

**ĐẠI HỌC QUỐC GIA TP HCM**  
**TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA**  
**KHOA CÔNG NGHỆ HÓA HỌC**



*Tiểu luận môn học*

# **Công nghệ lên men**

***Đề tài :Nghiên cứu quy trình sản xuất Penicillin***

GVHD : Cô Nguyễn Thúy Hương  
LỚP :HC07BSH  
SVTH :

## Phần II : Nội dung

### I. TỔNG QUAN VỀ 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.

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 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.

Thập kỷ 40 và 50 của thế kỷ XX đã ghi nhận những bước tiến vượt bậc của ngành công nghệ sản xuất kháng sinh non trẻ, với hàng loạt sự kiện như :

- Khám phá ra hàng loạt chất kháng sinh, thí dụ như Griseofulvin (1939), gramicidin S (1942), Streptomycin (1943), bacitracin (1945), cloramphenicol và polymycin (1947), clotetracyclin và Cephalosporin (1948), neomycin (1949), oxytetracyclin và nystatin (1950), erythromycin (1952), cycloserin (1954), amphotericin B và Vancomycin (1956), metronidazol, kanamycin và rifamycin (1957)...

- Áp dụng phối hợp các kỹ thuật tuyển chọn và tạo giống tiên tiến (đặc biệt là các kỹ thuật gây đột biến, kỹ thuật dung hợp tế bào, kỹ thuật tái tổ hợp gen ...) đã tạo ra những biến chủng công nghiệp có năng lực "siêu tổng hợp" các chất kháng sinh cao gấp hàng vạn lần các chủng ban đầu.

- Triển khai thành công công nghệ lên men chìm quy mô sản xuất công nghiệp để sản xuất *Penicillin G* (1942) và việc hoàn thiện công nghệ lên men này trên các sản phẩm khác.

-Việc phát hiện, tinh chế và sử dụng axit 6 - *aminopenicillanic* (6-APA, 1959) làm nguyên liệu để sản xuất các chất kháng sinh penicilin bán tổng hợp đã cho phép tạo ra hàng loạt dẫn xuất penicilin và một số kháng sinh  $\beta$  - lactam bán tổng hợp khác.

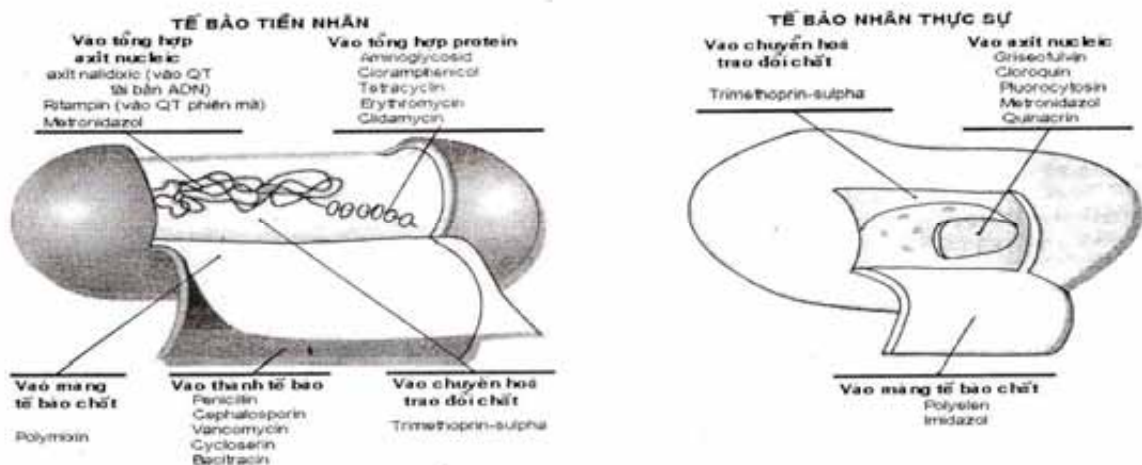
### 1. Khái niệm chất kháng sinh:

Kháng sinh là những chất có nguồn gốc vi sinh vật, bán tổng hợp hay tổng hợp. Với liều điều trị kháng sinh có tác dụng kìm hãm hoặc tiêu diệt vi sinh vật gây bệnh ngay ở nồng độ thấp. Một số kháng sinh có tác dụng ngăn cản sự phát triển của tế bào ung thư.

So với thuốc sát khuẩn, thuốc kháng sinh ít độc với cơ thể hơn vì kháng sinh có khả năng ức chế chọn lọc đối với một số khâu trong quá trình phát triển của vi khuẩn gây bệnh. Tuy nhiên kháng sinh không phải là chất vô hại đối với cơ thể, một số kháng sinh có thể gây độc với gan thận, hệ thống tạo máu hoặc gây rối loạn tiêu hóa....

### 2. 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)



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

### 3. 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*).

Đơn vị của kháng sinh được định nghĩa là lượng kháng sinh tối thiểu pha trong một thể tích quy ước dung dịch có khả năng ức chế hoàn toàn sự phát triển của chủng vi sinh vật kiểm định đã chọn ; thí dụ, với penicillin là số miligam penicillin pha vào trong 50 ml môi trường và sử dụng *Staphylococcus aureus* 209P làm chủng kiểm định .

### 4. Hoạt tính kháng sinh đặc hiệu:

Hoạt tính kháng sinh đặc hiệu là đặc tính cho thấy năng lực kìm hãm hay tiêu diệt một cách chọn lọc các chủng vi sinh gây bệnh, trong khi không gây ra các hiệu ứng phụ quá ngưỡng cho phép trên người bệnh được điều trị. Đặc tính này được biểu thị qua hai giá trị:

Nồng độ kìm hãm tối thiểu (*Minimun Inhibitory Concentration* - Viết tắt là MIC) và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (*Minimun Bactericidal Concentration* - Viết tắt là MBC), xác định trên các đối tượng vi sinh vật gây bệnh kiểm định lựa chọn tương ứng cho mỗi chất kháng sinh.

### 5. Hiện tượng kháng thuốc :

5.1 Hiện tượng kháng thuốc: Hiện tượng mầm bệnh vẫn còn sống sót sau khi đã điều trị kháng sinh được gọi là hiện tượng kháng thuốc (trên phương diện kiểm nghiệm, vi sinh vật gây bệnh được coi là kháng thuốc nếu nồng độ MIC của chất kháng sinh kiểm nghiệm in vitro trên đối tượng này cao hơn nồng độ điều trị tối đa cho phép đối với bệnh nhân.

5.2 Nguyên nhân hiện tượng kháng thuốc:

- Việc sử dụng cùng loại kháng sinh kéo dài hoặc lạm dụng thuốc kháng sinh (tùy tiện sử dụng thuốc không đúng liều lượng, không đúng chỉ định và không đủ thời gian cần thiết) đã vô tình tạo ra ưu thế phát triển cạnh tranh cho các chủng vi sinh vật có khả năng kháng thuốc .

- Xu thế sử dụng tùy tiện chất kháng sinh trong chăn nuôi, đặc biệt là bổ sung vào khi chế biến thức ăn gia súc, gia cầm nuôi lấy thịt, trứng, sữa ... Khi đó, ngoài các tác dụng có lợi dự kiến, chính chất kháng sinh bổ sung sẽ tạo ra môi trường phát triển chọn lọc cho các chủng mang yếu tố kháng thuốc R trên động vật nuôi. Khi sử dụng

thịt, trứng, sữa ... của chúng làm nguyên liệu chế biến, các chủng kháng thuốc này sẽ kéo theo vào trong các sản phẩm thực phẩm. Kết quả khi người tiêu dùng sử dụng các thực phẩm này, một mặt họ phải tiếp nhận phần dư lượng kháng sinh trong sản phẩm; nhưng mặt khác, nguy hiểm hơn là các loại vi sinh vật kháng thuốc trong các sản phẩm thực phẩm thuộc nhóm này có ưu thế tồn tại, phát triển cao hơn .

### 5.3 Cách khắc phục :

Khắc phục hiện tượng kháng thuốc của vi sinh vật gây bệnh: giải pháp trực quan và đơn giản là sử dụng các dạng kháng sinh mới. Tuy nhiên, việc tìm kiếm, phát hiện và sản xuất một kháng sinh mới là cả một khối lượng công việc khổng lồ, tiêu tốn rất nhiều thời gian, nhân lực và tiền bạc

Trước hết cần triệt để tôn trọng ba nguyên tắc sử dụng thuốc kháng sinh là:

- Chỉ định điều trị kháng sinh đúng (làm kháng sinh đồ để chọn đúng kháng sinh thích hợp để chỉ định điều trị; dùng thuốc đúng liều, đúng phác đồ, đủ thời gian điều trị; chú ý phát hiện sớm dấu hiệu kháng thuốc);
- Không lạm dụng kháng sinh khi chưa cần thiết (không lạm dụng "điều trị phòng ngừa" bằng thuốc kháng sinh, nghiêm cấm bệnh nhân tự chỉ định điều trị thuốc kháng sinh thay bác sĩ);
- Nghiêm cấm sử dụng tràn lan chất kháng sinh trong chăn nuôi và giám sát chặt chẽ việc sử dụng kháng sinh trong thú y.

## **II .CHẤT KHÁNG SINH PENICILLIN :**

### **1.Lịch sử phát hiện và sản xuất Penicillin :**

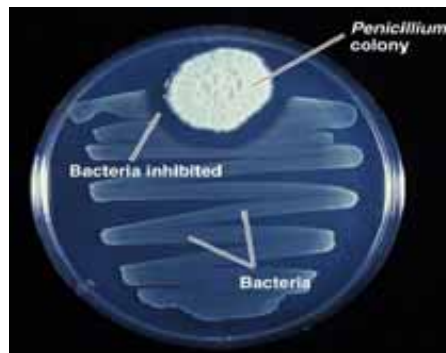
Người đầu tiên phát hiện ra kháng sinh là A. Fleming. Năm 1928, khi nghiên cứu các vi sinh vật gây bệnh , ông tình cờ phát hiện ra VSV gây bệnh bị tiêu diệt bởi một loại nấm sợi màu xanh xám , ông trích li dịch này nhỏ lên khuẩn lạc của các vi khuẩn gây bệnh, kết quả là VSV đó bị chết.

Nấm tạo nên chất tiêu diệt vi sinh vật đó là Penicillium. Chất do nấm tiết ra gọi là Penicillin. Một năm sau ông công bố kết quả nghiên cứu nhưng không được quan tâm đến.

Đến năm 1938, Howard Florey, Ernst Chain, Norman Heatley mới đưa Penicillin vào sản xuất thử. Vào năm 1940, Dorothy Hodgkin xác định được cấu trúc phân tử của Penicillin.

1942: Mary Hunt 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)....

Năm 1959, các nhà khoa học Anh và Mỹ 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. 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.

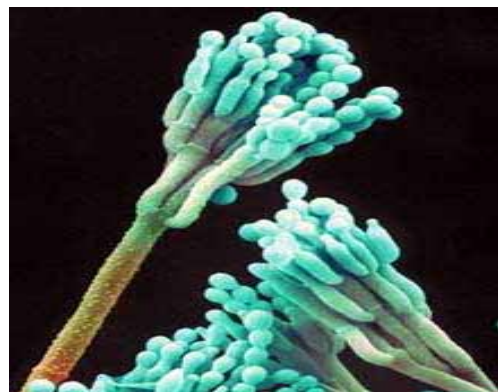


Tình hình sản xuất penicillin hiện nay trên thế giới :

Thuốc kháng sinh chiếm khoảng 30% thị phần dược phẩm thế giới. Các tập đoàn dược phẩm của Mỹ, Anh, Nhật Bản, Italia, Hà Lan, Ấn Độ...chiếm các vị trí hàng đầu trong lĩnh vực này. Ví dụ : Công ty DSM có trụ sở tại thành phố Delf (Hà Lan) sản lượng hàng năm 15000 tấn. Penicillin chiếm 30% sản lượng loại thuốc này trên thế giới

*-Lịch sử tuyển chọn chủng công nghiệp P. chrysogenum*

Vào những năm đầu, việc nghiên cứu sản xuất penicillin thường sử dụng các chủng có hoạt lực cao thuộc loài *P. notatum* và *P. baculatum*. Nhưng từ khi trường đại học Wisconsin (Mỹ) phân lập được chủng *P. chrysogenum* có hoạt tính cao hơn thì chủng này dần dần đã thay thế và từ khoảng



sau những năm 50 của thế kỷ XX đến nay tất cả các công ty sản xuất penicillin trên thế giới đều sử dụng các biến chủng *P.chrysogenum* công nghiệp.

