

ВЪВЕДЕНИЕ

Антибиотиците са специфични продукти от жизнената дейност на микроорганизмите, притежаващи висока физиологична активност спрямо други микроорганизми или злокачествени образувания, като задържат техния растеж или ги убиват. Те са вторични метаболити на микроорганизмите. Антибиотиците се получават от актиномицети, плесенни гъби, бактерии и намират широко приложение в медицината, животновъдството, растеновъдството.

В животновъдството се прилагат за лечение и профилактика, а в растеновъдството като защитни средства. В медицината се прилагат за лечение на инфекциозни заболявания. Важна група са аминогликозидните антибиотици. Те представляват гликозидно свързан със захариди циклохексан, съдържащ amino- и хидроксилни групи. Притежават широк антибактериален спектър, но са значително по-ефективни при Грам-отрицателните бактерии *Proteus*, *Klebsiella*, *E. coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus*. Оказват бактерицидно действие, което се дължи на необратимото свързване с 30 S-субединиците на рибозомите в клетките на патогенните микроорганизми и инхибиране на тяхната протеинова синтеза.

Един от представителите на аминогликозидните антибиотици е канамицинът. Той е открит през 1957г. от Н. Umezawa. За пръв път е изолиран от *Streptomyces kanamyceticus*. Канамицинът по спектър на действие е близък до стрептомицина, но е по-слабо активен от гентамицина.

Канамицинът е ефективен към повечето Грам-положителни и Грам-отрицателни микроорганизми, както и киселинно устойчиви бактерии

(*E. coli*, *Salmonella* spp, *Proteus* spp, *Staphylococcus* spp, *Mycobacterium tuberculosis*). В комбинация с пеницилини или цефалоспорини аминогликозидите се използват за профилактика на бактериемия, свързана със стоматологични процеси и гнойновъзпалителни сърдечни клапи.

Канамицинът потиска *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus* spp и други анаеробни бактерии, дрожди, вируси и плесени. Използва се предимно при инфекции, причинени от Ентеробактерии и за предоперативно подтискане на чревната микрофлора. Прилага се при лечение на туберкулоза, плевмония, цистит, белодробен абцес, бактериален колит, менингит. Не се използва за локално приложение на инфекции на кожата поради бързото развитие на резистентност на микроорганизмите.

Темата на настоящият дипломен проект е проектиране на цех за производство на канамицин с производителност 20 000 тона на година.

I. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

1. Исторически данни

Аминогликозидите са открити през [1943](#) г. от Schatz, Bougie и Waksman. Основните представители са [стрептомицин](#), [неомицин](#), [гентамицин](#),

[тобрамицин](#),

[амикацин](#)

. Следвайки откриването на пеницилина, който не е активен срещу *Mycobacterium tuberculosis*, проф. Селман Ваксман със своя екип през 1943 г, чрез системен скрийнинг на почвени бактериални култури, които да притежават *M. Tuberculosis* инхибиторна активност, открива първият антитуберкулозен агент- стрептомицина, първият аминогликозиден антибиотик. Това откритие дава началото на нов изключително важен клас антибиотични продукти и е възнаградено с Нобелова награда по физиология през 1952 г. Повечето от аминогликозидите са природни вещества и се добиват от бактерии *Streptomyces* или от *Micromonospora*. През 1944 г Ваксман и колеги изолират още 11 аминогликозидни антибиотика. По-късно, през 1957 от *Streptomyces kanamyceticus* е изолиран канамицин, който е изключително използван до началото на 70-те години. Развиването на резистентност към природните антибиотици води до появата на полусинтетични техни аналози като амикацин, (1972) полусинтетичен дериват на канамицин А, дибекацин, 3',4'-дидеокси-канамицин Б (1971) и арбекацин (1990) също дериват на канамицин Б. Понастоящем са известни повече от двеста аминогликозида. Техният успех като антибиотици се дължи на високата им и широкоспектрна активност при третиране на инфекции, причинени от чувствителни аеробни грам-отрицателни

бактерии и грам-положителни бацили. Чрез тях се постига бърз бактерициден и добър клиничен ефект. Те проявяват синергизъм с антибиотици от типа бета-лактам.[

Bull. Korean Chem. Soc.

