

Биотехнология создания антибиотиков

Содержание

Введение

1. Понятие об антибиотиках:

- Требования к антибиотикам;
- Классификация;
- Побочные действия.

2. Основные этапы промышленного получения антибиотиков.

3. Методы культивирования продуцентов антибиотиков.

4. Ферментеры.

5. Стерилизация питательных сред.

6. Подготовка посевного материала.

7. Развитие организма-продуцента антибиотика в ферментерах.

8. Выделение и химическая очистка антибиотиков.

9. Сушка, контроль и расфасовка препарата.

- Достижения научно-технического прогресса способствовали развитию новых биологических технологий создания диагностических, лечебных и профилактических препаратов, решению проблем сбалансированности питания, экологических проблем. Основные принципы биотехнологии- ферментация, культивирование микроорганизмов, растительных и животных клеток, генная и клеточная инженерия. Генная инженерия-сердцевина современной биотехнологии.

- Эре антибиотикотерапии предшествовал период разработки антимикробных химиопрепаратов. Некоторые вехи: в 1891г. Д. А. Романовский сформулировал основные принципы химиотерапии инфекционных болезней, предложил хинин для лечения малярии, П. Эрлих в 1906г. предложил принцип химической вариации. Синтезированы производные мышьяка сальварсан и неосальварсан, предложен химиотерапевтический индекс. Круг химиопрепаратов постепенно расширялся. В 1932г. открыты подходы к созданию сульфаниламидных препаратов. Однако поистинне революционное значение имело открытие антибиотиков.

- Одним из универсальных механизмов антагонизма микроорганизмов является синтез антибиотиков, которые тормозят рост и размножение микроорганизмов (бактериостатическое действие) или убивают их (бактерицидное действие). Антибиотики-вещества, которые могут быть получены из микроорганизмов, растений, животных тканей и синтетическим путем, обладающие выраженной биологической активностью в отношении микроорганизмов.
- Таких веществ известно несколько тысяч, однако реально используют значительно меньше.

Существует ряд требований к антибиотикам, существенно ограничивающих их терапевтическое применение:

- эффективность в низких концентрациях;
- стабильность в организме и в различных условиях хранения;
- низкая токсичность или ее отсутствие;
- выраженный бактериостатический и (или) бактерицидный эффект;
- отсутствие выраженных побочных эффектов;
- отсутствие иммунодепрессивного воздействия.

Антибиотики могут быть разделены по происхождению, направленности и спектру действия, по механизму действия.

По происхождению антибиотики могут быть:

- бактериального (полимиксин, грамицидин);
- актиномицетного (стрептомицин, левомицетин, эритромицин);
- грибкового (пенициллин);
- растительного (рафанин, фитонциды);
- животного происхождения (интерфероны, лизоцим).

По спектру действия антибиотики разделяют на:

- действующие преимущественно на грамположительную микрофлору - пенициллин, эритромицин;
- действующие преимущественно на грамотрицательную микрофлору - полимиксин;
- широкого спектра действия (на грам-плюс и грам-минус флору) — стрептомицин, неомицин;
- противогрибковые - нистатин, амфотеррицин, леварин, низорал;
- противотуберкулезные - стрептомицин, канамицин;
- противоопухолевые - рифампицин;
- противовирусные - интерферон, зовиракс, ацикловир.

Антибиотики разделяют по механизму действия:

- ингибиторы синтеза пептикогликана клеточной стенки (пенициллин, цефалоспорин, ванкомицин, ристомицин). Действуют на имеющих клеточную стенку растущие бактерии, не действуют на L-формы, покоящиеся формы бактерий;
- ингибиторы синтеза белка (стрептомицин, левомицетин, тетрациклин);
- ингибиторы синтеза нуклеиновых кислот, пуринов и аминокислот (налидиксовая кислота, рифампицин);
- ингибиторы синтеза мембраны и цитоплазматической мембраны грибов (нистатин, полимиксин).

Побочное действие антибиотиков

Для макроорганизма:

- токсическое действие;
- дисбактериозы;
- аллергические реакции;
- иммунодепрессивное действие;
- эндотоксический шок.

