

# 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. Среды засеваются 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.

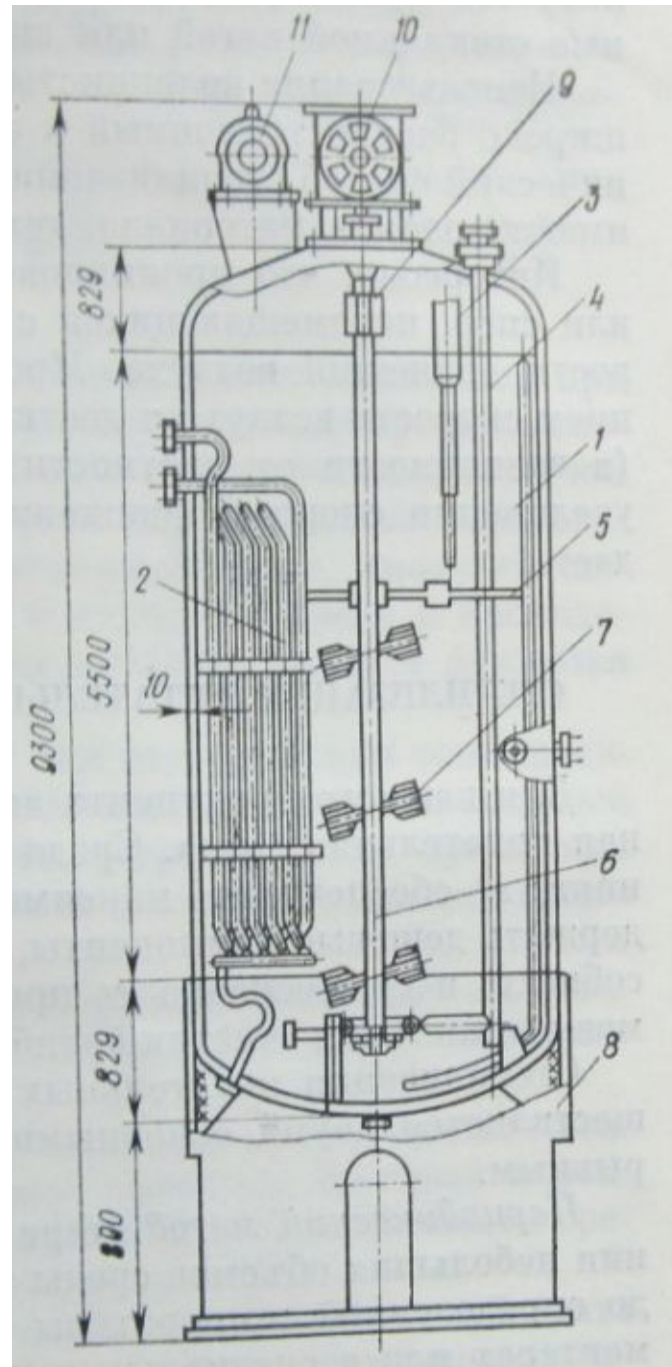
В основе этого метода лежит то, что развитие м/о происходит в условиях непрерывного протока питательной среды, что позволяет поддерживать развитие м/о на определенной стадии его роста. Стадия развития м/о определяется исходя из наиболее выгодного для максимального биосинтеза антибиотика.

# 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 50м<sup>3</sup>  
(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 м<sup>3</sup>.

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 5 атм). 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  $130^{\circ}\text{C}$ ) 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.