Việc tuyển chọn chủng công nghiệp để lên men sản xuất penicillin trên nguyên tắc cũng trải qua sáu giai đoạn cơ bản, trong đó giải pháp kỹ thuật đã được áp dụng hiệu quả để thu nhận biến chủng "siêu tổng hợp" penicillin lại chính là các kỹ thuật gây đột biến thường như: xử lý tia Rơn - ghen, xử lý tia cực tím và tạo đột biến bằng hoá chất, thí dụ như Metylbis – amin(metyl -2- $\beta$ -clo- etylamin), N-mustar (tris -  $\beta$ -clo- etylamin), Sarcrolyzin,  $\text{HNO}_2$ , Dimetylsulfat, 1,2,3,4 -diepoxybutan.

### **3.Tính chất hóa lý của penicillin :**

*Tính chất vật lý:*

Các *penicillin* dưới dạng muối hoặc dạng acid là những bột trắng không mùi khi tinh khiết.

Phổ UV: đa số các nhóm R acyl hóa trên 6-APA đều là vòng thơm nên cho phổ hấp thụ ở vùng UV có thể ứng dụng được.

Phổ IR: ở vùng  $1600 - 1800 \text{ cm}^{-1}$  có các đỉnh đặc trưng các nhóm sau :

- Nhóm lactam ở giữa  $1760$  và  $1730 \text{ cm}^{-1}$ .
- Chức carboxyl ở khoảng giữa  $1600 \text{ cm}^{-1}$ .
- Nhóm chức amid ngoại vòng ở giữa  $1700$  và  $1650 \text{ cm}^{-1}$ .

Bình thường penicillin có trọng lượng phân tử của 313 đến 334 g / mol ( penicillin G). Penicillin với các nhóm phân tử đính kèm thêm có thể có một khối lượng phân tử khoảng 500 g / mol. Ví dụ, cloxacillin có khối lượng mol của 476 g / mol và dicloxacillin có khối lượng mol của 492 g / mol.

*Tính chất hóa học:*

Các penicillin có khả năng tạo muối natri và kali tan trong nước, trong khi đó các muối kim loại nặng ( ví dụ muối  $\text{Cu}^{2+}$ ) thì không tan hoặc kích thích sự phân hủy.

Các penicillin cũng có khả năng tạo muối với các amin:

- Tạo các penicillin thủy giải chậm ( tác động trễ) như procain penicillin ( tác động kéo dài từ 24 – 48h), benethamin penicillin ( tác động kéo dài từ 3 – 7 ngày), benzathin penicillin ( tác động kéo dài 2 – 4 tuần).
- Một số có tính base ví dụ các aminosid, các alkaloid khi trộn chung với penicillin trong cùng một ống tiêm sẽ gây ra kết tủa.
- Các penicillin cũng có khả năng tạo ra các este, sẽ là những tiền chất có khả năng phóng thích các kháng sinh này trong invivo.

Tính không bền của vòng beta lactam:

Sự phân hủy trong môi trường kiềm: ở pH = 8 sẽ có sự tấn công của ion  $\text{OH}^-$  trên carbonyl lactam gây ra sự mở vòng theo qui luật chung, cuối cùng sẽ có sự tạo thành acid penicilloic, nhưng sự decarboxyl có thể xảy ra tiếp theo để tạo acid peniloic.

Nếu trong môi trường có sự hiện diện của những muối kim loại nặng ( $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  hoặc  $\text{Hg}^{2+}$ ) sẽ làm cho acid peniciloic bị phân hủy thành carbinolamin không bền, chất này sẽ tiếp tục bị phân hủy tạo D-penicillamin và acid penaldic. Acid penaloic đến lượt nó có thể bị decarboxyl hóa để trở thành penicillo-aldehyd.

Sự alcol phân và amino phân: vòng beta lactam nhạy với một số tác nhân ái nhân khác với xúc tác của các ion kim loại nặng:  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Sn}^{2+}$ .

Sự phân hủy trong môi trường acid: dưới sự hiện diện của ion  $\text{H}^+$ , sự tấn công ái điện tử trên nguyên tử S, kích thích sự mở vòng lactam và vòng thiazolidin, tiếp theo là sự tái sắp xếp để tạo thành cấu trúc oxazolic của acid penicillenic. Cuối cùng, nếu môi trường quá acid có thể tạo thành acid penillic.

Ngoài ra vòng lactam có thể bị mở bởi lactamase tiết ra từ vi khuẩn.

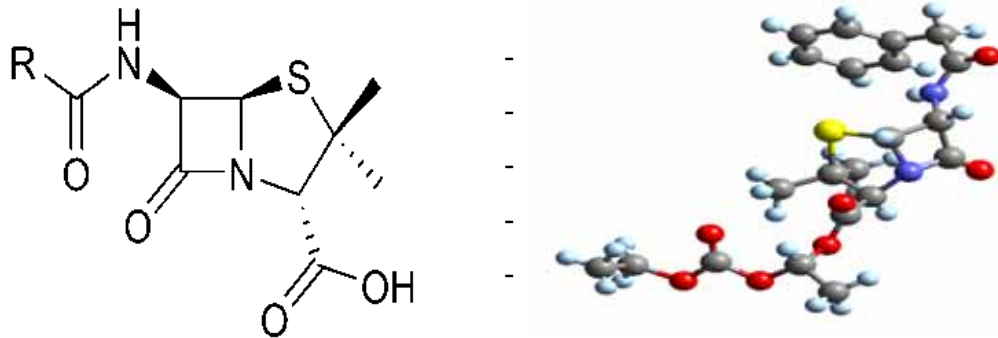
## 2. Phân loại Penixillin :

- Đặc điểm chung :

Penixillin là dẫn xuất của 6-aminopenixilamic gồm 1 vòng thiazolidin và một vòng beta-lactam.



-Công thức chung của penixillin :



- Khi thay thế H bằng kim loại kiềm hoặc kiềm thổ sẽ được các penixillin dễ tan trong nước (như Na, K, Ca ...)
- Vòng beta-lactam là yếu tố quyết định hoạt tính của kháng sinh
- Khi thay thế R bằng các gốc khác nhau sẽ được các penixillin có tác dụng khác nhau

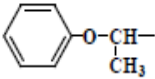
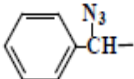
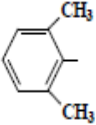
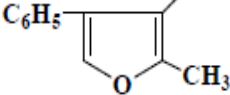
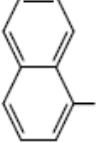
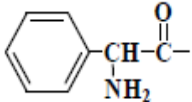
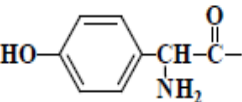
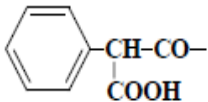
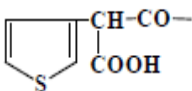
Dựa vào nguồn gốc có thể sắp xếp penixillin vào 3 nhóm :

-Penixillin nhóm I :gồm các penixillin tự nhiên được chiết xuất từ môi trường nuôi cấy nấm penicillium notatum hoặc P chrysogenum như penixillin G hoặc penixillin V  
Các penixillin được hấp thu nhanh và thải trừ ra khỏi cơ thể nhanh nên thời gian tác dụng ngắn. Muốn kéo dài tác dụng phải dùng các dẫn xuất của chúng như procain benzyl penixillin (kéo dài trong 24 h) hoặc benzathin benzyl penixillin ( kéo dài trong 4 tuần )

Các penixillin chậm chỉ dùng để tiêm bắp không được tiêm tĩnh mạch

-Penixillin nhóm II : Gồm các dẫn xuất của các penixillin bán tổng hợp có phổ kháng khuẩn hẹp hơn Penixillin G nhưng có khả năng kháng penicillinase dùng để chữa bệnh nhiễm khuẩn do tụ cầu kháng penixillin nhóm I như methycylin, cloxacilin

- Penixilin nhóm III : Gồm các penixillin bán tổng hợp phổ rộng, không kháng được penicillinase nhưng kháng được các vi khuẩn Gram(-) mà các penixillin nhóm II ít tác dụng bền vững trong môi trường dịch vị nên có thể dùng để uống như ampixillin, amoxycilin.

	R	Tên kháng sinh	Phổ kháng khuẩn
		Phenethicillin	Phổ kháng khuẩn hẹp, chủ yếu chống lại các vi khuẩn Gram (+) và bị phân huỷ bởi betalactamase
		Azidocillin	
		Methicillin	Phổ kháng khuẩn hẹp, chống lại được các vi khuẩn sinh betalactamase
		Oxacillin	Ức chế sự phát triển vi khuẩn Gram (+), đặc biệt trên tụ cầu <i>Staphylococcus</i> sinh penicillinase
		Nafcillin	
		Ampicillin	Phổ rộng, chống lại được các tụ cầu kháng penicillin G
		Amoxicillin	Bền trong môi trường acid, phổ rộng hơn ampicillin, có hoạt tính trên phần lớn vi khuẩn Gram (+) và Gram (-) nhưng vẫn chịu tác dụng của betalactamase
		Carbenicillin	Tác dụng chủ yếu trên vi khuẩn hiếu khí Gram (-)
		Ticarcillin	Tác dụng chủ yếu trên vi khuẩn hiếu khí Gram (-), hoạt tính mạnh gấp 2 – 4 lần carbenicillin

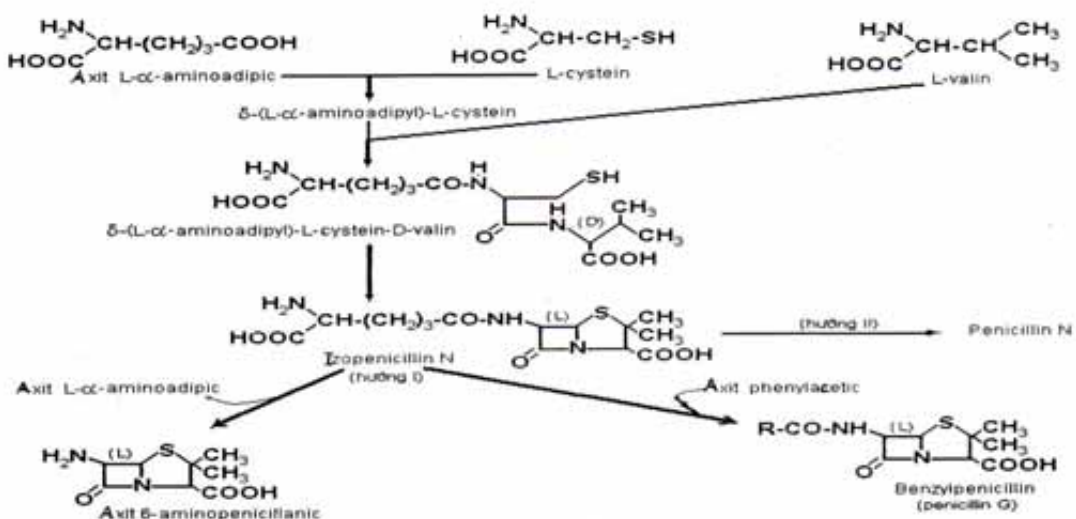
#### 4. Cơ chế sinh tổng hợp penicillin ở nấm mốc *P. chrysogenum* :

Nhìn chung, có tổng cộng ba bước quan trọng trong quá trình sinh tổng hợp penicillin G (benzylpenicillin)

Bước đầu tiên trong sinh tổng hợp của penicillin G là ngưng tụ của ba axit amin L- $\alpha$ -aminoadipic acid, L-cysteine, L-valine thành một tripeptide. Trước khi ngưng tụ thành một tripeptide, các amino acid L-valine sẽ trải qua quá trình epimerization và trở thành D-valine. Sau quá trình ngưng tụ, được đặt tên tripeptide  $\delta$ -(L- $\alpha$ -aminoadipyl)-L-cysteine-D-valine (viết tắt là ACV). Trong quá trình phản ứng cần 1 enzyme xúc tác là ACVs enzyme. ACVs enzyme này cần thiết cho việc kích hoạt của ba axit amin trước khi ngưng tụ và epimerization của biến đổi L-valine thành valine-D.

