

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

Освітньо-професійна програма «Біотехнології: фармацевтична
промислова, харчова, природоохоронна»

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології
і мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

“ 04 ” квітня 20 22 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

СЕРЕДЕНКА Єгора Ігоровича

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біосинтез амфотерицину В *Streptomyces nodosus*

керівник роботи ВОРОНЦОВ Олександр Олександрович, к.т.н., доц.

(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від 30 березня 2022 року № 164-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 01.06.2022

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Streptomyces nodosus*, цільовий
продукт: амфотерицин В.

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) РОЗДІЛ 1.
Характеристика амфотерицину В. РОЗДІЛ 2. Характеристика *Streptomyces
nodosus*. РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування. РОЗДІЛ 4. Обґрунтування
вибору технологічної схеми РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання. РОЗДІЛ 6. Опис
технологічної схеми. РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва.

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема виробництва амфотерицину В – 2 аркуші формату А0.
Апаратурна схема виробництва амфотерицину В – 1 аркуш формату
А0.

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв

7. Дата видачі завдання 04 квітня 2022 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика амфотерицину В	04.04.2022 – 09.03.2022	Виконано
2	Характеристика <i>Streptomyces nodosus</i>	10.03.2022 – 20.03.2022	Виконано
3	Техніко-економічне обґрунтування	15.03.2022 – 30.03.2022	Виконано
4	Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва амфотерицину В	30.03.2022 – 10.04.2022	Виконано
5	Специфікація обладнання	08.04.2022 – 15.04.2022	Виконано
6	Опис технологічної схеми виробництва амфотерицину В	10.04.2022 – 20.04.2022	Виконано
7	Контроль виробництва амфотерицину В	20.04.2022 – 10.05.2022	Виконано
8	Оформлення пояснювальної записки	15.05.2022 – 25.05.2022	Виконано
9	Виконання графічної частини проекту	10.05.2022 – 20.05.2022	Виконано

Здобувач

_____ (підпис)

Єгор СЕРЕДЕНКО

_____ (ім'я та прізвище)

Керівник роботи

_____ (підпис)

Олександр ВОРОНЦОВ

_____ (ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробленню біотехнології виробництва полієнового макроліда амфотерицину В. Полієнові макроліди – це група природних протигрибкових препаратів, що мають фунгістатичну та фунгіцидну дію, яка проявляється шляхом інгібування синтезу стеролів патогенних грибків з подальшою перфорацією їх клітинної стінки і витоком поживних речовин і органел клітини гриба. Даний препарат призначений для лікування тяжких грибкових інфекцій, при яких інші препарати безсилі або малоефективні.

У даній кваліфікаційній роботі розраховане техніко-економічне обґрунтування річної потреби полієнового антибіотика амфотерицин В на території України для 10% важкохворих на грибкові інфекції. Розглядається технологія отримання полієнового макроліду амфотерицину В за допомогою мікроорганізму *Streptomyces nodosus D5-2M2A*.

Новизною є використання нового генно-інженерного штаму *Streptomyces nodosus D5-2M2A*, який дає змогу отримати вищу концентрацію цільового продукту (15,6 г/л), в порівнянні з іншими штамми-продуцентами та розробка нової схеми біосинтезу антибіотика. Розрахована потужність виробництва препарату – 1626 кг на рік. Технологічна схема виробництва амфотерицину В включає допоміжні роботи (підготовку повітря, приготування і стерилізацію поживних середовищ) та технологічний процес (підготовка посівного матеріалу та біосинтез полієнового макроліду амфотерицину В у ферментері об'ємом 10 м³). Технологія отримання препарату амфотерицину В передбачає дві стадії підготовки посівного матеріалу (колби на качалках, вирощування в інокуляторах на 10 л, 100 л, 1 м³).

Проект виробництва амфотерицину В складається зі вступу, 7 розділів, графічних матеріалів та списку використаної літератури з 33 найменувань. Загальний обсяг роботи – 95 сторінок, 7 рисунків, 21 таблиці, 2 креслення.

Ключові слова: полієновий макролід, амфотерицин В, *Streptomyces nodosus D5-2M2A*.

Зміст

РЕФЕРАТ	4
ЗМІСТ	5
ВСТУП.....	7
РОЗДІЛ 1. Характеристика амфотерицину В	10
РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика <i>Streptomyces nodosus</i>	13
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування	13
2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента	21
2.2.1. Морфолого-культуральні ознаки біологічного агента.....	21
2.2.2. Фізіолого-біохімічні ознаки	21
2.3. Таксономічний статус біологічного агента	22
РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування	23
3.1. Потреба у цільовому продукті	23
3.1.1. Аналоги амфотерицину В в Україні	25
3.2. Розрахунок потужності виробництва амфотерицину В	28
РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми	34
4.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу	34
4.1.1. Обґрунтування способу культивування і виробу ферментера	34
4.1.1.1 Вибір умов і способу культивування	34
4.1.1.2 Вибір типу ферментера	35
4.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря	35
4.1.3. Вибір миючих та дезінфікуючих засобів	38
4.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища	42
4.1.4.1 Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках	43
4.1.4.2 Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту інокуляторі об'ємом 10 л	44
4.1.4.3 Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в інокуляторі об'ємом 100 л	45

4.1.4.4 Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в інокуляторі об'ємом 1 м ³	45
4.1.4.5 Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу в ферментері об'ємом 10 м ³	46
4.1.4.6 Обґрунтування використання стрептоміцину при одержанні інокуляту та виробничому біосинтезі	46
РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання	50
РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми виробництва амфотерицину В.....	55
РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва амфотерицину В	67
7.1. Мікробіологічний контроль	76
7.1.1. Мікробіологічний контроль стерильності поживного середовища	76
7.1.2. Мікробіологічний контроль посівного матеріалу	76
7.2. Показники росту і синтезу цільового продукту	77
7.2.1. Концентрація біомаси	77
7.2.2. Визначення концентрації амфотерицину В методом ВЕРХ.....	77
7.2.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту	79
7.2.3.1. Визначення концентрації глюкози в культуральній рідині методом капілярного електрофорезу	79
7.2.3.2. Визначення вмісту джерела амінного азоту в культуральній рідині йодометричним методом по Попу і Стівенсу (мідним способом)	80
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ	83
ДОДАТОК 1	87

ВСТУП

Від початку ери антибіотиків в першій половині ХХ ст. силами вчених було створено тільки 3 класи протигрибкових ліків, які могли б рятувати життя від важких системних мікозів. До них належать полієни (серед яких варто згадати амфотерицин В), ехінокандини (мікафунгін) та азоли (для прикладу – флуконазол). Паралель можна провести між засобами для лікування ВІЛ-інфекції, яких існує вже 5 видів. При чому 2 із даних засобів створено уже на момент існування ехінокандинів. Розроблений наприкінці першої половини ХХ ст., амфотерицин В досі є головним препаратом для лікування криптококового менінгіту. Цей мікоз і на сьогодні забирає більше життів ВІЛ-позитивних людей, аніж інші. Окрім того, цей препарат лишається єдиним, що застосовується для лікування мікозів у людей з ослабленим імунітетом. Таким чином, теперішні методи терапії важких системних мікозів, на які хворіють люди, не зазнавали суттєвих змін вже більше 50 років[1].

За останні 30 років значення протигрибкових препаратів у практиці сучасної медицини різко зросло. Оскільки переважна більшість небезпечних для життя грибкових інфекцій вражає людей з послабленою імунною системою, збільшення захворюваності інвазивними грибковими інфекціями може бути пов'язане зі збільшенням кількості людей, які живуть із захворюваннями або лікуванням, які впливають на імунну систему, наприклад ВІЛ/СНІД, первинний імунний дефіцит, хіміотерапія раку, переливання крові та трансплантація органів, недоношеність та імуномодулюючі препарати. Тому тверезим є звернення уваги на те, що два з трьох класів протигрибкових препаратів (азолів і полієнів), які зараз використовуються, вже були введені в клініки до 1980 року, тоді як третій клас (ехінокандини) в тому році був відкритий. Більше того, навіть із цими новітніми методами лікування клінічні результати більшості інвазивних грибкових інфекцій далекі від ідеальних.

					<i>НУХТ БТЕК 04.04.22 КР ПЗ</i>			
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розробник</i>	<i>Середенко Е.І.</i>				<i>ВСТУП</i>	<i>Літера</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Архів</i>
<i>Керівник</i>	<i>Воронцов О.О.</i>						7	93 7
<i>Н. контр</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Консульт</i>								
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стадніков В.П.</i>							

Дійсно, з'являються інфекції, викликані видами грибків, проти яких не існує надійної медичної терапії, а також з'являються штами більш поширених організмів, таких як *Candida albicans* і *Candida glabrata*, які стійкі до препаратів, що застосовуються в даний час. Тому здається досить очевидним, що темпи розробки протигрибкових препаратів не встигають за клінічними потребами[2].

На теренах як всього світу в цілому, так і України загалом, останніми роками спостерігається помітне збільшення захворюваності населення на мікози. Чи не найголовнішу роль в цьому зіграли медичні, соціальні та фармакологічні фактори. До таких факторів належать погіршення або повна відсутність санітарно-просвітницької роботи серед населення, збільшення кількості і погіршення санітарної якості басейнів, медичних кабінетів і саун, невід'ємною частиною яких є нехтування санітарно-гігієнічними нормами, проблематика терапії хворих на грибові захворювання людей, що ведуть асоціальний спосіб життя, порушення персоналом правил гігієни під час інвазивних методів діагностики, збільшення частоти діагностування захворювань, практично невід'ємною частиною яких є мікози (цукровий діабет, онкологічні захворювання, ВІЛ-інфекція та ін.). Крім того, через погіршення екології та почастищення стресових ситуацій спостерігається зниження показників імунної системи серед населення. Вказані вище причини збільшують частоту захворюваності на системні мікози (криптококоз, гістоплазмоз, параконцидіомікоз тощо), які по причині коштовності лікування основного захворювання набувають важливого фармакоекономічного значення. Серед терапевтичних чинників важлива роль належить антибіотикам широкого спектра дії; імуносупресорам у разі трансплантації органів тощо. Окрім того, існуючі антимікотики мають ряд дефектів: недостатня клінічна ефективність, висока токсичність, побічні ефекти[3].

Антимікотичні препарати є надпривабливою фармакотерапевтичною групою для фармацевтичних виробництв та реалізаторів продукції, так як певна частина ліків або навіть окремі дози дозволено продавати безрецептурно і тим паче без попередньої рекомендації з лікарем, тобто хворі можуть їх купувати з власної ініціативи або під впливом реклами для самолікування. Із вищенаведених причин

стан ринку антимікотичних препаратів під пильним оком не тільки практикуючих лікарів, а й фармацевтичних гігантів[3].

Новизною кваліфікаційної роботи є збільшення продуктивності за допомогою використання генно-модифікованого штаму-надпродуцента *Streptomyces nodosus* D5-2M2A з додаванням в поживне середовище антибіотику стрептоміцину з метою збільшення виходу антибіотику і збереженням генних модифікацій, зменшенням витрат за рахунок дешевизни компонентів поживного середовища.

Актуальність кваліфікаційної роботи полягає в тому, що в Україні станом на 2020 рік близько 1.000.000 чоловік (в тому числі ВІЛ/СНІД-інфікованих) хворіє на грибкові захворювання і їх кількість продовжує зростати. Більшість протигрибкових препаратів імпортуються. У зв'язку з цим необхідно налагодити виробництво максимальної кількості протигрибкового антибіотику за мінімальну ціну.

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА АМФОТЕРИЦИНУ В

Амфотерицин В – це протигрибковий антибіотик із групи полієнових макролітів, біосинтез якого здійснюється актиноміцетами роду *Streptomyces* виду *nodosus*. Цей препарат застосовується для лікування тяжких грибкових інфекцій, що можуть серйозно загрожувати життю пацієнта. Через свою токсичність даний лікарський засіб не підходить для лікування незначних захворювань, спричинених дріжджами, такі як кандидози статевих органів, стравоходу або рота, хоча й може негативно впливати на їх збудників. Не здійснює жодного впливу на вірусів, рикетсій або бактерій. Біосинтезується за участю ферментів-полікетидсинтаз. Сповільнює ріст грибків за допомогою утворення трансмембранних каналів, через які одновалентні йони виходять з грибкових клітин[4].

Органолептичні показники. Забарвлення амфотерицину В може коливатися від темно-жовтого до помаранчевого (при зв'язуванні з N,N-диметилформамідом). Без запаху або з ледь помітний і специфічний[5].

Хімічні властивості. Брутто-формула – [1R- (1R *, 3S *, 5R *, 6R *, 9R *, 11R *, 15S *, 16R *, 17R *, 18S *, 19E, 21E, 23E, 25E, 27E, 29E, 31E, 33R *, 35S *, 36R *, 37S *)] - 33 - [(3-Аміно-3, 6-дидеокси- β-D-маннопіранозил) окси] -1,3,5,6,9,11,17,37-октагідрокси-15,16,18-триметил-13-оксо-14,39-діоксабіцикло [33.3.1] нонатріаконта-19, 21, 23, 25, 27, 29, 31-гептан-36-карбонова кислота. Має молекулярну масу 924,09 і молекулярну формулу C₄₇H₇₃NO₁₇[5].

Фізико-хімічні властивості. Плавиться при температурі – 170°C, розчинність у воді становить – 750 мг/л (при 28°C). Кут обертання ±24°. Може розчинятися у диметилсульфоскиді та пропіленгліколі, погано розчиняється у диметилформаміді, дуже погано розчиняється в метанолі, практично не розчиняється в етанолі. УФ-спектр: λ_{max}=362 нм, λ_{max}=381 нм, λ_{max}=405 нм у суміші диметилсульфоскиду і метилового спирту. Зберігання здійснюють у добре закупореному флаконі у захищеному від світла місці при температурі 2–8 °C[6].

					<i>НУХТ БТЕК 04.04.22 КР ПЗ</i>			
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>РОЗДІЛ 1. Характеристика амфотерицину В</i>	<i>Літера</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розробник</i>	<i>Середенко Е.І.</i>						10	93
<i>Керівник</i>	<i>Воронцов О.О.</i>							10
<i>Н. контр</i>								
<i>Консульт</i>								
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стадніков В.П.</i>							
						<i>Кафедра БТМ</i>		

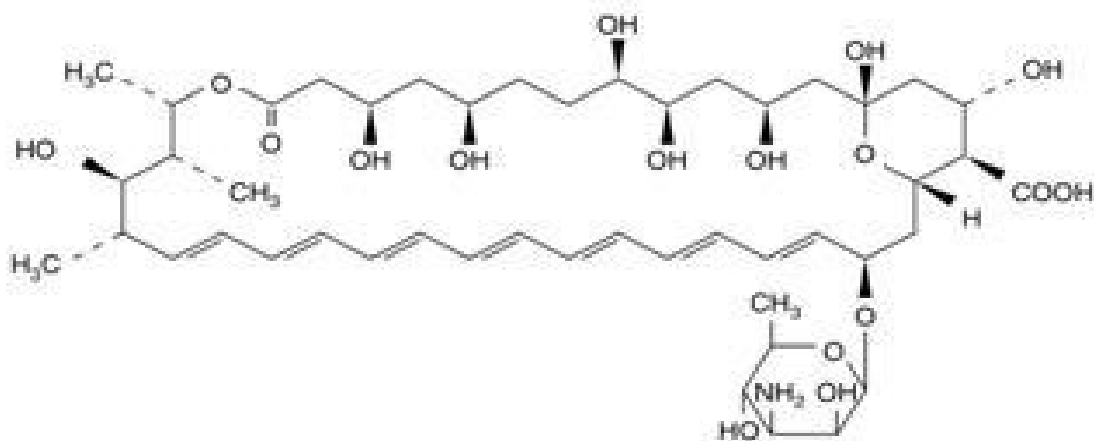


Рис. 1.1. Структурна формула амфотерицину В [5]

Механізм дії. Молекули антибіотику зв'язуються з ергостеролом цитоплазматичної мембрани грибів, після чого утворюються низькоселективні іонних каналів (складаються з пороутворюючих білків) з дуже високою провідністю. Через це компоненти грибної клітини виходять у позаклітинний простір, в результаті чого клітина руйнується[7].

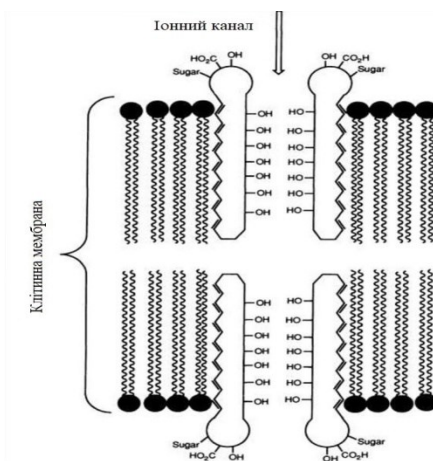


Рис. 1.2. Механізм дії амфотерицину В

Протипоказання. Препарат може ініціювати запуск алергії. Протипоказаний людям, які мають хвороби серця, цукровий діабет, захворювання нирок або порушення електrolітного балансу (наприклад, низький рівень K^+ або Mg^{2+} в крові). Не рекомендовано також вживати тим, кому здійснюють переливання крові або променеви терапію[5].

Фармакологічна дія. Амфотерицин В демонструє високу активність *in vitro* щодо багатьох видів грибів, серед яких варто виділити: *Histoplasma capsulatum*,

Coccidioides immitis, роди *Candida* та *Rhodotorula*, *Blastomyces dermatitidis*, *Cryptococcus neoformans*, *Sporothrix schenckii*, *Mucormucedo* та *Aspergillus fumigatus* пригнічуються концентраціями амфотерицину В в діапазоні від 0,03 до 1,0 мкм. Хоча *Candida albicans*, як правило, досить сприйнятлива до амфотерицину В, неалбіканські види можуть бути менш сприйнятливими. *Pseudallescheria boydii* та *Fusarium sp.* часто стійкі до амфотерицину В[8].

Тривалість внутрішньовенних інфузій може тривати від 2 до 6 годин. Якщо пацієнт відчуває лихоманку, гіпертонію, озноб або нудоту, здійснюють премедикаментацію за 30-60 хвилин до прийому комбінацією ацетамінофеном/ібупрофеном з димедрол та/або гідрокортизом. Ризик нефротоксичності зростає при дозах, що перевищують 1 мг/кг, відсутні дані, що підтверджують дози, що перевищують 1,5 мг/кг на добу. Нефротоксичність можна послабити при інфузійному введенні 1 літру фізіологічного розчину[9].

Форма випуску. Препарат випускається у формі суспензій для розчину для інфузій, мазей. Виробляється в Індії під назвою «Амфотрет», в США має найменування «Абельсет», у Великобританії – «Амбісом».



Рис. 1.3. Амфотерицин В від різних країн-виробників. 1. Росія. 2. Індія. 3. США. 4. Великобританія.

РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування

Амфотерицин В був вперше виділений із культури *Streptomyces nodosus* в 1955. Актиноміцет було ізольовано із зразку ґрунту, зібраного у басейні ріки Оріноко, що у Венесуелі.

Дикий штам ZJB 20130827 має відносно низьку продуктивність. Обробка N-метил-N-нітросо-N'-нітрогуанідином (НТГ) та ультрафіолетом (УФ), спричинила мутації, в результаті яких збільшився біосинтез амфотерицину В. Одержання мутанту N3 дозволило провести оптимізацію умов культивування, зменшивши витрати на поживне середовище і збільшивши при цьому продуктивність штаму актиноміцет. Для порівняння, дикий штам типу ZJB 20130827 утворював близько 580 мг/л, тоді як N3 продукував уже 5260 мг/л, збільшивши свою продуктивність на 906,9%. Варто зазначити, що мутант зменшив продукцію амфотерицину А на 60%. Одержаний мутантний штам є досить стійким генетично, а тому може розглядатися як кандидат для промислового одержання амфотерицину В[11].