Для микроорганизмов :

- формирование атипичных форм микробов;
- формирование антибиотикорезистентных и антибиотикозависимых форм микроорганизмов.

Основные этапы промышленного получения антибиотиков.

После установления высоких лечебных свойств первого антибиотика – пенициллина возникла задача организации производства его в больших количествах. На первых порах получение пенициллина в промышленности было экономически нерентабельно. Выращивание продуцента антибиотика осуществлялось на средах, находящихся в различных небольших сосудах (матрацы, молочные бутылки, колбы), при поверхностном культивировании гриба. Процесс развития гриба продолжается 8-10 суток.

Такой способ культивирования гриба при большой затрате труда давал низкий выход антибиотика, и себестоимость препарата была очень высокой. В результате поиска путей наиболее рационального способа производства антибиотика был предложен метод глубинного выращивания гриба в специальных емкостях – ферментерах или танках при продувании воздуха и перемешивании культуральной жидкости.

Технологический процесс производства антибиотиков включает:

1. Стадия биосинтеза (образования антибиотика) – основная. Главная задача на этой стадии – создание оптимальных условий для развития продуцента и максимально возможного образования антибиотика.
- Высокая результативность стадии зависит от уровня биосинтетической активности продуцента антибиотика, времени его максимального накопления, стоимости сред для культивирования организма, стоимости применяемых предшественников, энергетических затрат на процессы, связанные с развитием продуцента антибиотического вещества.

2. Стадия предварительной обработки культуральной жидкости , клеток (мицелия) микроорганизма и фильтрации (отделения культуральной жидкости от биомассы продуцента).

Эффективность стадии определяется составом среды для выращивания продуцента антибиотика, характером его роста, местом основного накопления биологически активного вещества (в культуральной жидкости или внутриклеточно).

3. Стадия выделения и очистки антибиотика.

На этой стадии в зависимости от свойств антибиотика , его химического строения и основного места накопления применяются такие методы выделения и очистки, как: экстракция, осаждение, сорбция на ионообменных материалах, упаривание, сушка.

4. Стадия получения готовой продукции, изготовление лекарственных форм, расфасовка.

Особенность стадии – к качеству конечного продукта предъявляются очень высокие требования (асептические условия, удобство в применении).

Методы культивирования продуцентов антибиотиков.

Наиболее перспективный метод выращивания микроорганизмов-продуцентов антибиотиков – это **метод глубинного культивирования**. Метод состоит в том, что микроорганизм развивается в толще жидкой питательной среды, через которую непрерывно пропускается стерильный воздух, и среда перемешивается.

Основные модификации глубинного выращивания микроорганизмов.

1. **Периодическое культивирование.** При этом способе весь процесс развития м/о полностью завершается в одном ферментере, после чего ферментер освобождается от культуральной жидкости, тщательно промывается и вновь заполняется свежей питательной средой. Среда засеивается изучаемым м/о, и процесс возобновляется.

2. **Отъемный метод.** Культивирование м/о осуществляется в ферментерах с периодическим отбором части объема культуральной жидкости (от 30 до 60% общего объема). Объем культуральной жидкости в ферментере при этом доводится свежей питательной средой до исходного уровня.
3. **Батарейный способ.** Развитие м/о происходит в ряду последовательно соединенных ферментеров. Культуральная жидкость на определенной стадии развития м/о перекачивается из 1го ферментера во 2й, из 2 в 3 и т.д.

Освобожденный ферментер немедленно заполняется свежей питательной средой, засеянной микроорганизмом. При этом способе выращивания происходит более рациональное использование емкостей.

4. Непрерывное культивирование. Метод принципиально отличен от указанных модификаций глубинного культивирования продуцентов антибиотиков.

