

Л.М. Буценко
Ю.М. Пенчук
Т.П. Пирог

Технології МІКРОБНОГО СИНТЕЗУ лікарських засобів



УДК 615.014:615.07

*Гриф Міністерства
освіти і науки України.
Лист № 1/11-3050 від 13.04.10 р.*

Л.М. Буценко, кандидат біологічних наук
Ю.М. Пенчук, кандидат технічних наук
Т.П. Пирог, доктор біологічних наук

Рецензенти: **Григорюк І.П.**, член-кор. НАН України, проф., д-р біол. наук, директор Навчально-наукового інституту охорони природи і біотехнологій Національного університету біоресурсів і природокористування України; **Патика В.П.**, акад. УААН, проф., д-р біол. наук, завідувач відділу Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України; **Верьовка С.В.**, д-р біол. наук, провідний науковий співробітник відділу структури і функції білка Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України.

Буценко Л.М., Пенчук Ю.М., Пирог Т.П. Технології мікробного синтезу лікарських засобів: Навч. посіб. — К.: НУХТ, 2010. — 323 с.

ISBN 987-966-612-093-2

Висвітлено технології виробництва та застосування антибіотиків, ферментних препаратів, вітамінів і генно-інженерних білкових препаратів. Наведено сучасні уявлення про біологічну роль антибіотиків, особливості біосинтезу антибіотиків різними групами продуцентів, біологічні основи ферментації для отримання антибіотиків і загальні принципи технології їх виробництва, дані щодо механізмів дії та практичного використання антибіотиків. Описано технологічні особливості культивування мікроорганізмів для отримання ферментів, методи виділення та очищення ферментних препаратів, технології виробництва протеолітичних, амілолітичних, ліполітичних та інших ферментних препаратів, сучасні методи іммобілізації ферментів і практичне використання іммобілізованих ферментних препаратів. Наведено сучасні технології одержання окремих вітамінів мікробним синтезом, рекомбінантних білків, їх виділення та очищення.

Для студентів напрямку підготовки 6.051401 «Біотехнологія».

ISBN 987-966-612-093-2

УДК 615.014:615.07

© Л.М. Буценко, Ю.М. Пенчук,
Т.П. Пирог, 2010
© НУХТ, 2010

ПЕРЕДМОВА

Останнім часом біотехнологія набула значення галузі знань, визначальної для сучасного науково-технічного прогресу загалом. Значна частина біотехнологічної промисловості у світі спрямована на виробництво фармацевтичних препаратів. Біотехнологічні медичні препарати за обсягами продажу становлять понад 15 % загального світового ринку фармацевтичних засобів. Щорічно на ринку з'являються нові препарати, при цьому більшість із них призначено для лікування хвороб, які раніше вважали невиліковними. Але не можна забувати, що, незважаючи на новітні досягнення в галузі медицини і фармації, добре відомі хвороби, наприклад туберкульоз, грізно нагадують про себе появою нових резистентних штамів збудників і послабленням профілактичних заходів. Тому розвиток фармацевтичної біотехнології пов'язаний не лише зі створенням нових препаратів, а й з удосконаленням технологій виготовлення та підвищенням ефективності відомих лікарських речовин і препаратів.

Найбільшим класом лікарських засобів, які одержують мікробним синтезом, є антибіотики. За різноманіттям і показаннями до застосування вони займають перше місце серед продукції світової фармацевтичної промисловості. Обсяг світового ринку антибіотиків збільшується в середньому на 10–12 % щорічно і становить понад 23 млрд доларів. Виробництво антибіотиків виявилось надзвичайно наукоємною галуззю, яка потребувала нових знань

від мікробіологів, біохіміків, генетиків і стимулювала розроблення сучасних біотехнологій, створення нового обладнання та сам розвиток мікробіологічної промисловості.

Крім антибіотиків продуктами фармацевтичної біотехнології є вітаміни, ферменти, вакцини, гормони, а також нові генно-інженерні лікарські препарати, діагностикими.

Серед лікарських засобів особливе місце належить ферментам. Ферментні препарати використовуються в багатьох галузях медицини. Так, протеолітичні ферменти використовують для лікування захворювань органів травлення. Їх же застосовують у лікуванні опікових уражень і різних ран для видалення некротичних тканин. У лікуванні патологій обміну речовин незамінні також ліпази. Протеїнази з фібрінолітичною дією використовують для розчинення тромбів. За допомогою таких препаратів, як стрептокіназа та урокіназа, лікують тромбоз коронарних судин серця, легенів, кінцівок. Ферментні препарати застосовуються також у системній терапії.

Використання ферментних препаратів у медицині не обмежується створенням лікарських препаратів. Ферменти необхідні для діагностики багатьох хвороб і вивчення функціонального стану організму. На основі ферментних препаратів розроблено спеціальні прилади — біосенсиори, використання яких значно прискорює діагностику та робить її точнішою.

Ще одним великим класом сполук, застосовуваних у медицині, є вітаміни. Використання вітамінів зумовлене значним поширенням хвороб, спричинених гіпо- та авітамінозами у населення. Рослинні та тваринні джерела не можуть у повному обсязі задовольнити зростаючу потребу у вітамінах, тому вітаміни, одержані мікробним синтезом, набувають важливого значення.

Найважливішим внеском мікробної біотехнології в медицину є отримання продукції, яку неможливо одержати хімічним синтезом. Зважаючи на це, можна стверджувати, що фармацевтична біотехнологія і надалі буде провідною галуззю, розвиток якої стимулює новітні наукові дослідження і використовує їх досягнення.

В Україні розвиток сучасних біотехнологій і використання їх у фармації досить обмежене, хоча традиційні біотехнології

застосовують у виробництві лікарських препаратів уже понад 20 років. На жаль, із 62 препаратів мікробного походження, що належать до першочергових лікарських засобів, виробляють лише 10–12 найменувань. Структура фармацевтичного біотехнологічного ринку України відрізняється від структури світового ринку. Найбільшими сегментами ринку у нас є препарати пробіотиків, вакцини і сироватки, далі — білки крові, антибіотики, ферменти і потім генно-інженерні препарати.

Головна мета даного посібника — ознайомлення читача з основними технологіями одержання антибіотиків, ферментних препаратів, вітамінів і генно-інженерних білкових препаратів. Мікробним синтезом, крім вищезазначених, отримують цілу низку важливих для медицини речовин (вакцини, гормони тощо), проте технології їх виробництва розглядаються в рамках окремих курсів і тому не наводяться в даному посібнику.

Перший розділ посібника присвячено антибіотикам — найбільшому класу фармацевтичних сполук, які отримують мікробним синтезом. Велику увагу приділено проблемам класифікації антибіотиків, пошуку нових сполук і нових продуцентів, удосконаленню технологій синтезу антибіотиків, проблемі резистентності до цих лікарських препаратів і шляхів її подолання. Відображено сучасні аспекти вивчення антибіотиків: створення високоефективних напівсинтетичних антибіотиків, одержання штамів-продуцентів генно-інженерними методами. Описано також технології отримання найважливіших антибіотиків.

У другому розділі розглянуто питання біосинтезу, виділення та очищення ферментів, описано традиційні біотехнології виробництва окремих ферментних препаратів. Приділено увагу питанням використання ферментних препаратів у медичних цілях: розробленню лікарських препаратів на основі ферментів, а також використанню ферментів для створення діагностичних приладів.

У третьому розділі висвітлено питання вітамінології та виробництва вітамінів мікробним синтезом. Зокрема розглянуто питання забезпечення населення вітамінами, шляхи подолання гіповітамінозів, використання мікроорганізмів у синтезі віта-

мінів, сучасні підходи до конструювання штамів надсинтетиків вітамінів та окремі технології виробництва останніх.

У четвертому розділі розглянуто технології одержання рекомбінантних білків, таких як інтерферони, інтерлейкіни, гормони росту та інсуліни. Приділено велику увагу процесам виділення та очищення рекомбінантних білків. Охарактеризовано основні мікроорганізми, які є продуцентами цих білків.

У посібнику не розглянуто технологічні аспекти одержання вакцин і пробіотиків, оскільки це тема інших видань.

В Україні навчальний посібник з технології мікробного синтезу лікарських засобів раніше не видавався.

1

ТЕХНОЛОГІЯ АНТИБІОТИКІВ

1.1. ПОНЯТТЯ ПРО АНТИБІОТИКИ

Антибіотики — це специфічні продукти життєдіяльності або їх модифікації, що характеризуються високою фізіологічною активністю щодо певних груп мікроорганізмів (віруси, бактерії, гриби, водорості, протозоа) або злоякісних пухлин, вибірково затримують їх ріст або повністю пригнічують розвиток.

Характерні ознаки антибіотиків:

- вибірковість дії. У цьому полягає їх відмінність від загальнобіологічних отрут (спирт, перекис водню, перманганат калію, ціаніди, фенол та ін.). Кожен антибіотик активний щодо певних груп організмів і не впливає на інші форми живих істот;
- висока біологічна активність щодо чутливих до них організмів. Тобто антибіотики активні за дуже низьких концентрацій. Так, концентрація пеніциліну, що спричиняє бактеріцидну дію, становить 10^{-6} г/мл.

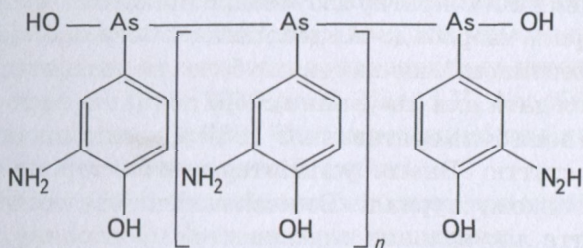
Вибірковість дії антибіотиків забезпечується їх здатністю впливати на певні мішені в чутливих клітинах. По-перше, антибіотики можуть впливати на утворення структурних компонентів мікробної клітини, яких немає у клітинах ссавців. Наприклад, більшість клітинних оболонок бактерій складається із пептидоглікану — макромолекули, що забезпечує еластичність оболонки бактеріальної клітини. Антибіотики пеніцилін і цефалоспорин пригнічують процес трансамінування на заключному етапі синтезу пептидоглікану. Наслідком цього є неможливість забезпечення міцності клітинної стінки бактерій і врешті їх за-

гибель. Клітини ссавців не потерпають, оскільки не містять пептидоглікану. По-друге, антибіотики можуть впливати на метаболічні процеси, властиві лише бактеріальним клітинам. Наприклад, сульфаніламід інгібує ріст мікробних клітин блокуванням синтезу фолієвої кислоти. Фолієва кислота необхідна для підтримання життєдіяльності будь-якої клітини. Проте, якщо клітини ссавців отримують цей вітамін ззовні, то бактерії, що мають менш проникну мембрану, змушені синтезувати його самостійно. В утворенні фолієвої кислоти бере участь пара-амінобензойна кислота (ПАБК). Молекули сульфаніламідів структурно схожі з ПАБК, завдяки чому конкурують з нею за зв'язування з ферментами і тим самим блокують синтез фолієвої кислоти, через це ріст бактерій припиняється. Антибіотик тетрациклін впливає на ріст бактеріальної клітини блокуванням синтезу білків. Як у клітинах бактерій, так і в клітинах ссавців синтез білків відбувається на рибосомах. Надходячи до бактеріальної клітини, молекули тетрацикліну блокують ділянки зв'язування транспортної РНК із рибосомами і зупиняють синтез білка. Надходячи до клітин ссавців, тетрациклін діє так само, але його концентрація в клітинах ссавців завжди нижча, ніж у клітинах бактерій, тому не відбувається впливового блокування. Дія антибіотиків типу ципрофлоксацину базується на пригніченні синтезу ДНК бактеріальної клітини. Цей процес відбувається майже однаково в бактеріальних клітинах і клітинах ссавців. Але фермент ДНК-гіраза має різні властивості, завдяки цьому ципрофлоксацин зв'язується лише з ДНК-гіразою мікробних клітин.

1.1.1. Історія відкриття антибіотиків

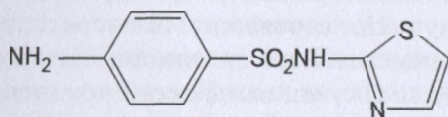
Наука про антибіотики досить молода. Минуло близько 80 років від часу відкриття першого антибіотика — пеніциліну. В усі часи інфекції були найстрашнішою загрозою для людства. У XVI ст. середня тривалість життя людини становила близько 30 років, а у XIX ст. і навіть на початку XX ст. людина могла померти від рани чи банального грипу. Вчені підраховали, що від чуми, холери, віспи загинуло більше людей, ніж під час усіх війн. Лікарі й учені завжди намагалися віднайти речовини для боротьби з інфекційними хворобами. Результатами досліджень стали пре-

парати, що містять миш'як, які на початку ХХ ст. використовували для боротьби із сифілісом. Наприклад, сальварсан. У Радянському Союзі такий препарат використовували до 1970 року.

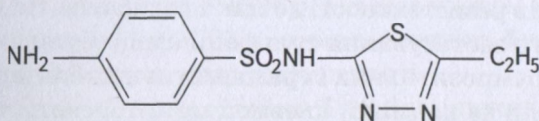


Сальварсан

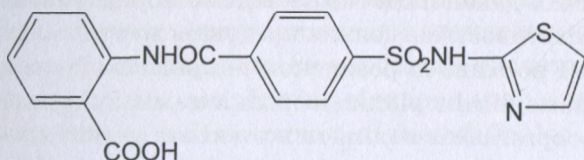
Для лікування багатьох інфекцій використовували також хімічно синтезовані сполуки — сульфаніламід, серед яких першим, ефективним щодо стрептококової інфекції, був препарат стрептоцид. Серед сульфаніламідів були широко відомі такі препарати, як етазол, фталазол.



Норсульфазол



Етазол



Фталазол

Історія відкриття сульфаніламідів повна драматизму. У 1932 р. хіміки німецької фірми «Фарбеніндустрі» синтезували

червону фарбу, яку назвали пронтозилем. Протимікробні властивості цієї речовини досліджував Г. Домагк. Він в експерименті довів, що пронтозил запобігав смерті лабораторних мишей, яким вводили 1000-кратну дозу гемолітичного стрептококу. Події прискорила хвороба дочки дослідника. Вона захворіла на важку форму септицемії, що на той час була смертельною. Домагк Г. не побоявся дати для лікування своїй дочці ще не досліджений препарат і вона була врятована. У 1935 р. дослідник опублікував історичну статтю «Внесок у хіміотерапію бактеріальних інфекцій» у німецькому журналі «Deutsch medicinische wochenschrift». За відкриття лікувальних властивостей пронтозилу, або червоного стрептоциду, Г. Домагк у 1938 р. отримав Нобелівську премію. Пізніше працівники Пастерівського інституту у Франції з'ясували, що діючою складовою червоного стрептоциду є його біла фракція — пара-амінобензолсульфамід, або білий стрептоцид, який ще у 1908 р. був синтезований випускником фармацевтичного факультету Віденського університету П. Гельмо, але не досліджений. Так починалася нова епоха у клінічній медицині — епоха антибактеріальної терапії, яка докорінно змінила можливості лікування переважної більшості хвороб.

Останніми десятиліттями використання сульфаніламідних препаратів для лікування інфекційних процесів значно скоротилося. Це зумовлено їх нижчою порівняно з сучасними антибіотиками активністю, значною токсичністю, поширеністю серед збудників резистентності до цих препаратів. На початку свого клінічного застосування сульфаніламідни були активні щодо більшості грампозитивних і грамнегативних бактерій. Крім того, вони діяли на хламідії, пневмоцисти, токсоплазми. Нині багато штамів резистентні до сульфаніламідів.

З давніх-давен людство несвідомо користувалося антибіотичними властивостями деяких продуктів життєдіяльності мікроорганізмів і рослин. Із розвитком мікробіології поступово вивчалися взаємодії між різними організмами, була доведена здатність мікроорганізмів виділяти в довкілля антимікробні речовини, вивчалось явище антагонізму в світі мікробів. Ще наприкінці XIX ст. Л. Пастер та І.І. Мечников відмічали, що деякі мікроби можуть бути дійовими у боротьбі з патогенними та іншими бактеріями, а у 1872 р. російські дослідники О.Г. Полотебнов і

В.А. Манасеїн уперше використали лікувальні властивості зеленої цвілі (*Penicillium*). У 1887 р. Є.Н. Павловський з успіхом використав живі культури *Bacterium prodigiosum* для лікування шкірних форм сибірки у кролів. У 1885 р. румунський учений В. Бабеш встановив, що антагонізм між бактеріями пов'язаний із виділенням у довкілля речовин, що завдають шкоди бактеріям іншого виду. У 1910–1913 рр. О. Блек і У. Альсберг виділили з грибів роду *Penicillium* у чистому вигляді пеніцилову кислоту, але не змогли визначити її будову.

1928 р. справедливо вважають початком ери антибіотиків — саме цього року А. Флемінг відкрив пеніцилін.

Александр Флемінг народився 6 серпня 1881 р. і був восьмою дитиною в родині фермерів. У 13 років він поїхав до брата в Лондон, де працював клерком, відвідував заняття в Політехнічній школі і після її закінчення влаштувався на службу в навігаційну компанію. Оскільки робота не задовольняла його, він вирішив вступити до медичної школи. У віці 20 років він став студентом медичної школи при лікарні Св. Марії і одночасно розпочав підготовку до університетських іспитів, які успішно склав у 1902 році. Одним із професорів у школі Св. Марії був Алмрот Райт, відомий бактеріолог, прибічник імунізації як основного методу боротьби з інфекційними захворюваннями. З 1906 р. А. Флемінг розпочав роботу в його бактеріологічній лабораторії. Він уже тоді вважав, що, крім імунізації, мають бути інші методи боротьби з інфекціями. У 1906 р. він став членом Королівського коледжу хірургів, а у 1908 р. отримав ступінь бакалавра і магістра наук у Лондонському університеті.

У часи Першої світової війни Флемінг служив армійським лікарем у Франції. Під час війни питання імунізації не виникало — поранені гинули від сепсису, правця, гангрени. Намагаючись їх врятувати, хірурги використовували антисептики. Флемінг показав, що такі антисептики, як карболова кислота, що на той час використовувалася для обробки відкритих ран, спричиняють загибель лейкоцитів, які створюють захисний бар'єр, що сприяє виживанню бактерій у тканинах.

Відтоді він розпочав пошуки речовини, що вбиває мікробів, але не шкідлива для людського організму. Першим відкриттям на цьому шляху став лізоцим — антисептик, притаманний

самому людському організму. Наприклад, сльози, які містять лізоцим, є чудовою антибактеріальною речовиною, що природно захищає наші очі від мікробних небезпек. До речі, саме досліді із сльозами допомогли Флемінгу відкрити лізоцим. У цього відкриття А. Флемінга виявилось досить перспективне майбутнє: лізоцим незамінний у запобіганні гниттю харчових продуктів. Крім того, лізоцим широко застосовують у разі кишкових та очних захворювань. Та все ж він був безсилий проти багатьох хвороботворних мікроорганізмів.

Після відкриття лізоциму А. Флемінг продовжував серйозно і невтомно працювати, іноді по 16 год на добу. Лише в 1928 р. він, сам того не підозрюючи, впритул наблизився до головного відкриття свого життя. А сталося це так.

На відміну від своїх колег, учений не викидав культури по кілька тижнів доти, поки його лабораторний стіл не ставав зараженим і лише тоді брався за прибирання. Не дивно, що роблячи прибирання в черговий раз, він побачив, що багато культур були зіпсовані пухнастою, схожою на шерсть кошениати, пліснявою. Але замість того, щоб викинути зіпсовані культури, Флемінг став уважно досліджувати їх. Він раптом помітив, що колонії стафілококів навкруги плісняви розчинились і замість жовтої мутної маси виднілися краплі, що нагадували росу. Це явище дуже зацікавило Флемінга. Тепер необхідно було визначити вид плісняви. Флемінг встановив, що його чудодійна пліснява належить до *Penicillium notatum* — виду, який уперше знайдено на гнилому ісопі (напівчагарниковій рослині, що містить ефірну олію). Зважаючи на такий поворот подій, Флемінг як глибоко віруюча людина радісно вигукнув: «Окропи мене ісопом, і буду чистим» (слова 50-го Псалма Біблії). Таким було перше в історії згадування пеніциліну.

Відділення вакцинації у лікарні Св. Марії, де працював Флемінг, існувало завдяки продажу вакцин. Флемінг виявив, що в процесі приготування вакцин пеніцилін допомагає захистити культури від стафілокока. Флемінг широко користувався цим технічним досягненням, щотижня даючи розпорядження приготувати великі партії бульйону. Від ділився зразками культури пеніциліну з колегами в інших лабораторіях, але ні разу не згадав пеніцилін у жодній з лекцій або статей, надрукованих ним

у 1930 – 1940 рр. Флемінг А. був скептично налаштований щодо свого дітища, заявивши, що «цим не варто займатися», коли Е. Чейн і Г. Флорі звернулися до нього з пропозицією дослідити діючу речовину з плісняви. 25 травня 1940 р. було завершено перший тест антибактеріальної «протекції» пеніциліну на мишах. Потім настав біохімічний тріумф Е. Чейна, який показав, що пеніцилін має структуру беталактаму. Залишилося лише налагодити виробництво нових ліків.

Чейн Е. вимагав патентування пеніциліну, оскільки досвід його батька доводив необхідність цієї юридичної операції. Але Г. Флорі не дослухався його. Він довів, що на фоні військових зусиль союзників неетично «закривати» пеніцилін патентними рогатками. Флорі Г. вирішив налагоджувати виробництво пеніциліну в Америці, оскільки там, завдяки роботам З. Ваксмана, було розроблено основи культивування мікроорганізмів для отримання антибіотиків. Разом з Г. Флорі за океан виїхав Н. Хетлі, експерт-технолог, який бачив дію пеніциліну в Оксфордї. Весною 1942 р. він уже працював в «Мерк», підказуючи американцям тонкощі напрацювання пеніциліну. Технологи «Мерк» вели на той час технологію «глибинних культур» у гігантських ферментерах, чого ще не було в Оксфордї, де працювали з поверхневими культурами з їх невеликим виходом продукту.

У 1945 р. А. Флемінг, Е. Чейн і Г. Флорі відзначені званням лауреатів Нобелівської премії в галузі фізіології та медицини «за відкриття пеніциліну і його цілющої дії під час різноманітних інфекційних хвороб», саме тоді, коли завершилась війна, в якій своїми життями пеніциліну завдячували мільйони людей. У 1944 р. Флемінга удостоєно лицарського звання. В 1947 р. він очолив створений при лікарні Св. Марії Інститут Райта-Флемінга, в 1951 – 1954 рр. був ректором Единбурзького університету. В останні 10 років життя Флемінга відзначено 25 почесними ступенями, 26 медалями, 18 преміями, 13 нагородами і почесним членством у 89 академіях наук і наукових товариствах. Але слава не запаморочила йому голову. Александер Флемінг ніколи не вважав винайдення пеніциліну своєю заслугою, вважаючи, що дослідник був лише випадковим спостерігачем того, що створив Бог.

Після смерті дружини в 1949 р. стан здоров'я А. Флемінга різко погіршився. 11 березня 1955 р. він помер від інфаркту міо-

карда. Його поховали у соборі Св. Павла в Лондоні, поруч із найшанованішими британцями. Пеніцилін так і залишився незапатентованим. Учені, які отримали за відкриття Нобелівську премію, відмовились отримувати патенти. Вони вважали, що речовина, яка може врятувати людство, не повинна стати джерелом доходу. Ймовірно, це єдине відкриття такого масштабу, на яке ніхто і ніколи не мав авторських прав.

Термін «антибіотики» належить ученому українського походження З. Ваксману (1942 р.). У 1944 р. Ваксман виділив із ґрунту стрептоміцети, які синтезують антибіотик. За це відкриття він був нагороджений у 1952 р. Нобелівською премією. Стрептоміцин використовувався для лікування туберкульозу.

З 1940 по 1970 рр. щорічно відкривалося та вивчалось понад 200 антибіотичних речовин. Від середини 1960-х років у зв'язку зі складністю виділення ефективних антибіотиків і виникненням явища резистентності до найпопулярніших антибіотичних речовин у певної кількості патогенних мікроорганізмів дослідники перейшли від пошуку нових антибіотиків до модифікації вже відомих. Паралельно і безперервно тривали роботи з удосконалення активних штамів продуцентів, а також технологічних процесів отримання антибіотичних речовин. Було використано генетичний скринінг. Внаслідок мутації виникали високоактивні штами, але ті мутанти, що утворилися, синтезували лише частину молекули антибіотика, а решта молекули мала бути в поживному середовищі. Це була форма мутаційного біосинтезу, яка привела до відкриття нових похідних антибіотиків.

Спочатку пеніцилін отримували за культивування гриба-продуцента поверхневим способом на рідких поживних середовищах. Собівартість пеніциліну була надзвичайно високою: 227270 доларів за 1 кг. У 1980-х роках собівартість пеніциліну становила 16 доларів.

Загальна кількість відомих антибіотиків до 2000 року становила приблизно 15,8 тис. найменувань. З них у медичній практиці використовується лише 200 природних сполук. Більшість антибіотиків у медицині не використовуються через їх токсичність, інактивацію в організмі хворого та з ряду інших причин.

Щороку в світі виробляється 100 тис. т антибіотиків. Серед інших лікарських засобів, що використовуються в медичній

практиці, вони становлять 30 %. Щорічно вчені відкривають 100–200 нових антибіотиків. За оцінками експертів на сьогодні розроблення нового антибіотика, від пошуку продуценту до впровадження готового продукту в практику, потребує затрат від 300 до 500 млн американських доларів.

1.1.2. Біологічне значення антибіотиків

Утворення антибіотичних речовин — одна з форм мікробного антагонізму. Це важливе явище для існування мікроорганізмів у природних умовах.

Антагонізм — одна з різноманітних форм взаємовідносин мікроорганізмів, що існують у природних умовах. Вони характеризуються тим, що один із видів мікробів так чи інакше затримує ріст інших мікроорганізмів.

Антагонізм дуже поширений серед різних груп мікроорганізмів. Залежно від причини, що зумовила прояв антагоністичних властивостей мікроорганізмом, всі відомі форми антагонізму можна поділити на дві групи: пасивний і активний антагонізм.

Пасивний антагонізм полягає в тому, що пригнічення росту одного виду мікроорганізмів іншим може відбуватися лише за певних, іноді дуже обмежених умов розвитку цих організмів. Такі умови зазвичай спостерігаються у разі лабораторного культивування мікроорганізмів. У природних умовах росту подібного прояву антагонізму, як правило, не відбувається. Прикладом пасивного антагонізму є конкуренція за поживні речовини у процесі сумісного розвитку різних видів.

За активного антагонізму пригнічення росту чи повне припинення життєдіяльності одного виду мікробів іншим відбувається в результаті збагачення середовища продуктами обміну, що виділяються організмами у процесі розвитку. За певних концентрацій таких продуктів метаболізму організми, що їх продукують, можуть вільно розвиватися.

До активного антагонізму належать: утворення мікробами органічних кислот, спиртів чи інших продуктів обміну в результаті використання окремих компонентів субстрату; утворення та виділення в середовище антибіотичних речовин.

Найсуттєвішою формою антагонізму є утворення специфічних продуктів обміну, що пригнічують розвиток інших видів.

Явище антагонізму може бути використано в практиці охорони здоров'я і сільського господарства. Живі мікроби-антагоністи використовують для боротьби з дисбактеріозами, для терапії і профілактики різних інфекційних захворювань.

Необхідно також зазначити, що функції антибіотиків різняться залежно від того, де вони накопичуються: усередині мікробної клітини чи зовні. Очевидно, що значення антибіотиків у такому разі для їх продуцентів неоднакове. Антибіотики, які накопичуються всередині клітини, суттєвіші для фізіології їхнього продуцента, ніж ті, що екскретуються зовні. В одних випадках антибіотики є захисним фактором, в інших – беруть участь у морфогенезі (утворенні спор), або є регуляторами ензиматичних реакцій. Наприклад, антибіотик грамїцидин, що майже повністю накопичується всередині клітин, бере участь у процесах відтворення виду. У процесі формування спор він переходить у них із вегетативних клітин. У процесі проростання спор під впливом особливого ферменту грамїцидинази він розкладається до амінокислот, які використовуються новими клітинами для синтезу білка. Бацитрацин бере участь у транспортуванні Mn^{+2} та, можливо, Co^{+2} в клітинах. Зважаючи на це, можна стверджувати, що біологічна роль антибіотиків не вичерпується їх участю в явищах антагонізму, а є набагато ширшою.

1.1.3. Сфери застосування антибіотиків

Антибіотики найдзвичайно різноманітна та численна група сполук, яка застосовується в багатьох галузях. Основні галузі застосування антибіотиків:

1. Медицина — лікування інфекційних хвороб, які були невиліковними (туберкульоз, чума, бруцельоз, пневмонії, септичні процеси), певних форм злоякісних пухлин;

Вимоги до антибіотичних речовин, що використовуються в медичній практиці:

1) відсутність або низький рівень токсичності препарату та продуктів його розпаду в організмі;

2) висока лікувальна ефективність за мінімальних концентрацій (10–30 мкг/мл);

3) повільний розвиток резистентності в процесі приймання препарату;

4) добра розчинність у воді. Стабільність за звичайних умов зберігання;

5) збереження антимікробної дії в різних фізіологічних рідинах і тканинах організму;

6) антибіотик не повинен пригнічувати імунні реакції організму;

7) доступність і дешевизна для споживача.

2. Сільське господарство — як лікувальні препарати у тваринництві, птахівництві, бджільництві, рослинництві, деякі антибіотики є стимуляторами росту тварин.

Антибіотики для кормових цілей використовуються у рецептурі преміксів у вигляді неочищених препаратів — сухої біомаси продуцента, яка містить різні амінокислоти, ферменти, вітаміни. До сільськогосподарських антибіотиків належить, наприклад, хлортетрациклін, або біовіт, бацитрацин і гризин. Боротьба з фітопатогенними мікроорганізмами полягає у використанні таких антибіотиків, як тетрациклін, гризеофульвін. Основна вимога до цих препаратів: вони не повинні використовуватись у медичних цілях.

3. Консервна промисловість — для знищення клостридіальних і термофільних бактерій, стійких до стерилізації. В харчовій промисловості використовують нізин, який знищує термофільні бактерії, що дає змогу уникнути термообробки під час консервування.

4. Діагностичні цілі — оскільки деякі з антибіотиків характеризуються виключною специфічністю, їх можна використати для ідентифікації мікроорганізмів.

5. Наукові дослідження — як специфічні інгібітори певних етапів метаболізму антибіотики використовують для вивчення окремих етапів метаболізму.

1.1.4. Класифікація антибіотиків

Класифікація антибіотиків за біологічним походженням

1. Утворювані мікроорганізмами, що належать до еубактерій:
а) представниками роду *Pseudomonas* — піскозин, піоціанін;

б) представниками родів *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Escherichia*, *Proteus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* — нізін, коліформін;
в) представниками роду *Brevi i Bacillus* — граміцидин, поліміксин, субтилін.

2. Утворювані мікроорганізмами, що належать до порядку *Actinomycetales*:

а) представниками роду *Streptomyces* — стрептоміцин, тетрациклін, актиноміцин;

б) представниками роду *Saccharopolyspora* — еритроміцин;

в) представниками роду *Nocardia* — рифампіцин;

г) представниками роду *Actinomadura* — карміноміцин;

д) представниками роду *Micromonospora* — гентаміцин, фортиміцин.

