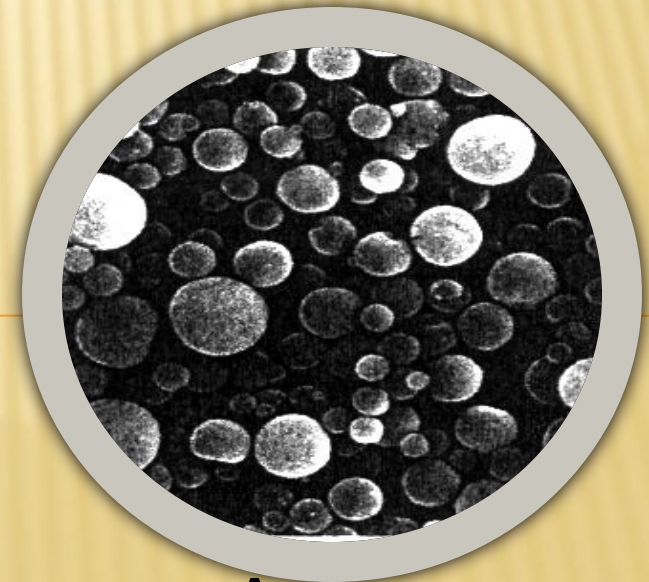


Основы технологии производства антибиотиков, пробиотиков, ферментов и витаминов



СОДЕРЖАНИЕ

- **1. Производство антибиотиков** (классификация, механизм действия, технология приготовления).
- **2. Технология производства пробиотиков** (лактобактерина, бифидумбактерина, пробиотиков на основе бактерий рода *Bacillus*).
- **3. Технология приготовления ферментных препаратов** (культивирование продуцентов, выделение, концентрирование и консервирование ферментов, применение ферментных препаратов в ветеринарии).
- **4. Технология производства витаминов** - кормового концентрата витамина В₂ (рибофлавин), витамина В₁₂ (цианкобаламин), витамина Д₂ (эргокальциферол).

ЛИТЕРАТУРА

- 1. Коновалов С.А. Биосинтез ферментов микроорганизмами.- М.: Высшая школа, 1982.
- 2. Молохова Е.И. Пробиотики – на Российском рынке //Фармация, 2000.- № 3.
- 3. Пассет Б.В., Воробьева В.Я. Технология химико-фармацевтических препаратов и антибиотиков. М.: Медицина. - 1977.
- 4. Самуйленко А.Я., Рубан Е.А. Основы технологии производства ветеринарных биологических препаратов.- М.: Изд. Академии наук РФ.- Т. 1, 2.- 2000.
- 5. Талонов К.П. Процессы и аппараты микробиоло-гических производств. М.: Легкая и пищевая промыш-ленность, 1981.
- 6. Тихонов И.В., Рубан Е.А., Грязнева Т.Н., Самуйленко А.Я., Гаврилов В.А. Биотехнология: учебник /под ред. Воронина Е. С.- Санкт-Петербург: Гиорд.- 2005.- 792 с.

Антибиотики

- химикотерапевтические препараты природного происхождения или их синтетические аналоги обладающие способностью избирательно убивать или подавлять рост и развитие микроорганизмов. Они являются наиболее эффективными препаратами для лечения заболеваний, вызываемых бактериями.

ПРИЧИНЫ ПОИСКА НОВЫХ АНТИБИОТИКОВ

- Многие антибиотики - незаменимые лечебные препараты при особо опасных инфекционных болезнях.
- Антибиотики - необходимые вещества для сельского хозяйства (лечебные препараты и стимуляторы роста животных).
- Быстрое приобретение микроорганизмами антибиотикоустойчивости ставит задачу замены одних антибиотиков другими.
- Широкое применение антибиотиков в пищевой промышленности в качестве консервантов скоропортящихся продуктов (свежей рыбы, мяса, сыра, овощей).

- Новые антибиотики представляют огромный интерес для специалистов в области химии природных соединений.
- Антибиотики нашли широкое применение в научных исследованиях в качестве веществ, используемых при изучении метаболизма организмов, расшифровки молекулярных механизмов биосинтеза белка, функционирования мембран, как специфические ингибиторы определенных реакций.
- Изучение путей образования антибиотиков способствует глубокому проникновению в механизмы синтетической деятельности этих продуцентов.

Классификация антибиотиков по различным показателям:

1. По спектру действия:

- **Антибактериальные**, губительно действующие на грамположительные (бензилпенициллин, ристомицин, новобиоцин), грамотрицательные (полимиксин) бактерии, а также антибиотики широкого спектра действия (левомицетин, канамицин, мономицин, гентамицин);
- **Противогрибковые** (нистатин, леворин, гризеофульвин);
- **Противоопухолевые**, включающие в себя 6 групп: актиномины, антракциклины, оливомицины, брунеомицины, блеомицины, а также такие **интерфероны**, как стоталон и эленин.

2. По химической структуре:

- Ациклические (нистатин, канцидин);
- Гетероциклические (гризеофульвин);
- Макроциклические (макролидазы, эритромицины);
- Ароматические (гигромицин);
- Аминогликозидные;
- Полипептазы (грамицидин, олимиксин);
- Пенициллины;
- Актиномицины;
- Стрептомицины.

3. По молекулярному механизму действия:

- Антибиотики, действующие на синтез бактериальной клеточной оболочки
(пенициллины, ристомицин);
- Антибиотики, нарушающие: синтез белков
(тетрациклины, макролиды, левомицетин);
- синтез белков и порядок генетического кода
(аминогликозиды);
- синтез нуклеиновых кислот
(противоопухолевые);
- целостность цитоплазматической мембраны
(противогрибковые).

Ингибиторы синтеза клеточной стенки

Пенициллины
Монобактамы
Цефалоспорины
Карбапенемы
Гликопептиды
Бацитрацин
Циклосерин

