

## ПЕРСПЕКТИВНІСТЬ ЗАСТОСУВАННЯ СУЧАСНИХ ФІЛЬТРУЮЧИХ ЕЛЕМЕНТІВ У ВИРОБНИЦТВІ АНТИБІОТИЧНОЇ РЕЧОВИНИ ПІОЦІАНИНУ БІОТЕХНОЛОГІЧНИМ МЕТОДОМ

### Повідомлення 1

Калюжная О.С., Івахненко О.Л., Стрілець О.П.

Національний фармацевтичний університет, м. Харків, Україна

**Вступ.** На сьогоднішній день широковідомою є проблема резистентності інфекційних агентів до антибіотиків, тому гостро постало питання пошуку нових антимікробних засобів. Перспективною антибіотичною субстанцією є сполука феназинового ряду – піоціанін (5-метіл-L-гідроксіфеназин) [4], яка продукується бактерією *Pseudomonas aeruginosa* в процесі її природної життєдіяльності. З літературних джерел відомий механізм дії антибіотиків феназинового ряду: мають здатність легко проникати всередину бактеріальних клітин і вступати в окисно-відновні реакції, приймаючи електрони від глутатіону і NADH, перетворюючись у відносно стабільні аніони, дані речовини викликають генерацію активних форм кисню ( $O^{2-}$ ,  $OH^-$  і  $H_2O_2$ ), результатом чого є індукція окисного стресу і подальша загибель мікроорганізмів. Дана антибіотична речовина проявляє високу активність щодо бактерій *Bacillus subtilis*, *Moraxella lacunata*, *Shigella flexneri* та інших грампозитивних, грамнегативних мікроорганізмів і грибів [4].

На сьогоднішній день основним перспективним способом отримання антибіотиків є біосинтез, що здійснюється шляхом ферментації відповідного продуценту, а завершальною стадією будь-якого біотехнологічного виробництва є виділення цільового продукту з культурального середовища різними методами, у тому числі й фільтрацією, з подальшим очищенням [3].

У реалізації процесу фільтрації велика увага приділяється вибору фільтруючого матеріалу, який має суттєвий вплив на якість фільтрації і на продуктивність фільтруючого обладнання. Серед великої кількості запропонованих на ринку конструкцій фільтрів та фільтроелементів різного складу, ми зупинились на нешироко розповсюджених на сьогоднішній день у біотехнології фторопластових фільтруючих елементах. Невисока вартість і хороша експлуатаційна якість (тривалий ресурс роботи при високій продуктивності процесу) робить їх конкурентноздатними, а використання у технологічних схемах фільтрації представляється оптимальним по співвідношенню ціна-якість [2].

**Метою** нашої роботи є дослідження можливості використання фторопластових фільтруючих елементів у виробництві перспективної антибіотичної субстанції піоціаніну методами біотехнології.

**Об'єкти та методи дослідження.** Об'єктами дослідження є продуцент піоціаніну *Pseudomonas aeruginosa* та фторопластові фільтруючі елементи типу ФЕП (фільтруючі елементи пористі).

Клітини продуцента – дрібні грамнегативні палички (0,3-0,6) мкм, поодинокі або з'єднані парами, мають 1-2 полярно розташованих джгутика,

рухливі, спор не утворюють, мають пілі (фімбрії). Культивууючи *P. aeruginosa* отримували культуральну рідину із піюціаніном, що використовувалась як модельний зразок для фільтрації. Піюціанін – темно-синій водорозчинний пігмент, має форму темно-синіх голчастих кристалів, Тпл 133 °С, добре розчинний у хлороформі, гарячій воді, етиловому спирті, ацетоні; окислена форма пофарбована в синій колір, відновлена – безбарвна [4].