3. Утворювані ціанобактеріями — малінголід.

4. Утворювані недосконалими грибами (мікроміцетами): представниками роду *Penicillium* — пеніцилін, гризеофульвін; *Trichotecium roseum* — трихотецин; *Acremonium chrysogenum* — цефалоспорин.

5. Утворювані базидіо- та аскоміцетами — хетомін, термофілін.

6. Утворювані лишайниками, водоростями і нижчими рослинами: уснінова кислота (лишайник *Usnea florida*).

7. Утворювані вищими рослинами — аліцин, госсипол, фазеолін.

8. Тваринного походження — лізоцим, екмолін, інтерферон (за класифікацією Егорова, 2004).

Класифікація антибіотиків за спектром біологічної дії

1. Протибактеріальні вузького спектра дії, переважно активні до грампозитивних мікроорганізмів.

1.1. Біосинтетичні пеніциліни — бензилпеніцилін та його калієва, натрієва і новокаїнова солі.

1.2. Напівсинтетичні пеніциліни — кислотостійкі, неактивні щодо утворювальних β -лактамазу стафілококів — пропіцилін та активні щодо утворювальних β -лактамазу стафілококів — оксацилін.

1.3. Напівсинтетичні цефалоспори́ни — цефалексин, цефалотин.

1.4. Лінкоміцин.

1.5. Новобіоцин.

1.6. Макроліди — еритроміцин, олеандоміцин.

2. Протибактеріальні широкого спектра дії.

2.1. Тетрацикліни біосинтетичні — хлортетрациклін, окситетрациклін, тетрациклін, деметилхлортетрациклін і деметилтетрациклін.

2.2. Напівсинтетичні тетрацикліни — метациклін, доксициклін.

2.3. Хлорамфенікол (левоміцетин).

2.4. Аміноглікозиди — стрептоміцин, неоміцин, гентаміцин.

2.5. Поліміксини.

2.6. Граміцидини.

2.7. Напівсинтетичні пеніциліни — ампіцилін, карбеніцилін.

3. Протитуберкульозні — стрептоміцин, канаміцин, цикloserин.

4. Протигрибкові — ністатин, гризеофульвін, трихотецин.

5. Протипухлинні — для клінічного використання на сьогодні допущено лише декілька антибіотиків: з групи антрациклінів — доксорубіцин (адріанаміцин), акларубіцин і рубоміцин (даунорубіцин); з групи актиноміцинів — актиноміцини С і Д; з групи ауреолової кислоти — олівоміцин; з групи стрептонігрину — брунеоміцин.

6. Протиамебні — фумагілін.

7. Противірусні препарати, передусім інтерферони, активні проти ДНК- і РНК-вмісних вірусів. Інших антибіотиків з широкою противірусною активністю поки що не знайдено. Проте синтезовано різні хімічні сполуки, що характеризуються противірусною активністю. Наприклад, амантадин і ремантадин пригнічують розмноження вірусу грипу; ацикловір і ганцикловір — вірусів герпесу; азидотімідин — вірусу СНІДу.

Класифікація антибіотиків за механізмом біологічної дії

1. Інгібують синтез клітинної стінки — пеніциліни, цефалоспори́ни, бацитрацини.

2. Порушують функції мембран — валіміцин, грамїцидин, ністатини.

3. Вибірково пригнічують синтез і обмін нуклеїнових кислот.

3.1. Пригнічують синтез РНК — актиноміцин, гризеофульвін, канаміцин.

3.2. Пригнічують синтез ДНК — мітоміцини, саркоміцин, новобіоцин.

4. Пригнічують синтез пуринів і піримідинів — азосерин.

5. Пригнічують синтез білка — бацитрацини, тетрацикліни, хлорамфенікол, еритроміцин.

6. Інгібують процеси дихання — олігоміцини, уснінова кислота.

7. Інгібують окислювальне фосфорилування — валіноміцини, грамїцидини.

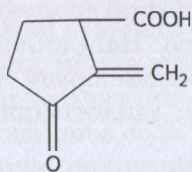
8. Мають антиметаболітні властивості — D-циклосерини, ацидоміцин.

9. Імуномодулятори — циклоспорини, рубоміцин.

Класифікація антибіотиків за хімічною структурою

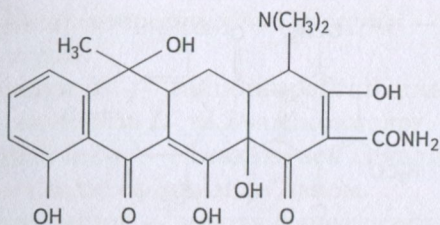
1. Ациклічні — залежно від будови до них належать такі основні групи: жирні кислоти, ацетилени, полієни, сірко- та азотвмісні сполуки. Характерна особливість полієнових антибіотиків — наявність системи, що містить від трьох до восьми спряжених подвійних зв'язків. Багато антибіотиків цієї групи містять аміносахар, окремі речовини в структурі мають іншу азотвмісну структуру — ароматичні кетони.

2. Аліциклічні — містять похідні циклопентану (саркоміцин), циклогексану та циклогептану.



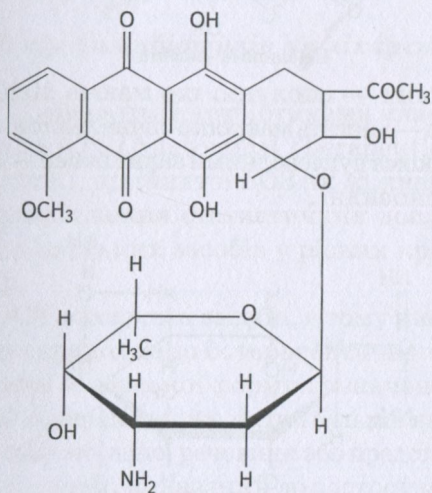
Саркоміцин

3. Тетрацикліни — сполуки, близькі за своєю будовою, в основі яких є тетрациклін.



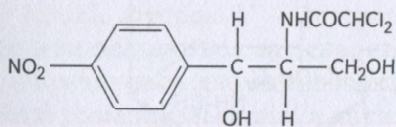
Тетрациклін

4. Хінони — бензохінони, нафтохінони, антрахінони.

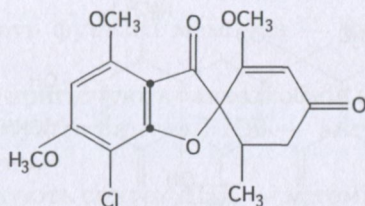


Дауноміцин

5. Ароматичні — похідні бензолу, ароматичні небензольні сполуки.

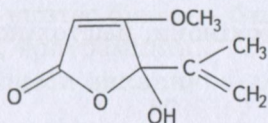


Хлорамфенікол



Гризеофульвін

6. Кисневмісні гетероциклічні сполуки.

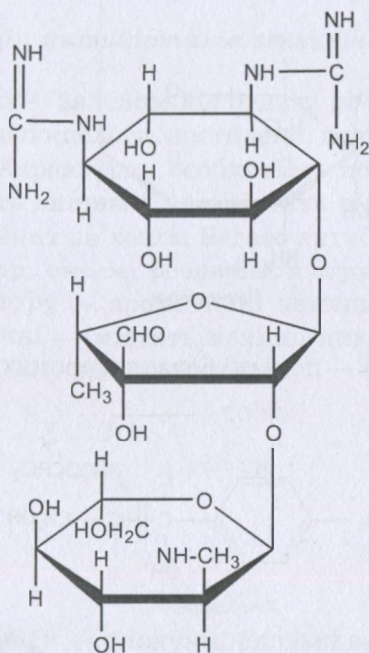


Пеніцилова кислота

7. Олігоміцини — сполуки, що мають дієнову систему.

8. Макроліди — містять макроциклічне лактонне кільце, зв'язане з одним або кількома вуглеводними залишками — аміносахарами.

9. Аміноглікозидні.



Стрептоміцин

10. Азотвмісні гетероциклічні сполуки — містять складні кільчасті структури.

11. Поліпептиди — найпоширеніші циклопептиди, що складаються із залишків *L*- та *D*-амінокислот.

12. Депсипептиди — складаються із залишків амінокислот, з'єднаних складноефірним зв'язком.

13. Актиноміцини — мають феноксазинову хромофорну групу та різні депсипептидні ланцюги.

14. Стрептотрицини — різняться циклічною структурою та різним вмістом амінокислотних залишків.

15. Металвмісні сполуки — містять залізо та мідь.

Класифікація антибіотиків як лікарських препаратів

Лікарські препарати з антибіотиками класифікуються відповідно до системи АТС (Anatomical Therapeutic Chemical (ATC) classification system), прийнятої ВОЗ як міжнародний стандарт методології для здійснення статистичних досліджень у галузі використання лікарських засобів у різних країнах. Розроблена ВОЗ у 1969 р.

У системі АТС лікарські засоби, в тому числі антибіотики, класифікуються відповідно до їх терапевтичного використання. Для кожної готової лікарської форми визначено лише один код АТС. Лікарський препарат може мати і більше як один код, якщо він містить різні дози активної речовини або представлений в декількох лікарських формах, показання до застосування яких різні.

За АТС всі лікарські препарати класифікують на групи, що мають п'ять різноманітних рівнів:

1) складається з 14 базових анатомічних груп, позначених однією латинською літерою — від А до V, яка в коді стоїть першою. Наприклад, літерою В позначають препарати, засоби, що впливають на систему крові, літерою V — різноманітні алергени;

2) групи, що розподіляються за основним терапевтичним застосуванням і позначаються двома арабськими цифрами, починаючи з 01. У коді розміщується після латинської літери. Наприклад, В03 — антианемічні засоби;

3) уточнення коду позначається латинською літерою. Наприклад, В03А — препарати заліза;

4) ще більше уточнення — латинською літерою. Наприклад, В03АА — препарати двовалентного заліза;

5) група за хімічною структурою позначається двома цифрами. Наприклад, В03АА07 — сульфат заліза.

Для кожної готової лікарської форми визначено тільки один код АТС, наприклад, протигрибкові препарати місцевого застосування — D01АА, гризеофульвін (ЗАТ НВЦ «Борщагівський ХФЗ») — Griseofulvin — D01АА08, поліміксин (ВАТ «Київмед-препарат») — D01АА09.

1.1.5. Резистентність мікроорганізмів до дії антибіотиків

Уперше стійкість мікроорганізмів до антибіотиків учени та лікарі виявили в 1950 р., майже відразу після початку широкого використання цих ліків.

У 1967 р. описано перший випадок пеніцилінстійкої стрептокової пневмонії. У 1980 р. 3–5 % стрептококів, що спричиняли пневмонію, були стійкими до пеніциліну, до 1998 р. 34 % стрептококів набули резистентності до цього антибіотика. Стійкість до тетрацикліну серед нормальної мікрофлори людини становила 2 % у 1950 р. і 80 % у 1990 р. У 1992 р. у США від інфекційних хвороб, спричинених стійкими формами бактерій, померло 133 тис. хворих.

Існує два типи стійкості до антибіотиків: природна і набута.

Природна стійкість є видовою ознакою. Вона притаманна всім представникам даного виду і не залежить від первинного контакту (контактів) з даним антибіотиком, в її основі немає ніяких специфічних механізмів. Найчастіше така резистентність пов'язана з відсутністю мішеней для даного антибіотика і зумовлена дуже слабкою проникністю клітинної стінки або цитоплазматичної мембрани або іншими причинами.

Набута стійкість виникає в окремих представників даного виду бактерій лише в результаті зміни їх геному. Можливі два варіанти генетичних змін. Один з них пов'язаний з мутаціями в тих чи інших генах бактеріальної хромосоми, внаслідок чого продукт активованого гена, перестає бути мішенню для даного антибіотика. Це відбувається або через зміну структури білка, або через недоступність для антибіотика.

В іншому разі бактерії стають стійкими до одного або декількох антибіотиків завдяки отриманню додаткових генів, носіями яких є R-плазміді.

Набуваючи стійкості до антибіотика, а тим більше до кількох антибіотиків, такі бактерії отримують значні переваги: завдяки селективному тиску антибіотиків чутливі до них штами даного виду витісняються, а стійкі варіанти виживають і починають відігравати головну роль в епідеміології даного захворювання. Саме тому вони і стають джерелами формування тих клонів, які забезпечують епідемічне поширення збудника. Вирішальну роль у поширенні стійкості, в тому числі і множинної, відіграють R-плазміді завдяки їх здатності до самоперенесення.

Основні механізми стійкості до антибіотиків:

1. Руйнування молекули антибіотика. Цим зумовлена стійкість до β -лактамних антибіотиків. β -лактамази, руйнуючи структуру пеніцилінів і цефалоспоринів, забезпечують резистентність бактерій до них.

2. Модифікація структури молекули антибіотика, в результаті якої втрачається його біологічна активність. Гени, що містяться в R-плазмідах, кодують білки, які спричиняють різні модифікації молекул антибіотиків їх ацилюванням, фосфорилуванням або аденілуванням. Саме таким чином інактивуються аміноглікозиди, макроліди, хлорамфенікол, кліндаміцин та інші антибіотики. Існують цілі родини генів, що визначають інактивацію того чи іншого антибіотика за даним механізмом. Наприклад, серед клінічних штамів грампозитивних і грамнегативних бактерій виявлено різні ізоферменти аміноглікозидфосфотрансфераз та аміноглікозидацетилтрансфераз, що забезпечують стійкість бактерій до аміноглікозидних антибіотиків.

3. Зміна структури чутливих до дії антибіотика мішеней. Зміна структури білків рибосом 70S є основою резистентності до стрептоміцину, аміноглікозидів, макролідів, тетрациклінів. Зміна структури бактеріальних гіраз (ферментів, що відповідають за нормальний розподіл двониткової ДНК при її реплікації) внаслідок мутацій призводить до формування стійкості до хінолів, РНК-полімерази — до рифампіцину.

4. Утворення бактеріями «обхідного» шляху метаболізму для біосинтезу білка-мішені, нечутливого до дії даного препарату. Цим зумовлена стійкість до сульфаніламідних препаратів.

5. Формування механізму активного виведення антибіотика, внаслідок чого він не встигає досягти мішені.

Незвичний механізм стійкості до ізоніазиду виявлено у *M. tuberculosis*. Дія ізоніазиду залежить від наявності у бактерій плазміди, яка несе ген ферменту, що перетворює неактивний ізоніазид в активну форму, яка руйнує бактеріальну клітину. Втрата цього гена зумовлює стійкість *M. tuberculosis* до ізоніазиду.

Стійкість до одного антибіотика може реалізовуватися різними шляхами. Так, існують три типи стійкості до тетрацикліну:

1. Стійкість, що визначається виводом тетрацикліну з клітини білком цитоплазматичної мембрани.
2. Стійкість, що зумовлюється зміною структури білка мішені рибосом.
3. Стійкість, що пов'язана з модифікацією тетрацикліну в неактивну форму.

Отже, на потужний натиск людини на бактерії завдяки антибіотикам вони відповіли унікальними біологічними реакціями, сила яких не поступається силі «атаки». З появою кожного нового антибіотика з'являлися резистентні до нього штами бактерій. Цей процес відбувається постійно.

Постає питання щодо джерел формування стійкості до антибіотиків. Оскільки стійкість формується на генетичному рівні, то йдеться про появу нових генів. Стійкість, що виникає внаслідок мутації може бути пояснена і зрозуміла. Але не вона відіграє основну роль. Основну роль у формуванні резистентності до лікарських препаратів відіграють гени, що містяться в R-плазмідах. Такі гени не можуть формуватися відразу наново, в природі має існувати своєрідний фонд генів лікарської стійкості, звідки бактерії зможуть отримувати ті гени, які необхідні для даної ситуації.

Найвірогіднішим є формування такого генофонду за рахунок генів, що є у продуцентів антибіотиків, кожен з яких захищений від дії антибіотика, що ним синтезується. Тобто, скільки б не було антибіотиків, проти кожного з них є механізм самозахисту, або ген стійкості до даного антибіотика. Останніми роками доведена можливість горизонтального обміну генетичною інформацією, яка і надає можливість передавати гени стійкості до організмів, які не синтезують даний антибіотик. Вирішальну

ж роль у поширенні генів резистентності серед збудників інфекційних хвороб відіграє сам антибіотик.

Значна відповідальність за поширення стійкості до антибіотиків лежить на виробниках м'яса тварин і птиці. На сучасних фермах тварини отримують у 30 разів більше антибіотиків, ніж людина.

ВОЗ вважає проблему формування стійкості до антибіотиків однією з глобальних проблем людства.

Одже, пошук нових антибіотиків має бути спрямовано на розроблення таких, що мають іншу молекулярну структуру та інші мішені в бактеріальній клітині, мають новий механізм транспортування в бактеріальну клітину, нечутливі до дії захисних ферментів і не індукували їх синтез, відповідають усім вимогам до антибіотиків.

Контрольні запитання до підрозділу 1.1

1. Дайте визначення поняття «антибіотик».
2. Назвіть учених — першовідкривачів антибіотиків.
3. Викладіть основні принципи класифікації антибіотиків.
4. Які механізми забезпечують вибірковість дії антибіотиків?
5. Опишіть форми антагонізму у мікробному світі.
6. Які об'єктивні причини пошуку і дослідження нових антибіотиків?
7. Наведіть основні механізми резистентності мікроорганізмів до дії антибіотиків.
8. Назвіть природні джерела генів стійкості до антибіотиків.
9. Які явища сприяють швидкому поширенню стійкості до антибіотиків?
10. Охарактеризуйте антибіотики, які можуть бути використані в медицині.
11. Наведіть приклади протибактеріальних антибіотиків вузького спектра дії, активних до грампозитивних мікроорганізмів. Опишіть механізм їх дії.

1.2. ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ АНТИБІОТИКІВ

1.2.1. Одиниці біологічної активності антибіотиків

Величину біологічної активності антибіотиків (антибактеріальної, протигрибкової і т.ін.) зазвичай виражають в умовних

одиницях, що містяться в 1 мл розчину (од./мл) чи в 1 мг препарату (од./мг). За *одиницю антибіотичної активності* беруть мінімальну кількість антибіотика, здатну пригнічувати розвиток чи затримувати ріст певної кількості клітин стандартного штаму тест-мікроба в одиниці об'єму поживного середовища.

За одиницю антибіотичної активності бензилпеніциліну взято мінімальну кількість препарату, здатну затримувати ріст золотистого стафілокока *Staphylococcus aureus* (штам 209) в 50 мл поживного бульйону. Для стрептоміцину одиниця активності буде інша: мінімальна кількість антибіотика, що затримує ріст *E. coli* в 1 мл поживного бульйону.

Після отримання антибіотиків у хімічно чистому вигляді з'явилася можливість для низки антибіотиків виразити умовні одиниці біологічної активності в одиницях маси. Встановлено, наприклад, що 1 мг чистого стрептоміцину еквівалентний 1000 од. біологічної активності. Відповідно 1 од. активності даного антибіотика еквівалентна 1 мкг чистого стрептоміцину. Тому на сьогодні кількість стрептоміцину здебільшого виражають у мкг/мл чи мкг/мг.

У таких антибіотиків, як карбоміцин, еритроміцин, ністатин, трихотецин, 1 од. активності еквівалентна чи приблизно еквівалентна 1 мкг речовини. Але у більшості антибіотиків одиниця біологічної активності значно відрізняється від 1 мкг речовини. Для бензилпеніциліну 1 од. активності еквівалентна приблизно 0,59 мкг, тобто 1 мг антибіотика містить 1667 од. активності. Відповідність одиниці біологічної активності масі, мкг, для деяких антибіотиків така:

| | |
|--------------------------------|--------|
| Бензилпеніциліну натрієва сіль | 0,5988 |
| Оксацилін (кислота) | 1,0 |
| Стрептоміцин (основа) | 1,0 |
| Стрептоміцин (сульфат) | 1,25 |
| Хлортетрациклін (гідрохлорид) | 1,0 |
| Поліміксин В | 0,1 |
| Тетрациклін (гідрохлорид) | 1,0 |
| Новобіоцин | 1,0 |
| Еритроміцин (основа) | 1,0 |
| Олеандоміцин (основа) | 1,0 |
| Неоміцин (основа) | 1,0 |
| Канаміцин (основа) | 1,0 |
| Циклосерин | 1,0 |

У вивченні умов утворення антибіотиків і дослідженні впливу різних факторів на біосинтез антибіотиків важливим критерієм оцінювання активності є характеристика антибіотичної продуктивності організмів.

Антибіотичною продуктивністю організму називають кількість антибіотика, мкг або од., що утворюється 1 мг сухих клітин (або міцелію) досліджуваного організму за певний проміжок часу (1 год). Антибіотична продуктивність організму виражається в мкг/(мг·год) або в од./ (мг·год).

1.2.2. Визначення антибіотичної активності мікроорганізмів

Після того як мікроб-антагоніст ізольований із природного середовища, виникає потреба у визначенні його антибіотичної активності.

Антибіотичні властивості мікроорганізмів вивчають за культивування їх на твердих (агаризованих) чи в рідких середовищах. Визначення антибіотичної активності мікроорганізмів на твердих середовищах здійснюється методом перпендикулярних штрихів або методом агарових блоків, на рідких поживних середовищах — методом паперових дисків.

Метод перпендикулярних штрихів. Досліджуваний організм висівають штрихом (полоскою) на поверхню агарової пластинки в чашці Петрі. Після того як досліджувана культура виросте на середовищі, перпендикулярно до її штриха підсівають тест-організми. Чашки інкубують упродовж 20–24 год. Якщо досліджуваний організм характеризується антимікробною дією щодо тест-організму, то останні будуть рости лише на відстані від штриха антагоніста (рис. 1.1). Нечутливі мікроорганізми будуть розвиватися безпосередньо біля штриха досліджуваного організму.



Рис. 1.1. Визначення антибіотичної активності мікроорганізмів методом перпендикулярних штрихів (Егоров, 2004)

Недолік методу: використання одного поживного середовища для досліджуваного організму і тест-організмів. Іноді для утворення антибіотика і росту продуцента необхідне середовище, що відрізняється від оптимального для росту тест-організмів.

Метод агарових блоків. Досліджуваний організм висівають суцільним газоном на поверхню агаризованого середовища. При цьому використовують оптимальне для росту і утворення антибіотика середовище. Після того як досліджуваний організм добре виросте, свердлом (діаметр 8 мм) вирізають агарові блоки, які переносять на поверхню іншого агаризованого середовища, попередньо засіяного одним із тест-організмів. В одній чашці Петрі можна розміщувати 5–7 агарових блоків.

Чашки з агаровими блоками культивують 20–24 год і відмічають наявність зони відсутності росту тест-організму навколо блока.

Метод паперових дисків. Диски з фільтрувального паперу діаметром 8 мм стерилізують в автоклаві під тиском 10^5 Па протягом 20–30 хв.

Стерильний диск беруть пінцетом і змочують у досліджуваній культуральній рідині (або екстракті). Після цього диски накладають на поверхню поживного агару, попередньо засіяного культурою тест-організму. Чашку з тест-організмом і паперовими дисками культивують при оптимальній для росту тест-організму температурі 20–24 год.

За присутності антибіотичної речовини в культуральній рідині навколо диска утворюється зона затримки росту тест-організму.

1.2.3. Визначення антивірусної дії антибіотиків

Віруси — внутрішньоклітинні паразити і тому не можуть розвиватися у вигляді чистої культури поза клітинами хазяїна. Це змушує використовувати для пошуку противірусних речовин методи, що відповідають їх особливостям.

Метод тканевих культур. Найзручнішим є метод використання шматочків хоріоалантоїдної тканини курячого ембріона.

З верхньої частини курячого яйця з 10–11-добовим ембріоном стерильними ножицями вирізають шість шматочків шка-

ралупи з прилеглою до неї тканиною хоріоалантоїдної оболонки. Шматочки тканини обережно відділяють від шкіралупи і промивають буферним розчином. Кожен такий шматочок вміщують у пробірку з 1 мл середовища такого складу, %: NaCl — 0,68, KCl — 0,04, CaCl₂ — 0,02, MgSO₄ — 0,01, NaH₂PO₄ — 0,0125, NaHCO₃ — 0,22, глюкоза — 1,0.

Крім того, в кожен пробірку додають пеніцилін (для запобігання бактеріальній контамінації). Пробірки ставлять у спеціальний барабан, що повільно обертається.

Для з'ясування антивірусної дії продуктів життєдіяльності організму шматочки тканини заражають відповідним видом вірусів і вносять до пробірки, що містить культуральну рідину цього організму. Пробірки культивують протягом 48 год.

Якщо культуральна рідина містить антивірусні речовини, то в середовищі навколо тканини не буде виявлено вірусних частинок. У разі відсутності антивірусної дії віруси будуть інтенсивно розмножуватися в клітинах тканини, що можна легко виявити методом титрування на еритроцитах.

Метод з використанням листків рослин. Для визначення антивірусної активності використовують також відносно простий метод з'ясування антивірусної дії антибіотиків щодо вірусу тютюнової мозаїки.

Мікроорганізми, активність яких досліджують, вирощують на агаризованому середовищі. Потім блоки агару вирізають свердлом і прикріплюють до листків дурману за допомогою розпавленої желатини. Листки дурману інокулюють вірусом тютюнової мозаїки. Через кілька днів спостерігають утворення на листках некрозів. Якщо в агаровому блоку міститься антивірусний препарат, навколо нього некрози не утворюватимуться.

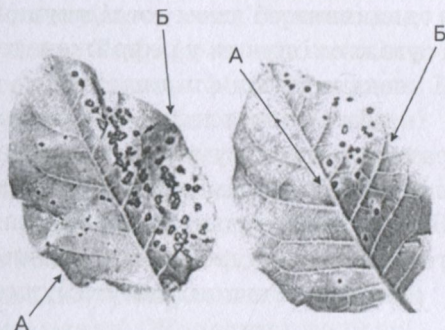


Рис. 1.2. Листки тютюну, інокульовані вірусом тютюнової мозаїки:

А — половина листка, інокульована сумішшю вірусу і культуральної рідини, антивірусна активність якої вивчається; Б — половина листка, інокульована вірусом

Якщо мікроорганізм вирощували на рідкому середовищі, то культуральну рідину змішують зі суспензією вірусів та інокують нею листя дурману або тютюну (рис. 1.2).

На половині листка, інокульованій вірусом, спостерігають утворення некрозів, на іншій половині, інокульованій сумішшю віруса і культуральної рідини мікроорганізму, антивірусна активність якого вивчається, кількість некрозів значно менша або їх немає взагалі.

1.2.4. Визначення протипухлинної дії антибіотиків

Для визначення протипухлинної активності культуральної рідини використовують безпосередньо пухлинні клітини організму експериментальних тварин, культури тканин чи вільноіснуючі в окремих порожнинах організму пухлинні (асцитні) клітини, але кінцевий висновок щодо протипухлинної дії антибіотика роблять лише після дослідів на тваринах.

Використання експериментальних тварин

Як тест-об'єкт використовують клітини асцитного раку Ерліха у мишей. Суспензію асцитних ракових клітин змішують з однаковим об'ємом досліджуваного антибіотичного препарату і суміш вміщують у рефрижератор при 4 °C на 4 год, після чого її вводять мишам підшкірно.

Для контрольних тварин замість досліджуваного препарату використовують фізіологічний розчин. Через 10 днів мишей умертвляють і визначають наявність пухлини та її розміри. Якщо досліджувана речовина знищує асцитні ракові клітини, то вони відповідно не утворюють пухлин.

Тест-об'єктом можуть бути також інші пухлинні клітини.

Використання мікроорганізмів для пошуку протипухлинних антибіотиків

Обмін речовин у пухлинних клітинах відрізняється від обміну нормальних клітин. Зокрема, різниця визначається інтенсивністю дихання, в пухлинних клітинах вона значно знижена.

Виходячи з цього висунуто припущення про можливість використання тест-об'єктів для пошуку протиракових антибіотиків мутантних мікроорганізмів зі зниженим коефіцієнтом дихання.

Після оброблення клітин стафілококів, кишкової палички та дріжджів отримано мікроорганізми, коефіцієнт дихання яких становив 20–80 % порівняно з вихідними культурами.

Треба зазначити, що біохімічні мутанти чутливіші до дії протипухлинних антибіотиків, ніж асцитні клітини Ерліха.

Використання рослинної тест-системи

Бактеріальний рак — одне з найпоширеніших і найшкідливіших захворювань рослин у багатьох країнах світу. Значне поширення бактеріального раку та його велика шкідливість вимагають пошуку нових ефективних методів боротьби з ним. Але значний інтерес до цього захворювання та його збудника пояснюється не лише його шкідливістю, а й близькістю механізмів пухлиноутворення у рослин і новоутворення у тварин і людей. Утворення пухлин — найскладніший процес, характерний для всіх багатоклітинних організмів. Серед усіх пухлин рослин тільки корончасті гали, зумовлені вірулентними штамами *Agrobacterium tumefaciens*, мають характерні біологічні особливості злоякісних пухлин, а саме: метаболітну автономію, гормонезалежний ріст і трансплантабельність. Тому їх можна вважати справжніми злоякісними пухлинами рослин — фітобластомами.

Бактерії роду *Agrobacterium* — аеробні грамнегативні неспоротвірні палички $0,6...1,0 \times 1,5...3,0$ мкм, рухливі за допомогою перитрихіально розміщених джгутиків. На КА вони утворюють вологі блискучі світло-бежеві колонії з рівним краєм. Іноді можуть утворюватися колонії шорсткої форми. Ріст на середовищах із вуглеводами супроводжується рясним утворенням позаклітинного полісахаридного слизу. Желатину не розріджують, оксидазопозитивні. Оптимальна температура росту 25–30 °С, максимальна — 37 °С. Оптимальний діапазон рН 6,0–9,0.

У клітинах вірулентних штамів *A. tumefaciens* містяться великі (200–250 т.п.н.) плазміди. Це так звані Ti (tumor inducing)-плазміди. На ДНК Ti-плазміди припадає близько 4 % усієї ДНК *A. tumefaciens*. Частина цієї плазміди, названа T-ДНК

(transferred), інтегрується в геном рослини і переносить інформацію, яка забезпечує основні пухлинні характеристики зміненим клітинам.

Останніми десятиріччями пухлини рослин, спричинені *A. tumefaciens*, стали об'єктом детального вивчення, оскільки вони є легковідтворюваною моделлю пухлинного росту, якій притаманні всі ознаки пухлин у тварин. Для скринінгу протипухлинних речовин використовують індукцію пухлиноутворення за допомогою *A. tumefaciens* на різних тест-рослинах: експлантатах коренеплодів моркви, картоплі й топінамбуру (рис. 1.3). Перевагами використання такої моделі пухлиноутворення є висока специфічність, незначна, порівняно з тваринними системами, тривалість проведення дослідів. Використання моделі індукції пухлиноутворення за допомогою *A. tumefaciens* дає можли-

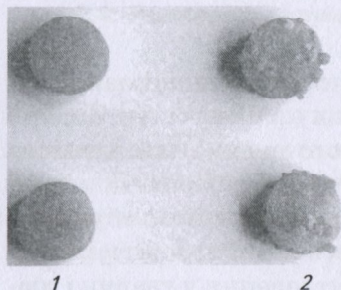


Рис. 1.3. Розвиток пухлин на експлантатах картоплі:

1 — експлантати, оброблені протипухлинною речовиною; 2 — не оброблені експлантати

вість здійснювати пошук сполук із протипухлинною активністю з мінімальними витратами та зменшити потребу у тваринних системах, які вимагають значних витрат коштів.

