**РЕФЕРАТ**

Пояснювальна записка до курсової роботи “Виробництво бензилпеніциліну”: 29 с., 7 рис., 1 таблиця, 9 літературних джерел, 2 додатка.

**Об’єкт дослідження** – технологія отримання бензилпеніциліну шляхом мікробіологічного синтезу.

**Мета роботи** – аналіз процесу отримання бензилпеніциліну шляхом мікробіологічного синтезу, опис основних стадій технології виробництва антибіотиків.

**Метод дослідження** – аналіз літературних джерел, графічне проектування.

**антибіотики, бензилпеніцилін (пеніцилін G), 6-апк, Penicillium chrisogenum, безперервний метод стерилізації, Кукурудзяний екстракт, фенілоцтова кислота, фенілацетамід, феноксиоцтова кислота, електролітична коагуляція, йонообмінні смоли, ліофілізація.**

**ЗМІСТ**

ВСТУП

1. Основні теоретичні відомості про антибіотики

2. Теорія біосинтезу антибіотиків

3. Технологія біосинтезу бензилпеніциліну

3.1 Характеристика об’єкту біосинтезу

3.2 Характеристика продуцента

3.3 Підготовка посівного матеріалу

3.4 Характеристика поживного середовища

3.5 Стерилізація поживного середовища

3.6 Особливості перебігу процесу ферментації

3.7 Особливості процесу виділення і очистки пеніциліну

3.8 Контроль якості отриманого антибіотика

ВИСНОВКИ

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

ДОДАТКИ

**ВСТУП**

Одним із ключових відкриттів ХХ століття по праву можна вважати з’ясування противомікробних властивостей пліснявих грибів, зокрема роду Penicillium. Проте історія пошуку препарату, що міг би врятувати людину від багатьох інфекційних захворювань почалась ще задовго до ХХ століття. В 1871 р. В.А. Манасеїним було встановлено, що зелена цвіль Penicillium glaucum знищує бактерії, що потрапляють у культуральне середовище. Ця властивість Penicillium була тоді ж використана лікарем А. Г. Полотебневим, що використовував змочені цієї цвіллю пов'язки для лікування гнійних ран і виразок.

Видатне відкриття російських учених не одержало широкого розповсюдження, і в 1928 р. англієць Олександр Флемінг удруге виявив здатність цвілевого грибка Penicillium пригнічувати ріст мікроорганізмів. Було показано, що загибель мікробів обумовлена невідомою органічною речовиною, названою пеніциліном. Однак виділення пеніциліну в чистому вигляді в той же час не було здійснене, у зв’язку із його термолабільністю, і недосконалістю методів виділення та очищення.

У роки Другої Світової Війни величезна практична потреба в ефективних антибактеріальних препаратах привернула до пеніциліну увагу широкого кола фахівців, і приблизно з 1939 р. почався період інтенсивних досліджень. Завдяки цьому у відносно короткий термін (3 – 5 років) англійцями Х. Флорі й А. Четтеном (1940) були розроблені способи промислового одержання й очищення пеніциліну, вивчені його лікувальні властивості й методи клінічного застосування, а також встановлена його хімічна структура.

Технологія виготовлення антибіотиків на початку своєї історії була дуже примітивною, іноді навіть кустарною. Культивування велося поверхневим способом, технологія очищення була недостатньою щоб отримати препарат високого ступення чистоти. Проте на сьогоднішній день досягнення науки та техніки дозволяють отримувати надзвичайно чисті препарати антибіотиків, зокрема, за рахунок хроматографічних, йонообмінних та мембранних методів очищення. Значний внесок в підвищення якості препаратів принесло впровадження технології напівсинтеничних антибіотиків.

Важливо зазначити, що попри велику кількість створених антибіотиків, тільки невелика кількість знайшла практичне застосування. Пеніцилін, незважаючи на свою майже столітню історію, виготовляється в достатньо великих кількостях і на сьогоднішній день.

**1. Основні теоретичні відомості про антибіотики**

бензилпеніцилін мікробіологічний антибіотик

Антибіотики – специфічні продукти життєдіяльності різних груп мікроорганізмів, нижчих та вищих рослин і тварин або їх модифікації, що володіють високою фізіологічною активністю по відношенню до певних груп мікроорганізмів або злоякісних пухлин, вибірково затримують їх ріст або пригнічують розвиток.

Утворення антибіотиків – спадково закріплена особливість метаболізму організмів. Це проявляється в тому, що кожний вид (або навіть штам) здатний утворювати один або декілька визначених, строго специфічних для нього антибіотичних речовин. Метаболіти являються проміжними продуктами обміну речовин, результатом катаболічних і анаболічних реакцій, кінцевий продукт обміну – антибіотики – синтезуються із первинних метаболітів. Разом з тим, один вид антибіотиків може синтезуватися декількома видами організмів. Утворення антибіотиків зумовлено визначеним характером обміну речовин, що виник та закріпився в процесі еволюції організму.

Утворення антибіотиків – біологічний фактор, що має адаптаційне значення. Для продуцента здатність до продукції антибіотиків важлива не постійно, а лише в несприятливих умовах, наприклад, у разі нестачі поживних речовин, або у випадку контакту із специфічними продуктами життєдіяльності іншого організму.

Специфічність антибіотиків характеризується:

– високою біологічною активністю по відношенню до чутливих до них організмів, тобто здатність проявляти ефект навіть за низьких концентрацій;

– вибірковістю дії, тобто здатністю конкретного антибіотику проявляти свою дію лише по відношенню до визначених організмів або їх груп, не впливаючи на інші форми живих істот.

Величину біологічної активності антибіотиків виражають в умовних одиницях, що містяться в 1 мл (од/мл) або в 1 мг (од/мг) препарату. За одиницю антибіотичної активності приймають мінімальну кількість антибіотику, що здатна пригнітити або зупинити ріст визначеного числа клітин стандартного штаму тест-організма в одиниці об'єму поживного середовища. За одиницю активності пеніциліну прийнято мінімальну кількість препарату, здатного затримати ріст золотистого стафілококу (штам 209) в 50 мл живильного бульйону.

Пригнічення росту мікроорганізмів антибіотиками може здійснюватися тільки за наявності трьох умов:

– біологічно-важлива для життєдіяльності бактерій система повинна реагувати на дію низьких концентрацій препарату через визначену точку впливу;

– препарати повинні володіти властивістю проникати в бактеріальну клітину і впливати на точку впливу;

– препарат не повинний інактивовуватися раніше, ніж вступить у взаємодію з біологічно активною системою бактерій [1].