Фторопластові фільтруючі елементи типа ФЕП (вид – диск, діаметр – 90 мм, висота – 4,6 мм; тонкість фільтрації – 1 та 5 мкм,) надані за договором про наукову співпрацю із кафедрою технології матеріалів ННІ Технічного сервісу Харківського національного технічного університету сільського господарства ім. Петра Василенка. Серед головних характеристик політетрафторетилена або фторопласту слід виділити широкий діапазон механічних та діелектричних властивостей, високий рівень електричної міцності і низький коефіцієнт тертя, зносу. Співробітниками кафедри ХНТУСГ був розроблений метод виробництва фільтруючих елементів на основі фторопласту, який полягає у формуванні пор певного розміру за рахунок змішування суміші фторопласту з пороутворювачем (NaCl), її запікання для стійкості форми, а потім ретельного послідууючого вимивання пороутворювача [2]. Завдяки використанню цього методу вартість виробу суттєво зменшується.

Нас зацікавили відомості авторів про високі регенеруючі властивості фільтроелементів на основі фторопласту та їх висока продуктивність, що й було обґрунтуванням вибору даного виробу в якості об'єкту досліджень з метою пошуку шляхів використання у біотехнологічних процесах.

Вивчення можливості застосування фільтруючих елементів на основі фторопластів базувалося на проведенні процесу фільтрації культуральної рідини продуцента за різних умов та підрахунку кількості клітин до і після фільтрації. При цьому постійно проводили контроль наявності саме клітин модельного зразка та відсутності сторонніх та вивчення антимікробних властивостей класичними мікробіологічними методами.

**Основні результати.** Піюціанін можна отримати як хімічним, так і біотехнологічними методами. Хімічний метод є складним багатадійним процесом та на сьогоднішній день використовується в лабораторних умовах для отримання досить невеликих об'ємів речовини. При цьому використовуються дорогі і токсичні речовини, які можуть залишитися в кінцевому продукті у формі домішок, крім того реакція проходить при високих температурах протягом тривалого часу, що є економічно не вигідним.

На відміну від цього біотехнологічний метод отримання піюціаніну є більш простим, безпечним та вигідним. *P. aeruginosa* – продуцент піюціаніна – невибагливий, добре розвивається на середовищах загального призначення, культивування проводять при 30 °С протягом 168 год в умовах аерації [4]. Піюціанін є екзопродуктом, тобто виділяється безпосередньо в культуральну рідину. Таким чином проаналізувавши дані літератури була складена технологічна схема отримання піюціаніну біотехнологічним методом (див. рисунок 1), за якою проведений процес ферментації до стадії отримання культуральної рідини, яку вже й використовували як модельний зразок для

фільтрації у подальших експериментах.