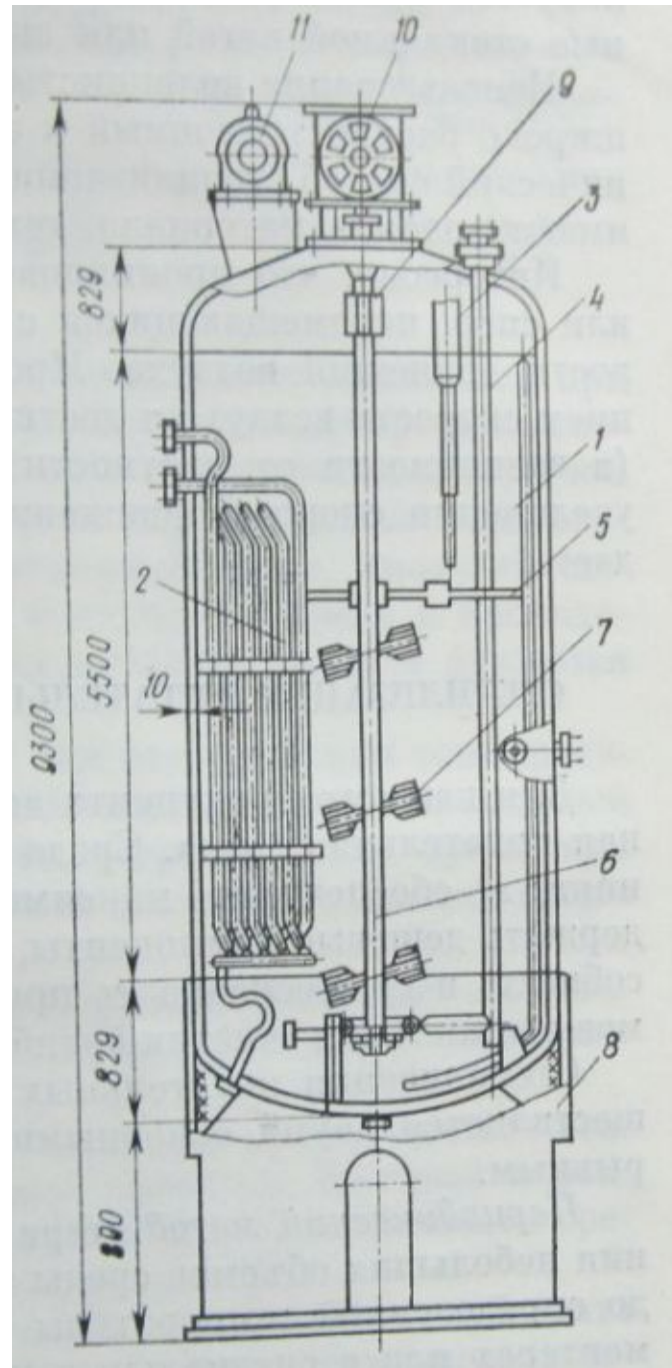
В основе этого метода лежит то, что развитие м/о происходит в условиях непрерывного протока питательной среды, что позволяет поддерживать развитие м/о на определенной стадии его роста. Стадия развития м/о определяется исходя из наиболее выгодного для максимального биосинтеза антибиотика.

Ферментеры.

Ферментеры – это специальные герметически закрытые емкости, обеспечивающие глубинное выращивание продуцентов антибиотиков. Они снабжены приспособлениями для достаточной аэрации и перемешивания культуры, поддержания необходимой температуры, контрольно – измерительными приборами.

Рис. 1. Ферментер емкостью 50м³
(по Былинкиной, 1970).

- 1-корпус аппарата;
- 2-теплообменник;
- 3-гильза для термометра;
- 4-барботер;
- 5-растяжки для центровки вала;
- 6-вал мешалки;
- 7-лопасть мешалки;
- 8-стойка ферментера;
- 9-соединительная муфта вала;
- 10-привод мешалки;
- 11-мотор.



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

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

- Наблюдение за основными процессами жизнедеятельности организма осуществляется контрольно-измерительной аппаратурой. Это позволяет поддерживать на определенном уровне температуру внутри ферментера, рН среды, количество пропускаемого воздуха, давление внутри ферментера и др.
- Применяются установки, позволяющие автоматически определять содержание азота в среде по ходу развития м/о.