З літератури відомо, що протипухлинні препарати, які запобігають утворенню корончастогогалокових пухлин на експлантатах картоплі, мають також протилейкемічну активність в експериментах з мишами, хворими на лейкемію. Показано, що відомі протипухлинні речовини здатні запобігати зумовленому *A. tumefaciens* пухлиноутворенню. Деякі з цих речовин (5-йод-2'-дезоксинуридин, арабінозид цитозину) повністю пригнічують пухлиноутворення, а інші (2'-гідрокси-4',5'-диметил-4-формілазобензен у суміші з 1,2-дихлор-4-бензен-сульфонамід-5-нітробенzenом) приводять до зменшення кількості пухлин.

1.2.5. Методи кількісного визначення антибіотиків

Для визначення антибіотичної активності використовують хімічні, фізичні та біологічні методи.

Біологічні методи

Ці методи мають найбільше значення, оскільки лише прямий вплив антибіотиків на мікроорганізми дає можливість виявити антимикробну активність.

Недоліками біологічних методів є тривалість проведення аналізів, залежність точності від багатьох зовнішніх факторів.

Біологічні методи визначення антибіотичної активності можуть мати різне оформлення залежно від консистенції поживного середовища, на якому здійснюють культивування тест-штамів.

Метод послідовних розведень. Використовується для визначення кількості антибіотика в культуральній рідині, розчинах чи екстрактах.

Для роботи треба підготувати поживний бульйон, придатний для розвитку тест-організму. Неодмінною умовою є прозорість поживного середовища. Одночасно готують культуру тест-організму. Стерильний бульйон розливають у пробірки, в які вносять досліджуваній антибіотик у відповідній концентрації. Після цього всі пробірки засівають культурою тест-організму і через певний час культивування визначають наявність чи відсутність росту тест-організму.

Методом послідовних розведень отримують достовірні результати у разі дотримання умов стерильності проведення дослідів, використання постійних середовищ, внесення однакової кількості клітин тест-організму.

Іноді під дією досліджуваного антибіотика виникають стійкі до нього форми тест-організму. Поява навіть одиничних резистентних клітин, які можуть надалі розвиватися, призводить до помилкових результатів визначення біологічної активності. Для запобігання цьому явищу використовують агаризовані поживні середовища.

Радіальна дифузія антибіотика в агар, який попередньо був засіяний тест-культурою, це найпопулярніший метод для визначення активності антибіотиків на твердих поживних середовищах.

Метод досить простий і добре демонструє випадок антагоністичних взаємовідносин у світі мікроорганізмів. Він ґрунту-

ється на явищі дифузії антибіотика в поживне агаризоване середовище, внаслідок чого створюються несприятливі умови для розвитку відповідної тест-культури.

Основою цього явища є закон Фіка, згідно з яким хімічна речовина поширюється в гелі з утворенням градієнта концентрації. На процес дифузії антибіотика впливає значна кількість різноманітних факторів: сама тест-культура, утворення продуктів метаболізму, які теж дифундують в агар та ін. Тому вважаємо, що це явище ґрунтується на законі Фіка з певним припущенням.

Для отримання достовірних результатів за цим методом потрібно дотримуватися таких вимог щодо його виконання:

1) стандартність поживного середовища за складом. Якщо використовують поживні середовища на базі панкреатичних гідролізатів казеїну, дріжджових і м'ясних екстрактів, пептонів у певних пропорціях, то такі поживні середовища дуже складно стандартизувати;

2) однаковий фізіологічний стан і кількість тест-культури.

Метод з використанням металевих циліндрів. Активність антибіотиків визначають порівнянням ступеня пригнічення росту чутливих мікроорганізмів у результаті дії випробовуваного антибіотика і стандартного зразка у відомих концентраціях. Робочими стандартами в дослідженні антибіотика служать спеціальні чисті зразки препаратів, активність яких встановлюється за міжнародними стандартними препаратами. Робочі стандарти випускають і зберігають у запаяних ампулах із нейтрального скла і зберігають при температурі не вищій за 0 °С.

У чашку Петрі заливають середовище певного складу одним або двома шарами. Для нижнього шару використовують незасіяні середовища, для верхнього — агаризоване середовище попередньо засівають відповідною тест-культурою. Наприклад, для визначення активності бензилпеніциліну калієвої та натрієвої солей, оксациліну і взагалі всіх інших похідних пеніцилінових антибіотиків — тест-мікроорганізм *Staphylococcus aureus* штам 209, для хлортетрацикліну — *Bacillus subtilis* var. L2, для еритроміцину — тест-культуру *Bacillus mycoides* НВ₂ гладкої форми, для граміцидину — *Bacillus mycoides* 537 складчастої форми.

Тест-культури повинні бути внесені у певній кількості — засівній дозі, яка виражається кількістю клітин на 1 мл середовища.

Середовище повинно бути певного складу. Часто буває так, що для верхнього і нижнього шару у чашці Петрі склад середовища різний. Якщо культура — це суспензія вегетативних клітин, то температура середовища не повинна перевищувати 48–50 °С. Якщо це суспензія спор — 65–70 °С.

Після того як агар ущільниться, на його поверхню за допомогою трафарету під кутом 60° ставлять шість стерильних циліндрів із нержавіючої сталі або алюмінію (циліндри також стандартні — однакова маса, розмір — 10 мм заввишки і внутрішній діаметр 6 мм). У циліндри кожної чашки вносять по 0,1 мл стандартного розчину і розчину, що досліджується на антибіотичну активність. Після цього чашки закривають і протягом 2 год витримують при кімнатній температурі. За цей час відбувається дифузія антибіотика в агар (рис. 1.4).

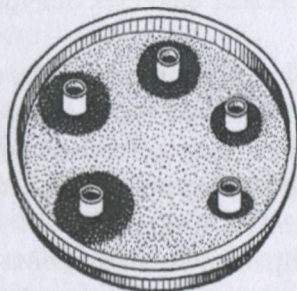


Рис. 1.4. Визначення активності антибіотиків на твердих поживних середовищах з використанням металевих циліндрів (Егоров, 2004)

Чашки ставлять для інкубації (температура 36–38 °С протягом 18 год). Після цього діаметри зон пригнічення росту, які утворились у стандартному і досліджуваному препаратах, вимірюють якомога точніше. Для вимірювання доцільно використовувати мікроскоп із відеокамерою і комп'ютером. Потім за допомогою деяких програм роблять необхідні підрахунки.

Такий метод досить затратний за тривалістю та потребує статистичної обробки, тому провадиться пошук альтернативних методів визначення антибіотичної активності, оперативніших і точніших.

Метод із використанням лунок в агарі. В агаровій пластинці роблять лунки діаметром 8 мм, використовуючи пробкове свердло. Блоки, надрізані свердлом на всю товщину агарової пластинки, видаляють стерильним скальпелем чи спеціальним гачком. В одні лунки вносять розчин досліджуваного антибіотика, в інші — його стандартні розчини.

Перевага цього методу: немає потреби в стерилізації металевих циліндрів.

Метод з використанням дисків фільтрувального паперу. На поверхню поживного середовища, засіяного тест-культурою, розкладають диски фільтрувального паперу, змочені досліджуваним розчином антибіотика та його стандартними розчинами. Промисловістю випускаються готові диски з антибіотиками.

Турбідиметричні методи

У певне поживне середовище вносять суспензію вибраних мікроорганізмів, чутливість яких до випробовуваного антибіотика така, що забезпечує достатньо сильне пригнічення їх росту за умов проведення випробування. Використовують певну кількість суспензії, яку підбирають так, щоб одержати легковимірювану каламутність після закінчення інкубаційного періоду тривалістю близько 4 год.

Готують також розчини стандартного зразка з відомими концентраціями і розчини випробовуваного антибіотика, передбачувані концентрації яких не мають істотних відмінностей від відповідних концентрацій стандартного зразка. Рівні об'єми кожного з розчинів вносять в однакові пробірки і додають у кожену пробірку однакові об'єми інокульованого середовища (наприклад, 1 мл розчину і 9 мл середовища).

Тимчасом готують дві контрольні пробірки з інокульованим середовищем, що не містить антибіотика, в одну з яких негайно вносять 0,5 мл формальдегіду. Ці пробірки використовують для регулювання оптичного приладу, за допомогою якого здійснюють вимірювання.

Пробірки ставлять на інкубацію при необхідній температурі від 3 до 4 годин. Після закінчення періоду інкубації зупиняють ріст мікроорганізмів додаванням у кожену пробірку 0,5 мл формальдегіду або тепловою обробкою, і за допомогою оптичного приладу вимірюють каламутність вмісту пробірок з точністю до третього знака. Активність розраховують із використанням відповідних статистичних методів.

Методи, що ґрунтуються на реєстрації відповідних продуктів метаболізму тест-організму

Метод ґрунтується на вимірюванні концентрації іонів металів або метаболітів, що виходять з клітини у разі порушення цитоплазматичної мембрани чутливих до антибіотиків тест-культур, бо ще одним із механізмів дії антибіотика на мікробну клітину є порушення проникності цитоплазматичної мембрани. Внаслідок цього порушення клітина втрачає життєво важливі компоненти — іони калію, магнію, АТФ.

Ці компоненти у середовищі виявляють за допомогою фізико-хімічних методів, таких як полуменева фотометрія, атомно-абсорбційна спектроскопія, радіометрія, використання іонно-селективних електродів. Наприклад, антибіотик ністатин визначають за допомогою тест-культури *Saccharomyces cerevisiae*, вимірюючи вміст іонів калію методом полуменевої фотометрії. Ністатин можна визначити також за реєстрацією іонів магнію і рубідію. Їх визначають за допомогою атомно-абсорбційної спектроскопії.

Граміцидин — тест-культура *Streptococcus faecalis*, реєструють кількість іонів рубідію за допомогою полуменевої фотометрії.

Гентаміцин — тест-культура *E. coli*, визначають кількість АТФ за допомогою методу біолюмінесценції.

Методи, що ґрунтуються на виділенні тепла або CO_2 в довкілля

Кількість виділеного тепла або CO_2 залежить від росту мікроорганізму і від інтенсивності процесів метаболізму. Запропонований метод фіксує зміну життєдіяльності мікроорганізму під впливом антибіотика. CO_2 реєструють за допомогою чутливого електрода. Щодо реєстрації виділеного тепла, то зміна тепловіддачі фіксується методом калориметрії. Тому кількість виділеного культуурою за одиницю часу тепла, CO_2 або будь-яких специфічних ферментів може бути основою для кількісного оцінювання активності антибіотика.

Активність виділення CO_2 визначають за допомогою CO_2 -чутливого електрода або радіометричним методом. Наприклад, пригнічення утворення CO_2 у суспензії клітин *E. coli* пропорційне концентрації тетрацикліну хлориду в інтервалі 33–167 мкг/мл. Перевага: висока швидкість (4 хв), простота й дешевизна.

У визначенні антибіотичної активності виділення тепла навіть невеликі зміни метаболізму пов'язані зі зміною швидкості виділення тепла, що реєструються калориметричними методами.

Вплив антибіотика на біоломінесценцію

Ґрунтується на тому, що енергетичне забезпечення біоломінесценції здійснюється через загальні метаболічні шляхи клітини. Відповідно до цього інтенсивність біоломінесценції прямо залежить як від вмісту метаболітів, що є у клітині, так і від додавання сторонніх для клітини речовин, які активно включаються у внутрішні ферментативні процеси. Так, з допомогою фотобактерій визначається активність хлортетрацикліну і граміцидину С. Визначення антибіотичної активності хлортетрацикліну ґрунтується на вимірюванні швидкості ферментативного процесу дії ферменту люциферази, тобто на вимірюванні інтенсивності світіння, чи біоломінесценції, після контакту з антибіотиком.

Хімічні та фізико-хімічні методи визначення антибіотиків

Такі методи визначення антибіотичної активності все ширше використовуються в практиці. Їх перевага в порівнянні з біологічними методами полягає в швидкому проведенні аналізів. У ряді випадків хімічні та фізико-хімічні методи поступаються біологічним методам за точністю, проте їх висока швидкість сприяє розвитку саме цього напрямку визначення антибіотичної активності.

Хімічні методи визначення кількості антибіотиків застосовуються досить рідко. Відомі кілька модифікацій визначення пеніцилінів, в основу яких покладено поглинання йоду продуктами гідролізу пеніцилінів. Використовують також ацидометричний

спосіб. У результаті розщеплення молекули пеніциліну за допомогою ферменту пеніцилінази або луку з утворенням пеніциланової кислоти відбувається звільнення однієї карбоксильної групи, яку можна врахувати методом хімічного титрування.

Досить часто застосовують колориметричні та спектрофотометричні методи визначення концентрації антибіотиків. В основу колориметричних методів покладено принцип перетворення препарату або його окремих груп у забарвлені сполуки. Спектрофотометричні методи ґрунтуються на властивостях багатьох антибіотиків давати характерний спектр поглинання у видимій або ультрафіолетовій ділянці спектра.

Контрольні запитання до підрозділу 1.2

1. У яких одиницях виражається активність антибіотиків?
2. Дайте визначення одиниці антибіотичної активності.
3. Що таке антибіотична продуктивність мікроорганізмів?
4. Які методи використовують для визначення антагоністичної активності мікроорганізмів?
5. На яких принципах ґрунтуються біологічні методи кількісного визначення антибіотиків?
6. Опишіть методи визначення протипухлинної дії антибіотиків.
7. Які методи дають можливість реєструвати протівірусну дію антибіотиків?
8. Які умови дають змогу отримати найточніші результати у визначенні активності антибіотиків біологічними методами?
9. Охарактеризуйте методи визначення антибіотиків на твердих поживних середовищах.
10. Які вимоги ставляться до тест-культур, використовуваних для визначення кількості антибіотиків?
11. Який хімічний метод визначення активності антибіотиків Вам відомий? Принцип цього методу.
12. Наведіть приклади фізико-хімічних методів визначення антибіотиків.

1.3. МІКРООРГАНІЗМИ — ПРОДУЦЕНТИ АНТИБІОТИКІВ

1.3.1. Пошук продуцентів антибіотиків

Продуценти антибіотичних речовин можуть бути ізольовані з найрізноманітніших субстратів: ґрунт, рослини і тваринні рештки, мул, вода озер і рік, повітря і т.ін. Найбагатший на організми,

що утворюють антибіотики, ґрунт. З нього найчастіше і виділяють продуценти антибіотиків.

Пошук продуцентів антибіотиків може бути спрямовано на вирішення таких завдань:

1. Виділення продуцентів уже відомих антибіотиків.

2. Пошук нових антибіотиків, здатних виявляти біологічну дію щодо конкретних організмів.

3. Виявлення продуцентів антибіотиків, що пригнічують у клітині певні мішені.

Для вирішення першого завдання потрібно враховувати, що кожен антибіотик продукується одним чи кількома певними видами організмів (кожен мікроорганізм продукує лише один або кілька антибіотиків). Утворення антибіотиків — це видова специфіка чи, точніше, особливість окремих штамів мікроорганізмів. Так, для пошуку продуцента грамїцидину С вивчають не всі бактеріальні штами, а лише штами споротвірних бактерій, що належать до виду *Bacillus*; для виділення продуцента стрептоміцину треба досліджувати стрептоміцети, що належать до виду *S. griseus*.

У разі пошуку продуцентів нових антибіотиків, активних щодо певного організму, треба досліджувати всі групи мікроорганізмів. Ізольовані з природних джерел або отримані з колекцій штами перевіряють на здатність пригнічувати ріст тест-організму, для якого шукають антибіотик.

Вирішення третього завдання — пошук нових препаратів за принципом «мішень — антибіотик» — має розпочинатися зі встановлення конкретної мішені в клітині. Для вирішення цього завдання класичні методи пошуку антибіотиків виявилися не ефективними. Продуктивнішим є використання хімічних чи біологічних модифікацій уже відомих антибіотиків. На сьогодні підходи для вирішення цього завдання лише розробляються.

Для виділення мікроорганізмів-продуцентів із природних середовищ використовують:

1. Ізоляцію чистої культури мікроорганізмів і дослідження її антагоністичного впливу на потрібний тест-організм.

2. Висівання ґрунту на поживний агар, попередньо засіяний тест-організмом. На поверхню поживного агару, засіяного тест-культурою, розкладають шматочки ґрунту (розміром, як зернина). Чашки культивують у термостаті і через певний проміжок часу

(24 – 48 год) проглядають шматочки ґрунту і відмічають ті, навколо яких утворилися зони затримки росту тест-організму. З цих шматочків ізолюють чисті культури і досліджують їх властивості.

3. Поживні середовища, які містять антибіотики. У разі додавання антибіотиків до середовищ для культивування мікроорганізмів звичайна мікрофлора пригнічується і створюються умови для розвитку стійких до цих антибіотиків форм мікробів, серед останніх можуть бути виявлені види, що синтезують антибіотики.

Головним у пошуку продуцентів антибіотиків є виділення їх із природних джерел. Водночас для цих цілей широко використовують метод зміни геному виділеного продуцента антибіотика шляхом мутагенезу чи методами генної інженерії.

Мікроорганізми, що є продуцентами найпоширеніших антибіотиків:

| <i>Мікроорганізм-продуцент</i> | <i>Антибіотик</i> |
|--------------------------------|-------------------|
|--------------------------------|-------------------|

Бактерії

| | |
|-------------------------------|------------|
| <i>Brevi bacillus</i> | Грамцидин |
| <i>Bacillus licheniformis</i> | Бацитрацин |
| <i>Bacillus polymyxa</i> | Поліміксин |
| <i>Lactococcus lactis</i> | Нізин |
| <i>Pseudomonas batumici</i> | Батумін |

Актиноміцети

| | |
|-----------------------------------|-----------------|
| <i>Streptomyces griseus</i> | Стрептоміцин |
| <i>Streptomyces fradiae</i> | Неоміцин |
| <i>Streptomyces kanamyceticus</i> | Канаміцин |
| <i>Amycolatopsis mediterranei</i> | Рифаміцин |
| <i>Streptomyces noursei</i> | Ністатин |
| <i>Saccharopolyspora erythrae</i> | Еритроміцин |
| <i>Mycromonospora purpurea</i> | Гентаміцин |
| <i>Streptomyces aureofaciens</i> | Хлортетрациклін |
| <i>Streptomyces peuceticus</i> | Дауноміцин |
| <i>Streptomyces venezuelae</i> | Хлорамфенікол |

Мікроміцети

| | |
|---------------------------------|---------------|
| <i>Penicillium chrysogenum</i> | Пеніцилін |
| <i>Acremonium chrysogenum</i> | Цефалоспорин |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> | Фузагілін |
| <i>Penicillium griseofulvum</i> | Гризеофульвін |
| <i>Trichothecium roseum</i> | Трихотецин |
| <i>Fusidium coccineum</i> | Фузидин |

1.3.2. Підвищення антибіотичної продуктивності мікроорганізмів

Для вирішення цього завдання використовують три тісно пов'язані методи: природної мінливості; індукованого мутагенезу і ступінчастого відбору найактивніших форм продуцентів; генно-інженерні маніпуляції.

Метод природної мінливості організмів

Популяцію клітин продуцента висівають на пластину поживного агару в чашці Петрі з таким розрахунком, щоб на ній виростило не більше як 40–50 ізольованих колоній. Після достатньо доброго розвитку колоній перевіряють їх здатність утворювати антибіотики. Це трудомісткий процес і пошук активних продуцентів дуже тривалий.

Індукований мутагенез і ступінчастий відбір

Вирішальну роль, що забезпечує успіх селекції багатьох продуцентів антибіотиків, відіграє отримання мутацій під впливом сильнодіючих факторів, у тому числі фізичних (іонізоване і ультрафіолетове опромінення), хімічних (етиленімін, амінопурин, нітрозогуанідин), біологічних (гени-мутатори, транспозони).

Використання сильних мутантів дає можливість у 100 і 1000 разів збільшити кількість змін у геномі (серед яких можуть бути і корисні зміни). На наступному етапі відбирають активні форми продуцента, як і в першому методі (табл. 1.1).

Таблиця 1.1. Результати селекції деяких продуцентів-антибіотиків (Егоров, 2004)

| Продуцент | Мутагенний фактор | Утворення антибіотика, од/мл | |
|------------------|-------------------|------------------------------|---------------------------------------|
| | | Вихідний штам | Штам, отриманий в результаті селекції |
| Пеніциліну | Р, УФ, АІ, ЕІ | 220 | 5200 |
| Стрептоміцину | Р, УФ | 250 | 4200 |
| Хлортетрацикліну | Р, УФ | 600 | 2200 |
| Еритроміцину | УФ, ЕІ | 500 | 1000 |

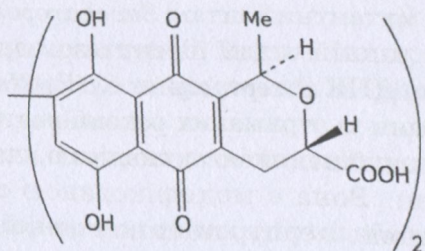
Примітка. Р — рентгенівське випромінювання, УФ — ультрафіолетове опромінення, АІ — азотистий іприт, ЕІ — етиленімін.

Перевага методу — менша тривалість пошуку активних форм продуцента, недолік — неможливість цілеспрямованої зміни певних генів, що беруть участь у синтезі антибіотиків.

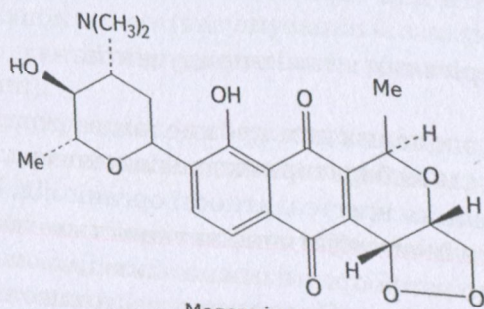
Перебудова шляхів синтезу антибіотиків з використанням технології рекомбінантної ДНК

У біосинтезі будь-якого антибіотика бере участь значна кількість генів, тому отримання високопродуктивних штамів-продуцентів за допомогою молекулярно-генетичних методів є складною процедурою. Використання методу рекомбінантної ДНК спрямовано не лише на підвищення виходу і швидкості синтезу антибіотиків, а й на отримання модифікованих і навіть нових антибіотиків.

Про першу роботу такого напрямку доповіли Д.Хопвуд із колегами у 1985 р. Вони ввели частину генів, що беруть участь у синтезі актинородину у *Streptomyces coelicolor*, в штам *Streptomyces*, що продукував медедміцин.



Актинородин



Медерміцин

Рекомбінантний штам продукував химерний антибіотик, що отримав назву медерродин.



Використана рекомбінантна плазміда містила ген ферменту, що каталізує β -гідроксилування актинородину. Завдяки широкій субстратній специфічності цей фермент у клітинах рекомбінантного штаму гідроксилував медерміцин в аналогічному положенні з утворенням медерродину.

Так само у мутантний штам *Saccharopolyspora erythraea* з перерваним на ранній стадії біосинтезом еритроміцину була введена бібліотека ДНК *Streptomyces antibioticus* —продуцента олеандоміцину. Один із отриманих рекомбінантних штамів утворював сполуку з антибіотичною активністю, що отримала назву 2-нореритроміцин. Вона є модифікованою структурою, що позбавлена, порівняно з еритроміцином однієї функціональної групи (CH_3).

Отже, технологію рекомбінантних ДНК можна з успіхом використовувати для отримання нових антибіотиків.

1.3.3. Зберігання штамів-продуцентів

Важливе значення для промислового отримання антибіотиків, а також для лабораторних досліджень продуцентів мають методи підтримання життєздатності організмів, що дають можливість зберігати їх антибіотичну активність на постійному рівні.

Відомо, що мікроорганізми легко змінюються під час тривалого зберігання. При цьому досить часто спостерігається повна або часткова втрата антибіотичних властивостей.

У технології антибіотиків використовують надсинтетиками — мікроорганізми, які можуть утворювати антибіотики у великій кількості. Ці культури дуже уразливі і часто втрачають або різко знижують здатність утворювати великі кількості антибіотика. Це відбувається, як правило, з двох причин:

1) спонтанна дисоціація: продуценти — це гетерогенні культури, які складаються з багатьох варіантів, що різняться за рівнем біосинтезу. Внаслідок спонтанних мутацій можуть утворюватися малоактивні продуценти (варіанти). Наприклад, у культурі *B.brevis* (граміцидин С) може утворюватися чотири варіанти R, S, P⁺, P⁻. Тільки R і P⁺ активні щодо антибіотикоутворення;

2) фаголізис — призводить до повного припинення росту культури і відповідно до зупинки процесу утворення антибіотика, особливо під час культивування актиноміцетів (стрептоміцин, новобіоцин).

Найпоширеніші методи зберігання продуцентів антибіотиків (ферментів та інших біологічно активних речовин):

1. Зберігання культур при низьких температурах (від 4 до -5 °C).

2. Зберігання культур на агаризованих середовищах під шаром вазелінової олії. В таких умовах мікроорганізми можуть зберігатися до 5 років.

3. Зберігання спор у вигляді водних суспензій у запаєних ампулах.

4. Зберігання вегетативних клітин або спор мікроорганізмів у стерильному ґрунті, піску або на насінні деяких рослин (просо). У стерильному ґрунті клітини стрептоміцетів зберігають життєздатність протягом 30 років.

5. Ліофілізація клітин (висушування із замороженого стану).

6. Висушування під вакуумом із рідкого стану (L-висушування клітин).

7. Кріоконсервація — зберігання мікроорганізмів у рефрижераторах з азотом двох типів: газофазовим (-130, -170 °C) і рідким (-196 °C).

Зберігання на агаризованих середовищах. Це економічний і надійний метод, який полягає в постійному пересіванні культури на свіже поживне середовище. Негативним є те, що метод потребує великих затрат праці і може призвести до втрати ос-

новних біосинтетичних властивостей культури (відбувається утворення низькоактивних варіантів, які в подальших пасажах можуть поступово витіснити високоактивні форми). Для запобігання цьому треба відбирати генетично однорідний матеріал, використовувати селективні середовища, додавати стимулятори біосинтезу антибіотиків.

У процесі зберігання в пасажах, особливо на багатих середовищах, може відбуватися спонтанний фаголізис продуцента. Уражені фагом продуценти різко знижують або втрачають свою активність. Для запобігання фаголізису в поживне середовище додають 10 М розчин цитрату натрію або 0,03 М розчин оксалатів. Запобігти фаголізису можна також пасажем на синтетичних середовищах.

Культури активних продуцентів на агаризованих середовищах зберігаються при температурі 5–7 °С. Для уповільнення висихання агару ватяні пробки заливають парафіном. У такому вигляді культура може зберігатися майже без змін 12 місяців.

Зберігання штамів у стерильному ґрунті. Використовують садовий ґрунт. Його подрібнюють, просіюють і вносять у пробірки в кількості 1–2 г, додають 2–3 краплі води, закривають ватяними пробками та двічі стерилізують протягом 1 год при 120 °С з перервою на 1 добу, при цьому пробірки зберігають у термостаті при температурі 26–28 °С. У стерильний ґрунт закладають спори і зберігають досить тривалий час при температурі 4 °С або в замороженому стані. У цьому разі можна використовувати не лише садовий ґрунт, а й ґрунт у суміші з кварцовим піском або сам пісок.

Зберігання штамів на зерні. Використовують як подрібнене, так і не подрібнене зерно, як правило, — пшоно. Пшоно заливають окропом і кип'ятять до повного поглинання зерном вологи. На 1 кг зерна потрібно 800 мл окропу. Посудину обгортають папером, ватою і витримують 30 хв. Після цього пшоно охолоджують і засипають у стерильні флакони (250 мл), які стерилізують при 115 °С протягом 40 хв.

Пшоно засівають суспензією спор або вегетативним міцелієм. Флакони ретельно струшують, щоб клітини рівномірно розподілилися на зерні.

Найкращою формою зберігання мікроорганізмів, за якої не втрачається їх антибіотична активність, вважається *ліофілізація*.

Суть методу: суспензія клітин або спор мікроорганізму, приготвлена на багатому на білки середовищі, швидко заморожується при температурі від -40 до -60 °С і висушується під вакуумом до залишкової вологості $0,5-0,7$ %. Після цього ампули ліофілізованого мікроорганізму запаюють. Ліофілізовані бактерії зберігаються $16-18$, спори грибів — 10 років.

Потрібно пам'ятати, що для кожного продуцента треба підбирати свій метод зберігання. За використання будь-якого способу зберігання не виключена можливість появи спонтанних мутацій, тому завдання збереження вихідного рівня антибіотичної активності продуцентів не може бути повністю вирішене лише методами консервації культур. Для підтримання активності культур-продуцентів антибіотиків використовують комплекс заходів, який передбачає підбір найкращих методів зберігання, культивування на спеціально підібраних для кожного штаму-продуцента середовищах і, головне, здійснення безперервної селекції найбільш активніших форм продуцента з розсівів популяції продуцента на агаризованих середовищах. Одержану в результаті селекції колонію продуцента, антибіотична продуктивність якої не нижча, ніж заявлена в паспорті продуцента, використовують для приготування нової партії штаму-продуцента на агаризованому середовищі в пробірках. Після підтвердження високої активності приготовленої партії її використовують для виготовлення засівного матеріалу і закладають на зберігання різними способами. Цю саму партію перевіряють на відсутність сторонніх мікроорганізмів.

1.3.4. Система депонування штамів-продуцентів

Депонування активних штамів-продуцентів антибіотиків, ферментів та інших біологічно активних речовин здійснюється з метою проведення патентної процедури, зважаючи на те, що активний штам-продуцент — це інтелектуальна власність і вона має бути захищена.

Порядок депонування затверджений наказом Держпатенту України та Національної академії наук України в 1995 р. і викладений у відповідній інструкції. Інструкція регламентує порядок прийняття на депонування, реєстрації, обліку, збері-

гання штамів мікроорганізмів і видачі їх зразків зацікавленим особам відповідно до закону України «Про охорону прав на винаходи і корисні моделі».

Система депонування активних штамів-продуцентів антибіотиків передбачає реєстрацію, зберігання, перевірку, підтримку життєдіяльності активних штамів-продуцентів у державному депозитарії. Особи, які хочуть отримати штами з депозитарію, повинні сплатити кошти. В Україні депозитарій міститься на території Інституту мікробіології і вірусології НАН України ім. Д.К. Заболотного. Депозитарій має право вносити зміни до таксономічного визначення штаму та уточнювати його науковий опис. Паспорт штаму мікроорганізму повинен мати видову (родову) назву штаму, номер, родовід, культурально-морфологічні та фізіолого-біохімічні властивості, інформацію про наявність патогенних властивостей тощо, необхідні вказівки на умови культивування, зберігання, реактивації, способів перевірки життєздатності та специфічної активності штаму.

Депозитарій видає культуру з паспортом. Особа, яка придбала культуру в депозитарії, не має право передавати штам іншим особам або установам.

1.3.5. Вплив антибіотиків на штами-продуценти

Вивчення ролі антибіотиків у життєдіяльності організмів, що їх утворюють, має загальнобіологічне значення. З'ясування питання взаємовідносин продуцента і утворюваного ним антибіотика може допомогти у розкритті деяких аспектів біосинтезу цих речовин і з'ясуванні механізму їх біологічної дії. Під час вивчення процесу антибіотикоутворення виникає низка питань: чи впливають антибіотики на власні продуценти, чи виконують ці речовини лише захисні функції?

