

**ONLINE CLASS : INDUSTRIAL & ENVIRONMENTAL MICROBIO**

**ON -02.09. 2020 BY DEPARTMENT OF BOTANY, GGDC AT KALIGANJ**

**FOR 5TH SEMESTER HONS/DSC**

**TOPIC- INDUSTRIAL  
MICROBIOLOGY**

**PENICILLIN**

**PRODUCTION**

# PENICILLIN Fermentation

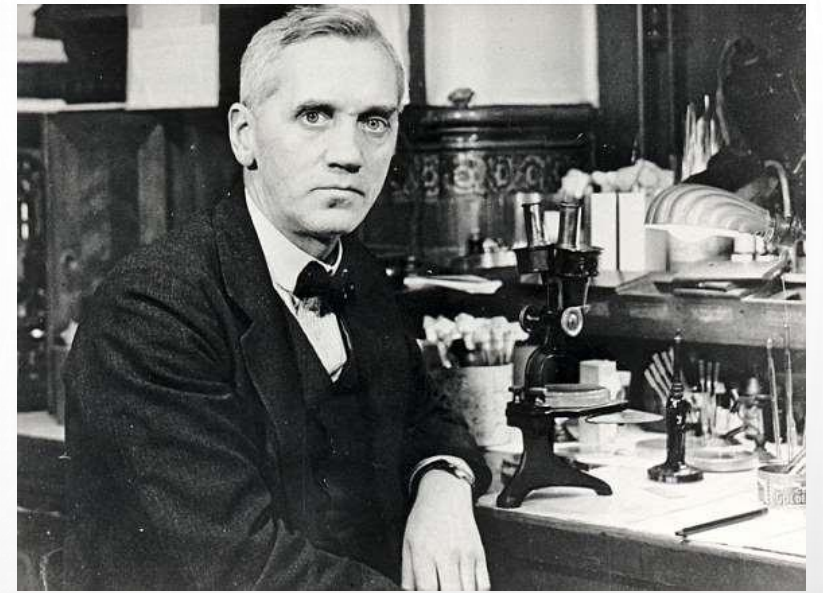
---

পেনিসিলিন ফার্মেন্টেশন

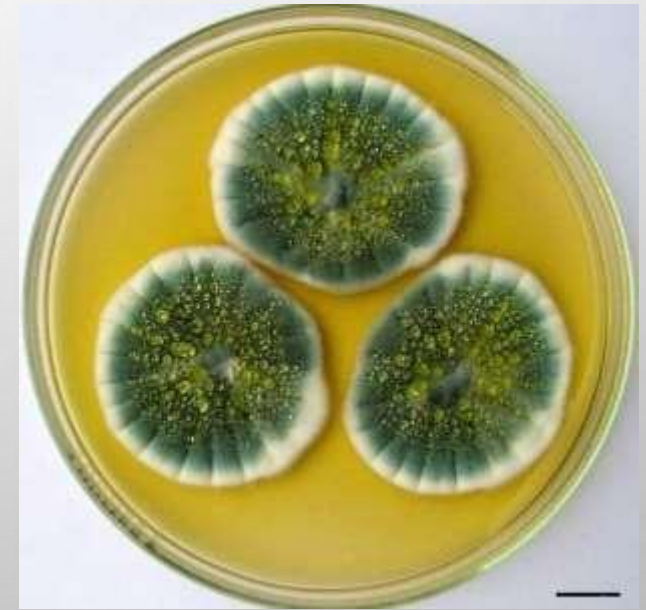
# PENICILLIN.

- PENICILLIN IS A NATURALLY OCCURRING ANTIBIOTIC.
- IT IS OBTAINED FROM A FUNGUS CALLED *Penicillium notatum* & *P. chrysogenum*.
- IT WAS THE FIRST ANTIBIOTIC TO BE DISCOVERED.
- IT WAS FIRST DISCOVERED BY ALEXANDER FLEMING IN 1928.

- পেনিসিলিন প্রাকৃতিকভাবে পাওয়া অ্যান্টিবায়োটিক।
- এটি *Penicillium notatum* এবং *P. chrysogenum* নামক ছত্রাক থেকে পাওয়া যায়।
- এটি প্রথম অ্যান্টিবায়োটিক, যা আবিষ্কার করা হয়েছিল।
- এটি প্রথম আবিষ্কার করেছিলেন আলেকজান্ডার ফ্লেমিং 1928 সালে।

