

Trường Đại học Tôn Đức Thắng

Khoa: Khoa học ứng dụng

Ngành công nghệ sinh học



Seminar:

CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT PENICILLIN

**SVTH: Tân Thị Xuân Huyền
Nguyễn Thị Lan Hương
Hoàng Hồng Ngọc
Phan Ngọc Bảo Nguyên**

Mục Lục

I. GIỚI THIỆU CHUNG VỀ CHẤT KHÁNG SINH:

1.1. Lịch sử phát hiện chất kháng sinh

1.2. Định nghĩa kháng sinh:

1.3. Cơ chế tác dụng:

1.4. Đơn vị kháng sinh:

II. CHẤT KHÁNG SINH PENICILLIN:

2.1. Lịch sử phát hiện và sản xuất penicillin

2.2. Công thức cấu tạo của penicillin

2.3. Những vi sinh vật sản sinh Penicillin và đặc điểm dinh dưỡng của chúng.

2.4. Cơ sở công nghệ sinh tổng hợp penicillin từ nấm mốc

III. QUY TRÌNH SẢN XUẤT PENICILLIN TỪ VI SINH VẬT:

3.1. Đặc điểm chung:

3.2. Chuẩn bị lên men:

3.3. Kỹ thuật lên men:

3.3.1. Kỹ thuật lên men bề mặt:

3.3.2. Kỹ thuật lên men chìm:

3.4 Xử lý dịch lên men và tinh chế thu penicillin tự nhiên

IV. SẢN PHẨM:

I. GIỚI THIỆU CHUNG VỀ CHẤT KHÁNG SINH:

1.1. Lịch sử phát hiện chất kháng sinh:

Sự phát triển về vi sinh vật học nói chung, và vi sinh vật công nghiệp nói riêng, với bước ngoặt lịch sử là phát minh vĩ đại về chất kháng sinh của Alexander Fleming (1928) đã mở ra kỷ nguyên mới trong y học: khai sinh ra ngành công nghệ sản xuất chất kháng sinh và ứng dụng thuốc kháng sinh vào điều trị cho con người.

Thuật ngữ " *chất kháng sinh*" lần đầu tiên được Pasteur và Joubert (1877) sử dụng để mô tả hiện tượng kìm hãm khả năng gây bệnh của vi khuẩn *Bacillus anthracis* trên động vật nhiễm bệnh nếu tiêm vào các động vật này một số loại vi khuẩn hiếu khí lành tính khác. Liên tiếp sau đó là những phát hiện khác của:

Babes (1885) đã nêu ra định nghĩa hoạt tính kháng khuẩn của một chủng là đặc tính tổng hợp được các hợp chất hoá học có hoạt tính kìm hãm các chủng đối kháng.

Nicolle (1907) là người đầu tiên phát hiện ra hoạt tính kháng khuẩn của *Bacillus subtilis* có liên quan đến quá trình hình thành bào tử của loại trực khuẩn này.

Gratia và đồng nghiệp (1925) đã tách được từ nấm mốc một chế phẩm có thể sử dụng để điều trị hiệu quả các bệnh truyền nhiễm trên da do cầu khuẩn.

Mặc dù vậy, trong thực tế mãi tới năm 1929 thuật ngữ "*Chất kháng sinh*" mới được Alexander Fleming mô tả một cách đầy đủ và chính thức trong báo cáo chi tiết về penicillin.