Процес утворення антибіотиків є фактором біологічним, що має певне пристосувальне значення. Здатність до утворення антибіотиків з'явилася і закріпилася в організмах під час тривалої еволюції. Біосинтез тієї чи іншої речовини є спадково закріпленою особливістю одного чи кількох видів (штамів) організмів і регулюється особливими генами.

Велике різноманіття антибіотиків щодо їх хімічної будови і механізму біологічної дії дає змогу передбачити, що в числі пристосувальних реакцій у цих біологічно активних речовин, крім захисної функції, спостерігається вплив на окремі етапи процесу метаболізму тих організмів, які їх утворюють, через активацію чи інгібування низки ферментних систем, що виконують певні регуляторні функції.

У процесі розвитку організми пристосувалися до дії антибіотичних речовин у тих концентраціях, в яких вони їх утворюють, але якщо концентрацію антибіотика в середовищі штучно збільшити, то мікроорганізм, що утворює даний антибіотик, починає реагувати на це. Так, деякі стрептоміцети за наявності певних концентрацій утворюваних ними антибіотиків припиняють ріст. Існує певний зв'язок між утворенням антибіотика і стійкістю до нього продуцента цього антибіотика. Високопродуктивні штами аміноглікозидів знаходять, як правило, серед стрептоміцетів, що виявили вищу стійкість до цих антибіотиків.

Різні штами *S. griseus* різняться за чутливістю до стрептоміцину. Штами, здатні продукувати більшу кількість цього антибіотика, витримують наявність у середовищі великих концентрацій стрептоміцину, менш активні штами не здатні до росту, а ті, що не утворюють стрептоміцин, взагалі гинуть. Ця властивість стрептоміцетів використовується для селекції найпродуктивніших штамів, оскільки внесення стрептоміцину в середовище сприяє розвитку найактивніших штамів стрептоміцету.

Внесення в середовище для культивування *S. venezuelae* хлорамфеніколу в кількості, що не перевершує утворювану даним мікроорганізмом, перешкоджає біосинтезу антибіотика, але не впливає на розвиток продуцента. Хлортетрациклін пригнічує аеробне та анаеробне дихання у *S. aureofaciens*, та спричиняє зниження активності ферментів циклу трикарбонових кислот.

Утворення антибіотика бацитрацину тісно пов'язане з утворенням спор його продуцентом *B. licheniformis*. Проте існують мутанти *B. licheniformis*, які не синтезують бацитрацин, при цьому утворення спор у них не порушене. Антибіотик грамїцидин також впливає на процеси спороутворення у власного продуцента. Крім цього, додавання грамїцидину в поживне середовище стимулює біосинтез цього антибіотика культурою *B. bacillus*.

Важливу роль у життєдіяльності власного продуцента відіграє трихотецин. Він забезпечує мікропаразитизм *Trichothecium roseum*, надаючи йому можливість використовувати пошкоджені чи вбиті антибіотиком мікроміцети як джерело живлення.

Організми, які продукують антибіотики, стійкі до їх дії. При цьому мікроорганізми, що виділені з природних джерел і мають невисоку антибіотичну продуктивність, резистентні до власного антибіотика на рівні мембран. Високопродуктивні мутанти захищаються від антибіотиків, що ними утворюються, в результаті інактивації їх ферментами чи утворення деяких метаболітів, що інактивують власні антибіотики, а також завдяки клітинним мембранам, що перешкоджають надходженню антибіотика в клітину, і генам стійкості.

Тобто мікроорганізми-продуценти антибіотиків виробили певні механізми власного захисту від цих біологічно активних сполук, які у різних продуцентів здійснюються по-різному.

Контрольні запитання до підрозділу 1.3

1. Охарактеризуйте основні методи виділення продуцентів антибіотиків із природних середовищ.
2. Які засоби дають можливість прискорити пошук продуцентів антибіотиків?
3. Які методи уможливають збільшення антибіотичної продуктивності мікроорганізмів?
4. Порівняйте між собою методи природної мінливості та використання індукованого мутагенезу.
5. Які переваги надає використання генно-інженерних методів у створенні штамів-продуцентів?
6. Перелічіть методи зберігання продуцентів в активному стані.
7. Назвіть переваги і недоліки методу зберігання ліофільно висушених культур продуцентів.
8. Які процеси можуть призводити до втрати антибіотичної активності продуцентами?
9. Як в Україні захищаються авторські права винахідників штамів-продуцентів?
10. Яку роль відіграють антибіотики в метаболізмі власних продуцентів?
11. Які антибіотики можуть впливати на спороутворення?

1.4. КУЛЬТИВУВАННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ АНТИБІОТИКІВ

1.4.1. Особливості біосинтезу антибіотиків у мікроорганізмів

Утворення антибіотиків мікроорганізмами — спадкова властивість. Кожен вид мікроорганізмів здатний утворювати одну або кілька певних специфічних для цього виду антибіотичних речовин.

Особливість біосинтезу антибіотиків мікроорганізмами полягає в тому, що цей процес відбувається за двофазним принципом (рис. 1.5). Ця закономірність характерна для більшості стрептоміцетів і мицеліальних грибів.

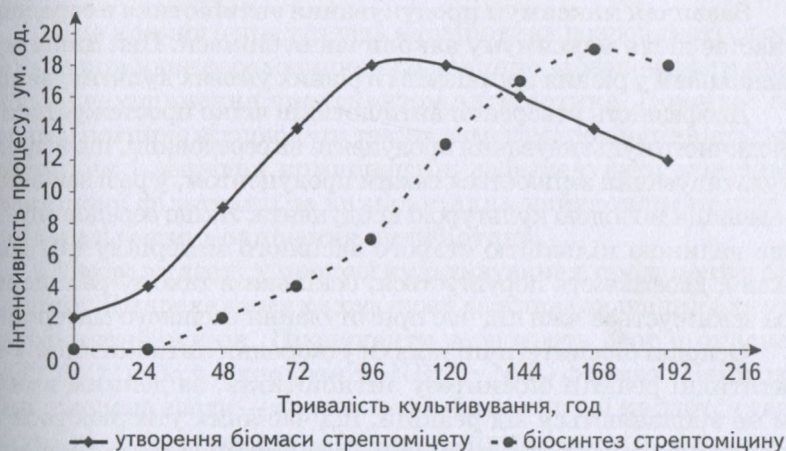


Рис. 1.5. Схема двофазного процесу культивування *Streptomyces griseus*

У першій фазі (фаза збалансованого росту, тропофаза) відбувається процес накопичення біомаси продуцента (утворюються ферменти, білки, нуклеїнові кислоти, вуглеводи, тобто речовини, що беруть участь у рості мікроорганізму). Швидкість засвоєння основних компонентів субстрату та кисню висока. Утворюються деякі органічні кислоти, що призводить до зниження значення рН середовища. В цій фазі антибіотик, як правило, ще не утворюється, а якщо антибіотична речовина наявна, то у нез-

начних кількостях. Це пов'язують із пригніченням генів і ферментів, що відповідають за синтез антибіотика.

У другій фазі (ідіофазі, фазі незбалансованого росту) спостерігається уповільнення накопичення біомаси, навіть її зменшення. Це пов'язано з тим, що основні компоненти середовища вже використані продуцентом, середовище збагачене продуктами життєдіяльності, в культурі переважають літичні процеси, відбувається автоліз клітин, що призводить до залуження. У період ідіофазі відбувається дерепресія ферментів, що беруть участь у біосинтезі антибіотиків. Починається антибіотикоутворення. Здебільшого антибіотики максимально накопичуються після максимального накопичення біомаси. Антибіотики ще називають метаболітами-ідіолітами.

Зазвичай максимум продукування антибіотика в середовищі настає після максимуму накопичення біомаси. Цей максимум не однаковий у різних організмів і в різних умовах культивування.

Двофазність утворення антибіотиків чітко простежується за періодичного культивування продуцента на середовищі, що в процесі культивування змінюється самим продуцентом, у разі засівання середовища молодією культурою продуцента. Якщо середовище засіяне великою кількістю старого засівного матеріалу (40 год і більше), двофазність порушується, оскільки в такому разі перша фаза закінчується вже під час приготування засівного матеріалу.

Основні біосинтетичні шляхи утворення антибіотиків. Ферментативні реакції біосинтезу антибіотиків, за деяким винятком не відрізняються від реакцій, під час яких утворюються інші метаболіти. Механізми біосинтезу антибіотиків можна поділити на три основні категорії:

1. Антибіотики, що походять від одного первинного метаболіту. Шлях їх біосинтезу складається з послідовності реакцій, які модифікують вихідний метаболіт, як це відбувається за синтезу амінокислот і нуклеотидів.

2. Антибіотики, що походять від двох чи трьох різних первинних метаболітів, які модифікуються та конденсуються з утворенням складної молекули.

3. Антибіотики, що є продуктами полімеризації кількох схожих метаболітів з утворенням основної структури, що згодом може модифікуватися.

У результаті полімеризації утворюються антибіотики чотирьох типів: 1) поліпептидні, що утворюються конденсацією амінокислот; 2) утворені з ацетатпропіонатних одиниць у реакціях полімеризації, схожих з реакціями біосинтезу жирних кислот; 3) терпеноїдні, що утворюються з ацетатних субодиниць синтезом ізопреноїдних сполук; 4) аміноглікозидні, що утворюються в реакціях конденсації, схожих з реакціями біосинтезу полісахаридів. Треба зазначити, що основна структура, отримана полімеризацією, далі модифікується, до неї можуть приєднуватися різні радикали.

1.4.2. Вплив умов середовища на антибіотичну продуктивність

Для кожного продуцента антибіотика розробляється оптимальне поживне середовище, яке повинно забезпечувати максимальне накопичення продуцентом антибіотика. Поживне середовище повинно відповідати таким вимогам: повноцінність; вміст доступних і дешевих компонентів; забезпечувати можливість ефективної фільтрації та використання найекономічніших методів виділення і очищення антибіотика.

Джерела азоту у процесі культивування продуцентів антибіотиків. Джерела азоту мають дуже важливе значення для отримання антибіотиків. Продуценти засвоюють азот в окисненій (NO_2^- , NO_3^-) або у відновленій (NH_4^+ , $-\text{NH}_2$) формах. Найважливіші джерела азоту — солі азотної або азотистої кислот, а також амонійні солі органічних або неорганічних кислот, амінокислоти, продукти гідролізу білків, білки.

У натуральних середовищах невизначеного складу (кукурудзяний екстракт, м'яса, соєве борошно) азот міститься у формі білків. Утилізація такого азоту залежить від наявності у продуцента відповідного протеїназного комплексу для перетворення білків на амінокислоти.

У більшості продуцентів антибіотиків найефективніше засвоюється азот амонійних солей та амінокислот, в яких він міститься у відновленій формі.

Ефективність засвоєння азоту залежить від хімічної природи джерела вуглецю, наявності в середовищі органічних кис-

лот, катіонів та аніонів солей. На середовищах з єдиним джерелом азоту продуценти можуть розвиватися дуже добре, але не утворювати потрібну кількість антибіотика. Потреба в азоті різних продуцентів специфічна. Наприклад, продуцент стрептоміцину не утворює антибіотик на середовищах із нітратами або нітридами тоді, коли вони є єдиними джерелами азоту. Стрептоміцин утворюється на середовищах з амонійними джерелами азоту. Біосинтез пеніциліну відбувається енергійніше в середовищі, яке разом з амонійним джерелом азоту містить і нітратне.

Джерела вуглецю у процесі культивування продуцентів антибіотиків. Значення джерела вуглецю для антибіотикоутворення полягає насамперед у впливі на використання джерела азоту. Можуть бути використані глюкоза, галактоза, мальтоза, сахароза, лактоза, крохмаль, гліцерин, етанол, бурштинова, пірвіноградна, оцтова, молочна кислоти. Наприклад, для отримання пеніциліну доцільно використовувати одночасно глюкозу та лактозу, що забезпечує розвиток мікроміцета та високий рівень накопичення пеніциліну.

Не всі продуценти антибіотиків мають досить активні амілази, здатні здійснювати гідроліз крохмалвмісних природних субстратів. Тому таку сировину доцільно обробляти перед використанням ферментами.

Важливе значення має також співвідношення вуглецю та азоту в середовищі. Для росту багатьох продуцентів зазвичай оптимальним є співвідношення 20:1 (C:N). Не завжди таке співвідношення приводить до максимального накопичення антибіотика. Для кожного конкретного продуцента воно встановлюється окремо експериментальним шляхом.

Джерела мінерального живлення. Важливими є фосфор, калій, кальцій, магній, сірка, залізо, цинк, мідь, молібден та інші елементи. Вони входять до складу протоплазми клітини як складові деяких ферментів, є компонентами для регулювання осмотичного тиску. Фізіологічна роль макро- та мікроелементів у тому, що вони є структурними елементами ферментних систем, регулюють проникність мембран клітини, беруть участь у перенесенні енергії, активують ферментні системи.

Важливе значення для утворення антибіотиків, що містять хлор (хлортетрациклін, хлорамфенікол), має наявність у

середовищі цього галогену. При цьому наявність інших галогенів (наприклад броду) призводить до інгібування процесу хлорування і утворення антибіотика, позбавленого хлору.

Мікроорганізми-продуценти антибіотиків культивуються в асептичних умовах. Для стерилізації поживних середовищ використовують:

- а) безперервну стерилізацію — для великих обсягів поживного середовища;
- б) періодичну стерилізацію — для невеликих обсягів;
- в) роздільну стерилізацію за групами компонентів, зважаючи на стан і характеристику компонентів. Наприклад, щоб запобігти реакції карамелізації С- та N-вмісні компоненти (глюкоза та амінокислоти) стерилізуються окремо.

1.4.3. Спеціальні умови культивування для одержання антибіотиків

Інтенсифікувати утворення антибіотика, крім відомих підходів (отримання мутантних штамів із підвищеною здатністю до синтезу антибіотика, підбір відповідних середовищ для культивування, поліпшення технологічних умов розвитку продуцента), можна спільним культивуванням продуцента антибіотика з іншими спеціально підібраними видами мікроорганізмів. Змішана культура термофільних *Lactococcus* і *Lactobacillus*, що є мікрофлорою йогуртів (кислого молока), має більшу антибіотичну активність порівняно з активністю цих мікроорганізмів поодиноці.

Уперше метод спільного культивування мікроорганізмів для отримання антибіотиків було запропоновано у 1959 р. угорськими вченими для отримання трихотетину. Було помічено, що продуцент трихотетину *Trichothecium roseum* найбільшу біологічну активність виявляє за спільного культивування з міцеліальними грибами роду *Penicillium*. Якщо до 24-годинної культури *T. roseum* додавати 2–10 % однодобового міцелію пеніцилового гриба, вихід трихотетину підвищується в кілька разів.

Неживий міцелій або культуральна рідина пеніцилу не стимулюють утворення трихотетину. Продукція трихотетину в змішаній культурі збільшується в результаті антагоністичних

взаємовідносин між продуцентом антибіотика та грибами роду *Penicillium*.

Збільшення утворення бацитрацину спостерігається у разі спільного культивування його продуцента *B. subtilis* і бактерій роду *Pseudomonas*.

Вплив мікроорганізмів у змішаних культурах один на одного може відбуватися по-різному:

1) продукти обміну одного організму можуть бути використані іншим як джерело азоту, вуглецю або іншого компонента чи як попередник біосинтезу якої-небудь сполуки;

2) у змішаній культурі один із мікроорганізмів може утворювати стимулятори росту для іншого;

3) продукти життєдіяльності одного з мікроорганізмів (того, що не утворює антибіотик) дещо притримують розвиток продуцента, який у відповідь починає активніше синтезувати антибіотики.

Треба враховувати, що не існує універсальних комбінацій для спільного культивування. У кожному конкретному випадку потрібно підбирати відповідні організми та їх оптимальне співвідношення.

Останніми десятиріччями ХХ ст. успішно розвинувся новий напрям у біосинтезі антибіотиків — використання іммобілізованих клітин продуцента. Виявилось, що живі клітини мікроорганізмів в іммобілізованому стані здатні досить довго існувати і здійснювати характерні для них біохімічні процеси. Існування мікроорганізмів в іммобілізованому стані екологічніше, тобто в природних умовах більшість мікроорганізмів існують саме в такому стані. Наприклад, у ґрунті майже не зустрічаються вільноіснуючі мікроорганізми, всі вони адсорбовані на поверхні твердих часток ґрунту.

На сьогодні дослідження з іммобілізації клітин мають пошуковий характер і в промислових умовах не використовуються.

Встановлено, що іммобілізовані клітини *Bacillus* sp. здатні продукувати бацитрацин, *S. griseus* — кандицидин, *P. chrysogenum* — пеніцилін, *L. lactis* — нізин.

1.4.4. Спрямований біосинтез антибіотиків

Під спрямованим біосинтезом антибіотиків треба розуміти втручання експериментатора в метаболізм мікроорганізмів.

му-продуцента для отримання одного (з кількох) або нових порівняно з тими, що зазвичай синтезуються.

Для спрямованого утворення переважно одного антибіотика з тих, що продукує обраний продуцент (або їх модифікації), використовують такі методи втручання в метаболізм мікроорганізмів:

1) зміна умов культивування і передусім зміна складу поживного середовища;

2) введення в середовище для культивування специфічних інгібіторів;

3) отримання мутантів вихідного продуцента, що утворюють модифіковані антибіотики;

4) оброблення отриманого антибіотика певними ферментами або мікроорганізмами.

Отримання деяких антибіотиків спрямованим синтезом:

➤ введення до складу поживного середовища речовин, що вбудовуються в молекулу антибіотика, забезпечуючи отримання препаратів з новими властивостями, тобто введення попередників біосинтезу. Попередники — це органічні речовини, що в процесі біосинтезу антибіотика включаються в його молекулу без попереднього розщеплення на окремі фрагменти і їх наступного ресинтезу. Так, введення в середовище для культивування *Penicillium chrysogenum* фенілоцтової кислоти забезпечує утворення бензилпеніциліну, а введення феноксиоцтової кислоти — феноксиметилпеніциліну;

➤ зміна співвідношення концентрацій джерел вуглецю та азоту (або ступеня аерації культури). Наприклад, залежно від співвідношення вуглецю та азоту в середовищі культура *Bacillus licheniformis* продукує ліхеніформіни або бацитрацини. Якщо в середовищі міститься лактат амонію і співвідношення C:N невисоке, утворюються ліхеніформіни. Якщо створено умови підвищеного співвідношенні C:N, утворюються бацитрацини;

➤ введення специфічного інгібітора. На середовищі з хлоридами *S. aureofaciens* продукує хлортетрациклін (90–95 %) і тетрациклін (5–10 %). Якщо цей організм культивувати на середовищі, вільному від хлоридів, збільшується вихід тетрацикліну за рахунок зменшення хлортетрацикліну. Тетрациклін можна отримати і на середовищі, що містить хлориди, у разі додавання речовин, що інгібують процес хлорування (броміди, тіосечовина, меркаптобензотіазол).

Контрольні запитання до підрозділу 1.4

1. Двофазний характер розвитку мікроорганізмів і біосинтезу антибіотиків.
2. За яких умов може порушуватися двофазність утворення антибіотиків?
3. Охарактеризуйте вплив джерела азотного живлення на біосинтез антибіотиків.
4. Які речовини можуть використовуватися як джерела вуглецевого живлення для отримання антибіотиків?
5. Охарактеризуйте роль мікроелементів в утворенні антибіотиків.
6. Яка роль спільного культивування під час біосинтезу антибіотиків?
7. Які переваги має синтез антибіотиків за допомогою іммобілізованих клітин?
8. Дайте визначення поняття «попередники біосинтезу антибіотиків». Наведіть приклади таких речовин.
9. Як співвідношення кількості вуглецю та азоту в середовищі може вплинути на біосинтез антибіотиків?
10. Що таке спрямований біосинтез антибіотиків?

1.5. ПРОМИСЛОВЕ ОТРИМАННЯ АНТИБІОТИКІВ

1.5.1. Загальні відомості про виробництво антибіотиків

Після завершення всіх досліджень і визначення потреби (і можливості) використання антибіотика в лікувальній практиці розробляється технологія широкомасштабного виробництва такого антибіотика. Першим етапом на шляху до промислового випуску антибіотика є створення лабораторного регламенту, завдання якого — розроблення оптимального методу виробництва антибіотичної речовини.

Лабораторний регламент отримання антибіотика складається з таких розділів:

1. Характеристика антибіотика.
2. Технологічна схема виробництва.
3. Сировина і матеріали.
4. Апаратурна схема виробництва.
5. Викладення технологічного процесу.
6. Відходи виробництва, технологічні і вентиляційні викиди в атмосферу, їх використання і знешкодження.

7. Контроль виробництва.

8. Техніка безпеки, пожежна безпека і виробнича санітарія.

9. Перелік виробничих інструкцій. Наводиться повний перелік інструкцій, які мають бути розроблені на основі лабораторного регламенту.

10. Техніко-економічні нормативи.

11. Інформаційні матеріали.

Промислове виробництво антибіотиків було налагоджено відразу після відкриття пеніциліну і виявлення його цінних лікувальних властивостей. Спочатку продуцент антибіотика культивували у матрацах, молочних пляшках, колбах, що було економічно нерентабельно. Вихід антибіотика за таких умов був надзвичайно низьким і не міг задовольнити зростаючі потреби медицини. В результаті наукових досліджень було запропоновано метод глибинного вирощування продуцента, як найраціональніший спосіб виробництва антибіотиків. Глибинне культивування здійснюється в спеціальних місткостях — ферментерах — з подачею стисненого повітря і перемішуванням культуральної рідини. Узагальнену схему отримання антибіотиків мікробним синтезом показано на рис. 1.6.

На сьогодні виробництво антибіотиків — добре розвинена галузь. У ряді країн (США, Японія, Англія, Франція та ін.) виробництво антибіотичних речовин — одна з найприбутковіших галузей хіміко-фармацевтичної промисловості.

У колишньому Радянському Союзі випуск пеніциліну було розпочато в 1944 р. поверхневим культивуванням гриба. Створення спеціалізованих підприємств із промислового виробництва пеніциліну глибинним культивуванням продуцента розпочалося в 1946–1948 рр. і вже до 1957 р. в країні функціонувало кілька спеціалізованих підприємств, які виробляли пеніцилін, стрептоміцин, тетрациклін, хлортетрациклін.

Станом на 11 лютого 2008 р. серед вітчизняних виробників лікарських засобів виготовляють препарати, що містять антибіотики і мають сертифікат відповідності вимогам належної виробничої практики (GMP), такі підприємства: ЗАТ НВЦ «Борщагівський ХФЗ» — дільниця з виробництва стерильних антибіотиків у флаконах, дільниця з виробництва нестерильних антибіотиків у капсулах; ЗАТ фармацевтична фірма «Дарниця» —

дільниця з виробництва стерильних антибіотиків для приготування ін'єкцій у флаконах; ВАТ «Київмедпрепарат» — дільниця з виробництва антибіотиків цефалоспоринового ряду.

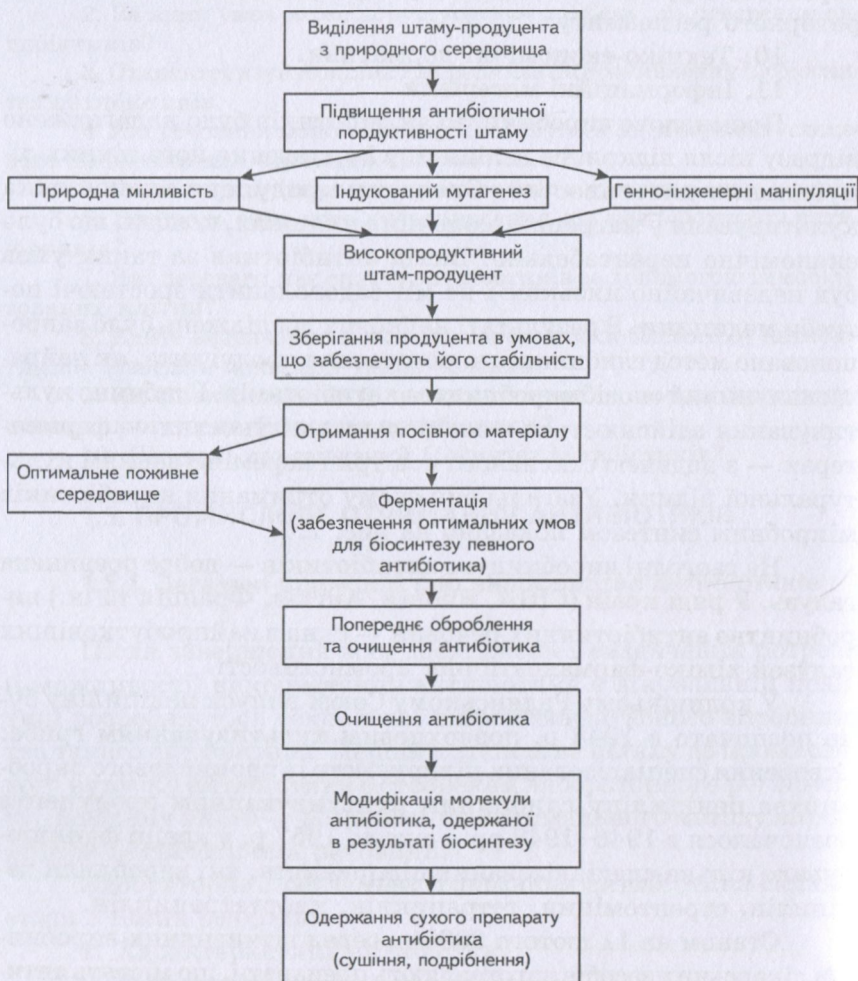


Рис. 1.6. Загальна схема отримання антибіотиків шляхом мікробного синтезу

Успіх антибіотичної промисловості і якість виготовленої продукції визначається рівнем основних стадій технологічного

процесу. Сучасне промислове отримання антибіотиків — складна багатоступенева біотехнологічна система, що складається з таких послідовних стадій:

- біосинтезу (утворення) антибіотика;
- попереднього оброблення культуральної рідини, клітин (або міцелію) мікроорганізму і відділення культуральної рідини від біомаси продуцента;
- виділення і очищення антибіотика. Зважаючи на досить низький вміст антибіотика (не більше як 1 %) у культуральній рідині ця стадія дуже важлива;
- отримання готової продукції, виготовлення лікарських форм, фасування.

У промисловому одержанні антибіотика потрібно на всіх стадіях виробництва вжити заходів для максимального зниження собівартості препаратів, а саме: впровадити у виробництво високопродуктивні штами продуцентів антибіотиків; створити сприятливі умови для розвитку продуцентів на етапі біосинтезу; використовувати дешеву сировину для виробництва і сучасне обладнання на всіх стадіях виробництва; налагодити автоматизований контроль виробництва, що знизить втрати антибіотика.

1.5.2. Підготовка засівного матеріалу

Підготовка засівного матеріалу — багатоступеневе вирощування культури продуцента з поступовим збільшенням обсягу його біомаси. Від кількості та якості засівного матеріалу залежить успіх ферментації.

Початковий засівний матеріал це зазвичай культура, вирощена на поверхні поживного субстрату (агарове середовище, зерно, висівки та ін.). Найчастіше він має вигляд спор, тому спочатку із спорового стану його переводять у вегетативний, накопичують певний обсяг, достатній для засівання апаратів певної місткості.

Кількість етапів підготовки засівного матеріалу залежить від таксономічної належності продуцента, його питомої швидкості росту; об'єму поживного ферментаційного середовища.

Інокуляція може бути одно-, дво-, триступенева.

Поживне середовище для інокуляції готується окремо, дуже часто таке, як і для ферментера. Але може бути, що інокуля-

ційне середовище відрізняється від ферментаційного, тому і готується, і стерилізується окремо. Контроль стадії інокуляції на стадії засівання дуже ретельний.

Вимоги до засівного матеріалу: чистота — відсутність контамінаційної мікрофлори; заданий титр клітин продуцента; висока фізіологічна активність культури; кількість інокуляту — 5–10 % обсягу середовища у ферментері.

1.5.3. Ферментація

Ферментація відбувається у параметрах, що відображають фізіолого-біохімічні особливості біологічного агента.

pH середовища. Більшість бактеріальних продуцентів утворюють антибіотики за нейтрального значення pH (pH 7,0), крім молочнокислих стрептококів продуцентів нізину, їх оптимальне значення pH 5,5–6,0.

Для культивування актиноміцетів оптимальне значення pH 6,7–7,8, мікроміцетів — pH 4,5–5,0.

Треба пам'ятати, що значення pH середовища не залишається постійним. Якщо в середовищі єдиним джерелом азоту є сірчаноокислий амоній, то при споживанні азоту середовище буде підкислюватися (це не буде відбуватися за наявності значної кількості іонів калію). Якщо джерелом азоту є KNO_3 , то під час культивування середовище буде підлужнюватися.

Сильна зміна pH середовища може призводити до припинення росту продуцента і утворення ним антибіотика. Середовища необхідно складати так, щоб упродовж ферментації pH залишався в межах допустимої для продуцента норми.

Температура. Для більшості бактеріальних продуцентів оптимальною є температура 30–37 °C, виняток — продуцент грамїцидину, який культивують при 40 °C.

Актиноміцетні продуценти антибіотиків культивують при температурі 26–30 °C, мікроміцетні — 25–28 °C.

Є поодинокі випадки використання термофільних продуцентів, що утворюють антибіотики при температурі 50–65 °C.

Аерація. Це суттєвий фактор під час культивування продуцентів антибіотичних речовин, зважаючи на те що більшість продуцентів — аероби. Ступінь аерації — один із засобів зміни

окисно-відновних умов середовища (ступінь аерації — це співвідношення об'єму повітря до об'єму середовища за 1 хв). Більшість антибіотиків утворюються за значення ступеня аерації, близького до одиниці. Цей показник залежить від реологічних властивостей поживного середовища. Для аерації використовується стерильне стиснуте повітря.

У біосинтезі антибіотиків дуже важливим є явище *піноутворення*. Причини утворення піни — наявність у поживному середовищі досить великої кількості білків, високий ступінь аерації.

Утворення піни може стати причиною контамінації культуральної рідини. Крім того, цей фактор визначає коефіцієнт заповнення ферментера: чим піноутворення інтенсивніше, тим коефіцієнт заповнення нижчий.

Методи піногасіння:

механічні — наявність піновідбійників у конструкції ферментерів, різка зміна тиску всередині ферментера;

хімічні — використання піногасників. Піногасники — це природні (соняшникова олія, тваринні жири) та штучні (ніоген, пропінол) поверхнево-активні речовини. Кориснішими для біологічних агентів є натуральні піногасники, бо жири є джерелом вуглецю. Кількість піногасника повинна бути мінімальна, щоб не було зон зі зниженим масообміном. Тому емульсії піногасників готуються у воді. Переваги використання емульсій піногасників: зменшення кількості піногасника зі збереженням його активності, що економічно доцільно, зменшення наявності сторонніх речовин у цільовому продукті, що полегшує стадії видалення та очищення антибіотика. Режим стерилізації піногасника жорсткіший, ніж режим стерилізації компонентів поживного середовища. Тому піногасник стерилізують окремо періодичним способом.

