

Получение антибиотиков. Разработка новых биотехнологий и усовершенствование антибиотиков.

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.

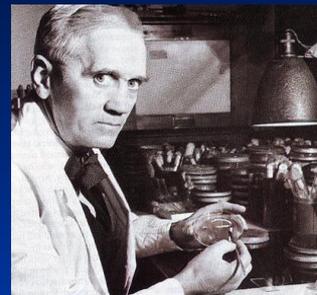


Химиотерапевтические средства — это ЛВ, в том числе используемые для подавления жизнедеятельности и уничтожения микроорганизмов в тканях и средах больного, обладающие избирательным, этиотропным (действующим на причину) действием.

Историческая справка создания антибиотиков (АБ)

5

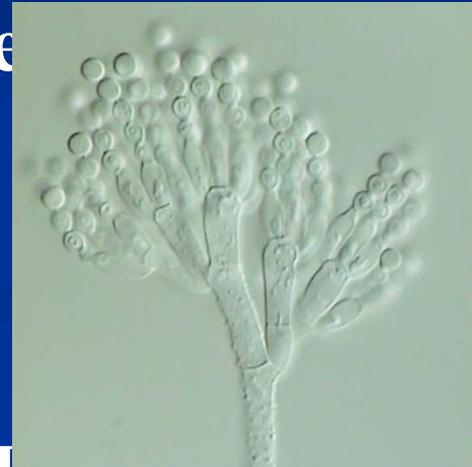
1. Впервые предсказали существование антибиотиков ученые Луи Пастер и И.И. Мечников.



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:

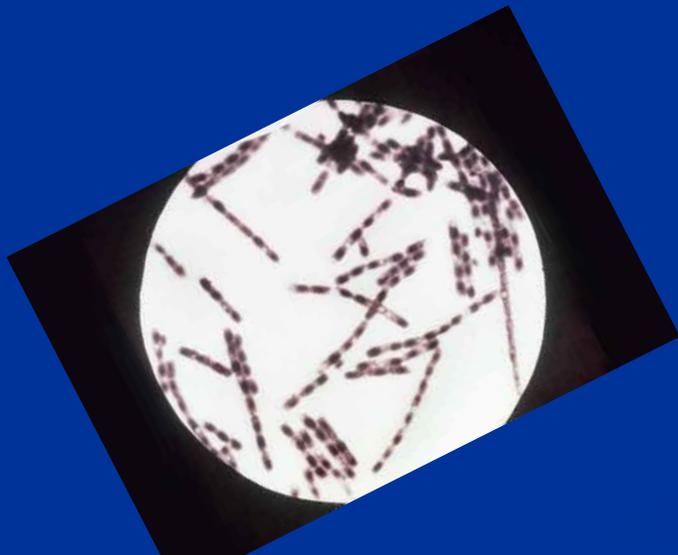
- 1. АБ, полученные из грибов – пенициллины, цефалоспорины;**
- 2. АБ, полученные из актиномицетов – стрептомицин, эритромицин, нистатин;**
- 3. АБ, произведенные собственно бактериями – полимиксины;**
- 4. АБ животного происхождения – эктерицид (получают из рыбьего жира);**
- 5. АБ растительного происхождения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

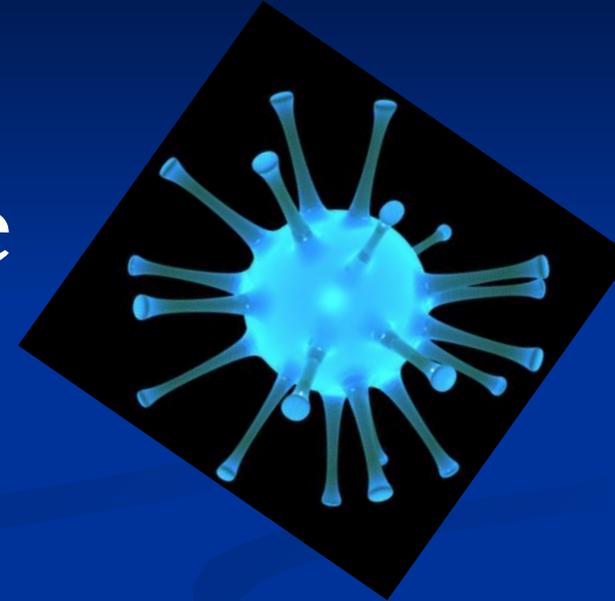
1. АБ, получаемые **путем микробиологического синтеза** на основе плесневых грибов или актиномицетов (тетрациклины, пенициллины, антибиотик-гликозиды, макролиды и др.);