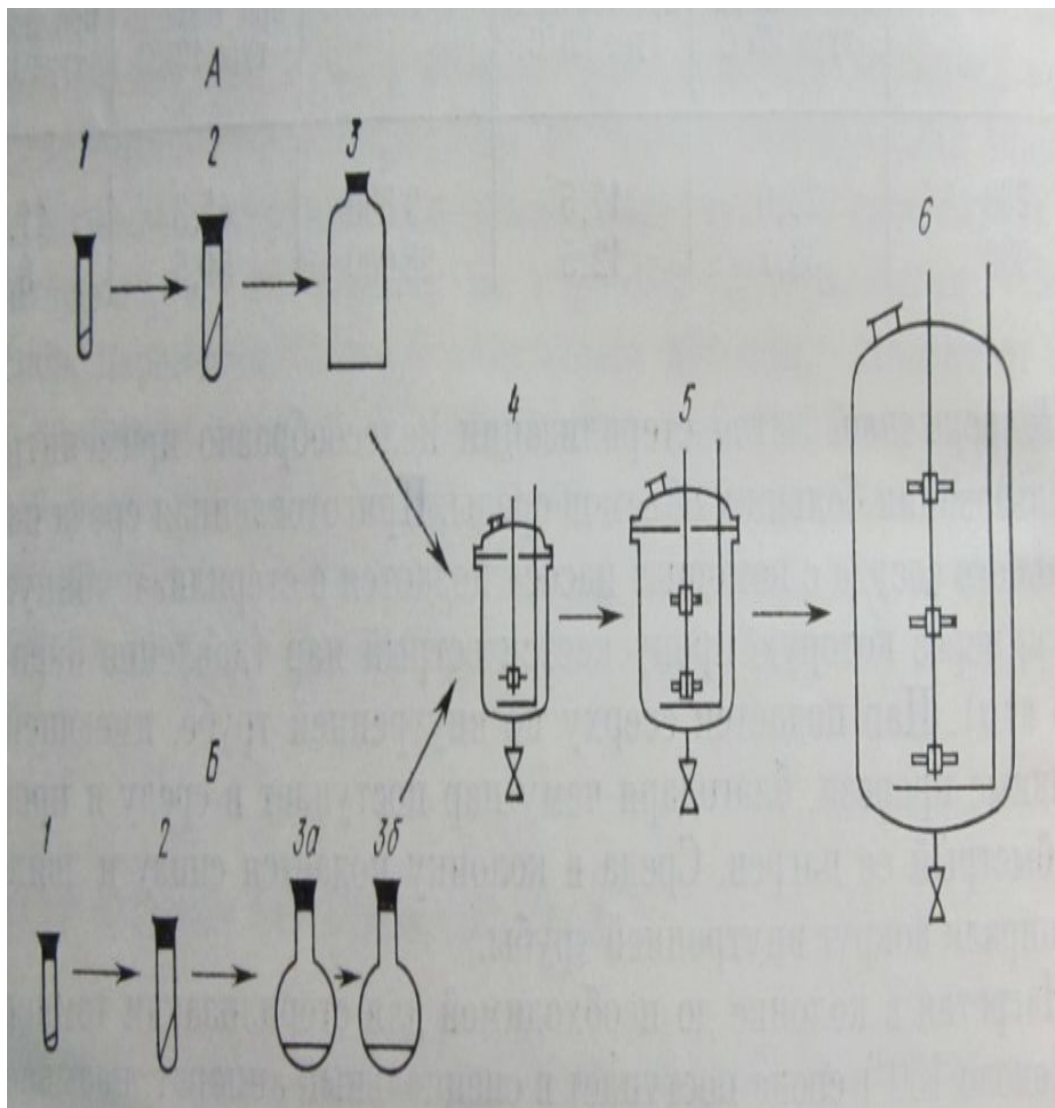


Рис. 2. Схема многоступенчатого приготовления посевного материала.

- 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<sub>у</sub>,
- 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;

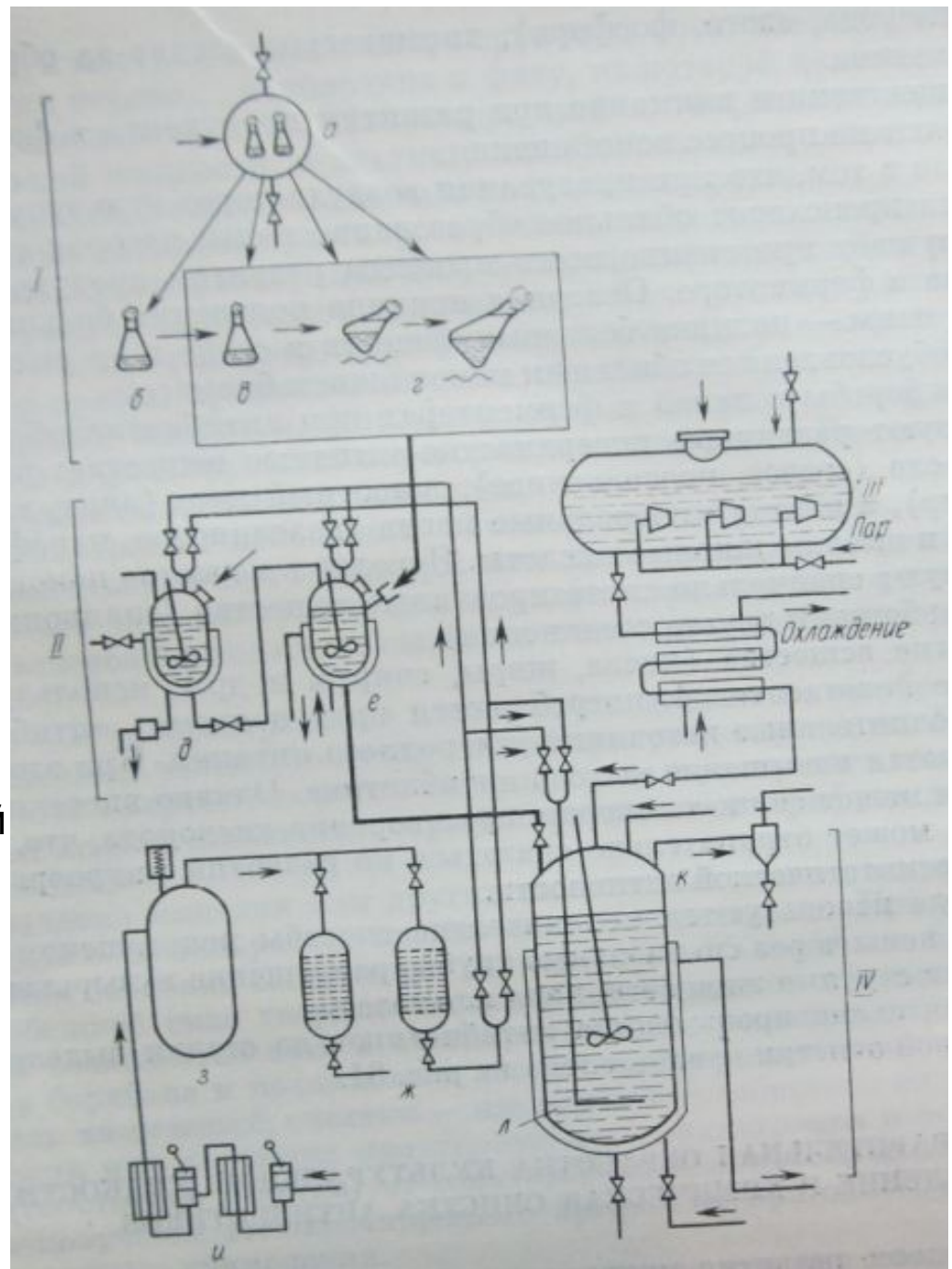
ж-фильтры и компрессор;

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!**