Класифікація антибіотиків може проходити за різними критеріями:

1. Класифікація антибіотиків за біологічним походженням:

а) антибіотики, продуковані мікроорганізмами, що належать до еубактерій;

б) антибіотики, продуковані мікроорганізмами, що належать до порядку Actinomycetales;

в) антибіотики, утворені ціанобактеріями;

г) антибіотики, утворені недосконалими грибами;

д) антибіотики, утворені грибами, що належать до класів базидоміцетів і аскоміцетів;

е) антибіотики, утворені лишайниками, водоростями і нижчими рослинами;

є) антибіотики, утворені вищими рослинами;

ж) антибіотики тваринного походження.

2. Класифікація за спектром біологічної дії:

а) протибактеріальні антибіотики вузького спектра дії, активні переважно по відношенню до грампозитивних мікроорганізмів;

б) протибактеріальні антибіотики широкого спектра дії;

в) протитуберкульозні антибіотики;

г) протигрибкові антибіотики;

д) протипухлинні антибіотики.

3. Класифікація антибіотиків за хімічною будовою:

а) антибіотики ациклічної будови;

б) антибіотики аліциклічної будови;

в) тетрацикліни;

г) ароматичні антибіотики;

д) антибіотики-хінони;

е) антибіотики-кисневмісні гетероциклічні сполуки;

є) антибіотики-азотовмісні гетероциклічні сполуки;

ж) антибіотики-аміноглікозиди;

з) металовмісні антибіотики [2].

Тип дії антибіотиків може бути цидним (бактеріоцидним, фунгіцидним, віріоцидним, протозоацидним), під цим розуміється невідворотне порушення життєдіяльності інфекційного агенту, і статичним (бактеріостатичним, фунгістатичним, віріостатичним, протозоастатичним), що спричиняє призупинення життєдіяльності і розмноження збудника.

Антибіотики повинні володіти високою вибірковою токсичністю, тобто вони повинні бути токсичними по відношенню до мікробних клітин і нешкідливими до клітин організму хворого.

Залежно від точки впливу і механізму біологічної дії, антибіотики поділяють на:

1. Специфічні інгібітори біосинтезу клітинної стінки: пеніциліни, цефалоспорини, цефаміцини, ванкоміцин, ристоміцин, циклосерин.
2. Препарати, що порушують молекулярну організацію та функціонування біологічних мембран: поліміксини, полієни.
3. Препарати, що пригнічують синтез білку на рівні рибосом: макроліди, лінкоіцини, аміноглікозиди, тетрацикліни, левоміцетин, фузидин.
4. Інгібітори синтезу РНК на рівні РНК-полімерази та інгібітори, що діють на метаболізм фолієвої кислоти: рифампіцини.
5. Інгібітори синтезу РНК на рівні ДНК-матриці: актиноміцини, антибіотики групи аурелової кислоти.
6. Інгібітори синтезу ДНК на рівні ДНК-матриці: мітоміцин С, антрацикліни [1].

**2. Теорія біосинтезу антибіотиків**

Промисловий процес виготовлення антибіотиків проходить за наступними етапами:

1. Стадії біосинтезу (утворення) антибіотика. Це основна біологічна стадія складного процесу одержання антибіотичної речовини. Головне завдання на цій стадії – створення оптимальних умов для розвитку продуцента й максимально можливого біосинтезу антибіотика. Висока результативність стадії залежить від рівня біосинтетичної активності продуцента антибіотика, часу його максимального накопичення, складу поживних середовищ для культивування організму, у тому числі вмісту застосовуваних попередників, а також загальних енергетичних витрат на процеси, пов'язані з розвитком продуцента антибіотичної речовини.

2. Стадії попередньої обробки культуральної рідини, клітин (міцелію) мікроорганізму й фільтрації (відділення культуральної рідини від біомаси продуцента). Ефективність стадії багато в чому визначається складом середовища для вирощування продуцента антибіотика, характером його росту, місцем основного нагромадження біологічно активної речовини (у культуральній рідини або всередині клітини).

3. Стадія виділення й очищення антибіотика. На цій стадії, залежно від властивостей антибіотика, його хімічної будови й основного місця нагромадження антибіотичної речовини, застосовують різні методи виділення й очищення. У якості основних методів використовуються екстракція, осадження, сорбція на йонообмінних матеріалах, розпарювання, сушіння.

Особливість цієї технологічної стадії визначається тим, що на першій стадії мають справу з невеликою концентрацією (~1 %) антибіотика в оброблюваному розчині, тоді як на наступних етапах його концентрація збільшується до 20-30 %. Усе це вимагає застосування різних місткостей і об'ємів використовуваних реагентів.

4. Стадії одержання готової продукції, виготовлення лікарських форм, розфасовки. Особливість стадії обумовлюється дуже високим вимогам до якості кінцевого продукту. У випадку випуску антибіотиків, призначених для ін'єкцій, препарати повинні бути стерильними; одержання таких антибіотичних препаратів, готування різних лікарських форм, дозування (розфасовка) і пакування повинні здійснюватися в асептичних умовах. Для максимального виходу антибіотика при культивуванні продуцента використовують комплекс заходів, що включають підбір найбільш сприятливих для цих цілей поживних середовищ, режимів культивування організму. Весь цей комплекс заходів включається в поняття «керований біосинтез».

У промислових умовах керований біосинтез вимагає суворого дотримання технологічного процесу як на стадії підготовки інокуляту, так і на стадії біосинтезу. На стадії підготовки інокуляту особливу увагу звертають на склад середовища, на якому вирощується організм, на вік клітин або міцелію. На стадії біосинтезу, крім складу середовища, велику роль відіграють швидкість споживання тих або інших компонентів, вміст попередників, регуляція процесу аерації культури, підтримка відповідних температури й рН середовища й інших показників режиму культивування.

У сучасних умовах виробництва вживають заходів для максимального зниження собівартості препаратів шляхом інтенсифікації всіх стадій технологічного процесу й, насамперед, підвищенням ефективності першої стадії – біосинтезу антибіотичної речовини.

Для цього необхідно:

а) впровадження у виробництво найбільш високопродуктивних штамів мікроорганізмів-продуцентів антибіотиків;

б) створення й забезпечення найсприятливіших умов розвитку продуцента антибіотика на відносно дешевих середовищах;

в) широке використання математичних методів планування процесу розвитку організму й електронно-обчислювальної техніки з метою оптимізації й моделювання умов його культивування, що забезпечують максимальний вихід антибіотика;

г) застосування сучасного обладнання на всіх стадіях технологічного процесу з автоматизованими системами, що контролюють основні параметри розвитку організму і стадій біосинтезу антибіотика.