Bước thứ hai trong sinh tổng hợp của penicillin G là sử dụng một loại enzyme để thay đổi ACV thành isopenicillin N. Các enzyme là synthase N isopenicillin với gen pcbC kèm theo. Các tripeptide trên ACV sẽ trải qua quá trình oxy hóa, sau đó khép vòng. Isopenicillin N là một trung gian rất yếu bởi vì nó không hiển thị nhiều hoạt động kháng sinh.

Bước cuối cùng trong sinh tổng hợp của penicillin G là trao đổi các nhóm bên chuỗi để isopenicillin N sẽ trở thành penicillin G. Thông qua các coenzyme xúc tác isopenicillin N acyltransferase (IAT), phía alpha-aminoadipyl-chuỗi isopenicillin N được lấy ra và trao đổi cho một chuỗi phenylacetyl-side. Phản ứng này được mã hoá bởi các penDE gen. xem sơ đồ tổng hợp penicillin G trong hình 3.



Hình 3. Cơ chế sinh tổng hợp penicillin từ axit L- $\alpha$ -aminoadipic, L-cystein và L-valin

## 5. Tác động của các thông số công nghệ đến quá trình sinh tổng hợp penicillin.

### 5.1. Sự phát triển hệ sợi và đặc điểm hình thái hệ sợi nấm:

*Sự phát triển hệ sợi nấm* trong quá trình lên men bao gồm:

- *Sự tăng trưởng về kích thước hệ sợi* (tăng độ dài sợi, sự lớn lên về kích thước, mức độ phân nhánh của hệ sợi ... )

- *Sự biến thiên về số lượng khóm sợi nấm trong môi trường*: Thông thường, sự phát triển này được đánh giá qua hai chỉ tiêu là: hàm lượng sinh khối và tốc độ biến thiên hàm lượng sinh khối trong môi trường. Hai chỉ tiêu này có thể xác định bằng nhiều phương pháp khác nhau như: hàm lượng sinh khối (Sinh khối tươi hoặc sinh khối khô), mật độ quang dịch lên men, trở lực lọc của dịch lên men, hàm lượng nitơ, hàm lượng hydratecarbon, hàm lượng axit nucleic ... Trong các phương pháp trên, được áp dụng phổ biến hơn cả trong sản xuất công nghiệp là phương pháp xác định qua hàm lượng sinh khối.

Tốc độ phát triển hệ sợi nấm phụ thuộc hàng loạt các yếu tố khác nhau trong quá trình lên men và sự tích tụ penicillin thường xảy ra mạnh mẽ khi hệ sợi phát triển đạt trạng thái cân bằng. Trạng thái này có thể xác lập được khi chỉ cung cấp vừa đủ và liên tục lượng thức ăn tối thiểu cho nấm mốc. Thiếu thức ăn, hệ sợi nấm sẽ tự phân, còn nếu cung cấp quá nhu cầu trên, hệ sợi sẽ phát triển, nhưng không tích tụ mạnh penicillin mà tích tụ nhiều axit gluconic và axit malic.

-*Đặc điểm hình thái và cấu trúc hệ sợi nấm*: Trong quá trình lên men, do nhiều nguyên nhân khác nhau, số lượng khóm sợi nấm bao giờ cũng có xu hướng tăng lên, ngay cả trong quá trình lên men tĩnh. Trong điều kiện lên men có sục khí và khuấy trộn, do tác dụng va đập cơ học với cánh khuấy và các chuyển động dòng xoáy trong môi trường, một mặt sự đứt gãy hệ sợi nấm xảy ra nhiều hơn và hệ sợi nấm bao giờ cũng có xu hướng vón cuộn lại thành cấu trúc búi sợi cuộn xoắn, được gọi là pellet.

♦ *Pellet xốp (fluffy loose pellets)* là dạng pellet có phần bên trong hệ sợi cuộn thành khối chắc và mịn, lớp sợi phía bên ngoài cuộn lỏng lẻo tạo thành cấu trúc xốp hơn.

♦ *Pellet chắc và mịn (compact smooth pellets)* có đặc điểm là phần sợi phía bên trong pellet cuộn tương đối chặt chẽ ra đến gần sát lớp sợi phía ngoài, lớp sợi phía ngoài cũng cũng cuộn đủ chắc thành lớp sợi mịn.

♦ *Pellet rỗng (hollow pellets)* là dạng pellet có phần sợi bên trong bị tự phân tạo thành khoảng rỗng, hệ sợi phía bên ngoài cuộn rất chặt thành lớp sợi mịn và chắc chắn.

- Hiệu quả chung của quá trình lên men có quan hệ hữu cơ với số lượng, kích thước và cấu trúc pellet nấm. Trong thực tiễn sản xuất công nghiệp, người ta thường điều

chỉnh các thông số công nghệ theo hướng ưu tiên tạo ra dạng pellet đủ nhỏ và mịn, hạn chế tạo pellet xốp và ngăn ngừa hình thành các pellet rỗng. Điều kiện công nghệ tương ứng với mục tiêu trên thường áp dụng là : tỉ lệ cây giống 10%, với mật độ dịch giống

$(2-10).10^{11}$  bào tử / $m^3$ ; phối hợp điều chỉnh giữa sục khí và khuấy trộn để đảm bảo cung cấp oxy hòa tan dư so với nhu cầu tương ứng với thời điểm lên men, và để tạo ra pellet mịn và nhỏ (kích thước pellet thích hợp nhất khoảng 0,2 - 0,5mm), trong điều kiện đã cân đối với nhu cầu tiết kiệm mức tiêu tốn năng lượng do khuấy trộn.

### *5.2. Đặc tính nhiệt động của dịch lên men:*

Trong các thiết bị lên men dung tích lớn có sục khí và khuấy trộn, thực tế không thể xác lập được sự đồng đều tại khắp các vùng thể tích làm việc của thiết bị. Tại các vùng chảy rối (vùng gần cánh khuấy), tốc độ trao đổi nhiệt, tốc độ chuyển khối xảy ra mạnh mẽ hơn. Còn tại các vùng chảy màng (vùng sát thành thiết bị, vùng gần các ống xoắn trao đổi nhiệt, vùng kém hiệu quả hay vùng chết của thiết bị...) tốc độ chuyển khối hay tốc độ truyền nhiệt cũng giảm đi. Ngoài ra, tại những khu vực nhất định của thiết bị có thể xuất hiện vùng xoáy cục bộ hay các dòng chảy thứ cấp làm thiếu hụt về hàm lượng oxy hòa tan.

Các yếu tố nêu trên đây sẽ tác động trực tiếp đến năng lực sinh tổng hợp của chủng, hiệu quả chuyển hóa tạo sản phẩm và hiệu quả kinh tế chung của toàn quá trình lên men. Thực tế thường chọn chế độ khuấy trộn dư trên mức yêu cầu.

### *5.3. Thành phần môi trường lên men:*

Môi trường cơ sở để lên men penicillin, vào thời kỳ đầu trong những năm 40 - 50, là môi trường lactoza - nước chiết ngô

Nguồn cơ chất chính: là lactoza có thể được thay thế từng phần hoặc toàn bộ bằng các cơ chất khác như: các loại đường hexoza, đường pentoza, disaccarit, dextrin hay thay thế bằng dầu thực vật. Trong các cơ chất nêu trên, hiệu quả cao hơn cả vẫn là glucoza.

Ngoài ra, khi sử dụng dầu thực vật làm chất phá bọt phải xét đến hiệu ứng nấm mốc sử dụng một phần dầu thực vật làm nguồn cung cấp thức ăn cacbon, để tính toán điều chỉnh nồng độ glucoza trong môi trường lên men (và cả sự cản trở quá trình chuyển khối do ảnh hưởng của dầu phá bọt).

Nguồn cung cấp thức ăn nitơ: có thể sử dụng là bột đậu tương, bột hạt bông, các loại dầu cá. Nhu cầu về thức ăn nitơ cũng có thể được đáp ứng bằng cách cung cấp liên tục  $(NH_4)_2SO_4$ , nhưng duy trì ở nồng độ thấp, khoảng 250 - 340g/l (nếu dư thừa hiệu quả sinh tổng hợp penicillin sẽ giảm, nếu thiếu sẽ xảy ra hiện tượng tự phân hệ sợi) .

Hàm lượng các chất khoáng bổ sung: được tính toán, phụ thuộc vào lượng dịch chiết ngô sử dụng; pH môi trường được điều chỉnh trước khi thanh trùng, sau đó trong suốt quá trình lên men được giám sát chặt chẽ và điều chỉnh theo yêu cầu công nghệ.

Nồng độ tiền chất tạo nhánh: Trong quá trình sinh tổng hợp penicillin, việc kết gắn mạch nhánh của phân tử penicillin không mang tính đặc hiệu chặt chẽ. Nhờ vậy, nếu duy trì nồng độ tiền chất tạo nhánh cần thiết phenylacetat (hoặc phenooxyacetat) sẽ cho phép thu nhận chủ yếu một loại penicillin G trong dịch lên men (hoặc penicillin V). Theo lý thuyết, nhu cầu về phenylaceta là 0,47g/gam penicillin G (hoặc phenooxyacetat là 0,50g/gam penicillin V). Cần chú ý cả hai cấu tử trên thực chất đều gây độc cho nấm nên người ta thường lựa chọn giải pháp bổ sung liên tục cấu tử này và khống chế chặt chẽ nồng độ theo yêu cầu, để không làm suy giảm năng lực lên men của chủng sản xuất.

#### *5.4. Điều kiện tiến hành lên men:*

*Nhiệt độ* là thông số có ảnh hưởng lớn đến sự phát triển của nấm mốc, khả năng sinh tổng hợp và năng lực tích tụ penicillin của chúng. Nhìn chung nấm mốc phát triển thuận lợi hơn ở dải nhiệt độ khoảng 30°C. Tuy nhiên, ở dải nhiệt độ này tốc độ phân huỷ penicillin cũng xảy ra mạnh mẽ. Trong thực tế, ở giai đoạn nhân giống sản xuất người ta thường nhân ở dải nhiệt độ 30°C; sang giai đoạn lên men thường áp dụng một trong hai chế độ nhiệt là :

- ♦ Lên men ở một dải nhiệt độ: Thường duy trì nhiệt độ trong suốt quá trình lên men ở dải nhiệt độ 25 - 27°C.
- ♦ Lên men ở hai chế độ nhiệt độ: Giai đoạn lên men bắt đầu tiến hành ở 30°C cho đến khi hệ sợi phát triển đạt yêu cầu về hàm lượng sinh khối thì điều chỉnh nhiệt độ sang chế độ lên men penicillin ở dải nhiệt độ 22 - 25°C (có công nghệ điều chỉnh xuống 22 - 23°C, giữ ở nhiệt độ này tiếp hai ngày rồi chuyển sang lên men tiếp ở 25°C cho đến khi kết thúc quá trình lên men).

*pH môi trường* thuận lợi cho sự phát triển hệ sợi và cho quá trình sinh tổng hợp penicillin thường dao động trong khoảng pH = 6,8 - 7,4. Tuy nhiên ở điều kiện pH cao xu hướng phân huỷ penicillin cũng tăng lên. Vì vậy, trong sản xuất pH môi trường thường được khống chế chặt chẽ ở giá trị lựa chọn trong khoảng pH = 6,2 - 6,8.

*Nồng độ oxy hoà tan và cường độ khuấy trộn dịch lên men:* Với nhiều chủng nấm mốc, nồng độ oxy hòa tan thuận lợi cho quá trình sinh tổng hợp penicillin dao động quanh mức 30% nồng độ oxy bão hòa.

*Nồng độ CO<sub>2</sub> trong dịch lên men* ở mức nhất định cũng cần thiết cho quá trình nảy mầm của bào tử nấm mốc; tuy nhiên nếu nồng độ CO<sub>2</sub> quá cao sẽ làm cản trở quá

trình hấp thu và chuyển hoá cơ chất của chúng, nghĩa là làm cản trở quá trình sinh tổng hợp penicillin.

#### 5.5. Sự tích tụ và phân huỷ penicillin:

Trong quá trình lên men, do nhiều nguyên nhân khác nhau, trong đó có ảnh hưởng của nồng độ penicillin tích tụ trong môi trường ngày càng tăng, làm cho năng lực sinh tổng hợp penicillin của chúng có xu hướng giảm dần theo thời gian lên men. Đồng thời, phụ thuộc vào nhiệt và pH môi trường, một phần lượng penicillin đã tích tụ cũng bị phân huỷ theo thời gian.

