

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології та мікробіології

«До захисту в ЕК»

Директор інституту (декан факультету)

Наталія ГРЕГІРЧАК
(підпис) (ім'я та прізвище)

« 06 » червня 2025 р.

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

Віктор СТАБІКОВ
(підпис) (ім'я та прізвище)

« 06 » червня 2025 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітньо-професійної програми «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна»

на тему: «Біосинтез тетрацикліну *Streptomyces aureofaciens*»

Виконала: здобувачка 4 курсу, групи 2

КОВІНЧЕНКО Анастасія Юріївна
(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

Керівник СТАБІКОВ Віктор Петрович
(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

Консультанти _____
(ім'я та прізвище)

(ім'я та прізвище)

(ім'я та прізвище)

Рецензент Ярослав СМІТЮХ
(ім'я та прізвище)

(підпис)

(підпис)

(підпис)

(підпис)

(підпис)

(підпис)

Я як здобувачка Національного університету харчових технологій розумію і підтримую політику університету з академічної доброчесності. Я не надавала і не одержувала недозволеної допомоги під час підготовки цієї роботи. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Здобувач _____
(підпис)

Київ – 2025 р.

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

« 1 » березня 2025 року

З А В Д А Н Н Я НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

КОВІНЧЕНКО Анастасії Юріївні

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема проекту (роботи): «Біосинтез тетрацикліну *Streptomyces aureofaciens*»
керівник роботи СТАБНИКОВ Віктор Петрович, зав. кафедри біотехнології і мікробіології, д. т. н., професор
затверджені наказом закладу вищої освіти від « 27 » 03 2025 року № 188-к
2. Строк подання здобувачем роботи: 27.05.2025
3. Вихідні дані до проекту (роботи): Об'єм ферментеру – 10 м³, коефіцієнт заповнення – 0,6; цільовий продукт – антибіотик тетрациклін; продуцент: *Streptomyces aureofaciens*.
4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань що їх належить розробити): Характеристика цільового продукту; обґрунтування вибору та характеристика біологічного агенту; техніко-економічне обґрунтування; біосинтез цільового продукту; обґрунтування вибору технологічної схеми; специфікація обладнання; опис технологічної схеми; основні етапи виділення та очищення цільового продукту; контроль виробництва
5. Перелік графічного матеріалу (з точним зазначенням обов'язкових креслень):
Технологічна схема біосинтезу тетрацикліну – 2 аркуші формату А1, апаратурна схема біосинтезу тетрацикліну – 3 аркуші формату А1

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01.03.2025 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика цільового продукту	01.03.2025 – 05.03.2025	
2	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агенту	06.03.2025 – 10.03.2025	
3	Техніко-економічне обґрунтування	11.03.2025 – 17.03.2025	
4	Біосинтез цільового продукту	18.03.2025 – 27.03.2025	
5	Обґрунтування вибору технологічної схеми	28.03.2025 – 03.04.2025	
6	Специфікація обладнання	04.04.2025 – 08.04.2025	
7	Опис технологічної схеми	09.04.2025 – 15.04.2025	
8	Основні етапи виділення та очищення цільового продукту	16.04.2025 – 22.04.2025	
9	Контроль виробництва	23.04.2025 – 30.00.2025	
10	Оформлення кваліфікаційної роботи	01.05.2025 – 20.05.2025	
11	Оформлення графічної частини	21.05.2025 – 28.05.2025	

Здобувач _____
(підпис)

Анастасія КОВІНЧЕНКО _____
(ім'я та прізвище)

Керівник роботи _____
(підпис)

Віктор СТАБНІКОВ _____
(ім'я та прізвище)

Abstract

This work is dedicated to the development of a production site for the antibiotic tetracycline using the *Streptomyces aureofaciens* ZT04 strain. This strain is highly productive, and by the end of a 96-hour fermentation, the antibiotic concentration in the culture broth reaches 18.9 g/L with a minimal amount of tetracycline analog impurities.

Tetracycline is a broad-spectrum antibiotic developed in 1953, which remains relevant due to its ability to act against a wide range of susceptible microorganisms. Its versatility is based on a specific mechanism of action: binding to the small S30 ribosomal subunit, which blocks protein synthesis in the cell, leads to its gradual death and prevents reproduction.

The qualification thesis consists of nine chapters, an abstract, an introduction, a list of references, and appendices. The total volume of the work is 96 pages, including 16 tables and 10 figures, based on data from 50 sources. Within the project, the following engineering drawings were developed: a process flow scheme (A1 format, 3 sheets) and a technological scheme (A1 format, 2 sheets), which includes auxiliary operations such as aeration air preparation and nutrient media sterilization.

