

CAPITOLUL I. AGENȚI BIOLOGICI UTILIZAȚI ÎN BIOTEHNOLOGIILE FARMACEUTICE

Nomenclatorul agenților biologici utilizați în biotehnologie se extinde în permanență. Între cele mai importante grupe de agenți biologici, pe primul loc se situează cel mai tradițional dintre ei – celula microbiană. Numai în secolul al XX – lea s-au realizat progrese majore în cunoașterea structurii și funcțiilor acestor microorganisme utile, precum și a geneticii lor. S-a început, de pildă, inducerea artificială de mutații cu ajutorul radiațiilor X, al radiațiilor ultraviolete sau cu cel al unor substanțe chimice, fapt care a permis intensificarea procesului de selecție a unor microorganisme utile. De exemplu, sușele sălbatice de *Penicillium* erau capabile să producă numai circa 60 mg de penicilină per litru de mediu de cultură în perioada când s-a descoperit că acest antibiotic este capabil să vindece unele infecții bacteriene. După un proces intens de selecție, realizat prin folosirea atât a unor mutații naturale, cât și a celor induse artificial, s-au obținut sușe care sunt capabile să producă circa 20g de penicilină la litru de mediu de cultură, adică de peste 10.000 ori mai mult decât cele sălbatice neameliorate.

După 1970, odată cu apariția ingineriei genetice, s-au creat condiții favorabile pentru manipularea informației genetice a microorganismelor industriale, pentru transferul de gene de la o specie la alta, pentru crearea de programe genetice artificiale. S-au putut astfel obține sușe noi de microorganisme capabile să mărească considerabil eficiența proceselor microbiologice în producerea de substanțe utile cu rol terapeutic.

Cerința care trebuie întotdeauna respectată se referă la concordanța dintre alegerea agentului biologic și principiul tehnologic. Astfel, dacă pe parcursul a mai multe cicluri de cultivare proprietățile agentului biologic dispar sau suferă modificări esențiale, atunci respectivul agent biologic trebuie acceptat ca fiind netehnologic, deci neutilizabil pentru stadiile ulterioare. Până la obținerea unui agent biologic care să corespundă principiului tehnologic, nici un produs biofarmaceutic nu trebuie recomandat pentru producerea în sistem industrial. Cele mai importante grupe de microorganisme utilizate în procesele biotehnologice farmaceutice clasice și moderne sunt drojdiile, mucegaiurile și bacteriile.

1. Drojdiile

Sunt un grup de peste 500 de specii care aparțin, în conformitate cu modul lor de reproducere sexuat sau asexuat, la trei clase de fungi și anume: Ascomycetes, Basidiomycetes

și Deuteromycetes. Ele sunt organisme de tip eucariot, având nucleu prevăzut cu membrană nucleară, diviziune celulară de tip mitotic și meiotic, precum și un anumit număr de cromozomi ce constituie o caracteristică de specie. Cele mai utilizate tulpini de drojdii în procesele biotehnologice farmaceutice sunt: *Saccharomyces cerevisiae*, *S. boulardii*, *Hansenula polymorpha*, *Candida boidinii*, *C. utilis*, *C. lipolytica*, *Kluyveromyces fragilis*, *Eremothecium ashby*, etc.

La drojdii, talusul fungal este generat de o singură celulă. Drojdiile sunt predominant fungi unicelulari, de formă redusă, ovală sau alungită. Lungimea variază de la 2 la aproximativ 10 milimicroni. Un număr limitat de drojdii elaborează capsule extracelulare. Un exemplu este *Cryptococcus neoformans*, un patogen uman care produce o formă gravă de meningită la bolnavii de SIDA. În acest caz, capsula mucopolizaharidică, creează drojdiei rezistență la mecanismele de apărare ale organismului uman, putând astfel cauza meningita.

Drojdiile, în general, se reproduc prin proces asexuat de înmugurire. Celula parentală dezvoltă o protuberanță, care eventual se separă de celula inițială. În fiziune, întâlnită la drojdiile de tipul *Schizosaccharomyces pombe*, celula parentală este divizată în doi descendenți, într-un mod similar cu fiziunea binară transversală întâlnită la reproducerea bacteriană.

Drojdiile formează rar structuri multicelulare. Unele drojdii, cum ar fi *Candida boidinii*, formează lanțuri celulare numite pseudomicelii sau pseudohife. Pseudomiceliul este format din celule de drojdii alungite, care provin de la mugurii care aderă unul de altul, sub forma unui lanț. Celulele individuale din structura pseudomiceliului sunt independente una de alta și spre deosebire de unitățile din structura hifelor septate, nu sunt conectate între ele prin pori. Drojdiile cu morfologie unicelulară tipică se pot prinde terminal sau de-a lungul pseudomiceliului, formând un blastospor secundar. Unele drojdii pot produce pereți despărțitori formând micelii adevărate, care cu siguranță sunt subordonate condițiilor de creștere.

2. Bacteriile

Sunt un alt mare grup de microorganisme cu importanță în biotehnologiile farmaceutice. Ele sunt organisme de tip procariot, adică cu celule care nu posedă nucleu, membrană nucleară și diviziune celulară de tipul mitozei și meiozei. Sunt microorganisme unicelulare sporulate sau nesporulate. Caracterizarea bacteriilor se poate face în funcție de

morfologia lor (coci, bacili, vibrioni), de afinitatea față de colorații de anilină (bacili acido – rezistenți, germeni gram pozitivi sau negativi), de proprietățile biologice (rezistență la temperatură ridicată, tipul de nutriție, respirație, patogenitate). Rezistența la temperatură ridicată a celulei bacteriene vegetative este mult mai mică decât a sporilor bacterieni, care este dată de acidul dipicolinic în special de o sare a acestuia, diploconatul de Ca. Printre cele mai utilizate tulpini bacteriene în procesele biotehnologice farmaceutice se numără: *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *B.macerans*, *Micrococcus glutamicus*, *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium lactofermentum*, *B.brevis*, *Lactobacillus acidophilus*, *L.plantarum*, *L.fermenti*, *Bifidobacterium bifidum*, *Acetobacter suboxidans*, *Xanthomonas. campestris*, *Streptomyces sp.*, etc.

Bacteriile reprezintă un grup de microorganisme procariote, unicelulare, de dimensiuni microscopice, cu morfologie variată și cu un echipament enzimatic mai mult sau mai puțin complex în funcție de specie. Fiecare bacterie prezintă o formă și dimensiuni caracteristice, dar supuse, între anumite limite, variabilității în funcție de condițiile mediului înconjurător, de vârsta celulei, iar pentru unele specii și de etapele ciclului lor evolutiv.

