

ЧАСТНАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ АНТИБИОТИКОВ



к.б.н. Караева Альбина
Маирбековна

ПЛАН:

- 1. Производство пенициллинов**
- 2. Получение цефалоспоринов**
- 3. Получение стрептомицина**
- 4. Получение тетрациклинов**
- 5. Получение антибиотиков-макролидов**
- 6. Ретроингибирование антибиотиков и преодоление этого процесса**
- 7. Механизмы развития резистентности у бактерий.**
- 8. Теория взаимозаменяемости антибиотиков**

Производство пенициллинов



В 1871 г. В.А. Манасеиным было установлено, что зеленая плесень *Penicillium glaucum* при своем росте уничтожает бактерии, попадающие в культуральную среду. Это свойство *Penicillium* было тогда же использовано врачом А. Г. Полотебневым, применившим смоченные этой плесенью повязки при лечении гнойных ран и язв.

Выдающееся открытие русских ученых не получило широкой известности, и в 1928 г. англичанин Александр Флеминг вторично обнаружил способность плесневого грибка *Penicillium* угнетать рост микроорганизмов. Было показано, что вызываемая плесенью гибель микробов обусловлена образованием неизвестного органического вещества, названного *пенициллином*.

Очень важное значение для высокого выхода пенициллина имеет питательная среда, примерный состав которой (в %) следующий:

Кукурузный настой – 3 (по объему)

Сульфат цинка – следы

Лактоза (или глюкоза) – 2 (по весу)

Карбонат кальция – 0,25

Нитрат натрия – 0,6

Магний сернокислый гептагидрат – 0,05

Калий фосфорнокислый (однозамещенный) – 0,15

Вода ~ 90

Вместо кукурузного настоя успешно применяется мука из хлопковых семян или мясные гидролизаты.

Приготовленную питательную среду подвергают стерилизации. Процесс ведут в колоннах непрерывного действия. Далее питательная среда поступает в аппарат-выдерживатель, где охлаждается в течение определенного времени до температуры 23–25 °С.

Первая стадия процесса – выращивание стандартной колонии штаммов плесени *Penicillium chrysogenum* – проводится в инокуляторах на питательной среде, где процесс идет ~30 часов. Подготовленный инокулят передают в посевной аппарат, объем которого ~ в 10 раз больше объема инокулятора. В посевном аппарате находится также стерилизованная питательная среда. Процесс роста здесь идет ~15–20 часов, и далее посевной материал передается на ферментацию в большие реакторы – ферментаторы объемом до 100 м³ на питательную среду. Процесс ферментации идет ~70 часов при температуре 23–24 °С, рН среды 6–6,5 и постоянной аэрации воздуха – 1 л воздуха/1 литр питательной среды/1 мин по всему объему ферментатора. Основная задача этого процесса – создание оптимальных условий для развития продуцента и накопления антибиотика.

Для увеличения выхода антибиотика в питательную среду вводят «предшественники», т. е. химические вещества, способствующие целенаправленному синтезу антибиотика. Так, в питательную среду при биосинтезе пенициллина вводят «предшественник» фенилацетамид – это увеличивает выход антибиотика более чем в 2 раза.

По окончании процесса ферментации культуральную массу передают на процесс выделения антибиотика.

Большинство продуцентов при биосинтезе выделяют антибиотик в водную фазу, поэтому процесс выделения антибиотика начинается с разделения твердой и жидкой фаз.

Твердая фаза, кроме массы мицелия, содержит значительное количество коллоидных примесей, затрудняющих фильтрование, поэтому культуральную массу предварительно подвергают различным типам коагуляции (электролитической, тепловой, кислотной и т. д.). Наиболее эффективным методом коагуляции культуральной массы является ее обработка флокулянтами (высокомолекулярными полиэлектролитами), например, поли-(4-винил)-N-бензилтриметиламмонийхлоридом. Оставшийся от фильтрации мицелия водный раствор антибиотика направляют на химическую очистку и выделение. Таким образом, водный раствор пенициллина направляют после фильтрации на экстракцию бутилацетатом при рН водной среды, равной 2. При таком значении кислотности среды подавляет кислотная ионизация пенициллина в водной фазе и он переходит в органическую фазу (в бутилацетат). Реэкстракцию пенициллина из бутилацетата проводят слабыми растворами щелочей.

Широко применяются сорбционные методы выделения и очистки антибиотиков. В качестве сорбентов широко используются синтетические ионообменные смолы.

Сушат пенициллины методом сублимации или распыления.