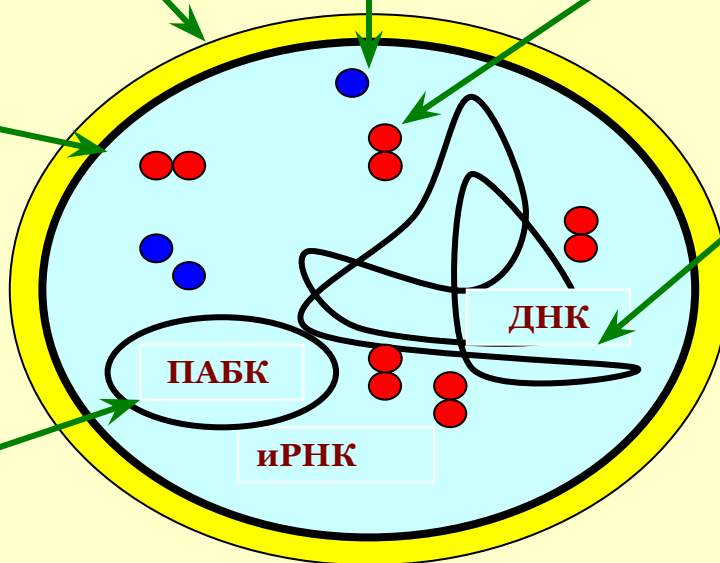
ИНГИБИТОРЫ СИНТЕЗА БЕЛКА

Ингибиторы 30S-субъединиц рибосом
Тетрациклины
Аминогликозиды

Ингибиторы 50S-субъединиц рибосом
Макролиды
Хлорамфеникол
Линкомицин

Ингибиторы функций цитоплазматической мембраны
Полимиксины

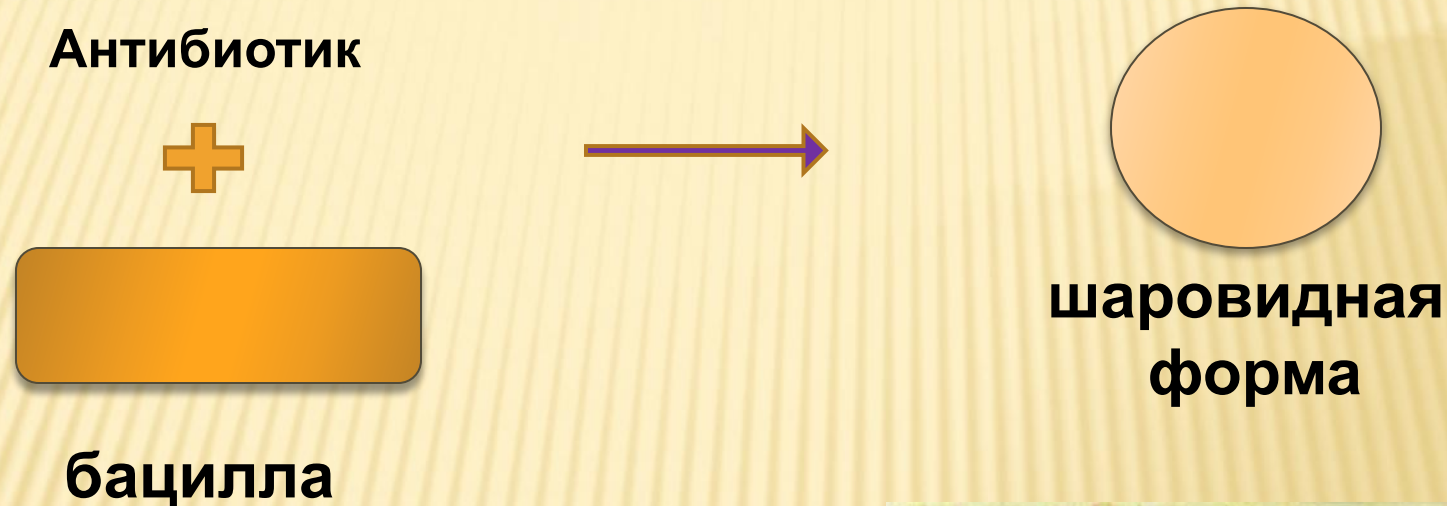
Антиметаболиты (метаболизм фолиевой кислоты)
Сульфонамиды
Триметоприм



Ингибиторы синтеза нуклеиновых кислот
Рифампицин (ингибитор ДНК-зависимой РНК-полимеразы; нарушение транскрипции)
Хинолоны (ингибитор ДНК-гиразы; нарушение репликации ДНК)

Механизм действия антибиотиков на бактерии

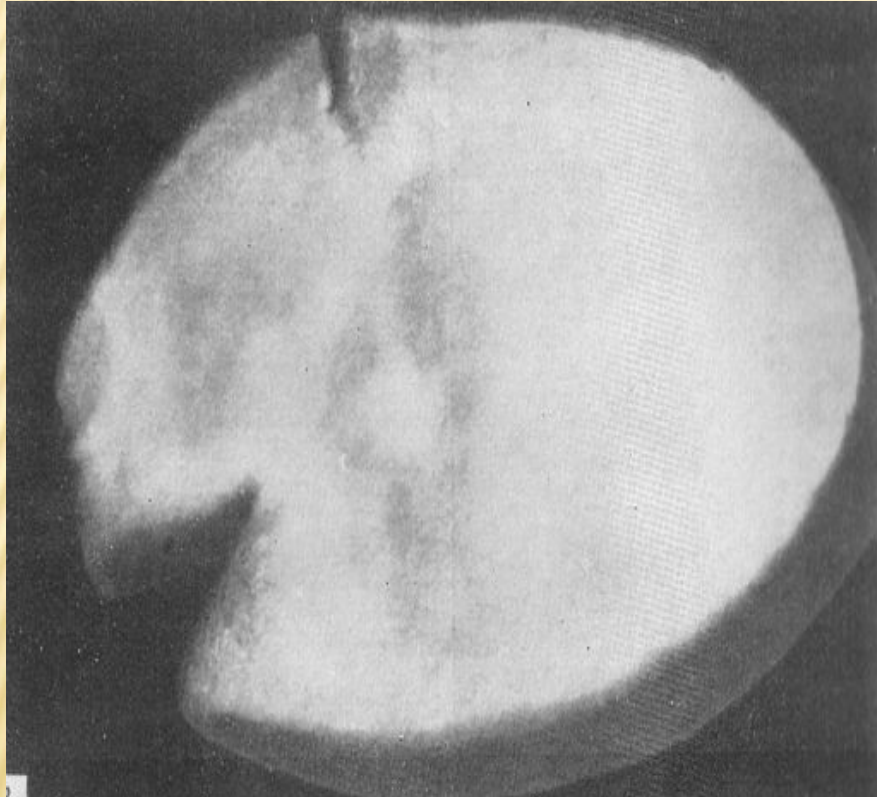
Воздействие антибиотика на бактерии, приводит к образованию L – формы бактерий.