- Ферментеры снабжены приспособлениями для переноса инокулята, внесения дополнительных питательных веществ, пеногасителем и устройством для взятия проб.

Различают ферментеры:

- лабораторные;
- полупроизводственные;
- производственные.

1. Лабораторные ферментеры

изготавливаются из стекла или нержавеющей стали и имеют, как правило, емкость не более 30 литров. Стерилизация – в автоклавах.

Питательную среду стерилизуют отдельно, а затем переносят в стерильный ферментер.

2. Полупроизводственные ферментеры имеют емкость 100 литров, выполнены из нержавеющей стали.

3. В промышленных условиях получения антибиотиков применяют ферментеры различной емкости – от 500 л до 50 и 100 м³.

Стерилизация
полупроизводственных и
производственных ферментеров
осуществляется перегретым паром.
Воздух, необходимый для аэрации,
стерилизуется путем фильтрации
через специальные фильтры,
заполненные стеклянной ватой или
активированным древесным углем.

Стерилизация питательных сред.

- Для каждого продуцента антибиотика разрабатывается оптимальная питательная среда.
- Среда **должна**:
 1. обеспечивать максимальное образование антибиотика;
 2. содержать дешевые компоненты;
 3. иметь хорошую фильтрующую способность;
 4. обеспечивать применение наиболее экономичных приемов выделения и очистки антибиотика.

Основные методы стерилизации в промышленных условиях.

1. Периодический метод. 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.

2. Непрерывный метод. Целесообразно применять при использовании больших объемов среды. Приготовленная среда из специального сосуда с помощью насоса подается в стерилизационную колонку, через которую пропускается острый пар (давление пара около 5атм). Пар подается сверху по внутренней трубе, имеющей щелевидные прорези, благодаря чему пар поступает в среду и происходит быстрый ее нагрев. Среда в колонку подается снизу и движется по спирали вокруг внутренней трубы.

Нагретая в колонке до необходимой для стерилизации температуры (около 130°C) среда поступает в специальный аппарат, называемый выдерживателем, где она выдерживается определенное время при температуре $125-130^{\circ}\text{C}$. Время выдержки зависит от состава среды и составляет 5-10 мин. Из выдерживателя стерильная среда поступает в змеевиковый холодильник, где она охлаждается до $30-35^{\circ}\text{C}$ и поступает в ферментер.

Непрерывный метод имеет ряд преимуществ:

- возможность автоматического регулирования процессов;
- быстрый и равномерный нагрев среды;
- обеспечение более полной стерильности среды.

Подготовка посевного материала.

- многоступенчатый процесс.

М/о предварительно выращивают на агаризированной среде в пробирке (2), затем из пробирки делают высев в жидкую питательную среду в колбы и проводят две генерации при глубинном выращивании на качалках в течение 2-3 суток для каждой генерации (3а,3б). Из второй генерации культуры в колбе делают посев в небольшой (10л) инокулятор (4), после чего хорошо развившуюся культуру переносят в более крупный инокулятор (100-500л) (5), откуда и производят посев в основной ферментер (6). Для посева в основной ферментер используют от 5 до 10 объемных % инокулята.

