

## ЛЕКЦІЯ 4

### Тема: Мікробіологічне виробництво біологічно активних речовин і препаратів

**Мета:** сформувати знання про використання мікроорганізмів для виробництва гормонів, вакцин та інших лікувальних засобів; шляхи підвищення біосинтезу антибіотиків.

#### План

1. Виробництво вітамінів, каротиноїдів і кормових препаратів вітамінів.
2. Виробництво ферментів і ферментних препаратів.
3. Виробництво антибіотиків.
4. Використання мікроорганізмів для виробництва гормонів і лікарських препаратів.

**Основні терміни і поняття:** біологічно активні речовини, антибіотики, вітаміни, вакцини, гормональні препарати, каротиноїди, кормові препарати, бактерицидна дія, бактеріостатичний ефект, мутасинтез, ферменти, ферментна технологія.

Біотехнологічна промисловість умовно поділяється на великотонажне виробництво й виробництво продуктів тонкого синтезу. До тонкого синтезу відноситься, перш за все, виробництво антибіотиків, гормонів, медичних (очищених) ферментів, фармацевтичних препаратів, а також різноманітних біохімічних реактивів. До великотонажних виробництв відноситься виробництво етанолу, кормових і пекарських дріжджів, органічних кислот, органічних розчинників, полісахаридів і ферментів. До цієї групи можна приєднати одержання фруктозної патоки за допомогою мікробних ферментів.

#### 5.1. Виробництво вітамінів, каротиноїдів і кормових препаратів вітамінів

**Вітаміни** – низькомолекулярні органічні речовини, які в низьких концентраціях мають високу біологічну дію. Джерелом вітамінів у природі є рослини і мікроорганізми. Препарати вітамінів у промисловості одержують двома способами:

- хімічним – переважну більшість препаратів вітамінів;
- мікробіологічним – препарати вітамінів **В<sub>12</sub>** (ціанкобаламін), **В<sub>2</sub>** (рибофлавін), ергостерин, каротиноїди.

Світове виробництво **вітаміну В<sub>12</sub>** становить 9–11 т/рік, з них 6,5 т використовують для медичних цілей, а решту – для тваринництва. Основними продуцентами вітаміну В<sub>12</sub> є пропіоновокислі бактерії – *Propionibacterium freudenreichii* та *Pseudomonas denitrificans*.

Сировиною для культивування продуцентів **вітаміну В<sub>12</sub>** є соєва та рибна мука, м'ясний та кукурудзяний екстракти, спирти – ізопропанол, метанол і пропандіол. Необхідними компонентами при виготовленні середовища є солі кобальту і амоній сульфат.

Схема виробництва препаратів **вітаміну В<sub>12</sub>** при використанні пропіоновокислих бактерій:

1. Культивування здійснюється періодичним способом у анаеробних умовах. Обов'язково контролюють рН середовища (утворену кислоту нейтралізують, додаючи луги). Через 72 години в середовище культивування вносять попередник вітаміну В<sub>12</sub> – 5,6 диметилбензімідазол. Без внесення цієї сполуки бактерії синтезують кобінамід і псевдовітамін В<sub>12</sub> (азотистою основою є аденін), які не виявляють біологічної активності та не мають практичної цінності.

2. Через 72 години в клітинах нагромаджується В<sub>12</sub> і ферментацію завершують. Проводять сепарування біомаси і екстракцію вітаміну з неї водою, підкисленою до рН 4,5–5,0 при 85–90<sup>0</sup>С протягом 60 хв. Як стабілізатор додають розчин 0,25 % NaNO<sub>2</sub>. За таких умов вітамін В<sub>12</sub> переходить у розчин.

3. Водний розчин охолоджують, доводять рН до 6,8–7,0 50 % NaOH. Для коагуляції білків до розчину додають Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> x18H<sub>2</sub>O і безводний FeCl<sub>3</sub>, після чого суміш фільтрують через прес-фільтр.

4. Очищають розчин, використовуючи іонообмінні смоли СГ-1, після чого кобаламін елюють за допомогою розчину аміаку.

5. Далі проводять додаткове очищення водного розчину вітаміну органічними розчинниками, випарювання і очищення на колонці з Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, після чого кобаламін елюють водним ацетоном. При цьому вітамін відділяється від CN- і оксикобаламіну.

6. До водно-ацетонового розчину вітаміну додають ацетон і витримують 24–48 годин при температурі +3–4<sup>0</sup>С. Кристали вітаміну відфільтровують, промивають сухим ацетоном та сірчанним ефіром і висушують у вакуумному ексикаторі над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

Щоб запобігти руйнуванню вітаміну В<sub>12</sub> всі операції проводять у затемненому приміщенні або при червоному світлі.

