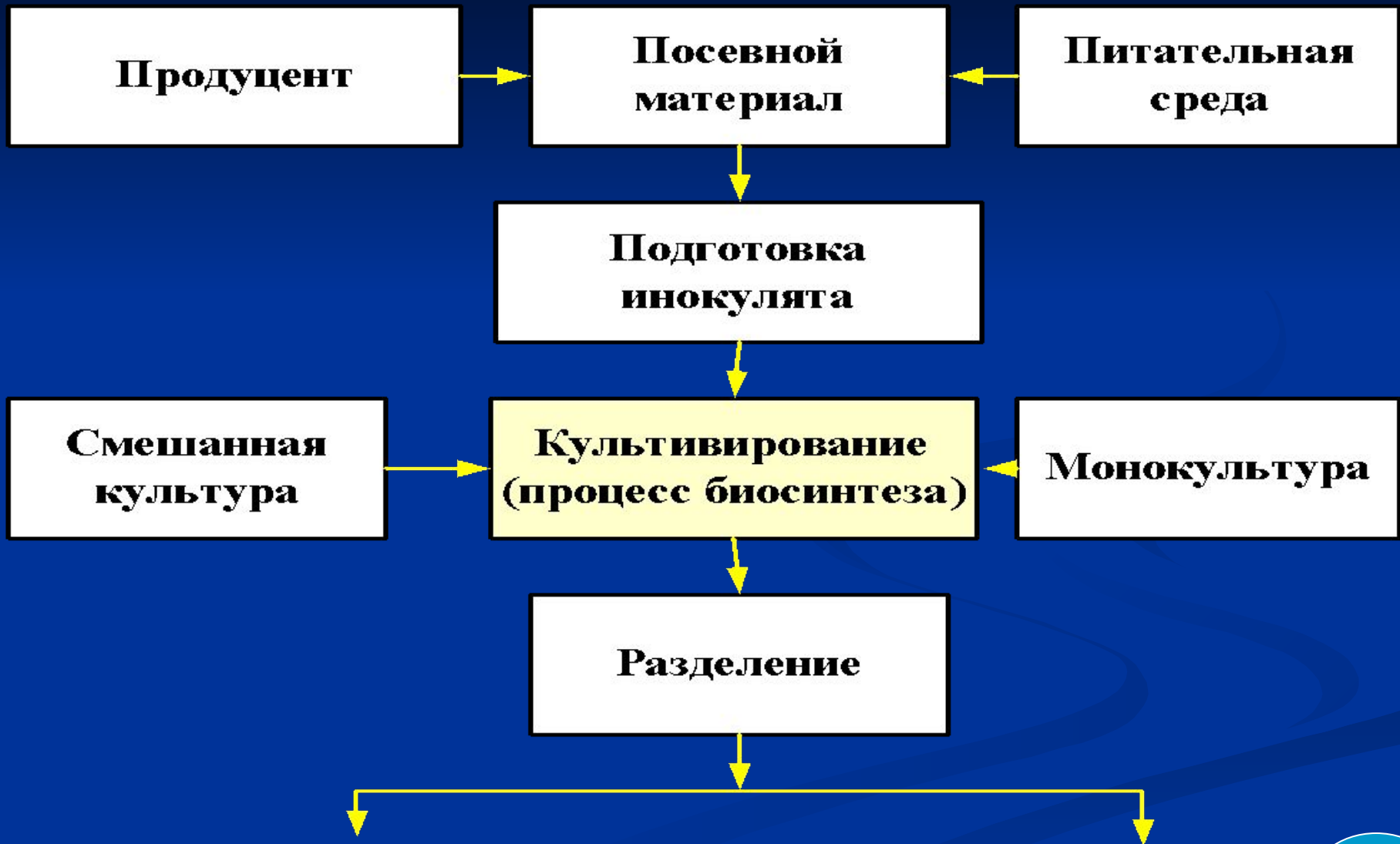
Слияния
протопластов

Генно-инженерной
манипуляцией

Высокопродуктивный и технологичный
штамм продуцента

II СТАДИЯ

II СТАДИЯ



III СТАДИЯ

III СТАДИЯ

Культуральная
жидкость

Биомасса

Выделение АБ

Очистка

IV СТАДИЯ

IV СТАДИЯ

2
3

Концентрирование

Стабилизация

Обезвоживание

Измельчение

Сухой препарат

Жидкий
экстракт

Фасовка



ПРОМЫШЛЕННОЕ ПОЛУЧЕНИЕ АБ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМ СПОСОБОМ

