

المضادات الحيوية

المحاضرة ٥،٦

تحضير وانتاج المضادات الحيوية

Preparation and Production of Antibiotics

المضادات الحيوية .. Antibiotics

هي عباره عن نواتج أيض ثانوية من نواتج التمثيل الغذائي للميكروبات— كما ذكر سابقا

تعتبر المضادات الحيوية من اهم المنتجات الميكروبية من الناحية التجارية ، و للأحياء الدقيقة دوراً مميزاً في انتاج المضادات الحيوية بصورة طبيعية حيث ان

٨٠% منها ينتج بواسطة الأحياء الدقيقة

٦٠% تنتج بواسطة الاكتينومييسيتات

١٠% بواسطة البكتيريا

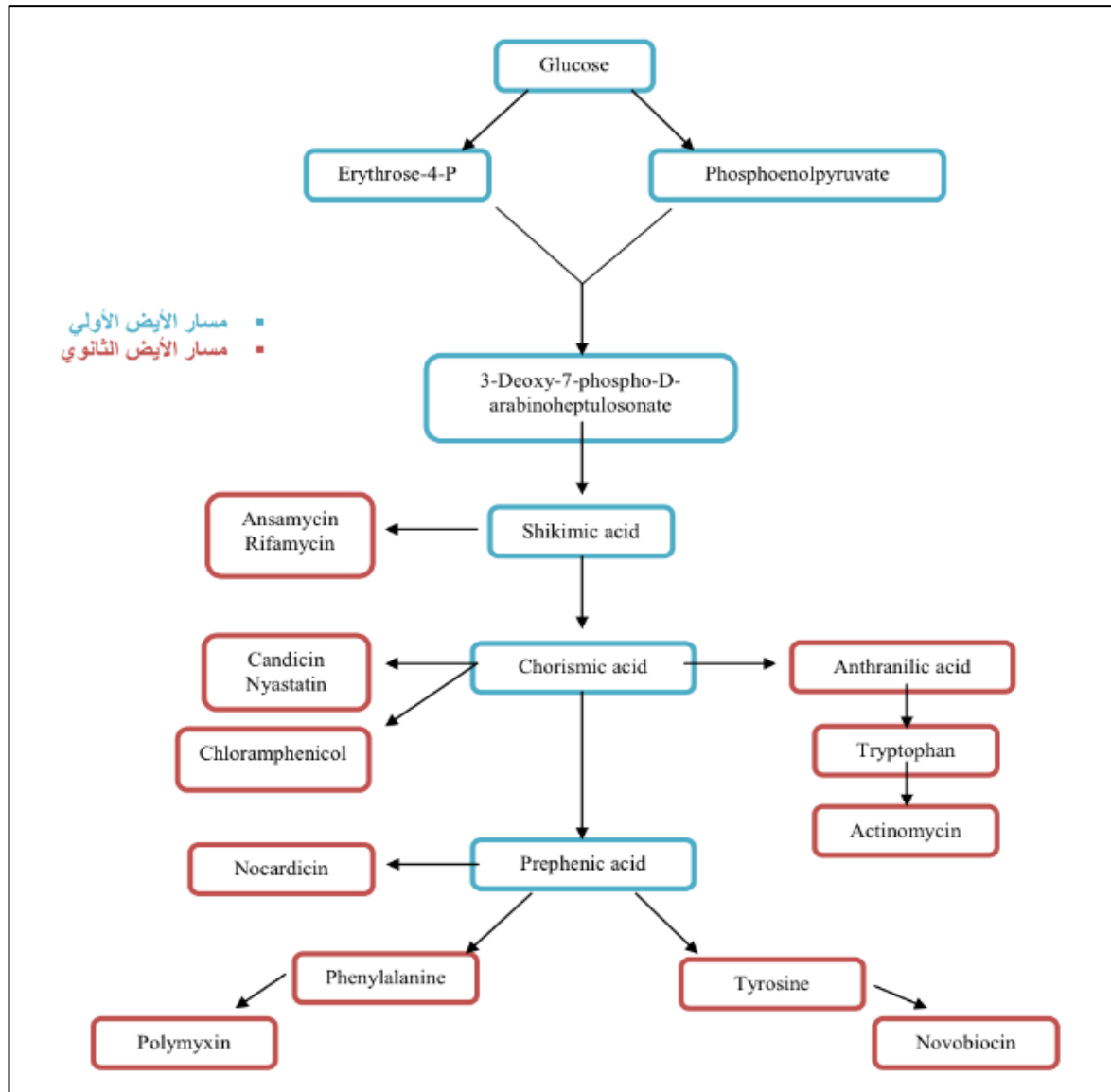
١٠% بواسطة الفطريات.