Біотехнологічний процес одержання антибіотиків можна зобразити у вигляді наступної схеми (рис. 1) [2].

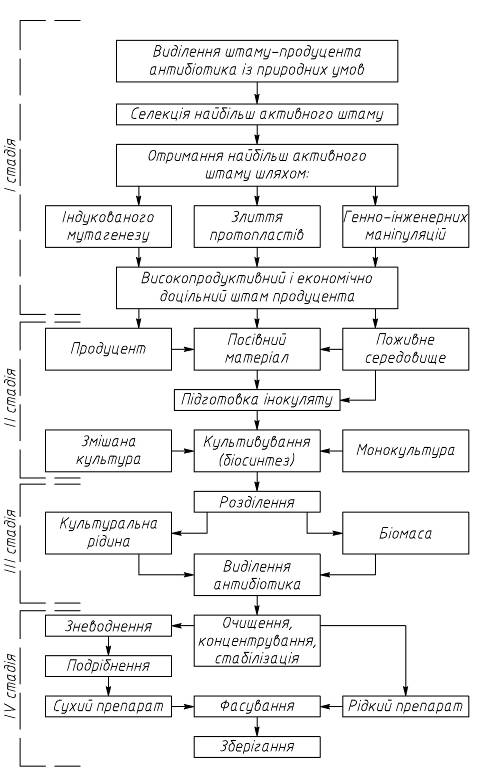


Рис. 1. Схема виробництва антибіотиків в процесі мікробіологічного синтезу.

**3. Технологія біосинтезу бензилпеніциліну**

**3.1 Характеристика об’єкту біосинтезу**

В 1871 р. В.А. Манасеїним було встановлено, що зелена цвіль Penicillium glaucum знищує бактерії, що потрапляють у культуральне середовище. Ця властивість Penicillium була тоді ж використана лікарем А. Г. Полотебневим, що використовував змочені цієї цвіллю пов'язки для лікування гнійних ран і виразок.

Видатне відкриття російських учених не одержало широкого розповсюдження, і в 1928 р. англієць Олександр Флемінг удруге виявив здатність цвілевого грибка Penicillium пригнічувати ріст мікроорганізмів. Було показано, що загибель мікробів обумовлена невідомою органічною речовиною, названою пеніциліном. Однак виділення пеніциліну в чистому вигляді в той же час не було здійснене, у зв’язку із його термолабільністю, і недосконалістю методів виділення та очищення.

У роки Другої Світової Війни величезна практична потреба в ефективних антибактеріальних препаратах привернула до пеніциліну увагу широкого кола фахівців, і приблизно з 1939 р. почався період інтенсивних досліджень. Завдяки цьому у відносно короткий термін (3 – 5 років) англійцями Х. Флорі й А. Четтеном (1940) були розроблені способи промислового одержання й очищення пеніциліну, вивчені його лікувальні властивості й методи клінічного застосування, а також встановлена його хімічна структура. До пеніцилінів відноситься група близьких по хімічних властивостях сполук, що містять у своїй структурі β-лактамне й тіазолідинове кільця: (див. рис. 2) [2].

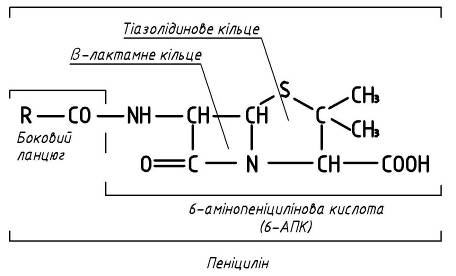


Рис. 2. Структурна формула пеніциліну.

В пеніцилінах R може бути представлений різними структурами. Найбільш відомий і широко використовуваним є бензилпеніцилін, або пеніцилін G, в якому радикал представляє собою бензильний залишок (C6H6 – CH2 – ), в пеніциліні V радикалом є феноксиметил (C6H6 – О – CH2 – ) [3].

Спочатку його отримували методом поверхневого культивування. Технологія була досить примітивною – продуцент культивували в колбах або пляшках. Потреба в пеніцилі була дуже велика і об’єм його виробництва, хоч і в примітивних умовах, швидко збільшувався. Для культивування продуцента використовувались навіть пляшки з-під молока, оскільки були в наявності машини для їх миття та обробки. В кожну пляшку наливали поживне середовище шаром 1 – 4 см, що забезпечувало необхідні умови аерації. Пляши поміщали в спеціальні кошики, стерилізували, а потім охолоджували. Сухі спори або їх водну суспензію вносили в пляшки пульверизаторами або піпетками і ферментували протягом 5 – 10 діб за температури 24 °С.

На сьогоднішній день у всьому світі пеніцилін отримують так, як і решту антибіотиків, методом глибинного культивування [4].

Більшість пеніцилінів виготовляють у вигляді натрієвих або калієвих солей. Новокаїнові і бензатинові солі є основою пролонгованих препаратів пеніциліну для внутрішньо-м’язового введення.

В сухій кристалічній формі пеніцилінові солі досить стабільні протягом тривалого терміну за температури 4 °С.

На сьогоднішній день бензилпеніцилін необхідний не тільки як медичний препарат, але і як речовина, що є вихідним продуктом для отримання 6-АПК і в подальшому напівсинтетичних пеніцилінів. Із загальної кількості природних пеніцилінів приблизно 35 % використовуються як медичні препарати, а 65 % – для отримання 6-АПК [1].

**3.2 Характеристика продуцента**

В якості продуцента широко використовують культури Penicillium chrisogenum, види Penicillium утворюють спори (конідії).

До роду Penicillium входять гіфальні мікроорганізми із септованим міцелієм, що утворює конідіальні китиці на септованих конідієносцях. Конідії одноклітинні, круглі або овальні і переважно зеленого кольору (див. додаток 2).

Рід Penicillium нараховує близько 900 описаних видів, систематика яких значною мірою базується на особливостях формування китиць (одномутовчасті, двохмутовчасті, неправильні). Рід поділяється на підроди: Eupenicillium, Gliocladium, Scopulariopsis, Paecilomyces, Citromyces.