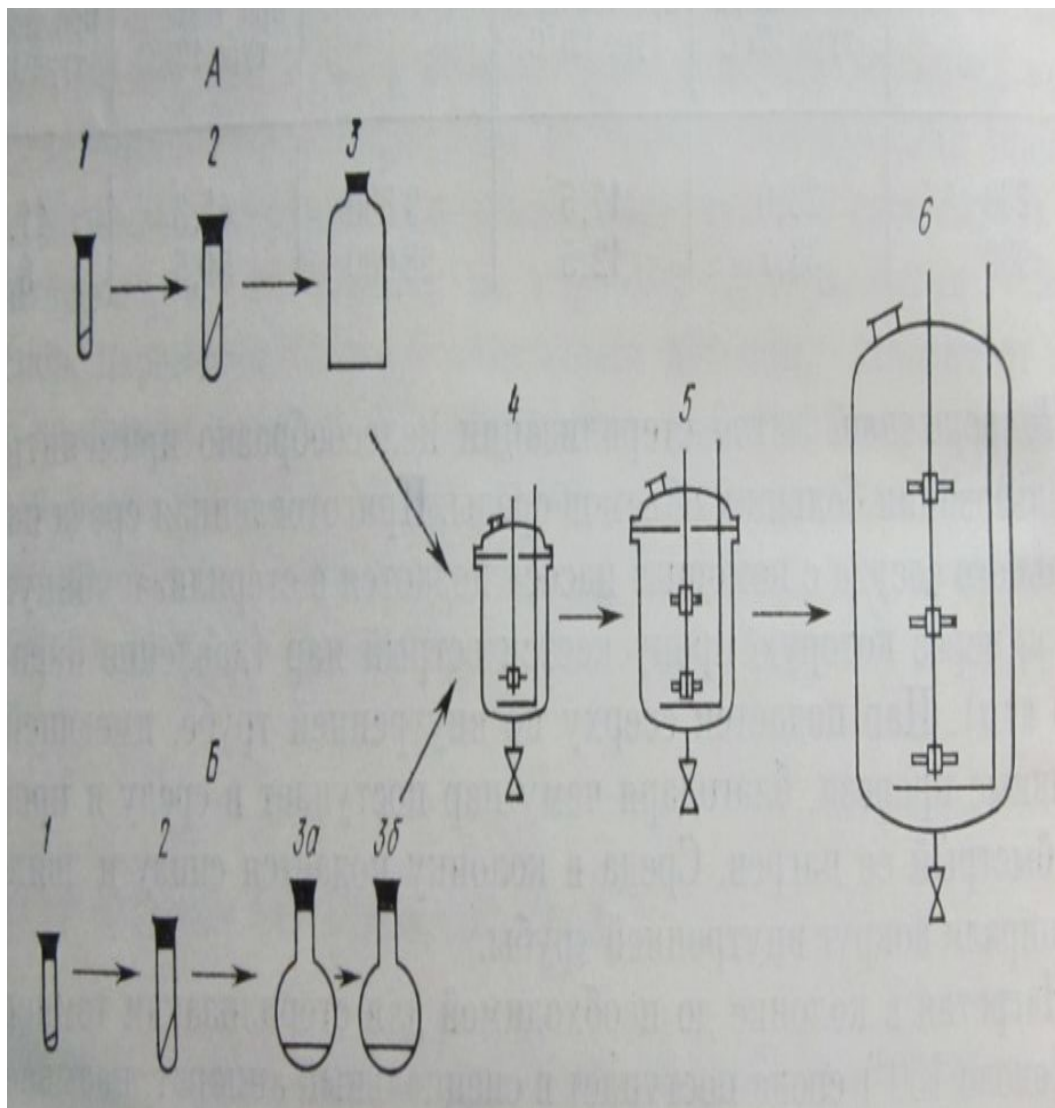


Рис. 2. Схема многоступенчатого приготовления посевного материала.

- А-выращивание во флаконах;
- Б-в колбах на качалках:
- 1-законсервированный исходный материал;
 - 2-споровая генерация на косом агаре в пробирке;
 - 3-II споровая генерация на твердой среде в сосуде Р_у,
 - 3а,3б-I и III генерации на жидкой среде в колбе;
 - 4-ферментер предварительного инокулирования;
 - 5-ферментер инокулирования;
 - 6-основной ферментер.

Развитие организма-продуцента антибиотика в ферментерах.

- Процесс развития м/о в ферментерах происходит при строгом контроле всех его стадий, очень точно выполняется разработанный регламент условий развития организма-продуцента антибиотика.
- Большое внимание уделяется поддержанию заданной температуры культивирования, рН среды, степени аэрации и скорости работы мешалки. Существенное внимание в ферментерах обращают на процесс пеногашения.

- Для борьбы с пеной применяют различные ПАВ: растительные масла (соевое, подсолнечное), животный жир (лярд, кашалотовый жир), а иногда и минеральные масла (вазелиновое, парафиновое), спирты и высшие жирные кислоты. Также используют силиконы, diazobutylcarbamate и др.