Контроль процесу ферментації. Мікробіологічний — відсутність сторонньої мікрофлори, титр клітин продуцента, фізіологічний стан клітин. Біохімічний — визначення динаміки споживання основних джерел вуглецю, азоту, накопичення цільового препарату. Технологічний — визначення параметрів середовища — рН, температура, розчинний кисень.

1.5.4. Попереднє оброблення культуральної рідини, виділення і хімічне очищення антибіотиків

У процесі розвитку продуцента утворюваний ним антибіотик здебільшого повністю виділяється з клітин у середовище. Проте в деяких випадках частина антибіотика може залишатися в клітинах продуцента або антибіотик повністю накопичується всередині клітин продуцента.

Залежно від місця накопичення антибіотика підбирають методику його виділення. Так, якщо антибіотик міститься в культуральній рідині, його виділяють методами екстрагування, використовуючи з цією метою розчинники, що не змішуються з водою, осаджують у вигляді нерозчинної сполуки або сорбують іонообмінними смолами.

Із клітин мікроорганізмів антибіотики виділяють екстрагуванням органічними розчинниками. При цьому досить часто клітини продуцентів-бактерій потрібно руйнувати, тоді як мікроміцети мають більшу проникність клітин, і антибіотик може бути екстраговано з неушкоджених клітин. Методи руйнації клітин такі:

а) механічні — балістичні, екструзійні (продавлювання з піском);

б) фізичні — термошок, осмотичний шок, дія ультразвуку, процес заморожування-танення, просте висушування клітин;

в) хімічні — дія кислот, лугів, ПАР;

г) ензиматичні — дія літичних ферментів (дріжджолітин);

д) біологічні — дія антибіотиків і фагів;

е) дія речовин, що призводять до інгібування біосинтезу клітинної оболонки.

Якщо антибіотик міститься в культуральній рідині і клітинах мікроорганізму, то спочатку його переводять у фазу, з якої його найдоцільніше виділяти. Наприклад, антибіотик, що міститься у культуральній рідині, і клітини, що містять антибіотик, переводять в осад, з якого екстрагують антибіотик.

Відділення нативного розчину, що містить антибіотик, від біомаси та зважених частинок здійснюють методами фільтрації і центрифугування.

Основний метод — фільтрування. Для поліпшення фільтрування застосовують кислотне або теплове коагулювання, об-

роблення електrolітами. Для великих об'ємів використовують фільтрпреси (під тиском), для малих — нутч-фільтри (під вакуумом) або друк-фільтри (підвищений тиск над рідиною, що фільтрується).

Дуже широко використовується також центрифугування. Добрі результати отримано і за використання сепараторів.

Залежно від властивостей антибіотика та методів його подальшого виділення та очищення обирається спосіб попереднього оброблення культуральної рідини. У разі застосування екстракційного методу виділення антибіотика з рідини (пеніцилін) нативний розчин повинен бути максимально звільнений від домішок, що здатні утворювати стійкі емульсії з органічними розчинниками. Білкові домішки, що утворюють стійкі емульсії, як правило, видаляють разом із міцелієм або іншими методами (хімічним способом або нагріванням рідини — денатурацією білка). Якщо міцеліальна маса видаляється легко, без попереднього оброблення, то до нативного розчину додають деемульгатори, які утримують білкові речовини у розчинному стані під час екстрагування. Якщо антибіотик виділяють методом осадження, то із нативного розчину бажано видалити всі домішки, що здатні в цих умовах перейти в осад. Піногасники, особливо жирові, погіршують якість фільтрації.

Заходи, що використовуються для поліпшення фільтрування: кислотне і теплове коагулювання; введення у рідину електролітів; використання наповнювачів, поліпшувачів фільтрування.

Мета хімічного очищення — видалення антибіотика з нативної рідини, його концентрування і звільнення від супутніх домішок для отримання високоочищеного препарату. Очищення антибіотиків — дуже важливий етап, оскільки кількість домішок у культуральній рідині іноді сягає 99 %.

Основні методи очищення — екстрагування, осадження, сорбування на іонообмінних матеріалах. Антибіотики — лабільні речовини, вони інактивуються під впливом температури, рН та інших факторів, що необхідно враховувати під час розроблення методів їх очищення.

Очищення може здійснюватись багаторазовим переведенням антибіотика з одного розчинника в інший з використанням попереднього осадження — *перекристалізація*. Принцип

кристалізації полягає у різкому зменшенні розчинності в результаті зміни температури розчину, як правило, зниження (виняток — еритроміцин, підвищення) чи завдяки переведенню антибіотика в іншу хімічну форму, менш розчинну. Це досягається зміною рН середовища чи додаванням відповідного реагенту. Цей метод комбінують з осадженням і сорбуванням.

Іонообмінне сорбування — водні розчини антибіотика, який за своєю хімічною природою є кислотою, лугом, амфотерною сполукою, пропускають крізь колонки з відповідними іонообмінними смолами. Антибіотики сорбуються на смолах, а розчин із домішками, що мають заряд, протилежний заряду антибіотика, проходить крізь колонку. Смоли, залежно від їх заряду, називають катіонітами та аніонітами. Потім за допомогою специфічних елюентів (розчини, що порушують зв'язок антибіотика зі смолою) здійснюють процес десорбування.

Метод *осадження* — базується на зв'язуванні антибіотика з органічними або неорганічними речовинами з метою отримання нерозчинного осаду, який, як правило, за допомогою центрифугування відділяють і висушують. Осадження — найпоширеніший метод у виробництві тетрациклінових антибіотиків.

Екстрагування — базується на різній розчинності різних хімічних форм антибіотика у воді та органічних розчинниках, що не змішуються з водою. Наприклад, переведення пеніциліну із сольової форми у кислотну та навпаки, що досягається зміною рН розчину, забезпечує перехід з одного розчинника в інший під час їх контакту. Межі значення рН повинні забезпечувати достатньо повний перехід у відповідну хімічну форму за мінімальної його інактивації.

Концентрування очищених розчинів антибіотика відбувається за допомогою вакуум-випарювання через лабільність останнього.

1.5.5. Сушіння і фасування препаратів

Зважаючи на термолабільність, сушіння антибіотиків може бути ліофільне, розпилювальне, у вакуум-сушильних шафах.

Сублимаційне (ліофільне) сушіння. Метод сублимаційного зневоднення дає можливість отримати продукти найвищої якості, оскільки в них повністю зберігається біологічна активність.

У процесі основного зневоднення матеріал перебуває в замороженому стані, тому мікроструктура і властивості матеріалу зберігаються максимально. Препарати, висушені цим методом, зберігають початковий об'єм і легко поглинають вологу під час зволоження, зберігають колір, запах та ін.

Переваги: волога видаляється при низьких температурах, що практично виключає термоінактивацію продукту;

зберігається стабільна структура матеріалу (не відбувається руйнування або конгломерація частинок);

практично не видаляються леткі компоненти висушеного матеріалу, не порушується його хімічний склад;

полегшується можливість отримання сухого продукту, упакованого у стерильному вигляді.

Недоліки: складність сублимаційного обладнання; тривалість і енергоємність процесу.

Розпилювальне сушіння. Відбувається при високих температурах. Розчин антибіотика пневматично розпилюється до мікрокраплинок у камері з потоком нагрітого повітря. Процес сушіння антибіотиків триває кілька секунд. За таких умов зберігаються навіть термолабільні препарати.

Вакуумне сушіння. Відбувається при низьких температурах (30–35 °С). Дешевий та ефективний метод.

Недоліки: отримання матеріалу у вигляді коржа; не можна піддавати такому сушінню рідини; малоефективний, оскільки потребує великого об'єму площ.

Завершальний етап роботи — розфасування та пакування готового препарату. На упаковці антибіотика вказують біологічну активність, дату виготовлення і термін зберігання.

1.5.6. Контроль готових препаратів антибіотиків

Готові препарати антибіотиків підлягають біологічному та фармакологічному контролю.

Біологічний контроль. З'ясовується стерильність (або обнасіненість мікроорганізмами) готового препарату. Для цього використовують два методи:

1. Інактивація антибіотика і засівання його на відповідне поживне середовище. Наприклад, біологічний контроль бен-

зилпеніциліну і його напівсинтетичних похідних здійснюється так: до пробірок, що містять тіогліколеве середовище, вносять фермент β -лактамазу (у кількості, що здатна інактивувати пеніцилін), витримують середовище при $37\text{ }^\circ\text{C}$ 2–3 доби для контролю стерильності, вносять до пробірок розчин пеніциліну і витримують п'ять діб при 24 і $37\text{ }^\circ\text{C}$.

Стрептоміцин для здійснення мікробіологічного контролю інактивують за допомогою гідроксиламіну або цистеїну.

2. Метод мембранного фільтрування. Використовують для контролю стерильності антибіотиків, для яких невідомі інактиватори їх антибіотичної активності. Розчин антибіотика пропускають крізь мембранні фільтри з діаметром пор $0,75$ мкм. Потім на поживні середовища засівають змиви з цих фільтрів.

Треба зазначити, що стерильність готового антибіотика забезпечується дотриманням стерильних умов роботи на всіх стадіях виробничого процесу.

Фармакологічний контроль. До антибіотиків, що використовуються в лікарській практиці, ставляться суворі вимоги. Перед упровадженням у практику нового лікарського препарату визначають пірогенність, гостру і хронічну токсичність (вплив на кров, центральну нервову систему, дихання), визначають дозу, що спричиняє загибель 50% піддослідних тварин — LD_{50} і абсолютно смертельну дозу — LD_{100} .

Гостра токсичність. Антибіотики та їх лікарські форми досліджують на токсичність для визначення ступеня чистоти препарату, тобто відсутності в препараті сторонніх отруйних домішок.

Для дослідження на токсичність із кожної серії відбирають кілька флаконів. Гостру токсичність зазвичай перевіряють на білих мишах масою 18 – 20 г, що утримуються на звичайному раціоні. Для більшості препаратів використовують внутрішньовенний спосіб введення. Для деяких препаратів (наприклад ністатин) застосовують внутрішньочеревне введення.

У визначенні гострої токсичності звертають увагу не лише на загибель піддослідних тварин від різних доз препарату, а й на характер його токсичної дії. Беруть до уваги загальний стан, поведінку і реакцію тварин (пригнічення, збудження, судоми, припинення дихання).

Препарати, призначені для парентерального введення (внутрішньовенно, внутрішньом'язово, підшкірно), обов'язково досліджують на пірогенні властивості, вплив на кровообіг і дихання. Пірогенні властивості вивчають на кролях, вводячи препарат внутрішньовенно (або іншим шляхом згідно з інструкціями).

Хронічна токсичність. Обов'язково досліджують для повної фармакологічної характеристики препарату. Для визначення хронічної токсичності препарат вводять 1–3 рази на добу протягом кількох днів (3–5), кількох тижнів (1–4) або кількох місяців (1–3). Хронічну токсичність обов'язково тестують на великих тваринах (кролі, кішки, собаки). Собакам при цьому вводять дозу, що дорівнює лікувальній дозі для людини. За тваринами спостерігають, визначаючи загальний стан, апетит, поведінку, температуру тіла, масу та ін. Дослідження хронічної токсичності, як правило, завершується патогістологічним вивченням внутрішніх органів і місць уведення препарату.

Для антибіотиків, призначених для парентерального введення, важливе значення має вивчення подразнювальної дії. Якщо препарат призначено для внутрішньовенного введення, подразнювальну дію вивчають на вені вуха кроля. За наявності подразнювальної дії спостерігають набряки, утворення тромбів, порушення прохідності вени після 6–10 уведень препарату.

Лікарські форми антибіотиків для місцевого використання перевіряють на місцевоподразнювальну дію шляхом внесення у кон'юнктивальний мішок одного ока кролика чи морської свинки один або кілька разів на день протягом 1–4 тижнів. Якщо препарат має подразнювальний вплив, спостерігають набряк слизової оболонки і повік, розширення судин кон'юнктиви та рогової оболонки.

Аерозолі, що містять антибіотики, досліджують шляхом інгаляції тваринам у камерах або через спеціальні респіратори.

1.5.7. Лікарські форми з антибіотиками

Один із завершальних етапів виробництва антибіотиків — отримання готових до використання лікарських форм. Антибіотики можуть бути представлені ін'єкційними, пероральними, ректальними та вагінальними лікарськими формами.

Антибіотики характеризуються рядом особливостей, які визначають технологічні і практичні аспекти лікарських препаратів із ними. Такими особливостями є недостатня стабільність під час зберігання, взаємодія між собою і з багатьма допоміжними речовинами, погана розчинність деяких антибіотиків у воді, недостатня стабільність водних розчинів антибіотиків, термолабільність.

Антибіотики чутливі до дії мікроорганізмів та їх ферментів. Тому всі лікарські форми з антибіотиками готуються в асептичних умовах. Більшість антибіотиків не витримують теплової стерилізації (виняток — очні краплі левоміцетину стерилізують плинною парою 30 хв при 100 °С).

Лікарські форми, що містять антибіотики, повинні відповідати таким вимогам: лікарські форми з антибіотиками треба готувати в асептичних умовах; лікарські форми мають забезпечувати стабільність антибіотика як у процесі технології, так і під час зберігання, а також потрібну концентрацію антибіотика в макроорганізмі за його мінімального дозування.

Для вибору обґрунтованого способу приготування лікарської форми з антибіотиками важливим є знання фізико-хімічних і фармакологічних властивостей останніх і вплив на їх стабільність різних факторів зовнішнього середовища та допоміжних речовин.

Для вживання всередину антибіотики випускають у вигляді таблеток, капсул, гранул або порошків для приготування суспензій, сиропів, а також у вигляді готових водних суспензій. Більшість антибіотиків випускають у вигляді таблеток і капсул. Загальну схему виготовлення таблеток показано на рис. 1.7.

З погляду терапевтичної ефективності таблетки і капсули рівноцінні, оскільки як цукрова оболонка, так і желатинова капсула максимально маскують неприємний смак і легко руйнуються у шлунку. У разі руйнування антибіотика в кислому середовищі шлунку, таблетки або гранули покривають кислотостійкою оболонкою. З цією метою можуть бути використані ацетилфталілцелюлоза, фталілдекстран та інші речовини, які легко руйнуються в лужному середовищі кишечника.

Капсулюванню і таблетуванню підлягають порошки антибіотиків з певною сипкістю. У процесі таблетування, а іноді й капсулювання, використовують наповнювачі, що забезпечують

нормальне розпадання таблеток у дистильованій воді, міцність і стабільність під час зберігання, гарний товарний вигляд. Наповнювачами можуть бути цукор, лактоза, крохмаль, тальк, стеаринова кислота, стеарат кальцію та ін.

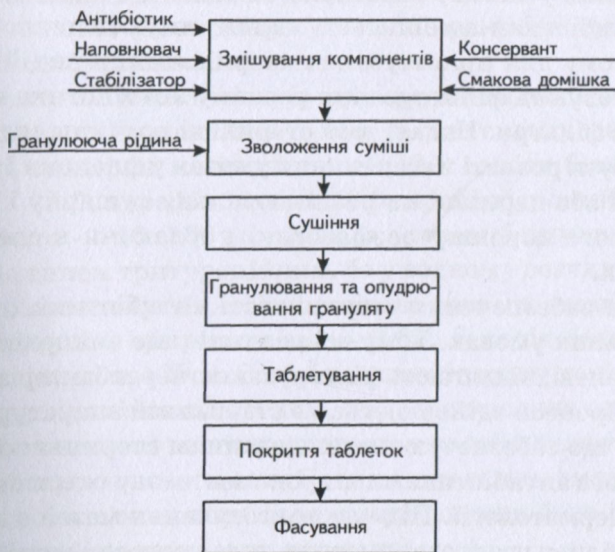


Рис. 1.7. Загальна схема виготовлення таблеток антибіотиків

У вигляді готових водних суспензій можуть випускатися лише дуже стабільні антибіотики. Здебільшого їх готують безпосередньо перед використанням. Водні розчини готують за загальними правилами приготування, враховуючи рН розчину та сумісність з іншими інгредієнтами. Особливістю є дотримання асептичних умов.

Ін'єкційні лікарські форми антибіотиків. На відміну від інших ін'єкційних лікарських засобів, що випускаються у вигляді розчинів в ампулах, антибіотики здебільшого випускають у вигляді стерильних порошоків у флаконах або ампулах, призначених для приготування розчину безпосередньо перед використанням введенням у флакон відповідного розчинника. Наприклад, для приготування розчинів бензилпеніциліну натрію як розчинники використовують ізотонічний розчин на-

трію хлориду, розчин глюкози ізотонічний (5 %), розчин новокаїну (0,25 і 0,5 %).

Специфіка випуску ін'єкційних препаратів антибіотиків у вигляді сухих порошоків зумовлена більшою стабільністю антибіотиків у такому вигляді.

Антибіотики здебільшого не витримують теплової стерилізації, тому для приготування стерильних ін'єкційних форм використовують фільтрування розчину антибіотика крізь бактеріальні фільтри. Надалі такі стерильні розчини антибіотиків можуть бути розлиті в асептичних умовах у флакони і ліофільно висушені або передані на розпилювальну сушарку і у вигляді стерильного порошку розфасовані у флакони в спеціальних автоматах.

Для забезпечення стерильності антибіотики отримують у стерильних умовах. Тому всі розчини, що використовуються у виробництві, підлягають фільтруванню через бактеріальні фільтри, всі процеси здійснюються в стерильній апаратурі в приміщеннях, що забезпечуються подаванням стерильного повітря.

Мазі з антибіотиками широко застосовуються в офтальмології та дерматології. Під час приготування мазей з антибіотиками особливу увагу звертають на склад основи і спосіб введення антибіотиків.

Найстабільнішими є мазі, приготовлені на безводних основах. Найчастіше основою для очних мазей є суміш, що складається з вазеліну — 9,0 і безводного ланоліну — 1,0 г. Також використовують такі основи: суміш із чотирьох частин ланоліну безводного і шести частин вазеліну; суміш парафіну (30,0 г) і олії соняшникової (70,0 г); поліорганосилоксанові основи (силікони) — пеніцилін на таких основах зберігається тривалий час (до трьох місяців і більше).

Усі основи для мазей з антибіотиками використовуються лише після їх стерилізації.

У процесі одержання мазей антибіотиків компоненти основи мазі (вазелін, ланолін, стабілізатори, емульгатори, інші речовини) роздільно стерилізують. Можлива спільна стерилізація, якщо компоненти основи мазі не руйнуються. Антибіотики чи їх суміші тонко подрібнюються та просіюються. Компоненти основи мазі подаються в попередньо простерилізований змішу-

вач і нагріваються до розплавлення. Розплавлена мазева основа фільтрується і охолоджується до температури, припустимої для введення антибіотика. Частина основи використовується для приготування концентрату (суміші основи і антибіотика), який потім розбавляється основою до потрібної концентрації антибіотика. Готова мазь зазвичай фасується в алюмінієві туби, вкриті всередині спеціальним захисним лаком.

Стрептоміцинова мазь із сульфаніламидами може бути приготовлена на емульсійній основі такого складу: самоемульгувальний гліцерин моностеарат — 12,0 г, віск білий — 3,0, гліцерин — 5,0, парафін рідкий 10,0, пропілгідроксибензоат — 0,035 г, вода — 90–100 мл. Мазі з солями бензилпеніциліну готують за типом тритураційних, бо у водному розчині антибіотик швидко інактивується. Пеніцилінова мазь має такий склад, г: бензилпеніциліну натрієва сіль — 0,65, ланолін безводний — 20,0, вазелін — до 100,0. Солі бензилпеніциліну доцільно диспергувати з вазеліновим маслом, тому що масляна плівка, яка утворюється навколо частинок порошку не дає можливості рідинам організму розчиняти антибіотик і тим самим зменшує його інактивацію, а також сповільнює вивільнення його із основи, що забезпечує пролонговану дію такої мазі.

Парентеральний шлях уведення антибіотиків має ряд недоліків так само, як і пероральний. Тому призначення антибіотиків у вигляді супозиторіїв має велике значення. Швидкість всмоктування антибіотиків залежить від природи основи. Як основу використовують масло какао, віск, гідровані рослинні олії та різні ПАР. Виготовляють супозиторії викачуванням або пресуванням, виливанням не можна. Пеніцилін розтирають із невеликою кількістю молочного цукру і у вигляді тонкого порошку вводять у супозиторну основу. Вміст пеніциліну в одному ректальному супозиторії — від 100 000 до 500 000 од. У разі зберігання в прохолодному місці активність готових супозиторіїв може зберігатися два місяці. Інколи для прискорення дії пеніциліну його розчиняють у розчині натрію цитрату (1:1000) і змішують із супозиторною основою. Стійкість таких супозиторіїв — не більше як 10 діб.

Ректальні супозиторії також готують із тетрацикліном. Найчастіше з цією метою застосовують тетрацикліну гідрохлорид, що зумовлено меншою подразнювальною дією цього антибіотика.

Лікарські форми з антибіотиками оцінюють за такими показниками: перевіряють правильність документації, упаковку (укупорку), органолептичний контроль (колір, запах, наявність осаду), відсутність механічних домішок (рідкі ліки), відхилення в об'ємі або масі, однорідність змішування (порошки, мазі), температуру плавлення, час повної деформації (супозиторії), а також інші показники відповідно до методик контролю даного препарату.

Зберігання лікарських форм з антибіотиками ґрунтується передусім на фізико-хімічних властивостях кожного антибіотика окремо. Наприклад, водні розчини сульфату поліміксину зберігають протягом семи діб при температурі 4–10 °С.

1.5.8. Екологічні проблеми у виробництві та застосуванні антибіотиків

Екологічні проблеми, пов'язані з антибіотиками, можуть виникати як на етапі їх промислового виробництва, так і практичного застосування.

На стадії отримання високопродуктивних штамів досить часто використовуються різні хімічні мутагени. Серед них такі високотоксичні сполуки, як етиленімін, нітрозогуанідин, етидія бромід та ін. За необережної роботи з цими речовинами останні можуть потрапляти у довкілля та індукувати мутації у мікро- та макроорганізмів.

У разі конструювання штамів продуцентів генно-інженерними методами не можна виключити потрапляння цих штамів у довкілля. І хоча можливості розвитку мікроорганізмів, отриманих генно-інженерними методами, в природі досить обмежені, потрібно вживати всіх заходів для запобігання цьому.

У промислового отриманні антибіотиків на етапі біосинтезу можуть статися ситуації, що вимагають злиття вмісту ферментера у трап. Таку операцію можна виконувати лише після попередньої стерилізації вмісту ферментера. Порухення цього правила може призвести до різкої зміни екологічної рівноваги водного басейну, куди потрапить культура мікроорганізмів у великій кількості.

Важливим завданням у виробництві антибіотиків є очищення стічних вод (найзабрудненішими серед яких є відпрацьовані

нативні розчини) та газових викидів для запобігання розсіюванню в атмосфері кінцевого продукту виробництва.

Екологічні проблеми, пов'язані з використанням антибіотиків, лежать у площині порушення мікробної екологічної рівноваги у природних еконішах і, зокрема, в організмі людини.

Контрольні запитання до підрозділу 1.5

1. Охарактеризуйте основні етапи промислового виробництва антибіотиків.
2. Значення джерел вуглецю, азоту й мікроелементів в утворенні антибіотиків.
3. Охарактеризуйте стадію біосинтезу у процесі одержання антибіотиків.
4. Вплив хімічних і фізико-хімічних факторів на процес утворення антибіотиків.
5. Які основні методи виділення і очищення антибіотиків?
6. Опишіть основні методи, що дають можливість визначити мікробіологічну чистоту антибіотиків.
7. Як здійснюється фармакологічний контроль антибіотиків?
8. Назвіть основні лікарські форми з антибіотиками.
9. У чому полягає особливість виготовлення ін'єкційних препаратів антибіотиків?
10. Які екологічні проблеми може спричинити виробництво і використання антибіотиків?

1.6. ТЕХНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОДЕРЖАННЯ АНТИБІОТИКІВ МІКРОБНОГО ПОХОДЖЕННЯ

1.6.1. Бактеріальні антибіотики

Бактерії є продуцентами значної кількості антибіотиків, але порівняно невелика їх кількість використовується в практиці, тому що більшість бактеріальних антибіотиків токсичні.

Використання бактеріальних антибіотиків:

медицина — граміцидин С, поліміксини, бацитрацини;

харчова промисловість — нізин, субтилін;

сільське господарство — бацитрацини.

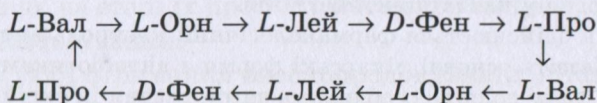
За хімічною будовою майже всі бактеріальні антибіотики є поліпептидами.

Бактерії здебільшого синтезують антибіотики, які є не окремими сполуками, а групою близьких за хімічними та біологічними властивостями речовин. Відомо, що *Bacillus subtilis* утворює приблизно 70 різних поліпептидних антибіотиків, *Bacillus polymyxa* — близько 20 поліміксинів.

Особливість поліпептидних антибіотиків, що утворюють бактерії, полягає в тому, що вони містять разом з *L*-формами амінокислот (які зазвичай входять до складу білків) *D*-амінокислоти, а також метиловані амінокислоти (метилдегідроаланін).

1.6.1.1. Граміцидин С

На сьогодні відомо п'ять видів граміцидинів — А, В, С_D, С(S) і D. Вони дещо різняться за амінокислотним складом. Найактивнішим є граміцидин С. Молекула цього антибіотика складається з 10 амінокислотних залишків п'яти амінокислот: *L*-валін, *L*-орнітин, *L*-лейцин, *D*-пролін, *D*-фенілаланін.



Продуцент — *Brevi bacillus (Bacillus brevis) subsp. G.B.* Грампозитивні спороутворювальні паличкоподібні бактерії, ізольовані з ґрунту. Продуцент у процесі розвитку в рідкому поживному середовищі дисоціює на ряд форм, що різняться морфологією колоній та іншими властивостями у разі засівання їх на тверді середовища з дріжджовим екстрактом. Це форми — R (складчаста), S (гладка), P⁺ і P⁻ (пласкі форми). S та P⁻ форми продуцента не здатні утворювати антибіотики.

Біосинтез граміцидину відбувається незалежно від процесу спороутворення. Антибіотик синтезується як у процесі спороутворення, так і клітинами, що активно розмножуються.

Умови отримання. Для отримання граміцидину С використовують м'ясні або дріжджові гідролізати. Температура культивування 40 °С, максимальний синтез антибіотика відмічається у перші 24 год. Кількість утворюваного антибіотика — до 2500 мкг/мл. Важливе значення для отримання граміцидину має аерація: за низької аерації бактерії розвиваються погано і антибіотик

майже не утворюється, а за дуже високої активно споживається субстрат, але антибіотик не утворюється. Необхідна інтенсивність аерації — від 2,0 до 5,8 г O_2 /(л·год).

Граміцидин С можна отримувати на досить простих синтетичних середовищах, наприклад на середовищах такого складу: бурштиновокислий амоній — 0,5 %, гліцерин — 1,5, сульфат магнію — 0,02, двозаміщений фосфат калію — 0,2 %, дистильована вода, рН середовища — 7,0–7,3. На такому середовищі можна отримувати до 2000 мкг/мл граміцидину.

Біосинтез граміцидину відбувається за наявності двох ферментів — граміцидинсинтази I і II в присутності АТФ та іонів магнію. Граміцидинсинтази містяться як у розчинній, так і в зв'язаній з мембранами формах. Синтез антибіотика відбувається не на рибосомах. Дослідники із США розробили метод ферментативного синтезу цього антибіотика.

Виділення граміцидину. Культуральну рідину підкислюють соляною кислотою до рН 4,5–5,0 і видаляють осад, що містить дихлоргідрат граміцидину і бактеріальні клітини (рис 1.8). У подальших стадіях антибіотик екстрагують із осаду за допомогою етилового спирту. Отриманий концентрат містить до 4 % граміцидину і певну кількість інших сполук, які в разі потреби можуть бути видалені. Граміцидин С у процесі упарювання спиртового екстракту легко перетворюється в кристалічну форму у вигляді голок.

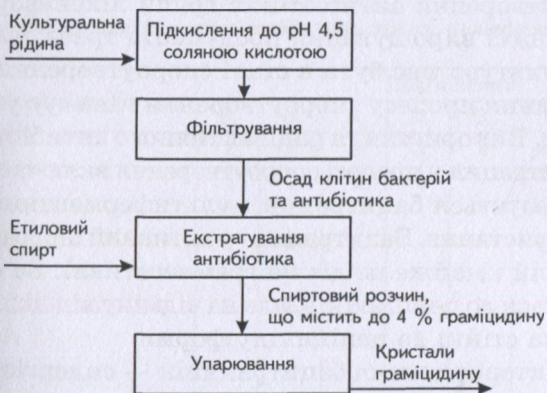


Рис. 1.8. Схема виділення граміцидину

Використання. Граміцидин С має досить широкий спектр антибіотичної активності щодо грамположитивних і деяких грамнегативних бактерій. Використовують у хірургії для первинного оброблення ран, у лікуванні інфікованих ран та опіків.

1.6.1.2. Бацитрацини

Відомо до десяти індивідуальних речовин бацитрацинів. Не всі вони є безпосередньо продуктами життєдіяльності бактерій, а можуть утворюватися в процесі виділення та очищення цього антибіотика. Основною речовиною є бацитрацин А, який становить до 37 % утворюваних бацитрацинів.

Бацитрацин А складається з 10 амінокислот: трьох залишків *L*-ізолейцину, *L*-лейцину, *L*-цистеїну, *L*-гістидину, *L*-лізину, *L*-аспарагінової кислоти, *D*-фенілаланіну, *D*-орнітину, *D*-аспарагінової та *D*-глутамінової кислот. Молекули всіх бацитрацинів містять тіазолінове кільце.

Продуцент — *Bacillus licheniformis*. Процес утворення бацитрацину *B. licheniformis* пов'язаний зі споруванням.

Умови утворення. Поживні середовища, які використовуються для біосинтезу, містять глюкозу, лактат амонію, соєве борошно, неорганічні солі. Для біосинтезу бацитрацинів суттєве значення має співвідношення вуглецю та азоту в поживному середовищі. За високого співвідношення С:N (більше вуглецю) відбувається утворення бацитрацинів, за зниженого — спостерігається утворення антибіотиків групи ліхеніформінів.

У процесі вирощування продуцента треба зважати на те, що його культура має бути в стані спорування. З'ясовано, що інгібування процесу спорування гальмує утворення бацитрацину. Використання радіоактивного антибіотика показало, що бацитрацин у процесі спорування включається в спори.

Синтезується бацитрацин мультиферментним шляхом.

Використання. Бацитрацин — активний щодо грамположитивних бактерій і майже не діє на грамнегативні. За спектром дії наближається до пеніцилінів, але на відміну від них, бацитрацини діють на стійкі до пеніциліну форми.

Характерна ознака бацитрацинів — синергізм дії з іншими антибіотиками, такими як пеніцилін, хлортетрациклін, стрептоміцин.

Активність препаратів бацитрацинів високого ступеня очищення — близько 60 од/мг. У сухому стані можуть зберігатися досить тривалий термін (до 2 років) без втрати активності. В медицині застосовують переважно у локальному лікуванні хірургічних інфекцій, захворювань шкіри, використовується в сільському господарстві як домішка до кормів — стимулюють ріст сільськогосподарських тварин.