**Кормовий препарат вітаміну В<sub>12</sub>** отримують шляхом термофільного метанового бродіння спиртової і ацетоно-бутилової барди (відходи ацетоно-бутилового виробництва). Для зброджування використовують змішану культуру термофільних матанутворюючих бактерій.

Схема виробництва кормового концентрату **вітаміну В<sub>12</sub>**

1. Зброджування барди у залізобетонних ферментерах безперервним способом протягом року. Контролюють рівень жирних кислот і амонійного азоту.

2. До барди у ферментер додають 4 г/л кобальт хлориду і 5 г/л метанолу, які стимулюють синтез кобаламінів. Перед випарюванням до зброженого середовища додають хлоридну чи фосфатну кислоту (рН 6,3–6,5), оскільки вітамін В<sub>12</sub> при нагріванні у лужному середовищі інактивується.

3. Метанову бражку концентрують і висушують на розпилюючій сушарці. Готовий препарат – порошок коричневого кольору з кислим смаком. Препарат фасують по 15 кг. Термін зберігання 12 місяців.

**Рибофлавін** (вітамін В<sub>2</sub>) отримують за допомогою мікробіологічного синтезу, але основну частку виробництва становить хімічний синтез.

Промисловими продуцентами **вітаміну В<sub>2</sub>** є дріжджоподібні гриби *Eremothecium ashbyii*, *Ashbyii gossupii*, дріжджі *Candida famata*, генно-інженерні штами бактерій *Bacillus subtilis*.

Сировина різна, залежно від продуцента. Якщо продуцентом є *Eremothecium ashbyii* – основним компонентом середовища у ферментері є кукурудзяна і соєва мука, кукурудзяний екстракт, буряковий цукор, технічний жир, КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>, СаСО<sub>3</sub>, NaCl. Середовище стерилізують при 120–122<sup>0</sup>С протягом години. Культуру культивують періодичним способом у аеробних умовах при температурі 28-30<sup>0</sup>С до початку спороутворення. За таких умов утворюється 12 мг/мл вітаміну.

При використанні *Bacillus subtilis* – середовища включає мелясу, білково-вітамінний концентрат, або дріжджовий екстракт.

Рибофлавін використовують для лікування захворювання печінки і підшлункової залози, для вітамінізації деяких сортів хліба. Наявність вітаміну В<sub>2</sub> у кормах значно підвищує яйценосність курей, виживання курчат і ваговий приріст, тому препарати В<sub>2</sub> входять до складу комбікормів.

**Кормовий препарат рибофлавіну** – продуцент *Eremothecium ashbyii*. Ферментацію проводять глибинним способом у ферментерах за температури 28-30<sup>0</sup>С, інтенсивному перемішуванні та аерації.

Сировиною є глюкоза, мальтоза або кукурудзяна мука. Культуральну рідину після ферментації випарюють у вакуумі до 30–40 % сухих речовин. Сироп висушують у розпилюючій сушарці й отримують готовий продукт.

**Ергостерин** (вихідний продукт для одержання деяких стероїдних гормонів, жиророзчинного вітаміну **D<sub>2</sub>**, лікувальних та харчових препаратів).

Продуценти – *Saccharomyces cerevisiae*, гриби р. *Aspergillus*, *Penicillium*.

Культивування дріжджів ведуть при оптимальній температурі і гарній аерації (до 2 % кисню), середовище повинно містити надлишок джерела вуглецю (співвідношення С:N є важливим фактором). Ростучу культуру опромінюють УФ-променями (280–300 нм). Склад і вихід продуктів залежить від тривалості опромінення, температури, наявності добавок.

**Каротиноїди** – це основні харчові барвники. Вони інгібують розвиток ракових клітин шкіри, індукованих УФ-променями.

Продуценти – дріжджі *Rhodotorula gracilis* і гетероталічний гриб *Blakeslea trispora*.

Середовище для культивування містить кукурудзяно-соєву та рослинні олії, поверхнево-активні речовини і спеціальні стимулятори, які впливають на синтез того чи іншого виду каротиноїду.

**Бета-каротин** (провітамін А) виробляють в Україні з гриба *Blakeslea trispora* глибинним способом на середовищах із мелясою, соєвою олією, кукурудзяним екстрактом (схема отримання подібна до вітаміну В<sub>2</sub>).

## 5.2. Виробництво ферментів і ферментних препаратів

Галузь промислової мікробіології, що займається одержанням ферментів і ферментних препаратів за допомогою мікроорганізмів називають біокаталізом або *ферментною технологією*. Інтенсивний розвиток технологій ферментації обумовлений тим, що ферменти є високоактивними і нетоксичними біокаталізаторами, які широко використовуються в харчовій промисловості (пивоваріння і виноробство), медицині, хімічній промисловості, при виробництві тканин, миючих засобів, для очищення середовища від пестицидів, інших отруйних сполук тощо.