2003, Vol. 24, No. 2 163

Synthesis of the Selectively Protected Garamine Derivatives as

Aminoglycoside Intermediates, SELMAN A. WA K S M A N

Streptomycin:

background, isolation, properties, and utilization

Nobel Lecture, December 12, 1952]

1. Структура и физико-химични свойства на канамицина

Канамицинът се отнася към групата на аминогликозидните антибиотици. Открит е през 1957г. от Н. Umezawa. Получен е от културалната течност на *Streptomyces kanamyceticus*. Хроматографски е установено, че шамът продуцира едновременно три антибиотика: канамицин А, В и С (Фиг.1)[Христов М, 1995]. Молекулата на канамицина се състои от агликон (2-дезоксистрептамин), гликозидно свързан с две аминокиселини: канозамин (3-амино-D-глюкоза) и 6-амино- D-глюкоза.[балуцов в- 1995]

Фиг.1. Структурна формула на канамицина

Канамицин

R1

R2

Емпирична формула

М.м

A

NH₂

OH

C₁₈H₃₆N₄O₁₁

484.50

B

NH₂

NH₂

C₁₈H₃₇N₅O₁₀

483.52

C

OH

NH₂

C₁₈H₃₆N₄O₁₁

484.50

Най-активен е каманицин А. Канамицин В е високо активен спрямо Грам-положителните микроорганизми и е по-токсичен от канамицин А. Вседствие на това неговото присъствие в търговския препарат е ограничено до 5 %. Канамицин С се съдържа до 1 % затова и не оказва влияние върху качеството на препарата. [балуцов в- 1995] При хидролизата на канамицин А се получава 6-амино-6-дезоксид-Д-глюкоза; канамицин С се получава 2-амино-2-дезоксид-Д-глюкоза, а на канамицин В се получава 2,6-диамино-2,6-дидезоксид-Д-глюамицинът. Канамицинът дава положителна реакция с нинхидрин, реакция с Молиш за захар и реакция на Елсон-Морган за хексозамини. Канамицинът няма максимално поглъщане в UV област. При нагряване на канамицин А с 40 % разтвор на H₂SO₄ се образуват вещества с максимално поглъщане при 275-280 nm.[моск 1970]

Канамицинът е базичено вещество и образува соли с органични и неорганични киселини. Антибиотикът се разтваря във вода. Слабо се разтваря в нисши алкохоли и не се разтваря в неполярни органични разтворители. Канамицинът е стабилен при нагряване [Hristow M, Балуцов В - 1995]. Резорбира се в стомашно-чревния тракт и не се свързва със серумни албумини. Прилага се като сяроокисела сол перорално (моносулфат) и инжекционно (дисулфат) [лекарствени препарати].

Канамицин моносулфатът е бял кристален прах без мирис и вкус. Разтворим във вода, трудно разтворим в хлороформ и естер и неразтворим в алкохол, ацетон, етилацетат.

Канамицин дисулфатът представлява бял кристален прах, без мирис и вкус. Разтворим във вода, трудно разтворим в хлороформ и естер и неразтворим в алкохол. [Балуцов В - 1995, Моск 1970]

Оптималното рН на *Streptomyces kanamyceticus* за получаване на канамицина е 7-8.6, а оптималната температура е 28-35 °С. Теоритичната активност е 1000 µg/ml. [Балуцов В - 1995]

1. Антимикробно действие на канамицина

Канамицинът притежава широк антимикробен спектър на действие, но е по-слабо активен от гентамицина и по-токсичен от него. Проявява бактерициден ефект върху Грам-положителните и Грам-отрицателните микроорганизми – стафилококи, пневмококи, туберкулозни и други киселинноустойчиви бактерии.

Спектърът на действие на канамицина е показан на таблица 1.