З метою збільшення продуктивності цільового продукту, можна використовувати як гіперекспресію генів, які так чи інакше беруть участь в синтезі цільового продукту, так і метаболомічне профілювання[12]. Основними речовинами для синтезу полікетидних макролактонових кілець амфотерицину В можна вважати малоніл-КоА, який є частиною синтезу жирних кислот, та метилмалоніл-КоА, який є частиною анаплеротичних реакцій і входить в цикл три карбонових кислот. Ген *amphA* є ініціюючим для синтезу амфотерицину, а першою речовиною є ацетил-КоА. Зважаючи на багатогранність та багатопрофільність метаболізму ацетил коферменту А в організмі, доцільнішим буде поліпшення використання ацетил-КоА за рахунок збільшення експресії гену, що контролює його утворення[10].

					НУХТ БТЕК 10.03.22 КР ПЗ			
Зм	Арк.	№	Підпис	Дата				
Розробник	Середенко Е.І.				РОЗДІЛ 2. Характеристика <i>Streptomyces nodosus</i>	Літера	Аркуш	Аркушів
Керівник	Воронцов О.О.						13	93
Н. контр						13		
Консульт						Кафедра БТМ		
Зав. каф.	Стадніков В.П.							

Було виявлено, що 6 генів найефективніше впливали на біосинтез амфотерицину В. Так, надмірна експресія генів *vhb*, *metK*, *amphRIV*, *amphH* у поєднанні з *amphG*, *araC* є дешевим та ефективним способом для масштабного виробництва антибіотику. Поодинокі додавання вищевказаних генів поступово збільшувало синтез цільового продукту. Крім того, видалення генетичного кластеру Δ PKS5, який відповідав за припинення синтезу антибіотику, дозволило збільшити продукцію амфотерицину В. Штам D5-2M2A, що містив гени *vhb*, *metK*, *amphRIV* дав максимальну продуктивність в 15,6 г/л [12].

Китайськими вченими на чолі з Бо Жангом, Кай Хуангом та співавторами [11, 12, 14] було проведено ряд досліджень для створення штамів-надсинтетиків *Streptomyces nodosus*. Об'єктами досліджень стали різноманітні штами, одержані як за допомогою мутацій, так і методами генної інженерії. Завдяки цим дослідженням вдалося дізнатися, як наявність чи відсутність тих чи інших генів впливає на продуктивність мікроорганізму. З результатами досліджень можна ознайомитися в таблиці, вказаній нижче.

Таблиця 2.1

Особливості одержання амфотерицину В на суміші ростових субстратів

Біологічний агент	Склад поживного середовища		Тривалість культивування, год	Концентрація, г/л	Особливості процесу біосинтезу	Використана література
	компонент	концентрація, г/л				
<i>Streptomyces nodosus</i> ZJB 20130827	глюкоза	80	48	0.58	Культивування в колбах на качалці (t° = 28°C, pH = 7.0)	Bo Zhang, Hai-Dong Zhang, Yi-Teng Zhou, Kai Huang, Zhi-Qiang Liu, Yu-Guo Zheng Improvement of amphotericin B production by a newly isolated <i>Streptomyces nodosus</i> mutant Key Laboratory of Bioorganic Synthesis of Zhejiang Province doi: 10.1002/bab.1579
	дріжджовий екстракт	8				
	екстракт яловичини	25				
	(NH ₄) ₂ SO ₄	6				
	MgSO ₄ • 7H ₂ O	0,1				
<i>Streptomyces nodosus</i> N3	глюкоза	80	48	5.26		
	екстракт яловичини	25				
	CaCO ₃	9				
	KH ₂ PO ₄	0.1				

Закінчення таблиці 2.1

Біологічний агент	Склад поживного середовища		Тривалість культивування, год	Концентрація, г/л	Особливості процесу біосинтезу	Використана література
	компонент	концентрація, г/л				
<i>S. nodosus</i> (<i>vhb</i> , <i>metK</i> , <i>amphRIV</i>) VMR4A	Глюкоза Екстракт яловичини CaCO ₃ KH ₂ PO ₄	69 25 9 0,1	72	6.58	Культивування в колбах на качалці об'ємом 500 мл з 100 мл середовища (t° = 25°C, pH = 7.0)	Bo Zhang, Yi- Teng Zhou, Sheng- Xian Jiang, Yu- Han Zhang, Kai Huang, Zhi- Qiang Liu and Yu- Guo Zheng Amphotericin B biosynthesis in <i>Streptomyces nodosus</i> : quantitative analysis of metabolism via LC-MS/MS based metabolomics forrational design Zhang etal. Microb Cell Fact (2020) 19:18 https://doi.org/10.1186/s12934-020-1290-y
<i>S. nodosus</i> + <i>amprIV</i>				5.64		
<i>S. nodosus</i> + <i>metK</i>				5.55		
<i>S. nodosus</i> + <i>amphH</i> + <i>amphG</i>				5.44		
<i>S. nodosus</i> + <i>araC</i>				5.24		
<i>S. nodosus</i> D5-2M2A	Глюкоза Бавовняне борошно CaCO ₃ KH ₂ PO ₄	69 25 9 0,1	144	15.6	Культивування у ферментері об'ємом 5 л з робочим об'ємом 3 л (t° = 25°C)	Kai Huang, Bo Zhang, Zhen-Yang Shen, Xue Cai, Zhi-Qiang Liu, Yu-Guo Zheng, Enhanced amphotericin B production by genetically engineered <i>Streptomyces nodosus</i> Microbiological Research (2020), doi: https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126623
<i>S. nodosus</i> ΔPKS 5				6.32		

Підсумовуючи написане вище, доцільніше використовувати генетично змінений штам *Streptomyces nodosus* D5-2M2A. На оптимізованому середовищі за

144 години при температурі 25°C і рН – 7.0 даний мікроорганізм продукуватиме значно більше цільового продукту, ніж його найближчий конкурент, мутантний штам *S. nodosus* ΔPKS5 (15.6 г/л проти 6.32 г/л). Недоліками вищевказаного надпродуцента можна вважати мезофільність і нейтрофільність: ці фактори роблять *Streptomyces nodosus* вразливими до контамінації іншої мікробіоти, що може призвести до значних втрат на виробництві.

Для обрахунку вартості поживних середовищ доцільніше брати трьох продуцентів з потенційно найвищою продуктивністю цільового продукту, а саме: штамми D5-2M2A, N3 і VMR4A. Решта враховуватись не буде, так як має недостатньо високу продуктивність.

Таблиця 2.2

**Вартість поживних середовищ для культивування продуцентів
амфотерицину В**

Продуцент	Компонент поживних середовищ	Концентрація у ПС, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації (1, 2, 3)*
1	2	3	4	5	6
<i>Streptomyces nodosus</i> N3	Глюкоза	80	23	1.84	[1]
	Екстракт яловичини	25	424.58	10.61	[2]
	CaCO ₃	9	180	0.162	[3]
	KH ₂ PO ₄	0.1	120	0.012	[4]
		Вартість 1 л середовища – 12.63 грн			
<i>S. nodosus</i> VMR4A	Глюкоза	69	23	1.587	[1]
	Екстракт яловичини	25	424.58	10.61	[2]
	CaCO ₃	9	180	0.162	[3]
	KH ₂ PO ₄	0.1	120	0.012	[4]
		Вартість 1 л середовища – 12.38 грн			

Продуцент	Компонент поживних середовищ	Концентрація у ПС, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації (1, 2, 3)*
1	2	3	4	5	6
S. nodosus -D5-2M2A	Глюкоза	69	23	1.587	[1]
	Бавовняне борошно	25	5.66	0.14	[5]
	CaCO ₃	9	180	0.162	[3]
	KH ₂ PO ₄	0.1	120	0.012	[4]
	Стрептоміцин	0,001	11500	0,0115	[6]
Вартість 1 л середовища – 1.92 грн					

Примітка. * – Ціни наведено станом на травень 2021 року.

1. <https://prom.ua/ua/p755976288-glyukoza-pishevaya.html?>
2. <https://russian.alibaba.com/product-detail/natural-china-supply-beef-extract-with-pahrm-grade-60746994854.html?spm=a2700.8699010.29.72.36d12215aLcaye>
3. <https://prom.ua/ua/p416266531-karbonat-kaltsiya-pishevoj.html?&primelead=My40Mg>
4. <https://prom.ua/ua/p151820671-kalij-fosfornokislyj-zameschennyj.html>
5. https://russian.alibaba.com/product-detail/cotton-seed-meal-1600152015854.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_title.75f472e5f1o0cK
6. <https://ukrzoovet.com.ua/ru/products/streptomitsin-1-g>

Згідно з даними, наведеними у таблиці 2.2, штам D5-2M2A має не тільки найбільший вихід цільового продукту, але й найменшу ціну на поживне середовище. Штами VMR4A і N3 мають майже однакову ціну за 1 л поживного середовища, проте синтезують меншу кількість цільового продукту, хоч і за менший час.

Розрахуємо умовну вартість 1 г антибіотику, беручи за основу такі критерії як концентрацію антибіотику, що утворюється при біосинтезі, тривалість культивування, кількість утвореного амфотерицину В за годину, а також вартість 1 л поживного середовища для росту продуцента.

Умовна вартість 1 г антибіотика, синтезованих на суміші ростових субстратів

Біологічний агент	Концентрація антибіотика, г/л	Тривалість культивування, год	Кількість утвореного амфотерицину за год, г/год	Вартість 1 л середовища, грн/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г
1	2	3	4	5	6
<i>Streptomyces nodosus</i> N3	5.26	48	0.11	12.63	2.4
<i>S. nodosus</i> VMR4A	6.58	168	0.04	12.38	1.88
<i>S. nodosus</i> –D5-2M2A	15.6	72	0.21	1.92	0.12

Згідно з даними, що наведені у таблиці 2.3, найменшу умовну вартість 1 г цільового продукту має штам D5-2M2A. Штами VMR4A і N3 мають як вищу ціну амфотерицину В, так і його меншу кількість.

Перевірочний розрахунок складу поживного середовища

Розрахунок вмісту в середовищі джерела вуглецевого живлення

Тривалість культивування 144 год, концентрація амфотерицину В в культуральній рідині становить 15.6 г/л, а концентрація біомаси – 25.6 г/л[12].

Потреби для синтезу амфотерицину В. Розрахуємо, скільки вуглецю (за елементом С) міститься в 15.6 г амфотерицину В. Молекулярна маса амфотерицину $C_{47}H_{73}NO_{17}$ становить 924. Отже, у 924 г амфотерицину В міститься 564 г Карбону, а в 15.6 г амфотерицину $\frac{564 \cdot 15.6}{924} = 9,5$ г Карбону.

Далі розрахуємо, у скількох грамах вуглеводів міститься 9,5 г Карбону, враховуючи, що вміст Карбону у глюкозі становить 40%. Отже, у 100 г глюкози – 40 г Карбону, а 9,5 г карбону міститься у $\frac{9,5 \cdot 100}{40} = 23,75$ г глюкози.

Потреби для синтезу біомаси. У біомасі міститься 50% Карбону, отже вміст Карбону у 25,6 г біомаси становить $25,6 \cdot 0,5 = 12,8$ г. Ця кількість Карбону міститься у $\frac{12,8 \cdot 100}{40} = 32$ г глюкози.

Враховуючи 40% втрат на «холосте окиснення», для одержання 25.6 г/л біомаси у середовище необхідно внести $(32 * 0,4) + 32 = 44,8$ г глюкози (40%).

Отже, загальний вміст глюкози у середовищі, необхідний для синтезу біомаси (25.6 г/л) та амфотерицину (15.6 г/л), становить $23,75 + 44,8 = 68,55$ г/л $\approx 6,9\%$.

Розрахунок вмісту в середовищі джерела азотного живлення

Потреби для синтезу біомаси. Припустимо, що у біомасі міститься 10% Нітрогену. Таким чином, у 25.6 г біомаси вміст азоту за (елементом N) становить 2.56 г.

Продуцент амфотерицину В асимілює як джерело азотного живлення органічний Нітроген. Для одержання амфотерицину В в промислових умовах використовується середовище, яке містить як джерело органічного Нітрогену бавовняне борошно, яке має невизначений хімічний склад, а отже не піддається розрахункам. Саме тому ми приймаємо, що лімітуючим фактором при рості *Streptomyces nodosus* виступає вуглець.

Розрахунок вмісту Фосфору у середовищі

У біомасі міститься близько 3% Фосфору (за елементом P). Отже, для синтезу 25,6 г/л біомаси вміст Фосфору у середовищі повинен становити $25,6 * 0,03 = 0,768$ г/л. Джерелами Фосфору у промисловому виробництві амфотерицину В є двозаміщений Калій фосфорнокислий – K_2HPO_4 .

Вміст Фосфору у K_2HPO_4 становить $\frac{31}{136} = 23\%$. Концентрація цієї солі у середовищі становить $\frac{136 * 0,153}{23} = 0,9 \frac{\text{г}}{\text{л}}$.

Оскільки в поживному середовищі міститься 0,1 г/л фосфору, а згідно розрахунків його потреба 0,9 г/л, то можна зробити висновок, що даного мікроелементу недостатньо. Його нестача може бути компенсована із бавовняного борошна, так як воно має невизначений склад, а тому цілком можливо, що в його складі міститься решта необхідного фосфору.

Розрахунок вмісту Кальцію у середовищі

У біомасі міститься близько 0,5% Кальцію (за елементом Ca). Отже, для синтезу 25,6 г/л біомаси вміст Кальцію у середовищі повинен становити $25,6 * 0,005 = 0,128$ г/л.

0,005 = 0,128 г/л. Джерелами Кальцію у промисловому виробництві амфотерицину В є Кальцію карбонат – CaCO₃.

Вміст Кальцію у CaCO₃ становить $\frac{40}{100} = 40\%$. Концентрація цієї солі у середовищі становить $\frac{100 \cdot 0,128}{40} = 0,32$ г/л.

Так як у складі поживного середовища міститься 9 г/л CaCO₃, а для біосинтезу його необхідно 0,32 г/л, то можна зробити висновок, що решта цього елемента необхідна для забезпечення буферності, аби рН середовища залишався сталим. Крім того, даний мікроелемент є необхідним кофактором для полікетидсинтетази 3 – ферменту, що каталізує синтез цільового антибіотику.

Таблиця 2.4

Склад поживного середовища для культивування амфотерицину В

Компоненти поживного середовища	Вміст, г/л		
	Згідно літературного джерела	Розрахунковий	Забезпечення потреб біосинтезу, %
Глюкоза	69	68, 55	100
Бавовняне борошно	25	–	–
CaCO ₃	9	0,32	>100
KN ₂ PO ₄	0,1	0,9	10

Таким чином, порівнявши розрахунковий склад поживного середовища і склад, що наведений у джерелі[11], можна зробити висновок, що дане поживне середовище забезпечує біологічний агент всіма необхідними поживними речовинами.

2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента

2.2.1. Морфолого-культуральні ознаки біологічного агента

Грампозитивно пофарбований тонкий міцелій має відкриті та закриті спіралі, що характерні для стрептоміцетів.

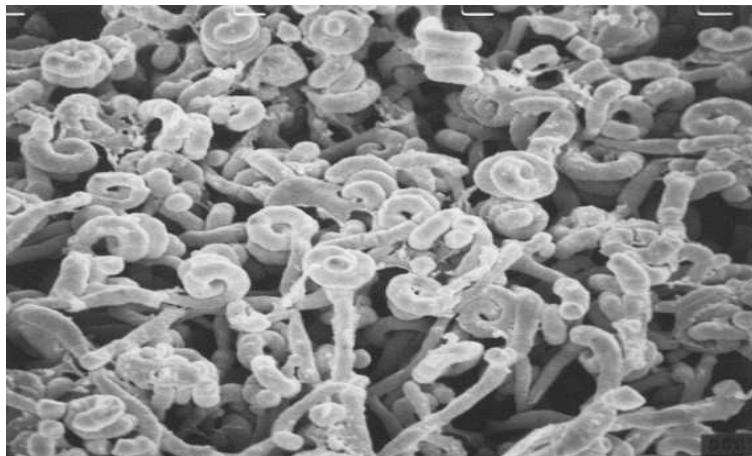


Рис. 2.1. Спіральні ланцюжки міцелію *Streptomyces nodosus* в електронному мікроскопі при збільшенні в 3500 разів[10].

Зростаючи на дріжджово-солодовому агарі, актиноміцет помірно утворює світло-коричневий субстратний міцелій, що вростає в середовище. На звороті чашки Петрі колонії мають чітке розмежування і пігментацію коричнево-рожевого[14]. На початку росту утворюється повітряний міцелій білого, бежевого і сірого кольору, що представлений спіральними ланцюжками. На одному ланцюжку може утворюватися більше десяти спор сірого кольору. Спори утворюються від 14 до 21 дня[15].



Рис. 2.2. Ріст *Streptomyces nodosus* на дріжджово-солодовому агарі[10].

2.2.2. Фізіолого-біохімічні ознаки

Streptomyces nodosus є аеробом і мезофілом, що росте при температурному діапазоні 25-35°C, оптимум становить 28°C. Оптимальний рН для росту – 7,0. Даний

актиноміцет може рости на поживному середовищі, концентрація NaCl в якому не перевищує 2,5%. За типом живлення стрептоміцет можна охарактеризувати як хемоорганотроф. Зброджує глюкозу, фруктозу, ксилозу, частково маніт та інозит, не розщеплює арабінозу, сахарозу, рамнозу, рафінозу, целюлозу. Утворює желатиназу, уреазу, β -галактозидазу, частково гідролізує лізин і орнітин, не утворює аргініндегідролазу, триптофандеаміназу, індол, сірководень і ацетоїн[16].

2.3. Таксономічний статус біологічного агента

Сучасна класифікація для *Streptomyces nodosus* наведена згідно другого видання Керівництва Бергі з систематики бактерій [10, 16].

Домен: *Bacteria*

Відділ: *Actinobacteria*

Клас: *Actinobacteria*

Порядок: *Actinomycetales*

Родина: *Streptomycetaceae*

Рід: *Streptomyces*

Вид: *Streptomyces nodosus*

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

Амфотерицин В – це полієновий антибіотик із групи макролідів, що продукується актиноміцетами роду *Streptomyces* виду *nodosus*. Використовується для лікування серйозних грибкових інфекцій, що становлять загрозу життю людини. Він не призначений для лікування незначних дріжджових інфекцій, таких як кандидози рота, стравоходу або статевих органів. Інгібує ріст грибків, утворюючи трансмембранні канали, які призводять до витоку одновалентних іонів з грибкових клітин[4].

Амфотерицин В демонструє високу активність *in vitro* щодо багатьох видів грибів, серед яких варто виділити: *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, роди *Candida* та *Rhodotorula*, *Blastomyces dermatitidis*, *Cryptococcus neoformans*, *Sporothrix schenckii*, *Mucormucedo* та *Aspergillus fumigatus* пригнічуються концентраціями амфотерицину В в діапазоні від 0,03 до 1,0 мкм у в. Хоча *Candida albicans*, як правило, досить сприйнятлива до амфотерицину В, неальбіканські види можуть бути менш сприйнятливими. *Pseudalles cheriabooydii* та *Fusarium sp.* часто стійкі до амфотерицину В. Антибіотик не впливає на бактерії, рикетсії та віруси[8].

3.1. Потреба у цільовому продукті

Згідно з даних Державної служби статистики[17], в Україні станом на 2020 рік проживає 41,9 млн чоловік. З них 14% населення – діти, 54% – жінки, 12% – жінки старше 60 років. Загальна захворюваність на грибкові інфекції, показник на 100 000 мешканців та кількість інфекцій, класифікованих з урахуванням основних факторів ризику наведено в таблиці 3.1. Географічний розподіл серйозних грибкових інфекцій в Україні узагальнено на рис. 3.1[18].