«Феномен жемчужного ожерелья» у возбудителя сибирской язвы при выращивании его на питательной среде с пенициллином



Воздействие антибиотиков на микроорганизмы



Воздействие пенициллина на стрептококк



Воздействие пенициллина на кишечную палочку

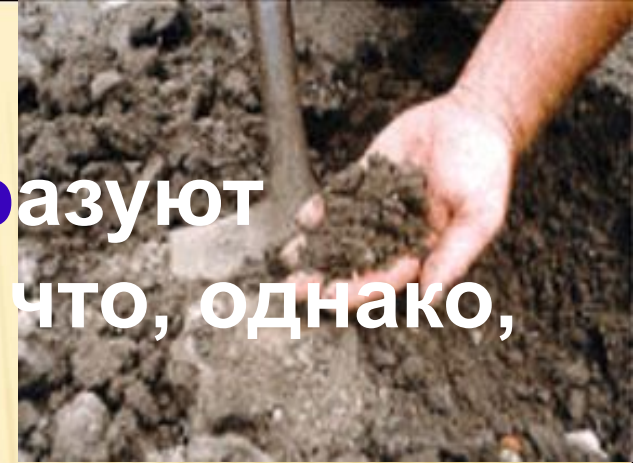
Основные этапы поисков антибиотиков:

- выделение бактерий-антагонистов из почвы;
- определение антагонистического спектра и активности антибиотиков;
- подбор условий культивирования продуцентов антибиотиков;
- выделение и химическая очистка антибиотиков;
- изучение физико-химических и фармакологических свойств антибиотиков;
- испытание химико-терапевтической эффективности:

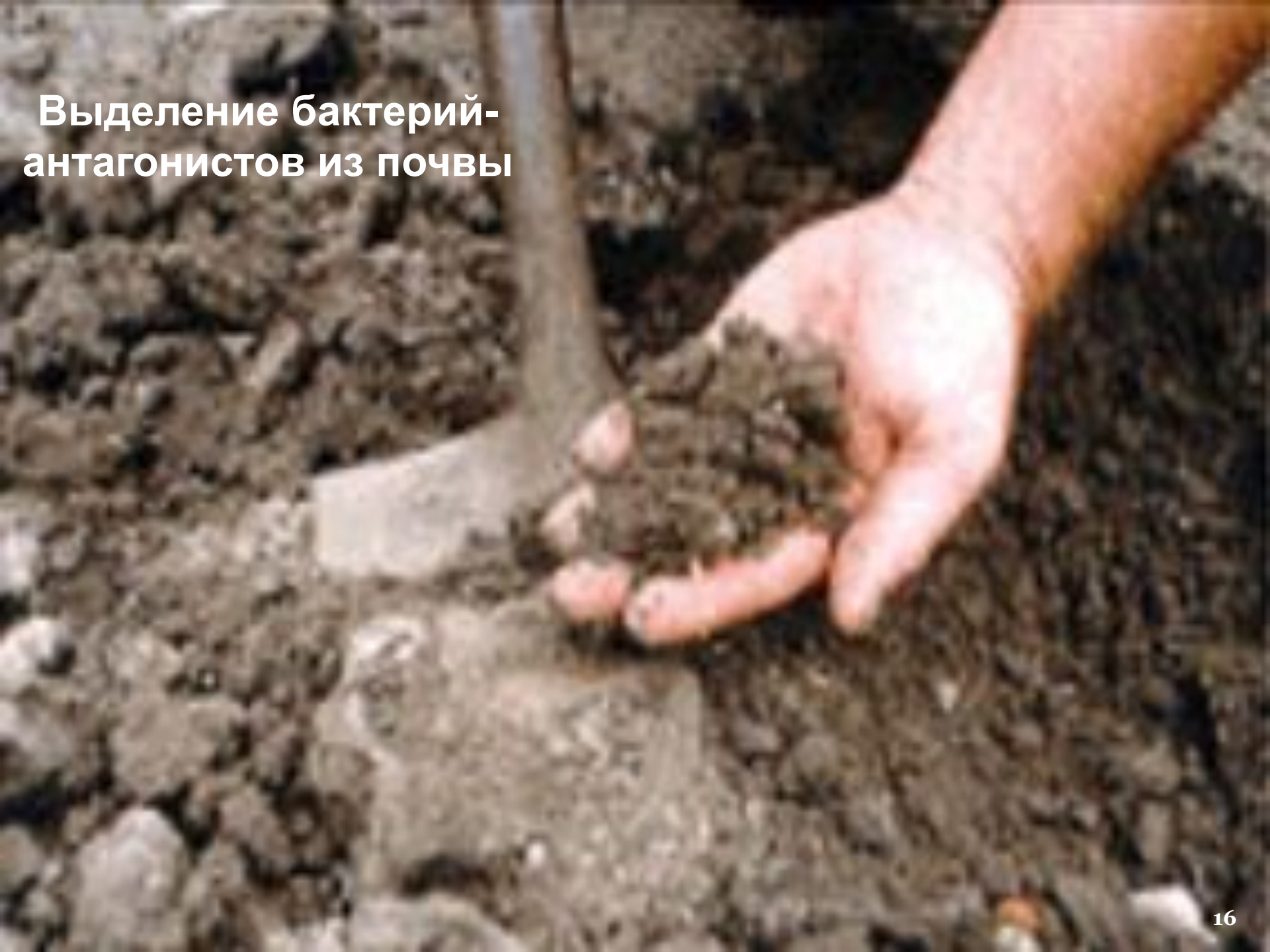
БИОСИНТЕЗ АНТИБИОТИКОВ

Наследственная особенность организмов, проявляющаяся в том, что каждый вид (штамм) способен образовывать один или несколько вполне определенных, строго специфичных для него антибиотических веществ.

1. Не все микроорганизмы образуют антибиотические вещества, что, однако, не мешает их широкому распространению в природе.
2. Антибиотические вещества, даже самые устойчивые, довольно быстро инактивируются в почве, в своем естественном местообитании большинства микроорганизмов. Только при максимальном насыщении почвы антибиотиками можно получить соответствующий биологический эффект.