النواتج الأيضية الثانوية غالباً ما تنتج في مجاميع مغلقة من المركبات، فمثلاً إحدى سلالات *Streptomyces* تنتج أكثر من 48 مركب مرتبط و لكنها مضادات حيوية مختلفة من مجموعة Anthracycline ، و من المحتمل الحصول على فائض مفاجئ من الأيض الثانوي، غير أن عمليات الأيض الأولية تكون مرتبطة بالأيض الأولي الذي غالباً لا يعطي فائض من النواتج. النواتج الأيضية الثانوية من المركبات الشائعة و الهامة صناعياً في حين أنها غير هامة في نمو أو تكاثر الميكروب الذي يفرزها.

الكثير من النواتج الأيضية الثانوية تكون عباره عن جزيئات عضوية معقدة تتطلب عدد كبير من الانزيمات المتخصصة لتفاعلات البناء، مثال على ذلك:

- هناك ٧٢ خطوة كحد أدنى لفصل انزيم يتضمن عملية بناء للمضاد الحيوي Tetracycline
- هناك أكثر من ٢٥ خطوة في عملية تصنيع Erythromycin و يحدث ذلك بدون حدوث أي انعكاسات خلال الأيض الأولي.

العلاقة ما بين مسار الأيض الأولي في تصنيع Aromatic amino acid و تكوين تشكيلة من نواتج الأيض الثانوية من المضادات التي تحتوي على الحلقة الأروماتية. و هذا نظام يتركب من سلسلة من العمليات تحدث عند وجود تنوع في الكائنات الدقيقة. لا يوجد كائن دقيق واحد ينتج جميع هذه النواتج الأيضية الثانوية، كما نلاحظ أن العديد من هذه المضادات تنشأ من الأيض الأولي.



إن أكثر المضادات الحيوية المتوفرة حالياً في السوق العالمية هي نتيجة الإنتاج الصناعي لتطبيقات علم الأحياء الدقيقة، حيث يتم تهيئة الظروف الملائمة للسلاسل المنتجة للمضادات الحيوية.

إن تفصيل طرق إنتاج المضادات الحيوية يعتبر سرّاً لا يمكن الإفصاح عنه لأسباب احتكارية و تجارية. المعمل الواحد يمكن أن ينتج أكثر من مضاد باستعمال طرق أكثر مرونة ودقة و باستعمال نفس الأجهزة.

يبلغ الانتاج السنوي للمضادات الحيوية ١٠٠ ألف طن، و يصل حجم المبيعات إلى حوالي ٥ بليون دولار. فتطور تكنولوجيا الانتاج مثل تحسين بيئة النمو و انتخاب السلالات الميكروبية ساهم في تطور الإنتاج للمضادات

هناك أكثر من ٨٠٠٠ مضاد معروف حتى الآن إلا أن أقل من ١ % من المضادات المكتشفة سنوياً لها أهمية طبية أو صناعية.