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

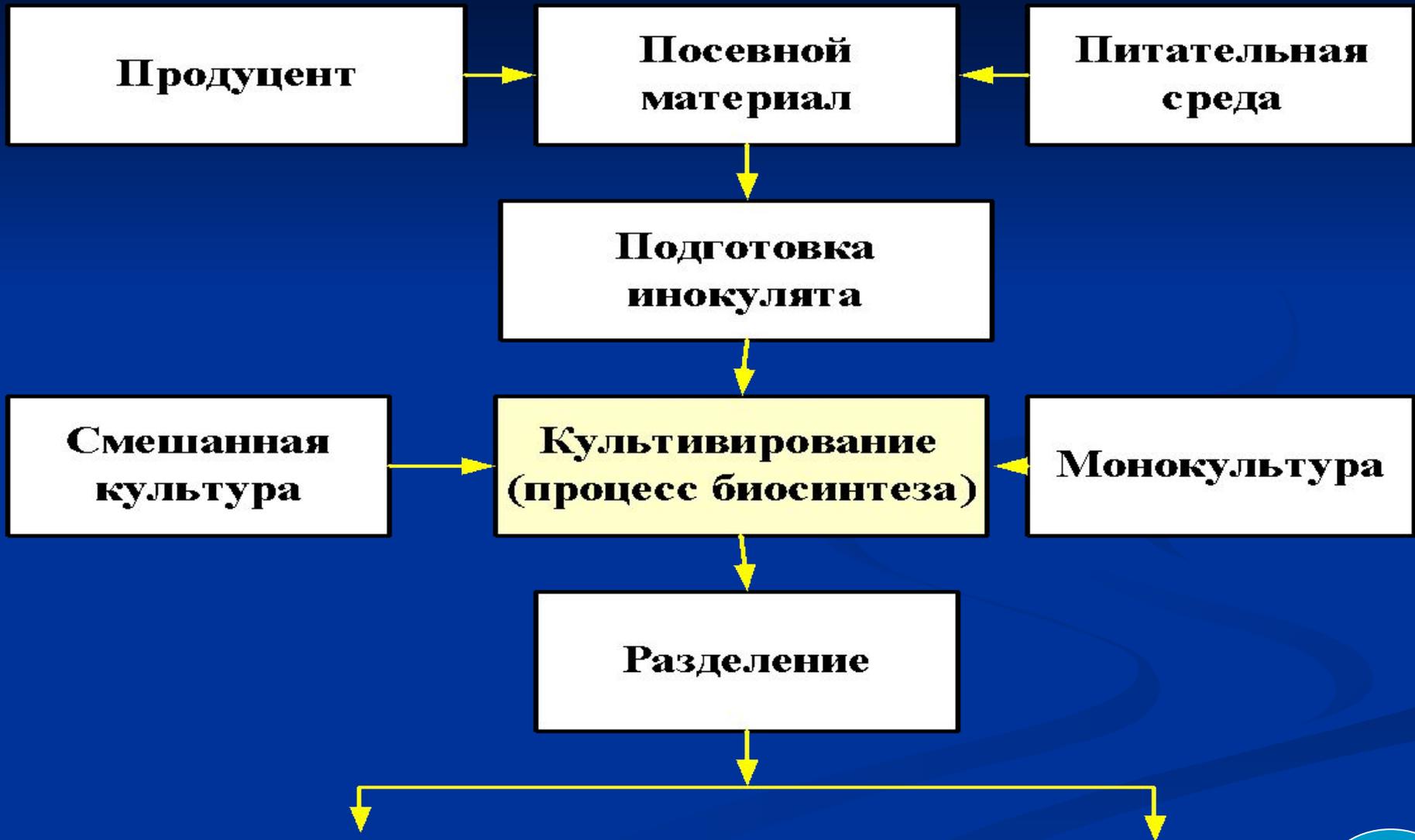
Слияния протопластов

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

Концентрирование

Стабилизация

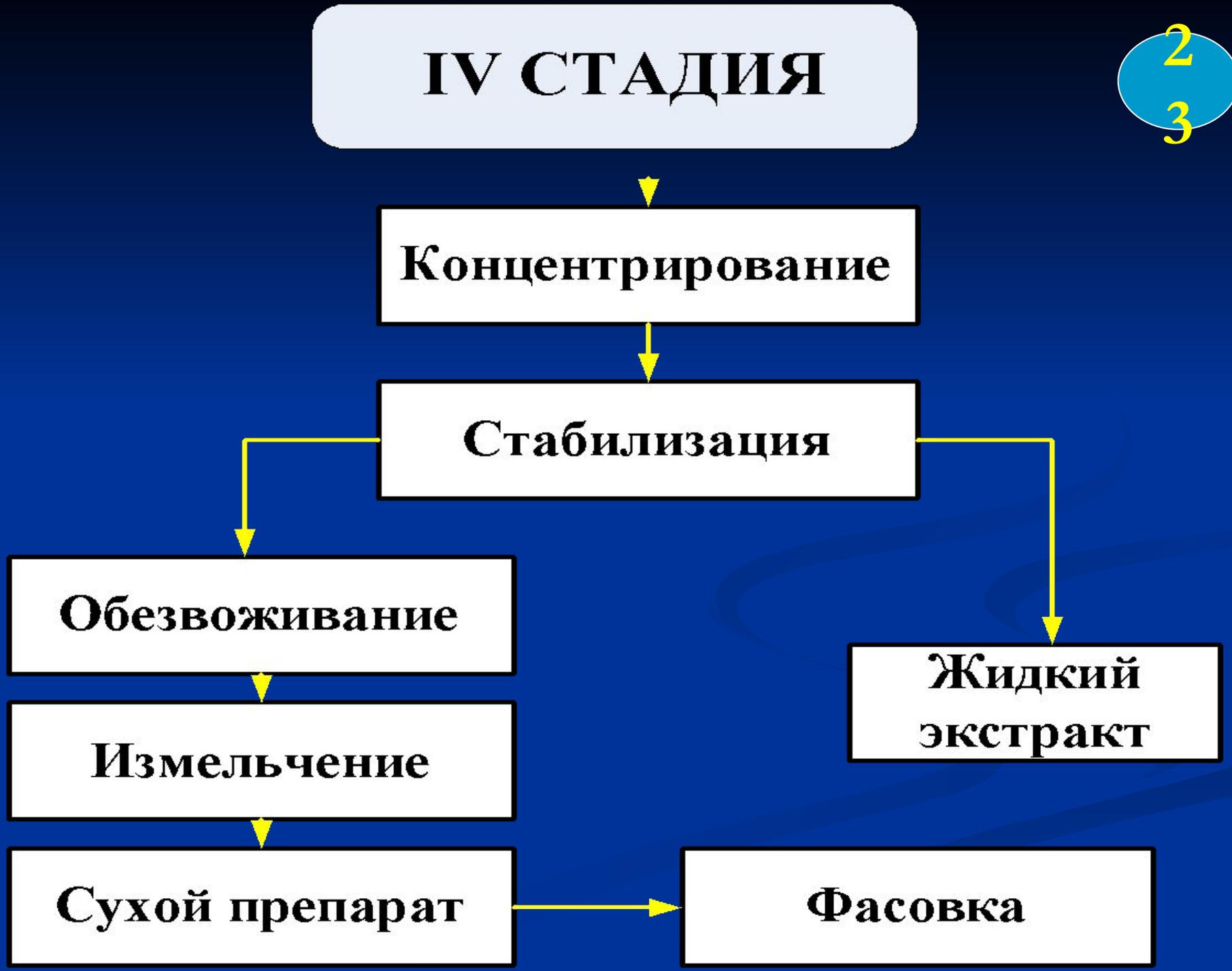
Обезвоживание

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;