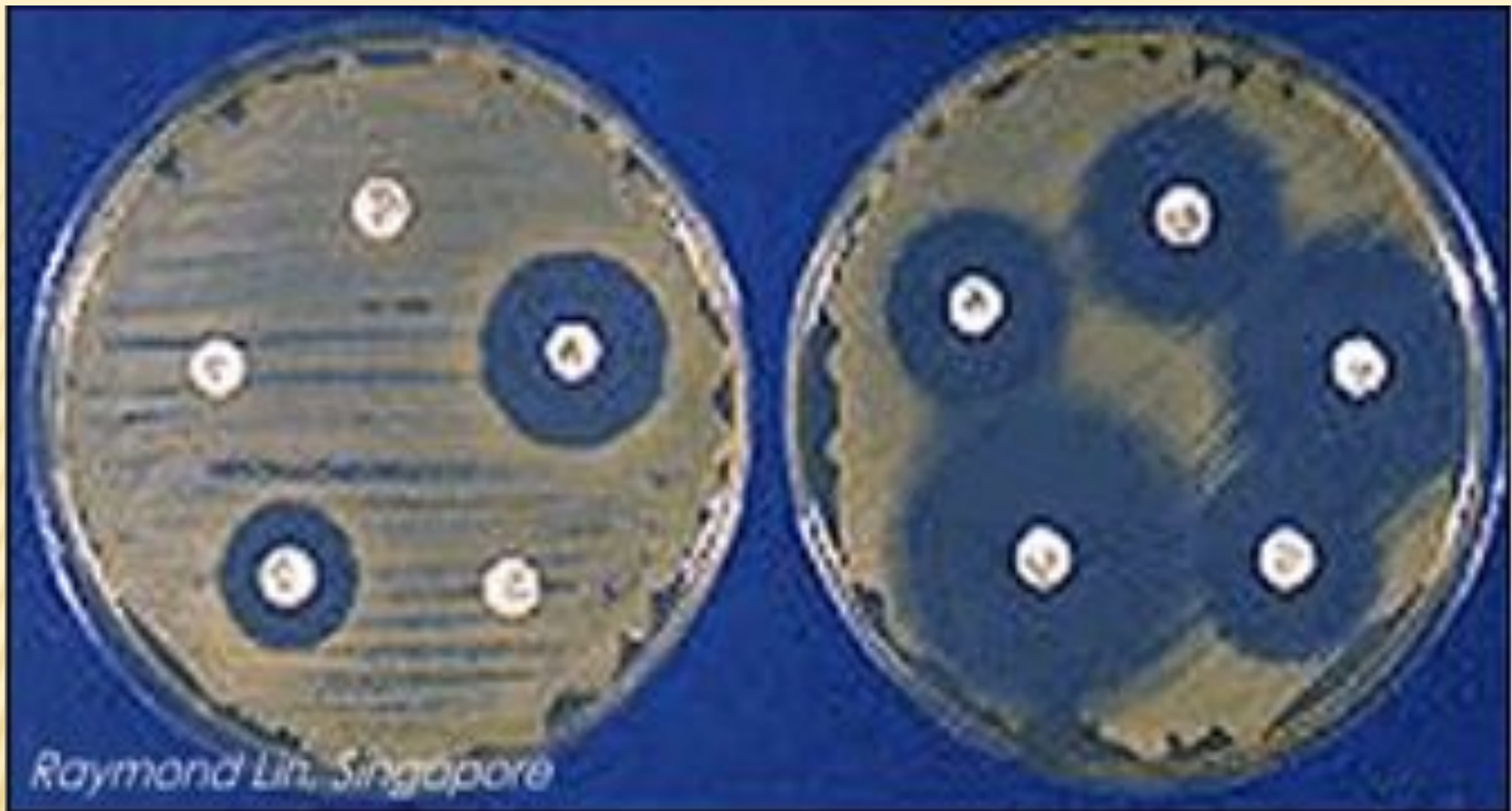


Выделение бактерий-антагонистов из почвы





**Цех глубинного
культивирования
продуцентов антибиотиков
в биореакторах марки
БИОР**



Кружки из фильтрованной бумаги, пропитанной определёнными дозами антибиотиков. Круговые зоны подавления роста тест-бактерий и их диаметр характеризуют степень антибиотико-чувствительности выделенной культуры

Биологическая активность антибиотика – это его способность убивать или тормозить рост и развитие микроорганизмов (цидное или статическое действие).

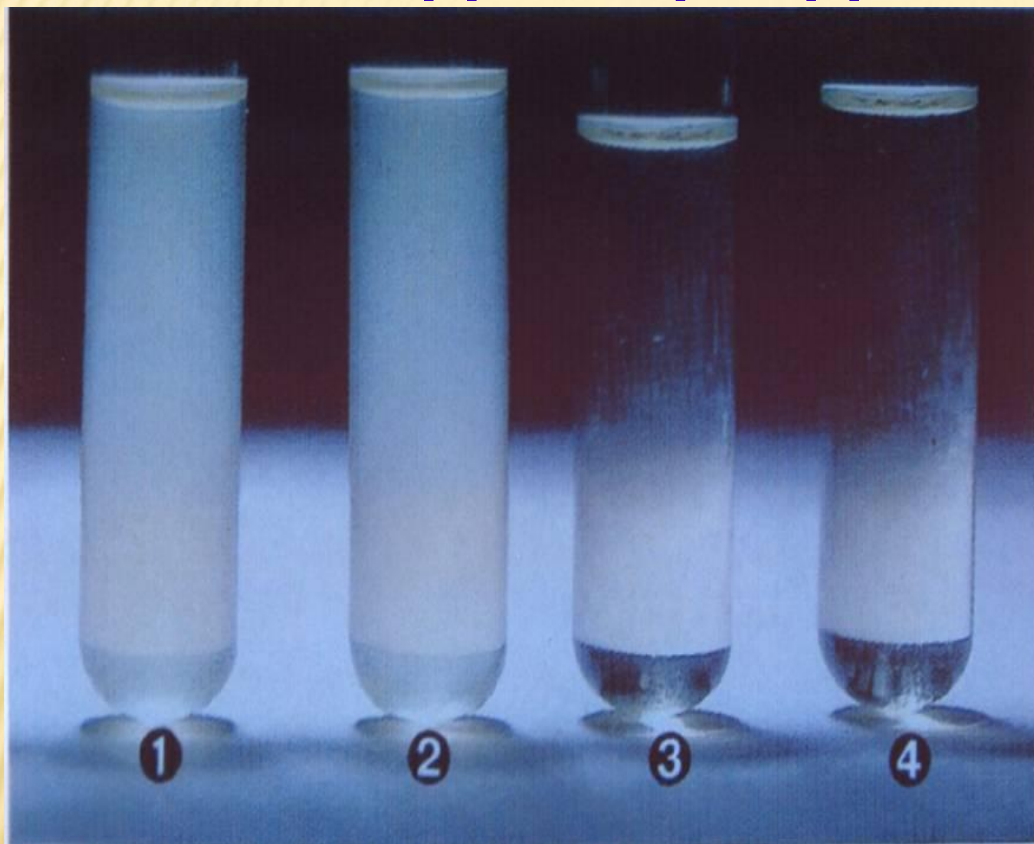
Единица действия (ЕД) антибиотика – это активность определенного весового количества антибиотика, принятого за эталон.

Методы определения активности антибиотиков

**Микробиологические
(метод серийных
разведений в жидких
или плотных
питательных средах;
метод диффузии в
агаре)**

**Химические и
физико-химические
(колориметрический,
хроматографический,
спектрофотометрическ
ий)**

Определение активности антибиотика в единицах действия (ЕД)



ЕД пенициллина - это его минимальная доза, подавляющая рост тест-штамма золотистого стафилококка в 50 мл питательного бульона. Если чистый кристаллический пенициллин задерживает рост золотистого стафилококка в разведении $1 : 83000000$, то в 1 г антибиотика содержится 1666000 ЕД ($83000000 : 50 = 1666000$) или 1666 ЕД в 1 мг.

**Продуцент
гентамицина
*Micromonospora
purpurea***

Приготовление посевного материала на
агаризированной питательной среде

Выращивание вегетативного посевного материала в колбах

Выращивание посевного мицелия в биореакторах

Биосинтез гентамицина (культивирование)

Предварительная обработка и ультрафильтрация
культуральной жидкости гентамицина

Сорбция гентамицина на катионите КБ-2
в аммонийной форме и десорбция

Получение концентрата гентамицина

Получение осветленного концентрата
гентамицина и перевод его в сульфатную форму

Распылительная сушка водных растворов гентамицина

Фасовка, упаковка и маркировка

Контроль

**Схема
получения
гентамицина
сульфата**

Пробиотики – это

биопрепараты, которые содержат живые, антагонистически активные в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов «полезные» бактерии (лактобациллы, бифидобактерии и др.), применяемые для профилактики и лечения инфекционных (в основном, желудочно-кишечных) болезней человека и животных.