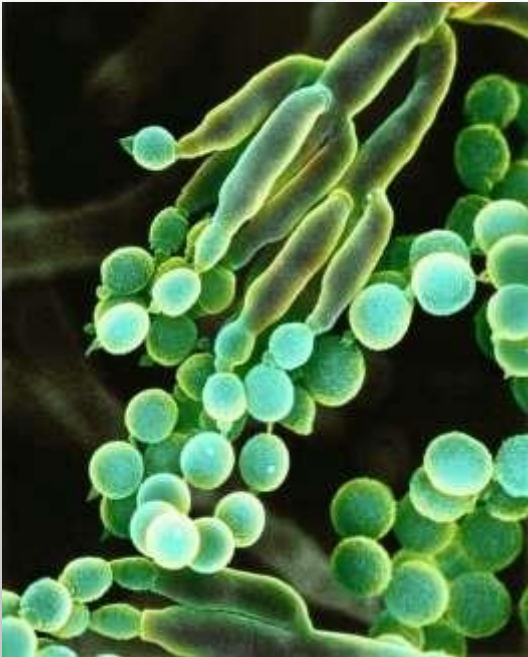


Alexander Fleming

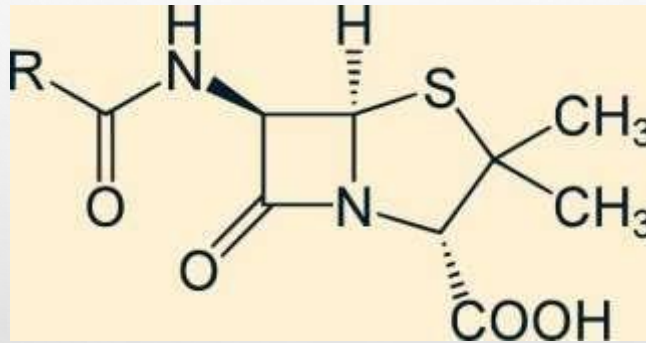


Penicillium Chrysogenum mold

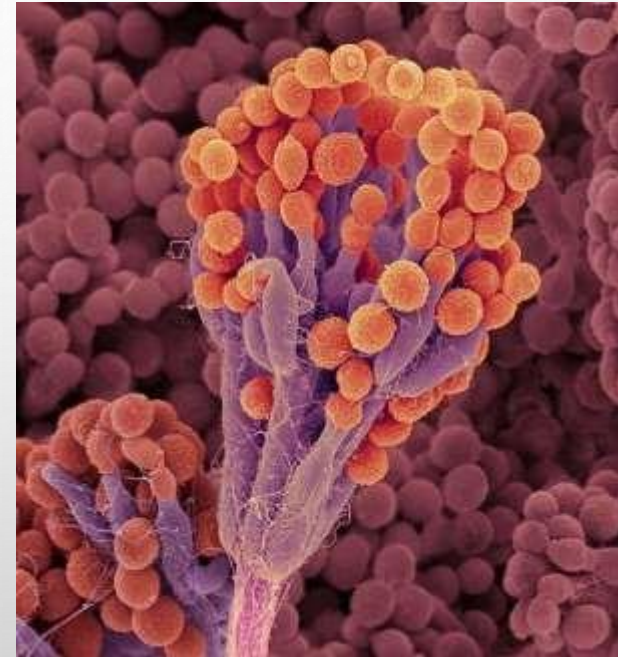
- It was the first Antibiotic to be produced on a Large scale during World War II.
- দ্বিতীয় বিশ্বযুদ্ধের সময় এটি বৃহৎ আকারে উৎপাদিত প্রথম অ্যান্টিবায়োটিক ছিল।



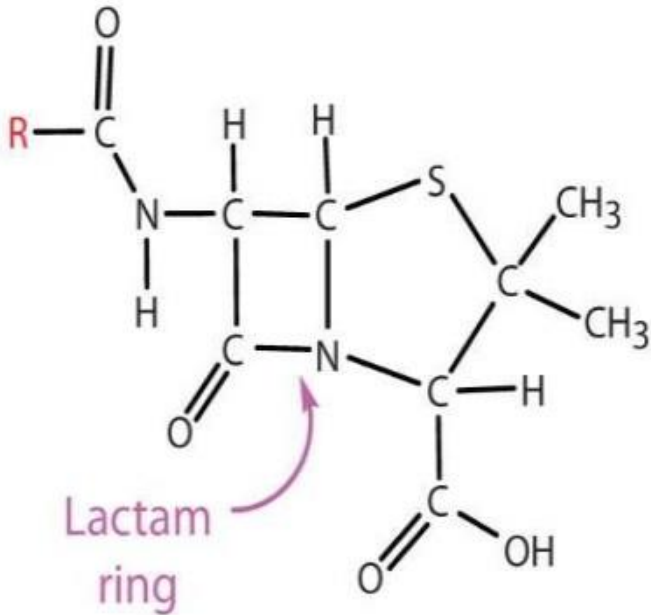
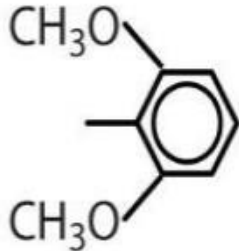
**Penicillium Chrysogenum**



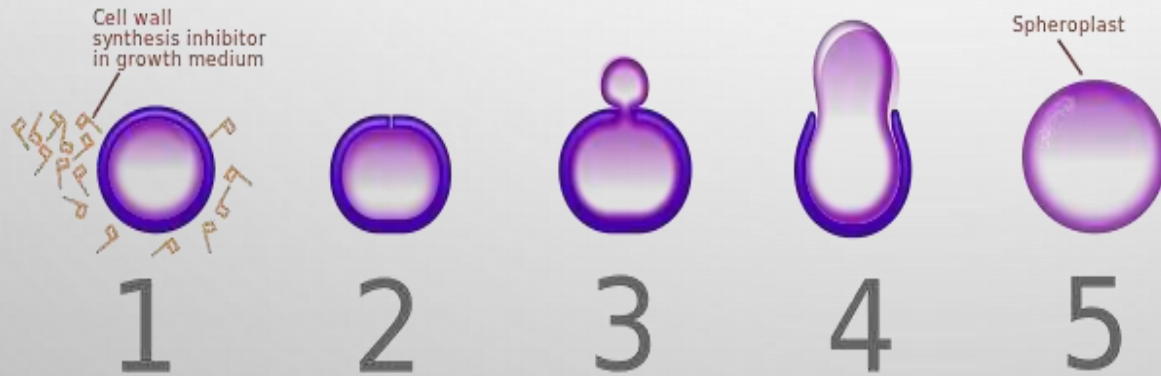
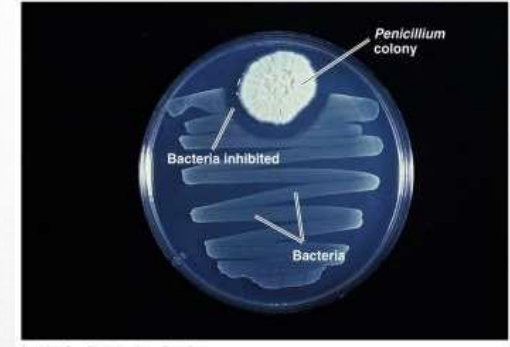
**General structure**