Резистентността към канамицин се създава много бавно, с изключение на туберкулозните бактерии. Съществува кръстосана резистентност между канамицин и неомицин. [M. Hristow, 1995]

Таблица.1 Спектър на действие на канамицин

Видове микроорганизми

Минимална потискаща концентрация ($\mu\text{g/ml}$)

Aerobacter aerogenes

0,6 – 125

Bacillus cereus

3

Corenebacterium xerosis

1

Diplococcus pneumoniae

12 – 16

Escherichia coli

1,5 – 5

Klebsiella pneumoniae

1 – 3

Lactobacillus casei

50

Mikrobacterium tuberculosis

0,8 – 10

Pseudomonas aeruginosa

62,5 – 125

Salmonella gallinarum

1,5

Staphylococcus aureus

0,16 – 3,2

Streptococcus faecalis

6 – 250

Vibrio cholerae

0,8

1. Биосинтез на канамицин

4.1. Щам –продуценти

Канамицинът е изолиран за първи път от *Streptomyces kanamyceticus* през 1957 г. от Н. Umezawa. Той е получен също и от *kanamyceticus* ATCC 12853 и *kanamyceticus* K2J, *kanamyceticus* IPS5500. Някои аналози включващи NK-1001 и NK-1012-1 са изолирани от културална течност, получена от мутантни щамове.(биотехнологични)

Първият използван щам е *Streptomyces kanamyceticus* K1, от който се получава 160 µg/ml канамицин. Освен него за получаването на канамицин се използват три мутанта UUNK15; UUNNK1; UUNNK25 на *Streptomyces kanamyceticus* K1. Мутантът UUNNK1 синтезира високи концентрации на канамицин. Той се развива на среда KPMВ съдържаща нишесте, соево брашно, бактопептон, MgSO₄.7H₂O, K₂HPO₄, CaCO₃, NaCl с рН= 8,0-8,6 при t = 30°C на клатчка. При тези условия за три дни щама произвежда

200 µg/ml канамицин. При четириднешно разклащане на клатчка със скорост 300 об./мин UUNNK1 произвежда 350 µg/ml канамицин. *Streptomyces kanamyceticus* K1 е открит от лабораторията по приложна микробиология в университета Kyushu, Япония. Той се запазва на среда съдържаща: нишесте 10 g/l ; дрождев екстракт 3 g/l; агар 15 g/l; 1000 мл дестилирана вода. Инкубира се на стайна температура в продължение на 7-10 дни, за да се получи добър растеж, а след това се съхранява при температура 4°C.

Streptomyces kanamyceticus K-2J може да дава максимален добив на канамицин в температурен диапазон от 28 до 32°C.(Optimal Conditions for the Production of Kanamycin by *Streptomyces kanamyceticus* Mutants

Onanong Pringsulaka¹ and Surina Chavanich¹)

S. kanamyceticus ATCC1285 е изолиран като див тип. Трансформира се върху 5% захароза, 0,02% калиев сулфат, 1% магнезиев хлорид, 1% захар, 0,5% дрождев екстракт на твърда среда при 28 ° C. (Heterologous expression of the kanamycin biosynthetic gene

cluster (pSKC2) in *Streptomyces venezuelae* YJ003

Laxmi Prasad Thapa & Tae-Jin Oh & Hei Chan Lee &

Kwangkyoung Liou & Je Won Park & Yeo Joon Yoon &

Jae Kyung Sohng)

4.2. Механизъм на биосинтез

Аминогликозидните антибиотици могат да се класифицират в отделни групи в зависимост от химичната. Те се продуцират от представител *Streptomyces kanamyceticus*.