Keywords: *Streptomyces aureofaciens*, tetracycline, antibiotic synthesis, submerged cultivation, actinobacterium, airlift fermenter.

РЕФЕРАТ

Дана робота присвячена розробці ділянки виробництва антибіотику тетрацикліну за допомогою штаму *Streptomyces aureofaciens* ZT04. Цей штам є високопродуктивним, і наприкінці 96-годинної ферментації концентрація антибіотику у культуральній рідині досягає 18,9 г/л з мінімальною кількістю домішок аналогів тетрацикліну.

Тетрациклін — це антибіотик широкого спектра дії, розроблений у 1953 році, який залишається актуальним завдяки здатності впливати на широкий спектр чутливих мікроорганізмів. Його універсальність ґрунтується на специфічному механізмі дії: зв'язування з малою субодиницею S30 рибосоми, що блокує синтез білка у клітині, призводить до її поступової загибелі та унеможливорює розмноження.

Кваліфікаційна робота складається з дев'яти розділів, реферату, вступу, списку використаних джерел, додатків. Загальний обсяг роботи: 96 сторінок, кількість таблиць — 16, рисунків — 10, використані дані з 50 джерел. У рамках проекту розроблено схеми: апаратурна схема (формат А1, 3 аркуші) та технологічна схема (формат А1, 2 аркуші), яка включає допоміжні операції, такі як підготовка аераційного повітря, а також стерилізація поживних середовищ.

Ключові слова: *Streptomyces aureofaciens*, тетрациклін, синтез антибіотику, глибинне культивування, актинобактерія, ерліфтний ферментер.

					НУХТ БТЕК 04.02.02 КР ПЗ							
Змн.	Арк	№ докум.	Підпис	Дата								
Розроб.		Ю.			РЕФЕРАТ				Літ.	Арк..	Аркушів	
Перевір.		В.П.Стабніков									5	96
Реценз.									Кафедра БТМ			
Н. Контр.												
Затверд.		ПСтабніков В. П										

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	5
ЗМІСТ	6
ВСТУП	8

ЗАГАЛЬНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту	10
РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агенту	13
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агенту та поживного середовища для його культивування	13
2.2. Розрахунок складу поживного середовища	18
2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агенту...	22
2.4. Таксономічний статус біологічного агенту	24
РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування.....	25
3.1. Потреба у цільовому продукті	25
3.2. Розрахунок потужності виробництва	29
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів	29
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу	30
РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту	34
4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агенту	34
4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт.....	37
РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми	40
5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера	40
5.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря	41
5.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів.....	43
5.3.1. Обґрунтування вибору мийних та дезінфікуючих засобів	43
5.3.2. Розрахунок витрат мийних та дезінфікуючих засобів	47
5.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища.....	56
РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання.....	64
РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми	71
РОЗДІЛ 8. Основні етапи виділення та очищення цільового продукту	81

РОЗДІЛ 9. Контроль виробництва тетрацикліну.....	85
9.1. Мікробіологічний контроль.....	85
9.2. Показники росту і синтезу цільового продукту	86
9.2.1. Концентрація біомаси	86
9.2.2. Концентрація цільового продукту.....	87
9.2.3. Концентрація джерел вуглецю і азоту.....	87
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	91
ДОДАТКИ.....	97

ВСТУП

Від початку повномасштабного вторгнення РФ у 2022 році епідеміологічна ситуація в Україні значно ускладнилася, що негативно вплинуло на загальний стан здоров'я населення. Особливо критичним є становище населення на окупованих територіях, де мирні жителі стикаються з гострою нестачею ліків і відсутністю доступу до якісної медичної допомоги. [1]

До загального погіршення ситуації додаються наслідки численних катастроф, спричинених війною. Одним із найбільш показових прикладів є епідеміологічна криза на Херсонщині, де після знищення Каховської ГЕС улітку 2023 року спалахнули кишкові інфекції через відсутність доступу чистої води. Водночас тривала відсутність опалення, спричинена як збоєм у роботі ЖКГ, так і масовими відключеннями електроенергії, сприяє поширенню інфекцій. У таких умовах особливу небезпеку становить бактеріальна пневмонія, яку складно лікувати без доступу до антибіотиків. У Маріуполі, наприклад, у листопаді 2022 року тепло мали лише 20% мешканців, через що працюючі лікарні були швидко перевантажені пацієнтами. [2,3]

За таких обставин критично важливим стає забезпечення доступу до простих, недорогих, безпечних і надійних антибіотиків широкого спектру дії. У "польових" умовах, коли немає часу на тривалу діагностику, потрібні засоби, здатні швидко зупинити розвиток інфекції. З огляду на це варто згадати тетрациклін — антибіотик, відкритий ще 1953 року, який має усі вищезазвані якості.