Forma și dimensiunile bacteriilor sunt elemente importante pentru diferențierea și clasificarea lor. Morfologia tipică a bacteriilor este dată de aspectul pe care îl prezintă celulele tinere, active din punct de vedere fiziologic, în condiții favorabile de mediu.

În general, la bacterii, se disting trei tipuri morfologice fundamentale: rotund (cocoid), alungit – cilindric (bacilar), și spiralat.

Tipul cocoid cuprinde bacteriile numite coci. Ei pot fi sferici, elipsoidali sau neregulați, cu diametrele celulei aproximativ egale. Celulele sunt sferice la stafilococi (*Staphylococcus aureus*), elipsoidale la streptococi (*Streptococcus viridans*), lanceolate la pneumococi (*Diplococcus pneumoniae*) și meningococi (*Neisseria meningitidis*).

Unul din criteriile de identificare și clasificare a cocilor îl constituie modul de grupare a celulelor după diviziune, determinat de planurile după care se face diviziunea și de tendința celulelor noi de a rămâne unite unele de altele. Când diviziunea se face după un singur plan, iar celulele noi formate rămân izolate, acestea poartă numele de micrococi (*Micrococcus uraea*). Dacă celulele nou formate rămân atașate câte două, în perechi, formează diplococii (pneumococ, gonococ, meningococ), iar dacă tendința de atașare a celulelor este mai pronunțată, se formează lanțuri mai lungi sau mai scurte de coci, constituind forma de streptococ. În urma unei diviziuni după două planuri, perpendiculare între ele, celulele mai rămân atașate câte patru formând tetrade (*Safrica tetragens*). După o diviziune în trei planuri perpendiculare rezultă pachete cubice de coci numite sarcina (*Sarcina lutea*). Atunci când

diviziunea se face după mai multe planuri neregulate, celulele se dispun sub formă de ciorchine alcătuind stafilococul.

Tipul bacilar cuprinde bacterii cilindrice, sub formă de bastonașe cu diametrul longitudinal de câteva ori mai mare decât cel transversal. Forma bacililor prezintă unele care se referă la marginile și extremitățile celulelor. Marginile pot fi paralele sau sunt depărtate la una sau la ambele extremități, dând aspectul de măciucie sau haltere (*Corynebacterium diphtheriae*), sau, din contra, sunt apropiate la capete, bacilul având aspect de fus (*Fusobacterium fusiforme*). La majoritatea speciilor extremitățile sunt rotunjite, la unele însă retezate (*Bacillus anthracis*).

Bacilii pot fi grupați în diplo și se numesc diplobacili, sau în lanțuri streptobacili. Unii se dispun sub formă de palisade ori pachete de ace cu gămălie (*Corynebacterium diphtheriae*), iar alții formează grupări caracteristice de rozetă sau stea (*Agrobacterium radiobacter*, *Agrobacterium stellatum*).

Tipul spiralat cuprinde bacterii cilindrice, alungite dar care prezintă curburi ale axului longitudinal. Se deosebesc trei subtipuri:

- vibriionul (*Vibrio cholerae*) bacterie în formă de virgulă;
- spirilul (*Spirillum volutans*) în formă de spirală rigidă, cu mai multe ture de spirală;
- spirocheta (*Treponema pallidum*, *Leptospira*, *Borrelia*) în formă de spirală, cu mai multe ture de spirală, dar flexibile.

În afară de aceste trei tipuri morfologice fundamentale există și un tip morfologic

intermediar, situat între tipul cocoid și bacilar, numit tip cocobacilar. La acest tip cele două diametre ale celulei se apropie de unitate. Unele bacterii dispun de un anumit grad de pleomorfism. Celulele de *Haemophilus influenzae* pot crește sub formă de filamente, pot fi rotunde, netede, încadrându-se în tipul cocobacililor. În culturi artificiale unele bacterii ale genului *Rhizobium* cresc sub formă de bacili cu formă regulată și dimensiuni uniforme, pe când unele bacterii din rădăcinile plantelor fixatoare de azot, prezintă celule cu o mare degenerare, de formă neregulată, fiind numite bacterioizi.

2.1. Dimensiunile bacteriilor

Bacteriile au dimensiuni de ordinul micronilor din care cauză nu pot fi observate decât la microscop. Mărimea bacteriilor este cuprinsă între 0,2 – 10 μm, deși organismele spiralate pot avea o lungime de 100 μm. Dimensiunile cocilor variază între 0,2 – 2 μm. Bacilii au

diametrul longitudinal de 0,5 – 10 μm , iar cel transversal de 0,3 – 2 μm . Dimensiunile spirililor și spirochetelor variază între 0,25 – 3,5 μm , diametrul transversal și 6 – 100 μm , diametrul longitudinal.

2.2. Structura celulei bacteriene

Celula bacteriană poate fi constituită din două tipuri de elemente structurale:

- a. elemente structurale constante, prezente la toate bacteriile, nucleoid, perete celular, membrană citoplasmatică, citoplasmă, organele citoplasmatică, incluziuni citoplasmatică;
- b. elemente structurale inconstante întâlnite numai la unele specii bacteriene, capsula și stratul mucos, flagelii, pili, sporul, cromatoforii.

3. Mucegaiurile

Sunt un grup de fungi filamentoși, organisme de tip eucariot și care împreună cu drojdiile formează o grupare mare de organisme denumită Mycota. Ele sunt microorganisme ce se prezintă sub formă de filamente de diverse dimensiuni, ce formează un miceliu care provoacă degradarea mediului în care se dezvoltă. Importantă pentru biotehnologiile farmaceutice au speciile care produc antibiotice și enzime cu rol terapeutic: *Penicillium natatum*, *P. erysogenum*, *Aspergillus niger*, *A. oryzae*.

Odată cu dezvoltarea biotehnologiei o importanță deosebită capătă băncile specializate de agenți biologici, în particular colecțiile de microorganisme caracterizate genetic, ca și băncile de crioconservare a celulelor vegetale și animale, care pot fi folosite cu succes pentru crearea de noi organisme, producătoare de substanțe biologice active cu rol terapeutic.

Pe plan mondial, există centre independente de colecționare a microorganismelor, caracterizate genetic, de exemplu cele create în S.U.A.; Coli – Center, Bacillus – Center, Centrul pentru ciuperci, etc. Colecțiile de culturi au un rol deosebit de important în procedura de protecție juridică a noilor culturi și în standardizarea proceselor biotehnologice. Colecțiile urmăresc păstrarea și menținerea tulpinilor și tot ele asigură lucrările de cercetare științifică și aplicativă cu tulpinile de microorganisme, plasmide, fagi, linii celulare.