Penicillium chrysogenum належить до секції Asymmetrica, підсекції Asymmetrica-Velutina. Колонії на агаризованому середовищі плоскі, бархатисті. Розвинутий повітряний міцелій. З верхньої сторони колонії синьо-зелені, іноді з краплинами жовтого екссудату, з нижньої – безбарвні або жовтуваті. Конідії від еліптичних (3,3 × 4 мкм) до округлих (4 мкм), часто зібрані в тісні колонки. Конідієносці гладенькі [5].

В розвитку міцелію спостерігається ряд різних фаз. На початку і в середині розвитку міцелію у клітинах накопичуються жири. Згодом їх кількість зменшується, з’являються вакуолі з гранулами рибонуклеополіфосфатів, потім починається автоліз. Інтенсивний синтез пеніциліну починається за наявності великої кількості біомаси міцелію, за повного виснаження глюкози і молочної кислоти в середовищі і за рН, близького до нейтрального.

Під час вивчення пеніциліну встановлено, що серед продуктів його кислотного гідролізу завжди присутня β-диметилцистеїн. Введенням в поживне середовище речовин із міченими атомами C14, N15, S32 було вивчено механізм біосинтезу пеніциліну.

Прийнято вважати, що бензилпеніцилінова кислота синтезується із L-цистина, фенілоцтової кислоти і диметилпіровиноградної кислоти.

Для отримання пеніциліну спочатку розмножують спори. Їх можна вирощувати на агаризованих середовищах, в складі яких входить 0,5 % меляси, 0,5 % пептону, 0,4 % повареної солі, 0,01 % однозаміщеного фосфату калію і 0,005 % сульфату магнію. Спори вирощують за температури 25 – 27 °С протягом 4 – 5 діб.

В промисловості спори часто отримують, вирощуючи міцелій в скляних флаконах на просяному середовищі. Висушений споровий матеріал можна зберігати навіть за кімнатної температури.

Отриманий споровий матеріал використовують для засіву інокуляторів (1 – 3 флакони на апарат, де міцелій розмножують до кількості 5 – 10 % від об’єму посівних ферментерів) [4].

Промислові штами під час селекції дають невелику кількість варіантів, із яких відбирають найбільш активні і стабільні для подальшого використання. Культури зберігаються в ліофілізованому стані протягом 3 років. Пеніциліни також можуть синтезувати Penicillium notatum, P. brevicompactum, P. nigricans, P. turbatum, P. steckii, P. corylophylum, Aspergillus flavus, A. janus, A. nidulans [5].

**3.3 Підготовка посівного матеріалу**

Підготовка посівного матеріалу – одна з найвідповідальніших операцій у циклі біотехнологічного способу одержання антибіотиків. Від кількості і якості посівного матеріалу залежить як розвиток культури у ферментері, так і біосинтез антибіотика. Продуцент зазвичай вирощують на багатих по складу натуральних середовищах, здатних забезпечити найвищу фізіологічну активність мікроорганізмів. Підготовка посівного матеріалу – процес багатоступеневий (мал. 3).

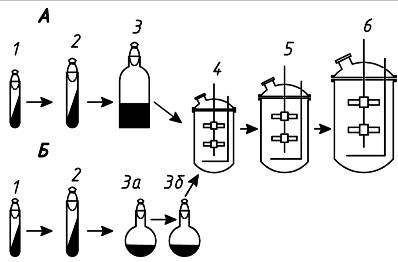


Рис. 3. Схема багатоступеневого приготування посівного матеріалу А – вирощування у флаконах, Б – вирощування у колбах на качалках: 1 – законсервований вихідний матеріал; 2 – спорова генерація на скошеному агарі в пробірці; 3 – II спорова генерація на твердому середовищі; 3а і 3б – I і III генерації на рідкому середовищі в колбі; 4 – ферментер попереднього інокулювання; 5 – ферментер інокулювання; 6 – основний ферментер.

Мікроорганізм попередньо вирощують на агаризованому середовищі в пробірці (1, 2), потім із пробірки роблять висів у колби з рідким поживним середовищем, проводять дві генерації методом глибинного вирощування на качалках протягом двох-трьох діб для кожної генерації (3а й 3б). Із другої генерації культури в колбі роблять посів у невеликий (10 л) інокулятор 4, після чого добре розвинену культуру переносять у більший інокулятор 5 (100 – 500 л), звідки й роблять посів в основний ферментер 6. Для посіву в основний ферментер використовують від 5 до 10 % посівного матеріалу (інокуляту) [2].

**3.4 Характеристика поживного середовища**

Для промислового виробництва антибіотика використовують середовище, що містить кукурудзяний екстракт, гідрол, лактозу і мінеральні солі. Замість кукурудзяного екстракту можуть використовуватися арахісове борошно, вичавки, борошно із бавовняного насіння та інші джерела поживних речовин. Можливість широкого використання продуктів рослинного походження обумовлена тим, що продуцент має сильні протеолітичні ферменти. В якості вуглеводів часто використовують цукрозу або суміш лактози із глюкозою у співвідношенні 1:1. Глюкоза може знижувати біосинтез антибіотика; на середовищах, що містять лактозу або цукрозу (в умовах депресії), біосинтез антибіотика іде активніше. Важливу роль в процесі босинтезу пеніциліну відіграє сірка, що міститься в структурі антибіотику. В якості джерела сірки використовують сульфат або тіосульфат натрію. Надлишок йонів міді не впливає на ріст гриба, але пригнічує синтез пеніциліну. Ефект пригнічення біосинтезу знімається за рахунок додавання в середовище йонів заліза. Продуцент в якості джерела фосфору може використовувати не тільки фосфати, але й фітати (солі інозитфосфорних кислот): Penicillium chrisogenum містить фермент, що руйнує фітин з вивільненням неорганічного фосфору [1].

В посівних ферментерах міцелій вирощують 12 – 18 год, 12 – 15 % об’єму культуральної рідини використовують для початку основної ферментації. Поживне середовище для вирощування міцелію і біосинтезу пеніциліну готують зазвичай із кукурудзяного екстракту, лактози, глюкози, мінеральних речовин і декількох препаратів фенілоцтової кислоти – попередників антибіотиків [4].

Синтез того чи іншого пеніциліну залежить від наявності специфічної речовини в середовищі, інакше кажучи, попередника, якого мікроорганізм включає в молекулу антибіотика без попереднього розщеплення. Варто відзначити, що попередники біосинтезу пеніциліну (фенілоцтова кислота, фенілацетамід, феноксиоцтова кислота) за визначених концентрацій та значень рН середовища проявляють токсичну дію на продуцента. Фенілоцтова кислота найменш токсична. Додавання її в середовище в концентрації більше 500 мкг/мл пригнічує ріст міцелію, особливо в перші 24 год його розвитку. Фенілоцтова кислота додається в концентрації від 100 до 500мкг/мл через 24 год розвитку продуцента. За таких умов забезпечується найбільший вихід бензилпеніциліну, концентрацію якого через 72 год розвитку може досягнути 500 – 1000 мкг/мл.