الطرق العامة لتحضير المضادات الحيوية

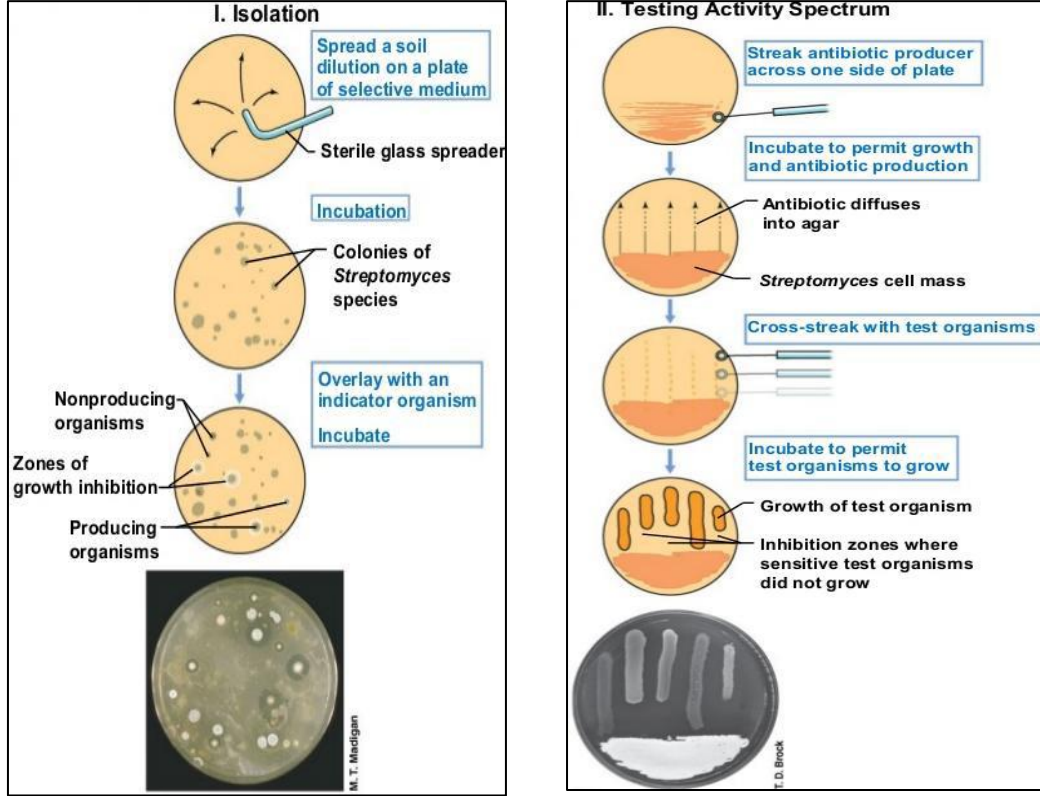
1. التحضير معملياً

على الرغم من استخدام شركات صناعة الأدوية و العقاقير لكثير من اكتشافات الأدوية باستخدام النظام الحاسوبي، إلا أن المتعارف عليه و المعروف أن المضادات الحيوية يتم اكتشافها معملياً عن طريق الترشيح أو التصفية . **Screening** في هذا المجال هناك عدد كبير من العزلات التي من الممكن أن تكون كائنات دقيقة منتجة للمضادات الحيوية بصورة طبيعية، حيث أن بكتيريا الاختبار تكون منتقاة من ضمن مختلف السلالات و الأنواع البكتيرية.

حيث يتم العزل باستخدام بيئة اختيارية ل *Streptomyces* مثلاً، و التي أثبتت قدرتها على إنتاج المضادات الحيوية عن طريق استخدام كائنات دقيقة أخرى كمؤشر أو دليل، كما يمكن فحص مدى فاعليتها.

الأوساط الغذائية المستعملة في تنمية الكائن الدقيق المنتج للمضادات الحيوية.