Cercetătorii acordă o atenție deosebită creării direcționate de noi agenți biologici inexistenți în natură. În primul rând, trebuie remarcată crearea de noi celule de microorganisme, plante și animale prin metodele ingineriei genetice. A apărut și o orientare

care se ocupă de construcția celulelor artificiale. În prezent există metode care permit obținerea de celule artificiale prin folosirea diferitelor materiale sintetice și biologice, de exemplu a membranelor celulare artificiale, cu permeabilitate selectivă stabilă și având proprietăți tensioactive de suprafață. În interiorul unor astfel de celule pot fi incluse sisteme enzimatică, extracte celulare, anticorpi, antigeni, hormoni, etc. Utilizarea celulelor artificiale a dat rezultate pozitive în producerea de interferoni și anticorpi monoclonali, în crearea imunosolvenților.

Procesul de creare artificială a agentului biologic (a microorganismului sau celulei de țesut) constă în modificarea informației lui genetice, în scopul eliminării însușirilor nedorite și pentru imprimarea unor însușiri calitative cu totul noi. Cele mai importante modificări se obțin prin recombinare, respectiv prin redistribuirea de gene sau particule de gene și unificarea într-un singur organism a informației genetice derivate din două sau mai multe organisme. Obținerea organismelor recombinante, în particular, poate fi realizată cu metode de fuziune a protoplaștilor, pe calea transferului de plasmide naturale sau prin alte metode de inginerie genetică.

În etapa actuală de dezvoltare a biotehnologiei, celulele de țesuturi printre care hibridomii, transplantele sunt considerate agenți biologici netradiționali. În prezent, culturile de celule provenind de la mamifere sunt producătoare de interferon, vaccinuri virale, anticorpi monoclonali, antigeni celulari tensioactivi umani, factori angiogeni.

În mod special, trebuie evidențiat grupul de agenți biologici reprezentat de către enzimele catalizatoare de proveniență biologică, de al căror studiu, sub aspect aplicativ se ocupă ingineria enzimologică. Principala sa sarcină constă în elaborarea proceselor biotehnologice în care se folosește acțiunea catalitică a enzimelor, de regulă separate din compoziția sistemelor biologice sau care se găsesc în interiorul celulelor. În funcție de domeniul de utilizare se modifică și cerințele față de enzime în ceea ce privește gradul de puritate, compoziția, sursa de obținere. De exemplu în scopuri farmaceutice și medicale sunt utilizate doar enzimele individuale de mare puritate, în timp ce pentru prelucrarea deșeurilor agricole sunt suficiente preparatele enzimatică complexe, multicomponente.

Un domeniu independent de creare și folosire a agenților biologici este cel al agenților biologici imobilizați. Agentul biologic imobilizat este un sistem armonios, a cărui acțiune este determinată prin alegerea corectă a trei componente de bază: a agentului biologic, a suportului și a modului de conexiune dintre agent și suport. În principiu se folosesc următoarele grupe de metode pentru imobilizarea agenților biologici:

- introducerea în gel, microcapsule;

- absorbția pe suporturi insolubile;
- legarea covalentă cu suportul;
- îmbinarea prin reactivi bifuncționali, fără folosirea suportului;
- autoreglarea în cazul celulelor intacte.

Microcapsularea agenților biologici în celule artificiale constă în obținerea acestor celule dintr-o membrană artificială ultrafină, provenind dintr-un polimer, proteină sau alt material și conținutul încapsulat. În calitate de catalizator încapsulat pot fi folosite enzime, sisteme polifermentative, organite celulare, celule și culturi celulare. Pentru încapsulare se pot folosi simultan mai multe materiale polimerice. De exemplu, o substanță biactivă (hormoni, anticorpi, enzime) suspendată în soluția apoasă a polimerului cationic sau anionic formează particule lichide cu acest sistem polimeric. În final se formează capsule cu membrana, în interiorul căroră se găsește un material bioactiv. Catalizatorii încapsulați în celule artificiale pot să acționeze în substrat, penetrând liber prin membrana moleculelor, ceea ce oferă posibilitatea utilizării lor în obținerea produselor biofarmaceutice și medicină

Se extind metodele de imobilizare a agenților biologici, îndeosebi a enzimelor și a celulelor microbiene pe materiale textile. De exemplu, lizozimul imobilizat pe material textil are o eficiență sporită în tratamentul rănilor purulente, comparativ cu lizozimul nativ.

Utilizarea agenților biologici imobilizați prezintă următoarele avantaje esențiale:

- reținerea în interiorul reactorului;
- activitate puternică;
- posibilitatea controlului asupra micromediului din jurul agentului biologic;
- posibilitatea separării rapide și totale a produselor;
- posibilitatea realizării unor procese continue, cu re folosirea multiplă a agentului biologic imobilizat.

În operarea cu agenți biologici imobilizați se poate ajunge la accelerarea formării produsului, îmbunătățindu-se în acest mod tehnologiile existente și creându-se altele noi. De exemplu, viteza de biosinteză a acidului citric (ce intră în compoziția diferitelor preparate farmaceutice) cu miceliu imobilizat de *A. niger* este de 2,4 ori mai mare decât cea realizată cu miceliu liber.

Pentru prima dată pe plan mondial s-a realizat hidroliza asimetrică a acetyl-DL-aminoacidului, la nivel industrial, prin utilizarea aminoacilazei imobilizate prin legătură ionică pe DEAE-sefadex, obținându-se o-metionină, o-valină, o-fenilalanină cu 40% mai ieftin și care au utilizare farmaceutică.

Din cele spuse mai sus reiese că în procesele biotehnologice farmaceutice este posibilă utilizarea unei întregi serii de agenți biologici, caracterizați prin nivele diferite de complexitate a reglării biologice, de exemplu celular, subcelular, molecular. O astfel de serie convențională se poate deschide cu microbiocenoza (asociație de microorganisme) și încheie cu enzima individuală de puritate ridicată. În mod nemijlocit, abordările pentru crearea întregului sistem biologic depind de particularitățile agentului biologic utilizat.

Microorganismele industriale au nevoie pentru creșterea și înmulțirea lor de energie și de o multitudine de substanțe organice pe care le sintetizează cu ajutorul unor variate căi metabolice. În ce privește necesitățile față de mediul de cultură, ele pot fi clasificate în aerobe, anaerobe și facultative.

Microorganismele aerobe sunt capabile să și desfășoare metabolismul exclusiv în prezența oxigenului atmosferic. Din acest grup fac parte specii ale genului *Streptomyces* care sunt utilizate pentru biosinteza diferitelor antibiotice.