Під час розвитку гриба без внесення попередника утворюється близько 45 % бензилпеніциліну (пеніцилін G) і близько 53 % пеніциліну К (радикал п-гептилпеніцилін). У разі додавання в поживне середовище фенілоцтової кислоти змінюється співвідношення утворюваних компонентів в бік різкого збільшення бензилпеніциліну, кількість якого залежно від віку досягає 75 – 95 % від суміші пеніцилінів. В процесі культивування Penicillium chrisogenum в середовищі, що не містить фенілоцтової кислоти, в ньому накопичуються сірковмісні сполуки не β-лактамної природи, наближені до цистеїну та метіоніну. Додавання в середовище фенілоцтової кислоти сприяє більш швидкому метаболізму сірковмісних компонентів та сполуки β-лактамної природи [1].

Склад деяких поживних середовищ, що використовуються у промисловості для основної ферментації пеніциліну, наведено у таблиці 1 [4].

Таблиця 1. Склад ферментаційних середовищ (в %) для отримання пеніциліну

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Компонент | Середовище | | |
| Кукурудзяне | Вичавкове | Жирове |
| Кукурудзяний екстракт  Горіхові, соняшникові, соєві вичавки  Лактоза  Глюкоза або гідрол  Кашалотовий жир або рослинні олії  Нітрат амонію  Сульфат натрію  Дигідрофосфат калію  Сульфат магнію  Тіосульфат натрію  Карбонат кальцію (крейда)  Попередники бензилпеніциліну | 2,0 – 3,0  –  5,0  1,5  0,5 – 0,1  0,4  0,05  0,4  0,025  0,2  0,5 – 0,1  0,3 – 0,4 | –  2,0 – 4,0  5,0  1,5  0,5 – 0,1  0,4  0,05  0,4  0,025  0,2  0,5 – 0,1  0,3 – 0,4 | 2,0 – 3,0  –  1,0  1,5  2,5 – 3,5  0,4  0,05  0,4  0,025  0,2  0,5 – 0,1  0,3 – 0,4 |

**3.5 Стерилізація поживного середовища**

Для кожного продуцента антибіотика розробляється оптимальне живильне середовище. Середовище повинне відповідати певним вимогам:

а) забезпечувати максимальний вихід антибіотика;

б) складатися з відносно дешевих компонентів;

в) мати гарну фільтруючу здатність;

г) забезпечувати застосування найбільш економічних прийомів виділення й очищення антибіотиків.

Стерилізація поживних середовищ у промислових умовах здійснюється двома методами: періодичним і безперервним.

Періодичний метод стерилізації застосовується у разі використання невеликих об'ємів середовища й полягає в тому, що середовище нагрівається до температури 120 – 130 °С безпосередньо у ферментерах або в спеціальних казанах-стерилізаторах, витримується при цій температурі протягом 30 – 60 хвилин (залежно від об'єму середовища і його складу), після чого охолоджується до 27 – 30 °С.

За час, затрачуваний на нагрівання середовища до температури, необхідної для стерилізації, і її охолодження, знищується значне число мікроорганізмів. Ефект стерилізації й збереження термолабільних речовин досягаються в тому випадку, якщо стерилізацію проводять за більш високої температури і за коротший проміжок час. Безперервний метод стерилізації доцільно застосовувати при використанні більших об'ємів середовища. Приготовлене середовище зі спеціальної посудини за допомогою насоса подається в стерилізаційну колону, через яку пропускають гостру пару (тиск пари близько 505 Па). Пару подають зверху по внутрішній трубі, що має щілиноподібні прорізи, завдяки чому він надходить у середовище, швидко її нагріваючи. Середовище в колону подається знизу й рухається по спіралі навколо внутрішньої труби.

Середовище, нагріте в колоні до необхідної для стерилізації температури (~130 °С), надходить у спеціальний апарат, де воно витримується певний час при температурі 125 – 130 °С. Час витримки залежить від складу середовища й триває 5 – 10 хвилин. Звідси стерильне середовище надходить у змієвиковий холодильник, охолоджується до 30 – 35 °С (на виході) і надходить у ферментер.

Безперервний метод стерилізації має ряд переваг: можливість автоматичного регулювання процесу, швидке й рівномірне нагрівання середовища, забезпечення більш повної стерильності середовища й ін.

У процесі підготовки поживного середовища для отримання бензилпеніциліну приготовлене середовище піддають стерилізації. Процес ведуть у колонах безперервної дії. Далі середовище надходить у витримувач, де охолоджується протягом певного часу до температури 23 – 25 °С [2].

**3.6 Особливості перебігу процесу ферментації**

У сучасних умовах найбільш перспективним методом вирощування мікроорганізмів-продуцентів антибіотиків визнаний метод глибинного культивування. Метод полягає в тому, що мікроорганізми розвиваються в товщі рідкого поживного середовища, через яке безупинно подається стерильне повітря, і за постійного перемішування.

Існує чотири основні модифікації глибинного способу вирощування мікроорганізмів:

1. Періодичне культивування. У цьому способі весь процес розвитку мікроорганізмів повністю завершується в одному ферментері, після чого ферментер звільняється від культуральної рідини, ретельно промивається, стерилізується й знову заповнюється свіжим поживним середовищем. Середовище засівається продуцентом, і процес відновляється.

2. Метод відбору. Культивування мікроорганізмів здійснюється у ферментерах з періодичним відбором частини об'єму культуральної рідини і доведенням свіжим поживним середовищем до попереднього рівня.

3. Батарейний спосіб. Мікроорганізми розвиваються в ряду послідовно з'єднаних ферментерів. Культуральна рідина на певній стадії розвитку мікроорганізму перекачується з першого ферментера в другий, потім із другого в третій і т.д. Звільнений ферментер відразу заповнюється свіжим поживним середовищем, засіяним продуцентом. У цьому способі вирощування мікроорганізмів місткості використовуються більш раціонально.