Nhằm giảm tổn thất trên, ngay sau khi kết thúc quá trình lên men cần xử lý thu sản phẩm sớm hoặc có giải pháp hạ thấp nhanh nhiệt độ dịch lên men.

### III .QUY TRÌNH LEN MEN SẢN XUẤT PENIXILLN TRONG CÔNG NGHIỆP :

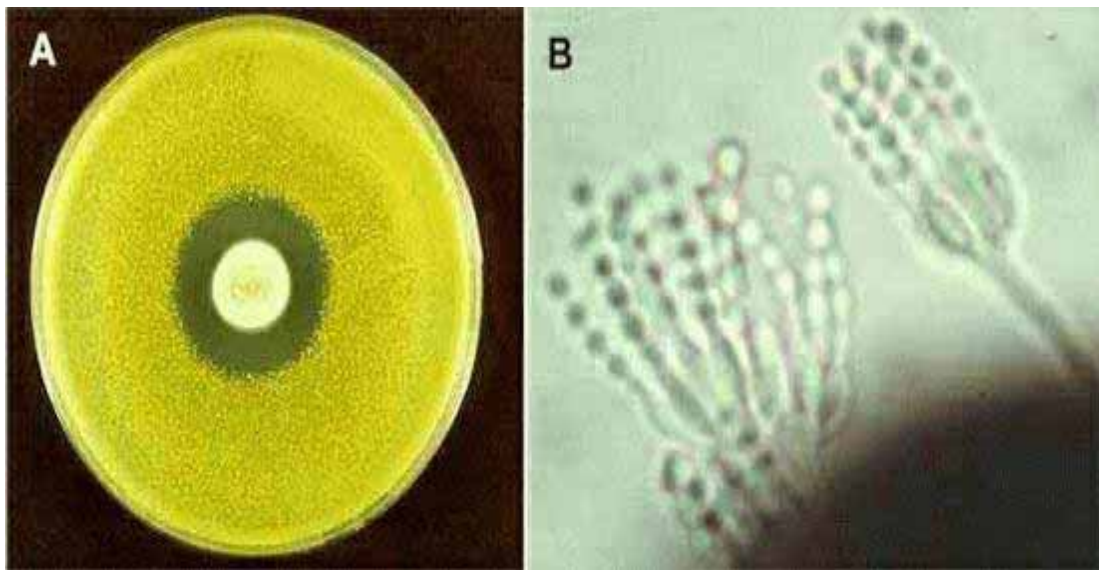
#### 1. Đặc điểm chung:

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 10-15 đv/ml kháng sinh.

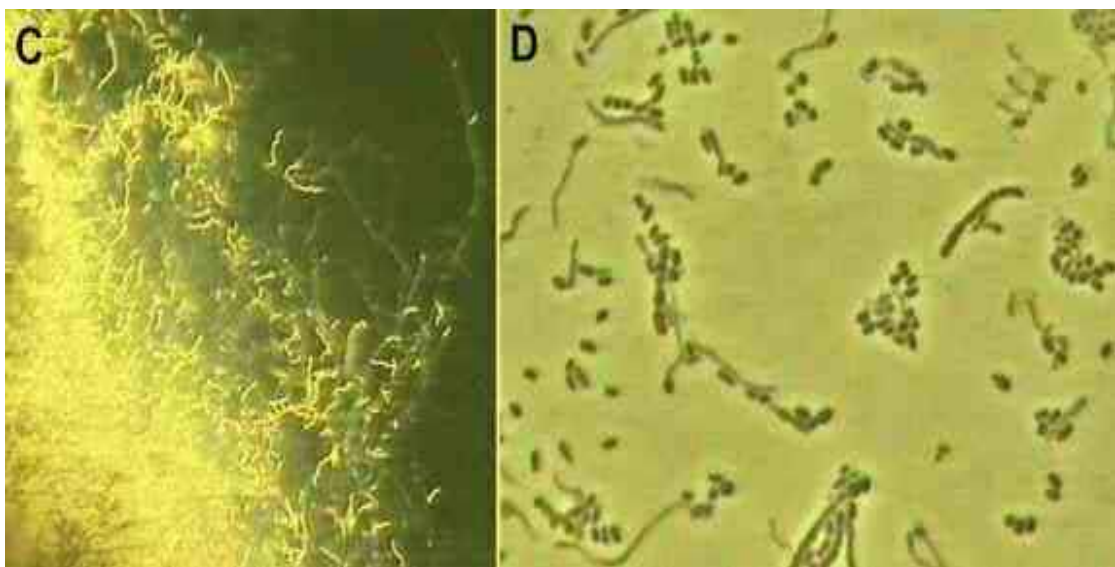
Penicillium chrysogenum trên môi trường Raistrick tạo thành hai kiểu khuẩn lạc:

-Kiểu I: 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 hoà vào môi trường.

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



*Chủng penicillium được nuôi cấy trên đĩa petri*



*Các chủng penicillium ở các giai đoạn phát triển khác nhau*

Những chủng *Penicillium* thường có hoạt lực cao lại kém ổn định. Đặc tính này đặt cho những 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 này bảo vệ ở kệ, ở trạng thái đông khô có thể tới ba năm, ở đất vô trùng là hai



năm. Ngày nay nhờ di truyền học đã tạo được những giống ổn định, ít nhất sau sáu thế hệ không giảm hoạt tính kháng sinh.

Chúng ta cần phải nhận thức rằng các nấm penicillium thường dễ 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 khoẻ 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:

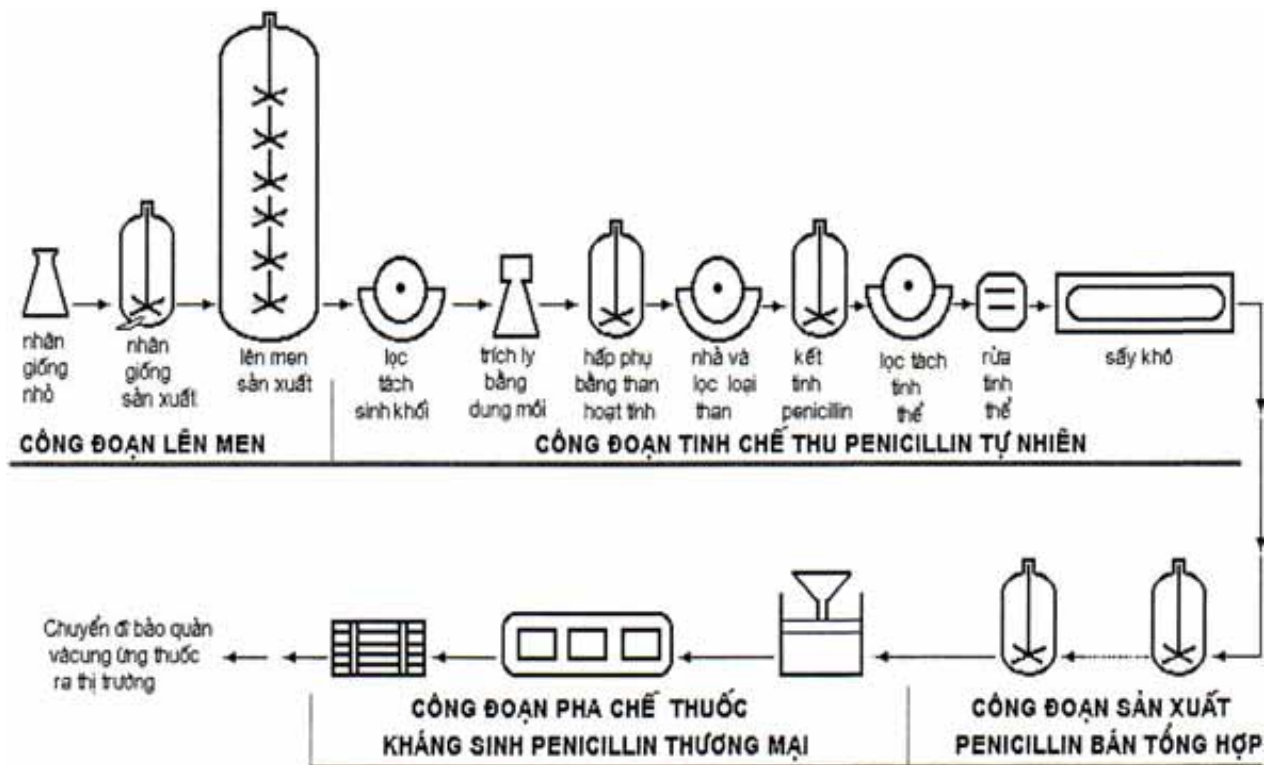
- Giai đoạn I: Các bào tử nấm mốc nảy mầm, phát triển thành chồi nhỏ, tế bào chất chưa phân hóa. Thanh thoát không bào có những hạt nhỏ bất màu trung tính.
- Giai đoạn II: Khuẩn ty phát triển, tế bào chất ưa kiềm, những hạt nhỏ trong không bào dần dần biến mất. cuối giai đoạn này xuất hiện những giọt chất béo nhỏ.
- Giai đoạn III: Tạo thành những giọt chất béo to, không còn không bào, tế bào chất rất ưa kiềm.
- 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
- Giai đoạn V: Khuẩn ty có hình trống và có những không bào, ở giữa hoặc vài hạt lớn. Các hạt chất béo biến mất, tính ưa kiềm giảm
- Giai đoạn VI: Khuẩn ty vẫn có dạng hình trống nhưng không còn những hạt bắt màu trung tính, 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 loại lên men 2 pha: Pha sinh trưởng ứng với giai đoạn I,II,III. Pha sinh penicillin ứng với giai đoạn IV,V,VI

Công nghệ lên men sản xuất penicillin mang nét đặc thù riêng của từng cơ sở sản xuất và các thông tin này rất hạn chế cung cấp công khai, ngay mỗi bằng sáng chế thường cũng chỉ giới hạn ở những công đoạn nhất định; vì vậy rất khó đưa ra được công nghệ tổng quát chung. Theo công nghệ lên men của hãng Gist-Brocades (Hà Lan), toàn bộ

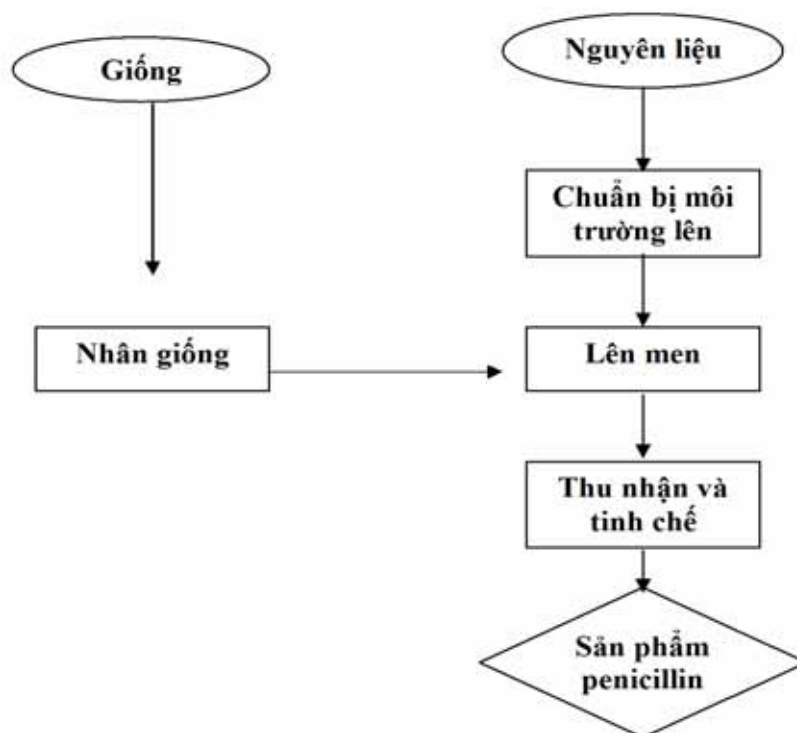
dây chuyền sản xuất thuốc kháng sinh penicillin có thể phân chia làm bốn công đoạn chính như sau (xem sơ đồ hình 4)

- ♦ Lên men sản xuất penicillin tự nhiên (thường thu penicillin V hoặc penicillin G) .
- ♦ Xử lý dịch lên men tinh chế thu bán thành phẩm penicillin tự nhiên.
- ♦ Sản xuất các penicillin bán tổng hợp (từ nguyên liệu penicillin tự nhiên)
- ♦ Pha chế các loại thuốc kháng sinh penicillin thương mại.