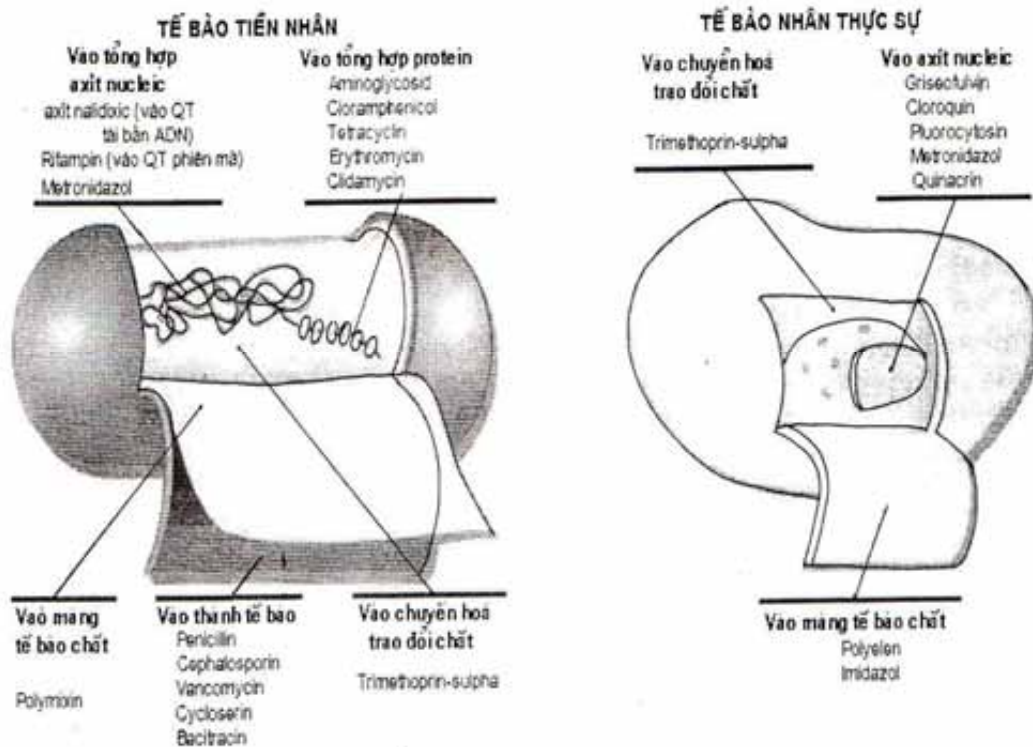
1.2. Định nghĩa kháng sinh:

Chất kháng sinh được hiểu là các chất hoá học xác định, không có bản chất enzym, có nguồn gốc sinh học (trong đó phổ biến nhất là từ vi sinh vật), với đặc tính là ngay ở nồng độ thấp (hoặc rất thấp) đã có khả năng ức chế mạnh mẽ hoặc tiêu diệt được các vi sinh vật gây bệnh mà vẫn đảm bảo an toàn cho người hay động vật được điều trị.

1.3. Cơ chế tác dụng:

Cơ chế tác dụng lên vi sinh vật gây bệnh (hay các đối tượng gây bệnh khác - gọi tắt là mầm bệnh) của mỗi chất kháng sinh thường mang đặc điểm riêng, tùy

thuộc vào bản chất của kháng sinh đó; trong đó, những kiểu tác động thường gặp là làm rối loạn cấu trúc thành tế bào, rối loạn chức năng điều tiết quá trình vận chuyển vật chất của màng tế bào chất, làm rối loạn hay kiềm toả quá trình sinh tổng hợp protein, rối loạn quá trình tái bản ADN, hoặc tương tác đặc hiệu với những giai đoạn nhất định trong các chuyển hóa trao đổi chất



Hình 1. Vị trí tác dụng chính của một số chất kháng sinh

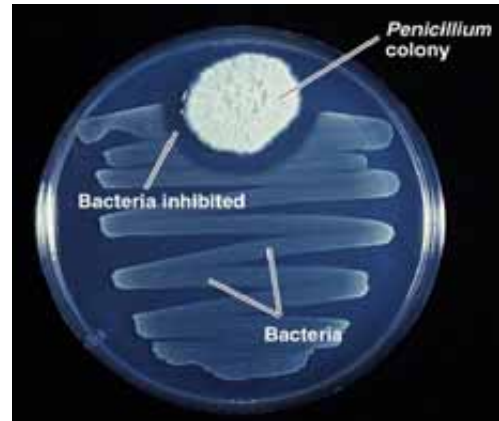
1.4. Đơn vị kháng sinh:

Năng lực tích tụ kháng sinh của chủng hay nồng độ chất kháng sinh thường được biểu thị bằng một trong các đơn vị là : mg/ml, µg/ml, hay đơn vị kháng sinh UI/ml (hay UI/g, *International Unit* .

II. CHẤT KHÁNG SINH PENICILLIN

2.1. Lịch sử phát hiện và sản xuất penicillin:

Penicillin được phát hiện tình cờ vào năm 1928 do Alexander Fleming, khi nhận thấy một hộp petri nuôi *Staphylococcus* bị nhiễm nấm mốc *Penicillium notatum* có xuất hiện hiện tượng vòng vi khuẩn bị tan xung quanh khuẩn lạc nấm.



Ông đã sử dụng ngay tên giống nấm *Penicillin* để đặt tên cho chất kháng sinh này (1929).