Джерелом отримання деяких ферментів є рослини (протеїнази) і тканини тварин (хімотрипсин, амілаза, колагеназа, ліпаза). Однак основним джерелом для виділення ферментів і ферментних препаратів є мікроорганізми. Це обумовлено високою інтенсивністю їх метаболізму, швидким приростом біомаси на дешевих (нехарчових) субстратах, окремі з яких є токсичними для інших організмів. Мікробіологічний метод одержання ферментів є більш перспективним, порівняно з хімічним синтезом. Його перевагами є:

- широке різноманіття ферментів, що синтезуються мікроорганізмами;
- можливість управління ферментними системами і складом препаратів, що виробляються;
- висока швидкість розмноження мікроорганізмів і можливість використання різноманітних дешевих субстратів.

У ферментній технології використовуються як дикі, так і мутантні штами мікроорганізмів, деякі з них представлені в табл. 5.1.

Крім високо очищених окремих ферментів, промисловість випускає ферментні препарати, які містять суміш ферментів. Ферментні препарати класифікують за основним компонентом (ферментом): амілолітичні містять амілази, протеолітичні – протеази, ліполітичні – ліпази тощо.

Ферменти, що утворюють мікроорганізми, бувають:

- *екзогенні* (екзоцелюлярні, позаклітинні) – можуть виділятися у культуральну рідину – протеази, амілази;
- *ендогенні* (ендоцелюлярні, внутрішньоклітинні) – містяться в середині клітин – глюкозоізомераза, інвертаза, глюкозооксидаза.

В Україні виробляють глюкозооксидазу, галактозооксидазу і каталазу.

## Ферменти, що виробляють у промисловості, та їх продуценти

Ферменти	Продуценти
А-амілаза	<i>Aspergillus niger, A. orizae;</i> <i>Bacillus, Streptococcus</i>
Протеїнази (лужна і кисла)	<i>Aspergillus, Penicillium;</i> <i>Bacillus subtilis, Bacillus spp., Clostridium</i>
Целюлази	<i>Aspergillus niger, Penicillium,</i> <i>Trichoderma viride, T. roseum;</i> <i>Cellulomonas, Clostridium</i>
Пектинази	<i>Aspergillus niger, Mucor, Penicillium;</i> <i>Erwinia,</i>
Глюкозоізомераза	<i>Bacillus, Microbacterium, Streptomyces</i>
Інвертаза	<i>Saccharomyces cerevisiae, Kluyveromyces,</i> <i>Streptomyces</i>
Ліпаза	<i>Candida, Aspergillus,</i> <i>Clostridium</i>
Сичужний фермент	<i>Mucor, Bacillus</i>
Лактаза	<i>Saccharomyces</i> <i>Escherichia</i>
РНК-ази	<i>Aspergillus,</i> <i>Bacillus, Streptococcus, Clostridium</i>

**Виробництво ферментів** має деяку специфіку в порівнянні з іншими мікробіологічними процесами:

1. Потрібно ретельне дотримання стерильності, бо продукт, що утворився – фермент – на відміну від кислот, спиртів і антибіотиків не подавляє сторонню мікрофлору.

2. Біосинтез ряду ферментів пригнічується катаболітною репресією.

3. Для продукту представляють небезпеку протеази.

Ці особливості враховують при підборі поживних середовищ, селекції штамів і реалізації процесу.

Сировина для одержання ферментів є різною, залежно від продуцентів. У виробництві пектинолітичних ферментів використовують пектинвмісну сировину (буряковий жом), целюлолітичних – солому, висівки тощо.

У якості джерела вуглецю використовують кукурудзяне або пшеничне борошно, крохмаль, глюкозу, лактозу. Крохмаль є індуктором для  $\alpha$ -амілази, а глюкоза репресором. Утворення глюкоізомерази інтенсивніше відбувається в середовищах із ксилозою або геміцелюлозою. У якості джерела азоту в середовищах для одержання ферментів застосовують соєве борошно або білкові ізоляти, рибне борошно, кукурудзяний екстракт, казеїн, солі амонію. Сухої речовини в таких середовищах повинно бути 10–20 %.

Процес виробництва ферментів і ферментних препаратів включає три стадії:

1. Отримання посівного матеріалу.
2. Отримання виробничої культури з використанням методів глибинного і/або поверхневого культивування.
3. Отримання з готової виробничої культури технічних чи очищених ферментних препаратів і ферментів.

Способи культивування:

- поверхневий (для грибів) – кюветний або в механічних установках;
- глибинний (для бактерій) – у ферментерах.