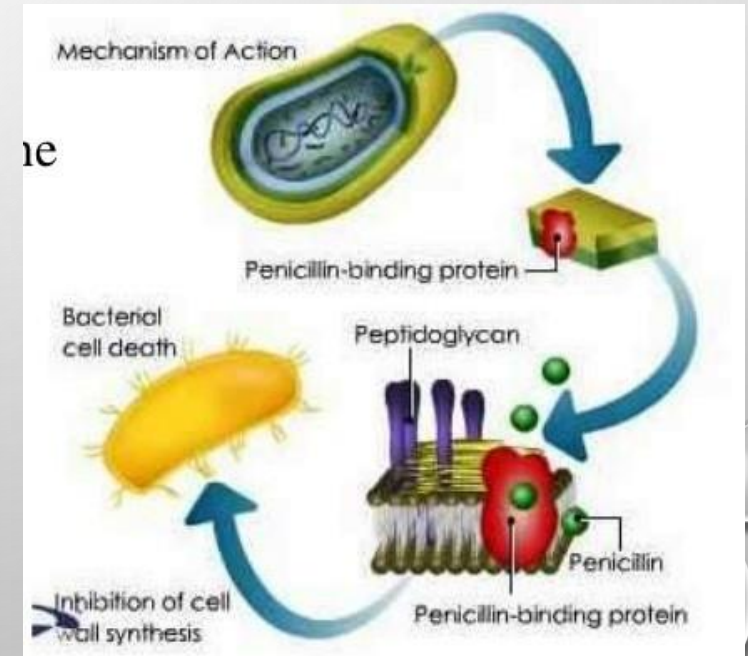
**Penicillium notatum**

Penicillin Structure	R Group	Drug Name
 <p data-bbox="563 1001 715 1120">Lactam ring</p>	$-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$	penicillin G
	$\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_5$	penicillin V
	$-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{C}_6\text{H}_5$	ampicillin
	$-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH}$	amoxicillin
		methicillin

- It is active against many gram positive bacteria.
- It kills the Bacterias by interfering with the cell wall synthesis of sensitive organisms.
- It is inactive against most Gram negative bacteria.
- এটি অনেকগুলি গ্রাম পজিটিভ ব্যাকটেরিয়ার বিরুদ্ধে সক্রিয়।
- সংবেদনশীল জীবের কোষ প্রাচীর সংশ্লেষণে হস্তক্ষেপ করে এটি ব্যাকটেরিয়াকে হত্যা করে।
- এটি বেশিরভাগ গ্রাম নেগেটিভ ব্যাকটেরিয়ার বিরুদ্ধে নিষ্ক্রিয়।



**Mechanism of Action of Penicillin**



# PENICILLIN PRODUCTION (HISTORY)

- It was until the 1939 when a group of scientists at Oxford University led by Howard Florey begin working to transform Penicillin into a life saving drug.
- By 1940 Florey's team had extracted and proven that penicillin could protect mice from Bacterial infection.
- By 1941 they used penicillin to successfully treat the first human patient.

- ১৯৩৯ সালের আগস্ট-হাওয়ার্ড ফ্লোরির নেতৃত্বে অক্সফোর্ড বিশ্ববিদ্যালয়ের একদল বিজ্ঞানী পেনিসিলিনকে জীবন রক্ষাকারী ওষুধে রূপান্তরিত করার কাজ শুরু করেছিলেন।
- 1940 এর মধ্যে ফ্লোরির দল বের করে প্রমাণ করেছিল যে পেনিসিলিন ইঁদুরকে ব্যাকটেরিয়া সংক্রমণ থেকে রক্ষা করতে পারে।
- 1941 সালে তারা সফলভাবে প্রথম মানব রোগীর চিকিৎসার জন্য পেনিসিলিন ব্যবহার করেছিল।