Основные характеристики пробиотических препаратов

1. Выживать при пассивации через желудочный тракт;
2. Адгезироваться на эпителиальных клетках кишечника;
3. Стабилизировать кишечную микрофлору;
4. Не иметь признаков патогенности;
5. Сохранять жизнеспособность;
6. Быстро размножаться, колонизируя кишечный тракт;
7. Существовать в организме с проявлением родовых свойств пробиотиков.

Возможные механизмы действия пробиотиков

1. Подавление живых патогенных и условно-патогенных микроорганизмов

- а) продукция антибактериальных веществ - бактериоцинов;
- б) конкуренция за источники питания;
- в) конкуренция за рецепторы адгезии.

2. Влияние на микробный антагонизм

- а) уменьшение ферментативной активности;
- б) увеличение ферментативной активности.

3. Стимуляция иммунитета

- а) увеличение уровня антител;
- б) увеличение активности макрофагов.

Пробиотики на основе лакто- и бифидобактерий

Используемые лакто- и Бифидобактерии	Препараты
<p><i>B.bifidum</i>, <i>B.infantis</i>, <i>B.longum</i>, <i>B.breve</i>, <i>B.adolescentis</i>, <i>B.lactis</i>, <i>B.animals</i></p>	<p>бифидумбактерин сухой, бифидумбактерин форте, бифилиз, бифилин</p>
<p><i>L.acidophilus</i>, <i>L.plantarum</i>, <i>L.casei</i> spp. <i>rhamnosus</i>, <i>L.brevis</i>, <i>L.delbrueckii</i> spp. <i>bulgaricus</i>, <i>L.helveticus</i>, <i>L.femientum</i>, <i>L.lactis</i></p>	<p>Лактобактерин, ацилакт, аципол, витафлор, колибактерин сухой</p>

Пробиотики на основе спорообразующих бактерий

Используемы спорообразующие бактерии

Препараты

Bacillus subtilis, шт. 3Н

Бактиспорин

Bacillus subtilis шт. ВКПМ-В2335

и B. licheniformis, шт. ВКПМ В2336

Биоспорин

Bacillus subtilis, шт. ВКПМ-7092

Ветом 1.1

B. subtilis, шт. ВКПМ-7092

Ветом 1.29

B. subtilis, шт. ВКПМ В 7048 и

B. licheniformis, шт. ВКПМ В 7038

Ветом 2

B. subtilis, шт. ВКПМ В 7048

Ветом 3

B. licheniformis, шт. ВКПМ В 7038

Ветом 4

B. subtilis, шт. ВКПМ-7092

Ветоцил

B. subtilis, шт. ВКПМ-7092

Коредон

Bacillus subtilis 11В ВКМ В-2218Д

Витаспорин

B. licheniformis, ВКПМ В-7038

Биосептин

B. subtilis

Биокорм Пионер



БАКТИСТАТИН

пробиотический комплекс нового поколения

ФУГАТ
B. subtilis
пробиотическая
составляющая

ЦЕОЛИТ
природный
минерал
алюмосиликат

ГИДРОЛИЗАТ
СОЕВОЙ
МУКИ
пребиотическая
составляющая

АЭРОСИЛ
технологическая
составляющая



нормализация кишечного биоценоза



1. Препараты из монокультуры живых микроорганизмов (бактисубтил, бифинорм, лактобактерин, бифидобактерин).
2. Препараты, содержащие комплекс живых микроорганизмов (бификол, иммунобак, бифилак, Биод-5).
3. Препараты из монокультур или комплекса микроорганизмов, включая субстанции, стимулирующие их приживание, рост и размножение (лактобифидол, стрептофид, бактистатин, КД-5).
4. Препараты из генетически модифицированных штаммов микроорганизмов (ветом -1.1, субалин).
5. Препараты, содержащие помимо микроорганизмов или средств, стимулирующих их рост и размножение, другие соединения, влияющие на функции клеток органов и тканей животного (целлобактерин).

Микроорганизмы, используемые при производстве молочнокислых продуктов

Молочнокислые стрептококки

```
graph TD; A[Молочнокислые стрептококки] --> B[S. cremoris (сливочный стрептококк). Развивается при 30 град. С. Предельная кислотность сквашивания 100-120 Т. Придаёт сгустку сметанообразную консистенцию, образует молочную кислоту, летучие кислоты.]; A --> C[S. thermophilus. Развивается при 40-45 град. С. Участвует в образовании молочной кислоты];
```

S. cremoris (сливочный стрептококк). Развивается при 30 град. С. Предельная кислотность сквашивания 100-120 Т. Придаёт сгустку сметанообразную консистенцию, образует молочную кислоту, летучие кислоты.

S. thermophilus. Развивается при 40-45 град. С. Участвует в образовании молочной кислоты

Ароматизирующие стрептококки



S. citrovorus, S. paracitrovomus, S. lactis subsp. acetoinicus, S. Diacetilactis, S. lactis subsp. diacetilactis

Развиваются при 25-30 град. С. Предельная кислотность сбраживания 80-120Т. Образуют молочную кислоту, углекислый газ, спирты, ароматические вещества (эфирьы, диацетил), придающие продукту специфический запах и определённую консистенцию. Участвуют в биосинтезе витаминов, аминокислот, углеродсодержащих полимеров.

Молочнокислые палочки



**Lactobacillus bulgaricus (болгарская палочка),
Lactobacillus acidophilus (ацидофильная палочка)**

Развиваются при 40-45 град. С. Предельная кислотность 200-300 Т. Сбраживают глюкозу, галактозу, лактозу. Слизистые расы образуют глюкопротеины – муцины, придающие продукту слизистую консистенцию и низкую кислотность; неслизистые расы – высокую кислотность.

Чистые культуры дрожжей



Saccharomyces kefir

Участвуют в спиртовом брожении, придают продукту острый вкус, пенистую консистенцию, своеобразный аромат.

Производство пробиотиков



Питательные среды для молочнокислых бактерий

1. Стерильное обезжиренное молоко.
2. Гидролизованное молоко.