Більшість процесів одержання ферментів аеробні, тому потрібні біореактори з аераторами. Притік повітря 0,1–1,0 м<sup>3</sup>/хв. При роботі з бактеріальними продуцентами потрібні механічні мішалки – 1-3 кВт/м<sup>3</sup>, а при роботі з міцеліальними продуцентами – 4–6 кВт/м<sup>3</sup>. рН нейтральний або слабкокислий.

Залежно від способів аерування і перемішування розрізняють три групи ферментерів:

- комбіновані з механічним перемішуванням і автоматичною аерацією;
- ежекційні (автоматичне перемішування і аерація різними способами);
- барботажні (перемішування за допомогою аерації).

**Глибинне культивування** продуцентів ферментів має переваги над поверхневим: скорочує виробничі площі, виключає важку ручну працю, поліпшує гігієну праці, спрощує механізацію й автоматизацію виробництва, робить можливим перехід на безперервне культивування, дає змогу раціональніше використовувати середовище, забезпечує більшу питому активність отриманих ферментів.

Незалежно від способу культивування (поверхневого чи глибинного), культура мікроорганізмів містить ряд баластних речовин. Виділення і очищення ферментів – процес дуже коштовний і трудомісткий. Тому в таких галузях господарства, як спиртова, шкіряна, сільськогосподарська використовують неочищені культури мікроорганізмів і/або культуральну рідину (амілазні, протеазні, целюлазні препарати). Однак у хлібопеченні, пивоварінні, виноробстві, м'ясопереробному, концентратному, текстильному виробництві, при виготовленні сирів, крохмалю, соків, хутра, у медицині використовують частково або повністю очищені ферменти або ферментні препарати.

Процес очищення культур після глибинного культивування починають з відділення культуральної рідини від твердої фази (використовують фільтри, центрифуги, сепаратори).

Очищення культур після поверхневого культивування починається із руйнування клітин, потім додають розчинник і отримують екстракт. Далі фільтрати, центрифугати й екстракти піддають концентруванню:

- вакуум-випарювання;
- ультрафільтрація (діаліз, електродіаліз, зворотній осмос);
- осадження органічними розчинниками (у спеціальних апаратах);

- висолювання – осадження висококонцентрованими розчинами солей (амоній сульфат, натрій сульфат, натрій хлорид).

Після концентрування проводять розділення і очищення ферментів методом адсорбції за допомогою спеціальних колонок, з яких фракціями збирають відповідні ферментні препарати. Потім фермент іммобілізують. Після адсорбції окремі фракції піддають висушуванню для отримання стабільного для зберігання ферментного препарату.

Важливо, щоб на всіх етапах розділення і очищення ферменти і ферментні препарати не втратили своєї активності, тобто були стабільними. Для стабілізації ферментів використовують наступні *способи стабілізації*:

- фізико-хімічні (висушування, зберігання при низьких температурах, зміна рН чи тиску);
- вплив хімічних агентів із метою ущільнення (гліцерину, вуглеводів, полісахаридів, іонів металів, детергентів, інгібіторів тощо);
- мікрокапсулювання і гранулювання.

Ферментні препарати, що випускаються в промислових масштабах, завжди стандартизовані. Для стандартизації ферментів і ферментних препаратів до них додають наповнювачі. Наповнювачем для амілолітичних і пектолітичних ферментів є крохмаль, для інших – сахароза, глюкоза, лактоза, желатина.

### 5.3. Виробництво антибіотиків

До антибіотиків відносяться низькомолекулярні речовини, що різняться за хімічною структурою. Спільним для цих сполук є те, що вони є продуктами життєдіяльності мікроорганізмів, які в малих концентраціях специфічно порушують ріст мікроорганізмів і/або злужкісних пухлин.

Більшість антибіотиків відносяться до вторинних метаболітів. Їх також, як токсини й алкалоїди, неможна віднести до суворо необхідних для забезпечення росту мікроорганізмів речовинами. За цією ознакою вторинні метаболіти відрізняються від первинних.

Характерною особливістю розвитку більшості продуцентів антибіотиків є двофазність. У першій фазі розвитку культури спостерігається інтенсивне нагромадження біомаси продуцента, у другій – синтез антибіотика. Біосинтез антибіотиків, як і інших вторинних метаболітів, як правило відбувається в клітинах, що пройшли стадію інтенсивного росту (трофофазу), тобто у мікроорганізмів, які припинили ріст (ідіофаза). У зв'язку з цим антибіотики відносять до метаболітів-іділітів.