Sau đó, Mỹ đã triển khai lên men thành công *penicillin* theo phương pháp lên men bề mặt (1931). Tuy nhiên, cũng trong khoảng thời gian đó mọi nỗ lực nhằm tách và tinh chế penicillin từ dịch lên men đều thất bại do không bảo vệ được hoạt tính kháng sinh của chế phẩm tinh chế và do đó vấn đề penicillin tạm thời bị lãng quên.

Năm 1938 ở Oxford, khi tìm lại các tài liệu khoa học đã công bố, Ernst Boris Chain quan tâm đến phát minh của Fleming và ông đã đề nghị Howard Walter Florey cho tiếp tục triển khai nghiên cứu này.

Ngày 25/05/1940 penicillin đã được thử nghiệm rất thành công trên chuột.

Năm 1942, đã tuyển chọn được chủng công nghiệp *Penicillium chrysogenum* NRRL 1951 (1943) và sau đó đã được biến chủng *P. chrysogenum* Wis Q - 176 (chủng này được xem là chủng gốc của hầu hết các chủng công nghiệp đang sử dụng hiện nay trên toàn thế giới); đã thành công trong việc điều chỉnh đường hướng quá trình lên men để lên men sản xuất penicillin G (bằng sử dụng tiền chất Phenylacetic, 1944)....



Hình 2. Các tác giả giải thưởng Nobel y học năm 1945 về công trình penicillin

Penicillin được xem là loại kháng sinh phổ rộng, được ứng dụng rộng rãi trong điều trị và được sản xuất ra với lượng lớn nhất trong số các chất kháng sinh đã được biết hiện nay. Chúng tác dụng lên hầu hết các vi khuẩn Gram dương và thường được chỉ định điều trị trong các trường hợp viêm nhiễm do liên cầu khuẩn, tụ cầu khuẩn, thí dụ như viêm màng não, viêm tai - mũi - họng, viêm phế quản, viêm phổi, lậu cầu, nhiễm trùng máu... Thời gian đầu penicillin được ứng dụng điều trị rất hiệu quả. Tuy nhiên, chỉ vài năm sau đã xuất hiện các trường hợp kháng thuốc và hiện tượng này ngày càng phổ biến hơn.

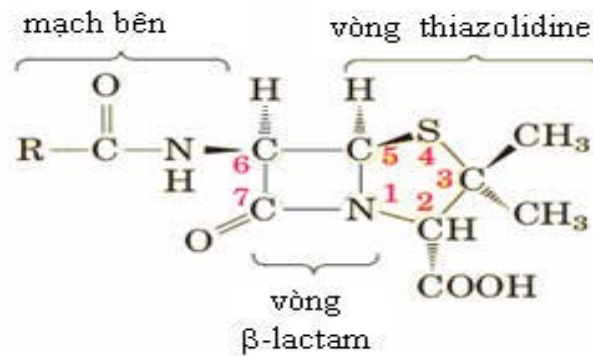
Vì vậy 1959, Batchelor và đồng nghiệp đã tách ra được axit 6-aminopenicillanic. Đây là nguyên liệu để sản xuất ra hàng loạt chế phẩm penicillin bán tổng hợp khác nhau.

Đối với Việt Nam, năm 1946, giáo sư Đặng Văn Ngữ đã thành công trong việc sản xuất nước lọc penicillin trong môi trường nước ngô góp phần đáng kể vào việc cứu chữa thương bệnh binh và đã được Bác Hồ thưởng Huân chương Lao động hạng ba cho thành tựu kỳ diệu chưa từng ai làm được này.

2.2. Công thức cấu tạo của penicillin:

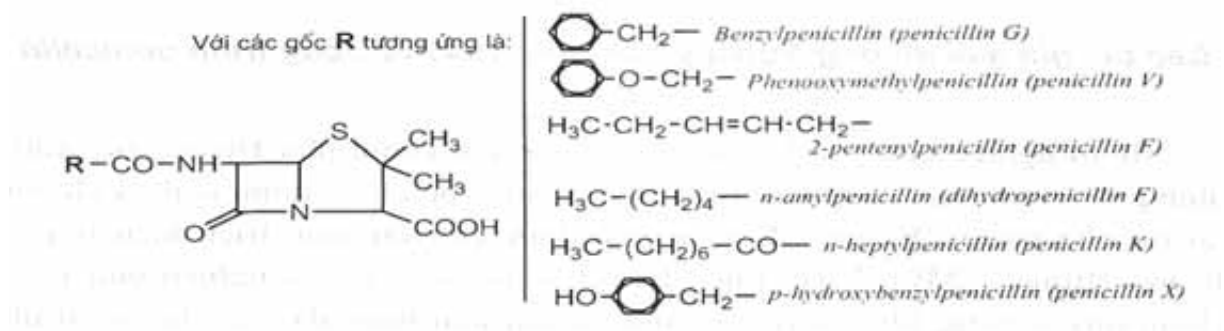
Penicillin gồm nhiều loại, chúng có cấu tạo gần giống nhau, bao gồm một vòng thiazolidine, một vòng β -lactam, một nhóm amino có gắn với CO_2 và một mạch bên (R). Tất cả các penicillin đều là dẫn xuất của acid 6-aminopenicillanic. Sự thay thế R