През 1967 г. Umezawa и др. предлагат следният биосинтетичен път на получаване на канамицина:

D-глюкоза → D-глюкоза-1-фосфат → UDP-D-глюкоза →

[UDP-3-кето-D-глюкоза] → UDP-3-амино-3-деокси- D-глюкоза

Най-вероятната схема на биосинтеза на канамицина е следната:

Глюкоза → пароамин → неамин → каназамин

↓ ↓ Канамицин С → канамицин В → канамицин А

[канамицин:4-О-(6-амино-6-деокси-D-глюкопуранозил)-2-деоксистрептамин]

За получаването на канамицин се използва култура от *Streptomyces kanamyceticus*. (биотехнологично)

Както е показано на фигура 2 Кана (2-DOI (2-deoxy-scylloinosose) синтаза), KanB (аминотрансфераза), и KanK (дехидрогеназа) участват в биосинтеза на 2-DOS(2-деоксистрептамин). Двустепенно гликозилиране от Кейн и KanF се наблюдава в биосинтеза. Нуклеотидите $\beta\alpha\beta$ зависят от дехидрогеназа и са запазени на N края. Поради което, Kan I участва в дехидрогениране на глюкоза и се трансформира от KasL, за да се получи канозамин. Следователно, чрез дехидрогениране от KanC и последващо трансформиране от KanD, а уридин дифосфат (UDP)-глюкозамин от UDP-глюкоза. (Heterologous expression of the kanamycin biosynthetic gene

cluster (pSKC2) in *Streptomyces venezuelae* YJ003

Laxmi Prasad Thapa & Tae-Jin Oh & Hei Chan Lee &

Kwangkyoung Liou & Je Won Park & Yeo Joon Yoon &

Jae Kyung Sohng)

4.3 Влияние на хранителната среда и условия за култивиране върху биосинтеза на канамицина

За изясняване на физиолого-биохимичните свойства на щам продуцента и максималния биосинтез на целевия продукт основно влияние оказва съставът на хранителната среда и условията на култивиране. Важно значение за развитието на продуцентите и биосинтеза на антибиотик има състава на хранителната среда. Основно изискване към средата е да бъде пълноценна т.е да съдържа балансиран набор от различни

хранителни компоненти.

Хранителните среди трябва да съдържат източник на въглерод, източник на органично свързан азот- царевичен екстракт, източник на неорганично свързан азот- амониеви соли, източник на сяра и фосфор-сулфатни и фосфорни соли, и микроелементи.

Хранителната среда за биосинтеза на канамицина има следния основен състав:

Източници на азот и въглерод

Въглеродът има най-голямо биологично значение за всяка жива клетка. Той съставлява около 50 % от сухото вещество на клетките и влиза в състава на всички органични вещества, образуващи се в клетките. Видът и количеството на въглеродния източник зависят от физиологичните особености на продуцентите и от синтезирания антибиотик, поради това те се подбират опитно за всеки продуцент.

Източниците на въглерод благоприятстващи растежа на канамицина са някои въглехидрати, алкохоли и органични киселини. От въглехидратите значение имат монозахаридите и дизахаридите, като глюкоза, малтоза и захароза. От полизахаридите широко приложение намира нишестето. То може да се използва директно като въглероден източник само от микроорганизми, които притежават собствени ензими, хидратиращи нишестето. В противен случай нишестето се подлага на ензимна или химична хидролиза. Всички въглехидрати при достатъчна аерация се усвояват чрез окисление и крайните продукти от техният метаболизъм са CO_2 и H_2O .

Окислението протича постепенно с образуване на междинни продукти, кетокиселини, дикарбоксилни и трикарбоксилни киселини. Те могат в значителни количества да се натрупат в средата и да служат като източници на въглерод в края на ферментацията, когато въглехидратите са усвоени. Наред с това те подкисляват рН на средата.

Получаването на остатъчни количества междинни продукти от окисляването на въглехидратите се наблюдава при недостатъчна аерация.

Азотът съставлява от 10-14 %е от сухото вещество на клетката. Той е необходим на микроорганизмите за синтеза на аминокиселините, пуриновите и пиримидиновите бази, както и за синтеза на някои витамини. Като източници на азот се използват органични вещества или минерални соли. В органичните източници азотът е под формата на белтък или във вид на продукти от хидролизата на белтъка като смес от аминокиселини и полипептиди.

Азотните източници за соево брашно, пептон, месен екстракт, царевичен екстракт, а също и амониев сулфат и амониев нитрат.