

ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ ПРОМЫШЛЕННОГО ПОЛУЧЕНИЯ АНТИБИОТИКОВ

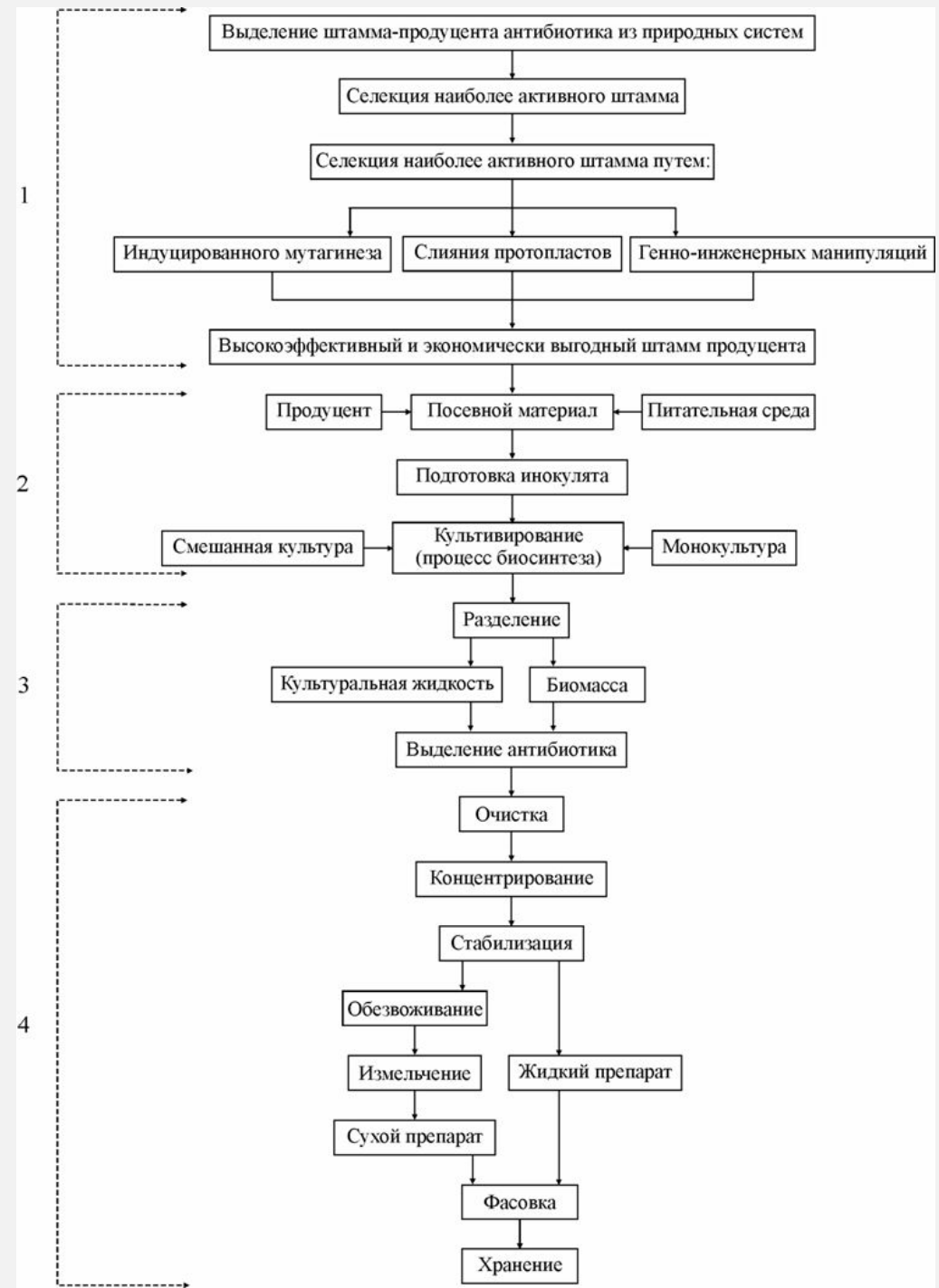


Сделано студенткой I I группы
ОРМК
Ишковой Светы

- Антибиотики – специфические продукты жизнедеятельности микроорганизмов, обладающие высокой физиологической активностью к определенным группам микроорганизмов и злокачественным опухолям, избирательно задерживая их рост или полностью подавляя развитие.
- Специфичность характеризуется: 1. Высокой биологической активностью по отношению к чувствительным микроорганизмам, т.е. даже в очень низких концентрациях проявляют высокий физиологический эффект. Например, пенициллин в концентрации 0,000001 г/мл оказывает выраженное бактерицидное действие. 2. Избирательность действия, например, бензилпенициллин действует только на грамположительные кокки и не оказывает биологического действия на грамотрицательные.