- طبيعة الوسط الغذائي المستخدم في عملية تحضير المضاد الحيوي معتمدة بدرجة كبيرة على نوع الكائن الدقيق سواء أكان بكتيريا أو فطر.
- لنفرض أننا نعمل على إنتاج Penicillin G باستخدام الخمير، و بفرض أن الكائن الدقيق المستخدم في هذه العملية هو (*Penicillim chrysogenum* للعلم هناك أنواع و سلالات من الكائنات الدقيقة القادرة على انتاج البنسلين و التي قد تختلف فيما بينها في كمية المضاد المنتجة.)
- الوسط الغذائي عبارة عن ذرة مهروسة و مخمرة نشاء، و دبس السكر (المولاس)، و بعض المعادن.
- تضاف كربونات الكالسيوم بهدف معادلة الحمضية الناتجة عن عمليات الأيض (التخمير)، كما أنها تعمل كمنظم للحفاظ على درجة الحموضة مرتفعة لحد مناسب لاستمرار نمو الكائن الدقيق.
- تضاف الأمونيا للحفاظ على قيمة الأس الهيدروجيني pH ، كما أنها تعمل كمصدر إضافي للنيتروجين في البيئة.



الطريقة المتبعة للبحث عن مضادات حيوية جديدة (Screening)

2. التحضير صناعياً

- من أهم الطرق المتبعة في إنتاج المضادات الحيوية صناعياً هي استخدام عمليات التخمير Fermentation، وهي عمليات قد تحدث طبيعياً ضمن مسار الأيض الثانوي في بعض الظروف الغير ملائمة.
- **عملية التخمير .. Fermentation** هي عملية كيميائية يتم من خلالها تحطيم السكريات بواسطة الأنزيمات وذلك للحصول على الطاقة، و ينتج عن ذلك كحول الايثلي وثاني أكسيد الكربون كنواتج أساسية لعملية التخمير.
- **هناك خصائص لا بد من توفرها في الكائن الدقيق المستخدم في إنتاج المضادات الحيوية صناعياً، و هي:**
 1. يجب أن تكون قادرة على نمو و تكوين منتجات ذات أهمية في المجال الصناعي.
 2. يجب أن تكون قادرة على التكاثر سريعاً و أن تكون فترة جيلها قصيره.
 3. أن تكون سهلة التلقيح في الخزانات الكبيرة.
 4. أن تكون قادرة على النمو في مزارع سائلة رخيصة نسبياً، كمنقوع الذرة و نفايات الكربون الناتجة من صناعات أخرى.
 5. أن تكون غير ممرضة للإنسان، و لا تسبب خسائر اقتصادية للحيوان و النبات.
 6. لا بد أن تكون قابله للتغير الجيني، و لذلك لتطوير المضاد ضد المقاومة و تحسين الانتاجية