На 1 стадии:

**Подготовка питательной среды и
посевного материала
(инокулята).**



Требования, предъявляемые к питательной среде:

2
5

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

Стерилизация

питательных сред в промышленных условиях осуществляется двумя основными методами:

1) периодическим

2) непрерывным

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

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

Стадия биосинтеза -
основная биотехнологическая
стадия в процессе получения
АБ, обеспечивающая для
продуцента условия
развития, которые бы
способствовали
максимальному уровню
образования БАВ.

Эффективность стадии биосинтеза определяется:

- 1. Составом питательной среды;**
- 2. Режимом и временем развития продуцента;**
- 3. Стоимостью компонентов среды;**
- 4. Энергетическими затратами (расходы энергии при стерилизации среды, ферментера, культуральной жидкости и т.д.).**

В производстве АБ используют
методы культивирования:

1. Периодический;
2. Непрерывный;
3. Полунепрерывный отъемно-доливной (промежуточный).

**При получении пенициллина
микробиологическим синтезом используют
питательную среду, включающую:**

глюкозу	1,5 %
лактозу	5 %
сульфат аммония и фосфаты	0,5 - 1%
кукурузный экстракт	2 - 3 %

«предшественники» АБ:

фенокси- или фенилуксусная кислота	0,3 - 0,6%
мел	0,5 - 1 %
пеногаситель	0,5 - 1 %.

Условия ферментации:

температура ферментации 22—26⁰ С;

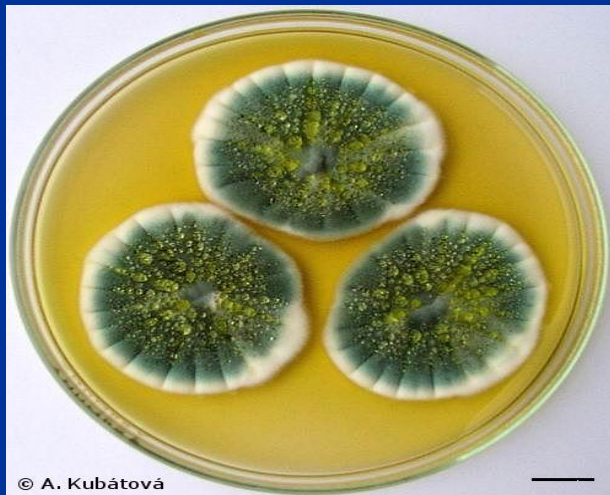
рН от 5,0 до 7,5;

постоянной аэрации (1 м³ воздуха на
1 м³ среды в 1 мин);

продолжительность процесса — 4 сут.

Перспективный метод выращивания микроорганизмов - продуцентов АБ

метод **глубинного**
культивирования **или**
периодическое
культивирование.



© A. Kubátová

Особенностью II стадии производства АБ является двухфазный характер ферментации.

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

**АБ не синтезируется в
1-ой фазе.**

Во второй фазе (идиофаза)

3
4

накопление биомассы

замедляется, т.к. питательная

среда обеднена и обогащена

продуктами жизнедеятельности

продуцента.

Максимум биосинтеза

антибиотика наступает в

стадии отмирания культуры.

**Цель химической очистки -
извлечение АБ из культуральной
жидкости или клеток
продуцента,**

- **концентрирование,**
- **освобождение от примесей,**
- **получение высокоочищенного
препарата.**

Методы очистки:

1. Метод жидкостной экстракции;
2. Ионообменная сорбция;
3. Метод осаждения.