1.6.1.3. Поліміксини

Поліміксини — це сполуки з групи поліпептидів, що мають основний характер і утворюють солі з неорганічними та органічними кислотами. Існує кілька груп поліміксинів — А, В, С, D, Е, М. Загалом на сьогодні описано 22 антибіотика поліміксинового ряду. Найбільше практичне значення мають поліміксини В і М.

Поліміксини розрізняються за амінокислотним складом. Але в молекулі всіх поліміксинів містяться треонін, α , γ -діаміномасляна кислота і одна з жирних кислот (табл. 1.2).

Умови отримання. Культура продуцента добре росте і утворює антибіотик за глибинного культивування. Як основний компонент поживного середовища використовують кукурудзяний екстракт, дріжджовий екстракт, сульфат амонію. Як джерело вуглецю доцільно використовувати глюкозу, сахарозу, крохмаль.

Таблиця 1.2. Склад деяких антибіотиків групи поліміксинів

| Складові молекули антибіотика | Поліміксини | | | | | | | |
|--|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|---|---|----------------|
| | B ₁ | B ₂ | B ₃ | D ₁ | D ₂ | К | М | S ₁ |
| L-Треонін | 2 | 2 | 2 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| L-Лейцин | 1 | 1 | 1 | 1 | | | | |
| D-Лейцин | | | | | | 1 | 1 | |
| D-Фенілаланін | 1 | 1 | 1 | | | | | 1 |
| D-Серин | | | | 1 | 1 | | | 1 |
| L- α , γ -діаміномасляна кислота | 6 | 6 | 6 | 5 | 5 | 6 | 6 | 5 |
| 6-метилоктаноїл | 1 | | | 1 | | | 1 | 1 |
| 6-метилгептаноїл | | 1 | | | 1 | | | |
| Октаноїл | | | 1 | | | | | |
| Аліфатична кислота | | | | | | 1 | | |

Продуцент — *Bacillus polymyxa*, *B. circulans*.

Для розвитку продуцента і утворення антибіотика може бути рекомендоване середовище такого складу: глюкоза — 20 г/л, хлорид натрію — 0,1, крейда — 3, кукурудзяний екстракт — 2 г/л або біотин — 0,5 мг/л, вода водопровідна — до 1 л, рН 7,0–7,2.

Вихідну культуру готують на гороховому агарі у вигляді спор. Засівний матеріал вирощують протягом 10–18 год і вносять у ферментер у кількості 2,0–2,5 %. Культивування здійснюють при температурі 28–30 °С та аерації. Максимальне утворення антибіотика спостерігається на 24–30 годині культивування, основна маса поживних компонентів до тих пір уже спожита. Препарат повинен містити не менше як 8000 од./мг антибіотика.

Поліміксин видаляється різними способами. В деяких випадках антибіотик адсорбують за допомогою вугілля, а потім елюють підкисленою сумішшю ацетону і води або метиловим чи етиловим спиртами. Виділяти антибіотик можна також екстрагуванням із нефільтрованої культуральної рідини ізопропиловим спиртом у присутності сульфату амонію (0,25 об'єму спирту до 1 об'єму культуральної рідини). Досить поширений спосіб виділення поліміксинів — використання іонообмінних смол марки КБ-2; за хімічною природою поліміксини — луги, тому для їх виділення використовують катіоніти.

Етапи процесу виділення поліміксину М за допомогою катіонітів такі. Культуральну рідину обробляють щавлевою кислотою до рН 3,5–4,0, потім — щавлевокислим натрієм до повного видалення іонів кальцію та фільтрують. Таким обробленням повністю видаляють неорганічні (кальцій, залізо) та органічні катіоніти, що є конкурентами антибіотика у зв'язуванні з катіонітами. На наступному етапі рідину нейтралізують розчином їдкого натрію і пропускають через колонки, заповнені катіонітом до насичення антибіотиком головної колонки. Після насичення колонку відключають і промивають дистильованою водою. Десорбцію антибіотика здійснюють за допомогою водного розчину соляної або сірчаної кислоти. Знебарвлення елюатів досягається обробленням у кислому середовищі активованим вугіллям або перманганатом калію.

Розчин поліміксину М сульфату висушують методом розпилювання попередньо упареного в 1,5–2,0 рази розчину до

значення вологості не більше як 6 %. Такий препарат фасують у поліетиленові мішки.

Отримання лікарської форми поліміксину М сульфату передбачає розчинення товарного препарату, його стерильне фільтрування, розлив у стерильні флакони, які заморожуються в сушильному агрегаті і висушуються методом ліофілізації (загальна тривалість процесу — 24–26 год), після чого флакони укупорюються стерильними пробками та алюмінієвими ковпачками.

Препарат потрібно випробувати на токсичність. Тест-доза — 1000 од. в 0,5 мл води внутрішньовенно. Термін спостереження — 24 год. Препарат для виготовлення лікарських форм на стерильність не перевіряється.

Використання. Зовні — білий порошок або пориста маса без запаху, препарат гігроскопічний, легко розчиняється у воді і практично не розчиняється у етиловому спирті, хлороформі та ефірі. Досить стабільний у кислому середовищі, менш стабільний у лужному.

Діє переважно на грамнегативні мікроорганізми, затримує ріст кишкової, дезинтерійної паличок, паличок черевного тифу, паратифів А і В. Активний щодо синьогнійної палички, на яку не діють інші антибіотики.

За місцевого застосування препарат малотоксичний. У разі внутрішнього введення слабо всмоктується, тому його застосовують у лікуванні кишкових інфекцій. Препарат застосовується у лікуванні гострих і хронічних дизентерій у дорослих і дітей, якщо застосування інших препаратів неефективне.

Антимікробна активність поліміксинів пов'язана зі зміною проникності мембран, внаслідок чого клітини втрачають іони калію.

1.6.1.4. Нізин

До групи нізинів належать чотири антибіотики — нізини А, В, С, D. До складу молекул цих антибіотиків входять 34 залишки 15 амінокислот: лізину, гістидину, аспарагінової кислоти, серину, проліну, гліцину, аланіну, валіну, метіоніну, ізолейцину, лейцину, а також залишки ненасичених амінокислот — дегідроаланіну і β -метилдегідроаланіну. Можуть зустрічатися

також сірковмісні амінокислоти — лантіонін і β-метиллантіонін.

Біосинтез нізину чутливий до впливу хлорамфеніколу, який є інгібітором білкового синтезу, та актиноміцину, який інгібує синтез РНК. Це дає можливість вважати, що утворення нізину, на відміну від інших поліпептидних антибіотиків, пов'язане з рибосомним механізмом. Утворення нізину відбувається синтезом нізиноподібних білків, а перетворення пренізину в нізин — під дією ферменту, розміщеного на зовнішній поверхні мембрани клітин продуцента.

За хімічною природою нізин є кислотою, тому він стабільніший у кислих умовах середовища. Розчин нізину при рН 2 витримує нагрівання до 120 °С без втрати активності.

Продуцент — *Streptococcus lactis*.

Умови утворення. Біосинтез нізину починається в ранню стаціонарну фазу розвитку продуцента. Відносно високий вихід антибіотика спостерігається на середовищах, що містять амонійні солі органічних кислот і глюкозу. Оптимальне значення рН для росту і утворення антибіотика — 6,5–6,8. Треба зазначити, що рН середовища впливає на виділення антибіотика з клітин продуцента. Так, за рН 4,3 більш як 90 % нізину виділяється в середовище.

Використання. Антибіотик нізин пригнічує розвиток грам-позитивних і деяких кислотостійких бактерій, не впливає на грамнегативні, дріжджі та плісняві гриби, пригнічує розвиток пневмококів, стрептококів, різноманітних видів *Bacillus*, *Clostridium*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, не має антимікробної дії на *E. coli*, *Salmonella typhi*, *Shigella*.

Нізин не використовується в медицині, але використовується у ветеринарії та в харчовій промисловості як консервант. Безпека використання нізину в харчовій промисловості зумовлюється його поліпептидною структурою. В кишково-шлунковому тракті людини цей антибіотик швидко руйнується до амінокислот, які включаються в звичайний метаболізм людини.

1.6.1.5. Батумін

Продуцент — *Pseudomonas batumici*.

Батумін — унікальний антибіотик, відкритий українськими вченими, працівниками Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАНУ. Антибіотик не має аналогів серед відомих груп антибіотиків і характеризується високою селективною активністю щодо всіх випробуваних штамів стафілококів, у тому числі штамів, полірезистентних до антибіотиків. Батумінова кислота — основна частина антибіотика батуміну — є 3,5,15-триметил-7-метилен-17-кето-2,10,12-триєн-октадекановою кислотою. Здатність «дикого» штаму *P. batumici* до біосинтезу антибіотика була підвищена хімічним мутагенезом; одержано активний штам — продуцент антибіотика, захищений патентом України.

Унікальна активність батуміну щодо стафілококів стала підставою для створення на його основі діагностичного препарату «Діастаф», який забезпечує швидку й надійну діагностику стафілококів в умовах клінічної лабораторії. Рішенням Державного фармакологічного центру МОЗ України диски з батуміном «Діастаф» для експрес-ідентифікації стафілококів впроваджено у клінічну практику.

Розроблена й захищена патентом України лікарська форма антибіотика — 0,1 % батумінова мазь, ефективна у місцевому лікуванні стафілококових інфекцій. Мазь є високоефективним препаратом у боротьбі з назальним носійством полірезистентних до антибіотиків госпітальних штамів золотавих стафілококів.

У процесі вивчення механізму дії батуміну були продемонстровані істотні зміни жирнокислотного складу стафілококів, вплив антибіотика на структуру та функції (зокрема, на проникність) бактеріальної мембрани.

1.6.2. Актиноміцетні антибіотики

Найбільша кількість антибіотиків (не менш як 70 %), що широко використовуються в практичних цілях, належать до речовин, що утворюються актиноміцетами (порядок *Actinomycetales*). До цього порядку належать кілька родів: *Streptomyces*, *Nocardia*, *Actinomadura*, *Micromonospora*, *Saccharopolyspora* та ін. Продуцентом більшості відомих на сьогодні антибіотиків, що синтезуються актиноміцетами, є рід *Streptomyces*.

Найвизначнішим досягненням, що привернуло пильну увагу дослідників до вивчення антибіотиків актиноміцетного походження, було відкриття у 1944 р. З. Ваксманом стрептоміцину. Роботи з вивчення цього антибіотика були відзначені Нобелівською премією. На той час уже були відомі кілька антибіотичних речовин, що утворювалися актиноміцетами, але вони були дуже токсичні.

Антибіотики, що утворюються актиноміцетами, дуже різноманітні за хімічною будовою. Вони використовуються в різних галузях, оскільки мають антибактеріальну, антигрибну та протипухлинну активність.

1.6.2.1. Стрептоміцин

Перше повідомлення про виділення антибіотика було зроблене А. Шатцом та З. Ваксманом у січні 1944 р. Антибіотик отримав назву стрептоміцин (від родової назви актиноміцетів — *Streptomyces*), а організм, що його утворює було ідентифіковано як *Streptomyces griseus*.

Стрептоміцин утворюють не лише штами *S. griseus*, а й інші стрептоміцети: *S. bikiniensis*, *S. raneus*, *S. reticuli*. Але основним продуцентом є *Streptomyces griseus*. Продуценти, що використовуються на сучасних виробництвах, здатні накопичувати до 10–20 тис. мкг/мл антибіотика.

Виробництво стрептоміцину розпочалося у 1946 р. і на сьогодні воно становить не менше як 300 т на рік.

Стрептоміцин — аміноглікозидний антибіотик широкого спектра дії. Його бактерицидна дія зумовлена пригніченням синтезу білка на рибосомах мікробної клітини. Стрептоміцин один із класичних протитуберкульозних антибіотиків. Він активний щодо більшості грамнегативних бактерій, чутливі до нього також стафілококи, стрептококи, дифтерійна паличка, але він не діє на анаеробні бактерії.

Токсичність стрептоміцину порівняно невелика. Для людини масою 60 кг токсична доза цього антибіотика становить 6 г. Зазвичай у практиці хворому одночасно вводять близько 1 г препарату. Проте за тривалого використання великих доз препарату спостерігаються вестибулярні порушення та глухота.

Найкращим джерелом вуглецю для розвитку *S. griseus* і утворення антибіотика є глюкоза. Стрептоміцет добре росте також на середовищах, що містять фруктозу, галактозу, ксилозу, мальтозу, лактозу, крохмаль. Продукент не здатний гідролізувати сахарозу і рафінозу. Майже всі штами продукента використовують тваринні жири, рослинні олії, жирні кислоти як джерело вуглецю на середовищах, що не містять глюкози.

Для промислового отримання антибіотика запропоновано середовища, до складу яких входять соєве борошно, кукурудзяний екстракт, земляні горіхи, відходи виробництва пеніциліну. Вибір основного компонента середовища визначається наявністю сировини в регіоні виробництва стрептоміцину.

Для розвитку стрептоміцета та біосинтезу стрептоміцину як джерело азоту найпридатніші амонійні солі. Нітрати як єдине джерело азоту не використовуються, але за наявності в середовищі дріжджового автолізату стрептоміцет їх використовує.

Середовище для біосинтезу стрептоміцину обов'язково містить хлорид натрію. За наявності хлориду натрію збільшується проникність клітинної стінки і стрептоміцин легше переходить у середовище, не відбувається біосинтез стрептоміцину, а лише полегшується виділення утвореного антибіотика.

Стрептоміцин здебільшого виробляється на середовищах із соєвим борошном приблизно такого складу, %: глюкоза — 2,0; соєве борошно — 2,0; сульфат амонію — 0,3; фосфат калію однозаміщений — 0,05; хлорид натрію — 0,25; карбонат кальцію — 0,3.

Стрептоміцин добре накопичується на середовищах, що містять відвар соєвого борошна (1 %) з додаванням глюкози (1 %) і хлориду натрію (0,5 %).

Утворення стрептоміцину також спостерігається на синтетичному середовищі такого складу: глюкоза — 36,0 г, натрій молочнокислий — 11,2, NH_4Cl — 4,28, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 2,68, KCl — 4,47, $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ — 2,46 г, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 14,3 мг, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 13,9, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ — 84,5 мг, вода дистильована — до 1 л (рН 6,5–7,0).

Межі оптимуму температури для біосинтезу стрептоміцину становлять 27–29 °С, підвищення до 30 °С призводить до припинення біосинтезу антибіотика. Найкращим початковим

значенням рН середовища для розвитку продуцента є 7,0. Стрептоміцин утворюється за значення рН у межах 7,5–8,5. *S. griseus* — високоаеробний організм, що поглинає значну кількість кисню, яка залежить від складу середовища і стадії розвитку продуцента.

Принцип виділення стрептоміцину полягає в адсорбції активованим вугіллям із культуральної рідини та наступній елюції з вугілля підкисленим метанолом. Для цього культуральну рідину *S. griseus* обробляють 0,5 % активованого вугілля за рН 2,0. За таких умов вугілля сорбує більшу частину неактивних домішок і практично не сорбує стрептоміцин. Після цього вугілля відфільтровується, рідина нейтралізується і стрептоміцин сорбується 1,0 % активованого вугілля за нейтрального значення рН. Вугілля з адсорбованим на ньому стрептоміцином промивається водою, а потім — нейтральним етиловим і метиловим спиртом для видалення домішок. Елюція стрептоміцину з вугілля відбувається за його оброблення підкисленим соляною кислотою метанолом. До кислого елюату додають чотири об'єми сухого сірчаного ефіру, після чого в осад випадає солянокисла сіль стрептоміцину.

Згідно з даними інших дослідників стрептоміцин успішніше може бути отриманий у разі його безпосередньої сорбції на нейтральному вугіллі (без попереднього очищення кислим вугіллям), з наступною елюцією водним розчином метанолу (співвідношення спирт : вода 1:1), підкисленим 0,8 н. розчином мурашиної кислоти. Одержаний елюат упарюється у вакуумі, залишок розчиняють у невеликій кількості метанолу, стрептоміцин осаджується додаванням чотирьох об'ємів ацетону.

Надалі стрептоміцин можна очищати обробленням його розчинів окисом алюмінію. У разі внесення до розчину стрептоміцину в метанолі окису алюмінію останній буде сорбувати неактивні домішки, що дає можливість значно підвищувати чистоту препаратів стрептоміцину.

В Україні стрептоміцин випускають ВАТ «Київмедпрепарат», ТОВ «Львівтехнофарм», ТОВ «Авант» (Київ) у вигляді сульфату стрептоміцину, порошку для приготування розчинів для ін'єкцій.

Особливість біосинтезу стрептоміцину — паралельно з накопиченням антибіотика утворюється досить потужний

протеолітичний комплекс — проназа. Це мультиензимна композиція широкого спектра протеолітичної дії. Ферментний комплекс можна видаляти з культуральної рідини після видалення стрептоміцину. Це може бути прикладом створення інтегрального виробництва двох субстанцій за культивування одного продуцента.

Проназа. Протеази *S. griseus* отримують з фільтрату глибинної культури вибірковою сорбцією катіонообмінними смолами. Після елюції і подальшого очищення протеаза очищується в 22–25 разів і відома на світовому ринку під назвою проназа.

Проназа є комплексним препаратом, що складається з 11 протеаз: чотирьох нейтральних, трьох лужних протеїназ, трьох амінопептидаз і карбоксипептидази. Це стабільний ферментний препарат, що характеризується широкою специфічністю і здатністю глибоко (на 70–90 %) гідролізувати субстрат до амінокислот. Тільки керотин і фіброїн шовку важко гідролізуються проназою. Проназа розчинна у воді, слабких сольових розчинах, водних розчинах ацетону і спиртів із концентрацією не більш як 50 %. Середня молекулярна маса пронази — 20 000.

Проназа стійка до дії температури. Після 10-хвилинного витримування водних розчинів пронази при 40 °С зберігається більш як 90 % первинної активності препарату; при 50 °С — близько 70 %. За наявності субстрату термостабільність пронази значно збільшується.

Оптимальне рН у лужній зоні — від 8 до 9, за рН нижче як 4 і вище як 10 протеази інактивуються. Стабілізується проназа іонами кальцію, нейтральні протеїнази і пептидази пронази є металоферментами. Пептидази інгібуються ЕДТА, причому за наявності іонів кальцію і кобальту цей ефект знімається.

Проназа містить ферменти, близькі за механізмом дії до трипсину і хімотрипсину. Треба зазначити, що хімотрипсин-подібний фермент *S. griseus* характеризується високою еластазною активністю. Вірогідно, це комплексний фермент, що має в своєму складі фрагмент еластазного ферменту.

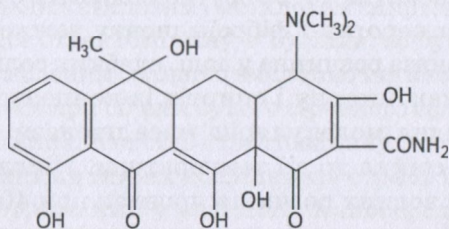
Препарати пронази тривалий час зберігають свою активність. У висушеному вигляді їх можна зберігати при –20 °С протягом трьох років без зміни активності, яка визначається за гідролізом казеїну і лейцин-β-нафтиламідую.

1.6.2.2. Тетрацикліни

До цієї групи належать речовини, що мають схожу хімічну будову, з широким спектром антибіотичної активності і успішно використовувані в медицині.

Ця група антибіотиків зберігає донині важливе значення у лікуванні захворювань дихальних шляхів, спричинених хламідіями, рикетсіями, спірохетами, мікоплазмами, стійкими до інших антибіотиків. Крім цього, деякі тетрациклінові антибіотики використовуються в сільському господарстві.

Найвідоміші тетрациклінові антибіотики: тетрациклін, 7-хлортетрациклін, окситетрациклін і метациклін, доксициклін, які отримано в результаті хімічної модифікації окситетрацикліну.



Тетрациклін

Хлортетрациклін. Уперше було виділено у 1948 р. Б. Дуггаром і названо ауреоміцином. Продуцент — *Streptomyces aureofaciens*. Після вивчення хімічної будови дано назву хлортетрациклін (ХТЦ). Випускається промисловістю за назвами біоміцин, ауреоміцин, дуоміцин, біовіт.

S. aureofaciens — аероб, оптимальна температура розвитку 26–28 °С, крім хлортетрацикліну накопичує вітамін В₁₂, тетрациклін та інші антибіотичні речовини.

ХТЦ має найбільшу активність за рН 3,5–4, у лужному середовищі досить швидко руйнується. Дія ХТЦ бактеріостатична. ХТЦ застосовується тільки як антибіотик у ветеринарії, оскільки, незважаючи на його активність у лікуванні коклюшу і дифтерії, це високотоксичний препарат.

Культура *S. aureofaciens* як джерело вуглецю використовує крохмаль, декстрини, мальтозу, фруктозу, не засвоює лак-

тозу, цукрозу, арабінозу. Найефективніше джерело вуглецю — глюкоза.

Компонентами комплексного середовища для одержання ХТЦ є крохмаль, соєве і кукурудзяне борошно. Альтернативне джерело вуглецю — оцтова, молочна, бурштинова кислоти або багатоатомні спирти — маніт, сорбіт, гліцерин, тваринні й рослинні жири. Останні одночасно є піногасниками.

Амонійні солі під час біосинтезу ХТЦ можуть бути єдиним джерелом азоту. Культура має досить розвинений протеолітичний комплекс і тому може засвоювати органічні джерела азоту — поліпептиди, амінокислоти. Найефективніший варіант — наявність у середовищі як органічного, так і неорганічного азоту.

Як джерело фосфору використовують кукурудзяний екстракт. На синтетичних середовищах використовують фосфорнокислі солі.

Біосинтезу ХТЦ сприяє молочна кислота, джерелом якої є кукурудзяний екстракт. Metали — магній, залізо, цинк, мідь — додають у синтетичні середовища у вигляді солей, у комплексні середовища ці елементи не додають.

На біосинтез тетрацикліну негативно впливає надлишок неорганічного фосфору в середовищі, при цьому прискорюються ріст продуцента, споживання вуглеводів, відбувається накопичення піровиноградної і оцтової кислот і зменшується антибіотична активність.

Середовище для культивування має рН 6,6–7,2. Процес біосинтезу ХТЦ відбувається за рН 5,5–7,2 при температурі 27–28 °С. Необхідною є посилена аерація порівняно з іншими випадками, а припинення аерації навіть на незначний термін призводить до припинення біосинтезу.

Після ферментації відбувається відділення міцеліальної маси, яку потім знімають із фільтрів і висушують на парових сушарках. Іншим способом культуральну рідину без фільтрації висушують на розпилювальній сушарці. Більша частина ХТЦ міститься в міцелії. ХТЦ, що міститься в культуральній рідині, можна осадити простим підкисленням до рН 7,5–8,0. Товарний препарат одержують висушуванням вологого осаду, що надходить із фільтрпресів.

ХТЦ витримує температуру 100 °С, тому для його одержання в сухому вигляді сушіння триває 3,5–4 год і значення кінцевої вологості препарату — 6 %. Сушильним агентом є повітря (температура 40–50 °С у стрічкових сушарках, до 200 °С у розпилювальній сушарці).

Для сільського господарства випускається препарат «*Biovit*». Загальний вигляд — однорідний порошок коричневого кольору зі специфічним запахом, нерозчинний у воді. В 1 г препарату «*Біовіт-120*» міститься 120 мг ХТЦ і не менше як 120 мкг вітаміну B_{12} , «*Біовіт-80*» — 80 мг ХТЦ і не менше як 8 мкг B_{12} , «*Біовіт-40*» — 40 мг ХТЦ і не менше як 40 мкг B_{12} .

Тетрациклін. Уперше було отримано каталітичним дегідруванням хлортетрацикліну у 1953 році. Пізніше антибіотик отримано біосинтетичним шляхом. Продукент — *Streptomyces viridifaciens*, використовують також мутантні форми *S. aureofaciens*.

У процесі розвитку на звичайних середовищах *S. aureofaciens* утворює переважно хлортетрациклін і незначну кількість тетрацикліну. Але у разі використання середовищ, що не містять хлоридів, вдається отримувати значну кількість тетрацикліну.

Ферментаційне середовище для отримання тетрацикліну містить кукурудзяний екстракт, кукурудзяне борошно, азотно-кислий амоній, крейду, бромистий натрій, роданистий амоній, роданистий бензил, соняшникову олію.

Процес виділення тетрацикліну передбачає звичні для виробництва антибіотиків стадії: попереднє оброблення культуральної рідини, концентрування антибіотиків і отримання технічних продуктів чи концентратів, отримання товарних продуктів.

Тетрациклін утворює нерозчинні продукти з багатьма речовинами, наявними в культуральній рідині (солями кальцію та магнію, деякими амінами, білками тощо). Під час ферментації такі нерозчинні сполуки накопичуються в міцелії продуцента, а концентрація тетрацикліну в розчині залишається порівняно невеликою. Тому найпоширенішими є методи виділення тетрацикліну, що після первинного оброблення культуральної рідини забезпечують перехід активної речовини в розчин, максимальне осадження домішок, повне відділення міцелію. Перехід тетрацикліну в розчин відбувається за підкислення

культуральної рідини до рН 1,5–2,0. Одночасно за таких умов осаджуються іони заліза, кальцію, коагулюють білки, що забезпечує добру фільтрацію культуральної рідини.

Найпростіший спосіб виділення тетрацикліну полягає в його осадженні у разі доведення рН розчину до 9,0–9,5. За таких умов утворюється аморфний осад, що містить солі тетрацикліну з кальцієм та магнієм, білки, деякі аміни, велику кількість пігментів. Осад відфільтровують, промивають водою і отримують продукт із вологістю 70–80 %, що містить до 500 од/мг тетрацикліну (у перерахунку на суху речовину). Вологий осад обробляють 3–4 % розчином щавлевої кислоти, отримують розчин з рН 1,5–1,8, що містить до 30 000 од/мл тетрацикліну. При цьому з розчину осаджується оксалат кальцію і певна частина оксалату магнію. Осад видаляють фільтруванням. З отриманого розчину тетрациклін осаджують за доведення рН до 4,5–5,0. Отримують технічну основу тетрацикліну брудно-жовтого кольору, що містить 750–800 од/мг антибіотика у перерахунку на суху речовину. Для подальшого очищення такий продукт розчиняють у водному розчині щавлевої кислоти і освітлюють розчин активованим вугіллям (до 2 % вугілля від об'єму розчину). Після цього з розчину за рН 4,0 осаджують товарну основу тетрацикліну. Сушіння основи тетрацикліну здійснюють у калориферній або вакуумній сушарці.

Тетрациклінові антибіотики здатні вибірково накопичуватися в пухлинних тканинах. Опромінені пухлинні тканини, що містять тетрацикліни, починають флуоресціювати. Цей метод використовують у діагностиці хворих на рак шлунку.

В Україні тетрацикліну гідрохлорид у вигляді таблеток або капсул випускають такі підприємства: ЗАТ НВЦ «Борщівський ХФЗ», ВАТ «Вітаміни» (Умань), ІФГ АМН України, ТОВ «Львівтехнофарм».

1.6.2.3. Авермектини

Використовуються в сільському господарстві як ветеринарні препарати для лікування тварин і досить широко — як засоби захисту рослин.

За структурою авермектини — це антибіотики-макроліди.

Продуцент — *Streptomyces avermitilis*. Отримують ці антибіотики глибинним культивуванням даного продуцента. Аналіз культуральної рідини на вміст антибіотиків показує наявність чотирьох основних форм — А1, А2, В1 і В2. Кожна з цих форм має ще дві модифікації — а і в. З них найактивніша — В1а. Це і є препарат авермектин.

Культивують *Streptomyces avermitilis* із подальшим відділенням міцелію, який висушують на сушарці в киплячому шарі і отримують напівпродукт антипаразитарного препарату (НАП).

Зовні НАП — однорідний аморфний порошок темно-коричневого кольору, зі специфічним запахом свіжозораної землі, вмістом вологи — 10 %. У 1 кг НАП міститься 50 г авермектину. Його визначають хімічним методом — реакція з орцином з утворенням забарвлених похідних, а також біологічним методом — за паралічем рисової нематоди.

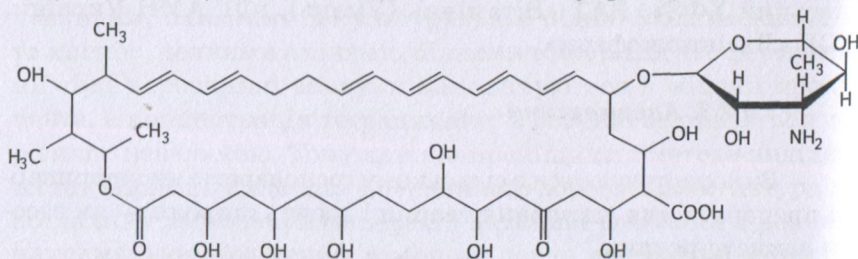
Випускають також спиртовий екстракт НАП у вигляді 1 % розчину. Цей препарат досить високоактивний, його достатня кількість $5 \cdot 10^{-4}$ % для рослин.

1.6.2.4. Ністатин

Продуцент — *Streptomyces noursei*.

Антибіотик уперше було ізольовано в 1950 р. І. Хазеном і Р. Брауном. Його використовують у медицині для лікування захворювань, спричинених грибами роду *Candida*. Він активний також проти міцеліальних грибів інших родів і не має антибактеріальної дії.

Молекула ністатину містить макроциклічне лактонне кільце (ністатинол), з'єднане з дезоксиаміноцукром (мікозаміном).



Ністатин

Вважається, що біологічна активність ністатину зумовлена наявністю лактонної структури і кон'югованих ненасичених подвійних зв'язків.

Механізм антимікробної дії пов'язаний з порушенням клітинної мембрани грибів, що містить холестерол та ергостерол. З ергостеролом антибіотик утворює комплекси, що призводить до появи каналів у мембранах і втрати клітинами грибів низькомолекулярних сполук.

Резистентність до ністатину зумовлена відсутністю або низьким вмістом ергостеролу в клітинах.

Ністатин отримують за глибинного культивування *S. noursei*, антибіотик накопичується переважно в міцелії.

Як засівний матеріал використовують спорову культуру продуцента, вирощену на агаризованому середовищі або пшоні. Для отримання засівного міцелію використовують лише молоду спорову культуру, яка через 30–40 год утворює густу масу міцелію (до 0,6–0,7 % за сухою речовиною). Міцеліальний засівний матеріал вирощується у колбах або спеціальних апаратах при температурі (28 ± 1) °C на середовищі, яке містить кукурудзяний екстракт, соєве борошно, азотнокислий чи хлористий амоній, крохмаль або глюкозу, вуглекислий кальцій. Ферментери засівають таким міцелієм у кількості до 10 %.

Продуцент ністатину добре росте на середовищах, що містять кукурудзяний екстракт, соєве борошно, амонійні солі, крохмаль, глюкозу, крейду. Процес розвитку продуцента і утворення антибіотика в ферментері триває 80–90 год при температурі 28 °C. Біосинтез ністатину вимагає інтенсивної аерації. У разі погіршення умов аерації знижується споживання вуглеводів і амонійного азоту, різко падає активність культуральної рідини.

Процес ферментації і синтез ністатину залежать від концентрації неорганічного фосфору в середовищі. Оптимальна концентрація неорганічного фосфору в умовах середовища з дріжджовим екстрактом — 5–6 мг%.