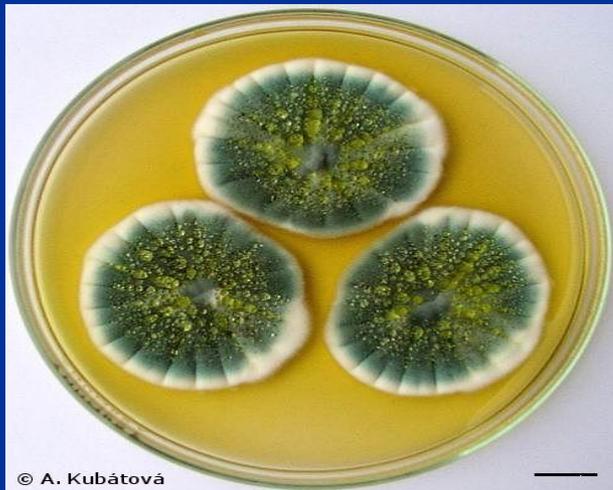
рН от 5,0 до 7,5;

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 3 действия (ЕД) АБ

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.**

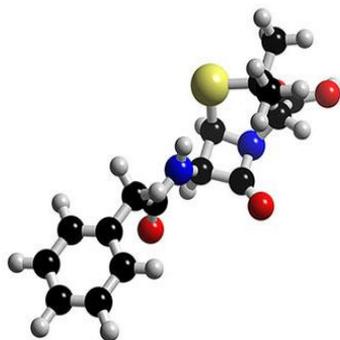


4. Эпидемиологический принцип.

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!**