Microorganismele anaerobe au un metabolism care nu se poate realiza decât în absența oxigenului liber, cum este de pildă bacteria *Lactobacillus delbrueckii* producătoare de acid lactic de uz farmaceutic.

Din grupul **microorganismelor facultative** fac parte cele care pot să-și modifice metabolismul încât să realizeze atât unul de tip aerob (respirator) cât și unul anaerob (fermentativ). Un exemplu de astfel de microorganisme facultative îl reprezintă drojdiile, care pot atât respira cât și fermenta anumite substraturi.

În ce privește metabolismul de tip fermentativ, ca rezultat al său se poate obține un singur produs principal și atunci el se cheamă homofermentativ. De pildă, bacteriile lactice transformă glucoza în acid lactic.

Organismele heterofermentative realizează un metabolism din care rezultă două sau mai multe produse principale. Ca exemplu poate fi citată specia bacteriană *Clostridium acetobutylicum* care convertește glucoza într-un amestec de acetonă, alcool etilic, izopropanol și butanol.

Prin activitatea microorganismelor pro- și eucariote se realizează două tipuri de metaboliți: primari și secundari.

Metaboliții primari sunt compuși chimici sintetizați de celule și necesari creșterii și înmulțirii lor. Printre aceștia putem cita: aminoacizi, nucleotide purinice și pirimidinice, acizi organici și vitamine. De regulă celulele microorganismului produc numai cantități relativ reduse din acești metaboliți primari, strict necesare metabolismului lor. S-a demonstrat că sinteza acestor substanțe este reglată genetic, în sensul că funcționarea genelor care determină

sinteza acestor substanțe, se realizează numai atâta timp cât este necesar, în funcție de ciclul vital al organismului respectiv și de mediul ambiant. Prin mutații ale genelor care intervin în reglajul genetic al activității celulelor, acestea pot produce cantități disproporționate dintr-un anumit metabolit.

De exemplu, bacteriile *Corynebacterium glutamicum* și *Brevibacterium flavum* sintetizează în mod normal toți cei 20 de aminoacizi necesari pentru producerea proteinelor cu rol structural și metabolic foarte important în viața celulelor. Dacă însă se produc mutații ale genelor de reglaj genetic al unor căi metabolice, aceste bacterii produc cantități foarte mari de anumiți aminoacizi, cum sunt lizina și acidul glutamic, ce pot fi utilizați în industria alimentară și biofarmaceutică. Mutantele respective ale celor două specii bacteriene pot transforma circa o treime din zahărul conținut de mediul de cultură în lizină și acid glutamic.

De asemenea, prin intervenția în reglajul genetic al activității celulare la microorganisme, se pot produce și alți metaboliți primari utili economic și cu rol terapeutic cum sunt vitaminele. De pildă microorganismul *Ashbya gossypii* poate astfel sintetiza o cantitate necesară creșterii sale. În mod similar mutante bacteriene de *Pseudomonas dinitrificans* pot sintetiza de 50.000 ori mai multă vitamină B₁₂ decât tipul normal.

Metaboliții secundari sunt compuși chimici sintetizați de celule vii, care nu sunt indispensabili pentru creșterea lor în cultură pură. Din acest grup fac parte: antibioticele, alcaloizii, hormonii de creștere, etc. În general microorganismele au o fază de creștere rapidă în timpul căreia sinteza metaboliților secundari este foarte redusă, după care, când mediul de cultură se epuizează în substanțe nutritive, are loc o reducere a creșterii și se realizează sinteza de metaboliți secundari.

Antibioticele sunt astfel de metaboliți secundari sintetizați de unele microorganisme și care au importanță practică în medicina umană și veterinară, pentru combaterea unor maladii infecțioase. Din cele 5500 de antibiotice cunoscute astăzi, numai circa 100 sunt utilizate în terapeutică.

S-a constatat că sinteza antibioticelor se realizează în cadrul unor căi metabolice, în care intervin 10 – 30 de gene diferite ce determină sinteza unor enzime care favorizează desfășurarea diferitelor etape succesive necesare în procesul de sinteză a antibioticelor. Ca urmare obținerea unei sușe de microorganisme care să producă mari cantități de antibiotice este un proces complex ce se realizează artificial prin cicluri succesive de mutație și selecție. Pe măsură ce o mutantă utilă este selecționată ea servește din nou ca loc de plecare pentru tratamente cu agenți mutageni și selecția unei noi mutații mai productive. În cazul unor specii de microorganisme eucariote (drojdii) la care există și reproducere sexuată, se utilizează

hibridarea prin care se realizează fenomenul de recombinare genetică a patrimoniului ereditar al speciilor genitoare și apariția unor noi programe genetice, care permit selecția de sușe mai productive.

Schimbările în procesul de selecție a unor microorganisme utile s-au realizat după apariția ingineriei genetice. Descoperirea structurii moleculare a genelor a făcut posibilă sinteza lor artificială și transferul de gene peste barierele de specie. S-au creat astfel premise pentru dezvoltarea rapidă a biotehnologiilor farmaceutice moderne și utilizarea lor eficientă în vederea obținerii unei game variate de substanțe utile cu rol terapeutic.

CAPITOLUL II. BIOTEHNOLOGIA ANTIBIOTICELOR

Descoperirea în anul 1928 de către Alexander Fleming a faptului că fungul *Penicillium notatum* poate să producă un compus capabil să inactiveze selectiv un gen mare de bacterii, fără a influența nejustificat gazda, a pus în mișcare o serie de studii științifice care arată influența bolilor bacteriene asupra oamenilor. Din aceste studii au rezultat antibiotice fungice: penicilina și cefalosporina, și antibiotice actinomicinice: streptomicina, aureomicina, cloramfenicolul, tetraciclina și multe altele. Multe din bolile bacteriene au fost învinse prin folosirea antibioticelor. Pneumonia, tuberculoza, holera și lepra, și sunt doar câteva, nu au dominat societatea mult și în sfârșit în locurile dezvoltate ale lumii au fost catalogate ca fiind boli rare. Griseofulvina, un antibiotic activ împotriva fungilor, a adus un mare ajutor împotriva infecțiilor datorate bolilor de piele produse de fungi.

Antibioticele sunt compuși antimicrobieni produși de microorganisme vii, și sunt folosiți terapeutic și uneori profilactic în controlul bolilor infecțioase. Peste 4000 de antibiotice au fost izolate, dar numai 50 au o utilizare largă (Tabelul 1). Alți compuși cu rol antibiotic nu sunt folosiți din unele motive, cum ar fi toxicitatea la animale și oameni, costuri de producție mari.