У культуральній рідині ністатин міститься в нерозчинному вигляді у міцелії. Для виділення антибіотика зазвичай відфільтровують міцелій і відповідним методом екстрагують із нього ністатин.

Хоча розчинність ністатину у воді дуже мала, в окремих випадках у процесі ферментації у середовище переходять значні кількості антибіотика, особливо за автолізу, коли відбувається

підлужнення середовища. Тому фільтрування культуральної рідини треба розпочинати до появи будь-яких ознак автолізу.

Треба також враховувати, що гіфи продуцента ністатину дуже тонкі, тому для фільтрування культуральної рідини потрібно використовувати фільтрувальні порошки (наприклад кізельгур).

Для відділення міцелію можна використати також сепарацію.

Відділений фільтруванням міцелій містить до 88 % вологи. Для подальшого виділення антибіотика за допомогою органічних розчинників міцелій має бути зневоднений.

Міцелій може бути зневоднений сушінням при мінімальній температурі, що не призводить до втрати активності антибіотика, або оброблений органічним розчинником, змішаним із водою.

Зі зневодненого міцелію ністатин екстрагується метанолом (або іншим спиртом). Додавання до розчинника хлориду кальцію дає можливість підвищити концентрацію антибіотика в екстракті за рахунок комплексоутворення.

Спиртовий екстракт, крім ністатину, містить жироподібні домішки та інші продукти життєдіяльності актиноміцета. Його упарюють у 10 разів. Домішки, що випадають в осад, видаляють фільтруванням, а ністатин виділяють розбавленням упарених екстрактів водою. За таких умов ністатин випадає в осад, який відділяють від маточного розчину сепаруванням або фільтруванням. Після багаторазового промивання антибіотик висушують. Висушений порошок антибіотика може бути оброблений дихлоретаном, хлороформом або чотиріхлористим вуглецем для видалення жироподібних і забарвлених домішок і повторно висушений.

Товарний порошок ністатину має жовте забарвлення, активність до 5000 од/мг, вихід становить 50–60 % культуральної рідини.

Препарат у вигляді мазі, таблеток вкритих оболонкою, ректальних супозорій випускають українські підприємства: ТОВ «Лубнифарм», ЗАТ НВЦ «Борщагівський ХФЗ», АТ «Галичфарм», ТОВ «Фармацевтична компанія «Здоров'я», ВАТ «Вітаміни», ТОВ «Львівтехнофарм», ВАТ «Монфарм».

1.6.2.5. Рифампіцин

Продуцент — *Mycolatopsis (Nocardia) mediterranei* n.sp.
Він добре розвивається і синтезує антибіотик на середовищах^x

із кукурудзяним екстрактом, соєвим борошном. Утворюється комплекс з п'яти антибіотиків — рифампіцини А, В, С, D, Е. Найстабільніший рифампіцин В.

Антибіотик має протибактеріальну активність. Механізм дії зумовлено пригніченням активності ДНК-залежної РНК-полімерази шляхом утворення з нею комплексів, що призводить до зниження синтезу РНК мікроорганізмів.

Активний щодо грампозитивних бактерій і мікобактерій туберкульозу. У великих концентраціях діє на ряд грамнегативних мікроорганізмів. Вірулоцидний — активний щодо вірусу сказу.

В Україні випускається у вигляді капсул на підприємствах ЗАТ НВЦ «Борщагівський ХФЗ», ІФТ АМН України, ЗАТ «Фармацевтична фірма «Дарниця».

1.6.2.6. Дауноміцин

Продуцент — *S. peuceticus*, уперше описано у 1963 р., а у 1965 р. Г. Гаузе описав штам *S. coeruleorubidis*, що утворював рубоміцин. Антибіотики виявилися ідентичними за структурою.

Дауноміцин (адриаміцин, карміноміцин) і подібні до нього сполуки мають протипухлинну активність і використовуються в хіміотерапії ракових захворювань. Їх не використовують для лікування інфекційних хвороб, хоча вони мають антибактеріальну активність щодо грампозитивних бактерій.

Механізм біологічної дії дауноміцину і його аналогів пов'язаний із пригніченням реплікації та транскрипції ДНК. Молекули цих антибіотиків убудовуються між основами ДНК і перешкоджають зв'язуванню РНК-полімерази з ДНК, що призводить до пригнічення синтезу РНК.

1.6.2.7. Ландоміцин Е

Продуцент — *Streptomyces globisporus*. Антибіотик із протипухлинною активністю, що на сьогодні активно досліджується українськими вченими в Інституті біології клітини НАН України (м. Львів). Було виявлено високу протипухлинну активність ландоміцину Е *in vitro* проти 60 ліній ракових клітин різного походження в організмі людини. Встановлено, що ландомі-

цин Е спричиняє запрограмовану смерть ракових клітин (апоптоз), яка виявляється у стисканні клітин, конденсації хроматину й утворенні апоптичних тілець, фрагментації ДНК, каспазоіндукованому розколі полі(АДФ-рибозил)полімерази, каспаз 3 і 7, інтенсивній деполяризації мембрани мітохондрій, зменшенні пулу внутрішньоклітинної АТФ і посиленні оксидативного стресу. Важливою властивістю ландоміцину Е можна вважати його активність проти ракових клітин із множинною лікарською резистентністю, що дає можливість успішно його використовувати разом з іншими препаратами (доксорубіцином) у клініці.

Ландоміцин Е має середню цитотоксичність порівняно з відомими і токсичнішими препаратами, які використовуються у клініці для лікування онкологічних хворих, і не має мутагенної активності.

1.6.3. Мікроміцетні антибіотики

Мікроміцети продукують велику кількість антибіотичних речовин (близько 2500), але лише деякі з них мають практичне значення. Решта не використовується через свою токсичність.

Характерною особливістю антибіотиків, що утворюються грибами, є відсутність азоту в їх молекулах, а також переважно циклічна (гетероциклічна) будова молекул. Проте найцінніші грибні антибіотики є сполуками, що містять азот.

У сільському господарстві та медицині застосовуються такі грибні антибіотики:

пеніциліни — основний продуцент — *Penicillium chrysogenum*. Утворюються також мікроміцетами: *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium nigricans*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nidulans*. Молекула пеніциліну — це біциклічна структура, що складається з β -лактамного та тiazолідинового кілець. До цієї структури приєднується певний радикал, специфічний для кожного антибіотика. Природні пеніциліни мають радикал бокового ланцюга, як правило, у вигляді бензилпеніциліну або оксибензилпеніциліну. З відщепленням бокового ланцюга від молекули пеніциліну утворюється 6-амінопеніциланова кислота (6-АПК). Вона майже позбавлена антибіотичної активності, але

з неї можна отримати велику кількість різноманітних напівсинтетичних пеніцилінів — ампіцилін, оксацилін тощо;

цефалоспорини — антибіотики, що продукуються мікроміцетом *Cephalosporium acremonium*. Характерна особливість цефалоспоринів — висока антибактеріальна активність і низька токсичність. Хімічна структура цефалоспоринів така, що з них можна отримувати велику кількість модифікованих антибіотиків;

гризеофульвін — *Penicillium nigricans*, *Penicillium griseofulvum*. Належить до групи кисневмісних сполук. Характерна особливість — дуже активний щодо мікроміцетів, у тому числі й тих, що мають хітинову оболонку. Малотоксичний. Використовується для лікування трихофітій (стригучий лишай), боротьби з борошнистою россою полуниці;

трихотецин — *Trichotecium roseum*. Має протигрибкову та противірусну дію і не має антибактеріальної дії. Особливо активний проти пеніцилів і мікроміцетних збудників. Він здатний пригнічувати фітопатогенні гриби і гриби, що спричиняють дерматомікози у тварин;

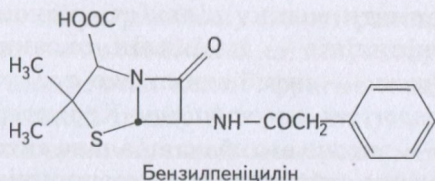
фумагілін — продукується *Aspergillus fumigatus*. Пригнічує бактеріофаги, деякі види амеб, але практично не діє на бактерії та мікроміцети. Використовується у бджільництві. В літературі є повідомлення про протипухлинну дію цього антибіотика.

Серед грибних антибіотиків найунікальнішими за своїми властивостями є β -лактамні антибіотики (пеніцилін і цефалоспорин). Вони широко використовуються в медичній практиці, оскільки мають широкий спектр антибіотичної дії, високу активність, стабільність і ефективність.

1.6.3.1 Пеніциліни

За хімічним складом ці антибіотики є одноосновними кислотами, що містять β -лактамне кільце. До цієї групи належать антибіотики природного походження, а також біологічно активні синтетичні та напівсинтетичні речовини. Усі пеніциліни мають бактерицидну дію.

Найвідомішою і загально визнаною є класифікація пеніцилінів, згідно з якою препарати поділяють на дві великі групи: природні і напівсинтетичні.



Природні пеніциліни: бензилпеніцилін (пеніцилін) натрієва та калієва солі; бензатин бензилпеніцилін, бензилпеніцилін прокаїн і комбіновані препарати з пролонгованою дією — біцилін-3 і біцилін-5; феноксиметилпеніцилін.

Напівсинтетичні препарати: ізоксазолілпеніциліни (оксацилін); амінопеніциліни (ампіцилін, амоксицилін); карбоксипеніциліни (карбеніцилін, тикарцилін).

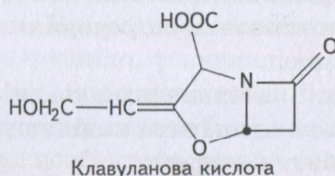
Препарати карбеніцилін, трикарцилін не зареєстровані і не випускаються в Україні.

Природні пеніциліни активні щодо грампозитивних бактерій (особливо до стрептококів, стафілококів, *Bacillus*), спірохет *Treponema*, *Leptospira*, меншою мірою — до *Enterococcus*.

Напівсинтетичні пеніциліни стійкіші до дії β -лактамаз і мають ширший спектр антибактеріальної дії. Оксацилін є основним антистафілококовим пеніциліном. Його клінічне застосування зумовлене стійкістю до дії багатьох β -лактамаз, у тому числі стафілококових. Ампіцилін і амоксицилін мають ширший спектр дії за рахунок окремих представників *Enterobacteriaceae* — *Escherichia coli*, *Shigella* spp., *Salmonella* spp., а також *Proteus mirabilis*. Тикарцилін — препарат активний щодо *Pseudomonas aeruginosa*.

Для подолання антибіотикорезистентності почали застосовувати комбінацію пеніцилінів з інгібіторами β -лактамаз. До інгібіторів β -лактамаз належать клавуланова кислота (клавуланат), сульбактам, тазобактам.

Клавуланова кислота утворюється культурою *S. clavuligerus*. Вона належить до оксипенемів і містить у своїй структурі β -лактамне кільце:



Клавуланова кислота не має антибактеріальної дії, але здатна пригнічувати активність β -лактамаз, що утворюються грам-позитивними і грамнегативними бактеріями.

Поєднанням амоксициліну з клавулановою кислотою створено препарат амоксиклав (аугментин, медоклав), ампіциліну і сульбактаму — уназин (ампісульбін). В Україні препарат такого типу — ампісульбін-КМП, ліофілізований порошок для приготування розчинів для ін'єкцій, (0,75 або 1,5 г у флаконі) — виробляє ВАТ «Київмедпрепарат».

Технологія отримання бензилпеніциліну. Вперше в промисловості пеніцилін був отриманий поверхневим методом культивування з використанням штамів, які виділені з природних субстратів і утворювали 10–50 од./мл антибіотика. На сьогодні в усьому світі бензилпеніцилін синтезується глибинним методом.

Продуцент — *Penicillium chrysogenum*.

Здатність утворювати пеніцилін поширена серед багатьох мікроміцетів, що належать до родів *Penicillium* та *Aspergillus*. Але ця властивість характерніша для групи *Penicillium notatum-chrysogenum*.

Penicillium chrysogenum на середовищі Райстрика утворює в основному колонії двох типів. Колонії першого типу мають округлу, радіально-складчасту форму. Повітряний міцелій зелений, добре розвинутий. По краю колонії розміщена смуга неспоруючого міцелію білого кольору завширшки 2–5 мм. Субстратний міцелій буруватий. Розчинного пігменту немає.

Колонії другого типу округлі, складчасті. Повітряний міцелій білуватий, слабкорозвинений.

Колонії першого типу найпродуктивніші, вони становлять основну масу популяції (91–93 %). Але і серед цих колоній, що не відрізняються одна від одної за культурально-морфологічними ознаками, є колонії з різним ступенем активності — від 40 до 100 % щодо вихідної активності штаму. Колонії другого типу завжди мають низьку антибіотичну активність — від 1 до 14 % активності популяції продуцента. Тому для підтримання вихідного рівня антибіотичної активності з розсіву популяції на середовищі Райстрика виділяють колонії першого типу з подальшою перевіркою їх продуктивності та відбором найактивнішої колонії.

Продукцент пеніциліну можна зберігати на пшоні і в ліофільно висушеному стані до трьох років, а в стерильному ґрунті — до двох років. Він генетично досить стійкий і витримує не менш як шість пасажів без помітного зниження антибіотичної активності.

За глибинного вирощування культура *Penicilium chrysogenum* проходить шість фаз росту, що характеризуються типовими цитологічними ознаками:

перша — проростання конідій, їх набухання та утворення невеликих ростових трубок, цитоплазма недиференційована. Наявні вакуолі, іноді з дрібними гранулами;

друга — розростання міцелію, цитоплазма сильно базифільна, гранули поступово зникають, до кінця другої фази з'являються дрібні крапельки жиру;

третья — утворення жирових включень у вигляді великих крапель, вакуолей немає, цитоплазма дуже базифільна;

четверта — поява вакуолей із гранулами, жирові включення містяться у формі дрібних крапель і менш виражені, ніж у третій фазі, базифілія знижена;

п'ята — клітини міцелію стають бочкоподібними і містять великі центральні вакуолі з однією або кількома дуже великими гранулами, жирових включень немає, базифілія продовжує знижуватися;

шоста — бочкоподібна форма клітин зберігається, але гранули фарбуванням не виявляються, замість них спостерігається оранжеве або рожеве рівномірне забарвлення вмісту великих центральних вакуолей, жирових включень немає, за винятком нечисленних гіфів із жировим переродженням, що залишився від більш ранніх фаз росту. З'являються окремі автолізовані клітини.

Характер розвитку міцелію дає можливість у процесі ферментації пеніциліну намітити два основних етапи: перший — період росту (вегетативний) — від першої до третьої фази росту та другий — від четвертої до шостої фази, пов'язаний з утворенням пеніциліну.

Основним завданням культивування продукента пеніциліну в посівних апаратах є швидке отримання великої маси міцелію, здатної забезпечити у разі пересівання у ферментер інтенсивний ріст і високий вихід антибіотика. Для здійснення

цього завдання продуцент необхідно вирощувати на середовищах, багатих легкозасвоюваними поживними речовинами, в умовах доброї аерації, при оптимальній для росту мікроорганізму температурі.

Поживні середовища для вирощування посівного міцелію зазвичай містять легкозасвоюваний вуглевод, яким для пеніцилів є глюкоза. Як друге джерело вуглецю використовують у невеликих кількостях лактозу, наявність якої в середовищі для вирощування посівного міцелію бажана з такої причини. Лактоза є обов'язковим компонентом ферментаційного середовища, її споживання починається не відразу, а після деякого періоду адаптації, протягом якого відбувається утворення ферменту, який розщеплює лактозу. Посівному міцелію, вирощеному на середовищі, що містить лактозу, притаманна вища ферментаційна активність щодо важкозасвоюваної лактози, що позитивно відображається на перебігу ферментації.

Потреба продуцента в азоті легко задовольняється мінеральним азотом — амонійним або нітратним. У першу чергу і з великою швидкістю пеніцили засвоюють амонійний азот. Крім неорганічного азоту, до складу поживних середовищ, що використовуються в промисловості, входить багатша органічним азотом рослинна сировина — кукурудзяний екстракт. Рослинна сировина характеризується не лише наявністю органічного азоту, вона містить додатковий вуглець, що входить до складу амінокислот, поліпептидів і білків, а також мінеральні елементи, вітаміни та ростові речовини. Всі ці фактори сприяють утворенню на комплексних середовищах великої кількості біомаси. Крім вуглецю та азоту, для росту мікроорганізму необхідні фосфор, сірка, магній, калій і мікроелементи — марганець, цинк, залізо, мідь.

На ріст міцелію суттєво впливає рН середовища. Найсприятливіше значення рН для росту міцелію — 6,0–6,5. За кислішого або більш лужного рН ріст і розвиток мікроорганізму уповільнюється.

Важливу роль в обміні речовин клітини відіграє фосфор, який потрібний не тільки для нормального росту та розвитку гриба, а й для здійснення самого процесу біосинтезу пеніциліну. Для утворення пеніциліну потрібні значно вищі концентрації фосфору в середовищі, ніж для росту гриба.

Основна частина поживних речовин середовища, вже починаючи з другої доби культивування, використовується продуцентом на біосинтез пеніциліну. Найкращим джерелом вуглецю для біосинтезу пеніциліну визнана лактоза. Це пояснюється тим, що лактоза засвоюється повільніше, ніж глюкоза, тому в фазі утворення пеніциліну лактоза наявна в середовищі. Максимум утворення пеніциліну відбувається на 6–7 добу. Біосинтез пеніциліну супроводжується досить інтенсивною аерацією. Середовище містить значну кількість білків, тому під час аерації виникає проблема піноутворення, яку вирішують за допомогою рослинних олій — вони одночасно є джерелом вуглецю.

Важливе значення в процесі біосинтезу має сірка. Сірка засвоюється у вигляді сульфатів — сульфат натрію, гіпосульфит або гіосульфат натрію. Біосинтез інгібується іонами міді. Якщо міді більше ніж 2 мг/мл, то повністю гальмується утворення антибіотика, а біомаса продовжує накопичуватись. Це треба враховувати у використанні комплексних середовищ. Якщо до середовища додати 1 мг/л заліза, то ефект інгібування міддю зникає.

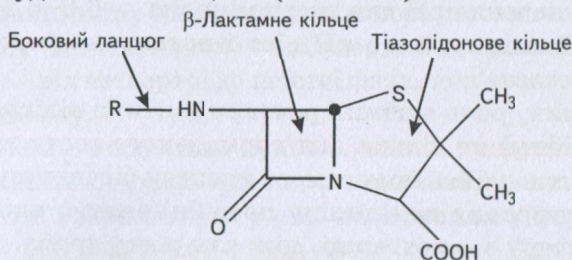
Фосфати використовують у вигляді фосфату калію однозаміщеного, а також можуть бути використані солі, що містять фосфор — інозит фосфорних кислот.

Оптимальна температура росту 30 °С, в другій фазі — 20 °С. Значення рН у другій фазі повинно бути 7–8.

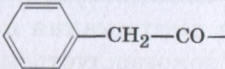
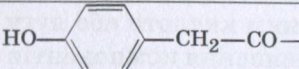
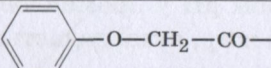
Протягом біосинтезу утворюються також токсини — продукти автолізу міцелію. Це явище може бути знижене, якщо додавати свіжі порції поживного середовища в процесі ферментації.

Вирішальне значення для направлено біосинтезу пеніциліну має наявність у середовищі попередників антибіотика.

Попередники біосинтезу. Продуцент у процесі життєдіяльності утворює різні форми пеніцилінів — G, X, F, K, що різняться за будовою R ланцюга (табл. 1.3).



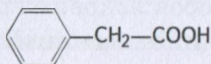
Таблиця 1.3. Хімічна будова деяких природних пеніцилінів

| Назва пеніциліну | Умовне позначення | Будова R бокового ланцюга |
|-----------------------|-------------------|---|
| Бензилпеніцилін | G |  |
| Оксибензилпеніцилін | X |  |
| Пентенілпеніцилін | F | $\text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CO}-$ |
| Феноксиметилпеніцилін | V |  |

Значну роль у процесі біосинтезу певної форми і в утворенні великої кількості одиниць активності відіграють попередники біосинтезу. Попередниками можуть бути тільки ті органічні речовини субстрату, які так чи інакше вбудовуються прямо в його молекулу.

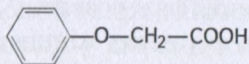
Продуцент пеніциліну вводить у молекулу антибіотика деякі органічні сполуки без попереднього розщеплення їх на окремі фрагменти. Всі типи пеніцилінів різняться між собою тільки будовою радикалів.

Для отримання бензилпеніциліну як попередника додають фенілоцтову кислоту або її похідні — фенілацетамід, фенілетиламін, фенілацетилгліцин та інші речовини.



Фенілоцтова кислота

Для отримання феноксиметилпеніциліну в середовище для культивування додають феноксиоцтову кислоту.



Феноксиоцтова кислота

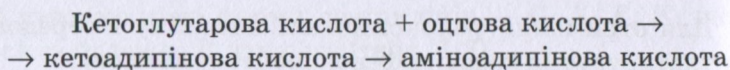
Невеликі кількості попередника (0,1–0,15 %) додають безпосередньо в середовище перед засівом. Вищі концентрації попередника (0,2–0,5 %) токсичні для гриба і їх доцільно дода-

вати періодично або безперервно протягом усього процесу біосинтезу. Це підвищує вихід пеніциліну на 30–50 %, вміст бензилпеніциліну за таких умов становить до 90 % суми утворюваних пеніцилінів.

Для підтримання в культуральному середовищі певного рівня рН рекомендується регулювати його автоматичним додаванням кислоти або лугу або встановленням правильного співвідношення компонентів середовища. Для синтетичних середовищ як регулятори рН найчастіше застосовують органічні кислоти, в комплексних середовищах — крейду. Своєрідним регулятором рН у промисловому отриманні пеніциліну є кашалотовий жир, який додається в середовище в процесі ферментації як піногасник.

Важливою умовою вдалого проведення процесу біосинтезу є чітке виконання умов асептики, оскільки наявність сторонніх мікроорганізмів може різко знизити вихід антибіотика. Багато мікроорганізмів (*E. coli*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. megatherium*, *B. mesentericus* тощо) здатні утворювати фермент пеніциліназу, який розщеплює пеніциліни. Потрапляння навіть невеликої кількості таких бактерій призводить до повної інактивації пеніциліну. В зв'язку з цим треба приділяти особливу увагу стерильності поживних середовищ, повітря та допоміжних матеріалів.

Шлях біосинтезу пеніциліну. Молекула пеніциліну утворюється з *L*-цистеїну, *L*-валіну і неполярних карбонових кислот — попередників бічного радикала молекули пеніциліну. Крім зазначених сполук, обов'язковим компонентом біосинтезу пеніциліну є *L*- α -аміноадипінова кислота, яка утворюється з кетоглутарату та ацетил-КоА за участю ферменту гомоцитратсинтази.



Проте в першій фазі розвитку продуцента може відбуватися інгібування цього ферменту кінцевим продуктом метаболізму — лізином.

Першим етапом утворення пеніциліну вважається утворення трипептиду: *L*-2-аміноадипіл-*L*-цистеїніл-*D*-валін (*LLD*). Трипептид перетворюється в ізопеніцилін N через моноциклічний β -лактам (рис.1.9). β -лактам утворюється внаслідок зми-

кання кільця між С3 цистеїном та NH-групою валіну. Таким чином утворюється 6-амінопеніциланова кислота. Надалі ацилювання 6-АПК відбувається за допомогою ферменту пеніцилін-ацилтрансферази з утворенням пеніциліну.

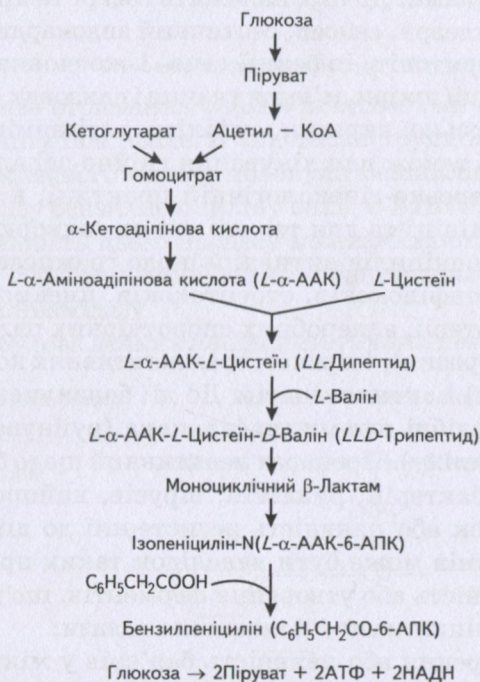


Рис. 1.9. Схема біосинтезу бензилпеніциліну

Виділення пеніциліну. Пеніцилін накопичується в культуральній рідині. Тому перший етап виділення — фільтрування для відділення міцелію.

Пеніцилін із культуральної рідини видаляють методом екстрагування органічними розчинниками, що не змішуються з водою (бутилацетат, бутиловий спирт). Процес екстрагування базується на тому, що пеніцилін у вигляді кислоти може бути екстрагований розчинником, а потім знову переведений у водний розчин у вигляді солі додаванням лугу. Повторення таких операцій приводить до концентрування антибіотика.

Бензилпеніцилін випускається промисловістю у вигляді бензилпеніциліну натрієвої солі. Порошок для ін'єкцій по 500 000 од.

або 1 000 000 од. у флаконах за якістю відповідає вимогам ФС-42У-3-108-96 і виправленню №1 до ФС-42У-3-108-96.

Використання. Бензилпеніцилін використовують у лікуванні захворювань, спричинених чутливими до антибіотика мікроорганізмами. До них належать гострі та хронічні пневмонії, емпієма плеври, сепсис, септичний ендокардит, менінгіт, остеомієліт, перитоніт, інфекції сечо- і жовчовивідних шляхів, ангіни, інфекції шкіри, м'яких тканин і слизових оболонок, скарлатини, сибірської виразки, сифілісу, актиномікозу. Препарат призначають також для лікування гнійно-запальних захворювань в акушерсько-гінекологічній практиці, в оториноларингологічній клініці та для терапії очних захворювань.

Бензилпеніцилін активний щодо грампозитивних мікроорганізмів (стафілококів, стрептококів, пневмококів, коринєбактерій дифтерії, анаеробних споротвірних паличок, паличок сибірської виразки), спірохет, грамнегативних коків (гонококів, менінгококів) і актиноміцетів. До дії бензилпеніциліну стійкі пеніциліноподібні штами стафілокока (руйнування молекули бензилпеніциліну). Препарат неактивний щодо більшості грамнегативних бактерій, рикетсій, вірусів, найпростіших.

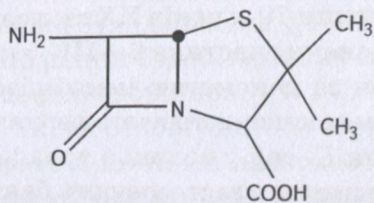
Розвиток або наявність резистенції до дії пеніцилінів у мікроорганізмів може бути внаслідок таких причин:

- 1) наявність або утворення ферментів, що руйнують пеніцилін — пеніцилінази і пеніцилінацилази;
- 2) утворення або наявність бар'єрів у мікробної клітини для проникнення антибіотика всередину.

Пеніцилін та його похідні низькотоксичні для людини і тварин.

Напівсинтетичний спосіб отримання пеніцилінів. Наявність у природних умовах кількох активних форм пеніциліну спонукала дослідників до пошуку нових похідних із модифікованим боковим ланцюгом, які б мали поліпшені властивості. Отримувати різні похідні пеніциліну можна додаванням у середовище для культивування відповідних попередників. Але цей спосіб виявився малоефективним, тому що продуцент пеніциліну може засвоювати обмежену кількість хімічних речовин. Досягненням, яке дало змогу отримувати тисячі нових похідних пеніциліну, було виділення 6-амінопеніциланової кислоти.

На сьогодні вихідним продуктом для отримання напівсинтетичних пеніцилінів є 6-амінопеніциланова кислота (6-АПК).



6-Амінопеніциланова кислота

Промислове отримання 6-АПК шляхом хімічного гідролізу бензилпеніциліну пов'язане зі значними труднощами — з нестійкістю β -лактамного кільця молекули пеніциліну. Так, у разі лужного гідролізу бензилпеніциліну вихід 6-АПК становить лише 1%. Продуктивність цього процесу можна підвищити, якщо використати для гідролізу іммобілізовані бактеріальні клітини, що містять пеніцилінамідазу.

Хімічна будова деяких напівсинтетичних пеніцилінів така:

| Назва пеніциліну | Будова R бокового ланцюга |
|------------------|---------------------------|
| Амоксицилін | |
| Ампіцилін | |
| Оксацилін | |
| Карбеніцилін | |
| Нафцилін | |

З другої половини 70-х років ХХ ст. вся 6-АПК, що випускається в Росії, та значна частина 6-АПК, яку отримують в Італії, виготовляється за допомогою іммобілізованих ферментів. На італійських фірмах використовують фермент, іммобілізований включенням клітин *E. coli* у волокна триацетатцелюлози, а на російських підприємствах застосовують бактеріальні клітини іммобілізовані у поліакриламідному гелі. Використання таких технологій забезпечує вихід кінцевої продукції на рівні 80–85 %. За даними японських учених, час напівінактивації пеніцилінамідази, що міститься в іммобілізованих у поліакриламідному гелі бактеріальних клітинах, становить 42 доби при температурі 30 °С або 17 діб при 40 °С.

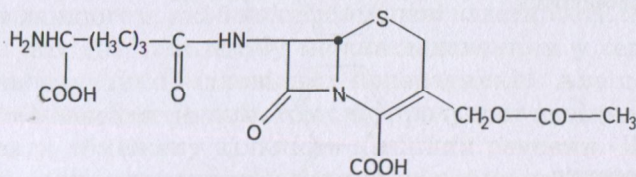
6-АПК підлягає хімічному ацилюванню, в результаті якого утворюються напівсинтетичні пеніциліни. Отримано близько 50 тис. сполук, 35 з них використовують у практиці.

Усі відомі напівсинтетичні пеніциліни, як і бензилпеніцилін, пригнічують синтез клітинної стінки бактерій. Основним завданням у синтезі нових пеніцилінів є отримання препаратів, стійких до дії β-лактамаз, та препаратів із пролонгованою дією.

1.6.3.2. Цефалоспорин

Цефалоспоринові антибіотики використовуються у клінічній практиці від початку 60-х років ХХ ст. Синтезовано понад 50 представників цієї групи антибіотиків. Ядром молекули цефалоспоринів є 7-аміноцефалоспоринова кислота.

За хімічною будовою належить до β-лактамних антибіотиків, близьких до пеніциліну, в біосинтезі основного ядра (цефемового) беруть участь дві амінокислоти — *L*-цистеїн, *L*-валін.



Цефалоспорин С

Цефалоспорини — антибіотики, що утворюються грибами роду *Cephalosporium acremonium* (*Acremonium chrysogenum*).

Уперше цефалоспорин було виділено у 1948 р. Джузеппе Бротцу. В культуральній рідині *Cephalosporium acremonium* він виявив три варіанти цефалоспоринів: Р, N і С. Цефалоспорин С — головний антибіотик, на основі якого створено численні напівсинтетичні препарати з цінними властивостями.

За біологічною активністю цефалоспорини відрізняються від пеніцилінів. Цефалоспорини пригнічують розвиток грампозитивних і грамнегативних бактерій, але їх антибіотична активність нижча, ніж у пеніцилінів.