Hình 4. Sơ đồ dây chuyền sản xuất penicillin  
(theo Gist-Brocades Copr. (Hà Lan))

- Sơ đồ khối :

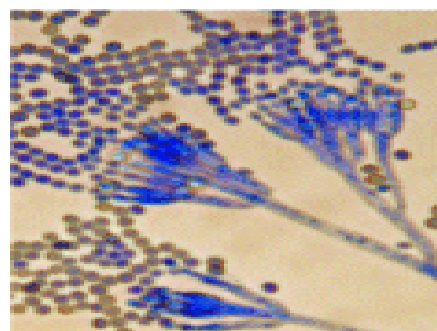
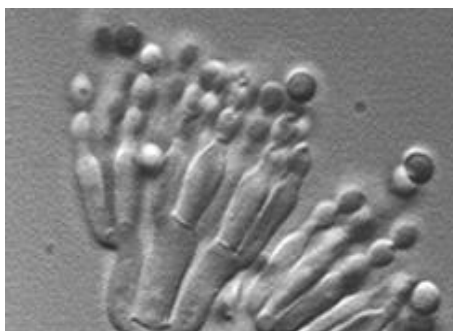


### Chuẩn bị lên men :

*Giống, bảo quản và nhân giống cho sản xuất:*

Giống dùng để lên men penicillin là *P.chrysogenum*, đây là loại nấm sợi bào tử hở.

Khi mới phát hiện trong môi trường đặc, chúng tạo ra hai loại khuẩn ty: khuẩn ty khí sinh và khuẩn ty dinh dưỡng màu trắng. Sau khi nuôi cấy 1 ngày, khuẩn ty bắt đầu chuyển sang màu xanh xám và đỉnh bào tử bắt đầu xuất hiện. Thời gian này bắt đầu xuất hiện 1 ít bào tử trần từ tiền bào tử nằm trong các đỉnh bào tử. Các bào tử lần lượt được tạo thành theo thời gian nuôi cấy và cuối cùng thì màu của nấm penicillium sẫm hơn



-Giống công nghiệp *P.chrysogenum* được bảo quản lâu dài ở dạng đông khô, bảo quản siêu lạnh ở  $-70^{\circ}\text{C}$  hoặc bảo quản trong nơ lỏng. Giống từ môi trường bảo quản được

cấy chuyển ra trên môi trường thạch hộp để hoạt hoá và nuôi thu bào tử. Dịch huyền phù bào tử thu từ hộp petri được cấy chuyển tiếp sang môi trường bình tam giác, rồi sang thiết bị phân giống nhỏ, qua thiết bị nhân giống trung gian ... và cuối cùng là trên thiết bị nhân giống sản xuất. Yêu cầu quan trọng của của công đoạn nhân giống là phải đảm bảo cung cấp đủ lượng giống cần thiết, với hoạt lực cao, chất lượng đảm bảo đúng thời điểm hco các công đoạn nhân giống kế tiếp và cuối cùng là cung cấp đủ lượng giống đạt các yêu cầu kỹ thuật cho lên men sản xuất. Trong thực tiễn, để đảm bảo cho quá trình lên men thuận lợi người ta thường tính toán lượng giống cấp sao cho mật độ giống trong dịch lên men ban đầu khoảng  $1 - 5 \cdot 10^9$  bào tử /  $m^3$ .

Thành phần môi trường nhân giống cần được tính toán để đảm bảo cung cấp đủ nguồn thức ăn C, N, các chất khoáng và các thành phần khác, đảm bảo cho sự hình thành và phát triển thuận lợi của pellet.

Chuẩn bị môi trường lên men và thiết bị:

- Chuẩn bị môi trường lên men:

- . Cân đong, pha chế riêng rẽ các thành phần môi trường lên men trong các thùng chứa phù hợp

- . Thanh trùng gián đoạn ở  $121^0C$  ( hay thanh trùng liên tục ở khoảng  $140-146^0C$ ) hoặc lọc qua các vật liệu siêu lọc rồi mới bơm vào thùng lên men.

Nếu đặc tính công nghệ của thiết bị lên men cho phép, có thể pha chế rồi thanh trùng đồng thời dịch lên men trong cùng một thiết bị. Tất cả các cấu tử bổ sung vào môi trường lên men đều phải được xử lý khử khuẩn trước và sau đó bổ sung theo chế độ vận hành vô khuẩn.

Thiết bị lên men: Phải được vô khuẩn trước khi đưa vào sử dụng. Thường thanh trùng bằng hơi quá nhiệt 2,5 – 3,0 at trong thời gian 3 giờ. Đồng thời khử khuẩn nghiêm ngặt tất cả các hệ thống ống dẫn, khớp nối, van, phin lọc và tất cả các thiết bị phụ trợ khác....Trong quá trình lên men luôn cố gắng duy trì áp suất dư trong thiết bị nhằm hạn chế rủi ro do nhiễm tạp.

Không khí thường được khử khuẩn sơ bộ bằng nén đoạn nhiệt, sau đó qua màng lọc vô khuẩn hay màng siêu lọc .

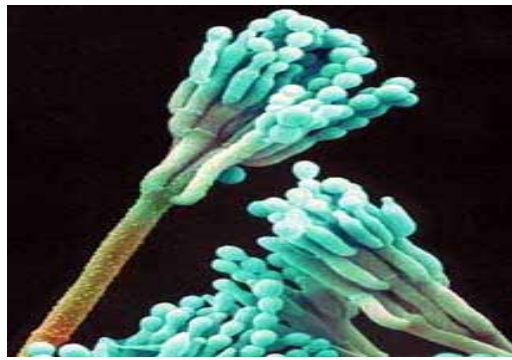
### **3. Kỹ thuật lên men:**

#### *3.1. Kỹ thuật lên men bề mặt:*

Trong những năm 30 đến những năm 50 của thế kỷ XX, phương pháp nuôi cấy bề mặt được áp dụng rộng rãi để sản xuất kháng sinh từ nấm

penicillin chrysogenum... ngày nay kĩ thuật lên men bề mặt được thay thế bằng kĩ thuật lên men chìm

**a) Giống *Penicillin chrysogenum*:** là nấm sợi đơn bào hữu. Khi mới phát triển trong môi trường đặt thì tạo ra 2 khuẩn ty: khuẩn ty khí sinh và khuẩn ty dinh dưỡng màu trắng. Sau 1 ngày nuôi cấy, các khuẩn ty chuyển sang màu xanh sẫm và đính bào tử bắt đầu xuất hiện. Thời gian này cũng xuất hiện một ít bào tử trần từ tiền bào tử nằm trong các đính bào tử. Các bào tử lần lượt tạo thành theo thời gian nuôi cấy và cuối cùng nấm penicillin có màu sẫm hơn.



*Nấm sợi penicillium chrysogenum.*

*Nấm penicillin:* thuộc họ hiếu khí bắt buộc, do đó trong quá trình nuôi phải cung cấp khí liên tục. Phương pháp bảo quản được dùng nhiều nhất là phương pháp cấy truyền định kì trên thạch hàng tháng kết hợp với bảo quản lạnh, phương pháp bảo quản bằng hạt ngũ cốc bảo quản theo phương pháp đông khô cũng được sử dụng.

**b) Nguyên liệu:** Cám và hạt ngũ cốc các loại, nguyên liệu được bổ sung nước sao cho độ ẩm đạt 55-60%W và được hấp thanh trùng ở 121°C trong 30-45 phút. Ngay sau khi kết thúc thanh trùng, chúng được tải vào những khay hình chữ nhật có kích thước dài 1-1.2 m, rộng 0.6-0.8 m, cao 5-6 cm. Lớp môi trường cho vào đáy dày 2-3 cm để đảm bảo độ thoáng khí trên toàn bộ bề mặt và mặt dưới của môi trường. Một số cơ sở dùng nguyên liệu là các hạt ngũ cốc thì lớp môi trường dày hơn (3-4 cm) do các hạt ngũ cốc tạo ra môi trường có độ thoáng khí hơn.

Trong trường hợp cám quá mịn thì phải trộn thêm trấu xay nhỏ (thêm khoảng 20-25%) hoặc cùi bắp xay nhỏ trước khi thanh trùng.

Để làm môi trường nhân giống, người ta cũng làm như trên. Chỉ có một điểm khác là sau khi làm ẩm môi trường đến độ ẩm nhất định, người ta phân phối chúng vào các dụng cụ thủy tinh (chai thủy tinh hay bình tam giác) với khối lượng bằng 1/5 hay 1/6 dung tích của dụng cụ, đậy kín bằng nút bông và thanh trùng ở 121°C(0.5 at) trong 30 phút rồi để nguội mới cấy giống.

**c) Quá trình nhân giống:** bắt đầu từ giống có trong ống nghiệm. Trong các nhà máy, mỗi lần cấy truyền giống, người ta thường cấy làm 3 ống. Một ống dùng để kiểm tra trước khi sản xuất, một dùng để sản xuất và một dùng để bảo quản.

Song song đó, người ta chuẩn bị một bình tam giác dung tích 200-250ml và chuẩn bị 50g môi trường. Môi trường được thanh trùng và làm nguội đến 30°C.

Đổ 10ml đã thanh trùng và làm nguội vào ống giống, dùng que thủy tinh đánh cho bào tử hòa trộn vào nước. Bằng biện pháp vô trùng (thực hiện trong các tủ cấy vô trùng) chuyển toàn bộ vào bình tam giác trên, lắc cho thật đều rồi chuyển chúng sang tủ ấm 30-37°C. Nuôi ở điều kiện này cho đến khi bào tử nấm xuất hiện và phát triển đều khắp môi trường.

Ta gọi quá trình thực hiện như trên là quá trình nhân giống cấp 1. Cứ tiếp tục thực hiện ta có giống cấp 2, cấp 3 cho đến khi đủ 5-10% giống cho sản xuất.

Cứ mỗi một cấp độ nhân giống từ cấp này sang cấp khác, khối lượng môi trường tăng từ 10-15 lần. Trong trường hợp vượt quá 1 ký người ta nuôi trên những khay.

**d) Quá trình lên men:** khi môi trường đã được khử trùng và làm nguội đến 30°C, tiến hành trộn giống với tỉ lệ 5-10%. Các khay được xếp chồng lên nhau trên những giá đỡ với khoảng cách nhất định để thoáng khí và thoáng nhiệt.

Nấm penicillium trong quá trình phát triển thường tạo ít nhiệt hơn nấm Aspergillus. Tuy nhiên, để tăng cường khả năng phát triển và sinh tổng hợp, người ta thường thổi khí bằng quạt gió có lắp hệ thống làm sạch.

Quá trình lên men kéo dài 6-7 ngày ở 24-28°C.

Trong lên men bề mặt, người ta sử dụng môi trường lỏng. Môi trường lỏng dùng trong nuôi cấy bề mặt thu nhận penicillin bao gồm:

Cao ngô (bắp)	50g	Lactose	30g	NaNO <sub>3</sub>	3g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5g	MgSO <sub>4</sub>	0.25g		
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub> COOH	0.2g	ZnSO <sub>4</sub>	0.044g	Nước	1000ml

Dung dịch lên men được khử trùng ở 121°C (0.5 at) trong 30 phút, được phân khối vào các khay giống các khay nuôi cấy bề mặt với môi trường bán rắn. Ở đáy các khay này không được đục lỗ vì phải chứa môi trường lỏng. Chiều cao của dung dịch môi trường trong các khay là 3-4 cm. Người ta cũng tiến hành lên men trong khoảng thời gian là 6-7 ngày ở nhiệt độ lên men là 24-28°C.

Váng nấm sợi được giữ lại sau khi đã rút hết dịch lên men, được tiếp tục sử dụng cho những lần lên men kế tiếp. Ở những lần lên men tiếp theo người ta chỉ đổ thêm dịch lên men vào. Các thí nghiệm cho thấy chỉ nên sử dụng lại 3-4 lần, vì những lần sau hiệu suất thu nhận kháng sinh sẽ giảm dần.