					НУХТ БТЕК 15.03.22 КР ПЗ			
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	РОЗДІЛ 3. Техніко- економічне обґрунтування	<i>Літера</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розробник</i>	<i>Середенко Е.І.</i>						23	93 23
<i>Керівник</i>	<i>Воронцов О.О.</i>							
<i>Н. контр</i>								
<i>Консульт</i>								
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стадніков В.П.</i>						Кафедра БТМ	

Таблиця 3.1

Захворюваність на серйозні грибкові інфекції в Україні[18]

Інфекції	Кількість інфекцій на одну основну хворобу на рік					К-сть на 100 тисяч	Всього хворих
	Немає	ВІЛ/СНІД	Респіраторні	Рак/ Туберкульоз	В реанімації		
Кандидоз стравоходу	–	13727	–	–	–	30.134	13727
Кандидемія	–	–	–	–	752	5.0	2278
Кандидозний перитоніт	–	–	–	–	376	0.8254	376
Рецидивуючий вагінальний кандидоз	893579	–	–	–	–	1961.625	893579
Алергічний бронхолегеневий аспергільоз	–	–	28447	–	–	62.448	28447
Важка астма з сенсibiliзацією грибків	–	–	37491	–	–	82.3019	37491
Хронічний легеневий аспергільоз	–	–	10054	–	–	22.071	10054
Інвазивний аспергільоз	–	–	930	303	–	2.7067	1233
Мукормікоз	–	–	–	90	–	0.1975	90
Криптококовий менінгіт	–	101	–	–	–	0.2217	101
Пневмоцистна пневмонія	–	6152	–	–	–	13.5052	6152
Оцінка загальної захворюваності	893579	19980	76952	393	752		999152

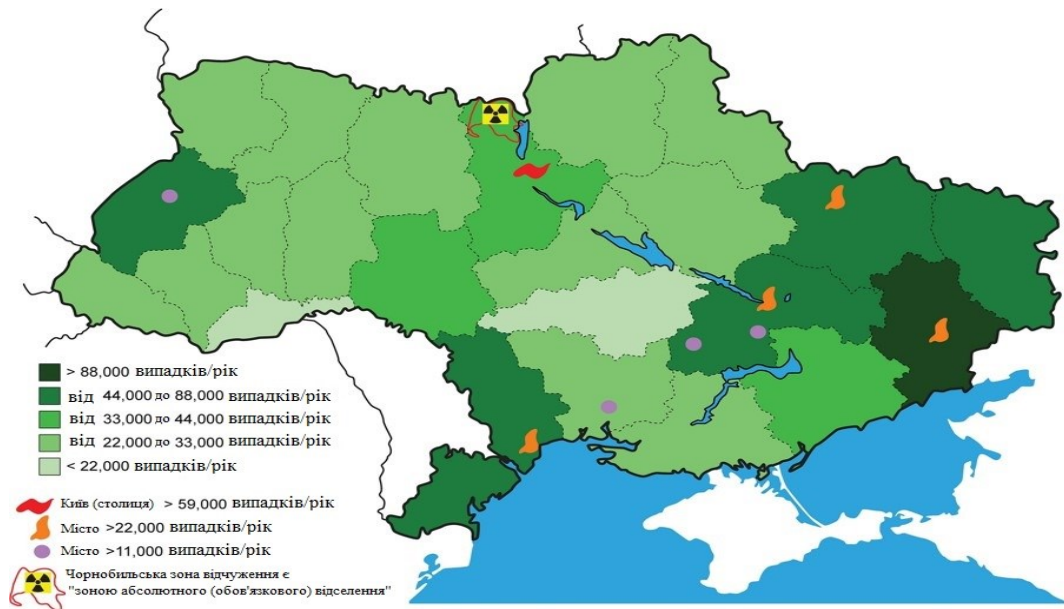


Рис. 3.1. Географічне поширення серйозних грибкових інфекцій в Україні[18].

3.1.1. Аналоги амфотерицину В в Україні

Амфотерицин В є одним з найпотужніших протигрибкових препаратів, що демонструє активність проти маси дріжджових та міцеліальних грибкових збудників (див. табл. 3.2). Амфотерицин В проявляє активність щодо *Cryptococcus spp.* та більшості *Candida spp.*, за винятком *Candida lusitanae*, для якої зазвичай виявляється більш висока мінімальна інгібуюча концентрація. Він також демонструє активність проти *Aspergillus spp.*, за великим винятком *Aspergillus terreus*, який часто стійкий. Крім того, препарати амфотерицину В активні проти диморфних грибів, включаючи *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis* та *posadasii*, а також *Paracoccidioides spp.* Амфотерицин В активний проти багатьох патогенних організмів групи *Mucorales*. Однак *Scedosporium spp.* і *Fusarium spp.* часто мають більш високі мінімальні інгібуючі концентрації. Загалом, набута резистентність до амфотерицину В вкрай рідкісна, незважаючи на багаторічне клінічне застосування[19].

Спектр активності системних протигрибкових засобів[19]

Назва антибіотику	Активний	Підвищена МІК	Неактивний
Амфотерицин В	<i>Candida spp.</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Mucorales</i> , <i>Blastomyces dermatitidis</i> , <i>Coccidioides immitis</i> , <i>Histoplasma capsulatum</i>	<i>Fusarium spp.</i> , <i>Scedosporium spp.</i>	<i>Candida lusitaniae</i>
Флуцитозин	<i>Candida spp.</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Candida krusei</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Mucorales</i> , <i>Fusarium spp.</i> , <i>Scedosporium spp.</i> , <i>Blastomyces dermatitidis</i> , <i>Coccidioides immitis</i> , <i>Histoplasma capsulatum</i>
Флуконазол	<i>Candida spp.</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Blastomyces dermatitidis</i> , <i>Coccidioides immitis</i> , <i>Histoplasma capsulatum</i>	<i>Blastomyces dermatitidis</i> , <i>Histoplasma capsulatum</i>	<i>Candida krusei</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Mucorales</i> , <i>Fusarium spp.</i> , <i>Scedosporium spp.</i>
Ітраконазол	<i>Candida albicans</i> , <i>Candida parapsilosis</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Candida lusitaniae</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Blastomyces dermatitidis</i> , <i>Coccidioides immitis</i> , <i>Histoplasma capsulatum</i>	<i>Candida glabrata</i> , <i>Candida krusei</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Fusarium spp.</i> , <i>Scedosporium spp.</i>	<i>Mucorales</i>

Закінчення таблиці 3.2.

Назва антибіотику	Активний	Підвищена МІК	Неактивний
Вориконазол	<i>Candida spp.</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Fusarium spp.</i> , <i>Blastomyces dermatitidis</i> , <i>Coccidioides immitis</i> , <i>Histoplasma capsulatum</i>	<i>Scedosporium spp.</i>	<i>Mucorales</i>
Позаконазол	<i>Candida spp.</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Mucorales</i> , <i>Fusarium spp.</i> , <i>Blastomyces dermatitidis</i> , <i>Coccidioides immitis</i> , <i>Histoplasma capsulatum</i>	<i>Scedosporium spp.</i>	—
Ізавуконазол	<i>Candida spp.</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Mucorales</i> , <i>Fusarium spp.</i> , <i>Blastomyces dermatitidis</i> , <i>Coccidioides immitis</i> , <i>Histoplasma capsulatum</i>	<i>Scedosporium spp.</i>	—
Ехінокандини (каспофунгін, мікафунгін, анідулафунгін)	<i>Candida albicans</i> , <i>Candida parapsilosis</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Candida krusei</i> , <i>Candida lusitaniae</i> ,	<i>Candida glabrata</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Mucorales</i> , <i>Fusarium spp.</i> , <i>Scedosporium spp.</i> , <i>Blastomyces dermatitidis</i> , <i>Coccidioides immitis</i> , <i>Histoplasma capsulatum</i>

3.2. Розрахунок потужності виробництва Амфотерицину В

На даний момент на фармацевтичному ринку України Амфотерицин В представлений під торговими назвами «Фунгізон» та «Амбісом» Виробниками даного препарату є США, Росія, Франція та Великобританія.

Таблиця 3.3

Країни-імпортери амфотерицину В

Товарна назва	Країна-виробник	Об'єм	Ціна
Фунгізон	США	50 мг	800 грн
Амфотерицин В	Росія	50 мг	77 грн
Амбісом	Великобританія	50 мг	2000 грн
Фунгізон	Франція	40 мл	700 грн

При лікуванні амфотерицином В підбір лікувальних доз здійснюють індивідуально в залежності від виду і тяжкості інфекції. Терапію починають із дози концентрацією 0,1 мг/кг і, поступово збільшуючи, доводять до рекомендованої добової в 0,7 мг/кг. Курсова доза і тривалість терапії відрізняються в залежності від виду збудника і тяжкості інфекції. Так, тривалість терапії для хворих на криптококоз становить 30 днів, тоді як тривалість лікування від аспергільозу становить 11 місяців (335 днів)[20]. Для розрахунку використаємо дані по тривалості лікування обох захворюваннях.

Розрахуємо масу антибіотику на курс для всіх пацієнтів, що хворіють на серйозні грибкові захворювання. Для розрахунку візьмемо до уваги те, що курс лікування пацієнтів з аспергільозом складе 11 місяців, а для пацієнтів з криптококозом – місяць.

Необхідним параметром для розрахунку є середня вага хворих. Для розрахунків візьмемо дані про середню вагу дорослих хворих на ВІЛ/СНІД, адже на важкі грибкові захворювання переважно хворіють люди з ослабленим імунітетом. Згідно з даними[21], середня вага хворих на ВІЛ/СНІД віком від 19 до 50 років становить 63,7 кг.

Таким чином, для повного курсу їм знадобиться:

$$1 \text{ доза} * 0,0007 \frac{\text{Г}}{\text{КГ}} * 63,7 \text{ кг} * 365 \text{ днів} = 16,275 \text{ г}$$

Таким чином, для всіх пацієнтів, що хворіють на серйозні грибкові захворювання необхідно:

$$\begin{aligned} \Pi &= 1 \text{ доза} * 0,0007 \frac{\text{Г}}{\text{КГ}} * 63,7 \text{ кг} * 999152 \text{ пацієнта} * 365 \text{ днів} = 16\,261\,548,5 \text{ г} \\ &= 16\,261,5 \text{ кг} \end{aligned}$$

Отже, для забезпечення усіх хворих на тяжкі грибкові захворювання в Україні амфотерицином В необхідно виробляти 16260 кг сухого антибіотику в рік.

Враховуючи те, що продуцент *Streptomyces nodosus* D5-2M2A здатний продукувати 15,6 г амфотерицину В на 1 л культуральної рідини[12], то для отримання 16260 кг антибіотику необхідний такий об'єм культуральної рідини:

$$\frac{15,6 \text{ г}}{16\,261\,548,5 \text{ г}} = \frac{1 \text{ л}}{x} \quad x = 1\,042\,406,955 \text{ л}$$

Враховуючи втрати антибіотику при виділенні (40%), необхідно одержати наступну кількість культуральної рідини:

$$\frac{1\,042\,406,955 \text{ л}}{(1 - 0,4)} = 1\,737\,344,925 \text{ л або } 1\,737,344\,925 \text{ м}^3$$

У амфотерицину В є більш дешеві і менш токсичні аналоги, яким можуть надати перевагу пацієнти. Крім того, даний антибіотик імпортується з інших країн і може мати вищу якість. Враховуючи ці фактори, визначимо потребу вітчизняного фармацевтичного ринку в амфотерицині В не вище 10%. Таким чином, потужність нашого виробництва складе:

$$G_{\text{гп}} = 16\,261\,548,5 \text{ г} * 0,1 = 1\,626\,154,85 \text{ г}$$

Приймаємо $G_{\text{гп}} = 1\,626\,154,85 \text{ г}$ як 1626 кг субстанції для виробництва даного ЛЗ.

Потужність виробництва амфотерицину В, яке ми проектуємо, становить $G_{\text{гп}} = 1626 \text{ кг/рік}$.

Продуцент амфотерицину В – актиноміцет *Streptomyces nodosus* D5-2M2A 15,6 г/л = 15,6 кг/м³ культуральної рідини[12]. Плануємо, що обрану кількість субстанції

будемо виробляти за $T_{рд} = 300$ робочих трудоднів. $T_{цф} = 154$ год – цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (144 год) та час підготовки ферментера до роботи (10 год).

Кількість ферментацій на рік:

$$N_{цк} = 24 * \frac{T_{рд}}{T_{цф}} = 24 * \frac{300}{154} = 46,7 \approx 47 \text{ циклів}$$

Кількість продукту за цикл, кг/цикл:

$$G_{цк} = \frac{G_{гп}}{N_{цк}} = \frac{1626}{46,7} = 34,778 \text{ кг}$$

Об'єм КР, що зливається за одну ферментацію (цикл) з урахуванням втрат за виробничий цикл ($E_{св}$), m^3

$$V_{кр} = K1 * G_{цк} * \frac{C_{гп}}{P_{кр} * (1 - E_{св})} = 1,5 * 0,556 * \frac{0,9}{15,6 * (1 - 0,4)}$$

$$= 5.016 \text{ м}^3 \text{ або } 5016 \text{ л}$$

Визначаємо робочий об'єм ферментера, $V_{ф}$, л

$$V_{роб.1} = \frac{V_{кр}}{1 - E_{ф}} = \frac{5.016}{1 - 0,2} = 6,27 \text{ м}^3$$

Приблизний геометричний об'єм ферментера, m^3

$$V_{ф} = \frac{V_{роб.1}}{K_{зап}} = \frac{6,27}{0,6} = 10,45 \text{ м}^3$$

$$V_{сф} = 10 \text{ м}^3$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення $K_{зап}$, частка

$$K_{зап} = \frac{V_{роб.1}}{V_{сф}} = \frac{6,27}{10} = 0,627$$

Перевірене значення $K_{уф}$ відповідає вибраному діапазону: комбінованому 0,5 – 0,65

Для розрахунку кількості посівного матеріалу $V_{пмф}$ визначимо об'єм поживного середовища в інокуляторі $V_{пс1}$

$$V_{пс1} = \frac{V_{роб.1}}{1 + X_{ф}} = \frac{6,27}{1 + 0,1} = 5,7 \text{ м}^3$$

Кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пс1}} = 6,27 - 5,7 = 0,57 \text{ м}^3 = 570 \text{ л}$$

Для одержання 570 л інокуляту в посівному апараті врахуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%.

Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{роб.2}} = \frac{V_{\text{пм1}}}{(1 - E_{\text{па}})} = \frac{0,57}{(1 - 0,1)} = 0,633 \text{ м}^3 \text{ або } 633 \text{ л}$$

Кількість поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{\text{пс2}} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{(1 + X_{\text{па}})} = \frac{0,633}{1 + 0,1} = 0,576 \text{ м}^3 \text{ або } 576 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу для посівного апарату становить:

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 0,633 - 0,576 = 0,057 \text{ м}^3 \text{ або } 57 \text{ л}$$

Кількість інокуляту $V_{\text{роб.2}} = 633 \text{ л}$ можна одержати під час культивування актиноміцету у посівному апараті геометричним об'ємом:

$$V_{\text{па2}} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{K_{\text{зап}}} = \frac{0,633}{0,6} = 1,055 \text{ м}^3 = 1055 \text{ л}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{сф}} = 1 \text{ м}^3$, уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{з1}} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{V_{\text{сф}}} = \frac{0,633}{1} = 0,633$$

Для одержання 57 літрів посівного матеріалу в інокуляторі враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%.

Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{роб.3}} = \frac{V_{\text{пм2}}}{(1 - E_{\text{ін}})} = \frac{57}{1 - 0,1} = 63,3 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу (доза) становить 10% від об'єму поживного середовища.

Тоді кількість поживного середовища в інокуляторі буде:

$$V_{\text{пс3}} = \frac{V_{\text{роб.3}}}{(1 + X_{\text{ін}})} = 57,5 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пм3}} = V_{\text{роб.3}} - V_{\text{пс3}} = 63,3 - 57,5 = 5,8 \approx 6 \text{ л}$$

Кількість інокуляту $V_{\text{роб3}} = 63,3$ л можна одержати під час культивування актиноміцету в інокуляторі геометричним об'ємом

$$V_{\text{ін3}} = \frac{V_{\text{роб.3}}}{K_{\text{зап}}} = \frac{63,3}{0,6} = 105,5 \text{ л}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом ферментер $V_{\text{сф}} = 100$ л, уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{\text{з1}} = \frac{V_{\text{роб.3}}}{V_{\text{сф}}} = \frac{63,3}{100} = 0,633$$

Для одержання 6 л посівного матеріалу в малому інокуляторі враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%.

Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в малому інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{роб.4}} = \frac{V_{\text{пм3}}}{1 - X_{\text{ін}}} = \frac{6}{1 - 0,1} = 6,66 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу (доза) для малого інокулятора становить 10% від об'єму поживного середовища в малому інокуляторі.

Тоді кількість поживного середовища в малому інокуляторі буде становити:

$$V_{\text{пс4}} = \frac{V_{\text{роб.4}}}{1 + X_{\text{ін}}} = 6 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{\text{пм4}} = V_{\text{роб4}} - V_{\text{пс4}} = 6,66 - 6 = 0,66 \text{ л} = 660 \text{ мл}$$

Кількість інокуляту $V_{\text{роб4}} = 6,66$ л можна одержати під час культивування актиноміцету в малому інокуляторі з геометричним об'ємом:

$$V_{\text{ін4}} = \frac{V_{\text{роб.4}}}{K_{\text{зап}}} = \frac{6,66}{0,6} = 11,1 \text{ л}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{сф}} = 10$ л, уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{\text{з1}} = \frac{V_{\text{роб.4}}}{V_{\text{сф}}} = \frac{6,66}{10} = 0,66$$

Кількість інокуляту для засіву ферментера $V_{\text{пм4}} = 660$ мл можна одержати культивуванням актиноміцетів у колбах на качалці. Для цього використовують качалочні колби об'ємом $V_{\text{колб}} = 750$ мл та коефіцієнтом заповнення $K_{\text{зк}} = 0,2$.

Тоді кількість колб для отримання посівного матеріалу становитиме:

$$N_{\text{колб}} = \frac{V_{\text{пм2}}}{V_{\text{колб}} * K_{\text{зк}}} = \frac{660}{750 * 0,2} = 4,4$$

Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 5 качалочних колб.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу амфотерицину В у ферментері об'ємом 10 м^3 з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити у три етапи.

Таблиця 3.4

Результати розрахунку об'ємів ферментаційного обладнання для підготовки посівного матеріалу і виробничого біосинтезу

Об'єм ферментера, л	Коефіцієнт заповнення	Робочий об'єм ферментера, л	Об'єм посівного матеріалу (10%), л	Конденсат (10%), л	Об'єм поживного середовища, л
10 (м^3)	0,6	6,27 (м^3)	627	564	5079
1 (м^3)	0,6	627	62,7	56,4	508
100	0,6	62,7	6,27	5,64	50,8
10	0,6	6,27	627 (мл)	0,56	5,08
4x750 (мл)	0,2	627 (мл)	–	–	627 (мл)

Таким чином, за результатами розрахунків для біосинтезу Амфотерицину В актиноміцетом *Streptomyces nodosus* D5-2M2A приймаємо до встановлення один ферментер об'ємом 10 м^3 і три інокулятори об'ємом 1 м^3 , 100 л і 10 л.

РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

4.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

4.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

4.1.1.1. Вибір умов і способу культивування

Так як при вирощуванні посівного матеріалу і виробничому культивуванні оптимальним температурним значенням для аероба *Streptomyces nodosus D5-2M2A* є 25°C, а оптимальне значення рН = 7, то існує вірогідність контамінації сторонньою мезофільною і нейтрофільною мікробіотою. Це зумовлює необхідність забезпечувати асептичні умови під час біосинтезу, чого неможливо досягти при поверхневому (твердофазному) культивуванні. Асептичні умови забезпечуються стерилізацією поживного середовища, обладнання і комунікацій, аераційного повітря (необхідного для росту *S. nodosus* та синтезу ним продуктів метаболізму, оскільки даний біологічний агент є облигатним аеробом). З метою запобігання контамінації в ферментері створюється надлишковий тиск подачею стерильного повітря.

Варто враховувати те, що міцелій даного актиноміцету росте в усій товщі субстрату[13], а рідке середовище не створює опору при рості біомаси. Також глибинний спосіб культивування є більш економічний і, на відміну від поверхневого, займає менше простору, його легше механізувати та автоматизувати [22, 23]. Враховуючи все вказане, культивування *S. nodosus D5-2M2A* для біосинтезу амфотерицину В здійснюється глибинним способом.