Біологічна роль їх у забезпеченні життєдіяльності клітин-продуцентів залишається до цього часу не вивченою. Вважається, що вони в несприятливих умовах стримують ріст конкуруючих мікроорганізмів, забезпечуючи тим самим більш сприятливі умови для виживання мікропродуцентів того чи іншого антибіотика. Значення процесу антибіотикоутворення в життєдіяльності мікробної клітини підтверджується тим, що у стрептоміцетів близько 1 % геномної ДНК відводиться на долю генів, що кодують ферменти біосинтезу антибіотиків, які протягом більшої кількості часу можуть не експресуватися.

Відомо близько 5000–6000 антибіотиків, продуцентами яких є в основному 6 родів грибів, три роди актиноміцетів (майже 4000 різноманітних антибіотиків) і два роди бактерій (близько 600 антибіотиків). Із міцеліальних грибів особливу увагу потрібно звернути на плісеневі гриби, які є продуцентами так званих лактамних антибіотиків (пеніцилінів і цефалоспоринів). Більша частина синтезуючих актиноміцетами антибіотиків, включаючи тетрацикліни синтезується родом *Streptomyces*.

Із відомих 5000-6000 природних антибіотичних речовин для реалізації споживачам виробляється тільки близько 100.

Пріоритет у відкритті антибіотиків належить видатному англійському мікробіологу О. Флемінгу (1929 р.). У фільтраті бульйонної культури плісеневого гриба *Penicillium notatum* він виявив антибіотик, який знищував культуру золотистого стафілокока. Цей антибіотик був названий «пеніциліном» від назви гриба-продуцента. У чистому вигляді пеніцилін виявився нестійким, тому Флемінгу не вдалося виділити його з фільтрату. У вигляді солі його виділили англійські хіміки Г. Флорі і Дж. Чейн у 1940 році.

У теперішній час багато антибіотиків отримують промисловим способом. Відомо понад 2000 антибіотиків, але враховуючи високу токсичність більшості з них для людини, використовують лише близько 50.

Продуцентами антибіотиків є:

- бактерії (граміцидин, бацитрацин, едеїн, тиротрицин, субтилін);
- актиноміцети (стрептоміцин, тетрациклін, мономіцин, левоміцетин, ністатин);
- гриби (пеніцилін, цефалоспорини, грізеофульвін, мікроцид, фумагілін).

Із міцеліальних грибів особливу увагу потрібно звернути на плісеневі гриби, які є продуцентами так званих лактамних антибіотиків: пеніцилінів і цефалоспоринів. Найбільш активними продуцентами антибіотиків є актиноміцети роду *Streptomyces* (тетрациклін).

Антибіотики класифікуються за трьома основними ознаками: за спектром і спрямованістю біологічної дії, за хімічною структурою та за молекулярним механізмом дії на мікробну клітину.

**За спектром дії** розрізняють антибіотики вузького і широкого спектру:

- антибіотики вузького спектру дії пригнічують ріст певної групи мікроорганізмів (бензилпеніцилін, еритроміцин, грізеофульвін новобіцин), активні переважно до грампозитивних мікроорганізмів;
- антибіотики широкого спектру дії (цефалоспорини, тетрацикліни, трихотетин) пригнічують ріст і розмноження грампозитивних і грамнегативних форм бактерій.

**За ефектом протимікробної дії** антибіотики поділяють на:

- бактерицидні, що спричинюють загибель певних видів мікроорганізмів;
- бактеріостатичні, що пригнічують ріст і розмноження мікроорганізмів, але не знищують їх.



*За спрямованістю дії* антибіотики поділяють на чотири основні групи:

- антибактеріальні (більшість відомих антибіотиків);
- протигрибкові (ністатин, леворин);
- противірусні (інтерферон, інтерлейкіни);
- протиухлинні (рубоміцин, актиноміцин).

*За молекулярним механізмом дії* антибіотики поділяють на групи залежно від мішені в бактеріальній клітині:

- порушують синтез клітинної стінки бактерій (пеніциліни, ристоміцин, новобіоміцин). Порушуючи синтез пептидоглікану вони сприяють перетворенню нормальної бактеріальної клітини в L-форму.
- порушують синтез білків на рівні 70S рибосом (тетрацикліни, макроліди, левоміцетин);
- пригнічують синтез білків у бактеріальній клітині і порушують трансляцію генетичного коду (аміноглікозиди);
- пригнічують синтез нуклеїнових кислот, трансляцію і реплікацію ДНК (актиноміцини, міаміцин);
- порушують цілісність цитоплазматичної мембрани бактерій (поліміксини), протигрибкові (ністатин);
- пригнічують окисно-відновні ферменти у мікобактерій (стрептоміцин), активність декарбоксилази стрептококів, найпростіших, колі-бактерій (хлортетрациклін).