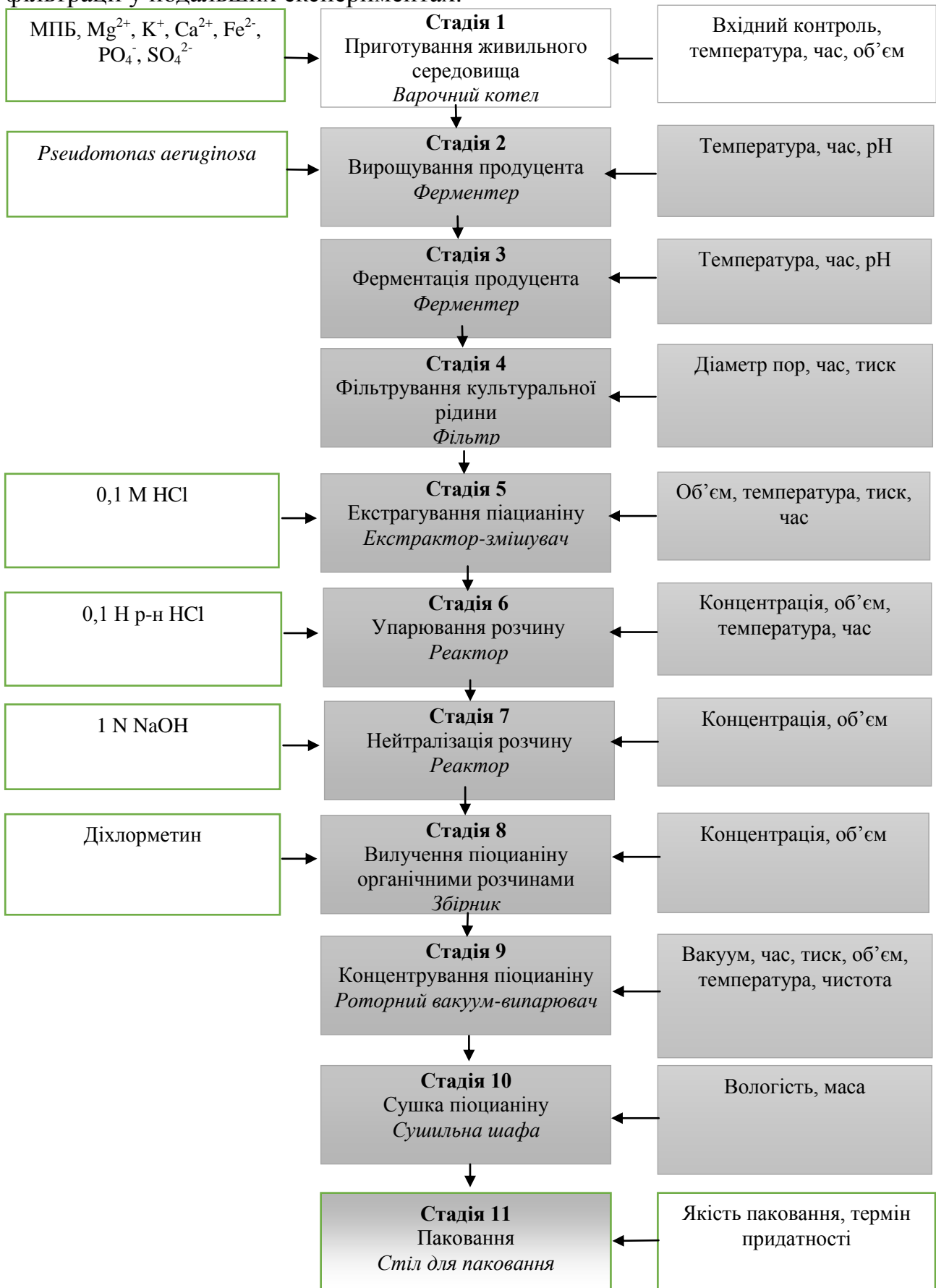


Рис. 1. Загальна технологічна схема отримання піоціаніну біотехнологічним методом

Застосуванню пористих фільтруючих елементів у промисловості передуює велика кількість досліджень з визначенням, в першу чергу, проникності, або пропускну здатності пористих матеріалів, яка обумовлена будовою пористого тіла. Проникність є основою фізичною величиною, яка визначається як швидкість, з якою рідина (або газ) проходить скрізь одиницю площі або одиницю товщини зразка матеріалу при певному тиску та основана на застосуванні закону Пуазейля стосовно течії рідини по капілярах [1].

Слід відмітити, що за цим законом на проникність впливає багато чинників, перш за все склад рідини, що фільтрується (її в'язкість, густина), тиск на вході та виході, довжина та структура капілярів або пор тощо. Також слід зауважити, що на сьогоднішній день як у вітчизняній, так і закордонній літературі існує багато підходів та математичних моделей як до вивчення проникності, так й до інших показників ефективності фільтрації [3]. Вже на основі проникності визначається продуктивність матеріалу, життєвий цикл матеріалу, регенеруючи властивості тощо [1]. Також, хотілось б відзначити, що багато коефіцієнтів та показників визначається експериментальним шляхом для кожного конкретного випадку. У цьому повідомленні зупинимось лише на експериментальному обґрунтуванні можливості використання пористих фільтруючих елементів на основі фторопласту мікробіологічними методами.