Угроза резистентности

Было установлено, что стафилококки способны обезвредить молекулу пенициллина, изменив его структуру в самом слабом месте. При этом процессе (гидролизе) образуется соединение, безвредное для микробов. Фермент, способствующий реакции «обезвреживания», называется *пенициллиназой*. Его возникновение вызывается присутствием в среде пенициллина. В построении ее молекулы участвуют 257 структурных единиц двадцати аминокислот, соединенных в различной последовательности.

Другие бактерии образуют ферменты (ацилазы), которые разрывают связь между основным ядром молекулы бензилпеницилина и ее боковой ацильной группой, образуя биологически неактивную 6-аминопеницилановую кислоту (6-АПК).

Второе расщепление ученые стали использовать для своих целей как возможность изменить молекулу пенициллина таким образом, чтобы ацилаза не смогла подвергнуть ее гидролизу. Таким способом были получены новые полусинтетические пенициллины.

Полусинтетический способ получения пенициллинов

Исходным продуктом получения аналогов природного пенициллина в синтезе служит 6-аминопенициллановая кислота

Кислоту получают в результате биосинтеза, при развитии штамма плесени *Penicillium chrysogenum*, в специфических условиях его культивирования (при отсутствии предшественников в среде) или чаще путем ферментативного дезацилирования бензилпенициллина с участием пенициллинацилазы. При этом образуется 6-АПК и фенилуксусная кислота.



Ацилированием аминогруппы 6-АПК получен ряд новых полусинтетических антибиотиков, которые кислотоустойчивы в желудке, не подвергаются деструкции в организме пенициллиназой, обладают более широким спектром действия:

Полусинтетические пенициллины

Препараты	Медицинское название антибиотика
Пенициллиназоустойчивые препараты	Тропициллин Фенбициллин
Кислотоустойчивые препараты	Метициллин Оксациллин Ампициллин

Получение цефалоспоринов



Цефалоспорины относятся к группе β -лактамных антибиотиков, близких по структуре к пенициллину. Основной продуцент этого антибиотика – гриб *Cephalosporium acremonium*.

Цефалоспорин подавляет развитие грамположительных и грамотрицательных бактерий, но антибиотическая активность гораздо ниже, чем у пеницилина. Структура β -лактамного кольца его также неустойчива, и гидролизуется ферментом цефалоспориназой.

Полусинтетические аналоги цефалоспорины

В последнее время методом смешанного (биологического и химического) синтеза получено большое число аналогов цефалоспорины.

Многие из этих соединений имеют важное практическое значение.

Основой полусинтеза цефалоспоринов служит 7-аминоцефалоспориновая кислота, которая получается в результате отщепления ацильного остатка от цефалоспорины C под действием фермента ацилазы. Модификация основного ядра цефалоспорины может происходить с двух сторон молекулы.

Полусинтетические цефалоспорины



Медицинское название
антибиотика

Цефалоридин
Цефокситин
Цефалексин
Цефотаксим



Получение стрептомицина



Ярко выраженной способностью вырабатывать антибиотические вещества обладают, помимо плесеней и микробов, также и лучистые грибки – актиномицеты, обычно обитающие в почве. Изучение этого явления привело к открытию в 1943 г. С. Ваксманом второго после пенициллина антибиотика – стрептомицина, устойчивого не только к грамположительным, но и к грамотрицательным, и кислотостойким бактериям. В своей структуре стрептомицин содержит (а) N-метил-D-глюкозамин, (б) – стрептозу и (в) – стрептидин и является сильным органическим основанием. В практике применяют его соли с кислотами (соляной, серной и др.)



При культивировании стрептомицина в качестве источника энергии требуется быстро метаболизируемый сахар (например, глюкоза), который вводят в начале процесса. Однако скорость его ассимиляции должна быть строго ограничена количеством присутствующего азота и фосфата, что в противном случае приводит к чрезмерному росту мицелия и снижению выхода антибиотика. На практике азот вводится в виде сложных соединений (фильтрат барды и остатки масличного семени), которые в течение длительного процесса ферментации медленно разлагаются, выделяя аммиачный азот, рН среды 7,0–8,0, температура ферментации ~28,5 оС. На стрептомицин не действует ни пеницилаза, ни большинство микроорганизмов; если на более поздних стадиях процесса происходит инфицирование культуры, то образовавшийся стрептомицин не разрушается.

Типичные промышленные среды представляют смеси 2,5 %-й глюкозы, 4 %-й соевой муки с низким содержанием масла, 0,5 %-й барды и 0,25 %-й поваренной соли;

в некоторых случаях добавляют сухие дрожжи, мясные экстракты и кукурузный экстракт. В процессе ферментации могут использоваться масла и жирные кислоты (в качестве питательных компонентов либо в качестве пеногасителей).