Howard Florey

# PENICILLIN PRODUCTION (উৎপাদন).

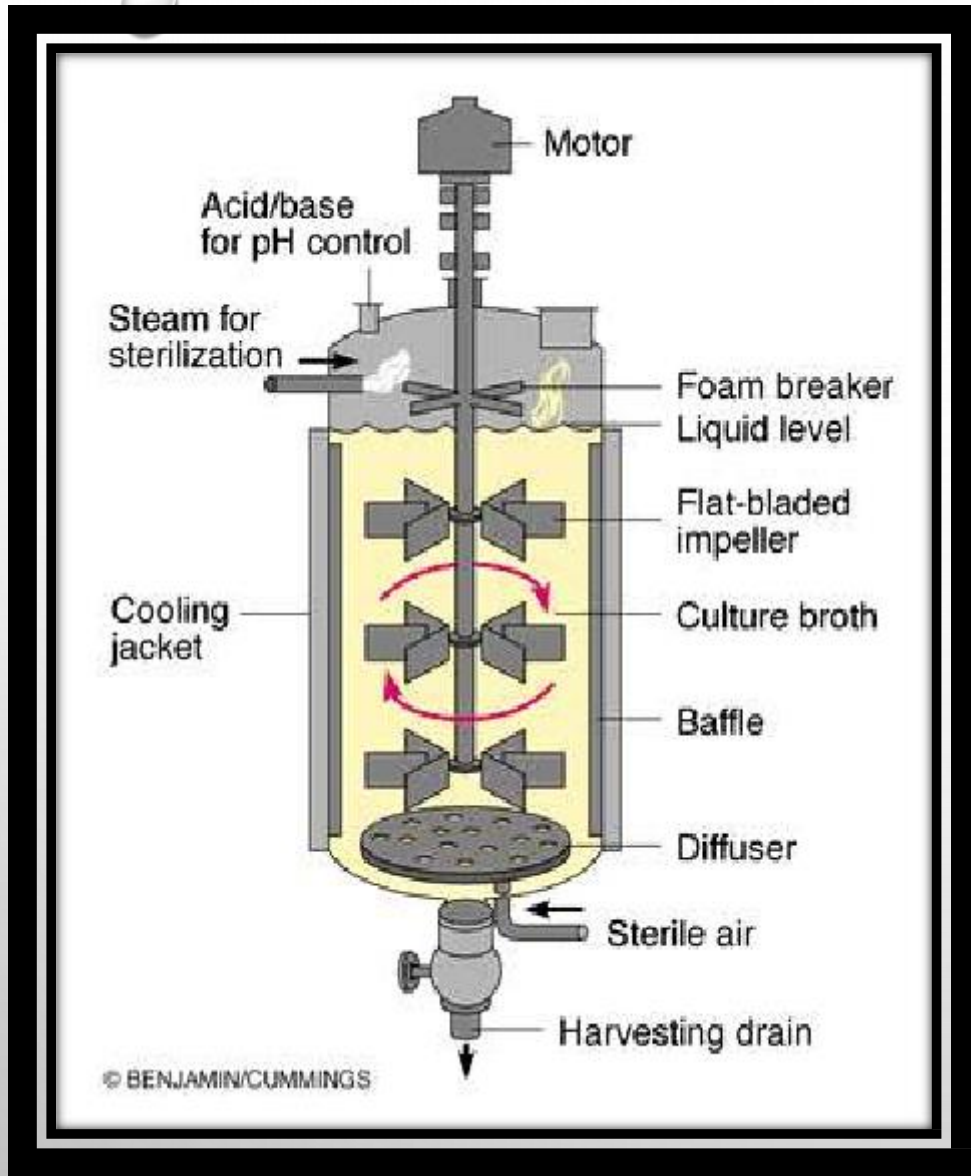
- Penicillin was first commercially produced by using Stationary mat culture method. But this technique was having a lot of problems. There were many chances of contamination of broth during its harvesting.
- পেনিসিলিন স্টেশনারি mat culture পদ্ধতি ব্যবহার করে প্রথমে কমার্শিয়ালি উৎপাদিত হয়েছিল। তবে এই কৌশলটিতে প্রচুর সমস্যা ছিল। harvesting-র সময় Media-র দূষণের অনেক সম্ভাবনা ছিল।



Stationary Mat culture vessels (Heatley designed vessels)



- After this the “Deep tank Aerated” Fermentation technique was developed and it became apparent that this tech is the most promising for Commercial production.
- This tech is still applied and Practiced till date. This process takes place using a Fermenter.
- এর পরে "ডিপ ট্যাঙ্ক বায়ুযুক্ত" Fermentation কৌশলটি বিকাশ করা হয়েছিল এবং এটি স্পষ্ট হয়ে উঠেছে যে এই প্রযুক্তিটি বাণিজ্যিক উত্পাদনের জন্য সবচেয়ে প্রতিশ্রুতিবদ্ধ।
- এই প্রযুক্তিটি এখনও প্রয়োগ করা হয় এবং আজ অবধি অনুশীলন করা হয়। এই প্রক্রিয়াটি Fermenter ব্যবহার করে হয়।



A Fermenter

# 1) MOLD PREPARATION :

- Desirable mold with high yielding capacity is selected.
- These desirable molds are obtained by mutagenic treatments of the fungus.
- These desired strains are stored in dormant condition
- Lyophilized or soil suspension formation
- উচ্চ ফলন ক্ষমতা সহ পছন্দসই mold নির্বাচন করা হয়।
- এই কাঙ্ক্ষিত mold গুলি ছত্রাকের মিউটেজেনিক ট্রিটমেন্ট দ্বারা প্রাপ্ত হয়।
- এই পছন্দসই স্ট্রেনগুলি সুপ্ত অবস্থায় সংরক্ষণ করা হয়
- লাইওফিলাইজড বা মাটি স্থগিতকরণ গঠন

## 2) MEDIA PREPARATION AND ITS COMPOSITION.

- The media is designed to provide the organism with desired nutrients.
- The exact composition of the Penicillin media actually used in industries are difficult to determine as these are considered Company's trade secrets.
- But a Typical media suggested by Coghill and Moyer are as follows....
- মিডিয়া প্রাণীর পছন্দসই পুষ্টি সরবরাহ করার জন্য ডিজাইন করা হয়েছে। শিল্পগুলিতে বাস্তবে ব্যবহৃত পেনিসিলিন মিডিয়াগুলির সঠিক রচনা নির্ধারণ করা কঠিন কারণ এগুলি কোম্পানির ব্যবসায়ের গোপনীয়তা হিসাবে বিবেচিত হয়। তবে কোঘিল এবং ময়ারের প্রস্তাবিত একটি সাধারণ মিডিয়া নিম্নরূপ...