Схема производства бифидумбактерина

Приготовление питательной среды (среда Блаурокка, гидролизатно-молочная или гидролизатно-дрожжевая)

Выращивание посевного материала I и II генерации

Культивирование в биореакторах

Сублимационное высушивание

Маркировка, упаковка

Контроль готового препарата

Лактобактерии в сквашенном молоке

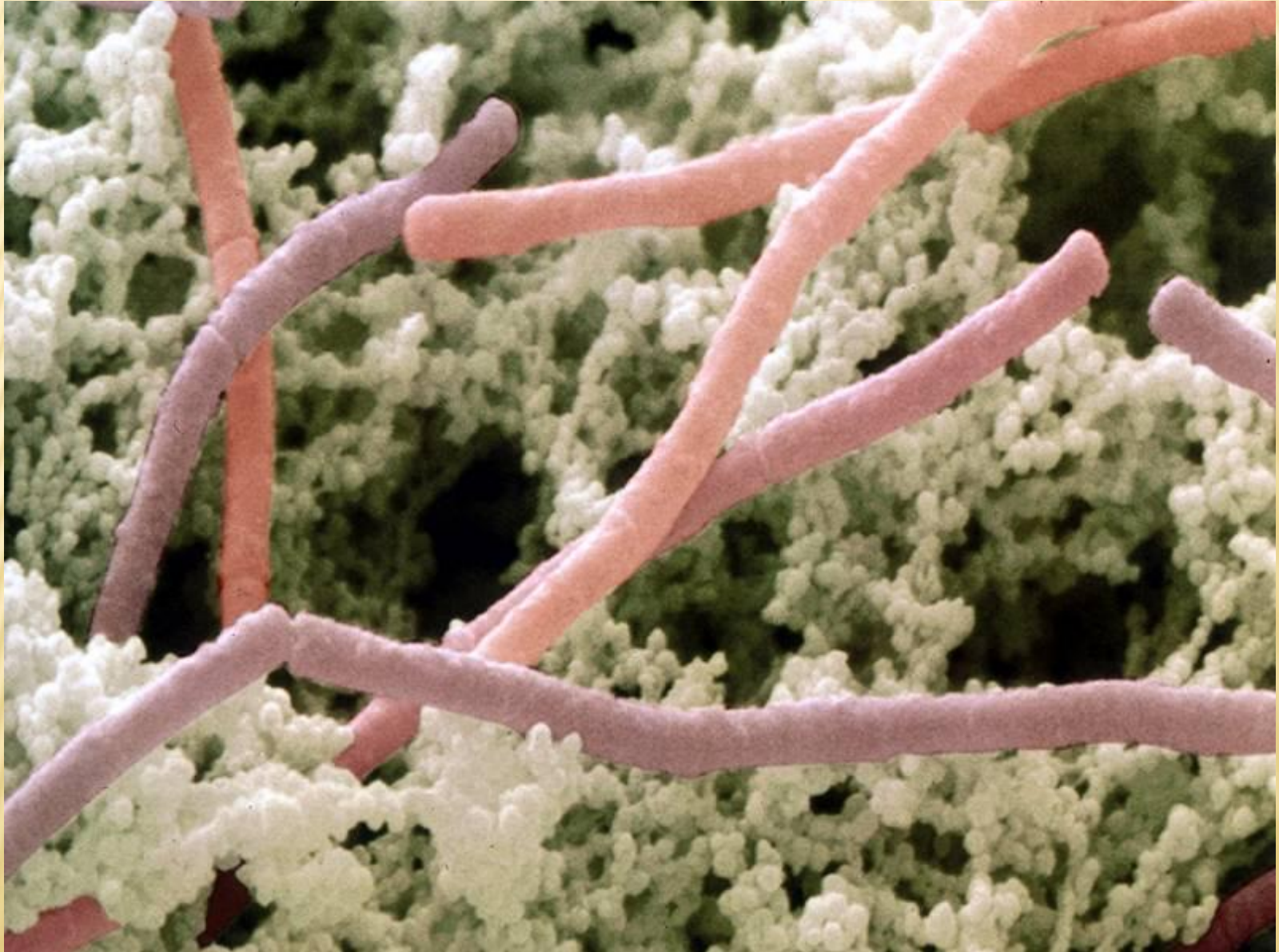


СХЕМА ПРОИЗВОДСТВА ЛАКТОБАКТЕРИНА

Приготовление
питательной среды

Подготовка посевного
материала

Культивирование микроорганизмов (2 суток)

Выделение и концентрирование лактобактерий

Лиофильное высушивание

Придание готовой лекарственной формы

Фасовка, упаковка, этикетирование

Контроль готовой продукции

Биод-5 – пробиотик нового поколения, разработанный на основе ассоциации двух штаммов аэробных непатогенных спорообразующих бактерий *B.subtilis* ТПИ 13 и *B.licheniformis* ТПИ 11.





Ф е р м е н т ы – это органические вещества белковой природы, которые синтезируются в клетках и во много раз ускоряют протекающие в них реакции, не подвергаясь при этом химическим превращениям.

Ферменты (от латинского **fermentum** - брожение, закваска) иногда называют **энзимами** (от греческого **en** - внутри, **zyme** - закваска).

Все источники ферментов делят на 3 основные группы:

- 1. Ткани животных** как отход мясоперерабатывающей промышленности. Прежде всего, это богатые ферментами поджелудочная железа и слизистая оболочка желудка.
- 2. Некоторые растения.** Например, такие ферменты, как папаин и фицин, извлекают соответственно из сока дынного и инжирного дерева. Из ячменя можно получить амилазу.
- 3. Микроорганизмы.** *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*, бактерии рода *Bacillus*, дрожжи рода *Saccharomyces*

Три вида посевного материала микроорганизмов - продуцентов ферментов

1. В виде культуры гриба
2. В виде мицелия
3. В виде спор

Субстраты, используемые при культивировании продуцентов ферментов (на твердых питательных средах)

1. Пшеничные отруби (20-25% крахмала, 12% белков, 10-15% клетчатка, 13% влаги)
2. Свекловичный жом (20-30% клетчатки)
3. Солодовые ростки – корешки проросшего ячменя (витамины и аминокислоты)
4. Древесные опилки – разрыхлитель
5. Шелуха сельскохозяйственных культур (рис, гречиха, подсолнух)

Схема получения посевного материала в виде культуры гриба

Получение маточной культуры в пробирках на
косяках

Выращивание посевного материала в колбах
малого размера на отрубях

Выращивание культуры гриба на отрубях в
посевных кюветах

Выращивание культуры гриба на отрубях в
производственных кюветах

Схема получения посевного материала в виде мицелия

Получение маточной культуры в пробирках на
косяках



Выращивание культуры в колбах на 250 мл на
тонком слое отрубей



Выращивание культуры в колбах на 4 – 8 л
качалке с жидкой питательной средой

Получение посевного материала в виде спор

- Выращивание посевного материала (мицелий со спорами)
- Измельчение
- Отделение под действием потока воздуха



Технология переработки культуральной жидкости при производстве ферментов

Применение ферментных препаратов в ветеринарии

Пероксидаза – в иммуноферментном анализе (ИФА) при диагностике инфекционных болезней.

Уреаза – определение мочевины в крови, моче, тканях.