المخمرات

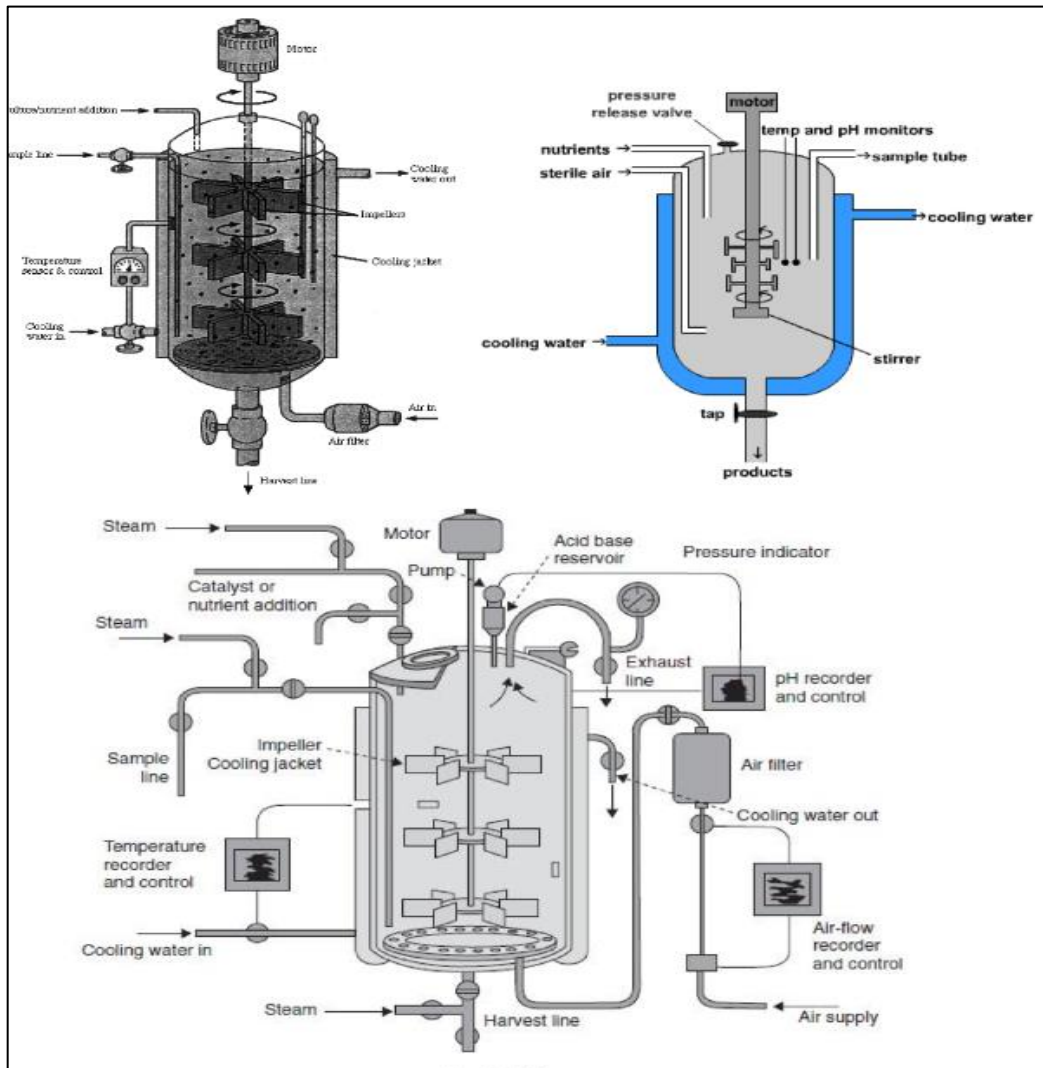
• يتم استخدام مخمرات ضخمة عبارة عن اسطوانات من الحديد الصلب غير قابل للصدأ أو من صفائح الكروم النيكلية ، Stainless steel

يكون ارتفاعها عادة ضعف عرضها، و يبلغ حجمها الاستيعابي في الحالات التجارية 100 ألف لتر.

تحتوي على منظمات للتهوية و التقليل و التعقيم، و عادة يستخدم المخمر الواحد لكائن دقيق واحد. فيما يلي عدد من نماذج المخمرات، و يلاحظ أن الوحدات الأساسية تبقى ثابتة، و الاختلاف فقط في التصميم والإخراج.