Обезвоживание препаратов (удаление свободной и связанной воды):

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

Биологические методы анализа АБ

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

3
8



3. Дозу, смертельную для всех животных (LD100).

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

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

УСКОРЕННЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АБ:

- **уреазный метод**
(проводят путем сравнения изменений рН в средах испытуемых и стандартных образцов);
- **ферментативный метод** (основан на инаktivации аминокликозидов в крови специфическими ферментами, продуцируемые Гр. «-» микроорганизмами);

■ Радиоиммунный метод

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

Единица действия (ЕД) - величина биологической активности АБ.

За ЕД принимают **минимальное количество АБ**, подавляющее развитие тест-микроорганизма в определенном объеме питательной среды.

4 Соотношение между массой и единицами действия (ЕД) АБ

3

НАИМЕНОВАНИЕ АБ	ЕД, млн.	МАССА, г
Бензилпенициллина натриевая (калиевая) соль	1	0,65
Стрептомицина основание	1	1,0
Стрептомицина сульфат (хлорид)	1	1,25
Эритромицин	1	1,11

Меры борьбы с фаговой инфекцией в промышленных технологиях:

1. Использование в производстве АБ специально отобранных фагоустойчивых культур.
2. Систематическая борьба с распространением фага в производственных цехах и лабораториях.
3. Защита производственной культуры продуцента АБ от фаговой инфекции (стерилизация сред, аппаратуры, строгим соблюдением стерильности на всех этапах получения АБ).

Преимущества полусинтетических АБ:

1. **Экономически выгодный способ** производства АБ (из 1 природного АБ можно создать более 100 полусинтетических препаратов с разными свойствами);
2. **Чувствительность** микроорганизмов к полусинтетическим АБ, устойчивых к природным АБ;

Принципы рациональной антибиотикотерапии:



1. Микробиологический принцип.

**АБ применять только по
показаниям, когда заболевание
вызвано микроорганизмами, в
отношении которых существуют
эффективные препараты;**

2. Фармакологический принцип.

При назначении АБ необходимо определить правильную дозировку препарата, интервалы между введением ЛП, методы введения, возможность сочетания различных АБ;



3. Клинический принцип.

**При назначении АБ учитывают
общее состояние больного, пол,
возраст, состояние иммунной
системы, сопутствующие
заболевания.**

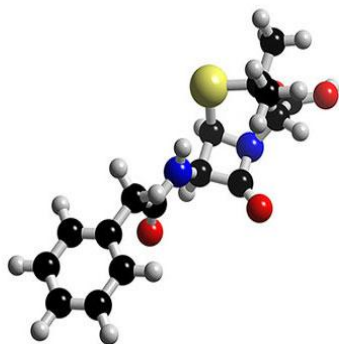


4. Эпидемиологический принцип.

При выборе АБ необходимо знать,
к каким АБ устойчивы
микроорганизмы в среде,
окружающей больного (больница,
отделение, географический регион).

5. Фармацевтический принцип.

Необходимо учитывать срок годности и условия хранения препарата, т.к. при длительном и неправильном хранении возможно образование токсичных продуктов.



Основные физико-химические свойства АБ:

1. Недостаточная растворимость АБ в воде (затрудняет получение инъекционных ЛФ);
2. Недостаточная стабильность водных растворов (в водной среде АБ подвержены реакциям гидролиза, окисления и др.);
3. Плохая совместимость с лекарственными и вспомогательными веществами;

4. Термолабильность большинства АБ делает невозможным применение тепловых методов стерилизации

Исключение:

Левомицетин и мономицин в виде растворов выдерживают стерилизацию при 100°C (текучим паром) в течение 30 мин.

5. В зависимости от рН среды возможно изменение активности АБ.

**БЛАГОДАРЮ
ЗА
ВНИМАНИЕ!**