L-аминоксидаза, D-аминоксидаза, декарбоксилаза, дегидрогеназа, лиаза, трансфераза и др. - определение отдельных аминокислот.

Глюкозооксидаза, гексокиназа - определение глюкозы.

Инвертаза, лактаза – определение сахарозы.

Профезим (протосубтилин) - для лечения острых гнойно-некротических процессов, гнойных ран, абсцессов и флегмон, послеоперационных осложнений, некротических пододермитов, некробактериоза в стадии изъязвления, ожогов.

Террилин - для лечения гнойных ран, ожогов, трофических язв, пролежней, воспалительных заболеваний верхних дыхательных путей (трахеита, бронхита, пневмонии, абсцесса легких).

Терридеказа - для лечения гнойных ран.

Ируксол (коллагеназа с хлорамфениколом) – для безболезненного очищения раны от некротизированных тканей.

Биосептин - антибактериальный и противовирусный препарат для наружного применения.

Лизоамидаза (мурамидаза, амидаза, пептидаза, протеиназа, фосфатаза) - для лечения болезней, вызванных стрептококками и стафилококками.

- это низкомолекулярные органические соединения, присутствующие в живых клетках в низких концентрациях и являющиеся компонентами энзиматических систем, ответственных за различные биохимические реакции.

Производство витаминов

```
graph TD; A[Производство витаминов] --> B[Экстракция витаминных препаратов из растительного или животного сырья]; A --> C[Химический синтез витаминов]; A --> D[Биосинтез витаминов];
```

Экстракция витаминных препаратов из растительного или животного сырья

Химический синтез витаминов

Биосинтез витаминов

Витамины, выпускаемые в РФ путем микробного синтеза: кормовой концентрат витамина В₂ (рибофлавин); витамин В₁₂ (цианкобаламин); кормовой концентрат витамина В₁₂ (КМБ-12); витамин Д₂ (эргокальциферол); β-каротин.

Состав и количество витаминов в биомассе дрожжей

Витамин	Количество, мг/кг
Тиамин (В ₁)	15 - 18
Рибофлавин (В ₂)	45 - 68
Биотин	1,6 - 3,0
Инозит	400 - 5000
Фолиевая кислота	3,4 - 21,5
Никотиновая кислота	440 - 610

Микроорганизмы – продуценты рибофлавина

Микроорганизм	Выход витамина мг%
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	97
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	58
<i>Mycocandida riboflavina</i>	200
<i>Candida flaveri</i>	567
<i>Eremothecium ashbyii</i>	2480-6000
<i>Ashbyii gossipii</i>	6420

1. Аэробная ферментация.
2. Термолиз и концентрирование.
3. Сушка, размол, гранулирование, упаковка.

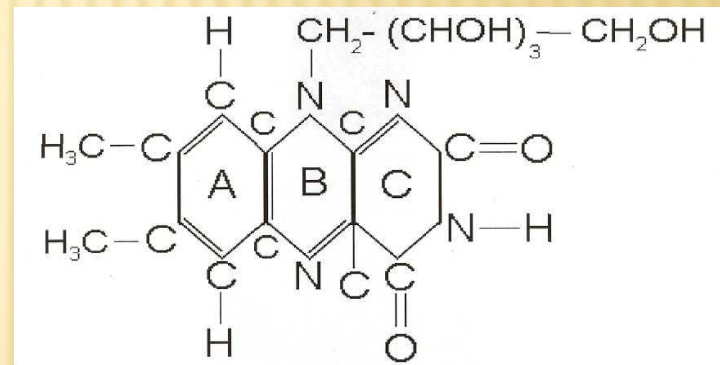
Производство рибофлавина состоит из трех основных стадий:



1. Компрессор воздуха
2. Маслоотделитель
3. Резивер
4. Фильтр головной
5. Инокулятор
6. Смеситель

7. Биореактор
8. Инокулятор
9. Сборник культуральной жидкости
10. Выпарной аппарат
11. Распылительная сушилка
12. Дробилка

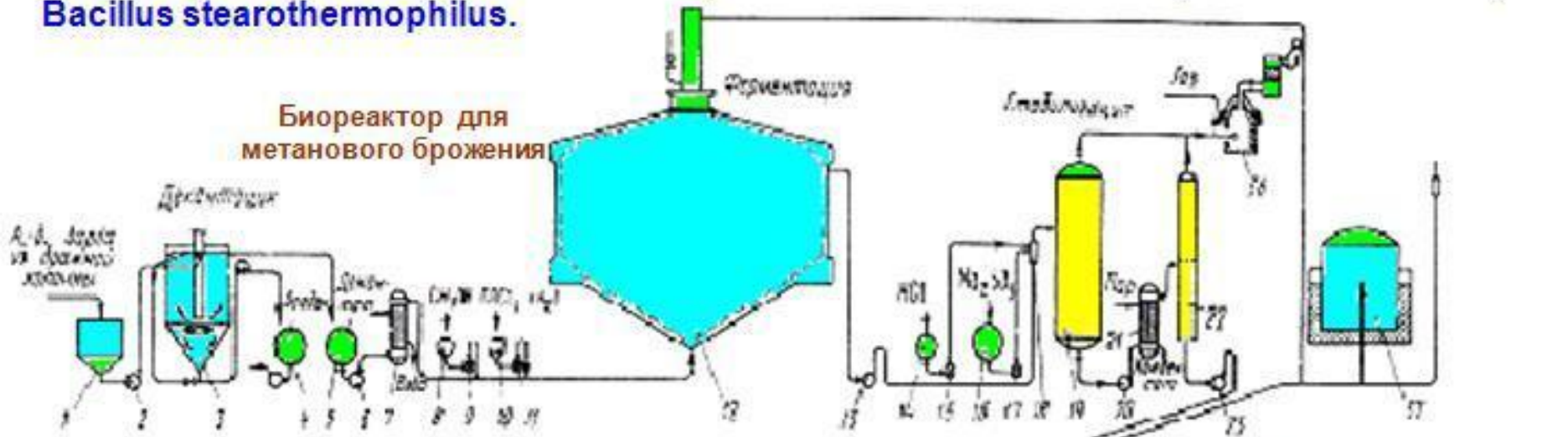
Технологическая схема производства кормового концентрата рибофлавина с помощью гриба *Ermothecium ashbyii*