*Khu vực lên men sản xuất penicillin.*

### *3.2. Kỹ thuật lên men chìm:*

Kỹ thuật lên men chìm là kỹ thuật được áp dụng trong hầu hết các cơ sở sản xuất penicillin công nghiệp hiện nay và thường được vận hành theo phương pháp lên men bán liên tục, gồm phương án lên men gián đoạn theo mẻ có bổ sung liên tục (hay bán liên tục) một hay một vài cấu tử kết hợp với phương án tuần hoàn lại một phần hệ sợi của mẻ lên men trước (hoặc không)

### 3.2.1 Quá trình nhân giống :

Trong quá trình lên men chìm người ta nhân giống trong môi trường lỏng. Mục đích của quá trình nhân giống là thu nhận được số lượng tế bào cao ( thường tính tổng lượng tế bào/ml).

Quá trình nhân giống được bắt đầu bằng việc chuyển giống từ ống nghiệm sang những bình tam giác đã chứa sẵn môi trường nhân giống. Người ta thường nhân giống vào các bình lên men dung tích từ 1 lít cho đến hàng ngàn lít. Nhiệt độ trong quá trình nhân giống duy trì ở khoảng  $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$  và thời gian nhân giống ở mỗi cấp độ khoảng 72 giờ.

Người ta thường nhân giống penicillium trong môi trường có thành phần sau:

Cao ngô 2%	Glucose 2%	lactose 0.5%
Nitrat amon 0.125%	Sunfat magiê 0.025	sunfat natri 0.05%
Kaliphotphat monoboric 0.2%		CaCO <sub>3</sub> 0.5%

Trong công nghiệp sản xuất kháng sinh hiện nay, thường là dùng những chủng biến đổi gen. Công nghệ biến đổi gen đã tạo ra những chủng siêu tổng hợp kháng sinh. Theo Talaro (1993), từ chủng penicillin chrysogenum đầu tiên chỉ có khả năng sinh tổng hợp 6mg/l, hiện nay người ta đã có những chủng biến đổi gen từ chủng gốc có khả năng sinh tổng hợp 85000ng/l penicillin.

### 3.2.2 Quá trình lên men :

Quá trình lên men trong môi trường lỏng bằng phương pháp lên men chìm để sản xuất penicillin được vận hành theo phương pháp lên men hai pha:

- Pha thứ nhất nuôi thu sinh khối trong khoảng 2 – 3 ngày. Trong pha này hệ sợi phát triển rất mạnh vì các chất dinh dưỡng dễ đồng hóa sẽ được tế bào hấp thụ rất mạnh, tốc độ sinh sản của nấm xảy ra rất nhanh, sự tạo thành penicillin mới bắt đầu.
- Pha thứ hai lên men thu sản phẩm. Ở pha này hệ sợi phát triển chậm lại, pH tăng dần và đạt đến giá trị khoảng 7 – 7,5. Trong pha này penicillin được tạo thành với mức độ cực đại.



Trong hầu hết các trường hợp, khi lên men, người ta thay thế phần lớn (hoặc hoàn toàn) đường lactose bằng đường glucose. Lượng glucose này có thể được bổ sung liên tục hay bán liên tục nhưng phải giám sát chặt chẽ nồng độ glucose trong suốt quá trình vận hành pha để duy trì nồng độ glucose luôn ở mức thích hợp nhằm vừa giữ khối lượng hệ sợi ổn định, vừa đảm bảo sinh tổng hợp nhiều penicillin.

Trong thực tiễn, để tránh xảy ra thiếu hụt nhất thời glucose, người ta có thể kết hợp bổ sung một lượng nhỏ đường lactose (khi đó, nếu chưa bổ sung kịp glucose thì nấm mốc sẽ tự điều chỉnh để sử dụng đường lactose nên không xảy ra hiện tượng tự phân hệ sợi). Ngoài nguồn nitơ trong nước chiết ngô, người ta thường sử dụng phối hợp  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  để vừa cung cấp thức ăn N và S, vừa sử dụng để điều chỉnh pH trong quá trình lên men (pH dịch lên men ban đầu thường được điều chỉnh về khoảng pH = 6,5 – 6,8 bằng dung dịch NaOH hoặc  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ); nồng độ  $\text{NH}_4^+$  thường khống chế trong khoảng 0,3 – 0,4 kg/m<sup>3</sup> dịch lên men. Chất phá bọt thường sử dụng là các loại dầu béo như: mỡ lợn, dầu đậu tương, dầu vừng, dầu cám... Tiền chất tạo nhánh phenylacetic trong lên men sản xuất penicillin G (hoặc phenooxyacetic trong lên men sản xuất penicillin V) được bổ sung liên tục (hoặc bổ sung gián đoạn làm nhiều lần) trong suốt thời gian pha lên men penicillin, để duy trì nồng độ trong khoảng 0,1 – 1,0 kg/m<sup>3</sup> dịch (nếu ít quá nấm mốc sẽ tổng hợp đồng thời nhiều penicillin khác, nếu nhiều quá sẽ gây độc cho nấm và tăng cường thúc đẩy quá trình hydroxyl hóa sản phẩm penicillin).

Nhiệt độ lên men pha đầu khống chế ở 30°C, sau đó sang pha sau giữ ở 22 – 25°C. Tốc độ sục khí và khuấy trộn được điều chỉnh để duy trì nồng độ oxy hòa tan trong dịch trong khoảng 30%. Trong điều kiện trên thời gian lên men mỗi mẻ thường kéo dài khoảng 144 – 180 giờ. Kết thúc quá trình lên men người ta cố gắng lọc sớm dịch lên men, làm lạnh rồi chuyển sang công đoạn trích ly và tinh chế thu penicillin.

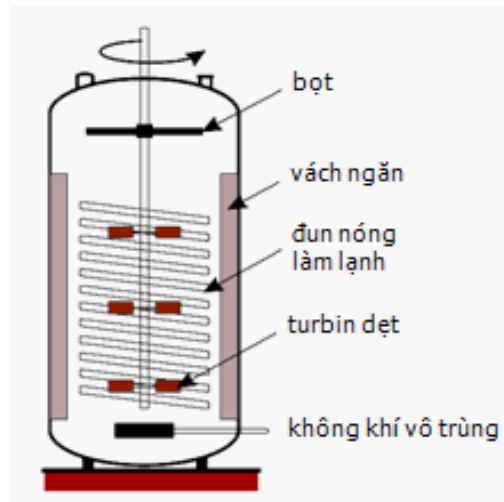
STT	Thành phần	Môi trường 1	Môi trường 2	Môi trường 3
1	Cao ngô	2.0-2.4	-	2.0-3.0
2	Khô hạt có dầu (lạc, đậu tương hướng dương)	-	2.0-2.4	
3	Lactose	5.0	5.0	1.0

4	Glucose hoặc hydol	1.0	1.0	1.0
5	Dầu thực vật	0.5-1.0	0.5-1.0	2.5-3.5
6	Amon nitrat	0.4	0.4	0.4
7	Sulfat natri	0.05	0.05	0.05
8	Kali photphat	0.4	0.4	0.4
9	Magie sulfat	0.025	0.025	0.25
10	Natri hyposunfit	0.2	0.2	0.2
11	Canxi cacbonat	0.5-1.0	0.5-1.0	0.5-1.0
12	Tiên chất	0.2-0.4	0.3-0.4	0.3-0.4

\* Đặc điểm về thiết bị lên men chìm:

Quá trình lên men sản xuất penicillin ngày nay chủ yếu được tiến hành trong thiết bị lên men chìm chế tạo bằng nhôm thép chịu ăn mòn CT2 với khuấy trộn kiểu tuốc-bin (gồm nhiều tầng cánh khuấy), kết hợp bố trí hệ vách dẫn dòng trong thùng). Công suất khuấy trộn tiêu hao được thiết kế khoảng  $3\text{kW/m}^3/\text{h}$ . Không khí nén đã vô khuẩn được cấp vào qua hệ ống phân phối kiểu vòng xoáy hay kiểu rẽ quạt đục lỗ lắp đặt sát dưới đáy (hay phía dưới cánh tuốc-bin). Bên trong thiết bị được lắp đặt nhiều tầng ống trao đổi nhiệt kiểu vòng xoắn kết hợp đồng thời với trao đổi nhiệt qua thành thiết bị hai lớp vỏ, đảm bảo điều nhiệt hiệu quả trong suốt quá trình lên men. Dung tích thiết bị phổ biến trong khoảng  $150 - 300\text{m}^3$ , hệ số đổ đầy thường chọn khoảng 80%V (phụ thuộc vào kỹ thuật và thiết bị phá bọt). Thiết bị nhân sản xuất giống có dung tích khoảng 10%V thiết bị lên men, được thiết kế tương tự và thường được ghép cứng với thiết bị lên men. Toàn bộ thiết bị lên men sản xuất, thiết bị nhân giống lớn và hệ thống trang thiết bị phụ trợ được thiết kế và lắp đặt đảm bảo có thể vệ sinh và thao tác vận hành theo chế độ vô khuẩn cao (tốt nhất nên bố trí sao cho có thể áp dụng chế độ thanh trùng đồng thời cho toàn bộ hệ thiết bị này). Các thông số kiểm tra quá trình lên men bao gồm: pH môi trường, nồng độ oxy hòa tan, nhiệt độ, hàm lượng sinh khối và tốc độ biến thiên lượng sinh khối, số lượng, kích thước và cấu trúc pellet, nồng độ các cấu tử cơ chất, nồng độ penicillin, thành phần khí thải và các chỉ tiêu kiểm tra về vi sinh vật. Việc giám sát và điều chỉnh quá trình lên

men được xây dựng trên cơ sở khai thác cả hai kiểu tương tác trực tuyến (online control) và tương tác không phản hồi theo quy luật (offline control), phụ thuộc vào khả năng đáp ứng của hệ thiết bị hiện có. Đồng thời xu hướng máy tính hóa trong kiểm tra và giám sát quá trình lên men đang dần chiếm ưu thế trong sản xuất công nghiệp.



Hình 5. Sơ đồ hệ lên men dùng cho sản xuất penicillin.

\* Hiệu quả kinh tế chung của quá trình lên men chìm

Năng lực sinh tổng hợp và tích tụ penicillin trong dịch lên men là kết quả của mỗi tương tác đồng thời của hàng loạt yếu tố công nghệ như: hoạt tính sinh tổng hợp của chúng, công nghệ lên men áp dụng, chất lượng nguyên liệu, đặc tính thiết bị và năng lực đáp ứng các yêu cầu công nghệ của thiết bị, chế độ giám sát và điều chỉnh các thông số công nghệ, năng lực và kỹ năng vận hành của công nhân.... Với nguồn cơ chất chính là glucoza và lên men theo phương pháp chìm, hệ số phân bổ nguyên liệu dự tính khoảng 25% glucoza được nắm mốc sử dụng để tổng hợp hệ sợi, 65% đường được sử dụng để duy trì sự sống sót của hệ sợi, còn lại chỉ khoảng 10% được nắm mốc sử dụng để tổng hợp penicillin. Hệ số sử dụng thức ăn nitơ và lưu huỳnh để tổng hợp penicillin tương ứng là 20% và 80%. Nồng độ penicillin G trong dịch lên men những năm 80 - 90 của thế kỷ XX đạt khoảng 80.000 UI/ml (tương ứng năng suất khoảng 40 - 50 kg penicillin G/ m<sup>3</sup> dịch lên men ).