Antibioticele au fost folosite încă din 1945, când a început să se utilizeze penicilina. Noile antibiotice au extins rapid limitele controlului antimicrobian și antibioticele sunt acum larg utilizate în medicina umană și veterinară și (ca măsură mai puțin importantă) în fermele de animale, unde unele antibiotice influențează creșterea longevității păsărilor. Antibioticele pot fi utilizate și pentru a limita extinderea bolilor la plante și ca insecticide.

Tabelul 1. Principalele antibiotice importante din punct de vedere economic

Componentul antibiotic	Microorganismul producător	Spectrul de activitate
Actinomicina D	<i>Streptomyces sp.</i>	Antitumoral
Bacitracina	<i>Bacillus sp.</i>	Antibacterian
Bleomicina	<i>Streptomyces sp.</i>	Anticancer
Cefalosporina	<i>Acremonium sp.</i>	Antibacterian
Cloramfenicol	<i>Cephalosporium sp.</i>	Antibacterian
Daunorubicina	<i>Streptomyces sp.</i>	Antiprotozoar
Fumagillina	<i>Aspergillus sp.</i>	Amoebicidal
Griseofulvina	<i>Penicillium sp.</i>	Antifungic
Mitomicina C	<i>Streptomyces sp.</i>	Antitumoral
Natamicina	<i>Streptomyces sp.</i>	Conservant de hrană
Nisina	<i>Streptococcus sp.</i>	Conservant de hrană
Penicilina G	<i>Penicillium sp.</i>	Antibacterian
Rifamicina	<i>Nocardia sp.</i>	Antituberculozic
Streptomicina	<i>Streptomyces sp.</i>	Antibacterian
Tetraciclina	<i>Streptomyces sp.</i>	Antibacterian, antimoebic

Antibioticele care afectează un gen mare de microorganisme sunt denumite „de spectru mare”, de exemplu: cloramfenicolul și tetraciclina, care pot controla organismele fără înrudire între ele ca specii de *Rickettsia*, *Chlamydia* și *Mycoplasma*. În contrast cu acestea, streptomicina și penicilina sunt exemple de „spectru mic (limitat, îngust)” fiind eficiente împotriva a numai câtorva specii de bacterii. Cele mai multe antibiotice sunt derivate din actinomicete și mucegaiuri.

Producția de antibiotice a fost fără nici un dubiu o parte profitabilă a industriei farmaceutice din lumea industrializată. Piața lumii pentru antibiotice valorează peste 10 bilioane USD/an și este cel mai valoros segment din toată piața farmaceutică (adică 100 miliarde USD).

În 1992, cefalosporinele (produse derivate din cefalosporina C sau penicilina C sau X), au fost una din marile afaceri pe piața farmaceutică cu vânzări de 8,3 miliarde \$. Procesele de acum au o eficiență mărită și au fost realizate cu puține cunoștințe despre genetica organismelor producătoare. Acestea se datorează, în parte, lipsei unui ciclu sexual evident

care limitează experimentele de împerechere a speciilor. În orice caz, tehnici noi cum sunt fuziunea protoplaștilor și tehnologiile transferului de gene au dus la dezvoltarea unor noi specii cu productivitate mărită, îmbunătățind stabilitatea și la apariția de produși noi. Aceste îmbunătățiri au dus la scăderea continuă a costurilor de producție. În prezent fermentațiile pentru antibiotice implică în principal reactoare care funcționează în condiții batch și continue. Modificări în procesele de producție pot fi bine urmărite de la proiectul fermentatorului care este acceptat industrial.

Este regretabilă observația că cele mai multe studii despre antibiotice au interesat țările dezvoltate asupra bolilor obișnuite. Multe boli ale țărilor în curs de dezvoltare, incluzând multe importante boli tropicale, au primit o mică atenție din partea marilor industrii farmaceutice. În parte, aceasta poate fi datorată nivelului înalt de tehnologie necesar, incluzând pregătirea cadrelor de specialitate, asociate în mod normal cu cercetări și dezvoltări în domeniul antibioticelor. Mult mai probabil, cauza o constituie economia politică de dezvoltare a noilor medicamente pentru țări cu resurse financiare limitate. Se speră că avansările în biotehnologie vor face posibilă descoperirea căii de dezvoltare a antibioticelor necesare pentru combaterea problemelor legate de bolile masive specifice țărilor în curs de dezvoltare. Biotehnologia poate să facă posibilă producerea economică a medicamente cu utilizări specifice și profit mic.

O observație îngrijorătoare a fost creșterea graduală a rezistenței medicamentelor la multe bacterii. Posibilitatea ca această rezistență căpătată să fie transmisă la alte specii de bacterii este acum realizată. De exemplu: gonoreea (o boală venerică) rezistentă la tratamentul cu penicilină, este acum prezentă în 19 țări. Este cunoscut faptul că factorii ce dau rezistență sunt localizați în plasmide în interiorul bacteriei și din această cauză pot fi transmiși cu mai multă ușurință între organisme. Esența tehnologiilor de transfer de gene derivă din acest fenomen. Rezistența antibioticelor în cazul multor boli bine cunoscute este în creștere și cauzează serioase îngrijorări în societate. De exemplu, tuberculoza, un chin vechi al oamenilor, a fost aproape eradicată, dar este acum din nou în creștere fiind întâlnită și în țările din Vest.

Piața de antibiotice folosite în hrana animalelor și pentru conservarea hranei este acum considerabil reapreciată. Fără nici un dubiu, adăția unor cantități relativ mici de anumite antibiotice (exemplu: bacitracina, clortetraciclina, penicilina) în stocul de hrană sau în hrana păsărilor de curte influențează producția animalelor care sunt mai sănătoase, cresc mai repede și dau rezultate importante rapide. În orice caz, nu există nici un dubiu că introducerea antibioticelor importante din punct de vedere medical în hrană a dus la creșterea numărului de

microorganisme rezistente la medicamente, crescând protecția periculoasei bacterii *Salmonella* în bălegarul animalelor și transferul de reziduri de antibiotice în hrana oamenilor.

Ca o consecință a pericolului utilizării antibioticelor cu relevanță umană în hrana animalelor, s-au depus eforturi masive pentru producerea de antibiotice specifice pentru introducerea lor în hrana animalelor și deci înlocuirea antibioticelor folosite în medicină. Astfel, antibioticele cu potențial terapeutic mic pentru oameni sau cu un spectru insuficient de activitate sunt acum utilizate mai mult în nutriția animalelor. Lupta pentru producerea hranei pentru populația continuu crescândă a lumii este mare. O parte majoră a acestei strategii implică bătălia contra microbilor. Biotehnologia va juca un rol major în dezvoltarea și producerea unor compuși antibiotici noi și de efect.