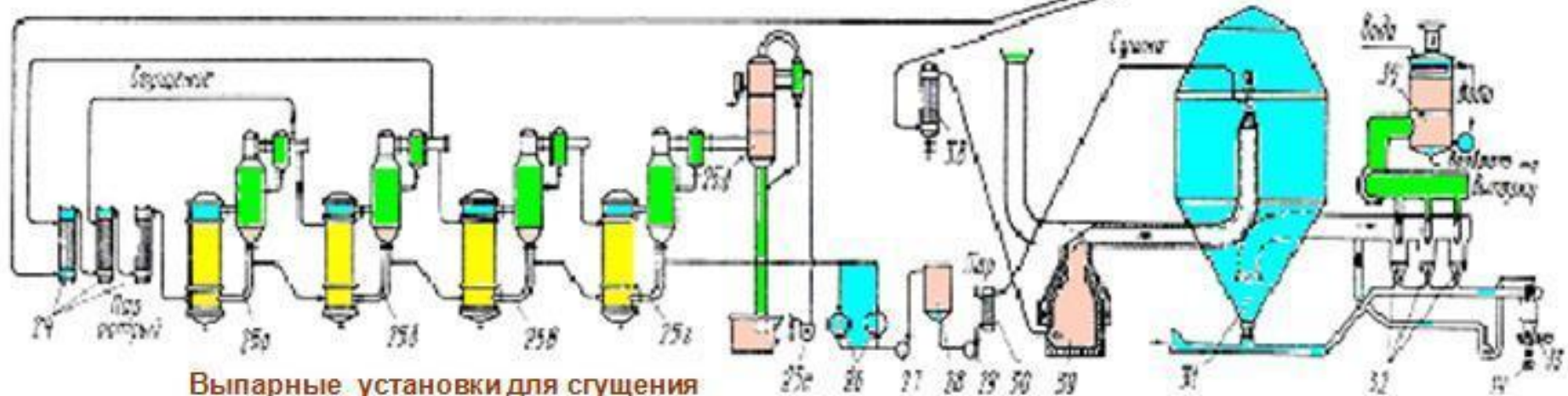
Технологическая схема получения концентрата витамина В₁₂

Продуценты витамина В₁₂ - Метанобразующие (*Methanococcus vacuolita*, *Methanosarcina barkeri*, *Methanosarcina halophilus*) и пропионовокислые бактерии (*Propionibacterium shermanii* M-82), *Nocardia rugosa*, *Micromonospora*, ацетогенные клостридии (*C. thermoaceticum*, *C. formicoaceticum* и *Acetobacter woodi*), *Pseudomonas denitrificans*, *Bacillus circulans*, *Bacillus stearothermophilus*.

Биореактор для метанового брожения

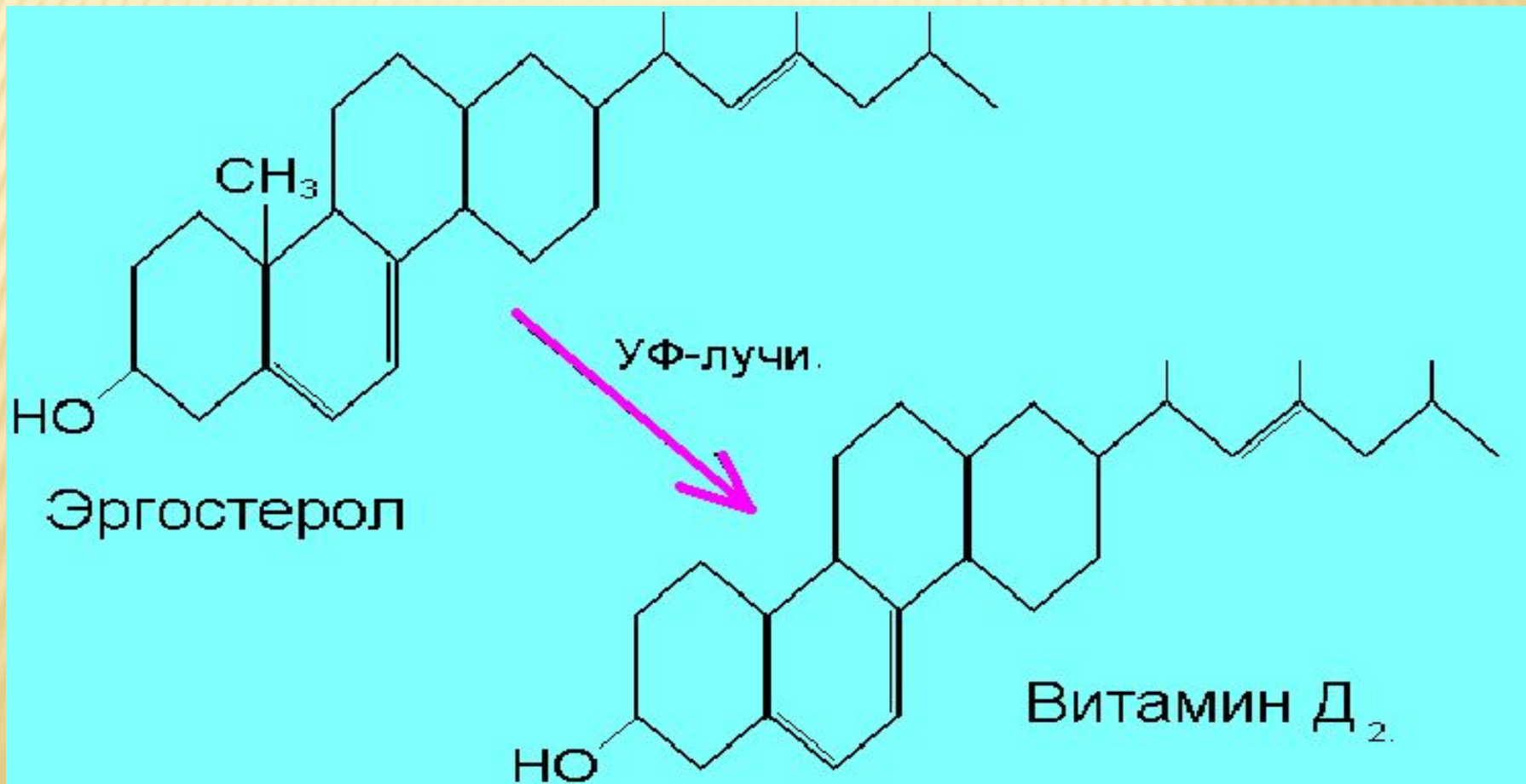


Выпарные установки для сущения метановой бражки



Распылительная сушилка

Фотохимическое превращение предшественников витамина Д в эргокальциферол (при обработке дрожжевой суспензии или сухих дрожжей ультрафиолетовыми лучами)



Содержание эргостерина у микроорганизмов

Микроорганизмы	Количество эргостерина, %
<i>Saccharomyces carlbergensis</i>	0,49-4,3
<i>Saccharomyces ellipsoides</i>	1,2-1,5
<i>Rhodotorula glutinis</i>	0,7-0,9
<i>Candida utilis</i>	0,4-0,6
<i>Candida tropicalis</i>	0,2-0,3
<i>Aspergillus</i>	1,2-1,4
<i>Penicillium Westlingii</i>	2,2

Заключение

Рассмотренные выше продукты микробиологической промышленности для сельскохозяйственных производств играют важную роль в интенсификации животноводства и птицеводства, увеличения объемов производства и улучшения технико-экономических показателей продукции сельского хозяйства.