Таблиця 1

Кількість клітин *P. aeruginosa* у рідині до та після фільтрації\*

| Кількість процесів фільтрації, що проведені крізь один і той же елемент** | Кількість клітин, КУО***/мл |                              |
|---|-----------------------------|------------------------------|
|   | Після фільтрації            | Контроль (до фільтрації)**** |
| 1   | 117±3                       | 0,5×10 <sup>9</sup>          |
| 2   | 101±1                       |                              |
| 3   | 108±5                       |                              |
| 4   | 102±3                       |                              |
| 5   | 96±7                        |                              |
| 6   | 100±9                       |                              |
| 7   | 108±10                      |                              |
| 8   | 95±8                        |                              |
| 9   | 10±1                        |                              |
| 10  | 10±1                        |                              |

Примітки: (M±m) – довірчий інтервал; \* – товщина фільтрації 1 мкм, товщина h=6 мм; \*\* – площа фільтруючого елемента (із зневагою «мертвого» простору, що утворився від суперклею на межі шприцу та фільтруючого елемента); d = 19 мм; \*\*\* – колонієутворюючі одиниці (визначали, як середньоарифметичне значення для 3-х паралельних чашок); \*\*\*\* – вибір початкової концентрації обумовлений стандартом каламутності на 5 ОД (відповідно 0,5 млрд. клітин в 1 мл).

Обґрунтування можливості використання пористих фільтруючих матеріалів на основі фторопласту будували на визначенні та порівнянні кількості клітин обраних нами модельних мікроорганізмів у культуральній рідині до фільтрації (контроль) та після фільтрації крізь смонтований у шприці фторопластовий матеріал, а для підтвердження тривалого ресурсу використання визначення кількості клітин після серії фільтрацій проводили крізь один й той самий елемент. Всі дослідні проводили в асептичних умовах

ламінарного боксу зі стерильним посудом та попередньо обробленими шприцами з вмонтованими фільтроелементами. Паралельно у всіх дослідах контролювали чистоту культури, тобто наявність у фільтраті тільки *P. aeruginosa* та відсутність сторонньої мікрофлори.

Результати досліджень (табл. 1) показали, що у порівнянні із контролем кількість клітин після фільтрації суттєво зменшилась; також бачимо, що зі збільшенням кількостей процесу фільтрації кількість клітин після фільтрації зменшується, але це не є статистично значущим фактом та може бути обумовлено утворенням додаткового фільтруючого шару із клітин, що просторово допомагали затримувати інші клітини.

Таким чином, визначення ефективності фільтрації культуральної рідини *P. aeruginosa* крізь фторопластові фільтри, показало значно меншу кількість клітин у фільтраті із збереженням проникності фільтроелементу після серії фільтрацій.

**Висновки.** Враховуючи, що піоціанін не вимагає особливих умов культивування продуцента, простий у виділенні, досить стійкий та може стати ефективним антибіотиком, та дані, що отримані у дослідженнях, можна рекомендувати продовжувати дослідження з визначення перспективності використання фторопластових фільтроелементів для біотехнологічних цілей.

#### Список літератури

1. Жужиков В. А. Фильтрование: Теория и практика разделения суспензий / В. А. Жужикова. – М.: Химия. – 1980. – 400 с.
2. Калюжный А. Б. Формирование структуры и свойств высокопористых материалов на основе фторопласта-4 / А. Б. Калюжный, В. Я. Платков // Тр. Междунар. конф. «XIV Петербургские чтения по проблемам прочности» - Санкт-Петербург, 2003. - С. 233.
3. Османов В. К. Методы выделения и очистки продуктов биотехнологических производств / В. К. Османов, О. В. Бирюкова, А. В. Борисова. - Нижний Новгород, 2005. - 27 с.
4. Хохлова И. Ю. Выделение и исследование абиотической активности метаболита *Pseudomonas aeruginosa* пиоцианина // IX международная конференция студентов и молодых ученых «Перспективы развития фундаментальных наук», 2012.