Біосинтез амфотерицину В здійснюється у періодичному процесі, оскільки максимальний синтез антибіотика відбувається у стаціонарній фазі росту актиноміцета. Таким чином, «підтримання» продуцента в експоненційній фазі росту є недоцільним, так як концентрація антибіотику не буде збільшуватись.

					НУХТ БТЕК 30.03.22 КР ПЗ			
Зм	Арк.	№	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва амфотерицину В	Літера	Аркуш	Аркушів
Розробник	Середенко Є.І.						34	93
Керівник	Воронцов О.О.							34
Н. контр								
Консульт								
Зав. каф.	Стадніков В.П.							
						Кафедра БТМ		

Таким чином, культивування продуцента амфотерицину В здійснюється періодичним глибинним способом в аеробних умовах із забезпеченням асептики проведення процесу.

4.1.1.2. Вибір типу ферментера

Залежно від умов культивування біологічного агента конструкція і оснащення ферментера може відрізнятися. Визначившись зі способом культивування та фізіолого-біохімічними особливостями продуцента, обираємо необхідне оснащення для ферментера, яке б забезпечило утворення даних умов.

У процесі культивування продуцента амфотерицину В аеробні умови створюються в результаті подачі повітря в ферментер. Біореактор повинен бути оснащений барботером для подачі асептичного повітря.

Так як *S. nodosus* є актиноміцетом і утворює міцелій, ферментер не можна оснащувати звичайною мішалкою, адже вона розірве волокна міцелію. Тому для інтенсифікації процесів масообміну та кращої гомогенізації культуральної рідини використовується якірна чи турбінна мішалка, які перемішують культуральну рідину, при цьому не завдаючи ушкоджень міцелію.

Для забезпечення сталої температури ферментер оснащується сорочкою і термометром.

Для контролю рН культуральної рідини ферментер оснащується датчиком рН.

Отже, для проведення виробничого біосинтезу необхідний ферментер, в якому передбачено подачу повітря через барботер, турбінну мішалку, сорочку, термометр і рН-метр.

4.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря

Продуцент Амфотерицину В *Streptomyces nodosus* є аеробом[12], а тому для його нормального розвитку в процесі культивування необхідно подавати в достатній кількості стерильне повітря. Враховуючи те, що даний продуцент культивується глибинним методом, до підготовки повітря пред'являються особливо високі вимоги до стерильності.

Засмоктування атмосферного повітря відбувається за допомогою спеціальних установок, висота забірною пристрою яких становить не менше 8-10 м. Подібні

пристрої розташовуються у найменш забруднених ділянках заводу. Внизу шахтної установки розташовують попередні фільтри Рекка або фільтри з насадкою з кілець Рашига, або стружки, просочені мінеральним маслом. Коефіцієнт K_p становить близько 10%. Після цього повітря надходить на турбокомпресор, за допомогою якого його стискають до тиску не менше 0,2 МПа. Найрозповсюдженішими пристроями для таких цілей є турбокомпресори. Потім повітря, що піддали стисненню надходить в теплообмінник-холодильник, в якому його піддають охолодженню; при цьому волога випадає з повітря у вигляді мікроскопічних крапель. Охоложене повітря спрямовують у вологовідділювач, в якому завдяки багаторазовій зміні напрямку руху повітря та його швидкості мікрокрапельки зливаються між собою. Конденсат, що утворився в результаті таких дій виводять з апарата. Вилучають вологу з повітря для того, щоб забезпечити нормальну роботу набивних фільтрів. Якщо відстань до цеху-споживача повітря становить сотні метрів і більше, допускається встановлення ще одного вологовідділювача. Після цього повітря рухається через теплообмінник-нагрівач, в якому здійснюють нагрівання повітря до температури, близької до температури ферментації і остаточно забезпечують відсутність крапельної вологи. З теплообмінника повітря спрямовують у стерилізаційні фільтри.

З метою досягнення стерильності повітря, яке після обробки відповідатиме необхідним вимогам, застосовують кілька способів: ліквідація мікробіоти нагріванням або іонізуючим випромінюванням, наприклад із застосуванням УФ-випромінювання, або видалення її фільтруванням. Перший спосіб є більш надійним та ефективним, проте в промисловості недопустимий, оскільки на виробництві витрачають колосальні об'єми повітря, щоб такий метод був економічно доцільним. В умовах промислового виробництва застосовують спосіб фільтрації крізь шари дірчастого, нитчастого або сипучого матеріалу. З метою попередньої стерилізації застосовують глибинні (набивні) фільтри, які виготовлені з нитчастих матеріалів. Для кінцевого знезараження перед повітропроводом інокулятора або біореактора вмонтовують персональні фільтри з розгорнутою поверхнею або абсолютні, які

діють як сита, картриджного типу. Так як абсолютні сита створюють декомпресію повітря і швидко забиваються, тому застосовують їх нечасто.

Не зважаючи на те, що волокна набивного фільтра розташовані між собою на відстанях значно більших, ніж діаметри мікрочастинок, вони є досить ефективними. Завдяки інерційному механізму осадження, частинки, розігнані до великих швидкостей, проходячи крізь шар волоконного фільтра, рано чи пізно стикаються з волокном і затримуються ним.

В разі невеликих швидкостей частинки затримуються, за допомогою таких механізмів як: осадження, електростатика або сили Ван-дер-Ваальса. Кожен аерозоль та волокно має критичну швидкість, при якій його фільтраційні можливості є малоефективним. Для таких швидкостей механізм інерції вже не працює, а для інших така швидкість є надто великою.

В якості фільтраційних матеріалів використовують перхлорвінілове волокно з термічною стійкістю 60-70 °С (марки ФП, ФП-15-1,5), поліакрилонітрильне волокно з термічною стійкістю до 180 °С (ФПАН-10-3,0) або до 250 °С (ФПАР-15-1,5), скловолокна (СТВ) або базальтові волокна. Товщини волокон змінюються в межах від 1,5 до 21 мкм. Всі волокна, крім перхлорвінілових, можуть стерилізуватися гострою парою. Перхлорвінілові стерилізують токсичними газами (наприклад, етиленоксид або газоподібним формаліном). Укладку волокон здійснюють у вигляді готових ущільнених шарів з щільністю упаковки 0,043-0,19 від об'єму (здебільшого 0,1-0,15).

Набивні фільтри мають ряд недоліків:

а) Через порівняно малу площу поперечного перерізу, через яку проходить велика кількість повітря, доводиться підвищувати швидкість фільтрування (1-3 м/с), що призводить до утворення каналів і так званого крайового ефекту, через який нефільтроване проходить вздовж стінки апарата.

б) потрапляння крапельної вологи також призводить до утворення каналів і проходження повітря через них без фільтрації.

в) набивні фільтри мають значний гідравлічний опір і важкі в експлуатації.

Сьогодні застосування таких фільтрів допустиме тільки для стерилізаційного очищення першого етапу.

Як індивідуальні фільтри широко застосовують рамні або картриджні фільтри з тканиною Петрянова на основі перхлорвінілових волокон. Конструкція фільтра представляє собою сталевий циліндр зі знімною кришкою і конічним дном. Всередину пристрою вмонтовують 73 конічні перфоровані трубки, обмотані тканиною Петрянова. Загальна площа фільтрування – 17,5 м². Пройшовши через таку тканину повітря вважається повністю чистим[24].

4.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Виробництво полієнового макролідів амфотерицину В здійснюється впродовж 300 днів. Оптимальна площа виробничого приміщення, в якому встановлено виробничий ферментер (10 м³), інокулятори об'ємом 10, 100 л та 1 м³, реактори-змішувачі, автоклави та інше устаткування становить 105 м² (15x21 м). Висота стін – 7,5 м. Загальна площа стін становить $((7,5 * 15) + (7,5 * 21)) = 270 \text{ м}^2$. Площа підлоги – 105 м². Визначимо площі поверхонь, які необхідно мити та/або дезінфікувати.

Для того, щоб обрати дезінфікуючий та мийний засіб, необхідно врахувати його вартість та витрати на оброблювання необхідної площі виробничого приміщення. На 1 м² витрачається приблизно 100 мл розчину дезінфікуючого або мийного засобу[25].

Таблиця 4.1

Розрахунок загальної площі миття та/або дезінфекції оброблюваного об'єкту за весь період виробництва амфотерицину В

Об'єкт миття та/або дезінфекції	Площа (об'єм) оброблюваного об'єкту, м ² (л)	Кількість процесів миття та/або дезінфекції за весь період виробництва	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м ² (м ³)
Обладнання, інвентар, комунікації	11770 л	42	494340
Підлога	105	300	31500
Стіни, двері, вікна	270	10	2700

Засіб дезінфікуючий «Бланідаз актив ензим»

Робочі розчини даного засобу мають виражені миючі, дезодоруючі, змочувальні, емульгуючі властивості. Не викликають корозії металів, не пошкоджують об'єкти, що виготовлені із корозійностійких і нестійких до корозії металів, термостабільних та термолабільних матеріалів, скла, гуми, каучуку, штучної шкіри, полімерних матеріалів, латексу, вітону, тефлону, поліаміду, макролону, полістиролу, поліетилену, м'якого та твердого полівінілхлориду, плексигласу (акрилового скла), поліефіру, силікону, альгінату, гідроколоїду, дерева, кахлю, порцеляни, фаянсу. Не пошкоджують поверхні медичних приладів і устаткування з лакофарбовим, гальванічним і полімерним покриттям, не знебарвлюють і не знижують міцність тканин, не фіксують забруднення органічного походження на поверхні виробів медичного призначення, добре змиваються, не залишають нальоту і плям на поверхнях об'єктів, що піддаються обробці[26].

Засіб дезінфікуючий «Санітаб»

Робочі розчини засобу «Санітаб» володіють антикорозійними, стабілізуючими властивостями, пом'якшують воду, мають змочувальні, емульгуючі, високі мийні та відбілюючі властивості, не пошкоджують об'єкти, що виготовлені із корозійностійкого металу, скла, гуми, полімерних матеріалів, силікону, пластмас, дерева, кахлю, порцеляни, фаянсу та поверхні медичних приладів, апаратів і устаткування з лакофарбовим, гальванічним і полімерним покриттям, не фіксують забруднення органічного походження на поверхні виробів медичного призначення, добре змиваються, не залишають нальоту на поверхнях об'єктів, що піддаються обробці. Засіб не горить, сумісний з милами, сульфованими маслами, аніонними поверхнево-активними речовинами, амфотерними та неіоногенними речовинами, солями лужних металів органічних і неорганічних кислот[27].

Засіб дезінфікуючий «Фамідез Саноксіл 100»

«Фамідез Саноксіл 100» використовують з метою дезінфекції поверхонь приміщень (підлога, стіни, двері, віконні рами та скло, підвіконники тощо), предметів обстановки (тверді та м'які меблі, килими), медичних та інших приладів, апаратів, устаткування з гальванічним, лакофарбовим, полімерним та комбінованим

покриттям, а також виготовлених зі скла (термометри), гуми, предметів догляду хворих (підкладні судна, міхури для льоду, грілки тощо) та особистої гігієни (гребінці, губки тощо), білизни, столового приладдя та посуду (столового, кухонного, аптечного, лабораторного), іграшок, обладнання та устаткування аптечних закладів, обладнання, устаткування та тари харчоблоків закладів охорони здоров'я та дитячих дошкільних закладів, мереж водопостачання, фільтрів систем кондиціонування повітря, фільтрів для ультра-, нано- та мікро-фільтрації, шкіри рук та тіла, транспортних засобів, ємностей для збирання, накопичування, зберігання відходів та сміття, технологічного обладнання, устаткування, продуктопроводи, інвентар, тара підприємств фармацевтичної, мікробіологічної, парфумерно-косметичної, харчової та переробної промисловості, перукарських, манікюрних та косметологічних інструменти, вентиляційних систем, кондиціонерів, санітарно-технічного обладнання, прибирального інвентарю[28].

Дезінфекційний засіб «Фамідез Санокварт»

Робочі розчини засобу "Фамідез Санокварт" виявляють мийні властивості, не ушкоджують об'єкти із металу, скла, гуми та полімерних матеріалів, добре змиваються, не залишають нальоту. Засіб "Фамідез Санокварт" не сумісний з окисниками, аніонними поверхнево-активними речовинами, милами.

Санокварт" використовують з метою дезінфекції та миття поверхонь приміщень (підлога, стіни, двері, віконні рами тощо); твердих меблів; медичних приладів, апаратів, устаткування з лакофарбовим, гальванічним, полімерним і гумовим покриттям; санітарно-технічного та технологічного обладнання, предметів догляду хворих, прибирального інвентарю[29].

Проаналізувавши дані, що наведені в таблиці 4.1, можна зробити такі висновки:

- 1) Обладнання, інвентар і комунікації варто мити засобами «Фамідез Саноксіл 100» і «Бланідаз актив ензим»;
- 2) Стіни, підлогу, вікна та двері варто мити та дезінфікувати засобами «Фамідез Санокварт» та «Санітаб».

Миття ферментера (10 м³), інокуляторів (10 л, 100 л, 1 м³), збірників для приготування композицій трьох стадій і запасних розчинів (загалом 11770 л) відбувається циркуляційним способом. Об'єм мийного засобу складе близько половини кожного з відповідних об'ємів обладнання. Всього для циклу необхідно витратити близько 5885 л робочого мийного засобу, а для всього періоду виробництва – 141240 л.

Таблиця 4.2

Узагальнена характеристика витрати мийних та дезінфікувальних засобів для виробництва амфотерицину В

Назва мийного/ дезінфікуючого засобу	Об'єкт миття та або дезінфекції	Концентрація робочого розчину, %	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м ² (л)	Кількість робочого розчину за весь період виробництва, л	Вартість 1 л/кг мийного або дезінфікувального засобу, грн	Загальна вартість миття та/або дезінфекції за весь період виробництва, грн
Фамідез Саноксіл 100	Обладнання, інвентар, комунікації	10	494340	49434	300	148302000
Бланідаз актив ензим	Обладнання, інвентар, комунікації	5	494340	98868	382	188837880
Фамідез Санокварт	Стіни, підлога, вікна, двері, інвентар	3	34200	11400	310	10602000
Санітаб	Стіни, підлога, вікна, двері, інвентар	0,3	34200	10260	210	7182000

Підлогу необхідно мити та дезінфікувати кожного дня (всього 300 разів), стіни, двері та вікна – 1 раз на місяць, тобто 10 разів.

Чистота повітря в приміщеннях повинна відповідати встановленим нормам[26], отже обираємо періодичність включення стельових бактерицидних ламп – 1 година після кожного генерального прибирання та 30 хв кожного робочого дня (під час обідньої перерви).

4.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Згідно з попередньо проведеними розрахунками (див. розділ 3.2) виробничий біосинтез Амфотерицину В проходить у ферментері об'ємом 10 м^3 , що містить $5,7 \text{ м}^3$ поживного середовища. Інокулянт отримують у два етапи: у колбах на качалці та в інокуляторах об'ємом 10 л, 100 л та 1 м^3 .

Максимальний синтез амфотерицину В ($15,6 \text{ г/л}$ за 144 години) досягається за умов росту штаму *Streptomyces nodosus* D5-2M2A в середовищі такого складу (г/л):

- Глюкоза – 69;
- Бавовняне борошно – 25;
- CaCO_3 – 9;
- KN_2PO_4 – 0,1;
- Стрептоміцин – 0,0000004
- рН середовища – 7,0.

Так як глюкоза в кількості більше 40 г/л сповільнює розвиток мікроорганізмів, то в поживне середовище цей компонент буде вноситися в саме в такій кількості. Решта 19 г/л глюкози буде вноситися в якості підживлювального розчину. Варто відзначити, що попереднього запарювання потребує бавовняне борошно перед початком стерилізації. Процес запарювання відбувається безпосередньо в реакторі-змішувачі, який обладнано сорочкою та мішалкою. Враховуючи те, що дигідроортофосфату калію і стрептоміцину в поживному середовищі мізерна кількість, доцільнішим буде приготування запасного розчину, із якого і буде вноситися сіль та антибіотик. Розчин стрептоміцину стерилізується за допомогою стерильних бактеріологічних фільтрів.

4.1.4.1. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках

Для отримання посівного матеріалу продуцента *Streptomyces nodosus* D5-2M2A у колбах на качалці об'єм яких 750 мл потрібно приготувати 180 мл поживного середовища наступного складу, г/л:

- Глюкоза – 10;
- Пептон – 15;
- Дріжджовий екстракт – 10;
- NaCl – 5;
- CaCO₃ – 1;
- Стрептоміцин – 0,001

Враховуючи невеликі об'єми компонентів, стерилізацію будемо проводити в автоклаві та за допомогою стерильного бактеріологічного фільтра.

Компоненти середовища розбиваються на наступні композиції:

Композиція А: глюкоза, дріжджовий екстракт (режим стерилізації: 112 °С; 0,05 МПа; 30 хв).

Композиція Б: пептон (режим стерилізації: 120 °С; 0,1 МПа; 30 хв).

Композиція В: NaCl (режим стерилізації: 131 °С; 0,15 МПа; 40 хв).

Композиція Г: CaCO₃ (режим стерилізації: 131 °С; 0,15 МПа; 40 хв).

Композиція Д: стрептоміцин (холодна стерилізація: діаметр пор: 0,22 мкм).

Глюкоза і дріжджовий екстракт (композиція А) є термолабільними, а тому потребують м'якого режиму стерилізації. Перед стерилізацією пептону його суспендують в холодній воді, потім розварюють на водяній бані при температурі 90 °С протягом 30 хв і тільки тоді стерилізують. Стерилізацію композицій В і Г проводять окремо при стандартній для них температурі, так як можуть утворюватися нерозчинні солі Ca²⁺. Стерилізацію усіх компонентів проводять в автоклаві. Стрептоміцин стерилізують безпосередньо перед внесенням у поживне середовище, пропускаючи через стерильний бактеріальний фільтр з діаметром пор 0,22 мкм.

4.1.4.2. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в інокуляторі об'ємом 10 л

Об'єм поживного середовища для цієї стадії складає 6,66 л (див. *табл. 3.4*). Проаналізувавши склад поживного середовища для вирощування *S. nodosus D5-2M2A*, умовно ділимо його на такі композиції (залежно від режиму стерилізації компонентів):

Композиція А: бавовняне борошно, глюкоза (режим стерилізації: 112 °С, 0,05 МПа 30 хв).

Композиція Б: CaCO₃ (режим стерилізації: 131 °С; 0,15 МПа; 40 хв).

Композиція В: КН₂РО₄ (режим стерилізації: 131 °С; 0,15 МПа; 40 хв).

Композиція Г: стрептоміцин (холодна стерилізація: діаметр пор: 0,22 мкм).

Стерилізацію карбонату кальцію із композиції Б проводять в автоклаві при 131 °С тривалістю 40 хв. Стерилізацію запасного розчину дигідроортофосфату калію із композиції В проводять в реакторі-збірнику, подаючи гостру пару при 131 °С тривалістю 40 хв. Бавовняне борошно із композиції А спочатку суспендують в холодній воді в збірнику, заварюють при 90 °С протягом 30 хв, а потім додають глюкозу і стерилізують за температури 112 °С впродовж 30 хв. Запасний розчин стрептоміцину із композиції Г стерилізують безпосередньо перед подачею в поживне середовище, пропускаючи через стерильний бактеріальний фільтр з діаметром пор 0,22 мкм.

4.1.4.3. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в інокуляторі об'ємом 100 л

Об'єм поживного середовища для цієї стадії становить 63,3 л (див. *табл. 3.4*). Проаналізувавши склад поживного середовища для вирощування *S. nodosus D5-2M2A*, умовно ділимо його на такі композиції (залежно від режиму стерилізації компонентів):

Композиція А: бавовняне борошно, глюкоза (режим стерилізації 112 °С, 0,05 МПа 30 хв).

Композиція Б: CaCO₃ (режим стерилізації 131 °С; 0,15 МПа; 40 хв).

Композиція В: КН₂РО₄ (режим стерилізації 131 °С; 0,15 МПа; 40 хв).

Композиція Г: стрептоміцин (холодна стерилізація: діаметр пор: 0,22 мкм).