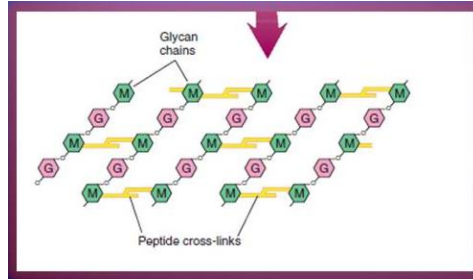


المخمرات



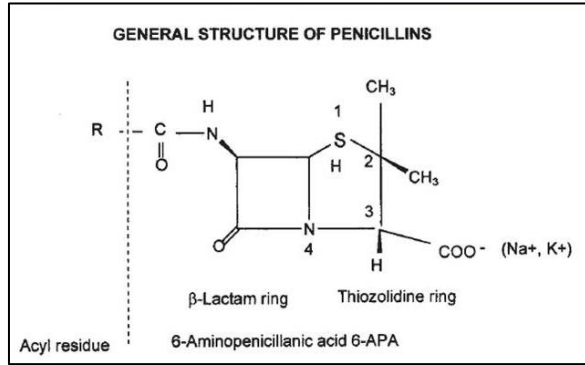
انتاج المضاد الحيوي البنسلين Penicillin

- البنسلين .. Penicillin هو أول المضادات الحيوية اكتشافاً على النطاق الصناعي
- فعال ضد معظم البكتيريا الموجبة لجرام.
- يؤثر على الجدار الخلوي من خلال تنشيط الإنزيمات المسؤولة عن ربط مكونات معقد الببتيدوجليكان، (منع تكوين الرابطة الببتيدية العرضية في طبقة الببتيدوجليكان) أي أنه يوقف تكوين جدار الخلايا البكتيرية حديثة التكوين مما يؤدي إلى انفجارها و موتها.
- يتميز بقلّة سميته لخلايا الانسان و الحيوان إلا أنه يسبب حساسية شديدة لبعض الأشخاص.
- استخدامه بكثرة يساعد على انتاج سلالات مقاومة للمضاد،
- هو حساس لانزيم البنسلينيز Penicillinase



التركيب الكيميائي للبنسلين:

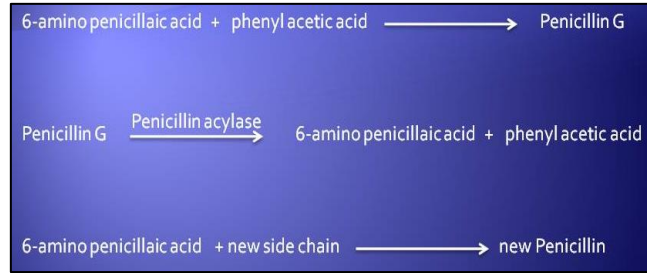
يتكون البنسلين من اتحاد الحمضين الامينيين D- Valine L –systein لانتاج نواة البنيسيلين



6- amino penicillanic acid

ترتبط النواة بعد ذلك بمجموعة جانبية لتكوين البنسلين

الطريقة النصف (الشبه) صناعية لإنتاج المضاد الحيوي البنسيلين
وجد ان اضافة السلسلة الجانبية الى بيئة الانتاج قد يؤدي الى محدودية الانواع الممكن انتاجها بسبب سمية بعض السلاسل الجانبية. او الى ضرورة اضافتها بصورة مستمرة وبتكريز منخفض.
من ناحية اخرى فان انتاج حمض 6- amino penicillanic acid يتطلب تحكما دقيقا في ظروف الانتاج.
لذلك يتم انتاج بنسيلين G ميكروبيا، ثم يتم تحويله كيميائيا الى انواع اخرى، وتسمى هذه الطريقة بالنصف صناعية.
ميزة هذه الطريقة هي امكانية استخدام انواع جديدة من السلاسل الجانبية وبالتالي انتاج انواع جديدة من البنسيلين.
ويمكن توضيح خطوات الطريقة النصف صناعية كما يلي :



عمية الانتاج:

- البادئ Starter



- سلالة فطر *Penicillium chrysogenum* لها قدرة عالية على انتاج مضاد البنسيلين.
- يتم إعداد اللقاح بنقل الفطر من الآجار المائل إلى دورق زجاجي يحتوي على نخالة القمح الرطبة و المعقمة.
- بعد اكتمال نمو الفطر على النخالة، يتم تكوين معلق للجراثيم، ثم ينقل المعلق إلى وعاء يحتوي على بيئة معقمة يطلق عليها اسم Bazooka
- الناتج يستخدم لتلقيح وعاء التخمر التجاري العملاق.