- Процесс получения антибиотика включает в себя четыре основные стадии: получение соответствующего штамма — продуцента антибиотика, пригодного для промышленного производства; биосинтез антибиотика; выделение и очистка антибиотика; концентрирование, стабилизация антибиотика и получение готового продукта.



- Первая задача при поиске продуцентов антибиотиков — выделение их из природных источников. Вместе с тем для этих целей широко применяется метод изменения генома выделенного продуцента антибиотика путем мутагенеза и генной инженерии.
- В основу большинства приемов выделения продуцентов положен принцип выделения чистой культуры микроба и непосредственного испытания его по отношению к используемым тест-организмам.
- Большинство *сапрофитных бактерий* хорошо развивается на богатых по составу натуральных средах (мясопептонный агар, картофельный агар, сусло-агар и др.) при pH около 7,0 и температуре 30–37 °С. В этих же условиях развиваются актиномицеты и некоторые грибы, но для них они менее благоприятны, чем для бактерий.
- Актиномицеты* растут медленнее, чем бактерии; они могут использовать такие источники питания, которые не очень хорошо усваиваются бактериями. Для выделения актиномицетов рекомендуются среды, приведенные в табл. 15.7.112. Значение pH среды после стерилизации устанавливается в пределах 6,8–7,1.
- Мицелиальные грибы* предпочтительнее развиваются на средах с несколько пониженным значением pH (4,5–5,0), на которых плохо растут многие бактерии и актиномицеты. Для выделения мицелиальных грибов можно рекомендовать среды

| Среда 1 | | Среда 2 | |
|---------------------------------------|------------------------|---------------------------------------|------------------------|
| Компоненты | Массовая доля, масс. % | Компоненты | Массовая доля, масс. % |
| Глюкоза | 2 | Глюкоза | 1 |
| Сахароза | 2 | Сахароза | 1 |
| Кукурузный экстракт (СВ) | 0,1 | Перевар Хоттингера | 4 |
| NH ₄ NO ₃ | 0,02 | K ₂ HPO ₄ | 0,05 |
| K ₂ HPO ₄ | 0,1 | MgSO ₄ · 7H ₂ O | 0,05 |
| MgSO ₄ · 7H ₂ O | 0,05 | ZnSO ₄ | 0,001 |
| ZnSO ₄ | 0,01 | FeSO ₄ | 0,001 |
| FeSO ₄ | 0,001 | | |

| Среда 1 | | Среда 2 | | Среда 3 ¹⁾ | |
|---------------------------------|----------------|---------------------------------|----------------|-----------------------|----------------|
| Компоне нты | Количес тво, г | Компоне нты | Количес тво, г | Компоне нты | Количес тво, г |
| SO ₄ | 1 | KNO ₃ | 1 | NaCl | 5 |
| K ₂ HPO ₄ | 1 | K ₂ HPO ₄ | 3 | CaCl ₂ | 0,5 |
| NaCl | 1 | NaCl | 0,2 | Пептон | 5 |
| MgSO ₄ | 1 | MgCO ₃ | 0,3 | Кукурузн ый экстракт | 5 мл |
| Крахмал | 10 | FeSO ₄ | 0,001 | Глюкоза | 10 |
| Агар-агар | 15 | CaCO ₃ | 0,5 | Агар-агар | 15 |
| Вода ²⁾ | 1000 | Крахмал | 10 | Вода ²⁾ | 1000 |
| | | Агар-агар | 15 | | |
| | | Вода ²⁾ | 1000 | | |

| Источник углерода | Антибиотик, мкг/мл | Биомасса, мг/100 мл |
|-------------------------|--------------------|---------------------|
| Глюкоза | 300 | 220 |
| Галактоза | 250 | 300 |
| Мальтоза | 250 | 250 |
| Сахароза | 0 | 140 |
| Лактоза | 0 | 160 |
| Крахмал | 250 | 160 |
| Глицерин | 1000 | 460 |
| Маннит | 0 | 100 |
| Этанол | 0 | 12 |
| Янтарная кислота | 350 | 180 |
| Пировиноградная кислота | 0 | 95 |
| Уксусная кислота | 25 | 80 |
| Молочная кислота | 250 | 160 |