Процесс ферментации развивается так же, как и в случае производства пенициллина, причем образование стрептомицина в течение первых трех дней не происходит. За 6 дней концентрация стрептомицина достигает конечной величины – 0,8 %.

Получение тетрациклинов

В 1948 г. из почвы был выделен новый вид актиномицета – *Streptomyces aureofaciens*, образующий антибиотики – хлортетрациклин, тетрациклин и другие вещества.

Как было найдено, эти антибиотики обладают широким антибиотическим действием в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, риккетсий, спирохет, хламидий и т. д.

Хлортетрациклин был первым из выделенных тетрациклинов. В зависимости от свойств штамма в качестве источника энергии могут быть использованы различные углеводы, однако для промышленного производства представляют интерес лишь сахароза, крахмал и глюкоза.

Примерный состав питательных сред:

- крахмал (зерно в перемолотом и набухшем состоянии) 2–5 %,
- сахароза (в виде сахара или свекольной патоки) 1–3 %,
- мука из масличного семени (отходы арахис или соя) 1–3 %,
- мясные отходы (кровяная или мясная мука) 0,2–0,5 %,
- кукурузный экстракт 0,2– 1,0 %,
- аммониевые соли 0,1–0,5 %,
- известь 0,5 %,
- поваренная соль 0,1–0,5 %,
- соли микроэлементов (Co, Cu, Zn, Mn, Fe).

Максимальные выходы антибиотика достигаются в результате ограничения содержания неорганического азота в среде и заменой его сложными веществами биологического происхождения (мукой масличных семян, арахисом, копррой – ядром кокосового ореха).



Для ферментации желательно применять ферментаторы, изготовленные из нержавеющей стали или другого стойкого материала. В течение четырех дней, пока длится процесс, среда должна аэрироваться.

Окончательное значение выхода продукта приближается к 1 %. Препарат может быть осажден добавлением извести до рН 8,8. Затем он отфильтровывается на фильтр-прессе, экстрагируется разбавленной кислотой и очищается посредством фракционного осаждения: после перекристаллизации можно получить продукт, достигающий 98 % чистоты.

Окситетрациклин был впервые изготовлен в 1950 г. при культивировании актиномицета *Streptomyces rimosus*.

Среда и условия ферментации подобны используемым при производстве хлортетрациклина, за тем исключением,

что в качестве источника азота могут быть использованы нитраты и кукурузный экстракт.



Окситетрациклин образует нерастворимый комплекс с солями четвертичного аммониевого основания, и этот комплекс может быть легко отделен от субстрата, после чего его размягчают соляной кислотой и затем кристаллизуют в виде соли уксусной кислоты. Как и другие тетрациклины, этот препарат выпускается главным образом в виде таблеток или суспензии.

2

3

Тетрациклин был получен как путем направленной ферментации с помощью отобранных штаммов *Streptomyces aureofaciens* в условиях низкого содержания хлоридов в питательной среде, так и путем каталитического восстановления хлортетрациклина.



В методе направленной ферментации используется ряд организмов, в том числе и *Streptomyces vicidifaciens*, при этом полученный штамм в адекватной среде может обеспечить большие выходы тетрациклина или равные количества хлортетрациклина и тетрациклина пропорционально количеству присутствующих ионов хлора. В случаях, когда необходимо избежать образования хлортетрациклина, содержание хлорида в среде не должно превышать 17 ч./млн.

Если необходимо использовать в качестве основных компонентов субстрата сложные биологические вещества, то в условиях промышленного производства для контроля уровня хлоридов имеются два способа:

1) удалять большую часть хлорида, пропуская компоненты, такие, как сахар-сырец и кукурузный экстракт через ионообменные смолы. Этот метод вполне эффективен, если применяется к разбавленным растворам;

2) вводить в среду вещества, замедляющие утилизацию хлорида, например, бромиды. Оказалось, что при концентрациях от 10 до 350 ч./млн., ионы брома практически подавляют образование хлортетрациклина, даже в присутствии ионов хлора в концентрациях 1500 ч./млн. На практике применяют бромистый натрий (5 %).

Получение антибиотиков-макролидов

Большую группу антибиотиков, содержащих в своей структуре макроциклический лактонный фрагмент и продуцируемых

различными штаммами *Streptomyces*, составляют так называемые макролиды. Наиболее известным представителем этой группы является эритромицин, который по спектру антибактериального действия близок к пенициллину и применяется для лечения больных с повышенной чувствительностью к пенициллину и тетрациклину.