Рис. 3. Схема производства антибиотиков:

I-приготовление посевного материала;

II-инокуляторы для наращивания посевного материала;

III-стерилизатор среды для большого ферментера;

IV-установка для биосинтеза антибиотика.

а-стерилизация среды в колбах;

б-охлаждение и посев культуры продуцента в колбу;

в-рост культуры в покое;

г-рост культуры в качалке;

д-инокулятор со стерильной средой;

е-инокулятор со средой, засеянной культурой продуцента;

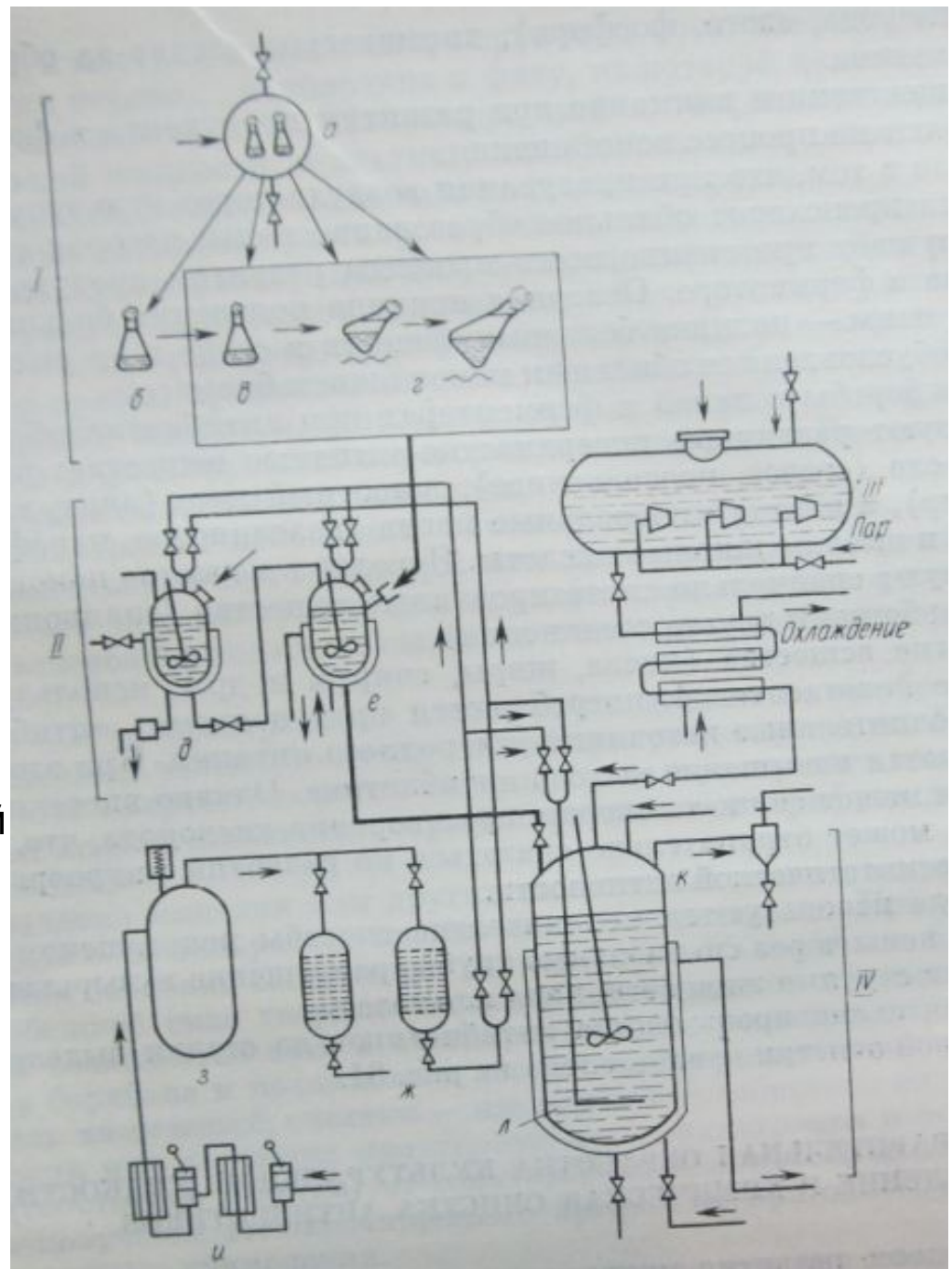
ж-фильтры и компрессор;

з-резервуар со сжатым воздухом;

и-нагрев воздуха;

к-ферментер;

л-рубашка для охлаждения ферментера.