# MEDIA COMPOSITION

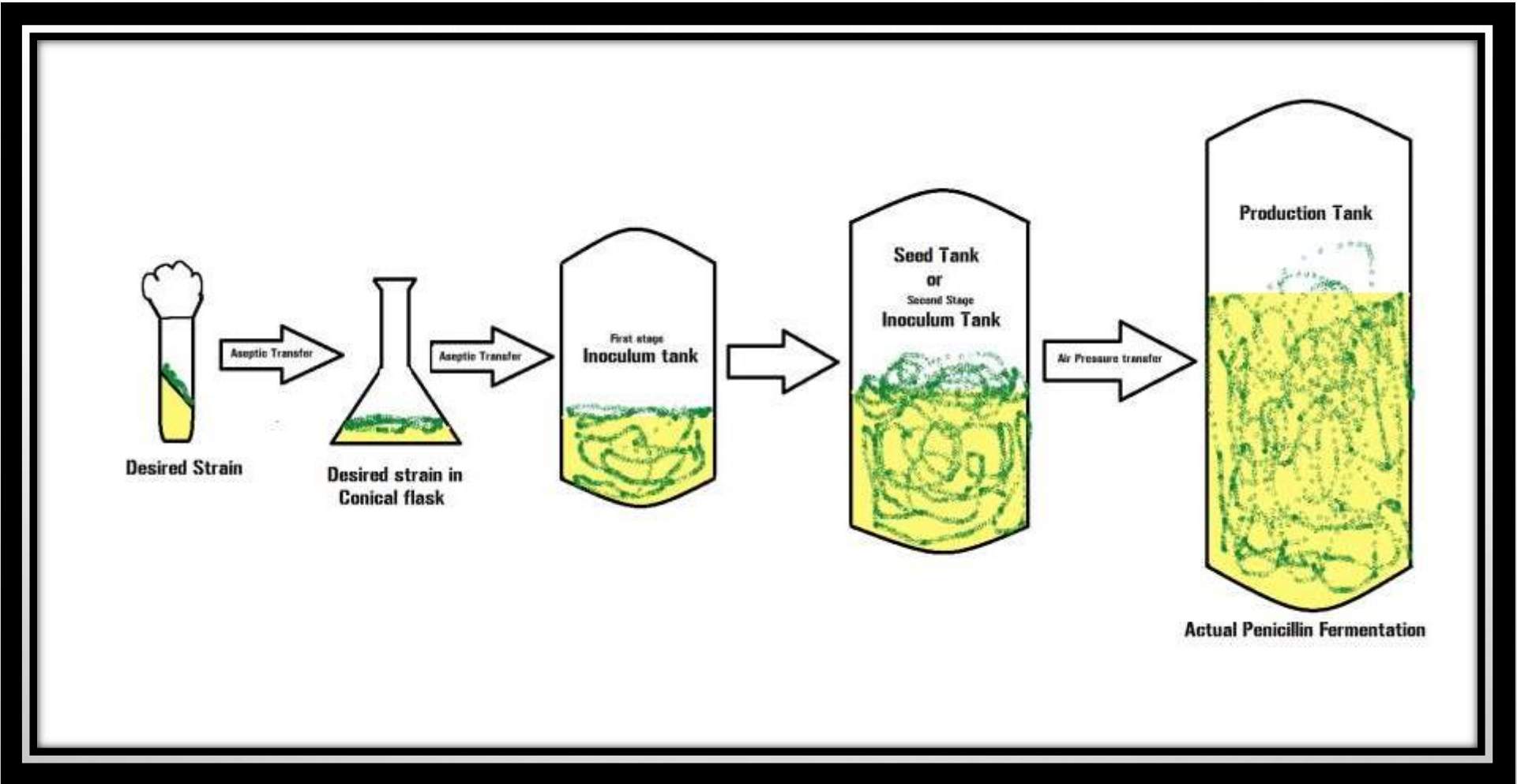
<b>Components</b>	<b>Contents %</b>
1) Cornsteep Liquor	3.5%- 8.5%
2) Lactose (Carbon source)	1-3.5%
3) Glucose (Carbon source)	1%
4) Calcium carbonate	1%
5) Sodium nitrate (N2 source)	0.3 to 0.5%
6) Potassium di hydrogen phosphate (Mineral source)	0.4%
7) Ammonium sulphate (Minerals source)	0.2 to 0.5%
8) Edible oils (Antifoaming)	0.25%
9) Precursors	
10) pH	5.5 to 6.0

# PRECURSORS....

- Used for increasing the yeild of Penicillin.
- There are different types of Penicillin like Penicillin G, Penicillin V, Penicillin X, etc....
- They decides the type of penicillin to be Produced.
- Ex : Phenyl acetic acid = Penicillin G. Phenoxy acetic acid = Penicillin V.
- পেনিসিলিনের উত্পাদন বাড়ানোর জন্য ব্যবহৃত হয়। বিভিন্ন ধরনের পেনিসিলিন রয়েছে যেমন পেনিসিলিন জি, পেনিসিলিন ভি, পেনিসিলিন এক্স, ইত্যাদি...। তারা যে পেনিসিলিন তৈরি করতে হবে তা নির্ধারণ করে। উদাঃ ফেনিল এসিটিক এসিড = পেনিসিলিন জি। ফেনোক্সি এসিটিক এসিড = পেনিসিলিন ভি।