- К числу наиболее существенных факторов, оказывающих влияние на проявление антибиотических свойств микроорганизмов, относятся состав среды, ее активная кислотность, окислительно-восстановительные условия, температура культивирования, методы совместного выращивания двух или большего числа микроорганизмов и другие факторы.
- **Среды для культивирования микроорганизмов.** Натуральные (комплексные) среды, состоящие из природных соединений и имеющие неопределенный химический состав (части зеленых растений, животные ткани, солод, дрожжи, фрукты, овощи, навоз, почва и т. д.), содержат все компоненты, необходимые для роста и развития микроорганизмов большинства видов. Используются следующие среды:
 - мясопептонная среда, в состав которой одновременно с мясным экстрактом и пептоном входят хлорид натрия, фосфат калия, иногда глюкоза или сахароза; используется обычно в лабораторной практике;
 - картофельные среды с глюкозой и пептоном, часто используемые в лаборатории для культивирования многих видов актиномицетов и бактерий;
 - среды с кукурузным экстрактом, соевой мукой, бардой и другими веществами, в состав которых входят сульфат аммония, карбонат кальция, фосфаты, глюкоза, сахароза, лактоза или иные углеводы и ряд других соединений; среды успешно применяются в промышленности, т. к. являются дешевыми и обеспечивают хорошее развитие микроорганизмов с высоким выходом антибиотиков.
- Поскольку натуральные среды не позволяют получать строгие количественные данные для изучения физиологических и биохимических особенностей организма, применяют синтетические среды, которые подбирают для отдельных продуцентов индивидуально. Синтетические среды могут быть как относительно простыми, так и сложными, для составления которых используют методы математического планирования эксперимента.
- *Источниками углерода* могут быть органические кислоты, спирты, углеводы, сочетания различных углеродсодержащих соединений

- При промышленном получении ряда антибиотиков в качестве источников углерода нередко применяют картофельный крахмал, кукурузную муку или другие растительные материалы. Однако не все продуценты обладают достаточно активными амилазами, способными осуществлять гидролиз крахмалсодержащего сырья. Предварительное осахаривание крахмалсодержащих материалов с помощью ферментов значительно облегчает использование микроорганизмами этих материалов.
- *Источники азота* оказывают большое влияние на образование микроорганизмами антибиотических веществ. Обычно в средах для культивирования микроорганизмов источником азота служат соли азотной (реже азотистой) кислоты, аммонийные соли органических и неорганических кислот, аминокислоты, белки и продукты их гидролиза. Многие микроорганизмы успешно используют и окисленные формы азота, некоторые из них нуждаются именно в нитратном источнике азота (*Streptomyces auranticus*, *S. subtropicus* и некоторые другие). Ряд актиномицетов иногда усваивают лучше нитраты, чем аммонийные соли; они могут использовать даже нитриты, если их вносят в среду в небольших количествах (не более 50 мг NaNO_2 / 1 л среды). При этом усвоение нитритов тесно связано с источником углерода; например в присутствии глицерина нитриты потребляются гораздо лучше, чем в присутствии глюкозы. Использование аммония и некоторых органических источников азота плесневыми грибами улучшается в присутствии небольших количеств (0,1–0,2 %) некоторых дикарбоновых (янтарной и фумаровой) кислот. В ряде случаев для накопления антибиотика необходимо присутствие и аммонийного, и нитратного источника азота (биосинтез пенициллина).
- Обычно наиболее благоприятным для микроорганизмов является соотношение $\text{C} : \text{N} = 20$. Однако для образования антибиотика такое соотношение не всегда оптимально. Поэтому для каждого продуцента необходимо подбирать соответствующее соотношение углерода и азота.

- Источниками минерального питания служат фосфор, сера и другие макро- и микроэлементы.
- Большинство микроорганизмов легко используют в качестве источников фосфора ортофосфаты. Отдельные виды наряду с этим потребляют и фитаты (соли инозитфосфорных кислот).
- Продуценты антибиотиков по отношению к концентрации фосфора в среде можно разделить на три группы:
 - высокочувствительные продуценты, для которых оптимальная концентрация фосфора в среде составляет менее 0,01 % (продуценты нистатина, тетрациклинов, флоримицина, ванкомицина);
 - продуценты средней чувствительности, для которых оптимальная концентрация фосфора составляет 0,010–0,015 % (продуценты стрептомицина, эритромицина, циклосерина, неомицина);
 - малочувствительные продуценты, для которых оптимальная концентрация фосфора составляет 0,018–0,020 % (продуценты новобиоцина, грамицидина, олеандомицина).
- Сера входит в состав некоторых антибиотиков, образуемых грибами (пенициллин, цефалоспорин, глиотоксин и др.), бактериями (бацитрацины, субтилины, низины) и актиномицетами (эхиномицины, группа тиострептона). Обычно источником серы в среде служат сульфаты. Однако при биосинтезе пенициллина лучшим источником серы для продуцента служит тиосульфат натрия.
- Кроме того, для биосинтеза антибиотиков необходимы и отдельные микроэлементы. Так, продуцент альбомуцина *S. subtropicus* образует антибиотик при значительной концентрации железа в среде. Железо необходимо для образования хлорамфеникола и других антибиотиков.
- Биосинтезу ряда антибиотических веществ (хлорамфеникола, стрептомицина, пенициллина и др.) способствуют ионы цинка.
- Стимулирующее влияние на биосинтез гентамицина, курамицина А, фософономицина оказывают ионы кобальта.
- Ионы галогенов входят в состав некоторых тетрациклиновых антибиотиков и хлорамфеникола.