Продуцент — *Cephalosporium acremonium* (*Acremonium chrysogenum*).

Механізм біосинтезу цефалоспорину. Первинні стадії біосинтезу пеніциліну і цефалоспорину до ізопеніциліну N однакові (рис. 1.10). Лише після цього шляхи розходяться. Пеніцилін N перетворюється в деацетоксицефалоспорин. Далі за дії ферменту гідроксилази утворюється деацетилцефалоспорин, який ферментом ацетил-Ко-трансферазою перетворюється у цефалоспорин С.

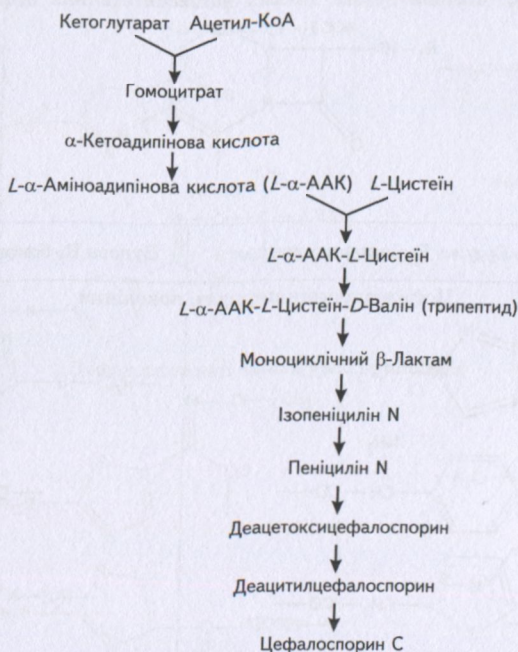
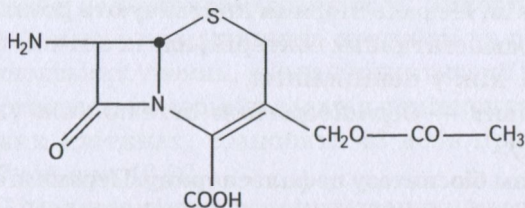


Рис. 1.10. Схема біосинтезу цефалоспорину

1.6.3.3. Напівсинтетичні цефалоспори́ни

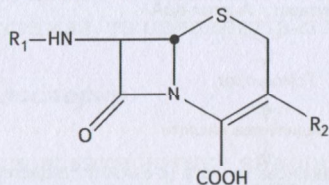
Вихідною речовиною для отримання напівсинтетичних цефалоспори́нів є 7-аміноцефалоспоронова кислота, яку отримують у результаті відщеплення від молекули цефалоспори́ну аміноадіпінової кислоти під дією ферменту ацилази.



7-Аміноцефалоспоронова кислота

Модифікування цефалоспори́ну може відбуватися приєднанням двох радикалів (табл. 1.4).

Таблиця 1.4. Хімічна будова деяких напівсинтетичних цефалоспори́нів



| Назва цефалоспори́ну | Будова R ₁ бокового ланцюга | Будова R ₂ бокового ланцюга |
|----------------------------------|--|--|
| Цефалоспори́ни першого покоління | | |
| Цефазолін | | |
| Цефалексин | | |
| Цефалоридин | | |

| Назва цефалоспорины | Будова R ₁ бокового ланцюга | Будова R ₂ бокового ланцюга |
|------------------------------------|--|--|
| Цефалоспорины другого покоління | | |
| Цефокситин | | $\text{—CH}_2\text{OCO—NH}_2$ |
| Цефуроксим | | $\text{—CH}_2\text{OCO—NH}_2$ |
| Цефалоспорины третього покоління | | |
| Цефотаксим | | —CH_3 |
| Цефазидим | | $\text{—H}_2\text{C—N}^+$ |
| Цефтріаксон | | $\text{—H}_2\text{C—S—}$ |
| Цефалоспорины четвертого покоління | | |
| Цефенім | | $\text{—H}_2\text{C—NH}$ |
| Цефпіром | | —N^+ |

Залежно від властивостей і часу отримання цефалоспори-ни поділяють на чотири покоління. Всі вони мають різний спектр дії на мікроорганізми (табл.1.5).

Цефалоспорины першого покоління (цефалоридин, цефазолін, цефалексин) мають високу біологічну активність щодо стафілококів, стрептококів, пневмококів, багатьох видів ентеробактерій.

Цефалоспорины другого покоління (цефамандол, цефокситин, цефуроксим) характеризуються високою біологічною активністю щодо грамнегативних бактерій, стійкі до дії β -лактамаз. Вони не мають помітного впливу на ентерококи та синьогнійну паличку.

Цефалоспорины третього покоління (цефотаксим, цефаклор, цефтриаксон, цефоперазон, цефпірамід) різняться високою антимікробною активністю щодо ентеробактерій, у тому числі стійких до інших антибіотиків, стійкі до дії β -лактамаз, водночас характеризуються помірною активністю щодо стафілококів. Цефтриаксон здатен протягом тривалого часу зберігатися в організмі хворого, що уможлиблює його вживання лише один раз на добу. Широко використовуються в медицині.

Цефалоспорины четвертого покоління — цефпіром, цефенім. Цефпіром пригнічує розвиток грамполозитивних і грамнегативних аеробних і анаеробних мікроорганізмів, стійкий до дії β -лактамаз. Використовується для лікування інфекцій нижніх дихальних шляхів, гінекологічних та інших захворювань.

Таблиця 1.5. Порівняльна активність *in vitro* цефалоспоринових антибіотиків

| Покоління цефалоспори-нів | Активність щодо бактерій | | Стійкість до β -лактамаз | |
|---------------------------|--------------------------|----------------|--------------------------------|-------------------------|
| | грамполозитивних | грамнегативних | стафілококів | грамнегативних бактерій |
| Перше | +++ | +/- | ++ | - |
| Друге | ++ | + | ++ | +/- |
| Третє | + | +++ | + | + |
| Четверте | ++ | +++ | ++ | ++ |

Отже, модифікація молекули цефалоспорины приводить до суттєвих змін його антимікробної дії, щодо β -лактамаз і ряду інших властивостей.

Українські фармацевтичні підприємства випускають широкий асортимент напівсинтетичних цефалоспоринів. Наприклад:

Борщагівський ХФЗ — цефазолін-БХФЗ (порошок для приготування розчину для ін'єкцій, один флакон містить цефазоліну натрієвої солі стерильної 500 або 1000 мг); цефалексин (капсули, одна капсула містить цефалексину 0,25 г, напівсинтетичний цефалоспориновий антибіотик першого покоління широкого спектра дії); цефотаксим-БХФЗ (порошок для приготування розчинів для ін'єкцій, один флакон містить цефотаксиму натрієвої солі стерильної у перерахуванні на цефотаксим 500 або 1000 мг, напівсинтетичний антибіотик групи цефалоспоринів третього покоління, широкого спектра дії); цефтріаксон-БХФЗ (порошок для приготування розчинів для ін'єкцій, один флакон містить цефтріаксону натрієвої солі стерильної в перерахуванні на цефтріаксон 500 або 1000 мг, цефалоспорин третього покоління); цефуроксим-БХФЗ (порошок для приготування розчинів для ін'єкцій у вигляді цефуроксиму натрієвої солі стерильної 0,25; 0,75 або 1,5 г, цефалоспорин другого покоління);

ВАТ «Київмедпрепарат» — цефазолін-КМП (порошок для приготування розчинів для ін'єкцій, 1 флакон — 0,5 г); цефоперазон-КМП (порошок для приготування розчинів для ін'єкцій, 1 флакон — 1,0 г, антибіотик широкого спектра дії групи цефалоспоринів третього покоління); цефотаксим-КМП (порошок для приготування розчинів для ін'єкцій, 1 флакон — 1,0 г); цефтазидим-КМП (порошок для приготування розчинів для ін'єкцій, флакон — 1,0 г, цефтазидим належить до цефалоспоринових антибіотиків третього покоління); цефтріаксон-КМП (порошок для приготування розчинів для ін'єкцій, 1 флакон — 0,5 г).

Контрольні запитання до підрозділу 1.6

1. Охарактеризуйте антибіотики, що утворюються бактеріями.
2. Опишіть у загальних рисах механізм біосинтезу поліпептидних антибіотиків.
3. Які особливості будови поліпептидних антибіотиків відрізняють їх від білків?
4. Поліміксини та умови їх утворення.
5. Опишіть у загальних рисах процес виділення і очищення поліміксину.
6. Бацитрацини, продуцент і властивості.

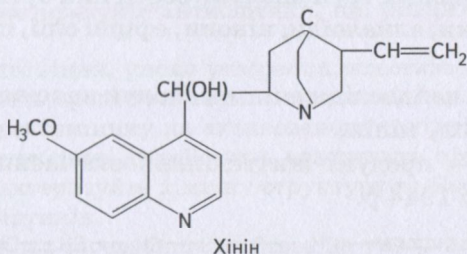
7. Як умови середовища впливають на біосинтез бацитрацину?
8. Назвіть продуцент антибіотика нізину.
9. Практичне використання нізинів.
10. Граміцидин С, умови його біосинтезу.
11. Охарактеризуйте антибіотик батумін і сфери його використання.
12. Охарактеризуйте антибіотики, що утворюються актиноміцетами.
13. Стрептоміцин, умови утворення, властивості, застосування.
14. Опишіть процес виділення стрептоміцину. Які особливості має сорбція стрептоміцину на активованому вугіллі?
15. Тетрациклінові антибіотики, властивості, сфери застосування.
16. Охарактеризуйте хімічну структуру та біосинтез тетрациклінових антибіотиків.
17. Як склад середовища впливає на утворення тетрациклінових антибіотиків?
18. Які антибіотики актиноміцетного походження використовують у сільському господарстві?
19. Назвіть антибіотики актиноміцетного походження з протипухлинною активністю. Який механізм дії таких антибіотиків?
20. Ністатин, отримання, застосування, механізм дії.
21. Назвіть продуцент антибіотика рифампіцину.
22. Дайте загальну характеристику антибіотиків, що утворюються мікроміцетами.
23. Які мікроміцетні антибіотики застосовуються в сільському господарстві?
24. Охарактеризуйте β -лактамі антибіотики.
25. Які ферменти інактивують молекулу пеніциліну?
26. Чим зумовлено використання попередників у біосинтезі пеніциліну?
27. Які природні пеніциліни Вам відомі?
28. Напівсинтетичні пеніциліни, принцип отримання і властивості.
29. Дайте загальну характеристику цефалоспоринолу і механізму його біосинтезу.
30. Наведіть схему біосинтезу цефалоспоринолу.
31. Напівсинтетичні цефалоспориноли, покоління антибіотиків.

1.7. АНТИБІОТИКИ НЕМІКРОБНОГО ПОХОДЖЕННЯ ТА ПРОБІОТИКИ

1.7.1. Антибіотики з вищих рослин

Біологічно активні речовини з вищих рослин, здатні інактивувати інші організми, отримали назву фітонциди. На сьогодні

Хінін відомий із доісторичних часів як засіб для лікування хворих на малярію. Це алкалоїд із хінного дерева червоносокового. Його структуру було визначено у 1907 р. і у 1944 р. синтезовано хімічним шляхом. Хінін має антибактеріальну активність.



1.7.2. Антибіотики тваринного походження

Такі антибіотики відрізняються від решти антибіотиків здатністю активізувати захисні сили макроорганізму. Поєднання цих властивостей з антибактеріальною дією робить їх важливими для профілактики та лікування деяких захворювань.

Лізоцим — міститься у білку курячого яйця, у слині, слюзах. Цей антибіотик відкрив А. Флемінг і визначив, що лізоцим є ферментом.

Лізоцим — білок із відносно невисокою молекулярною масою, що характеризується ферментативними властивостями. Цей фермент має також назву мурамідаза. Лізоцим курячого білка активний щодо грамозитивних бактерій. Він активно діє на клітинну стінку бактерій, спричиняючи гідроліз β-глікозидних зв'язків між залишками ацетилмурамової кислоти і глюкозаміну в пептидоглікані. Використовується в дерматології, офтальмології, хірургії.

Скваламін — антибіотик, виділений із катранової акули у 1992 р. Вчені раніше помічали, що акули майже ніколи не хворіють. Можливо, це пов'язано з наявністю в усіх їхніх клітинах антибіотика. Скваламін активний щодо бактерій, грибів, паразитів. За хімічною будовою він подібний до холестерину і не належить до жодного з відомих класів антибіотиків.

Екмолін — суміш білків-протамів, які отримують із риб. Він малотоксичний, пригнічує грампозитивні і грамнегативні бактерії. Спостерігається синергізм за сумісної дії з пеніциліном.

Інтерферон — білкової природи, пригнічує розмноження вірусів. Утворюється в клітинах під впливом вірусів, бактерій, ендотоксинів. Для отримання інтерферону використовують шестиденні одношарові культури клітин курячого ембріона або культивовані лейкоцити крові людини, які заражають певним вірусом.

1.7.3. Пробіотики

Останнім часом значної популярності набуває біотерапія. Організм людини в сучасних умовах витримує значний вплив несприятливих факторів: погіршення екології, збільшення кількості стресових факторів, неконтрольоване вживання хіміотерапевтичних препаратів, у тому числі антибіотиків. Все це призводить до порушення функціонування нормальної мікрофлори людини.

Мікрофлора людини є основою її мікроекології. Організм людини населяють близько 500 видів бактерій без урахування вірусів, найпростіших і грибів. Норма вмісту мікроорганізмів у кишечнику, КУО на 1 г фекалій:

| | |
|--|------------------|
| Біфідобактерії | $10^8 - 10^{10}$ |
| Лактобактерії | $10^6 - 10^9$ |
| Бактероїди | $10^7 - 10^9$ |
| Пептококи та пептострептококи | $10^5 - 10^6$ |
| Ешеріхії | $10^6 - 10^8$ |
| Стафілококи гемолітичні, не більше | 10^3 |
| Стафілококи негемолітичні | $10^4 - 10^5$ |
| Стрептококи | $10^5 - 10^7$ |
| Клострідії | $10^3 - 10^5$ |
| Дріжджоподібні гриби, не більше | 10^3 |
| Умовно-патогенні ентеробактерії, не більше | $10^3 - 10^4$ |

Нормальну мікрофлору розглядають як сукупність мікробіоценозів різних частин тіла, що контактують із зовнішнім середовищем. Сукупність мікробіоценозів називають нормоценозом або еубіозом. У нормі в організмі людини існують $10^{14} - 10^{16}$ бак-

терій, тобто кількість бактерій більша, ніж кількість клітин самого організму. Нормальна мікрофлора впродовж еволюції набула надзвичайно важливого значення для формування резистентності організму. Одним із головних механізмів захисту від колонізації умовно-патогенними і патогенними бактеріями є наявність в організмі достатньої кількості власної корисної мікрофлори і в першу чергу — лакто- і біфідобактерій.

Для корекції мікрофлори використовують препарати, що отримали назву «пробіотики» та «пребіотики».

Термін «пробіотик» у буквальному перекладі означає «для життя». У сучасному трактуванні пробіотики — біопрепарати, що є стабілізованими культурами сімбіонтних мікроорганізмів і продуктами їхньої життєдіяльності, які сприятливо впливають на здоров'я людини або тварин. Біфідобактерії і молочнокислі бактерії, які найчастіше входять до складу пробіотиків, за рахунок продукування антибіотикоподібних факторів, ряду органічних кислот, а також конкуренції за ділянки слизової оболонки кишечника з представниками патогенної і умовно-патогенної флори сприяють нормалізації якісного і кількісного складу мікробіоценозу шлунково-кишкового тракту. Постійна наявність у біотопі (ротова порожнина, кишечник, вагінальний канал) достатньої кількості клітин пробіотичних бактерій, прикріплених до його стінок, запобігає проникненню патогенних мікроорганізмів в епітеліальні клітини. Крім того, пробіотичні мікроорганізми створюють несприятливе для патогенів рН середовище.

Пробіотики є важливим і необхідним інструментом захисту організму від дії несприятливих екологічних умов, у разі порушення обміну речовин, після гормональної, променевої і антибактеріальної терапії, у разі гострих і хронічних хвороб і дисфункцій шлунково-кишкового тракту, спричинених незбалансованим харчуванням і стресами.

На відміну від пробіотиків, пребіотики є речовинами чи дієтичними інгредієнтами, які вибірково стимулюють ріст і біологічну активність мікроорганізмів у кишечнику і позитивно впливають на склад мікробіоценозу. Тобто пребіотики — це речовини, що стимулюють ріст нормальної мікрофлори. Їх можна поділити на такі групи:

моносахариди і спирти (ксилоза, рафіноза, сорбіт);

олігосахариди (лактоулоза, галактоолігосахарид, ксилоолігосахарид);

полісахариди (пектини, декстрини, інулін);

ферменти (β -галактозидаза мікробного походження, протеази сахароміцетів);

пептиди (соеві, молочні);

антиоксиданти (вітаміни);

інші біологічно активні добавки — амінокислоти, рослинні екстракти, органічні кислоти.

Іноді комбінації пребіотиків із пробіотиками називають «симбіотиками». Це препарати, в яких живі культури мікроорганізмів комбінуються з препаратами, що стимулюють їх ріст.

Для створення пробіотиків використовують різноманітні мікроорганізми: *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *B. cereus*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. longum*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus salivarius*, *Saccharomyces boulardii*.

Найчастіше у складі пробіотиків використовують біфідобактерії та молочнокислі бактерії (лактобацили). Основою таких пробіотиків є штами, ізолювані з кишечнику людини, де вони домінують з перших днів її життя. Біфідобактеріям і лактобацилам притаманна висока здатність до колонізації епітелію шлунково-кишкового тракту, що є захисним бар'єром на шляху проникнення патогенної мікрофлори і забезпечує стабілізацію нормального складу мікробіоценозу кишечнику. До складу пробіотиків можуть входити також штами біфідобактерій і лактобацил, ізолювані з інших природних і виробничих субстанцій, якщо вони мають достатню адгезивність до клітин епітелію ссавців.

Досить давно для створення пробіотиків використовують бактерії групи кишкової палички, ефективність яких пов'язана з різким зменшенням утворення в кишечнику токсичних речовин під впливом нормалізованої кишкової мікрофлори. Кишкова паличка є основою препарату колібактерин.

Дріжджі *Saccharomyces boulardii* входять до складу пробіотика, що використовується для лікування кишкових інфекцій, спричинених *Clostridium difficile*. Можуть бути також використані у складі пробіотиків *Saccharomyces cerevisiae*.

Споротвірні бактерії порівняно недавно використовуються для створення пробіотиків, і вони виявилися досить ефективними.

Високої популярності набувають пробіотики, що містять кілька видів мікроорганізмів, які належать до різних родів.

У створенні пробіотиків потрібно дотримуватися таких умов:

➤ безпека для людини штамів, що входять до складу пробіотика;

➤ наявність антагоністичних властивостей до конкурентної, в тому числі патогенної та умовно-патогенної мікрофлори;

➤ стійкість до дії антибіотиків, що найчастіше використовують у антибіотикотерапії;

➤ здатність пробіотичних мікроорганізмів активно засвоювати широкий спектр поживних речовин, наявних у шлунково-кишковому тракті;

➤ наявність адгезивної активності до клітин епітелію біотопів, для яких призначено пробіотичний препарат;

➤ вища, порівняно з коменсальною мікрофлорою, питома швидкість росту пробіотичних штамів, що дасть їм можливість швидше засвоювати поживний субстрат.

Пробіотичні штами також мають бути стійкими до дії літичних ферментів слини (лізоцим) і ферментів шлунково-кишкового тракту (пепсин, ліпаза). У конструюванні пробіотиків враховують також здатність штамів продукувати біологічно активні сполуки — вітаміни, амінокислоти, антиоксиданти. Важливою у підборі штамів є їх технологічність у виробничих умовах і стабільність їх властивостей у процесі культивування. Останніми роками до введених у склад пробіотиків штамів висувається умова імуномодельюючого впливу на макроорганізм (стимулювання продукції інтерферону).

До пробіотиків нового покоління належать препарати, основою яких є рекомбінантні штами мікроорганізмів із заданими властивостями. Таким пробіотиком є субалін. До його складу входить (крім інших штамів) рекомбінантний штам *B. subtilis* 2335/105, у який вбудовано ген антивірусної активності, що відповідає за продукування універсального антивірусного агента інтерферону.

Одним із засобів, який можна використати для поліпшення функціонування нормальної мікрофлори, є створення харчових продуктів із пробіотичними культурами мікроорганізмів.

Найчастіше використовують продукти на молочній основі. Це зумовлено тим, що молоко є оптимальним субстратом для росту багатьох представників корисної мікрофлори — молочнокислих бактерій, біфідобактерій, кишкової палички, дріжджів.

Більшість пробіотиків, що є нині на фармацевтичному ринку, призначені для лікування і профілактики дисбактеріозів шлунково-кишкового тракту. Одиначні розробки пробіотиків — для санації ротової порожнини і урогенітальної системи. Більшість описаних пробіотиків мають високу профілактичну дію, тоді як із виникненням захворювання, коли відбулася адгезія патогенного мікроорганізму (збудника) до епітелію конкретного біотопу, створення захисного бар'єра за допомогою пробіотика малоефективне. Для досягнення високого рівня лікувального захисту макроорганізму від адгезії патогенної мікрофлори в гострий період захворювання треба використовувати пробіотик з дуже високою концентрацією живих клітин, в іншому разі знижується його ефективність. В цьому напрямку фармакокінетика зазначених пробіотиків потребує доопрацювання.

Особлива увага останнім часом приділяється пробіотикам, що ґрунтуються на використанні бактерій роду *Bacillus*. Такі пробіотики порівняно недавно почали застосовувати в практиці, вони ефективні за рахунок антагонізму до патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів, синтезу біологічно активних сполук.

Для створення препаратів використовують види *B. cereus* (Бактисубтил) і *B. subtilis*. Застосування терапії за допомогою *B. subtilis* зумовило високий ефект у лікуванні абсцесів легенів, легеневої форми туберкульозу, а введення живої культури під мозкові оболонки сприяло вилікуванню інфекційного менінгіту та вірусного енцефаліту. Субтилітерапія ефективна у профілактиці та лікуванні інфекційних хвороб у людей і тварин, а також як протиалергійний і протитоксичний засіб.

Українськими вченими (В.В. Смирнов) було створено і введено в практику з 1992 р. пробіотик Біоспорин. До складу препарату входять два штами споротвірних бактерій — *B. subtilis* і *B. licheniformis*, що мають у вегетативну та спорову форми. Штами доповнюють один одного за антагоністичною активністю і ефективні щодо клінічних штамів бактерій родів *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Klebsiela*, *Proteus*, *Yersinia*, патогенних *E. coli* та грибів

роду *Candida*. Препарат використовують для профілактики і лікування дисбактеріозів і гострих кишкових інфекцій, для лікування гнійних ран, алергічних станів, відновлення імунітету, лікування колітів і пародонтитів. Він активний і в лікуванні пост-радіаційних ускладнень. Випускається в ампулах, його вживають по 1–2 дози 3–4 рази на день. Курс лікування 10–14 днів.

Ще один український препарат — Субалін. Містить живі клітини та спори рекомбінантного штаму *B. subtilis* 2335/105. Препарат має високу антибактеріальну та противірусну активність.

В Українській колекції мікроорганізмів зберігається понад десять штамів мікроорганізмів, на основі яких уже розроблено пробіотики, (табл. 1.6).

Таблиця 1.6. Штами, що входять до складу пробіотиків, які зберігаються в Українській колекції мікроорганізмів

| Штам | Препарат |
|--|---|
| <i>Bacillus licheniformis</i> B-5514 | Препарат Біоспорин — для профілактики і лікування шлунково-кишкових захворювань людини |
| <i>Bacillus subtilis</i> B-5007 | Препарат Бактерин-SL — для профілактики і лікування шлунково-кишкових захворювань сільськогосподарських тварин |
| <i>Bacillus subtilis</i> B-5008 | Препарат Бактерин-SL — для профілактики і лікування шлунково-кишкових захворювань сільськогосподарських тварин |
| <i>Bacillus subtilis</i> B-5020 | Препарат Біоспорин — для профілактики і лікування шлунково-кишкових захворювань |
| <i>Enterococcus faecium</i> B-2534 | Штам, що має антивірусну і антибактеріальну активність. Компонент бактеріальної закваски Стрептосан і пробіотика Лактосан — для поросят |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i> B-2691 | Компонент консерванта силосу, пробіотиків Лактин — для птиці і Бовілакт — для телят |
| <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i> B-2700 | Антагоніст патогенних мікроорганізмів. Компонент пробіотика Лактосан — для поросят |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> B-2627 | Антагоніст патогенних мікроорганізмів. Компонент бактеріальної закваски Геросан |
| <i>Lactobacillus salivarius subsp. salivarius</i> B-2613 | Продукент комплексу біологічно активних речовин. Компонент бактеріальної закваски Геросан |
| <i>Lactobacillus reuteri</i> B-2697 | Антагоніст патогенних мікроорганізмів. Компонент препарату Лактин |
| <i>Streptococcus salivarius subsp. thermophilus</i> B-2539, B-2540, B-2541, B-2542 | Синтезують в'язкий полімер. Компонент бактеріальних заквасок Геросан і Стрептосан |

Препарати пробіотиків використовують також у сільському господарстві (ветеринарія). Найперспективніші серед них препарати на основі *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, серед яких ті види, що є складовою мікробіоценозів рубця жуйних тварин, зобу птиці, шлунково-кишкового тракту поросят. Більшість пробіотиків для сільського господарства ґрунтуються на монокультурах. Серед найвідоміших — Біовіт, Лактосан, Лактовіт. В Україні розроблено препарат Бактерин SL на основі *B. subtilis* і *B. licheniformis*. Використовують для лікування діареї у телят.

Неодмінною умовою виробництва препаратів еубіотиків є збереження їх стабільності протягом тривалого часу. Бактерійні препарати, що містять живі організми, належать до найменш стійких, їх активність знижується внаслідок загибелі клітин. Для збільшення терміну життєздатності бактерій показане сублімаційне сушіння. З огляду на гігроскопічність сухі біопрепарати укупорюють під вакуумом або в потоці інертного газу.

Фактори, що впливають на виживання мікроорганізмів у препаратах сухих еубіотиків під час зберігання: регламентований вміст залишкової вологи, наявність захисного середовища, зберігання сухих препаратів в атмосфері, що не містить кисню.

Для захисту еубіотиків від кислого середовища шлунку на таблетовані і капсульовані форми наносять ацидорезистентні покриття чи здійснюють іммобілізацію бактерій на сорбенті.

Загальна схема процесу виробництва пробіотиків

1. Підготовка виробничих приміщень, обладнання, посуду, персоналу, вентиляційної системи — здійснюють згідно з інструкціями, що регламентують умови роботи зі стерильними лікарськими засобами.

2. Підготовка і стерилізація середовищ (концентрованого, виробничого і захисного для висушування). Попередні роботи передбачають: якісний підбір необхідних для даної культури речовин; оцінювання впливу окремих компонентів на вихід цільового продукту; знаходження оптимального співвідношення компонентів і здешевлення середовищ.

3. Вирощування маточних (до шести пасажів) і виробничих культур. Спочатку вирощують маточну культуру при температурі 37 °С, використовуючи різні середовища. Виробничу культуру вирощують методом глибинного культивування.

4. Розлив рідкого напівфабрикату у флакони.

5. Сублімаційне сушіння. Ампули (флакони) розміщують у морозильні камери. Вміст ампул заморожують при температурі -40 °С, витримують при цій температурі 18-24 год, після чого сушать під вакуумом з поступовим збільшенням температури.

6. Укупорювання. Ампули з сухою бактеріальною масою запаюють (флакони укупорюють) з газовим захистом.

7. Маркування, упакування.

8. Контроль якості готової лікарської форми.

Технологічна схема виробництва Лактобактерину

Для виробництва Лактобактерину використовують штам лактобактерій *Lactobacillus plantarum*, який належить до родини *Lactobacillaceae*. Лактобактерії є грампозитивними паличками завдовжки 0,7-3,0 мкм.

Лактобактерин отримують за загальною схемою для бактерійних препаратів:

1. Приготування гідролізованого молока (до прокип'яченого знежиреного молока з рН 7,7 додають панкреатин і хлороформ, витримують при 40 °С протягом 72 год, потім фільтрують, розводять удвічі водою, розливають у бутлі і стерилізують).

2. Приготування дріжджового аутолізу (хлібопекарські дріжджі розводять водою і стерилізують).

3. Приготування середовища МРС (до гідролізованого молока додають дріжджовий аутолізат і наважки магнію і марганцю сірчаноокислого, амонію лимоннокислого, глюкози).

4. Приготування гідролізату казеїну (до розчину казеїну додають хлороформ, витримують 5 діб при 45 °С, фільтрують і стерилізують).

5. Приготування казеїново-дріжджового середовища.

6. Приготування захисних середовищ для висушування (желатин, сахароза, молоко, натрій лимоннокислий і вода).

7. Отримання маточної культури (шість пасажів у пробірках, чашках Петрі, флаконах і бутлях протягом 9 діб).

8. Вирощування виробничої культури (в реакторах протягом 8–12 год при 37 °С; у 1 мл суспензії виробничої культури міститься не менш як 6 млрд живих мікробних клітин).

9. До суспензії клітин лактобактерій додають захисне середовище та розливають в ампули в дозі, що визначається концентрацією живих клітин.

10. Ліофільне сушіння. Заморожування протягом 18–24 год при –40 °С; сушіння в умовах глибокого вакууму протягом 68–70 год.

11. Запаювання ампул в атмосфері азоту.

12. Контроль якості.

Опис: кристалічна чи пориста маса жовтувато-білого кольору, кисло-молочного запаху і смаку.

Ідентифікація визначається наявністю характерних морфологічних, культуральних і біохімічних властивостей у виробничих штамів лактобацил.

Остаточна вологість Лактобактерину в ампулах чи флаконах не повинна перевищувати 3,5, в таблетках — 5 %.

Бактеріальна контамінація перевіряється бактеріоскопічно (перегляд під мікроскопом) та бактеріологічно (висівання на поживні середовища).

Специфічна безпечність: препарат має бути безпечний для білих мишей у разі введення внутрішньо в кількості однієї дози. Спостерігають за мишами 5 діб.

Специфічна активність: визначають за кількістю життєздатних клітин лактобацил в одній дозі препарату і активністю кислотоутворення.

Тривалість процесу виробництва Лактобактерину в ампулах і таблетках становить відповідно 42 і 66 діб.

Зберігають препарат у сухому місці при температурі 5 °С. Термін придатності — 12 і 6 місяців, залежно від кількості живих клітин у препараті. Якщо кількість живих клітин становить 4 млрд і більше, Лактобактерин зберігається 12 місяців, від 2 до 3,9 – 6 місяців. До кінця терміну зберігання повинно міститися 1 млрд живих лактобацил.

Контрольні запитання до підрозділу 1.7

1. Дайте загальну характеристику антибіотичних речовин, що утворюються рослинами.
2. Що таке фітонциди?
3. Охарактеризуйте антибіотики тваринного походження.
4. Дайте визначення поняття «пробіотик».
5. Яким вимогам мають відповідати мікроорганізми, що входять до складу пробіотиків?
6. Назвіть пробіотики українського виробництва.
7. Мікроорганізми яких груп можуть бути складовими пробіотиків?
8. Що таке «пребіотики»?