### 3) INOCULUM PREPARATION.

- Here the Prime aim is to prepare pure inoculum of the selected species.
- Stored spores from the desired strain are taken.
- A suspension is prepared by mixing the spores in a Non-Toxic wetting agent (Sodium lauryl sulphate).
- Spore suspension is added to a flask with media and incubated at 24c for 6 to 7 days.
- Spores from these flasks are directly used to inoculate the “Inoculum Tank” for 48 to 50 hrs.
- From this it is directly added to the “Production Tank”.
- এখানে প্রধান লক্ষ্যটি নির্বাচিত প্রজাতির বিশুদ্ধ ইনোকুলাম প্রস্তুত করা। পছন্দসই স্ট্রেন থেকে সংশ্লিষ্ট স্পোর নেওয়া হয়। অ-বিষাক্ত ভেজা এজেন্ট (সোডিয়াম লরিল সালফেট) এর বীজগুলিকে মিশিয়ে একটি সাসপেনশন তৈরি করা হয়। স্পোর সাসপেনশনটি মিডিয়াতে ফ্লাস্কে যুক্ত করা হয় এবং 24 থেকে 24 দিনের মধ্যে 6 থেকে 7 দিনের জন্য incubate করা হয়। এই ফ্লাস্কগুলি থেকে স্পোরগুলি 48 থেকে 50 ঘন্টা পর্যন্ত "ইনোকুলাম ট্যাঙ্ক" ইনোকুলেট করার জন্য সরাসরি ব্যবহৃত হয়। এটি থেকে এটি সরাসরি "উৎপাদনের ট্যাঙ্ক" এ যুক্ত হয়।



**Inoculum Preparation Process (Penicillin)**

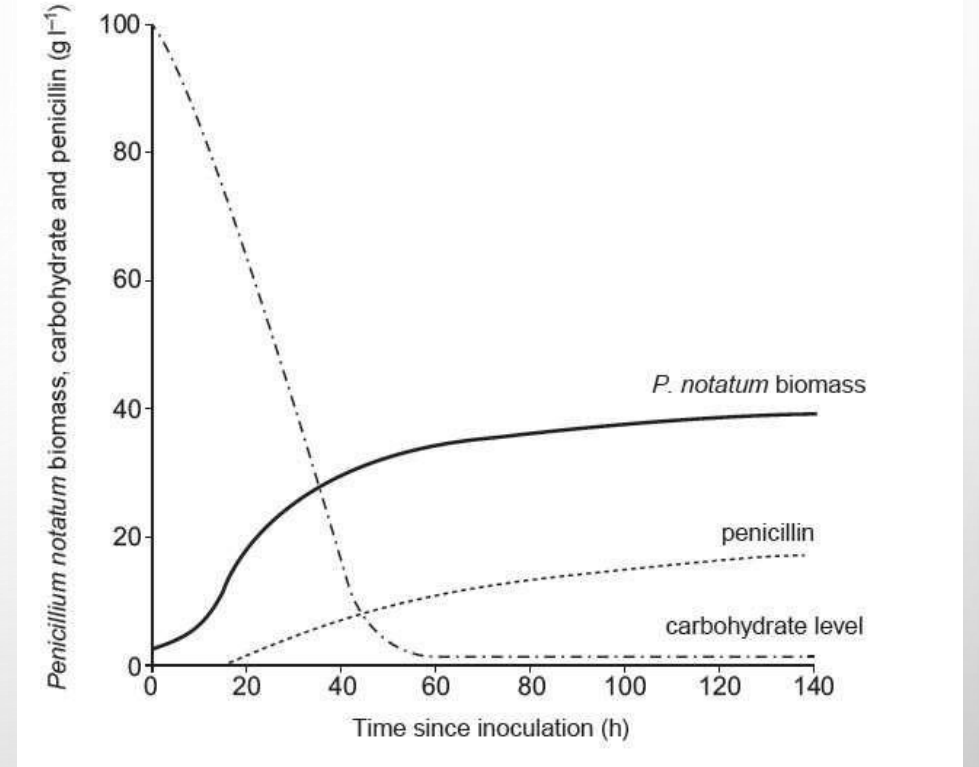


## 4) FERMENTATION PROCESS....

- Inside the Production fermenter the actual penicillin fermentation takes place.
- The Fermenter is Incubated at about 25c to 26c for about 5 to 7 days.
- During the first 20 to 30 hours the utilization of Carb and Corn steep takes place, due to this fungal growth becomes thick & heavy.
- Penicillin yield during 48 to 96 hrs. is very low or nothing.
- The yield increases at the time of stress when resources are very low.
- প্রোডাকশন ফার্মেন্টারের ভিতরে প্রকৃত পেনিসিলিন ফার্মেন্টেশন হয় takes ফার্মেন্টার প্রায় 5 থেকে 7 দিনের জন্য প্রায় 25c থেকে 26c এ সঞ্চারিত হয়। প্রথম 20 থেকে 30 ঘন্টা চলাকালীন কার্ব এবং কর্ন streep ব্যবহার হয়, ছত্রাকের কারণে বৃদ্ধি ঘন ও ভারী হয়ে যায়। 48 থেকে 96 ঘন্টা সময়কালে পেনিসিলিনের ফলন হয়। খুব কম বা কিছুই না। চাপের সময় ফলন বৃদ্ধি পায় যখন সংস্থানগুলি খুব কম থাকে।

- During this whole production, periodic samples are taken from fermenter for the determination of penicillin yield and contamination checks.

- এই পুরো উত্পাদন চলাকালীন সময়ে পেনিসিলিন ফলন এবং দূষণের চেক নির্ধারণের জন্য পর্যায়ক্রমিক নমুনাগুলি fermenter থেকে নেওয়া হয়।



## 1<sup>st</sup> Phase

- Low yeild
- Lactic acid utilized at maximum rate
- Ammonia rise pH

## 2<sup>nd</sup> Phase

- Intense production
- Mycelium mass increases
- pH unchanged

## 3rd Phase

- Antibiotic conc. Decreases
- Autolysis of Mycelium

## 4<sup>th</sup> Phase

- After 7 days cycle whole batch is harvested for recovery.