- **Влияние pH среды.** Многие бактериальные организмы, синтезирующие антибиотики, лучше развиваются при pH около 7,0, хотя некоторые, например молочнокислые стрептококки, продуцирующие низин, лучше развиваются в среде при pH = 5,5÷6,0.
- Большинство актиномицетов хорошо развиваются при начальных значениях pH среды в пределах от 6,7 до 7,8; в большинстве случаев жизнеспособность актиномицетов при pH ниже 4,0–4,5 подавлена.
- **Температура.** Для большинства бактериальных организмов температурный оптимум развития лежит в диапазоне 30–37 °С. Для продуцента грамицидина С (*B. brevis*) оптимальная температура для развития и биосинтеза равна 40 °С.
- Актиномицеты, как правило, культивируются при температуре 26–30 °С, хотя некоторые виды стрептомицетов могут развиваться как при пониженных (от 0 до 18 °С), так и при повышенных (55–60 °С) температурах.
- Для большинства мицелиальных грибов оптимальная температура составляет 25–28 °С.
- **Аэрация.** Большинство изученных продуцентов антибиотиков являются аэробами. Для биосинтеза многих антибиотиков (пенициллин, стрептомицин и др.) максимальное их накопление происходит при степени аэрации, равной единице, при которой через определенный объем среды за 1 мин продувается такой же объем воздуха.
- В процессе развития продуцента антибиотика в промышленных условиях потребность организма в кислороде меняется в зависимости от стадии развития, вязкости КЖ и других факторов. На определенных стадиях могут возникнуть ситуации, связанные с кислородным голоданием продуцента. В этих условиях следует принимать дополнительные меры, например, повышение концентрации окислителя добавлением пероксида водорода.

- В условиях глубинной культуры процесс развития организма и синтеза антибиотика проходит в две фазы.
- В первой фазе развития культуры или, как ее иногда называют, тропофазе (фаза сбалансированного роста микроорганизма), наблюдается интенсивное накопление биомассы продуцента, связанное с быстрым потреблением основных компонентов среды и с высоким уровнем поглощения кислорода.
- Во второй фазе развития, именуемой идиофазой (фаза несбалансированного роста микроорганизма), накопление биомассы замедлено или даже уменьшено. В этот период продукты метаболизма микроорганизма лишь частично используются на построение клеточного материала, они в основном направляются на биосинтез антибиотика. Обычно максимум продукции антибиотика в среде наступает после максимума накопления биомассы.
- Интенсифицировать антибиотикообразование можно путем совместного культивирования продуцента антибиотика с другими специально подобранными видами микроорганизмов.
- В частности, штаммы продуцента трихотецина (*Trichothecium roseum*) наибольшую биологическую активность проявляют при совместном развитии с микроскопическими грибами рода *Penicillium*; выход антибиотика повышается в этом случае в несколько раз.
- Увеличение образования бацитрацина происходит в том случае, если продуцент антибиотика *B. subtilis* культивируется совместно с *Pseudomonas sp.*
- Повышение биосинтеза леворина культурой *S. levoris* наблюдается при совместном культивировании актиномицета с дрожжеподобным грибом *Candida tropicalis*.
- При совместном культивировании двух мутантных штаммов *Streptomyces poursei*, потерявших способность к биосинтезу нистатина, антибиотик образуется в том же количестве, что и при развитии исходного активного штамма.
- **Методы культивирования продуцентов антибиотиков.** Наиболее перспективным методом выращивания микроорганизмов — продуцентов антибиотиков признан метод глубинного культивирования с использованием периодических процессов.

| Штамм актиномицета | Образование нистатина | |
|--|----------------------------------|-------------------|
| | В культуральной жидкости, ед./мл | В мицелии, ед./мг |
| Штамм № 149 | 0 | 0 |
| Штамм № 368 | 0 | 0 |
| Штамм № 149 + штамм № 368 | 310 | 100 |
| Исходный штамм актиномицета (контроль) | 350 | 80 |