Стерилізацію карбонату кальцію із композиції Б проводять в автоклаві при 131 °С тривалістю 40 хв. Стерилізацію запасного розчину дигідроортофосфату калію із композиції В проводять в реакторі-збірнику, подаючи гостру пару при 131 °С тривалістю 40 хв. Бавовняне борошно із композиції А спочатку суспендують в холодній воді в збірнику, заварюють при 90 °С протягом 30 хв, а потім додають глюкозу і стерилізують за температури 112 °С впродовж 30 хв. Запасний розчин стрептоміцину із композиції Г стерилізують безпосередньо перед подачею в поживне середовище, пропускаючи через стерильний бактеріальний фільтр з діаметром пор 0,22 мкм.

4.1.4.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в інокуляторі об'ємом 1 м³

Об'єм поживного середовища для цієї стадії становить 633 л (див. *табл. 3.4*). Проаналізувавши склад поживного середовища для вирощування *S. nodosus D5-2M2A*, умовно ділимо його на такі композиції (залежно від режиму стерилізації компонентів):

Композиція А: бавовняне борошно, глюкоза (режим стерилізації 112 °С, 0,05 МПа 30 хв).

Композиція Б: CaCO₃ (режим стерилізації 131 °С; 0,15 МПа; 40 хв).

Композиція В: КН₂РО₄ (режим стерилізації 131 °С; 0,15 МПа; 40 хв).

Композиція Г: стрептоміцин (холодна стерилізація: діаметр пор: 0,22 мкм).

Стерилізацію карбонату кальцію із композиції Б проводять в автоклаві при 131 °С тривалістю 40 хв. Стерилізацію запасного розчину дигідроортофосфату калію із композиції В проводять в реакторі-збірнику, подаючи гостру пару при 131 °С тривалістю 40 хв. Бавовняне борошно із композиції А спочатку суспендують в холодній воді в збірнику, заварюють при 90 °С протягом 30 хв, а потім додають глюкозу і стерилізують за температури 112 °С впродовж 30 хв. Запасний розчин стрептоміцину із композиції Г стерилізують безпосередньо перед подачею в поживне середовище, пропускаючи через стерильний бактеріальний фільтр з діаметром пор 0,22 мкм.

4.1.4.5. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу в ферментері об'ємом 10 м³

Об'єм поживного середовища для проведення виробничого біосинтезу становить 5 м³ (див. *табл. 3.4*). Проаналізувавши склад поживного середовища для вирощування *S. nodosus D5-2M2A*, умовно ділимо його на такі композиції (залежно від режиму стерилізації компонентів):

Композиція А: бавовняне борошно, глюкоза (режим стерилізації 112 °С, 0,05 МПа 30 хв).

Композиція Б: СаСО₃ (режим стерилізації 131 °С; 0,15 МПа; 40 хв).

Композиція В: КН₂РО₄ (режим стерилізації 131 °С; 0,15 МПа; 40 хв).

Композиція Г: стрептоміцин (холодна стерилізація: діаметр пор: 0,22 мкм).

Стерилізацію карбонату кальцію із композиції Б проводять в автоклаві при 131 °С тривалістю 40 хв. Запасний розчин дигідроортофосфату калію із композиції В стерилізують в реакторі-збірнику подаючи гостру пару при 131 °С тривалістю 40 хв. Бавовняне борошно із композиції А спочатку суспендують в холодній воді в збірнику, заварюють при 90 °С протягом 30 хв, а потім додають глюкозу і стерилізують за температури 112 °С впродовж 30 хв. Запасний розчин стрептоміцину із композиції Г стерилізують безпосередньо перед подачею в поживне середовище, пропускаючи через стерильний бактеріальний фільтр з діаметром пор 0,22 мкм.

4.1.4.6. Обґрунтування використання стрептоміцину при одержанні інокуляту та виробничому культивуванні

У прокаріотичних організмів синтез білкових речовин є багатоступеневим процесом, який можна пригнічувати на більшості етапів або взагалі зупиняти. До цих етапів належать, наприклад, транскрипцію матричної РНК, зв'язування інформаційною РНК з рибосомами, постачання амінокислот за допомогою тРНК та подовження поліпептидного ланцюга.

У актиноміцета *Streptomyces nodosus* можна впливати на синтез білка впливаючи на 70S рибосому, або на один із її компонентів, такі як: 16S, 23S, 30S і 50S рибосомкою РНК. Антибіотики, що здійснюють зв'язування рибосоми,

належать до класу аміноглікозидів. Серед найпідходящих можна назвати стрептоміцин, пуроміцин, дигідрострептоміцин, неоміцин, канаміцин, гентаміцин, амікацин і тобраміцин. Серед інших класів антибіотиків, що здатні зв'язувати рибосому, можна назвати макроліди, такі як еритроміцин, а також тетрацикліни, тіострептон, хлорамфенікол, лінкоміцин та спектиноміцин. Для *Streptomyces nodosus*, що синтезує полієновий макролід, подібний вплив є тотожним впливу на синтез амфотерицину В, а також на синтез побічного амфотерицину А. Дія деяких антибіотиків на актиноміцет та їх результативність представлені в *табл. 4.3*[30].

Таблиця 4.3

Вплив антибіотиків на біосинтез амфотерицинів[30]

Антибіотик	Амфотерицин А, мг/л	Амфотерицин В, мг/л
1	2	3
Контроль	2010	920
Стрептоміцин	325	1300
Дигідрострептоміцин	375	1020
Неоміцин	120	405
Тіострептон	100	675
Лінкоміцин	400	1220
Хлорамфенікол	975	1100
Еритроміцин	950	1175
Хлортетрациклін	825	970
Пуроміцин	875	950

Як видно із даних, що зазначені в *табл. 4.3*, стрептоміцин найкраще зменшує кількість біологічно неактивного амфотерицину А, збільшуючи при цьому біологічно активний амфотерицин В. Таким чином, додавання невеликої кількості даного антибіотику в поживне середовище дозволяє збільшити вихід необхідного цільового продукту і зменшити вихід біологічно неактивної речовини. Варто також зазначити, що додавання стрептоміцину дозволяє зберегти стабільність генно-модифікованого штаму, яким є *Streptomyces nodosus D5-2M2A*, що стимулює збереження заданих ознак.

Таблиця 4.4

**Розрахунок вмісту та особливості приготування деяких компонентів
поживного середовища для культивування в колбах на качалці**

Об'єм середовища, л	Глюкоза		Дріжджовий екстракт		Пептон		NaCl		CaCO ₃		Стрептоміцин	
	Вміст, г	Особливості приготування	Вміст, г	Особливості приготування	Вміст, г	Особливості приготування	Вміст, г	Особливості приготування	Вміст, г	Особливості приготування	Вміст, мг	Особливості приготування
1	6,3	у колбі на 2 л	6,3	у колбі на 2 л	9,4	у колбі на 500 мл	3,5	у колбі на 100 мл	0,63	у колбі на 100 мл	1	у колбі на 100 мл

Таблиця 4.5

**Розрахунок вмісту та особливості приготування деяких компонентів
поживного середовища для культивування в інокуляторі та ферментері**

Об'єм середовища, л	Глюкоза		Бавовняне борошно		CaCO ₃	
	Вміст, г	Особливості приготування	Вміст, г	Особливості приготування	Вміст, г	Особливості приготування
0,627	251	в інокуляторі на 10 л	157	в інокуляторі на 10 л	5,64	у колбі на 1 л
5,13	2150	в інокуляторі на 100 л	1570	в інокуляторі на 100 л	564	у збірнику на 10 л
51,3	21,5 (кг)	в інокуляторі на 1 м ³	15,7 (кг)	в інокуляторі на 1 м ³	5640	у збірнику на 50 л
513	215 (кг)	У ферментері на 10 м ³	157 (кг)	У ферментері на 10 м ³	56,4 (кг)	у збірнику на 1 м ³

**Розрахунок вмісту та особливості приготування компонентів підживлювальних
і запасних розчинів для поживного середовища для культивування в
інокуляторі та ферментері**

Назва компоненту	Вміст компоненту, кг	Об'єм розчину, л	Особливості приготування
Глюкоза	4,8	12	У збірнику на 15 л
K_2HPO_4	700 (г)	997,95	У збірнику на 1 м ³ л
Стрептоміцин	5 (г)	144,5	У збірнику на 250 л

Таким чином, виробництво необхідно забезпечити таким обладнанням:

- Колбами на 100 мл, 500 мл та 2 л;
- Збірниками на 10 л, 10 л, 15 л, 50 л, 250 л, 1 м³ та 10 м³;
- Інокуляторами на 10 л, 100 л і 1 м³ та ферментером на 10 м³.

РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання, зображеного на апаратурних схемах (див. *графічна частина*), наведена у *табл 5.1*.

Таблиця 5.1.

Специфікація обладнання

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
ПЗ-1	Пристрій для забору повітря	1	Вентилятор радіальний (центробіжний) VRM 150 E2 потужністю 900 м ³ /год, максимальна робоча температура до 60 °С. Виробник: «VENUS», Словачія[1].
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр повітряний панельний класу G4. Фільтроматеріал – поліестер. Продуктивність – 1910 м ³ /год. Ефективність очистки – 75%. Виробник: ООО «Аерофільтр», Україна[2].
К-3	Компресор	1	Компресор MetaboMega 400-50 W. Продуктивність – 300 л/хв, робочий тиск – 10 бар. Виробник: ТОВ «Метабо Україна»[3].
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Водяний охолоджувач AerostarSWC. Максимальний допустимий тиск – 1,5 МПа, вихідна температура повітря +30 °С. Виробник: «Аеростар», Україна[4].
Рес-5	Ресивер	1	Ресивер для стиснутого повітря Р 200.500. Об'єм 200 л, максимальний робочий тиск 10 бар. Виробник: «Ентех Україна»[5].
Т-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Водяний нагрівач SWH. Максимальний допустимий тиск – 1,6 МПа при температурі води 100 °С. Виробник: «Аеростар», Україна[6].

НУХТ БТЕК 08.04.22 КР ПЗ				
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>
<i>Розробник</i>	<i>Середенко Е.І.</i>			
<i>Керівник</i>	<i>Воронцов О.О.</i>			
<i>Н. контр</i>				
<i>Консульт</i>				
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стабніков В.П.</i>			
РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання			<i>Літера</i>	<i>Аркцш</i>
				<i>Аркцшів</i>
				50
Кафедра БТМ				

Продовження таблиці 5.1

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
Ф-7	Головний фільтр очистки повітря	1	Фільтр повітряний кишеньковий класу F9. Фільтроматеріал – поліестер/мікро-скловолокно. Продуктивність – 460 м ³ /год. Виробник: ООО «Аерофільтр», Україна[7].
Ф-28 Ф-30 Ф-32 Ф-34	Індивідуальний фільтр очистки повітря	13	Фільтри P-SRFC. Фільтроматеріал – боросилікат, ступінь затримки – 99,99999995%. Виробник: «Donaldson», США[8].
Д-8 Д-10 Д-12 Д-14 Д-16 Д-18 Д-20 Д-22	Ваговий дозатор		Ваговий дозатор ФС 75+. Робочий діапазон: 0,15-40 кг. Виробник: ООО «ТехноМашСтрой», Україна[9].
Д-24 Д-26	Ваговий дозатор		Ваговий дозатор ФС-125+. Робочий діапазон - 50-100 кг. Виробник: ООО «ТехноМашСтрой»[9].
Р-15	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації розчинів	1	Реактор-змішувач на 5 л. Максимальний допустимий тиск: 10 бар. Виробник: ООО «Промфарм НПК», Україна[10].
Р-19 Р-24	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації розчинів	1	Реактор-змішувач на 10 л. Виробник: ООО «Кабельфармтехніка», Україна[11].
Р-9	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації розчинів	1	Реактор-змішувач на 15 літрів. Оснащений сорочкою та мішалкою. Максимальний допустимий тиск: 4 атм. Виробник: «UkrChemGroup», Україна[12].

Продовження таблиці 3.1

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
P-17 P-23	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації розчинів	1	Реактор-змішувач на 50 літрів. Оснащений сорочкою та мішалкою. Максимально допустима температура: 160 °С. Виробник: ООО «Технолог», Україна[13].
P-13	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації розчинів	1	Реактор-змішувач на 250 літрів. Оснащений сорочкою та мішалкою. Виробник: ООО «Кабельфармтехніка», Україна[14].
P-21 P-27	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації розчинів	2	Реактор-змішувач з якірною мішалкою на 500 літрів. Оснащений сорочкою та мішалкою. Виробник: «ХімМікс», Україна[15].
P-11	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації розчинів	1	Реактор-змішувач на 1 м ³ . Оснащений сорочкою та мішалкою. Виробник: «Стройторгсервис», Україна[16].
P-25	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації розчинів	1	Реактор-змішувач на 10 м ³ . Оснащений сорочкою та мішалкою. Виробник: «Стройторгсервис», Україна[17].
I-39	Інокулятор	1	Ферментер BiostatCplus об'ємом 10 літрів. Швидкість обертання мішалки – 20-1500 об/хв. Виробник: ООО «Фенікс-СД»[18].
I-41	Інокулятор	1	Ферментер BIOSTAT D DCU об'ємом 100 л. Виробник: ООО «Фенікс-СД»[19].
I-43	Інокулятор	1	Ферментер VE316100 об'ємом 1 м ³ . Виробник: «Applikon Biotechnology B.V.», Нідерланди[20].
Фер-45	Ферментер	1	Ферментер об'ємом 10 м ³ . Оснащений термометром, рН-метром, мішалкою і барботером. Виробник: «Knick Bio», Китай[21].
H-46	Насос роторний	1	Насос роторний НР-10 (В3-ОРА-10). Продуктивність: 10 м ³ /год. Виробник: ООО «МТС-Полтава», Україна[22].

Примітка*: пошук і підбір обладнання здійснювався з використанням наступних електронних джерел:

1. [https://www.ventilation-ukraine.com.ua/industrial-ventilators/centrifugal-fans-\(snails\)-bahcivan-dundar/VRM-E2-150](https://www.ventilation-ukraine.com.ua/industrial-ventilators/centrifugal-fans-(snails)-bahcivan-dundar/VRM-E2-150) (пристрій для забору повітря);
2. https://aerofilter.com.ua/filtr_panelnyj.html (фільтр грубої очистки);
3. <https://metabo.net.ua/catalog/product/kompressor-metabo-mega-400-50-w/> (компресор);
4. <https://aerostar.ua/ua/catalogue/vozduhoobrabatyvajuschee-oborudovanie/kanalnoe-ventiljacionnoe-oborudovanie/ARPD0286.html> (теплообмінник-охолоджувач);
5. <https://entech-ukraine.dp.ua/p639933007-vozduhosbornik-resiver-dlya.html> (ресивер);
6. <https://aerostar.ua/ua/catalogue/vozduhoobrabatyvajuschee-oborudovanie/kanalnoe-ventiljacionnoe-oborudovanie/ARPD0284.html> (теплообмінник-нагрівач);
7. https://aerofilter.com.ua/filtr_karmannyj.html (головний фільтр очистки повітря);
8. <https://www.donaldson.com/ru-ru/compressed-air-process/products/compressed-air-gas/filter-elements/sterile-elements/p-srf-c/> (індивідуальний фільтр очистки повітря);
9. <https://tmagro.com.ua/p1345417342-vesovoj-dozator.html> (ваговий дозатор);
10. <https://ua.all.biz/reaktor-laboratornyj-5-l-1-bar-10bar-dlya-g397718> (реактор-змішувач 5 л);
11. <http://www.kft2.com.ua/gomik.html> (реактор-змішувач 10 л);
12. <https://khimmix.ua/himicheskie-reaktory/laboratornyj-reaktor-15-l> (реактор-змішувач для приготування та стерилізації розчинів на 15 л);
13. <https://tehnolog.com.ua/catalog/pharma/mixers-for-liquid-viscous-and-paste-like-products/> (Реактор-змішувач для приготування та стерилізації розчинів на 50 л);
14. <http://www.kft2.com.ua/reaktor250.html> (Реактор-змішувач на 150 л);

15. <https://khimmix.ua/smesiteli-dlya-zhidkостей/smesitel-500-s-yakornoj-meshalkoj> (Реактор-змішувач на 500 л);
16. <https://stprom.com.ua/p1016499204-reaktor-1000-litrov.html> (Реактор-змішувач на 1 м³);
17. <https://stprom.com.ua/p1016501527-reaktor-10000-litrov.html> (Реактор-змішувач на 10 м³);
18. <http://sartorius-sd.com.ua/index.php/%D1%81%D1%82%D0%B5%D1%80%D0%B8%D0%BB%D0%B8%D0%B7%D1%83%D0%B5%D0%BC%D1%8B%D0%B5-%D0%BD%D0%B0-%D0%BC%D0%B5%D1%81%D1%82%D0%B5-%D0%B1%D0%B8%D0%BE%D1%80%D0%B5%D0%B0%D0%BA%D1%82%D0%BE%D1%80%D1%8B/biostat%C2%AE-cplus.html> (інокулятор на 10 л);
19. <http://sartorius-sd.com.ua/index.php/стерилизуемые-на-месте-биореакторы/промышленный-реактор-biostat@d-dcu.html> (інокулятор на 100 л);
20. <https://www.biocenturyresearchfarm.iastate.edu/1000-liter-fermenter> (інокулятор на 1 м³ л);
21. <https://www.indiamart.com/proddetail/bioreactors-14497076455.html> (ферментер на 10 м³);
22. <https://mtsp.com.ua/catalog/product/nasos-rotornyj-v3-ora-10-28/> (насос роторний).

РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА АМФОТЕРИЦИНУ В

ДР 1. Підготовка аераційного повітря

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

Атмосферне повітря засмоктують через пристрій для забору повітря (ПЗ-1) на висоті 40 м, де концентрація пилу і мікроорганізмів є найнижчою.

ДР 1.2. Попереднє грубе очищення повітря

На фільтрі грубої очистки (Ф-2) здійснюється попередня очистка повітря від пилу та механічних часток діаметром 5-10 мкм. Ступінь очищення при цьому становить 75%. Потім, очищене повітря поступає у компресор (К-3). Осад на фільтрі відправляють на знешкодження відходів.

ДР 1.3. Компресування повітря

Повітря стискається в компресорі (К-3). При цьому тиск підвищується до 0,1 МПа, а температура зростає до 120-250 °С. В результаті цього знищується велика кількість контамінуючої мікрофлори, а на також збільшується кількість вологи.

ДР 1.4. Охолодження повітря та видалення зайвої вологи

У теплообміннику-охолоджувачі (Т-4) з метою відділення вологи відбувається швидке охолодження повітря з 120-250 °С до 20-30 °С. Після цього охоложене повітря передають до ресивера (Рес-5), де вміст вологи зменшується до $W = 60\%$, а пульсації згладжуються.

ДР 1.5. Нагрівання повітря

З метою уникнення псування головного та індивідуального фільтрів конденсатом пари, охоложене повітря в теплообміннику-нагрівачі (Т-6) підігрівають до 25 ± 1 °С.

					НУХТ БТЕК 10.04.22 КР ПЗ					
Зм	Арк.	№	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми					
Розробник	Середенко Е.І.							Літера	Аркуш	Аркушів
Керівник	Воронцов О.О.								55	93
Н. контр										55
Консульт								Кафедра БТМ		
Зав. каф.	Стадніков В.П.									

ДР 1.6. Очищення повітря в головному фільтрі

Охолоджене повітря, проходячи через головний фільтр (Ф-7), очищується від мікроорганізмів та пилу. Ступінь очищення при цьому становить $E = 95\%$. Осад на фільтрі відправляється на знешкодження відходів.

ДР 1.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Фінальна стадія очищення повітря відбувається в індивідуальних фільтрах (Ф-28, Ф-30, Ф-32, Ф-34), що встановлюються перед збірниками, інокуляторами і ферментером. Ступінь очищення становить $E = 99,99999995\%$.

ДР 2. Приготування і стерилізація поживних середовищ

ДР 2.1. Приготування і стерилізація поживних середовищ качалочних колб.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках наведений у *табл 6.1*.