## প্রথম পর্যায়

- কম উত্পাদন
- ল্যাকটিক অ্যাসিড সর্বোচ্চ হারে ব্যবহার করা হয়
- অ্যামোনিয়া পিএইচ বৃদ্ধি

## দ্বিতীয় পর্যায়

- তীব্র উত্পাদন
- মাইসেলিয়াম ভর বৃদ্ধি পায়
- অপরিবর্তিত pH

## তৃতীয় পর্যায়

- অ্যান্টিবায়োটিক ঘনত্ব হ্রাস
- মাইসেলিয়ামের অটোলিসিস

## চতুর্থ পর্যায়

- 7 দিন পরে পুরো চক্রটি পুনরুদ্ধারের জন্য কাটা হয়।

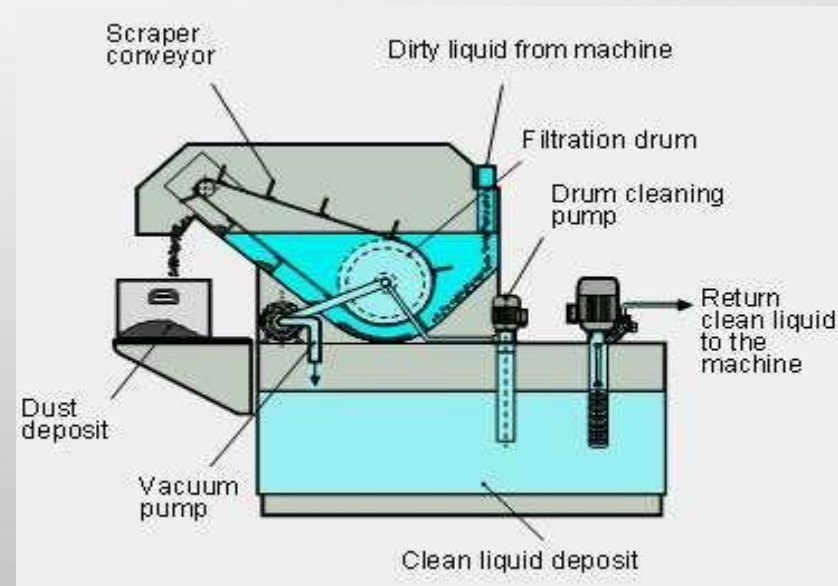
# 5) HARVEST & RECOVERY.

- After the completion of fermentation Media or the Broth contains penicillin in it and this needs to be extracted through separation as follows:

1. First the broth is filtered in a “Rotary vacuum filter” to remove the mycelia.

fermentation

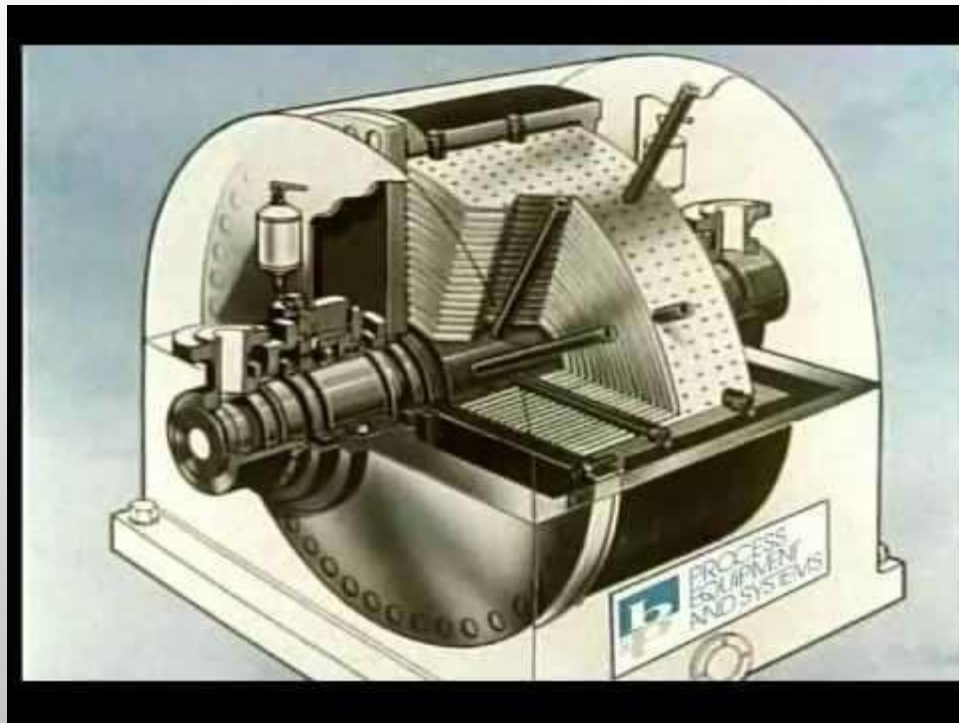
সম্পন্ন হওয়ার পরে মিডিয়া বা ব্রোথ এতে পেনিসিলিন ধারণ করে এবং এটি পৃথকীকরণের মাধ্যমে নিম্নোক্তভাবে বের করা দরকার: 1. প্রথমে ব্রোথটি মাইসেলিয়া অপসারণ করতে একটি "রোটোরি ভ্যাকুয়াম ফিল্টার" এ ফিল্টার করা হয়।



2. Sulfuric acid or phosphoric acid is added to lower the pH of broth to 2.5 to 2.
3. The broth is then soon transferred to “Counter current apparatus” or “Podbielnak extractor”.
4. In this extractor an organic solvent like, amyl acetate or butyl acetate is added.
5. This organic solvent separates the penicillin from the broth and penicillin moves inside this solvent.
6. Organic solvent containing penicillin is removed form the media by using separating funnel.