tạo nhiều acid amin khác nhau. hầu hết các penicillin đều được phân phối dưới dạng muối natri hoặc muối kali.

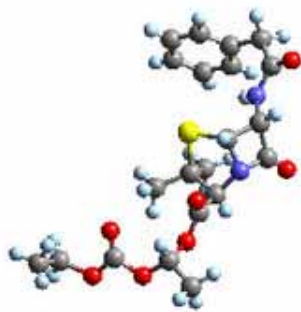


Hình 3. Cấu tạo chung của phân tử penicillin

Ngày nay trên thế giới đã sản xuất ra được trên 500 chế phẩm penicillin (trong đó chỉ lên men trực tiếp hai sản phẩm là penicillin V và penicillin G) và tiếp tục triển khai để sản xuất các chế phẩm penicillin bán tổng hợp khác.



Hình 2: Sản phẩm penicillin lên men tự nhiên nhờ P.chrysogenum



Cấu trúc không gian của Penicillin.

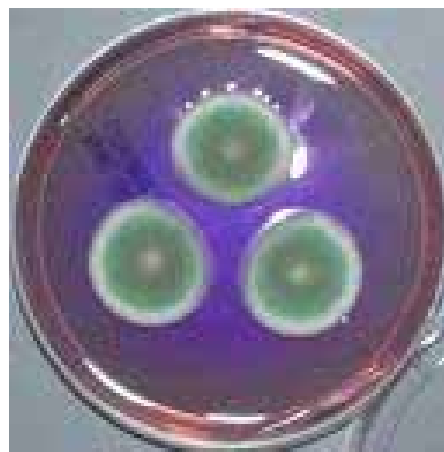
2.3 Những vi sinh vật sản sinh Penicillin và đặc điểm dinh dưỡng của chúng:

Những vi sinh vật sinh penicillin thuộc các giống nấm mốc penicillium và Aspergillus. Nhưng các chủng thuộc nhóm Penicillium notatum, Penicillium chrysogenum có hoạt lực cao và được dùng trong công nghiệp kháng sinh. Những chủng đầu tiên được nuôi cấy bằng phương pháp bề mặt trên cơ sở chất tự nhiên tạo thành 10-15đv/ml kháng sinh.

Penicillium chrysogenum trên môi trường Raistrick tạo thành hai kiểu khuẩn lạc:

✓ Kiểu 1: khuẩn lạc tròn trặn, các nếp nhăn rõ nét. Khuẩn ty khí sinh mọc tốt và có màu xanh, theo rìa khuẩn lạc có đường viền rộng 2-5 mm của những khuẩn ty bạc trắng không có bào tử, các khuẩn ty cơ chất màu nâu, chất màu không hòa vào môi trường.

✓ Kiểu 2: Khuẩn lạc có những khuẩn ty màu trắng phát triển yếu, khuẩn ty cơ chất cũng có màu nâu. Khuẩn lạc kiểu 1 cho hoạt lực cao, kiểu 2 thường xuyên cho hoạt tính kháng sinh thấp. Vì vậy cần phải tách những khuẩn lạc kiểu 1 trên môi trường này và thường xuyên kiểm tra để chọn những khuẩn lạc có hoạt lực cao, giữ được đặc tính của giống.



Các chủng penicillium nuôi cấy trên đĩa petri



các chủng *Penicillium* được nuôi cấy trên đĩa petri.