Таблиця 6.1

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 627 мл середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, V, мл
Глюкоза	10	6,3	А	500
Дріжджовий екстракт	10	6,3		
Вода		487 (мл)		
Пептон	15	9,4	Б	50
Вода		41 (мл)		
NaCl	5	3,5	В	27
Вода		23,5 (мл)		
CaCO ₃	1	0,63	Г	25
Вода		25 (мл)		
Стрептоміцин	1 (мг)	1 (мг)	Д	25
Вода		25 (мл)		
Всього:				627

ДР 2.1.1. Приготування і стерилізація композиції А

На аналітичних вагах зважують 6,3 г глюкози і 6,3 г дріжджового екстракту. Наважки поміщають у колбу об'ємом 2 л, додають 487 мл питної води, перемішують, закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при $t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P = 0,05\text{ МПа}$ (30 хв).

ДР 2.1.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 9,4 г пептону. Наважку поміщають у колбу об'ємом 500 м, додають 41 мл питної води, перемішують, закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при $t = 121\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P = 0,1\text{ МПа}$ (30 хв).

ДР 2.1.3. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 3,5 г NaCl. Наважку поміщають у колбу об'ємом 100 мл, додають 23,5 мл питної води, змішують до повного розчинення солі, закорковують ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при $t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P = 0,15\text{ МПа}$ (40 хв).

ДР 2.1.4. Приготування і стерилізація композиції Г

На технічних вагах зважують 0,63 г CaCO₃. Наважку поміщають у колбу об'ємом 100 мл, додають 25 мл питної води, змішують, закорковують ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при $t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P = 0,15\text{ МПа}$ (40 хв).

ДР 2.1.5. Приготування і стерилізація композиції Д

На аналітичних вагах зважують 1 мг стрептоміцину. Наважку поміщають у колбу об'ємом 100 мл, заливають 25 мл питної води, змішують і закорковують ватно-марлевым корком. Безпосередньо перед подачею в поживне середовище за допомогою шприца набирають необхідну кількість розчину антибіотику і пропускають через стерильну бактеріологічну мембрану з діаметром пор 0,22 мкм.

ДР 2.1.6. Змішування композицій поживного середовища

В асептичних умовах в попереднє простерилізовану колбу об'ємом 2 л з стерильною композицією А (від ДР 2.1.1) зливають простерилізовані композиції Б, В, Г і Д (від ДР 2.1.2–2.1.5), перемішують і розливають по 150 мл у чотири качалочних колб об'ємом 750 мл.

ДР 2.2 Приготування і стерилізація поживного середовища для ферментеру об'ємом 10 л

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках наведений у табл 6.2.

Таблиця 6.2

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л (Кз = 0,6).

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 6,27 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	40	251	А	4
Бавовняне борошно	25	157		
Вода		3192 (мл)		
Конденсат		400 (мл)		
CaCO ₃	9	5,64	Б	0,5
Вода		444 (мл)	В	0,5
КН ₂ РО ₄	0,1	0,63 г		
Вода		499 (мл)		
Стрептоміцин	0,001	0,005	Г	0,130
Вода		130 (мл)		
Всього:				5,13

ДР 2.2.1 Приготування і стерилізація композиції А

Через дозатор (Д-14) в реактор-збірник об'ємом 5 л (Р-15) відвантажують 157 г бавовняного борошна, додають 3,192 л холодної води (враховуючи % конденсату при подальшій стерилізації), вмикають перемішуючий пристрій до повної гомогенізації суспензії і заварюють подачею пари в сорочку збірника до $t = 90$ °С протягом 30 хв. Після цього через дозатор (Д-14) в реактор-збірник об'ємом 5 л (Р-15) вносять 251 г глюкози, перемішують, самоплином передають до інокулятора об'ємом 10 л (І-29) і стерилізують подачею пари в сорочку інокулятора при $t = 112$ °С, $P = 0,05$ МПа (30 хв).

ДР 2.2.2 Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 5,64 г CaCO₃. Наважку поміщають у колбу об'ємом 1 л, додають 444 мл води питної, перемішують, закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при t = 131 °С, P = 0,15 МПа (40 хв).

ДР 2.3 Приготування і стерилізація поживного середовища для ферментеру об'ємом 100 л

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках наведений у табл 6.3.

Таблиця 6.3

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в ферментері об'ємом 100 л (Кз = 0,6).

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 62,7 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	40	2150	А	40
Бавовняне борошно	25	1570		
Вода		31,92 (л)		
Конденсат		4 (л)	Б	5
CaCO ₃	9	564		
Вода		3,94 (л)		
Конденсат		0,5 (мл)	В	5
КН ₂ РО ₄	0,1	6,3		
Вода		4,495 (л)		
Конденсат		0,5	Г	1,3
Стрептоміцин	0,001	0,05		
Вода		1300 (мл)		
Всього				51,3

ДР 2.3.1 Приготування і стерилізація композиції А

Через дозатор (Д-16) в реактор-збірник об'ємом 50 л (Р-17) відвантажують 1570 г бавовняного борошна, додають 40 л холодної води (враховуючи % конденсату при подальшій стерилізації), вмикають перемішувач до повної гомогенізації суспензії і заварюють подачею пари в сорочку збірника до $t = 90$ °С протягом 30 хв. Після цього через дозатор (Д-16) в реактор-збірник об'ємом 50 л (Р-17) додають 2150 г глюкози, перемішують, самопливом передають до інокулятора об'ємом 100 л (І-31) і стерилізують подачею пари в сорочку інокулятора при $t = 112$ °С, $P = 0,05$ МПа (30 хв).

ДР 2.3.2 Приготування і стерилізація композиції Б

Через дозатор (Д-18) у реактор-збірник об'ємом 10 л (Р-19) завантажують 564 г CaCO_3 додають 5 л води питної (враховуючи % конденсату при подальшій стерилізації), перемішують і стерилізують подачею гострої пари при $t = 131$ °С, $P = 0,15$ МПа (40 хв). Отриманий розчин самопливом передають у попередньо простерилізований інокулятор на 100 л (І-31).

ДР 2.4 Приготування і стерилізація поживного середовища для ферментеру об'ємом 1 м³

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках наведений у *табл 6.4*.

Таблиця 6.4

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в ферментері об'ємом 1 м³ ($K_3 = 0,6$).

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 627 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	40	21,5 (кг)	А	400
Бавовняне борошно	25	15,7 (кг)		
Вода		319,2 (л)		
Конденсат		400 (л)		
CaCO_3	9	5640	Б	50
Вода		39,4 (л)		
Конденсат		5 (л)		

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 627 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, V, л
КН ₂ РО ₄	0,1	63	В	50
Вода		44,95 (л)		
Конденсат		5		
Стрептоміцин	0,001	0,5	Г	13
Вода		13 (л)		
Всього				513

ДР 2.4.1 Приготування і стерилізація композиції А

Через дозатор (Д-20) в реактор-збірник об'ємом 500 л (Р-21) відвантажують 15,7 кг бавовняного борошна, додають 319,2 л холодної води (враховуючи % конденсату при подальшій стерилізації), вмикають перемішувач до повної гомогенізації суспензії і заварюють подачею пари в сорочку збірника до $t = 90$ °С протягом 30 хв. Після цього через дозатор (Д-26) в реактор-збірник об'ємом 500 л (Р-21) додають 21,5 кг глюкози, перемішують, самопливом передають до інокулятора на 1 м³ (І-33) і стерилізують подачею пари в сорочку інокулятора при $t = 112$ °С, $P = 0,05$ МПа (30 хв).

ДР 2.4.2 Приготування і стерилізація композиції Б

Через дозатор (Д-24) у реактор-збірник об'ємом 50 л (Р-23) завантажують 5640 г СаСО₃ додають 39,4 л води питної (враховуючи % конденсату при подальшій стерилізації), перемішують і стерилізують подачею гострої пари при $t = 131$ °С, $P = 0,15$ МПа (40 хв). Отриманий розчин самопливом передають у попередньо простерилізований інокулятор на 1 м³ (І-33).

ДР 2.5 Приготування і стерилізація поживного середовища для виробничого ферментеру об'ємом 10 м³

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках наведений у *табл 6.5*.

Таблиця 6.5

Композиції стерилізації компонентів для виробничого культивування в ферментері об'ємом 10 м³ (Кз = 0,6).

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 6,27 м ³ л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	40	215 (кг)	А	4000
Бавовняне борошно	25	157 (кг)		
Вода		3192 (л)		
Конденсат		40 (л)	Б	500
СаСО ₃	9	56,4 (кг)		
Вода		394 (л)		
Конденсат		50 (л)	В	500
КН ₂ РО ₄	0,1	63		
Вода		449,5 (л)		
Конденсат		5	Г	130
Стрептоміцин	0,001	5		
Вода		130 (л)		
Всього				5130

ДР 2.5.1 Приготування і стерилізація композиції А

Через дозатор (Д-24) в реактор-збірник об'ємом 10 м³ (Р-25) відвантажують 157 кг бавовняного борошна, додають 4 м³ холодної води (враховуючи % конденсату при подальшій стерилізації), вмикають перемішуючий пристрій до повної гомогенізації суспензії і заварюють подачею пари в сорочку збірника до t = 90 °С протягом 30 хв. Після цього через дозатор (Д-24) в реактор-збірник об'ємом 10 м³ (Р-25) додають 215 кг глюкози, перемішують, самоплином передають до виробничого ферментера на 10 м³ (І-35) і стерилізують подачею пари в сорочку ферментера при t = 112 °С, P = 0,05 МПа (30 хв).

ДР 2.5.2 Приготування і стерилізація композиції Б

Через дозатор (Д-26) у реактор-збірник об'ємом 500 л (Р-27) завантажують 56,4 кг CaCO_3 додають 394 л води питної (враховуючи % конденсату при подальшій стерилізації), перемішують і стерилізують подачею гострої пари при $t = 131\text{ }^\circ\text{C}$, $P = 0,15\text{ МПа}$ (40 хв). Отриманий розчин самопливом передають у попередньо простерилізований виробничий ферментер на 10 м^3 (І-35).

ДР 2.6 Приготування і стерилізація 40%-го підживлювального розчину глюкози для інокуляторів та виробничого ферментера

Через дозатор (Д-8) в збірник об'ємом 15 л (Р-9) завантажують 4,8 кг глюкози, додають 12 л води, вмикають перемішуючий пристрій до повного розчинення глюкози і стерилізують подачею пари в сорочку при $t = 112\text{ }^\circ\text{C}$, $P = 0,05\text{ МПа}$ (30 хв). Після цього на 36 год культивування 10 мл розчину самопливом передають до інокулятора на 10 л (І-29), 100 мл – до інокулятора на 100 л (І-31), 1 л – до інокулятора на 1 м^3 (І-33), а 10 л – у виробничий ферментер на 10 м^3 (Фер-35) на 72-гу годину культивування.

ДР 2.7. Приготування і стерилізація запасного розчину KH_2PO_4 для інокуляторів та виробничого ферментера

На технічних терезах зважують 700 г KH_2PO_4 . Наважку транспортують у Через дозатор (Д-10) в збірник об'ємом 1 м^3 л (Р-11), додають 997,95 л води, вмикають перемішуючий пристрій до повного розчинення солі і стерилізують подачею гострої пари при $t = 131\text{ }^\circ\text{C}$, $P = 0,05\text{ МПа}$ (40 хв). Після цього 70 мл розчину самопливом передають до інокулятора на 10 л (І-39), 700 мл – до інокулятора на 100 л (І-41), 7 л – до інокулятора на 1 м^3 (І-43), 70 л – до виробничого ферментера на 10 м^3 (Фер-45).

ДР 2.8. Приготування і стерилізація запасного розчину стрептоміцину для інокуляторів та виробничого ферментера

На аналітичних вагах зважують 5 г стрептоміцину. Наважку через дозатор (Д-14) транспортують у реактор-змішувач об'ємом 250 л (Р-13), додають 144,5 л води, вмикають перемішуючий пристрій до повного розчинення антибіотику. Стерилізацію здійснюють безпосередньо перед подачею в поживне середовище за

допомогою мембранного фільтру з діаметром пор 0,22 мкм. 130 мл розчину самопливом передають до інокулятора на 10 л, 1300 мл – до інокулятора на 100 л, 13 л – до інокулятора на 1 м³, 130 л – до виробничого ферментера на 10 м³.

ТП 3. Підготовка посівного матеріалу

ТП 3.1. Підтримання колекційної культури

Одержану музейну культуру *Streptomyces nodosus D5-2M2A* зберігають на чашках Петрі з агаризованим середовищем (ДСА – дріжджово-солодовий агар) при температурі 4±2 °С. Пересіви на свіже поживне середовище здійснюють 1 раз на місяць. Всі роботи з колекційною культурою проводять в строго асептичних умовах.

ТП 3.2. Одержання робочої культури

Музейну культуру методом виснажувального штриха пересівають на чашку Петрі з ДСА для одержання ізольованих колоній. Культивують в термостаті при t = 25±1 °С (48 год).

ТП 3.3. Вирощування інокуляту на агаризованих поживних середовищах

Отримані ізольовані колонії з чашки Петрі (від ТП 3.2) пересівають петлею в пробірки зі скошеним ДСА (із однієї відокремленої колонії здійснюється для засів однієї пробірки). В пробірки пересівають відокремлені колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см. Культури вирощують в термостаті при t = 25±1 °С (48 год).

ТП 3.4. Вирощування інокуляту в колбах на качалках

У пробірку з робочою культурою *Streptomyces nodosus D5-2M2A* (від ТП 3.3) вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують міцелій (змивають культуру), піпеткою відбирають одержану міцеліальну суспензію і вносять у качалочні колби з поживним середовищем від ДР 2.1.6. Для інокуляції однієї колби використовують міцеліальну суспензію, добуту з однієї пробірки. Вирощують у колбах на качалці з частотою обертів 320 об/хв при t = 25±1 °С (72 год).

ТП 3.5 Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 10 л

У попередньо простерилізований інокулятор об'ємом 10 л (І-29) самоплином передають попередньо простерилізовані композиції А і Б (від ДР 2.2.1 – ДР 2.2.2, після чого вносять 70 мл попередньо простерилізованого запасного розчину КН₂Р₀4 від ДР 2.7 і 130 мл попередньо простерилізованого запасного розчину

стрептоміцину від ДР 2.8. Через засівний пристрій вносять 1 л посівного матеріалу від ТП 3.4. На 36-й годині культивування вносять 10 мл попередньо простерилізованого підживлювального розчину глюкози від ДР 2.6. Культивують до концентрації біомаси 25,6 г/л при $t = 25 \pm 1$ °С з частотою обертів перемішуючого пристрою 320 об/хв і рівнем аерації 10 л/хв впродовж 72 год.

ТП 3.6 Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 100 л

У попередньо простерилізований інокулятор об'ємом 100 л (І-31) самоплином передають попередньо простерилізовані композиції від ДР 2.3.1 – 2.3.2, після чого вносять 700 мл попередньо простерилізованого запасного розчину солі від ДР 3.7 і 1300 мл попередньо простерилізованого запасного розчину стрептоміцину від ДР 2.8. Через трубу перетискування з інокулятора на 10 л (І-29) перекачують 6 л посівного матеріалу від ТП 3.5. На 36-й годині культивування вносять 100 мл попередньо простерилізованого підживлювального розчину глюкози від ДР 2.6. Культивують до концентрації біомаси 25,6 г/л при $t = 25 \pm 1$ °С з частотою обертів перемішуючого пристрою 320 об/хв і рівнем аерації 100 л/хв впродовж 72 год.

ТП 3.7 Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 1 м³

У попередньо простерилізований інокулятор об'ємом 1 м³ (І-33) самоплином передають попередньо простерилізовані композиції від ДР 2.4.1 – 2.4.2, після чого вносять 7 л попередньо простерилізованого запасного розчину солі від ДР 2.7 і 13 л попередньо простерилізованого запасного розчину стрептоміцину від ДР 2.8. Через трубу перетискування з інокулятора на 100 л (І-31) перекачують 60 л посівного матеріалу від ТП 3.6. На 36-й годині культивування вносять 1 л підживлювального розчину глюкози від ДР 2.6. Культивують до концентрації біомаси 25,6 г/л при $t = 25 \pm 1$ °С з частотою обертів перемішуючого пристрою 320 об/хв і рівнем аерації 1000 л/хв впродовж 72 год.

ТП 4. Виробничий біосинтез

ТП 4.1 Виробниче культивування в ферментері об'ємом 10 м³

У попередньо простерилізований ферментер об'ємом 10 м³ (Фер-35) самоплином передають простерилізовані композиції від ДР 2.5.1 – 2.5.2, після чого вносять 70 л попередньо простерилізованого запасного розчину солі від ДР 2.7 і 130

л попередньо простерилізованого запасного розчину стрептоміцину від ДР 2.8. Через трубу перетискування перекачують з інокулятора на 1 м³ (І-35) 600 л посівного матеріалу від ТП 4.7. На 72-гу годину культивування вносять 10 л попередньо простерилізованого підживлювального розчину глюкози від ДР 3.6. Культивування здійснюють до концентрації біомаси в 25,6 г/л і концентрації амфотерицину в 15,6 г/л, при $t = 25 \pm 1$ °С з частотою обертів перемішуючого пристрою 320 об/хв і рівнем аерації 10000 л/хв впродовж 144 год. Після завершення культивування культуральну рідину на подальшу стадію виділення перекачують перистальтичним насосом (Н-36).

РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА АМФОТЕРИЦИНУ В

Таблиця 7.1

Карта контрольних точок виробництва амфотерицину В

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та відбору проб	Нормативні значення показника
1	2	3	4	5
ДР 1. Підготовка аераційного повітря				
Кт 1.2 Грубе очищення повітря	Повітря на виході з фільтра, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	E = 75%, тиск згідно паспорту
Кт 1.3 Компресування повітря	Стиснене повітря, температура, тиск	Манометр технічний	Після компресування повітря	P = 0,1 МПа
Кт 1.4 Охолодження повітря та видалення зайвої вологи	Охолоджене повітря, повітря після видалення зайвої вологи, температура	Термометр технічний, психрометричний метод	Після охолодження повітря та видалення зайвої вологи	t = 20-30 °C, W = 60%
Кт 1.5 Нагрівання повітря	Нагріте повітря, температура	Термометр технічний	Після нагрівання повітря	t = 25±1 °C
Кт 1.6 Очищення повітря в головному фільтрі	Очищення повітря ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі головного очищення	E = 95%
Кт 1.7 Очищення повітря в індивідуальному фільтрі	Очищення повітря, ступінь очищення	Перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря в індивідуальному фільтрі	E = 99,9999995%

НУХТ БТЕК 20.04.22 КР ПЗ				
Зм	Арк.	№	Підпис	Дата
Розробник	Середенко Е.І.			
Керівник	Воронцов О.О.			
Н. контр				
Консульт				
Зав. каф.	Стадніков В.П.			
РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва				
			Літера	Аркулш
				67
			Аркулшів	
			93 67	
Кафедра БТМ				

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та відбору проб	Нормативні значення показника
1	2	3	4	5
ДР 2.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту об'ємом 1 л в колбах на качалці				
Кт 2.1.1 Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалці Приготування і стерилізація композиції А	Композиція А Температура, тиск, час	Термометр, манометр, технічний годинник	Визначення температури і тиску відбувається безперервно впродовж стерилізації	t = 112 °С, P = 0,05МПа, τ = 30 хв
Кт 2.1.2 Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція Б Температура, тиск, час	Термометр, манометр, технічний годинник	Визначення температури і тиску відбувається безперервно впродовж стерилізації	t = 121 °С, P = 0,1 МПа, τ = 30 хв
Кт 2.1.3, 2.1.4 Приготування і стерилізація композицій В, Г	Композиція В, Г Температура, тиск, час	Термометр, манометр, технічний годинник	Визначення температури і тиску відбувається безперервно впродовж стерилізації	t = 131 °С, P = 0,15 МПа, τ = 40 хв
Кт 2.1.5 Приготування і стерилізація композиції Д	Композиція Д діаметр пор	Мікрометр	Визначення діаметру пор відбувається безпосередньо перед стерилізацією	Ø = 0,22 мкм