Combinarea tehnologiilor noi cu cele tradiționale în industria farmaceutică conduce la un potențial ieșit din comun pentru valorificarea utilizării microorganismelor în producția de antibiotice și izolarea unor noi produși antibiotici.

Antibioticele formează o grupă importantă de medicamente cu toxicitate selectivă, inhibând, în concentrații foarte mici, unele procese metabolice din celula microbiană sau producând adevărate ruperi ale acesteia, fără a fi nocive pentru celulele gazdă. Interesul lor economic provine din utilizarea medicală în lupta contra maladiilor infecțioase. Se cunosc antibiotice produse de microorganisme și plante superioare, dar importanță terapeutică au căpătat numai unele din antibioticele produse de microorganisme. Genul *Streptomyces* de exemplu conține o mare parte din microorganismele producătoare de antibiotice.

Producția de antibiotice utilizează sușe ameliorate prin mutagenză, prin recombinare și eventual prin inginerie genetică. Ingineria genetică permite de exemplu, transferul genei (penicilinacilază) de *Penicillium* la diverse sușe. Gena de rezistență la aminoglicozide poate de asemenea fi transferată, aceasta traducându-se prin posibilitatea unei hiperproducții fără inhibiție.

Exprimarea conținutului în antibiotic se face în unități gravimetrice sau unități internaționale de activitate. Aceste sisteme de unități sunt folosite atât în procesul biotehnologic cât și în terapeutică.

Unitatea internațională de activitate, reprezintă cantitatea minimă de antibiotic pur, necesară pentru a inhiba o cultură de 18 ore de stafilococ auriu în 50 ml bulion. Pentru câteva antibiotice, mai uzuale, corespondența dintre unitățile internaționale de antibiotice de activitate și concentrația gravimetrică, precum și activitățile standard și cele ale produselor comerciale sunt prezentate în Tabelul 2.

Tabelul 2. Corespondența dintre unitățile gravimetrice și cele internaționale ale câtorva antibiotice

Denumirea antibioticului	Greutate corespunzătoare pentru 1 UL/mg	Activitate standard UI/mg
Penicilină G	$5,98 \times 10^{-4}$	1670
Penicilină V	$5,90 \times 10^{-4}$	1965
Streptomicină	$12,80 \times 10^{-4}$	780
Tetraciclina	$10,0 \times 10^{-4}$	980
Clortetraciclina	$11,0 \times 10^{-4}$	990
Oxitetraciclina	$11,1 \times 10^{-4}$	990
Eritromicina	$10,53 \times 10^{-4}$	950
Polimixina	$1,27 \times 10^{-4}$	7874

Metodele chimice și fizico – chimice sunt recomandate în prezent ca metode oficiale de identificare și dozare a antibioticelor. Pentru identificarea antibioticelor se folosesc reacții specifice, metode cromatografice și metode spectroscopice în U. V. I. R., iar pentru dozarea activității se folosesc metode titrimetrice, electrochimice, cromatografice, polarimetrice și colorimetrice.

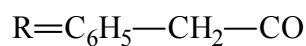
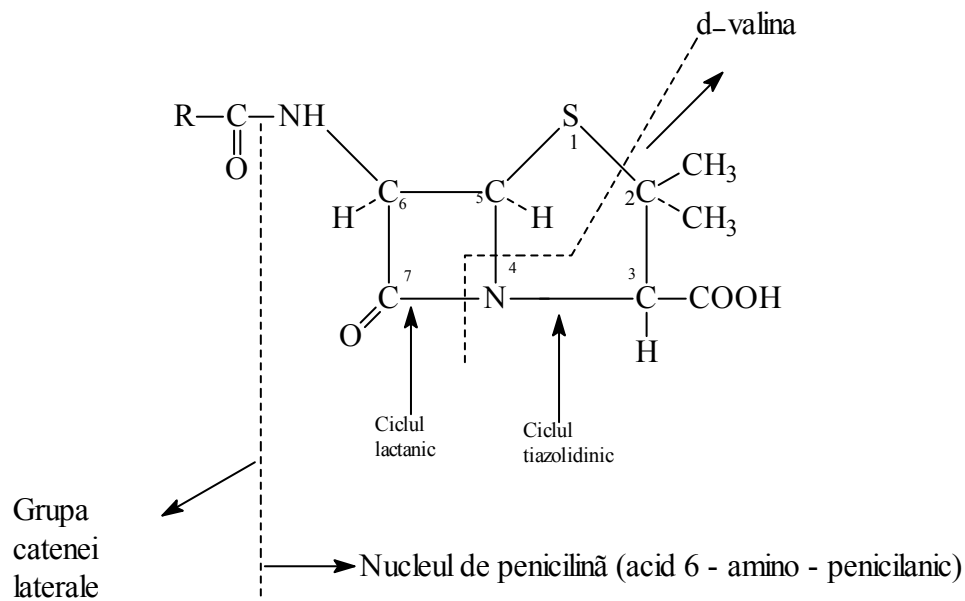
Clasificarea antibioticelor

Numărul foarte mare de antibiotice cunoscute până în prezent a pus problema clasificării acestor produse. S-au propus mai multe criterii de clasificare funcție de originea microorganismului producător, structura chimică a antibioticelor și acțiunea farmacologică. Clasificarea după structura chimică oferă posibilitatea formării unor grupe, care elucidează legătura dintre constituția chimică și proprietățile antimicrobiene.

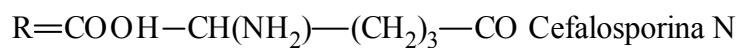
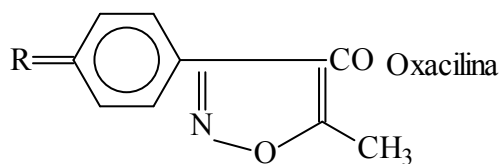
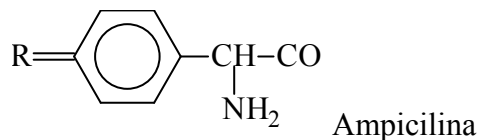
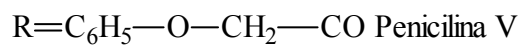
Antibiotice β - lactanice: peniciline și cefalosporine

Penicilinele naturale (G și V) sunt substanțe ce conțin heterociclul β - lactamic thiazolidin, produse de către *Penicillium chrysogenum* și care diferă între ele prin structura catenei laterale și activitate antibacteriană. Penicilinele au următoarea structură generală:

Sistemul biciclic tiazolidin - β - lactamic care este comun tuturor penicinelor rezultă prin înlanțuirea biogenetică a 2 aminoacizi și anume l-cisteină și d-valină. Structura moleculară a penicinelor este:



Penicilina G



Penicilinele de biosinteză se obțin printr-un proces biotehnologic comun care cuprinde următoarele faze:

- pregătirea mediilor de cultură și sterilizarea lor;
- fermentația biochimică;
- filtrarea soluțiilor native;
- separarea și purificarea penicinelor.