До антибіотиків рослинного походження належать **фітонциди**, які використовують у медицині та рослинництві, а також **фітоалексини** – речовини, які утворюються в тканинах вищих рослин унаслідок потрапляння туди паразитів.

Антибіотиками тваринного походження є лізоцим, еритрин, екмолін, спермін, спермідин тощо. Найбільш ефективний з них – **інтерферон**, який належить до антибіотиків широкого спектру дії.

## Біотехнологія виробництва антибіотиків

Промислове виробництво антибіотиків включає кілька стадій:

1. Виготовлення середовища для культивування продуцента і посівного матеріалу. Для кожного продуцента використовується своє оптимальне середовище, яке забезпечує ріст продуцента і максимальне утворення антибіотика, містить доступні та дешеві компоненти, забезпечує застосування економічно вигідних способів виділення і очищення антибіотика. У деяких випадках для значного підвищення біосинтезу антибіотика в середовище вносять попередників синтезу певного антибіотика.

2. Біосинтез антибіотика. Ферментацію проводять у спеціальних ферментерах, які забезпечують оптимальні умови для росту продуцента і максимальне утворення антибіотика.

3. Попереднє оброблення культуральної рідини. Залежно від того, виділяється антибіотик у культуральну рідину частково чи є в середині клітин, використовують різні способи його виділення. Для антибіотиків, які виділяються з культуральної рідини, застосовують методи екстракції розчинниками, осадження або сорбції іонообмінними смолами. Внутрішньоклітинні антибіотики екстрагують органічними розчинниками. Відділення розчину від біомаси та інших баластних речовин проводять методом фільтрації або центрифугуванням.

4. Виділення і очищення антибіотика. Основними методами є екстракція, осадження, сорбція на іонообмінних матеріалах, упарювання, сушіння.

5. Отримання готової продукції, приготування лікарських форм, фасування. До антибіотиків, що використовують у медицині, ставлять високі вимоги (високий ступінь очищення, стерильність препарату тощо), тому стадії очищення і стандартизації проводять у стерильних умовах. Найчастіше для сушіння використовують ліофілізацію при температурі -8, -12°C.

Готовий продукт піддають біологічному і фармакологічному контролю. Біологічний контроль включає визначення стерильності, фармакологічний – токсичності, пірогенності, токсикогенності тощо. Встановлюють максимальну дозу антибіотика, дози, що викликають повну і 50 % загибель експериментальних тварин. Готова форма лікарського засобу надходить до споживача із зазначенням біологічної активності і дати виготовлення.

**Антибіотики немедичного призначення**, що застосовують у сільському господарстві, одержують також в умовах стерильності, проте готовий продукт – це висушена біомаса продуцента або культуральне середовище, яке містить також біологічно активні речовини (вітаміни, ферменти, амінокислоти).

Для виробництва одного з найбільш розповсюджених антибіотиків – пеніциліну, використовується високопродуктивний промисловий штам *Penicillium notatum* (*syn. chrysogenum*). Його культивують у 100 – 1000-літрових ємностях – ферментерах, у присутності фенілоцтової кислоти на багатому поживному середовищі. Для забезпечення безперервного виходу пеніциліну декілька ферментерів працюють у змінному режимі.

По закінченні ферментації культуральну рідину відокремлюють фільтруванням, клітини плісняви промивають. Із одержаного фільтрату промиванням за допомогою бутанолу і джерела іонів калію в спеціальних установках-кристалізаторах одержують кристалічну калієву сіль пеніциліну 99,5 % чистоти. Виділений і очищений антибіотик пеніцилін є вихідною речовиною для наступних хімічних модифікацій. Оброблений ферментом пеніцилінамідазою (продуцентом якого є спеціальний бактеріальний штам), пеніцилін у результаті видалення із молекули бензольної групи при 37<sup>0</sup>С у водному середовищі перетворюється в 6-амінопеніцилову кислоту (6-АПК). Ця кислота як антибактеріальний засіб має слабку активність, однак, структура ядра 6-АПК є зручною основою для модифікаційних маніпуляцій, у результаті яких, при приєднанні бічних груп антибактеріальна ефективність препарату значно зростає.

Отримання 6-амінопеніцилової кислоти (6-АПК) хімічним синтезом є досить складним завданням. Отримання нових аналогів пеніциліну пов'язано зі зміненням його бічного ланцюга при збереженні цілісності «ядра» антибіотика, яким є 6-АПК. Найпростіший шлях отримання антибіотиків цього класу – отримання 6-АПК з подальшим ацилюванням її аміногрупи з отриманням напівсинтетичних аналогів. У теперішній час для отримання 6-АПК використовують іммобілізовані бактеріальні клітини, які містять пеніцилінамідазу, або чистий фермент пеніцилінамідазу. Більшість 6-АПК отримують за допомогою іммобілізованих ферментів.