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та відбору проб	Нормативні значення показника
1	2	3	4	5
Км 2.1.6 Змішування композицій поживного середовища	Суміш композицій А, Б, В, Г, Д стерильність	Мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль після змішування	Відсутність мікробіоти
ДР 2.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту об'ємом 6 л в інокуляторі об'ємом 10 л				
Кт, Км 2.2.1 Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 10 л Приготування і стерилізація композиції А	Композиція А Температура, тиск, час, стерильність	Термометр, манометр, технічний годинник, мікробіологічний контроль	Визначення температури і тиску відбувається безперервно впродовж стерилізації; мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112 °С, P = 0,05 МПа, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 2.2.2 Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція Б Температура, тиск, час, стерильність	Термометр, манометр, технічний годинник, мікробіологічний контроль	Визначення температури і тиску відбувається безперервно впродовж стерилізації; мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °С, P = 0,15 МПа, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та відбору проб	Нормативні значення показника
1	2	3	4	5
ДР 2.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту об'ємом 60 л в інокуляторі об'ємом 100 л				
Кт, Км 2.3.1, Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 100 л Приготування і стерилізація композиції А	Композиція А Температура, тиск, час, стерильність	Термометр, манометр, технічний годинник, мікробіологічний контроль	Визначення температури і тиску відбувається безперервно впродовж стерилізації; мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112 °С, P = 0,05 МПа, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 2.3.2 Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція Б Температура, тиск, час, стерильність	Термометр, манометр, технічний годинник, мікробіологічний контроль	Визначення температури і тиску відбувається безперервно впродовж стерилізації; мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °С, P = 0,15 МПа, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
ДР 2.4. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту об'ємом 600 л в інокуляторі об'ємом 1 м³				
Кт, Км 2.4.1, Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 1000 л Приготування і стерилізація композиції А	Композиція А Температура, тиск, час, стерильність	Термометр, манометр, технічний годинник, мікробіологічний контроль	Визначення температури і тиску відбувається безперервно впродовж стерилізації; мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112 °С, P = 0,05 МПа, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та відбору проб	Нормативні значення показника
1	2	3	4	5
Кт, Км 2.4.2 Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція Б Температура, тиск, час, стерильність	Термометр, манометр, технічний годинник, мікробіологічний контроль	Визначення температури і тиску відбувається безперервно впродовж стерилізації; мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °С, P = 0,15 МПа, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
ДР 2.5. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту об'ємом 6000 л в інокуляторі об'ємом 10 м³				
Кт, Км 2.5.1, Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 100 л Приготування і стерилізація композиції А	Композиція А Температура, тиск, час, стерильність	Термометр, манометр, технічний годинник, мікробіологічний контроль	Визначення температури і тиску відбувається безперервно впродовж стерилізації; мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112 °С, P = 0,05 МПа, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 2.5.2 Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція Б Температура, тиск, час, стерильність	Термометр, манометр, технічний годинник, мікробіологічний контроль	Визначення температури і тиску відбувається безперервно впродовж стерилізації; мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °С, P = 0,15 МПа, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та відбору проб	Нормативні значення показника
1	2	3	4	5
ДР 2.6. Приготування і стерилізація 60%-го підживлювального розчину глюкози для інокуляторів та виробничого ферментера				
Кт, Км 2.6.1 Приготування і стерилізація підживлювального розчину глюкози для вирощування інокуляту і виробничого культивування	Температура, тиск, час, стерильність	Термометр, манометр, технічний годинник, мікробіологічний контроль	Визначення температури і тиску відбувається безперервно впродовж стерилізації; мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112 °С, P = 0,05 МПа, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
ДР 2.7. Приготування і стерилізація запасного 10%-го розчину солі для інокуляторів та виробничого ферментера				
Кт, Км 2.7.1 Приготування і стерилізація запасного розчину солі для інокуляторів та виробничого ферментера	Температура, тиск, час, стерильність	Термометр, манометр, технічний годинник, мікробіологічний контроль	Визначення температури і тиску відбувається безперервно впродовж стерилізації; мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °С, P = 0,15 МПа, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
ДР 2.8. Приготування і стерилізація запасного 0,1%-го розчину стрептоміцину для інокуляторів та виробничого ферментера				
Кт, Км 2.8.1 Приготування і стерилізація запасного розчину стрептоміцину для інокуляторів та виробничого ферментера	Діаметр пор, стерильність	Мікрометр, мікробіологічний контроль	Визначення діаметру пор відбувається безпосередньо перед стерилізацією, мікробіологічний контроль після стерилізації	Ø = 0,22 мкм, відсутність мікробіоти

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та відбору проб	Нормативні значення показника
1	2	3	4	5
ТП 3. Підготовка посівного матеріалу				
Кт, Км 3.1 Підтримка колекційної культури <i>Streptomyces nodosus D5-2M2A</i>	Колекційна культура <i>Streptomyces nodosus D5-2M2A</i> Тривалість зберігання культури, температура зберігання морфологічна однорідність, відсутність сторонньої мікробіоти	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається під час зберігання, мікробіологічний контроль в кінці терміну зберігання	$\tau = 1$ місяць, $t = 4 \pm 2$ °С, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 3.2 Вирощування культури на агаризованому середовищі	Робоча культура <i>Streptomyces nodosus D5-2M2A</i> Тривалість культивування, морфологічна однорідність, відсутність сторонньої мікробіоти	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається під час культивування, мікробіологічний контроль кожні 8 годин	$t = 25 \pm 1$ °С, $\tau = 48$ год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 3.3 Вирощування інокуляту на агаризованих поживних середовищах	Робоча культура <i>Streptomyces nodosus D5-2M2A</i> Тривалість культивування, морфологічна однорідність, відсутність сторонньої мікробіоти	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається під час культивування, мікробіологічний контроль кожні 8 годин	$t = 25 \pm 1$ °С, $\tau = 48$ год, відсутність сторонньої мікробіоти

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та відбору проб	Нормативні значення показника
1	2	3	4	5
Кт, Км 3.4 Вирощування культури в колбах на качалці	Посівний матеріал Температура, частота обертів качалки, тривалість культивування, відсутність сторонньої мікробіоти	Технічний термометр, технічний тахометр, годинник, мікробіологічний контроль	Контроль і підтримка температури і частоти обертання здійснюється автоматично впродовж всього часу культивування, мікроскопія – кожні 8 годин	$t = 25 \pm 1 \text{ } ^\circ\text{C}$, $\tau = 72 \text{ год}$, $\omega = 320 \text{ об/хв}$, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 3.5 Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 10 л	Інокулят Температура, частота обертів мішалки, тривалість культивування, відсутність сторонньої мікробіоти	Технічний термометр, технічний тахометр, годинник, мікроскоп	Контроль і підтримка температури і частоти обертання здійснюється автоматично впродовж всього часу культивування, мікроскопія – кожні 8 годин	$t = 25 \pm 1 \text{ } ^\circ\text{C}$, $\tau = 72 \text{ год}$, $\omega = 320 \text{ об/хв}$, $\text{pH} = 7.0$, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 3.6 Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 100 л	Інокулят Температура, частота обертів мішалки, тривалість культивування, відсутність сторонньої мікробіоти	Технічний термометр, технічний тахометр, годинник, мікроскоп	Контроль і підтримка температури і частоти обертання здійснюється автоматично впродовж всього часу культивування, мікроскопія – кожні 8 годин	$t = 25 \pm 1 \text{ } ^\circ\text{C}$, $\tau = 72 \text{ год}$, $\omega = 320 \text{ об/хв}$, $\text{pH} = 7.0$, відсутність сторонньої мікробіоти

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та відбору проб	Нормативні значення показника
1	2	3	4	5
Кт, Км 3.7 Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 1 м ³	Інокулят Температура, частота обертів мішалки, тривалість культивування, відсутність сторонньої мікробіоти	Технічний термометр, технічний тахометр, годинник, мікроскоп	Контроль і підтримка температури і частоти обертання здійснюється автоматично впродовж всього часу культивування, мікроскопія – кожні 8 годин	t = 25±1 °С, τ = 72 год, ω = 320 об/хв, рН = 7.0, відсутність сторонньої мікробіоти
ТП 4. Виробничий біосинтез				
Кт, Км 4.1 Виробниче культивування в ферментері об'ємом 10 м ³	Культуральна рідина Температура, частота обертів мішалки, рівень рН, тривалість культивування, відсутність сторонньої мікробіоти, концентрація амфотерицину В	Технічний термометр, технічний тахометр, годинник, датчик рН, мікроскоп	Контроль і підтримка температури і частоти обертання здійснюється автоматично впродовж всього часу культивування, мікроскопія – кожні 8 годин	t = 25±1 °С, τ = 144 год, ω = 320 об/хв, рН = 7.0, X = 15,6 г/л, відсутність сторонньої мікробіоти

7.1. Мікробіологічний контроль

7.1.1. Мікробіологічний контроль стерильності поживного середовища

Контроль стерильності поживного середовища здійснюють методом посіву на щільне поживне середовище.

Матеріали і обладнання: пробірка з простерилізованим поживним середовищем для культивування *Streptomyces nodosus*; пробірки з м'ясо-пептонним агаром (для виявлення бактерій) і сусло-агаром (для виявлення грибів та дріжджів); бактеріологічна петля; штативи для пробірок; термостат.

Метод дослідження: пробірка з попередньо простерилізованим поживним середовищем для культивування *Streptomyces nodosus* і стерильними живильним середовищем (МПА або СА) береться в ліву руку і утримується скошеною поверхнею середовища вгору. У відкриті в полум'ї пробірку з попередньо простерилізованим поживним середовищем вводиться прожарена та охолоджена бактеріологічна петля, нею торкаються до поверхні середовища, беруть матеріал і переносять у пробірку зі стерильним МПА. Петлю опускають до дна пробірки, занурюють в конденсаційну рідину і зигзагоподібним рухом проводять нею від низу до гори по поверхні середовища (посів «штрихом»). Аналогічно здійснюють посів у пробірку з сусло-агаром. Пробірки закривають пробками, ставлять в штатив, петлю профламбувають. Штатив з засіяним м'ясо-пептонним агаром поміщають в термостат з температурою 30 ± 1 °C на 12-24 години. Штатив з засіяним сусло-агаром поміщають в термостат з температурою 25 ± 1 °C на 72 години[31].

7.1.2. Мікробіологічний контроль посівного матеріалу

Мікробіологічний контроль посівного матеріалу проводять за допомогою світлової мікроскопії.

Матеріали і обладнання: пробірка з культуральною рідиною, одержану при вирощуванні *Streptomyces nodosus*; пробірки з м'ясо-пептонним агаром (для виявлення бактерій) і сусло-агаром (для виявлення грибів та дріжджів); бактеріальна петля; штатив для пробірок; термостат, світловий мікроскоп.

Експрес-метод: Світлове мікроскопіювання проводиться за наступною методикою. На предметне скло трубочкою або піпеткою наносять невелику краплю

води. Запалюють спиртівку, прожарюють препарувальну голку над полум'ям пальника і відбирають невелику кількість міцелію з пробірки або чашки Петрі, дотримуючись правил асептики. Міцелій акуратно поміщають в краплю, нанесену на предметне скло і за допомогою двох голок розправляють його в воді. Препарат накривають покривним склом і злегка притискають. Надлишки води видаляють за допомогою фільтрувального паперу. При нестачі рідини її додають, підпускаючи піпеткою під покривне скло. Проводять мікроскопіювання препарату зі збільшенням $\times 8$ [32]. Актиноміцет утворює характерні відкриті і закриті спіралі міцелію. За Грамом є грам-позитивним мікроорганізмом. В полі зору не повинна знаходитись стороння мікрофлора.

7.2. Показники росту і синтезу цільового продукту

7.2.1. Концентрація біомаси

Кожні 8 годин з колб на качалках, інокуляторів або ферментера відбираються зразки для аналізу біомаси клітин. 1 мл культуральної рідини в попередньо зважену 2 мл пробірку типу «Еппендорф» центрифугують при 6000 об/хв протягом 5 хвилин. Осад міцелію повторно суспендують і двічі промивають 1 мл ультрарозведеної води центрифугуванням при 6000 об/ів. Пробірку з промитим міцелієм сушать при 80 °С до постійної ваги для розрахунку маси клітин[11].

7.2.2. Визначення концентрації амфотерицину В методом ВЕРХ

Матеріали: культуральна рідина, одержана при культивуванні актиноміцета *Streptomyces nodosus*, стандартний препарат амфотерицину В, фіксональний ацетонітрил та метанол, оцтова кислота, гідроксид натрію, дистильована вода.

Прилади: модульний рідинний хроматограф, що оснащений насосом, автосемплером, що встановлений на 10 мкл петлю для відбору проб, УФ-видимий детектор, C_{18} реверсивно-фазна колонка 250*4,6 мм, наповнена октадецилсиланом із розмірами частинок 5 мкм, програмне забезпечення Borwin 1,5 для ПК.

Приготування стандартного розчину для побудови калібрувальної кривої: точну наважку 15 мг амфотерицину В у колбі об'ємом 100 мл розчинити і довести до мітки водним розчином гідроксиду натрію (рН = 11), отримуючи концентрацію 150 мкг/мл. Вихідний розчин додатково розбавити сумішшю метанолу і води у

співвідношенні 2:1. Одержують наступні еталони калібрування: 0,1, 0,3, 1, 3 та 10 мкг/мл. Всі еталони калібрування, отримані з вихідного розчину, аналізують трічі.

Пробопідготовка: проба готується змішуванням культуральної рідини та метанолу у співвідношенні 1:4. Даний зразок депротейнізується з 2 об'ємами метанолу. Для цього зразки перемішують протягом 1 хвилину та центрифугують при 4500 об/хв протягом 10 хвилин. Супернатант фільтрують через 0,45 мкм стерильний шприцевий міліпорівський фільтр та вприскують у хроматограф.

Хроматографія: вводити пробу через автосемплер при температурі 25°C[4] зі швидкістю 1 мл/хв із довжиною хвилі 406 нм. Відносний час утримання амфотерицину В становить 12 хв. Загальний час хроматографування – 15 хв.

Елюювання: Приготувати суміш рухомої фази із ацетонітрилу, оцтової кислоти і води у співвідношенні 52:4,3:43,7. Профільтрувати через 0,45 мкм фільтрувальну мембрану із гідрофільного поліпропілену та дегазувати. Вводити у хроматографічну колонку зі швидкістю 1 мл/хв із довжиною хвилі 406 нм[5].

Використовуючи дані, створюється калібрувальна крива для препарату.

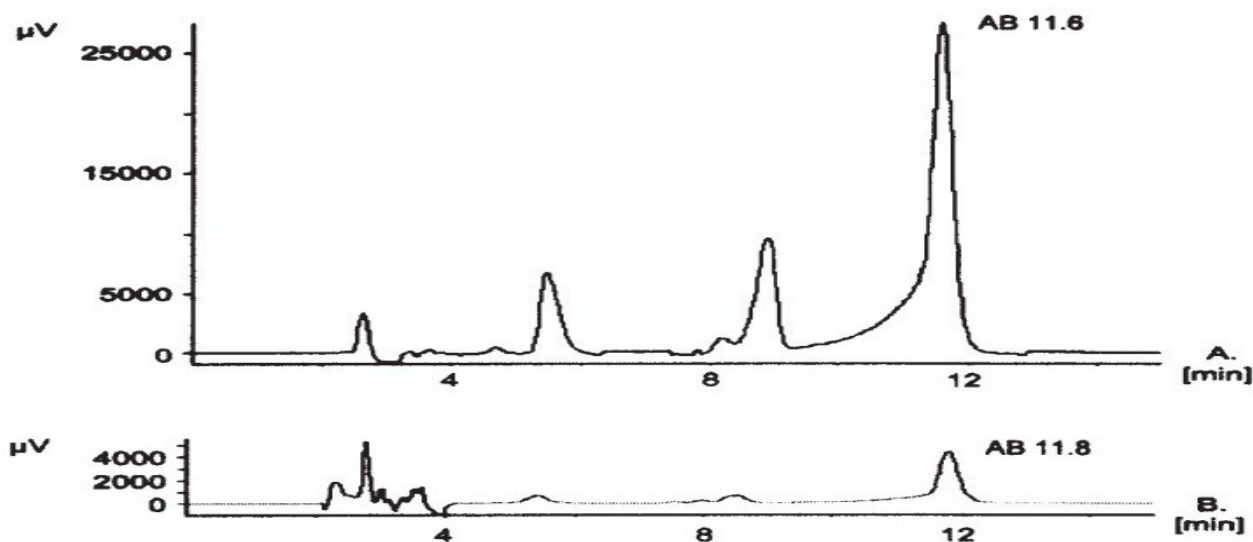


Рис. 7.1. Репрезентативна хроматограма стандартного препарату амфотерицину В в суміші метанолу і води (А) і амфотерицину В в культуральній рідині (В).

7.2.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту

7.2.3.1. Визначення концентрації глюкози в культуральній рідині методом капілярного електрофорезу

Принцип методу: Метод капілярного електрофорезу (КЕФ) заснований на поділі заряджених компонентів складної суміші в кварцовому капілярі під дією прикладеного електричного поля за рахунок подачі високої напруги до кінців капіляра[33].

Матеріали і обладнання: системи капілярного електрофорезу серії "Капель" ("Люмэкс", РФ) з наступними характеристиками: фотометричний детектор (254 нм), кварцевий капіляр з зовнішнім поліамідним покриттям (внутрішній діаметр 75×10^{-6} м, ефективна довжина – 0,5 м, водне термостатування), центрифуга "Minispin" ("Eppendorf", Німеччина), 13000 об/хв, машину для розтирання ("Bioreba", Швейцарія), рефрактометр ("Atago", Японія). Результати обробляють за допомогою програмного забезпечення "Мультихром для Windows, версія 1.5" (ООО "Амперсенд", Москва, РФ), водний ведучий електроліт, що містить 0,4% сорбату калію, 0,08% ЦТА-ОН (цетилтриметиламоній-основа), 3,2% гліцерину і 0,015% гідроксиду калію. Детектування при 254 нм.

Пробопідготовка: пробу культуральної рідини розбавляють в співвідношенні від 1:2 або 1:50 разів (залежить від того, який очікується вміст глюкози, який слід оцінити рефрактометром і розбавити до сумарної концентрації не більше 10 г/мл), центрифугують протягом 3-5 хв при 6000 об/хв. Однорідну культуральну рідину заливають дистильованою водою у співвідношенні 1:10, перемішують, настоюють протягом 1 год при кімнатній температурі, центрифугують, відфільтровують, розбавляють дистильованою водою й аналізують. Фрагменти міцелію подрібнюють на машині для розтирання або вручну, кількісно переносять в пробірки із полімерних матеріалів з кришками, що загвинчуються, додають дистильовану воду у пропорції 1:10, перемішують, настоюють протягом декількох годин при кімнатній температурі, потім декантують.

Метод вимірювання: Дозування проби здійснюють гідродинамічно (30 Мбар; 5 с). Рекомендована від'ємна напруга – 16 кВ, при цьому сила струму повинна скласти

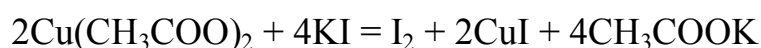
45±2 мкА, термостатування капіляра відбувається при +24 °С, час аналізу – 15 хв. Перед роботою кварцовий капіляр промивають 1 М соляною кислотою і дистильованою водою протягом 10 хв, кондиціонують спочатку 10 хв 1 М розчином гідроксиду калію, потім 10 хв дистильованою водою. Між аналізами капіляр промивають протягом 2 хв 1 М соляною кислотою, дистильованою водою, 1 М розчином гідроксиду калію[33].

7.2.3.2. Визначення вмісту джерела амінного азоту в культуральній рідині йодометричним методом по Попу і Стівенсу (мідним способом)

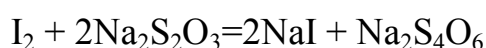
Джерелом азоту в поживному середовищі виступає бавовняне борошно. Цей компонент є багатим на білки і амінокислоти, які, власне, і використовуються мікроорганізмом для збільшення біомаси та синтезу амфотерицину В.