২) সালফিউরিক অ্যাসিড বা ফসফরিক এসিড যোগ করা হয় broth pH-কে 2.5 থেকে 2 এ নামিয়ে আনা হয়। ৩) এরপরেই খুব শীঘ্রই ব্রোথটিকে "কাউন্টার কারেন্ট যন্ত্রপাতি" বা "পডবিয়েলনাক এক্সট্রাক্টর" এ স্থানান্তরিত করা হয়। ৪) এই এক্সট্রাক্টরে একটি জৈব দ্রাবক যেমন, অ্যামিল এসিটেট বা বুটাইল এসিটেট যুক্ত হয়। ৫) এই জৈব দ্রাবকটি পেনিসিলিনকে ঝোল থেকে পৃথক করে এবং এই দ্রাবকের ভিতরে পেনিসিলিন সরানো হয়। ৬) পেনিসিলিনযুক্ত জৈব দ্রাবকগুলি আলাদা করে ফানেল ব্যবহার করে মিডিয়া তৈরি করে।

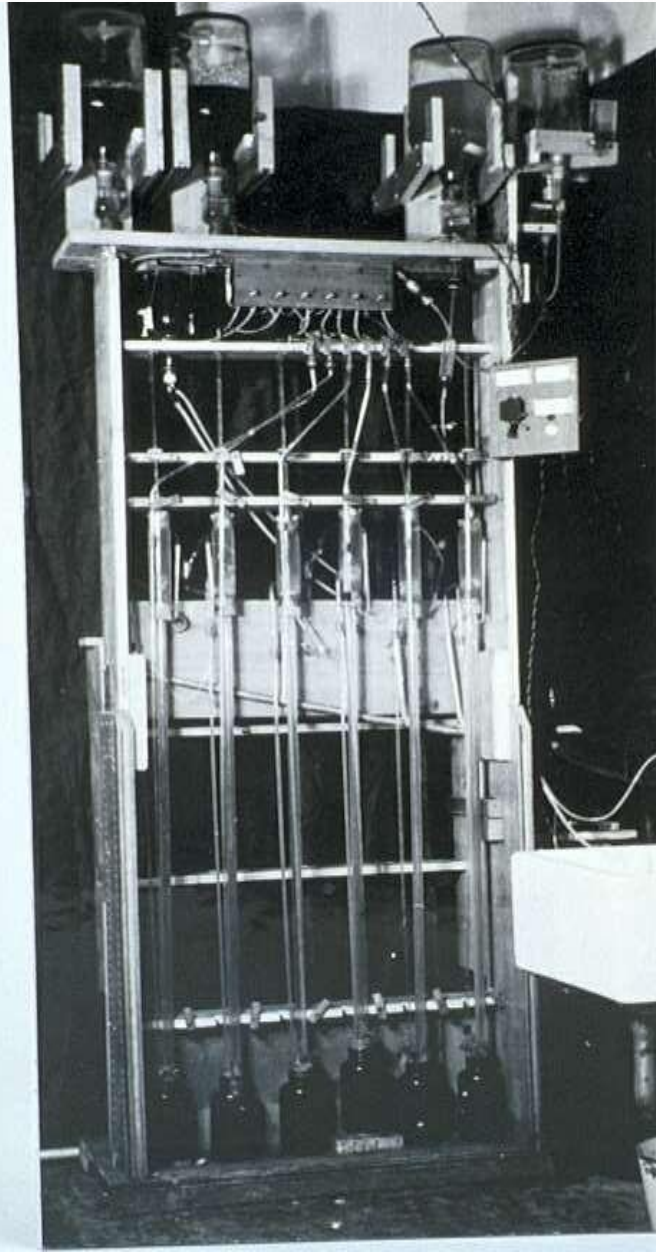
# THE PODBIELNIAK COUNTER CURRENT EXTRACTOR.



7. Water with an **alkali buffer** is added to the **amyl acetate solution**, due to this the Penicillin from organic solvent moves inside water.
8. This water is then separated from Organic solvent.
9. The water containing pure penicillin is transferred for **freeze drying process**, and pure Penicillin powder is obtained.

৭) অ্যালকালি বাফারের সাথে জল অ্যামিল অ্যাসিটেট দ্রবণে যুক্ত হয়, এর ফলে জৈব দ্রাবক থেকে পেনিসিলিন জল-এর অভ্যন্তরে চলে। ৮) এই জলটি তখন জৈব দ্রাবক থেকে পৃথক হয়। ৯) খাঁটি পেনিসিলিনযুক্ত জল Freeze drying প্রক্রিয়ার জন্য স্থানান্তরিত হয় এবং খাঁটি পেনিসিলিন পাউডার পাওয়া যায়।

# COUNTER CURRENT APPARATUS IN EARLY PERIOD





# PENICILLIN PRODUCTS...



Penicillin products during World War II



Penicillin Antibiotic Injection



Penicillin Antibiotic Tablets

# REFERENCES :

- Industrial Microbiology By : Casida.
- Industrial Microbiology By : A.H Patel.

**Power Point Source File-**

**By: Walid Hashmi**

**Department of Botany**

**Govt. Institute of Science Aurangabad**



THANK  
YOU