Những chủng *Penicillium* thường có hoạt lực cao lại kém ổn định. Đặc tính này đặt cho các nhà vi sinh vật một nhiệm vụ khó khăn: tạo được khả năng sinh kháng sinh cao nhất, giữ được ổn định trong quá trình nghiên cứu và sản xuất. Nhiệm vụ này có một ý nghĩa rất lớn trong công nghiệp, các giống được bảo vệ ở kệ, ở trạng thái đông khô có thể tới 3 năm, ở đất vô trùng là 2 năm. Ngày nay nhờ di truyền học đã tạo ra được những giống ổn định, ít nhất sau 6 thế hệ không làm giảm hoạt tính kháng sinh.

Penicillin thường biến đổi về hình thái và giảm khả năng sinh kháng sinh. Khi xảy ra biến đổi thì sẽ sinh ra hàng loạt những chủng mới từ giống cơ bản và nhiệm vụ của các nhà vi sinh vật lúc này là phải chọn lại những khuẩn lạc khỏe có nhiều ưu điểm, tiếp theo cần phải tiến hành những biện pháp bảo quản thích hợp.

Trong quá trình nuôi cấy chìm nấm *Penicillium chrysogenum* trải qua sáu giai đoạn phát triển:

1. **Giai đoạn I:** Các bào tử nấm mốc nảy mầm, phát triển thành chồi nhỏ, tế bào chất chưa phân hóa. thỉnh thoảng không bào có những hạt nhỏ bất màu đỏ trung tính.
2. **Giai đoạn II:** Khuẩn ty phát triển, tế bào chất ưa kiềm, những hạt nhỏ trong không bào dần dần biến mất. Ở cuối giai đoạn này xuất hiện những giọt chất béo nhỏ.
3. **Giai đoạn III:** Tạo thành những giọt chất béo to, không còn không bào, tế bào chất rất ưa kiềm.

4. **Giai đoạn IV:** Xuất hiện không bào với những hạt dễ bắt màu đỏ trung tính, những hạt chất béo nhỏ hơn ở giai đoạn III, tính ưa kiềm giảm.

5. **Giai đoạn V:** Khuẩn ty có hình tròn và có chứa những không bào, ở giữa có một hoặc một vài hạt lớn. Các hạt chất béo biến mất. Tính ưa kiềm tiếp tục giảm.

6. **Giai đoạn VI:** Khuẩn ty vẫn giữ được hình dạng hình tròn nhưng không còn những hạt bắt màu trung tính, các không bào bắt màu da cam hoặc màu hồng đồng đều. Các hạt chất béo không còn. Xuất hiện những tế bào riêng biệt bắt đầu tự phân.

Quá trình lên men penicillin cũng thuộc vào loại lên men hai pha: pha sinh trưởng (ứng với giai đoạn I, II, III) và pha sinh penicillin (các giai đoạn IV, V, VI).

Nguồn carbon trong lên men penicillin bằng nấm *penicillium chrysogenum* có thể là glucoza, sacaroza, lactoza, tinh bột, dextrin, các axit hữu cơ (lactic, axetic, formic), các axit amin...đường lactoza cho hiệu xuất penicillin cao nhất và thường được dùng trong công nghiệp. Nấm thường sử dụng lactoza chậm vì vậy, trong thực tế lactoza được dùng phối hợp cùng đường khác (glucoza, sacaroza...) trong môi trường dinh dưỡng.

Trong pha lên men thứ nhất giống phát triển mạnh, sử dụng glucoza và axit lactic của cao ngô. Sau đó lactoza mới được sử dụng (chủ yếu trong pha tạo penicillin). Khi trong môi trường cạn lactoza và không bổ sung các chất dinh dưỡng, hệ sợi nấm bắt đầu tự phân, nếu tiếp tục lên men nồng độ penicillin sẽ giảm, trong thực tế cần kết thúc trước thời điểm này.

Nguồn nitơ: có thể là những hợp chất hữu cơ (axit amin, pepton, protein) và vô cơ (amoniac, các muối amon và nitrat). Amoniac được nấm *penicillium chrysogenum* đồng hóa nhanh hơn cả. trong quá trình nuôi cấy $N-NH_3$ được tạo thành từ cao ngô do phản ứng khử amin các hợp chất nitơ. Nấm mốc sử dụng $N-NH_3$ trước tiên và nồng độ của chất này trong thời gian đầu tăng lên, vì tốc độ sinh trưởng, phát triển của nấm mốc và tiếp tục giảm cho đến khi hệ sợi của mốc tự phân. Tốc độ sử dụng amoniac phụ thuộc nguồn carbon trong môi trường. Trong trường hợp nguồn carbon là glucoza, sacaroza hoặc nguồn carbon dễ tiêu hóa khác,