4. Безперервне культивування. В основі методу лежить принцип безперервного потоку поживного середовища, що дозволяє підтримувати розвиток мікроорганізму на певній стадії його росту. Стадія розвитку мікроорганізму визначається тим, що в цей період відбувається максимальний біосинтез антибіотика або іншої біологічно активної сполуки. Встановлено, що в умовах безперервного процесу біосинтезу деяких антибіотиків можна одержати чудові результати, якщо процес вести у дві стадії. У першому апараті батареї підтримують високу швидкість потоку, що забезпечує більшу швидкість росту продуцента антибіотика, для того, щоб одержати високоактивну біомасу, а в другому апараті – забезпечують низьку швидкість потоку й відповідно невелику швидкість росту. Процес безперервного культивування – перспективний напрямок сучасної біотехнології.

Розвиток мікроорганізму у ферментерах проходить за суворого контролю всіх його стадій і точного виконанням регламенту умов розвитку. Велику увагу приділяють підтримці заданої температури культивування, активної кислотності середовища (рН), ступеня аерації й швидкості роботи мішалки. У процесі розвитку організму здійснюють біологічний контроль, враховують споживання організмом основних компонентів субстрату (джерела вуглецю, азоту, фосфору), уважно стежать за утворенням антибіотика. Проводити біологічний контроль на досить високому рівні дозволяє використання сучасного комп’ютерного забезпечення та автоматизованих систем управління.

Велике значення для утворення пеніциліну має аерація культури. Максимальне накопичення пеніциліну відбувається за інтенсивності аерації, що дорівнює 1 од. об’єму повітря за 1 хв. на 1 од. об’єму середовища. Зменшення інтенсивності аерації або надмірне збільшення призводять до зниження біосинтезу пеніциліну. Важливу роль при цьому відіграє перемішування культури. Так, із збільшенням потужності, що витрачається на обертання мішалки у ферментері об’ємом 7500 л, швидкість споживання лактози збільшується і біосинтез антибіотика зростає (рис. 4). Від способу перемішування культуральної рідини залежить форма і величина глибинних колоній, стан яких визначає міру здатності міцелію до синтезу пеніциліну [6].

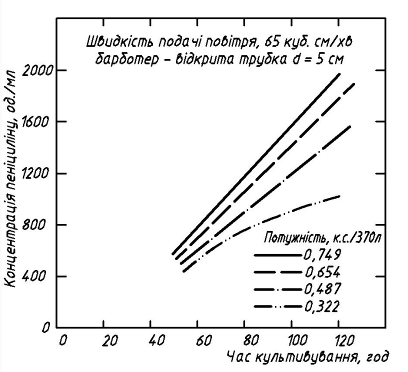


Рис. 4. Графік залежності накопичення пеніциліну від інтенсивності перемішування.

Велику увага в процесі розвитку продуцента у ферментерах звертають на процес піногасіння. Під час продування повітря через культуру мікроорганізму утворюється піна, яка суттєво порушує процес розвитку продуцента антибіотика у ферментері. Поява великої кількості піни обумовлена білковими речовинами, що знаходяться у середовищі, і її високою в'язкістю, що пов'язано з інтенсивним накопиченням біомаси.

Для боротьби з піною у ферментерах використовують поверхнево активні речовини: рослинні олії (соєву, соняшникову), тваринний жир (лярд, китовий жир), а іноді мінеральні олії (вазелінову, парафінову), спирти й вищі жирні кислоти. Нерідко в якості піногасників використовують спеціально синтезовані речовини (силікони, диазобутананкарбаміл та ін.).

Багато речовин (олії, жири, спирти й ін.), використовувані в якості піногасників, споживаються продуцентами антибіотиків як додаткові джерела вуглецевого живлення. При цьому часто спостерігається підвищення виходу антибіотика. Однак внесення піногасника може знижувати швидкість розчинення кисню, що, у свою чергу, негативно позначається на розвитку мікроорганізму і його біосинтетичну активність.

Іноді використовуються механічні способи піногасіння (відсмоктування піни через спеціальні труби, руйнування пухирців піни сильними струменями рідини, пари або газу).

Загальна схема виробництва антибіотиків до стадії виділення й хімічного очищення представлена на рис. 5.

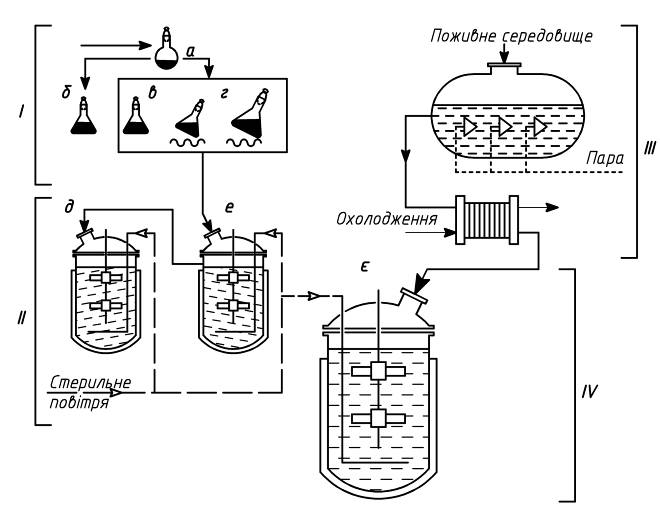


Рис. 5. Схема виробництва антибіотиків: I – приготування посівного матеріалу; II – інокулятори для нарощування посівного матеріалу; III – стерилізатор середовища для великого ферментера; IV – установка для біосинтезу антибіотика; а – стерилізація середовища в колбах; б – охолодження й посів культури продуцента в колбу; в – ріст культури в стані спокою; г – ріст культури в качалці; д – інокулятор зі стерильним середовищем; е – інокулятор із середовищем, засіяним культурою продуцента; є – ферментер;

Перша стадія процесу – вирощування стандартної колонії штамів плісняви Penicillium chrysogenum – проводиться в інокуляторах на поживному середовищі де процес іде ~30 годин. Підготовлений інокулят переносять у посівний апарат, об'єм якого ~ в 10 раз більше об'єму інокулятора. У посівному апараті знаходиться також стерилізоване поживне середовище. Процес росту тут іде ~15 – 20 годин, і далі посівний матеріал подається на ферментацію в більші реактори – ферментери об'ємом до 100 м3. Процес ферментації триває ~70 годин за температури 23 – 24 °С, рН середовища 6 – 6,5 і за інтенсивної аерації (1 од. об’єму повітря за 1 хв на 1 од. об’єму середовища) [2].