Выделение антибиотиков.

- В зависимости от того, где антибиотическое вещество сосредоточено, применяют соответствующие методы его извлечения.
- Если антибиотик находится в культуральной жидкости, его выделяют методами экстракции растворителями, не смешивающимися с жидкой фазой, осаждают в виде нерастворимого соединения или сорбируют ионообменными смолами.
- Отделение нативного раствора от биомассы и взвешенных частиц проводят методами фильтрации и или центрифугирования.

- Для процесса фильтрации применяют различные фильтрующие аппараты: фильтр-пресс, нутч-фильтр, друк-фильтр, центрифуги, сепараторы.
- **Фильтр-прессы** применяются для обработки больших объемов культуральной жидкости. 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, а в друк-фильтре процесс фильтрации осуществляется благодаря созданию давления над фильтрующей жидкостью.
- Отделение мицелия или других взвешенных частиц происходит в **сепараторах**. При скорости вращения барабана сепаратора 7000-7500об/мин, благодаря центробежной силе твердые частицы устремляются к стенкам барабана и осаждаются там, а отсепарированная жидкость стремится к центру барабана и поднимается вверх в специальную камеру.

Химическая очистка антибиотиков.

- Цель химической очистки – извлечение антибиотика из нативной жидкости или из клеток продуцента, его концентрация и освобождение (собственно очистка) от сопутствующих примесей и в конечном счете получение высокоочищенного препарата.

Основные методы очистки антибиотиков:

- **Метод экстракции.** Антибиотик многократно переводят из одного растворителя в другой с предварительным осаждением (кристаллизацией) – перекристаллизация.
- **Ионообменная сорбция.** 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.

- Антибиотик в виде отрицательно заряженного иона будет сорбироваться на катионидной смоле и наоборот. Адсорбированный на смоле антибиотик элюируют (десорбируют), в результате чего получают значительно очищенный и сконцентрированный препарат.
- **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).

Сушка, контроль и расфасовка препарата.

Сушка:

- лиофильная (-8-12°C);
- высушивание с применением распылительной сушилки (раствор антибиотика пневматически распыляется до мельчайших капель в камере с потоком нагретого воздуха. Процесс высушивания протекает в течение нескольких секунд).
- применение вакуум-сушильных шкафов, методы взвешенного слоя (сушка зернистых и пастообразных препаратов).

Контроль

1) Биологический контроль. Выяснение стерильности готового препарата.

2) метода:

1-связан с инактивацией антибиотика и высевом его в соответствующую питательную среду.

2-определяется тем, что для большинства антибиотиков не имеется биологических инактиваторов их биологической активности. Поэтому у изучаемых препаратов выявляют наличие устойчивых к ним форм м/о, а также определяют возможное присутствие чувствительной микрофлоры. Для определения возможного присутствия в таких препаратах чувствительной к ним микрофлоры раствор антибиотиков пропускают через мембранные фильтры с диаметром пор не более 0,75 мк.

2) Фармакологический контроль. Каждый новый лекарственный препарат должен пройти всесторонние испытания на токсичность, пирогенность и др. Препарат изучают на разных видах животных в отношении его острой и хронической токсичности.

Показатели острой токсичности являются одним из критериев качества антибиотика. Устанавливают максимально переносимую дозу (МПД), дозу, вызывающую гибель 50% подопытных животных (LD_{50}) и смертельную дозу (LD_{100}).

- Затем производят расфасовку и упаковку антибиотика. Упакованный антибиотик с указанием биологической активности и даты выпуска поступает в продажу.

Спасибо за внимание!