Культивирование продуцента эритромицина длится 150 часов при $pH \sim 7$ на среде, приготовленной на основе крахмала, соевой муки, масла, кукурузного экстракта, сухих дрожжей и извести. Культуральную жидкость фильтруют на кизельгуре (это природный песок, извлеченный из земли, он состоит из водорослей, известных как диатомовые водоросли, которые окаменели за миллионы лет), и антибиотик экстрагируют с помощью амилацетата. Обычно фильтрат культуры и растворитель пропускают через установленный в системе смеситель, а затем через обычную центрифугу. Антибиотик можно разбавить буферным раствором, осадить ацетоном и хлористым натрием, и, наконец, кристаллизовать его из ацетонового раствора.



Ретроингибирование антибиотиков и преодоление этого процесса

Ретроингибирование – это ингибирование синтеза по механизму обратной связи. Очень важно бороться с ретроингибированием.



Когда аминокислота накапливается в достаточном количестве для клетки, она начинает реагировать с первым ферментом цепочки (ключевым ферментом), связывается с его аллостерическим центром, в результате чего изменяется структура активного центра фермента и синтез прекращается. Когда концентрация аминокислоты снижается, синтез начинается снова. Если лизина в клетке много, он также может выключить процесс своего образования, а так как аминокислота – его предшественник и образуется с лизином в одном метаболическом пути, то ее образование также прекращается.

Биотехнологу для достижения большого выхода целевого продукта следует работать со штаммами, где разрегулирована (нарушена) система ретроингибирования.

Механизмы развития резистентности у бактерий.

Плазмиды – носители генов информации (всего около 30 генов). Плазмиды автономно реплицируются (размножаются) независимо от деления клетки. Плазмиды могут содержать гены резистентности (устойчивости) к разным антибиотикам. Плазмиды с генами резистентности легко передаются из клетки в клетку при конъюгации микроорганизмов. При этом двойная нить плазмиды расходится на две отдельные нити и одна остается в клетке донора, а другая передается реципиенту. Особенно часто это явление наблюдается в больницах (внутрибольничная инфекция). Конъюгация м/о может быть не только внутривидовой, но и межвидовой и даже межродовой; возможна «вспышка» - вся микрофлора может стать резистентной к антибиотикам.

Конъюгация - процесс переноса части генетического материала (плазмид, бактериальной хромосомы) при непосредственном контакте двух бактериальных клеток

Схема развития плазмидной резистентности.

Первоисточник генов резистентности находится в почве у почвенных микроорганизмов – продуцентов антибиотиков. Они могут передаваться через промежуточных хозяев патогенным микроорганизмам.

Борьба с резистентностью микроорганизмов.

1. β -лактамы инактивируются β -лактамазами, которые расщепляют их β -лактамное кольцо. Основной путь борьбы с β -лактамазами – создание молекул, которые не захватываются активным центром β -лактамаз.

Создают полусинтетический антибиотик (например, оксациллин или метициллин), которые не чувствительны к пенициллазам.

2. Создание ингибиторов β -лактамаз, созданы комбинированные препараты, содержащие антибиотик и ингибитор β -лактамаз.

Уназин (ампициллин + сульбактам - ингибитор пенициллазы).

Амоксиклав (амоксициллин + клавулановая кислота – ингибитор пенициллазы).

Аугментин (амоксициллин + клавулановая кислота но в другом соотношении).

Резистентность может существовать также за счет генов клетки

У некоторых клеток есть гены, которые делают мембраны непроницаемыми для антибиотиков (сужаются поры или снижается их количество).

Способы борьбы с этой резистентностью:

1. Создан β -лактамный антибиотик Имипинем, который в растворе образует цвиттер-ион, меньший по размерам, чем пенициллин и легко проникает через узкие пориновые каналы (пориновые белки).

2. Могут быть созданы структуры, которые проникают не через пориновые каналы, а другим способом, например, с помощью имитации структуры переносчика. Есть цефалоспорин, имитирующий переносчик железа и, попадая в клетку, он угнетает синтез пептидогликана, ингибируя транспептидазу).

-цефалоспорины III поколения не расщепляются β -лактамазами, но они являются индукторами выработки β -лактамаз,

- цефалоспорины IV поколения (Цефепим) не являются индукторами β -лактамаз.

3. аминогликозидный антибиотик Амикацин имеет фрагмент гаммаоксимасляной кислоты в структуре канамицина защищающий этот антибиотик от инактивации со стороны изоферментов этого антибиотика, поэтому этот антибиотик отличается высоким терапевтическим эффектом.

**БЛАГОДАРЮ
ЗА
ВНИМАНИЕ!**