Для стабілізації реакції середовища використовують крейду. Коли кількість пеніциліну досягає максимуму ферментацію припиняють. Динаміка утворення міцелію, біосинтезу пеніциліну і споживання лактози із середовища зображено на рис. 6.

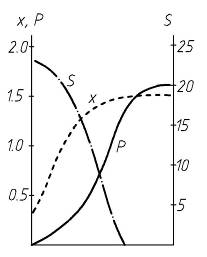


Рис. 6. Динаміка біосинтезу пеніциліну, утворення міцелію і асиміляції лактози: Х – сухий міцелій (мг/100 г), Р – концентрація пеніциліну (1000 од./мл), S – концентрація лактози (мг/мл).

Під час розвитку продуценту пеніцилінів – Penicillium chrisogenum – на кукурудзно-лактозному середовищі виділяють три фази.

**Перша фаза** – ріст міцелію, вихід антибіотика низький. Завжди присутня в кукурудзяному екстракті молочна кислота споживається продуцентом з максимальною швидкістю, лактоза споживається повільно. Споживання кисню – високе. Посилюється азотний обмін, в результаті чого в середовищі з’являється аміак і різко збільшується значення рН. Температура в період першої фази повинна бути 30 °С, рН в період росту гриба повинен бути нижче 7,0.

**Друга фаза** – максимальне утворення пеніциліну, це пов’язано із швидким споживанням лактози і амонійного азоту. рН середовища залишається практично без змін, збільшення маси міцелію незначне, споживання кисню знижується. Температура протягом другої фази повинна бути 20 °С,

**Третя фаза** – зниження концентрації антибіотика в середовищі у зв’язку із початком автолізу міцелію і виділенням в результаті цього процесу аміаку, що супроводжується підвищенням рН середовища.

На сьогоднішній день описано шість умовно виражених вікових фаз продуцента пеніциліну. Помітна кількість пеніциліну починає утворюватися з ІV вікової фази гриба, максимум накопичення припадає на VІ фазу – в період автолізу.

Визначення вікових фаз шляхом мікроскопічного контролю дозволяє встановити:

1. Хід загального темпу розвитку гриба, його стан, контроль за ходом утворення антибіотика.
2. Дефекти розвитку і можливі причини цих дефектів.
3. Момент закінчення розвитку гриба в реакторі.

По мірі розвитку гриба змінюється хімічний склад міцелію. Кількість загального азоту і білку в міцелії зменшується, вміст моноцукрів в період максимального біосинтезу пеніциліну (96 год.) збільшується майже в 6 разів по відношенню до початкового процесу, кількість дисахаридів зменшується. Змінюється кількість окремих амінокислот.

Процес біосинтезу пеніциліну ведеться за найретельнішого дотримання стерильності протягом усіх операцій, оскільки забруднення культури сторонньою мікрофлорою різко знижує накопичення антибіотика. Це пов’язано із тим, що багато бактерій здатні утворювати пеніцилазу.

Механізм біосинтезу пеніциліну зображений на рис. 7.

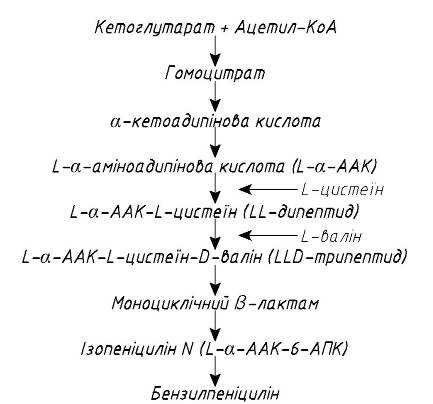


Рис. 7. Біохімія синтезу бензилпеніциліну

Сучасна промислова мікробіологія отримує культуральні рідини, що містять більше 55 тис. од./мл [1].

**3.7 Особливості процесу виділення і очистки пеніциліну**

Більшість продуцентів у процесі біосинтезу виділяють антибіотик у водну фазу, тому процес виділення антибіотика починається з розділення твердої й рідкої фаз.

Тверда фаза, крім маси міцелію, містить значну кількість колоїдних домішок, що ускладнюють фільтрування, тому культуральну масу попередньо піддають різним типам коагуляції (електролітична, теплова, кислотна і т.д.). Найбільш ефективним методом коагуляції культуральної маси є її обробка флокулянтами (високомолекулярними поліелектролітами), наприклад, полі - (4-вінил) - N-Бензилтриметиламонійхлоридом. Коагульований міцелій відділяють сепарацією або фільтрацією (частіш за все у вакуум-фільтрах циліндричного типу) [2].

Після відділення міцелію в фільтраті міститься 3 – 6 % сухих речовин, із яких 30 – 40 % складають мінеральні речовини, а 15 – 30 % пеніцилін. Вміст редукуючих речовин за Бертраном в нативному розчині зазвичай складає 0,1 – 0,4 %. Крім того, в ньому міститься 50 – 200 мг/100 г, а іноді навіть до 700 мг білку на 100 г розчину, що дуже ускладнює виділення пеніциліну. Білкові домішки видаляють, використовуючи різні методи попередньої обробки, наприклад, осадження солями полівалентних металів (Al, Fe, Zn), коагуляція таніном або високою температурою (60 – 70 °С) за рН середовища 5,5 – 6,0. В цих процесах втрати пеніциліну становлять 5 – 15 %. Після цього пеніцилін екстрагують органічними розчинниками (бутилацетат, амілацетат), які не змішуються із водою. На даному етапі важливо витримати рН середовища в межах 1,9 – 2,0. В результаті екстрагування чистота продукту збільшується в 4 – 6 рази. Потім пеніцилін із бутилацетатного екстракту за допомогою розчину дикарбонату натрію (рН середовища 6,6 – 7,2) розчиняють у воді, отримуючи розчин із 5 – 7 % вмістом сухих речовин і активністю 30000 – 50000 од./мл. Для очищення пеніциліну його знову екстрагують органічним розчинником (бутилацетатом). Під час екстрагування співвідношення фаз 1:0,5 – 1:1, активність екстракту 50000 – 70000 од./мл. Вихід пеніциліну складає приблизно 86 % від його кількості в культуральній рідині [4].

Широко застосовуються сорбційні методи виділення й очищення антибіотиків. У якості сорбентів широко використовуються синтетичні йонообмінні смоли.

Після виділення й хімічного очищення антибіотика його необхідно висушити, тобто вилучити із препарату вільну і зв'язану воду.