Принцип методу: полягає в здатності амінокислот утворювати розчинні з'єднання з міддю, число якої вираховують титруванням за участі йодвмісних речовин. Принцип дії даної методики полягає в тому, що розчин, в якому можуть міститися певні амінокислоти, за допомогою NaOH доводять до слабо лужного рН. Потім до цієї суміші речовин вносять у надмірній кількості суспензію мідного ортофосфату $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ у боратному буферному розчині. В результаті таких дій амінокислоти з культуральної рідини вступають в реакцію з міддю, утворюючи сполуки міді. Суміш піддають фільтруванню з метою відділення залишків нерозчинного ортофосфату міді. Після цього з метою відщеплення міді від комплексу з амінокислотами вносять розчин оцтової кислоти, який реагує з міддю, відщеплюючи її від амінокислот і утворюючи мідний ацетат.

Для того, аби дізнатися, яка кількість міді вступила в реакцію, до розчину ацетату міді вносять калій:



В наслідок реакції відбувається виділення йоду в тій кількості, яка еквівалентна кількості міді, а, відповідно, і азоту амінокислот, який піддають титруванню розчином тіосульфату натрію:



1 мл 0,01 н розчину тіосульфату натрію відповідає 0,28 мг амінного азоту, оскільки один атом міді реагує з двома молекулами амінокислот, утворюючи з'єднання типу $\text{Cu}(\text{RCHNH}_2\text{COO})_2$.

Реактиви і обладнання: мірні колби місткістю 50 і 100 мл, піпетки місткістю 5 і 10 мл, мірний циліндр місткістю 50 мл, конічна колба місткістю 100 мл, мікробюретка місткістю 2 мл, культуральна рідина, добута при вирощуванні *Streptomyces nodosus*, розчин хлориду міді (27,3 г солі розбавляють в 1 л води); розчин тринатрійфосфату (64,5 г динатрійфосфату NaHPO_4 розбавляють в 500 мл дегазованої дистильованої води, додають 7,2 г їдкового натру і після розбавлення доводять водою до мітки в 1 л); боратний буфер (57,21 г бури розбавляють в 1,5 л води, додають 100 мл розчину хлороводневої кислоти концентрацією 1 моль/л і доводять водою до мітки в 2 л); суспензія фосфату міді (один об'єм розчину хлориду міді змішують з двома об'ємами розчину фосфату натрію і додають два об'єми боратного буферу; суспензія зберігається не більше 3 днів); розчин тимолфталейну (0,25 г індикатору в 100 мл 50%-го спирту); розчин тіосульфату натрію концентрацією 0,01 моль/л; 1%-й розчин крохмалю; 80%-а або льодова оцтова кислота; розчин їдкового натру концентрацією 1 моль/л; 10%-й розчин йодиду калію.

Пробопідготовка: В мірну колбу місткістю 50 мл додають 5 мл культурального бульйону, вносять 3-4 краплини індикатору тимолфталейну і поступово розчин гідроксиду натрію концентрацією 0,1 моль/л до появи блідо-лазурного забарвлення. До слабо лужного розчину із циліндра при перемішуванні порціями обережно приливають 30 мл суспензії ортофосфату міді, вміст колби доводять дистильованою водою до мітки, перемішують і фільтрують через паперовий фільтр. Профільтрований розчин повинен бути чистим.

Метод дослідження: 10 мл чистого фільтрату піпеткою переносять в фарфорову чашку або конічну колбу, додають 0,5 мл 80%-ї льодової оцтової кислоти (для підкислення) і 10 мл розчину йодиду калію. Після змішування виділений йод титрують із мікробюретки розчином тіосульфату натрію концентрацією 0,01 моль/л. В кінці титрування до розчину додають 1-2 краплини розчину крохмалю. Кінець

титрування визначають по зникненню синього забарвлення від однієї краплі тіосульфату натрію.

За прийнятого розведення кількість амінного азоту в 10 мл фільтрату одержують множенням маси тіосульфату натрію, що пішла на титрування, на 0,28. Це відповідає з урахуванням розчинення 1 мл культуральної рідини. Вміст амінного азоту X розраховують за рівнянням:

$$X = \frac{a * 0,28 * b * 10 * 100}{50} \text{ мг в 100 мл культуральної рідини}$$

де a – розчину тіосульфату натрію концентрацією 0,01 моль/л, який пішов на титрування, мл; b – об'єм дослідної рідини, взятий на аналіз, мл[34].

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Krysan, D. J. (2017). The unmet clinical need of novel antifungal drugs. *Virulence*, 8(2), 135–137. doi:10.1080/21505594.2016.1276692 [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5354155/>
2. Roemer, T., & Krysan, D. J. (2014). Antifungal Drug Development: Challenges, Unmet Clinical Needs, and New Approaches. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 4(5), a019703–a019703. doi:10.1101/cshperspect.a019703 [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3996373/>
3. В.Г. Коляденко, В.В. Короленко, В.В. Бондур. Протигрибкові засоби: сучасне та майбутнє. Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, Київ. №3, вересень 2004. УДК 615.282.
4. Yi Zhang, Rosemary Loria and Yousong Ding. Applications of Natural Products from Soil Microbes – December 14, 2015
5. Amphotericin B - C₄₇H₇₃NO₁₇ - PubChem [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/14956>
6. Ablacet (Amphotericin B Lipid Complex Injection) U.S. Patent nos. 4,973,465 5,616,334 6,406,713 Manufactured by Exelead, Inc., Indianapolis, IN 46268 Distributed by Leadiant Biosciences, Inc., Gaithersburg, MD 20878, Revised 11/2018.
7. Гарна Н.В., Карпенко О.Є. Амфотерицин [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/2761/amfotericin>
8. Amphotericin B - DrugBankOnline [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00681>
9. Н.В. Дмитриева, И.Н. Петухова. Сравнительная эффективность и переносимость липидного комплекса амфотерицина В и липосомального амфотерицина В при лечении инвазивных грибковых инфекций у онкогематологических больных: обзор литературы / Лаборатория микробиологической диагностики и лечения инфекций в онкологии ФГБУ

- «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» РАМН, центр им. Н.Н. Блохина» РАМН, Москва
10. Asif Noor, Charles V. Preuss. Amphotericin B [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482327/>
 11. Bo Zhang, Hai-Dong Zhang, Yi-Teng Zhou, Kai Huang, Zhi-Qiang Liu, Yu-Guo Zheng. Improvement of amphotericin B production by a newly isolated *Streptomyces nodosus* mutant Key Laboratory of Bioorganic Synthesis of Zhejiang Provincedoi: 10.1002/bab.1579
 12. Kai Huang, Bo Zhang, Zhen-Yang Shen, Xue Cai, Zhi-Qiang Liu, Yu-Guo Zheng. Enhanced amphotericin B production by genetically engineered *Streptomyces nodosus* Microbiological Research (2020), doi: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126623>
 13. Bo Zhang, Yi-Teng Zhou, Sheng-Xian Jiang, Yu-Han Zhang, Kai Huang, Zhi-Qiang Liu and Yu-Guo Zheng. Amphotericin B biosynthesis in *Streptomyces nodosus*: quantitative analysis of metabolism via LC-MS/MS based metabolomics for rational design Zhang et al. MicrobCellFact (2020) 19:18 <https://doi.org/10.1186/s12934-020-1290-y>
 14. Dr. Joachim M. Wink Compendium of Actinobacteria. – University of Braunschweig.
 15. *Streptomyces nodosus* DSM 40109 is a mesophilic bacterium that was isolated from soil.[Электронный ресурс] Режим доступа: <https://bacdive.dsmz.de/strain/15428>
 16. AmBisome 287793-AMB-USA Marketed by: Astellas Pharma US, Inc. Northbrook, IL 60062 Manufactured by: Gilead Sciences, Inc. Foster City, CA 94404, Revised Month: 07/2020.
 17. Державна служба статистики. Населення України. [Электронный ресурс] Режим доступа: http://www.ukrstat.gov.ua/operativ/operativ2007/ds/nas_rik/nas_u/nas_rik_u.html
 18. Osmanov, A., & Denning, D. W. (2015). Burden of serious fungal infections in Ukraine. *Mycoses*, 58, 94–100. doi:10.1111/myc.12409

19. Nett, J. E., & Andes, D. R. (2016). Antifungal Agents. *Infectious Disease Clinics of North America*, 30(1), 51–83. doi:10.1016/j.idc.2015.10.012
20. Инструкция по медицинскому применению лекарственного препарата Амфотерицин В. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.binnopharmgroup.ru/upload/iblock/919/r66kpegq758j8ti66olycqyhntzuyb27/Amfoteritsin-V.pdf>
21. Bassichetto, K. C., Bergamaschi, D. P., Frainer, D. E. S., Garcia, V. R. S., & Trovões, E. A. T. (2013). Weight and height of people living with HIV/AIDS attended by the Brazilian National Health System. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 16(3), 622–632. doi:10.1590/s1415-790x2013000300007
22. А. Г. Моренко/ Біотехнології в галузі охорони здоров'я: Лабораторний практикум / Східноєвропейський національний університет імені Лесі Українки, 2020, 25 с
23. Пенчук Ю.М. Загальна біотехнологія [Електронний ресурс]: Конспект лекцій для здобув. освітнього рівня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-проф. прог. «Біотехнологія» ден. та заоч. форм навч. / Ю.М. Пенчук. – К.: НУХТ, 2019. – 80 с.
24. Сидоров Ю.І., Влязло Р.Й., Новіков В.П. Процеси і апарати мікробіологічної промисловості. Технологічні розрахунки. Приклади і задачі. Основи проектування виробництв: Навч. посібник. У 3 ч. – Ч. 1. Ферментація. – Львів: Видавництво Національного університету «Львівська політехніка», 2004. – 240 с.
25. Міністерство охорони здоров'я України наказ № 502 від 14.12.2001м. Київ Про затвердження методичних рекомендацій щодо виконання санітарно-гігієнічних вимог та проведення мікробіологічного контролю у виробництві нестерильних лікарських засобів. [Електронний ресурс] Режим доступа: https://zakononline.com.ua/documents/show/41907_487517
26. Інструкція щодо використання засобу дезінфікуючого «Бланідас Актив ензим». [Електронний ресурс] Режим доступа: https://lysoform.shop/wp-content/uploads/2020/08/instrukciya_blanidas_aktiv_enzym.pdf

27. Методичні вказівки щодо застосування засобу «Санітаб (Sanitab)» з метою дезінфекції об'єктів, до стерилізаційного очищення виробів медичного призначення. [Електронний ресурс] Режим доступу: https://clear.in.ua/dokumentu-dodatki/santab_mv_69906766.pdf
28. Інструкція щодо застосування засобу "Фамідез® Саноксіл 100" з метою дезінфекції. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://famidez.ua/doc/2020%20MI%20Famidez%20Sanoksil%20100.pdf>
29. Інструкція щодо застосування засобу "Фамідез Санокварт" з метою дезінфекції. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://famidez.ua/doc/2020%20MI%20Famidez%20Sanokvart.pdf>
30. Carl P. Schaffner, David J. Kientzler. Process for the production of amphotericin B inhibiting production of amphotericin A. United States Patent Number: 6,132,993. Date of Patent: Oct. 17, 2000
31. Білоконов І.І, Грінченко Д.М. Мікробіологія: методичні рекомендації для дистанційного та заочного навчання. – Харків: Харківська державна зооветеринарна академія, 2017 – 65 с. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://hdzva.edu.ua/microbiology/wp-content/uploads/sites/24/2018/06/lpz-tf.pdf>
32. Е.Ю. Тюменцева Основы микробиологии: учебное пособие Омск: Омский государственный институт сервиса, 2015. – 123 с.
33. Ю. Ф. Якуба, М. Г. Марковский/ Определение глюкозы, сахарозы и фруктозы методом капиллярного электрофореза. – Вопр. питания. - 2015. - № 1. - С. 89-94. [Електронний ресурс] Режим доступу: https://www.voprosy-pitaniya.ru/ru/jarticles_diet/337.html?SSr=05013461c721ffffff27c_07e50113150508-f9a
34. Загальні технології харчової промисловості: Метод. вказівки до вик. лаб. практикуму студ. заоч. форми навчання напряму підготовки 6.051701 “Харчові технології та інженерія“ спец. “Технологія продуктів бродіння і виноробства” / Укл.: А.М. Куц, М.В. Бондар, Ю.В. Булій. – К: НУХТ, 2011. – 53 с.

Highlights

- PKS5 was successfully identified as one of the main precursor competing branches in *Streptomyces nodosus*.
- The synthesis of amphotericin B was successfully increased by 40% through the knockout of competing branches and increasing the supply of precursors.
- The intracellular reduction force (NADPH/NADP) was compared with the ratio of AmB/AmA. The ratio of AmB/AmA was higher when the intracellular reduction force (NADPH/NADP) was insufficient.
- The yield of AmB from strain D5-2M2A reached 15.6 g/L on the 7th day with fed-batch fermentation in the 5 L bioreactor, which is the highest yield ever reported.

ОСНОВНІ МОМЕНТИ ГОЛОВНОЇ СТАТТІ

2.1 Bacterial strains, media, and growth conditions.

Bacterial strains and recombinant plasmids used in this study were listed in Table 1. *E. coli* DH5 α and *E. coli* ET12567 were cultivated on LB (Luria-Bertani) medium for plasmid construction and conjugation, respectively. *S. nodosus* was cultivated on GYM (glucose 4 g/L, yeast extract 4 g/L, malt extract 10 g/L, CaCO₃ 2 g/L and agar 18 g/L) agar slants medium and MS (mannitol 20 g/L, soy flour g/L and agar 18 g/L) agar slants medium for sporulation and conjugation, respectively. Isolation and purification of the conjugon was accomplished on GYM

5

Journal Pre-proof

agar slants medium with corresponding resistance. Agar slants medium was incubated at 28 °C for 4-10 days (Kieser et al. 2000).

Склад поживного середовища, на якому здійснюється вирощування біологічного агента в лабораторії

2.2 Fermentation and quantification of amphotericin A and B.

S1 medium was used for seed culture: 15 g/L peptone, 10 g/L glucose, 10 g/L yeast extract, 5 g/L NaCl and 1 g/L CaCO₃. F1 medium was used for fermentation: 25 g/L cotton-seed meal, 69 g/L glucose, 9 g/L CaCO₃ and 0.1 g/L KH₂PO₄. The seed culture was cultivated in 250 mL shake flasks containing 50 mL of liquid medium and incubated at 25 °C under orbital shaking at 200 rpm for 2 days. The shake-flask fermentation was cultured in 500 mL shake flasks containing 50 mL of liquid fermentation medium and incubated at 25 °C under orbital shaking at 200 rpm for 4-7 days (Zhang et al. 2018). The tank fermentation was cultured in a 5 L tank (Shanghai Baoxing Biological Equipment Engineering Co. Ltd, Shanghai, China) containing 3 L of liquid fermentation medium and incubated at 25 °C with a stirring speed at 500 rpm and an aeration rate of 5 L/min. After 72 h fermentation, 200 mL of feed solution (350 g/L glucose) was injected into the medium to raise the residual glucose concentration.

To measure the production of amphotericin, 1.5 mL of fermentation liquor was collected in a 50 mL centrifuge tube. Amphotericin was extracted by adding 13.5 mL DMSO (dimethylsulfoxide) and shaking at 25 °C for 20 minutes. The mixture was centrifuged at 10,000×rpm for 10 min and 1 mL of supernatant was used for analysis. Amphotericin was detected by high-performance liquid

Склад поживного середовища та умови культивування в колбах на качалці, ферментері, згадка про підживлення. Методика пробопідготовки визначення концентрації цільового продукту.

50 mL centrifuge tube. Amphotericin was extracted by adding 13.5 mL DMSO (dimethylsulfoxide) and shaking at 25 °C for 20 minutes. The mixture was centrifuged at 10,000×rpm for 10 min and 1 mL of supernatant was used for analysis. Amphotericin was detected by high-performance liquid chromatography (HPLC) with LDC 3200 analytical system (LDC ANALYTICAL INC., New York, USA) and UV-vis detector (YILITE ANALYTICAL INC., Dalian, China). The column was Agilent C18 reversed-phase column (5 μm, 4.6 × 150 mm, Agilent Technologies Inc., Santa Clara,

6

Journal Pre-proof

CA, USA) and the mobile phase was methanol: acetonitrile: water (4:7:9,v:v:v) at a flow rate of 1 ml/min. The HPLC column was operated at 25 °C. AmA was detected at 304 nm and the peak time was 10min. AmB was detected at 405 nm and the peak time was 21min (Supplementary Fig. S5). Pure samples of AmB and AmA were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

After the fermentation, the wet mycelium of *S. nodosus* was collected after centrifugation and dried to obtain the dry mycelium. The dried mycelium were transferred into the extraction tank, added methanol, adjusted the pH to 3.0 with hydrochloric acid and stirred for two hours at 4°C. The AmB extract was obtained by centrifugation. The AmB extract was passed through a

Методика визначення концентрації цільового продукту.

3.2 Overexpression of single functional genes in *S. nodosus* ZJB2016050.

Malonyl-CoA and methylmalonyl-CoA are considered as the basic substance to synthesize

11

Journal Pre-proof

polyketide macrolactone rings of AmB. The *amphA* module is the starting module of amphotericin synthesis and the first unit is acetyl-CoA. In view of the versatility and multi-pathway of acetyl-CoA metabolism in the organism, it is a better way to improve the utilization of acetyl-CoA by increasing the starting module (Krivoruchko et al. 2015). The *mcm* gene and *mme* gene were used to increase methylmalonyl-CoA.

Роль малоніл-КоА та метилмалоніл КоА в синтезі амфотерицину В.

3.6 The amphotericin B fermentation process in flask and 5L bioreactor.

The performance of *S. nodosus* D5-2M2A was investigated in flasks in comparison with *S. nodosus* ZJB2016050. The result showed the mutant *S. nodosus* D5-2M2A consumed glucose at a faster rate after 20 hours, and the strain grew faster than strain ZJB2016050. As shown in Fig. 8A, the speed of glucose consumption at 72 h reached the maximum and the rate of AmB accumulation became fastest. Meanwhile, it is revealed that accumulation of amphotericin is accompanied with mycelia growth. The maximum AmB yield of mutant strain *S. nodosus* D5-2M2A was achieved at 96 h, while the highest yield of *S. nodosus* ZJB2016050 appeared at 144 h. After 96 h, the AmB yield of *S. nodosus* ZJB2016050 was increased slowly as pH started to be less than 6.8. It is revealed that the optimum pH for amphotericin fermentation was above 6.8. Compared with the *S. nodosus* ZJB2016050, the fermentation cycle of *S. nodosus* D5-2M2A was shorter and the utilization of glucose was greatly improved.

The fed-batch process in a 5L bioreactor was investigated and the result was shown in Fig. 8B. The accumulation of AmB was significantly increased to 15.6 g/L with a feeding phase which was two fold higher than that in flask fermentation. The dry cell weight was 25.6 g/L at 144h which was twice fold higher than that in flask fermentation. For the strain growth and

Порівняння дикого штаму *Streptomyces nodosus* та генно-модифікованого D5-2M2A.

8B. The accumulation of AmB was significantly increased to 15.6 g/L with a feeding phase which was two fold higher than that in flask fermentation. The dry cell weight was 25.6 g/L at 144h which was twice fold higher than that in flask fermentation. For the strain growth and

15

Journal Pre-proof

amphotericin fermentation process is a process that consumed oxygen. After 144 h, due to the large amount of bacteria, there was insufficient dissolved oxygen. The yield of by-product AmA was 0.36 g/L at 144 h.

Концентрація біомаси на 144 годину культивування (кінець ферментації) та концентрація амфотерицину А в ньому.

The genetically engineered *S. nodosus* D5-2M2A was fermented in a 5-L bioreactor. The glucose consumption was the fastest at 72 h and the growth of mycelium and the accumulation of AmB was the fastest. The fermentation supplement was carried out at 72 h, the final yield of AmB and AmA was 15.6 g/L and 0.36 g/L, respectively. In the process of producing amphotericin by fermentation of *S. nodosus*, the fermentation liquid became thick with the growth of the strain, and the oxygen dissolved in the fermentation liquid decreased rapidly at 144 h. Amphotericin accumulation is an aerobic process, and after 144 h, amphotericin production was significantly reduced. Therefore, some measures such as the expression of the *vhb* gene to improve oxygen utilization will have a positive effect on fermentation (Brunker et al. 1998).

Накопичення амфотерицину В після 72 годин культивування, його концентрація в біомасі, а також концентрація амфотерицину А.