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

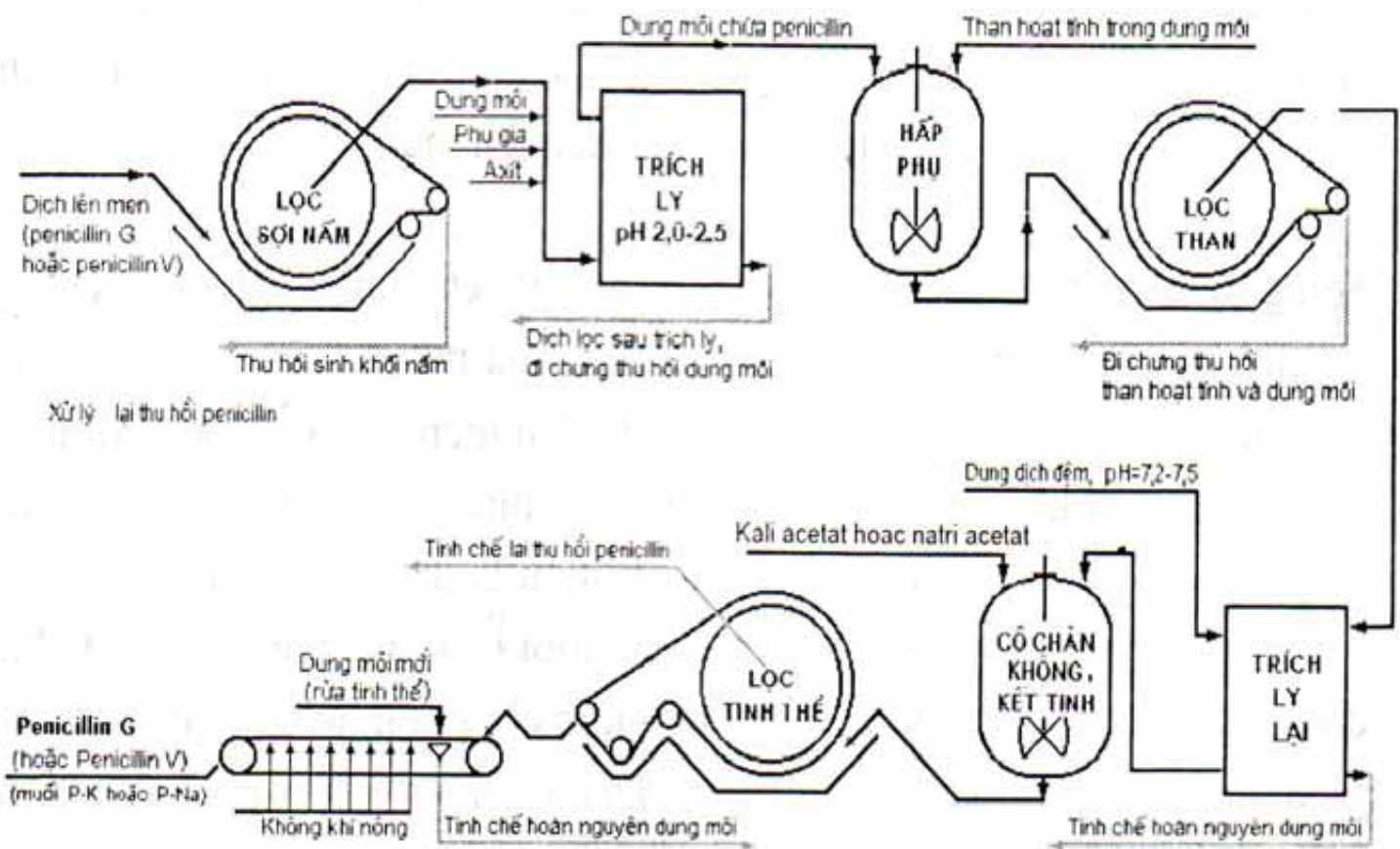
Có ba phương pháp thu nhận và tinh chế penicillin từ môi trường nuôi cấy, đó là:

- Trích ly bằng dung môi hữu cơ
- Hấp phụ
- Trao đổi ion

Trong ba phương pháp trên thì phương pháp trích ly bằng dung môi hữu cơ được sử dụng nhiều hơn cả. phương pháp này dựa trên những ưu điểm sau:

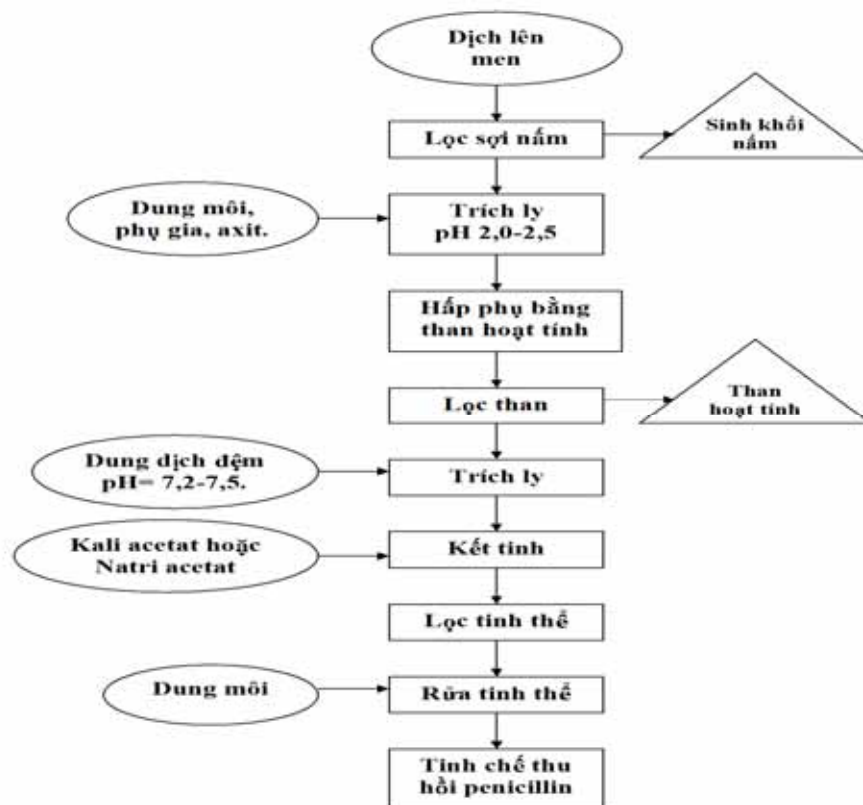
- Muối của penicillin rất dễ tan trong nước
- Acid penicillic rất dễ tan trong dung môi hữu cơ

Công đoạn xử lý dịch lên men và tinh chế thu penicillin tự nhiên được tóm tắt trong sơ đồ hình 6 , bao gồm các công đoạn chính sau đây:



Hình 6. Sơ đồ tóm tắt công đoạn xử lý dịch lên men thu penicillin tự nhiên

### Sơ đồ khối quá trình xử lý dịch lên men :



#### 3.2.4. Lọc dịch lên men :

**Mục đích :** Penicillin là sản phẩm lên men ngoại bào. Vì vậy, ngay sau khi kết thúc quá trình lên men người ta thường tiến hành lọc ngay để giảm tổn hao do phân hủy penicillin và giảm bớt khó khăn khi tinh chế, do các tạp chất tạo ra khi hệ sợi nấm tự phân.

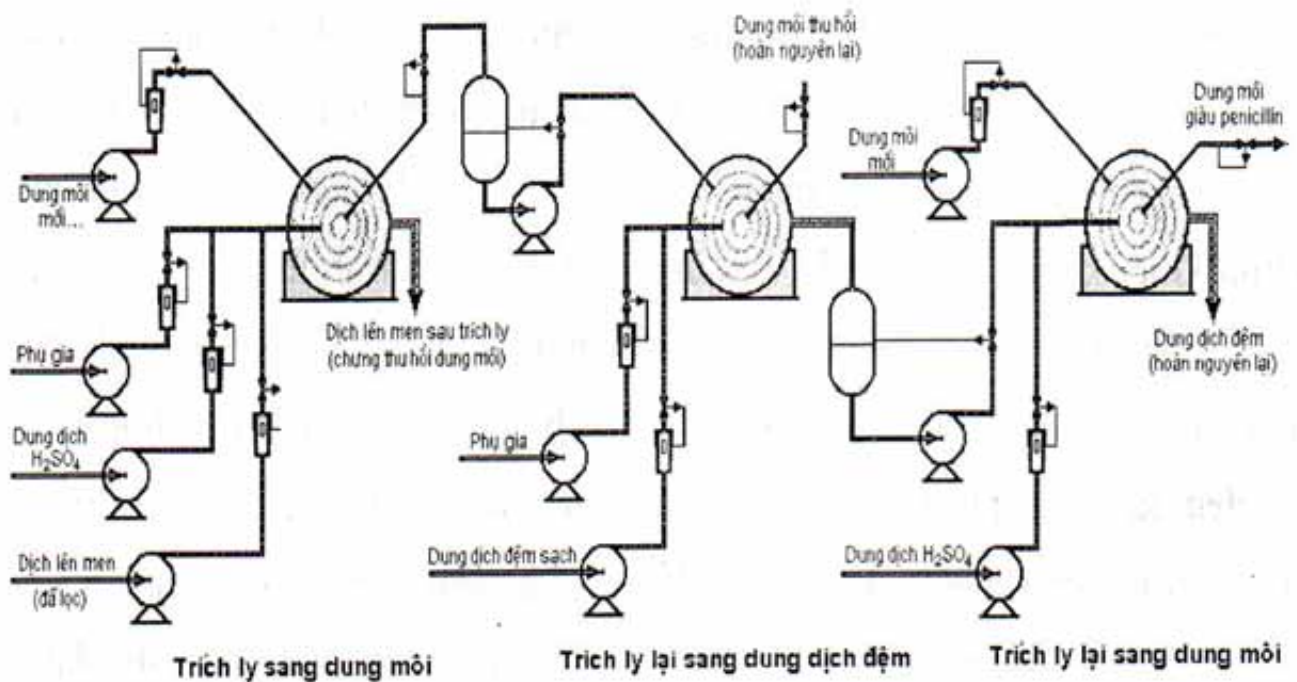
**Thiết bị lọc:** phổ biến là thiết bị lọc hút kiểu băng tải hoặc kiểu thùng quay. Thông thường, người ta chỉ cần lọc một lần rồi làm lạnh dịch ngay để chuyển sang công đoạn tiếp theo. Chỉ trong những trường hợp rất đặc biệt mới cần phải xử lý kết tủa một phần protein và lọc lại dịch lần thứ hai. Hiện tượng tự phân hệ sợi nấm thường kéo theo hậu quả làm cho dịch khó lọc hơn.

**Thu hồi sinh khối nấm:** Phần sinh khối nấm được rửa sạch, sấy khô và sử dụng để chế biến thức ăn gia súc.

#### 3.2.5. Trích ly :

Penicillin thường được trích ly ở dạng axit ra khỏi dịch lọc bằng dung môi amylacetat hoặc butylacetat ở pH = 2,0 - 2,5, nhiệt độ 0 - 3°C. Nhằm hạn chế lượng penicillin bị

phân huỷ, quá trình trích ly được thực hiện trong thời gian rất ngắn trong thiết bị trích ly ngược dòng liên tục kiểu ly tâm nhiều tầng cánh. Đồng thời, trong thời gian trích ly cần giám sát chặt chẽ các thông số công nghệ như: nhiệt độ pH, độ vô khuẩn.... để hạn chế tổn thất do phân huỷ penicillin. Dịch lên men sau khi lọc được bơm trộn đồng thời với dung dịch  $H_2SO_4$  hoặc  $H_3PO_4$  loãng có bổ sung thêm chất chống tạo nhũ và bơm song song cùng với dung môi trích ly vào trong thiết bị. Tỷ lệ dịch lọc: dung môi thường chọn trong khoảng 4 - 10V dịch lọc /1V dung môi. Trong một số công nghệ, nhằm cải thiện chất lượng sản phẩm, người ta có thể áp dụng phương pháp trích ly hai lần dung môi, với lần đầu trích ly penicillin bằng amylacetat hoặc butylacetat; tiếp theo penicillin lại được trích ly ngược sang dung dịch đệm pH = 7,2 - 7,5, thường là dung dịch KOH loãng hoặc dung dịch  $NaHCO_3$ ; sau đó penicillin lại được trích ly sang dung môi lần thứ 2, với lượng dung môi ít hơn.(hình 7)



Hình 7. Sơ đồ công nghệ trích ly 2 lần dung môi tinh chế penicillin

### 3.2.6 Tẩy màu :

Để tẩy màu và loại bỏ một số tạp chất khác, người ta thường bổ sung trực tiếp chất hấp phụ vào dung môi chứa penicillin sau trích ly, sử dụng phổ biến nhất là than hoạt tính. Sau đó than hoạt tính được tách và rửa lại bằng sử dụng thiết bị lọc hút băng tải hoặc thiết

bị lọc hút kiểu thùng quay. Phần than sau lọc được đưa đi chưng thu hồi dung môi và xử lý hoàn nguyên, phục vụ cho các mẻ sau.