Більшість антибіотиків добре розчинні в органічних кислотах і нерозчинні у воді. Для отримання антибіотиків, як правило використовують екстракцію, яку проводять у декілька стадій. На першій стадії із водної фази переводять сполуки в органічну фазу, потім з цієї фази знову переводять у водну фазу, при цьому забезпечується як концентрування, так і очищення цільового продукту.

При отриманні пеніциліну (в 1 л поживного середовища міститься 35 г антибіотика) видаляють біомасу міцелію фільтруванням. Оскільки рН пеніциліну знаходиться у діапазоні 2,5–3,1, то культуральне середовище доводять до рН 2,0–3,0, після чого проводять екстракцію органічними розчинниками. Для цього використовують систему культуральне водне середовище-амілацетат (або бутилацетат) у співвідношенні 10:1 (v/v)/ При цьому в органічну фазу переходить майже весь пеніцилін. Для додаткового очищення проводять повторну екстракцію водним розчином фосфатного буферу (рН 5-7,5). Антибіотик отримують у вигляді натрієвої солі осадженням із водно-бутанолової суміші.

Крім пеніцилінів і цефалоспоринів до  $\beta$ -лактамних антибіотиків належать цефаміцини, продуцентами яких є актиноміцети, що відносяться до роду стрептоміцетів (*Streptomyces*).

## Шляхи підвищення біосинтезу антибіотиків

Існує два способи підвищення біосинтетичної активності продуцентів антибіотиків:

1. Отримання з вихідних штамів мутантних форм, які мають підвищену активність до синтезу антибіотика.

2. Підбір умов культивування, найбільш сприятливих для максимального утворення антибіотиків.

Виділяють декілька шляхів підвищення ефективності штамів-продуцентів антибіотиків:

1. **Спонтанні мутації (класичний).** У той час, коли встановили антибактерійну дію пеніциліну і можливість його використання в якості лікарського засобу (Х.У. Флорі, Е.Б. Чейн та ін., 1941), продуктивність лабораторного штаму плісені (2 мг препарату на 1 л культуральної рідини) була недостатньою для налагодження промислового виробництва антибіотика. Багаторазовими систематичними впливами на вихідний штам *Penicillium chrysogenum* такими мутагенами як рентгенівське та ультрафіолетове опромінення, азотистий іприт у сполученні зі спонтанними мутаціями і відбором найкращих продуцентів, вдалося збільшити продуктивність гриба в 10000 разів і довести концентрацію препарату в культуральній рідині до 2 %.

Шлях підвищення ефективності штамів-продуцентів антибіотиків, заснований на спонтанних мутаціях, що став класичним, не дивлячись на трудомісткість і дуже великі витрати часу, використовується до цього часу. Антибіотик, на відміну від білка, не є продуктом вираження певного гену, біосинтез антибіотика відбувається в результаті спільної дії 10-30 різних ферментів, які кодуються відповідною кількістю різних генів. Крім того, для багатьох антибіотиків, мікробіологічне виробництво яких налагоджене, молекулярні механізми їх біосинтезу до цього часу не вивчені. Полігенний механізм, на якому базується біосинтез антибіотиків, є причиною того, що зміни окремих генів не можуть бути успішними.

2. **Генноінженерний підхід** передбачає конструювання продуцентів з використанням плазмід у якості вектора для створення рекомбінантних ДНК, які включають гени, що контролюють біосинтез ферментів, які каталізують реакції синтезу антибіотиків, поки встановлено тільки у продуцентів метиленоміцину. В інших випадках плазмідам відводиться роль регуляторів активності генів, локалізованих у хромосомах. Однак у більшості штамів мікроорганізмів, що використовуються для отримання антибіотиків у промислових масштабах, плазміді поки виявити не вдалося.

3. **Мутасинтез (мутаційний біосинтез).** Мутанти мікроорганізмів-продуцентів антибіотиків інколи утворюють біологічно активні проміжні продукти якогось певного шляху біосинтезу антибіотика або речовини, які можуть бути корисними як попередники при створенні нових аналогів антибіотиків. «Блоковані» мутанти цього типу не здатні утворювати потрібний антибіотик, якщо у середовищі культивування немає метаболічного попередника, який в нормі утворюється за участю фермента. Оскільки ферменти, що беруть участь у вторинному метаболізмі,

часто мають відносно низьку субстратну специфічність, то аналоги попередників антибіотиків можуть бути легко перетворені мутантом в аналоги самого антибіотика в ході мутаційного біосинтезу.