- الوسط المستخدم (بيئة التخمر) Fermentation medium

- تستخدم بيئة الانتاج التي تحتوي على سائل منقوع الذرة (نقيع الذرة يحتوي على مولد السلسلة الجانبية لبنسيلين G المركب Phenyl ethyl amine والذي يعطي Phenyl acetic acid)
- يمكن استخدام مخلوط السكر (لاكتوز و جلوكوز) (اللاكتوز يعمل على المحافظة على حيوية الميكروب في المرحلة الثانية (مرحلة الانتاج)، حيث انه بطيء الاستهلاك عكس الجلوكوز)
- يضاف للوسط أملاح معدنية و مواد أخرى ممهدة.
- زيت نباتي او حيواني (يضاف الزيت لتوفير البيروفيك اسيد لإنتاج الفالين بدلا من دخوله في دورة كريس لإنتاج الطاقة او استخدامه لإنتاج الاحماض الدهنية) (كما تعمل الدهون المضافة كمادة مضادة للزرغوة في بيئة الانتاج)
- بعض المصانع الحديثة تضيف فينيل حامض فينوكسي الخليك كمادة اضافية لبيئة التخمر، ذلك ينتج البنسيلين الذي يسمى phenoxy methyl penicillin وهو يتميز بثباته في الوسط الحامضي)
- يضبط pH الوسط عند 2.2 – 0.5
- يعقم الوسط ثم يبرد ثم يضح إلى المخمر.

التخمير يجعل مزرعة الاحياء الدقيقة المنتجة للمضاد الحيوي تنمو سريعاً

- طريقة الانتاج Product process

- كان إنتاج البنسلين في اول الامر باستخدام طريقة المزارع السطحية التي فيها تنمو الفطريات في منابت غير عميقة في زجاجات، ولكن تستخدم الآن المزارع المغمورة حيث يلحق المخمر باللقاح بمعدل 2% - 5% من حجمه.
- تهوية مستمرة بالهواء المعقم مع التقليب خلال فترة التخمير لعدة أيام عند درجة حرارة 22- 27 م°.

التحريك والهواء والمغذيات تساعد على تنشيط النمو.

يلاحظ ان قيمة pH في بداية الانتاج تكون ثابتة ثم تبدأ في الارتفاع الى ان تصل الى (7 - 7,5) وهي ال pH المناسبة للانتاج ويجب ان تظل ثابتة الى نهاية الإنتاج.

سؤال... ما سبب ارتفاع pH ؟

- استخلاص الناتج Product recovery

- بعد انتهاء فترة التخمير والوصول الى اقصى كمية ممكنة من المضاد الحيوي تم تكوينها بفعل الفطر
- تفصل الكتلة الحيوية من نموات الفطر من المزرعة عن طريق الترشيح من خلال مرشح غشائي دوار يعمل بالتفريغ أو باستخدام اجهزة الطرد المركزي.
- يؤخذ الراشح ثم يبرد و تخفض درجة حموضته.
- يستخلص منه البنسلين بالمذيبات العضوية.
- يستخلص في صورة نقية عن طريق سلسلة من عمليات الاستخلاص مثل التنقية بالترسيب ثم الإذابة و الترسيب و الترشيح، ثم يركز و يبلور ثم يجفف و يعبأ.



هناك مجموعة من المضادات الحيوية الاخرى تنتج باستخدام طرق مشابهة لإنتاج البنسلين وتختلف باختلاف نوع الميكروب المستخدم وتركيب بيئة التخمير مثل:

المضاد الحيوي	الكائن الدقيق المنتج للمضاد الحيوي
Bacitracin	<i>Bacillus subtilis</i>
streptomycin	<i>Streptomyces griseus</i>
Fumagellin	<i>Aspergillus funigatus</i>

سؤال... لا يصل الانتاج الكيميائي للمضادات الحيوية لمنافسة الانتاج الميكروبي ... لماذا؟؟؟