Оскільки більшість антибіотиків тією чи іншою мірою термолабільні, для їхнього висушування застосовують методи, що не приводять до втрати біологічної активності та хімічної структури препарату. На сучасному етапі промислового одержання антибіотиків використовують наступні методи зневоднювання. Це:

– ліофілізація антибіотиків – широкопоширений метод, проводиться за порівняно низьких температурах (-8 – -12 °С).

– висушування із застосуванням розпилювальної сушарки – прогресивний метод при роботі з великими кількостями антибіотика. Розчин антибіотика пневматично розпилюється у камері з протитоком нагрітого повітря. Процес висушування антибіотиків триває кілька секунд, при цьому навіть термолабільні препарати не змінюють свої властивості.

– Метод псевдокиплячого шару (або сушіння у вакуум-сушильних шафах) застосовується для висушування зернистих і пастоподібних антибіотичних препаратів.

Розфасовка й пакування антибіотика – завершальний етап роботи. Розфасований і упакований антибіотик із зазначенням показника біологічної активності, дати випуску й терміну придатності надходить у продажу [2].

**3.8 Контроль якості отриманого антибіотика**

Готовий антибіотик піддається ретельному контролю: біологічному й фармакологічному.

1. Під час біологічного контролю ставиться задача підтвердження стерильності готового препарату. Для цього зазвичай використовують два методи.

Перший пов'язаний з інактивацією антибіотика та висівом його у відповідне поживне середовище Наприклад, біологічний контроль бензилпеніциліну і напівсинтетичних препаратів, отриманих на його основі, проводиться в такий спосіб. У пробірки, що містять тіогліколеве середовище, вносять фермент пеніцилазу в кількості, що здатна повністю інактивовувати пеніцилін. Пробірки з пеніцилазой витримують дві – три доби за температури 37 °С для контролю стерильності ферменту, потім у них вносять розчин пеніциліну. Пробірки розділяють на дві групи: одну витримують за 37 °С, а іншу – за 24 °С протягом п'яти діб. Проводять щоденне спостереження за можливим розвитком мікроорганізму.

Другий метод з'ясування стерильності антибіотиків полягає у тому, що для більшості цих сполук не існує інактиваторів їх біологічної активності. Тому в досліджуваних препаратів виявляють стійкі до них форми мікроорганізмів, а також визначають можливу присутність чутливої мікрофлори. Для визначення можливої присутності в таких препаратах чутливої до них мікрофлори розчин антибіотика пропускають через мембранні фільтри з діаметром пор не більш 0,75 мкм.

2. До антибіотичних речовин, використовуваних у медичній практиці, відповідно до Державної Фармакопії України висуваються дуже суворі вимоги. Кожний новий лікарський препарат, перш ніж він буде дозволений до практичного застосування, повинен пройти всебічні випробування на токсичність, пірогеність і інші властивості, життєво важливі для організму. Препарат випробовують на різних видах тварин по відношенню до його гострої й хронічної токсичності (вплив на кров, ЦНС, дихання і т.д.). Показники гострої токсичності – один із критеріїв якості антибіотичної речовини. Встановлюють максимально допустиму дозу (МДД) антибіотика; дозу, що викликає загибель 50 % піддослідних тварин (LD50) і смертельну дозу (LD100). Тільки після всебічного й ретельного вивчення препарату він може бути рекомендований до практичного застосування.

**висновки**

Отже, промисловий процес виготовлення бензилпеніциліну проходить за наступними етапами:

1. Селекція високопродуктивного штаму продуцента.

2. Підготовка посівного матеріалу та поживного середовища.

3. Стадія біосинтезу.

4. Стадія попередньої обробки культуральної рідини.

5. Стадія виділення й очищення антибіотика.

6. Стадія одержання готової продукції.

7. Контроль якості бензилпеніциліну.

В процесі виготовлення бензилпеніциліну особливу увагу приділяють внесенню в поживне середовище речовин-попередників, тобто сполук, які продуцент буде використовувати для синтезу бензилпеніциліну. До них належать фенілоцтова кислота, фенілацетамід, феноксиоцтова кислота.

У сучасних умовах виробництва вживають заходів для максимального зниження собівартості препаратів шляхом інтенсифікації всіх стадій технологічного процесу й, насамперед, підвищенням ефективності першої стадії – біосинтезу антибіотичної речовини.

Для цього необхідно:

а) впровадження у виробництво найбільш високопродуктивних штамів мікроорганізмів-продуцентів антибіотиків;

б) створення й забезпечення найсприятливіших умов розвитку продуцента антибіотика на відносно дешевих середовищах;

в) широке використання математичних методів планування процесу розвитку організму й електронно-обчислювальної техніки з метою оптимізації й моделювання умов його культивування, що забезпечують максимальний вихід антибіотика;

г) застосування сучасного обладнання на всіх стадіях технологічного процесу з автоматизованими системами, що контролюють основні параметри розвитку організму і стадій біосинтезу антибіотика.

**Список використаної літератури**

1. Прищеп Т.П., Чучалин В.С., др. Основы фармацевтической биотехнологии: Учебное пособие. – Ростов н/Д.: Феникс; Томск: Издательство НТЛ, 2006. – 256 с. – (Высшее образование).
2. Тимощенко Л.В., Чубик М.В. Основы микробиологии и биотехнологии: Учебное пособие . – Томск: Изд-во Томского политехнического университета, 2009. – 194 с.
3. Елинов Н.П. Химическая микробиология: Учеб для студентов химикотехнол., технол., фармац., и др. ин-тов, аспирантов и практ. работников. – М.: Высш. шк., 1989. – 448 с.: ил.
4. Бекер М.Е. Введение в биотехнологию. Пер. с латышского. – М.: издательство «Пищевая промышленность», 1978. – 228 с.
5. Елинов Н.П. Общие закономерности строения и развития микробов-продуцентов биологически активных веществ. – М.: «Медицина», 1977. – 288с.
6. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках: Учеб. для студентов биолог. спец. ун-тов. – 4-е изд., перераб. и доп. – М.: Высш. шк., 1986. – 448 с.: ил.
7. Под ред. Н.С. Егорова. Промышленная микробиология: Учеб. пособие для вузов по спец. «Микробиология» и «Биология». – М.: Высш. шк., 1989. – 688 с.: ил.
8. Касаткин А.Г. Основные процессы и аппараты химической технологии. Издание седьмое. – М.: Государственное научно-технологическое издательство химической литературы, 1961. – 831 с.
9. Под ред. К.А. Калунянца. Оборудование микробиологических производств. – М.: Агропромиздат, 1987. – 389 с.