#### **5.4. Використання мікроорганізмів для виробництва гормонів і лікарських препаратів**

За допомогою мікроорганізмів можна отримати речовини, які не належать до природних метаболітів мікроорганізмів. Це **стероїдні гормони** і окремі поліпептиди людини. У промислових умовах випускають **кортикостероїди**: кортизон, гідрокортизон, преднізон, преднізолон, дексаметазон, які застосовують для лікування гормональних порушень і хвороб шкіри; **андрогени й естрогени** – тестостерон та естрадіол, які використовують як протизаплідні засоби тощо.

Сировиною для культивування мікроорганізмів-модифікаторів гормонів є складні спирти – стероли, присутні у відходах соєвої олії.

**Кортизон** (секретується наднирками людини) синтезували хімічним шляхом. У 1952 р. було виділено штам гриба *Rhizopus arrhizus*, здатний гідроксилувати і вводити у третє положення атом кисню другий стероїд – прогестерон, що надалі перетворюється у кортизон. Завдяки цій здатності з 37 стадій хімічного синтезу кортизону залишилось 11, а ціна знизилась у 33 рази.

**Інсулін, соматостатин, соматотропін, інтерферон людини** синтезовані генетично сконструйованими штамми *E. coli*, *Bacillus subtilis*.

До лікувальних засобів, які отримують за допомогою мікроорганізмів, належать **вакцини і препарати бактеріофагів**.

Створені **вакцини** можна розподілити на чотири групи:

1. Живі вакцини – це ослаблені або генетично змінені збудники захворювань. До них належать: спиртова черевнотифозна вакцина на основі *Salmonella typhi*, збагачена Ві-антигеном; вакцина БЦЖ (BCG) – на основі *Mycobacterium bovis*; туляремійна вакцина; вакцина проти кору та поліомієліту.
2. Вакцини отримані з убитих різними способами (нагріванням, оброблення хімічними речовинами – фенолами, спиртом, ацетоном тощо) збудників захворювань (вакцини проти вірусів грипу).
3. Анатоксини – це токсини – продукти життєдіяльності мікробів, оброблені формаліном і прогріті високою температурою (анатоксин проти токсину *Clostridium tetani*).
4. Штучні вакцини, що містять різні компоненти мікробних клітин.

Етапи створення вакцин:

1. Накопичення біомаси збудника або продуктів їх життєдіяльності.
2. Інактивація мікроорганізмів.
3. Концентрування.
4. Очищення та ліофілізація.

Для створення вакцин часто використовують методи генної інженерії. Виділивши антиген, або створивши його штучно, можна одержати вакцину. Вже отримано вакцини проти грипу, мишачого тифу, холери свиней.

Створення вакцин за допомогою методів генної інженерії ведеться в кількох напрямках:

1. Метод, що базується на вмонтовуванні гена антигену в мікроорганізм-продуцент, його вирощування і створення на його основі вакцини (**вірус гепатиту А і В, герпесу**);
2. Метод, що базується на одержанні штамів, які продукували б одночасно кілька антигенів – полівалентні вакцини – (вакцини, що містять антигени **гепатиту А і В з вірусом грипу і герпесу**).

Незалежно від способу одержання, всі вакцини мають відповідати таким вимогам:

1. Бути стерильними, не містити жодних агентів, крім ослаблених, вбитих збудників чи компонентів.
2. Бути нешкідливими;
3. Бути стандартними за імуногенністю і антигенністю (здатність антигену чи антигенів викликати утворення антитіл).
4. Мати помірну реактогенність.

Лікувально-профілактичні **препарати бактеріофагів** мають специфічність до патогенних і умовно-патогенних бактерій. Застосовують для лікування деяких інфекційних захворювань, оскільки вони не впливають на нормальну мікрофлору (препарати проти кишкових інфекцій: дизентерії, черевного тифу, сальмонельозу, ешерихіозів тощо).

Технологічна схема виробництва препаратів бактеріофагів:

1. Вибір штамів мікроорганізмів для виробництва даного виду фага.
2. Одержання посівних культур.
3. Приготування серій рідкого бактеріофага.
4. Контроль готового препарату на стерильність, нешкідливість, літичну активність.
5. Упаковка препарату.

### ***Питання для самоконтролю:***

1. Як здійснюється мікробіологічний синтез вітамінів В<sub>2</sub> і В<sub>12</sub>?
2. Що таке кормові препарати вітамінів і як їх отримують?
3. Які ферменти одержують за допомогою мікробного синтезу?
4. Охарактеризуйте основні стадії виробництва ферментів.
5. Які антибіотики отримують за допомогою плісеневих грибів?
6. Назвіть антибіотики, які отримують за допомогою бактерійних клітин.
7. Назвіть антибіотики немедицинного призначення.
8. Які лікувальні засоби отримують за допомогою мікроорганізмів?
9. Розкрийте механізми біологічної дії антибіотиків.