### 3.2.7 Kết tinh, lọc, rửa và sấy thu penicillin tự nhiên:

Việc kết tinh penicillin V hay penicillin G dưới dạng muối có thể được thực hiện rất đơn giản, bằng cách bổ sung trực tiếp vào dung môi sau khi tẩy màu một lượng nhỏ kali acetat (hay natri acetat) hoặc người ta trích ly lại sang dung dịch KOH loãng (hay NaOH loãng), tiến hành cô chân không ở nhiệt độ thấp, sau đó bổ sung BuOH để penicillin tự kết tinh. Các thông số công nghệ có ảnh hưởng lớn đến hiệu quả kết tinh là : nồng độ penicillin, nồng độ muối acetat, pH dung môi hay pH dung dịch cô đặc, nhiệt độ kết tinh ... Sau khi kết tinh, tinh thể penicillin được lọc tách bằng máy lọc hút thùng quay. Để đảm bảo độ tinh khiết cao hơn, có thể tiến hành hòa tan và kết tinh lại penicillin. Khi sản phẩm đã đạt độ tinh sạch theo yêu cầu, thường độ tinh khiết không dưới 99,5%, chúng được lọc tách tinh thể; tiếp theo rửa và làm khô sơ bộ bằng dung môi kỵ nước như izopropanol hay butylalcohol; hút chân không tách dung môi trên máy lọc băng tải rồi sấy bằng không khí nóng đến dạng sản phẩm bột muối penicillin. Sản phẩm này, một phần được sử dụng trực tiếp để pha chế thuốc kháng sinh penicillin; còn lại, phần lớn được sử dụng làm nguyên liệu phục vụ cho việc sản xuất các sản phẩm penicillin và cephalosporin bán tổng hợp khác. Ngoài ra, để sản xuất ra các sản phẩm penicillin có độ tinh khiết rất cao, người ta cần phải sử dụng phối hợp thêm một số giải pháp công nghệ khác.

### 3.2.8 Sản xuất penicillin bán tổng hợp từ penicillin tự nhiên:

Về nguyên tắc, để tạo ra một *penicillin* mới trong lên men sinh tổng hợp có thể dùng phương pháp thay đổi mạch nhánh bằng cách sử dụng các tiền chất khác nhau. Tuy nhiên bằng con đường lên men trực tiếp hiện nay người ta chỉ mới có khả năng tiến hành với *penicillin G* và *V*. Còn để triển khai trong sản xuất công nghiệp, người ta sử dụng *penicillin G* hay *V* để chế tạo ra 6-APA là nguyên liệu chủ yếu trong quá trình bán tổng hợp ra các *penicillin* mới.

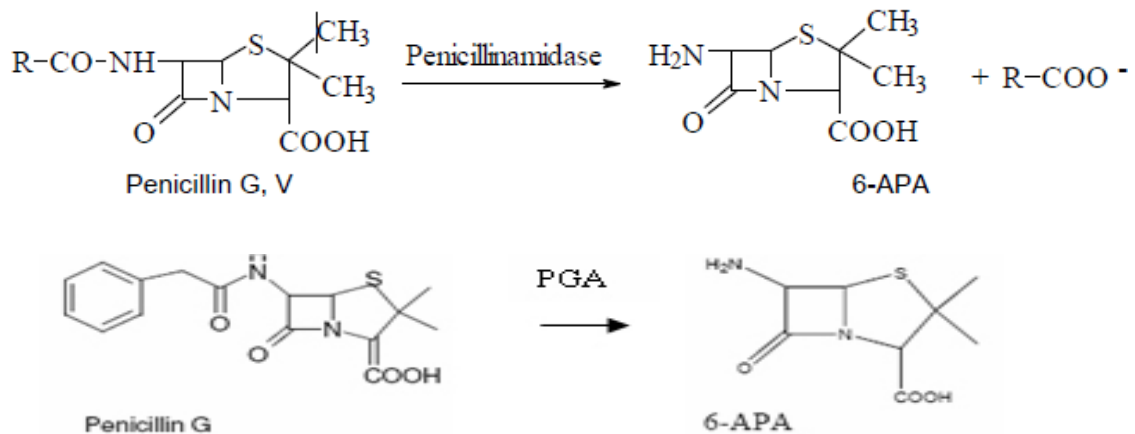
Theo cấu trúc hóa học, các *penicillin* tự nhiên đều là những hợp chất dị vòng của các acid amin có tên gọi là *acid 6-aminopenicillanic* (6-APA). Việc tìm ra phân tử 6-APA đã mở ra một hướng mới để sản xuất *penicilin* bán tổng hợp bằng cách gắn vào các mạch nhánh khác nhau vào phân tử 6-APA bằng con đường hóa học hay sinh học. Có hai hướng chính là acyl hóa nhóm  $\text{NH}_2$  ở vị trí số 6 và ester hóa nhóm  $-\text{COOH}$  ở vị trí số 3.

Enzyme *penicillinamidase* đóng vai trò trong việc thủy phân *penicillin* G hoặc V tạo thành *acid 6- aminopenicillanic* (6-APA) và *acid phenyl acetic*. 6- APA là tiền chất quan trọng được sử dụng để sản xuất các kháng sinh họ  $\beta$ -lactam hoạt động cao.

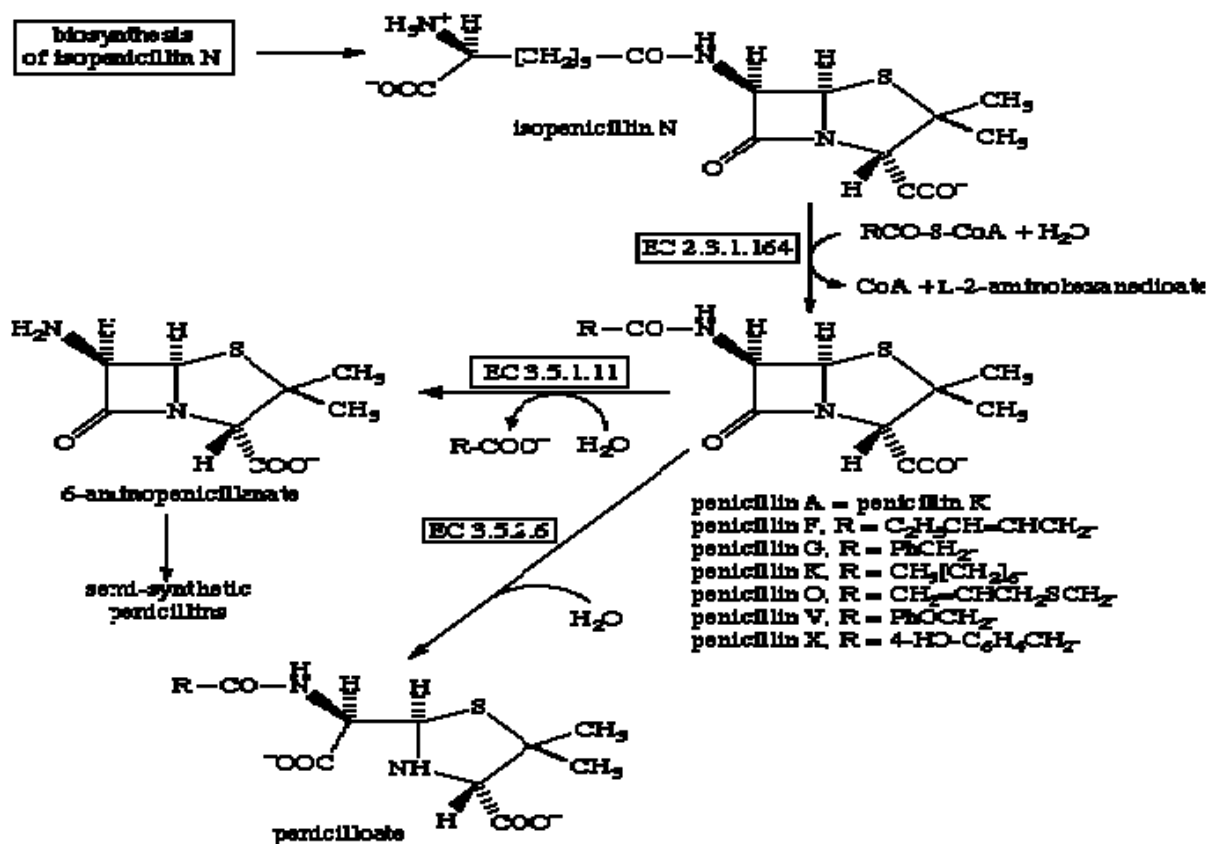
6-APA có thể sản xuất bằng phương pháp lên men các chủng *penicillium*. Động học của quá trình lên men tạo 6-APA: đồng hóa *hydratcarbon* nhanh, pH tăng dần và trong giai đoạn tạo 6- APA từ 7.0 -7.4. Thời gian lên men kéo dài từ 108- 120 giờ. Tuy nhiên quá trình này cho hiệu suất thấp vì 6-APA được tạo thành đồng thời với các penicillin tự nhiên , mặc khác chi phí cho quá trình tách chiết cao. Vì vậy trong thực tế người ta không sử dụng phương pháp này.

Hiện nay sử dụng enzyme cố định là phương pháp phổ biến để sản xuất 6-APA trong công nghiệp. Sử dụng enzyme *penicillin acylase* để cắt mạnh nhánh của penicillin G . Phương pháp này có nhiều ưu điểm, điều kiện phản ứng dễ dàng nên mang lại hiệu quả kinh tế cao. Hiện nay một số hãng dược phẩm áp dụng biện pháp này, điển hình là hãng dược phẩm Snam Progetti (Italia) với sản lượng khoảng 40 tấn/ năm.

Phương pháp enzyme cố định để sản xuất 6-APA cho hiệu quả tương đối cao (90-95%) và đã được áp dụng rộng rãi ở nhiều nước, mang lại hiệu quả kinh tế cao. Hơn 50% 6-APA trên thế giới sản xuất theo phương pháp enzyme cố định. Hiện nay một số nhà máy sản xuất penicillin chỉ cho xuất xưởng thành phẩm 6-APA.







#### 4. Các thiết bị dùng trong sản xuất penicillin :



Thiết bị sấy chân không



Thiết bị lọc sinh học



Thiết bị lọc than hoạt tính



Thiết bị sấy



*Khu vực lên men sản xuất penicillin.*

## **Phần II – Kết luận**

Penicillin là loại kháng sinh đầu tiên được dùng để điều trị viêm nhiễm ở người. Khám phá về penicillin từ một phát hiện tình cờ nhưng có ý nghĩa cực kỳ to lớn đối với nhân loại

Penicillin thông thường được sản xuất bằng phương pháp lên men chìm ưa khí và được chiết xuất ở độ pH thấp từ dịch lên men sử dụng butyl axetat hoặc kerosen. Do tính không ổn định của penicillin ở độ pH thấp, quy trình chiết xuất cần thực hiện ở nhiệt độ thấp, song có tới 10-15% sản phẩm bị thất thoát khi sử dụng quy trình hiện nay. Ngoài năng suất tương đối thấp, các phương pháp sản xuất truyền thống có chi phí cao, tiêu thụ nhiều năng lượng để thu hồi butyl axetat từ các chất – là quy trình đòi hỏi nhiều công đoạn.

Penicillin được thải ra rất nhanh ở những người bệnh nhân có chức năng thận bình thường, và được đưa vào cơ thể qua con đường tĩnh mạch ở những bệnh nhân bị nhiễm trùng nặng. tác dụng ngược quan trọng và phổ biến nhất đối với Penicillin là dị ứng.

Vì kiến thức còn hạn hẹp nên có rất nhiều sai sót mong cô và các bạn cùng đóng góp ý kiến để bài tiểu luận hoàn chỉnh hơn.

## Phần III: Tài liệu tham khảo

- [1] Nguyễn Văn Cách, *Công nghệ lên men các chất kháng sinh*, Nhà xuất bản Khoa học Kỹ thuật, Hà Nội 2005
- [2] Nguyễn Lâm Dũng, Nguyễn Đình Quyền, Phạm Văn Ty, *Vi sinh vật học*, Nhà xuất bản giáo dục 1997
- [3] Trương Thị Minh Hạnh, *Giáo án môn học công nghệ dược phẩm* , tài liệu điện tử
- [4] Nguyễn Đức Lượng, *Vi sinh vật học công nghiệp*, Nhà xuất bản Đại học quốc gia TP.Hồ Chí Minh
- [5] Hình ảnh từ internet