Mediul de cultură are în compoziție extract de porumb, lactoză, glucoză, CaCO_3 , KHPO_4 , NH_4NO_3 , Na_2SO_4 , ZnSO_4 , MnSO_4 , fenilacetamidă, tiosulfat de sodiu.

Fermentația este faza fundamentală a procesului de biosinteză și se realizează în trei trepte – inoculator, intermediar, regim – care corespund anumitor stadii de dezvoltare a microorganismelor. Astfel în inoculator se petrece procesul de aclimatizare a microorganismelor producătoare de penicilină, la noile condiții de dezvoltare, în intermediar începe creșterea exponențială a numărului de microorganisme, iar în regim se desavârșește procesul de creștere a microorganismelor și de elaborare a penicilinelor.

Eficacitatea procesului de biosinteză este determinată de conformația genetică a tulpinii producătoare. O tulpină bună se caracterizează prin capacitate mare de înmulțire, utilizare rapidă a azotului și a precursorului, lipsa pigmentilor în biomasă și miceliu fibros.

Procesul de fermentație a penicilinelor cuprinde trei faze metabolice distincte: faza de creștere, faza de producere și faza autolitică. Faza de creștere se caracterizează prin acumulare de masă miceliană și utilizarea intensivă a componentelor mediului de cultură. Glucoza este asimilată foarte rapid atât pentru formarea materialului celular, cât și pentru furnizarea energiei necesare. Cerințele de oxigen sunt maxime în această perioadă, iar activitatea respiratorie, caracterizată prin degajare de CO_2 este ridicată.

Faza de producere a penicilinelor se caracterizează prin încetinirea creșterii miceliului – fie datorită epuizării constituenților ușor asimilabili, fie scăderii consumului de oxigen, menținerii pH la 6,8 – 7,5 și acumulării de penicilină. În această fază lactoza este folosită lent de către miceliu și furnizează energia necesară proceselor de biosinteză sau pentru formarea constituenților celulari.

Faza autolitică corespunde stadiului în care microorganismul se epuizează ca urmare a activității metabolice prelungite, iar sursele de carbon din mediu sunt consumate. Conținutul în azot al miceliului descrește considerabil și începe procesul de acetoliză al acestuia cu eliberare de amoniac și creșterea pH peste 8. Producerea penicilinelor încetează și apare un proces de hidroliză alcalină a penicilinelor formate. În practica industrială nu este permisă prelungirea fermentației până la apariția autolizei.

Cantitatea de peniciline formate într-o fermentație biochimică normală este rezultatul îmbinării raționale a următorilor factori:

- conformația genetică a tulpinii care decide capacitatea de producere a penicilinelor;
- folosirea unor constituenți adecvați în mediu și un echilibru corect în proporțiile acestora;

- menținerea pH optim în mediul de fermentație;
- dozarea corectă a raportului între hidrații de carbon;
- adăugarea de precursori care vor decide natura catenei laterale și tipul de penicilină produsă;
- asigurarea necesităților în substanțe minerale;
- menținerea temperaturii optime.

Pentru faza de creștere a masei celulare pH optim este de 4,5 – 5,0, iar pentru faza de producere a penicilinelor este de 7,0 – 7,5. Dacă fermentația penicilinei se realizează prin proces continuu, atunci realizarea regimului optim de pH pentru faza de creștere a microorganismelor și pentru faza de elaborare a produsului este ușor de realizat. Pentru procese discontinue pH este cuprins între 6,4 – 7,0.

Regimul optim de temperatură este de $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, iar necesarul de aer, deoarece procesul este aerob, este de 1 – 1,5 aer/l mediu min., la o turație a agitatorului de 140 rot/min.

Dirijarea procesului de biosinteză spre o anumită penicilină se face cu ajutorul unor substanțe care sunt înglobate în catena laterală a penicilinelor și poartă numele de precursori. Pentru penicilina G se utilizează ca precursor fenilacetamida, iar pentru penicilina V acidul fenoxiacetic. Precursorii se adaugă în porțiuni, deoarece în concentrații mai mari de 0,1 – 0,2% sunt toxici pentru microorganisme.

Lichidul de cultură obținut în fermentație se separă de miceliu prin filtrare sub vid. Datorită diluției foarte mari, separarea penicilinelor se poate face, rentabil numai prin extracții repetate cu solvenți.

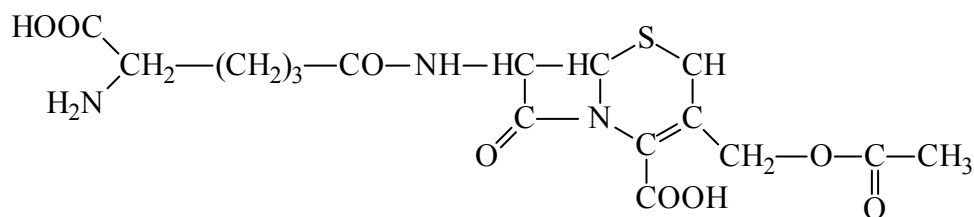
Pentru separarea penicilinei prin extracție lichid – lichid au fost studiați mulți solvenți organici, determinându-se valorile coeficienților de repartiție între apă și solvent, funcție de temperatură și pH. Dintre solvenții studiați pentru extracția penicilinelor cel mai economic este acetatul de butil.

Penicilinele de semisinteză sunt obținute pe cale chimică sau enzimatică plecând de la penicilinele naturale; prin hidroliză chimică sub acțiunea unei acilaze microbiene (*Escheria coli*, *Bacillus megaterium*, *Kluyvera citrophila*, *Pseudomonas melagenum*, *Streptomyces sp.*) se formează acid 6-aminopenicilanic (6 – APA) care este reciclat chimic pentru a se obține noi compuși activi (meticilină, oxacilină, ampicilină, carbenicilină).

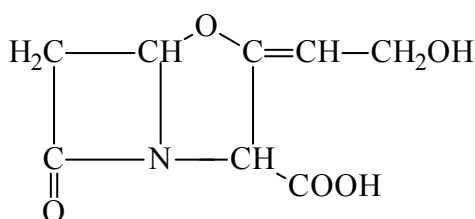
Penicilinele sunt capabile să inhibe sinteza peretelui bacterian. Ele sunt active asupra bacteriilor G⁺ (*Staphylococcus*, *Streptococcus*), asupra câtorva bacterii G⁻, *Neisseria* și

Treponema care este agentul sifilisului. Mai multe peniciline pot fi descompuse de germeni ce conțin o penicilază (*E. Coli*, *Bacillus*) care sunt transformate în acid peniciloic inactiv.

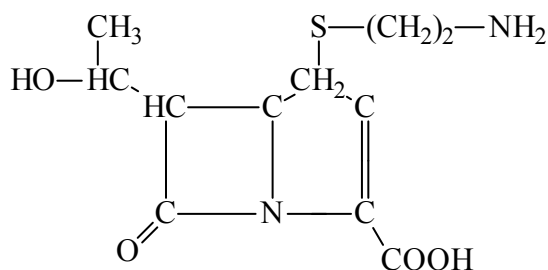
Cefalosporinele sunt molecule foarte apropiate de peniciline.



Cefalosporina C



Acid cluvulanic



Tienamicina

Prin ciclizarea unei tripeptide de către *Cephalosporium acremonium* se obține penicilina N sau cefalosporina N, apoi cefalosporina C. Cefalosporinele acționează mai ales asupra bacteriilor G⁺ prin inhibarea sintezei peretelui bacterian. Cefalosporina N este de asemenea activă asupra genului *Salmonella*.

Alte antibiotice β - lactanice sunt: acidul clavulanic care conține un ciclu β - lactanic și un ciclu oxazolidinic; tienamicinele care sunt sintetizate plecând de la acetyl - CoA, acid glutamic, cisteină și etanolamină, nocardicinele care sunt sintetizate plecând de la homoserină, serină, hidroxifenilglicină, care este un derivat de tirozină.

Antibiotice polipeptidice sunt peptide liniare (gramicidine A, B, C) sau circulare (tirocidine, polimixine, gramicidine S, bacitrocine) și sunt produse de genul *Bacillus* (*B. brevis*, *B.licheniformis*, *B. polymyxa*).

Polimixinele conțin acid L – diaminobutiric, acid 6 – metil octanoic și câteodată D – leucină. Elaborarea antibioticului se realizează în faza staționară de dezvoltare a microorganismului. Modul de acțiune este variabil. Polimixinele acționează asupra membranei celulare prin fisurarea unor molecule mici și liza celulelor. Ele sunt active asupra bacteriilor G-, în special polimixina E sau colimicina. Alte substanțe din această grupă sunt mai ales active asupra bacteriilor G+. Bacitracina A inhibă sinteza peretelui bacterian și împiedică traversarea membranei citoplasmatică de către mucopeptide. Gramicidina S este un inhibitor a fosforilării oxidative, iar tirocidinele și alte gramicidine afectează de asemenea funcțiile energetice de la nivelul membranei citoplasmatică.

Antibioticele aminoglicozidice reprezintă o grupă complexă de substanțe produse în mod esențial de genul *Streptomyces* și conțin diverși aminociclitoli, dezoxistreptamina, streptidină, actinamidă. Ele acționează în special prin inhibarea sintezei de proteine.

Streptomicina produsă de *Streptomyces griseus* este un antibiotic foarte valoros și acționează asupra a numeroase bacterii G- și micobacterii. Producția de streptomicină intervine în faza staționară de dezvoltare într-un mediu de cultură foarte aerat și la un pH de 7 – 8. Neomicina, gentamicina și kanamicina sunt derivați de dezoxistreptomicină și sunt produse de tulpini ale genului *Streptomyces*.

Antibiotice macrociclice

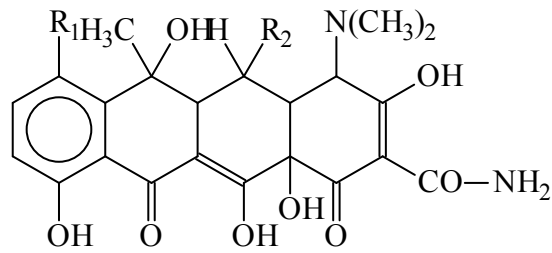
Mantidele sunt antibiotice ciclice și pot fi de natură polienică sau nepolienică. Cele nepolienice, cum ar fi eritromicina, tilosina sunt produse de *Streptomyces* și sunt inhibitori ai sintezei proteice. Biosinteza lor este stimulată de propanol sau propionat, iar producția se efectuează în timpul fazei staționare de dezvoltare.

Mantidele polienice de tipul nistatinei sunt produse de *Streptomyces* și prezintă particularitatea de a fi active asupra fungilor microscopici. Ele acționează la nivelul sterolilor prezenți în membrană, modificând permeabilitatea.

Rifamicina formează un grup particular de antibiotice macrolactanice, produse tot de *Streptomyces*, care inhibă sinteza ARN.

Antibiotice quinonice

În această grupă se găsesc tetraciclinele, cu toate că anthrocielinele și anthroquinonele de origine fungică, adesea sunt considerate ca micotoxine.



$R_1 = H$ $R_2 = H$ tetracilină

$R_1 = Cl$ $R_2 = H$ aureomicină (clortetracilină)

$R_1 = H$ $R_2 = OH$ teramicină (oxitetracilină)

Tetraciclinale sunt antibiotice tetraciclice și sunt produse de *Streptomyces*. Producția de tetraciclina începe să se realizeze în timpul fazei de dezvoltare exponențială a miceliului, aceasta continuând și în timpul fazei staționare. Sinteza nucleului tetraciclic este stimulată de prezența în mediul de cultură a benziltiocianatului. Tetraciclinale sunt antibiotice cu spectru larg (coci, bacili G⁺ și *Enterobacteriaceae*) asupra cărora acționează prin inhibarea sintezei proteice.

Antibiotice cu nucleu aromatic

Cloramfenicolul, antibiotic cu nucleu nitrobenzenic, care este produs de *Streptomyces venezuelae* poate fi obținut și prin sinteză chimică. Biosinteza se desfășoară paralel cu dezvoltarea miceliului. Nitrofenilserinolul este precursorul direct al cloramfenicolului. Acest antibiotic are un larg spectru de acțiune asupra bacteriilor, el acționând prin blocarea sintezei proteice la nivelul transferului de acizi aminați între ARN și ribozomi.

Griseofulvina, produsă de *Penicillium notatum*, posedă o structură triciclică și derivă din griseofenonă. Ea este activă asupra fungilor, acțiunea sa fiind asemănătoare cu cea a mamelidelor polienice.

Novobiocina este un antibiotic cu structură policiclică și este produsă de *Streptomyces sphaeroides*. Eliberarea antibioticului în mediul de cultură se realizează în faza staționară. Modul de acțiune este asemănător cu a penicilinei.