Актуальність:

Тетрациклін є антибіотиком широкого спектру дії. Він недорогий, але з часом був витіснений сучаснішими аналогами через певні обмеження: короткий період напіврозпаду (8–10 годин), тератогенну дію, що обмежує використання у вагітних і дітей, а також розвиток часткової резистентності у деяких мікроорганізмів. [4,5,6]

					НУХТ БТЕК 04.02.02 КР ПЗ			
Змн.	Арк	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Ковінченко А.			ВСТУП		Літ.	Арк..
Перевір.		Стабніков В.П.						8
Реценз.								96
Н. Контр.							Кафедра БТМ	
Затверд.		Стабніков В. П						

Однак нині, коли основною цільовою групою є доросле населення, ці недоліки втрачають критичність. До того ж, після тривалого періоду обмеженого застосування, ефективність тетрацикліну знову зростає, оскільки патогенні мікроорганізми поступово втрачають набуту резистентність. Доступність антибіотику тетрацикліну, його здатність боротися з великою кількістю збудників і низька токсичність роблять тетрациклін актуальним варіантом у сучасних умовах.

Новизна:

Ця робота присвячена виробництву тетрацикліну для потреб українського ринку в умовах війни. Його мета — переосмислити можливості застосування перевірених антибіотиків у нових реаліях, спростити виробничий процес, знизити собівартість і підвищити ефективність, зробивши цей препарат дієвим інструментом для боротьби з інфекційними захворюваннями.

Особливістю розробки є використання сучасного рекомбінантного штаму *Streptomyces aureofaciens* ZT04 *ctcP*, отриманого шляхом кон'югації дикого штаму *S. aureofaciens* ZT04 з *E. coli*, що містить відповідну плазмиду надсинтезу. Штам зберігає свої початкові переваги, набуваючи здатність до надсинтезу чистого тетрацикліну — 18,9 г/л. Штам не потребує складних умов культивування, і у результаті після 96 годин отримують 18,9 г/л тетрацикліну — вражаючий показник, який дозволяє оптимізувати виробництво. [7]

Новий підхід не лише зберігає відомі переваги тетрацикліну, як-от широкий спектр дії та менша токсичність у порівнянні з хлортетрацикліном, а й робить його конкурентоспроможним на ринку України. Проект має перспективу зайняти нішу доступного антибіотика, здатного ефективно відповідати на виклики, породжені війною.

РОЗДІЛ 1

ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Вторинним метаболітом актинобактерій *Streptomyces aureofaciens* є типовий представник групи тетрациклінових антибіотиків – тетрациклін. Це антибіотик бактеріостатичної дії широкого спектра. Основними мішенями для цієї групи антибіотиків є транспортний комплекс між РНК та рибосомою, що порушує синтез білку. За органолептичними показниками, чистий тетрациклін це гіркий на смак жовтий кристалічний порошок без запаху. [8,9]

Хімічні властивості.

Тетрациклін (молекулярна формула – $C_{22}H_{24}N_2O_8$, назва за IUPAC – (4S,4aS,5aS,6S,12aR)-4-(диметиламін)-1, 6, 10, 11, 12а-пентагідрокси-6-метил-3, 12-діокси-4, 4а, 5, 5а-тетрагідротетрацен-2-карбоксамід; молярна маса становить 444.4 г/моль) – це полікетидний антибіотик широкого спектру дії, в основі хімічної структури лежить ядро октагідронафтацену. Це третинний α -гідроксикетон у сполученні з кислотою (1-) або цвіттер-іоном тетрацикліну [8,10]:

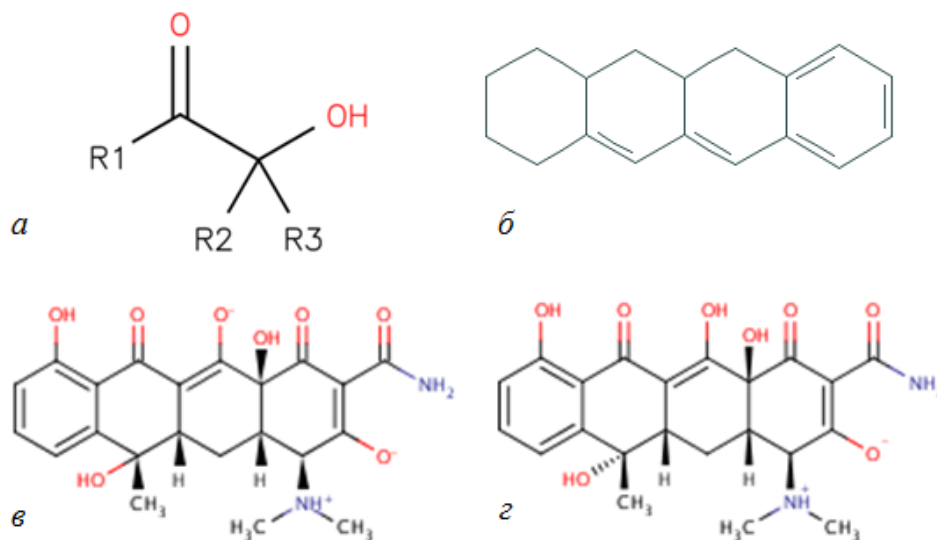


Рис. 1.1. а – α -гідроксикетон; б – октагідронафтацен; в – кислота тетрацикліну (1-); г – цвіттер-іон тетрацикліну [11];

					НУХТ БТЕК 04.02.02 КР ПЗ		
Змн.	Арк	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту Кафедра БТМ		
Розроб.	Ковінченко А.						
Перевір.	Стабніков В.П.						
Реценз.							
Н. Контр.							
Затверд.	Стабніков В. П				Літ. Арк.. Аркушів		
						10	96

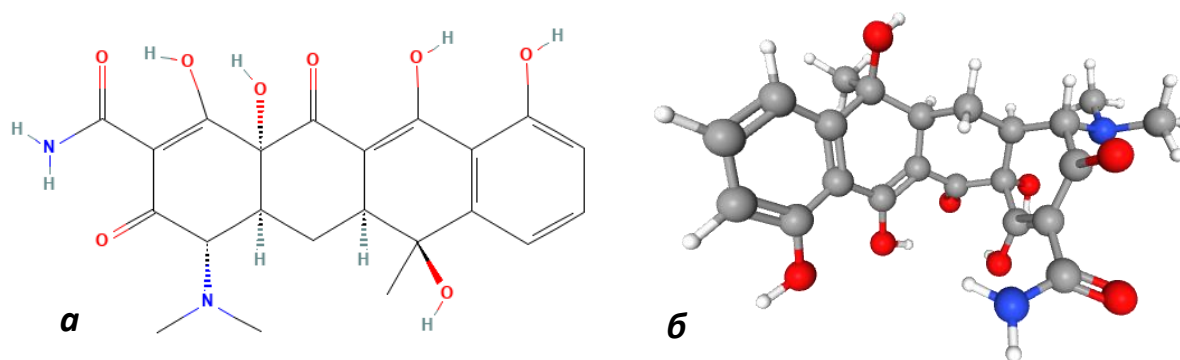


Рис. 1.2. Структурна (а) та просторова (б) формули тетрацикліну [9]

Гарно розчиняється у розбавлених розчинах лугів та кислот, а також у карбонатах лужних металів за рахунок амфотерних властивостей. У водних розчинах існує у вигляді цвіттер-іону [9,10].

Точка плавлення тетрацикліну становить 172,5 °С. Кристали зневоднюються при вакуумній сушці при 60°С протягом 8 годин. [9]

Продукція тетрацикліну.

Тетрациклін це антибіотик мікробного походження, основним продуцентом якого є різні штами актинобактерій *Streptomyces aureofaciens*. Вперше був отриманий у 1953 р каталітичним деградуванням хлортетрацикліну, але біосинтетичний шлях, тобто, культивуванням мутатних штамів *Streptomyces aureofaciens* або *Streptomyces viridifaciens*, є більш економічно доцільним. [12, 13]

Механізм біологічної дії

Механізмом дії антибіотиків групи тетрациклінів є вплив на синтез білку на рибосомах, тобто, перешкоджає включенню амінокислот до пептидних ланцюгів. Тетрациклін реверсивно зв'язується з субодиницею 30S рибосоми блокуючи зв'язування вихідної аміноацильної тРНК з акцепторним сайтом рибосоми. Також він частково зв'язується з рибосомальною субодиницею 50S, і, порушуючи синтез білків, що є компонентами цитоплазматичної мембрани, змінює її властивості і викликає відтік внутрішньоклітинних компонентів із бактеріальної клітини. Крім того, тетрациклін може утворювати стійкі комплексні сполуки (хелати) з 2- та тривалентними катіонами металів, усуваючи метали-кофактори зі складу ферментів. [9,10,12].

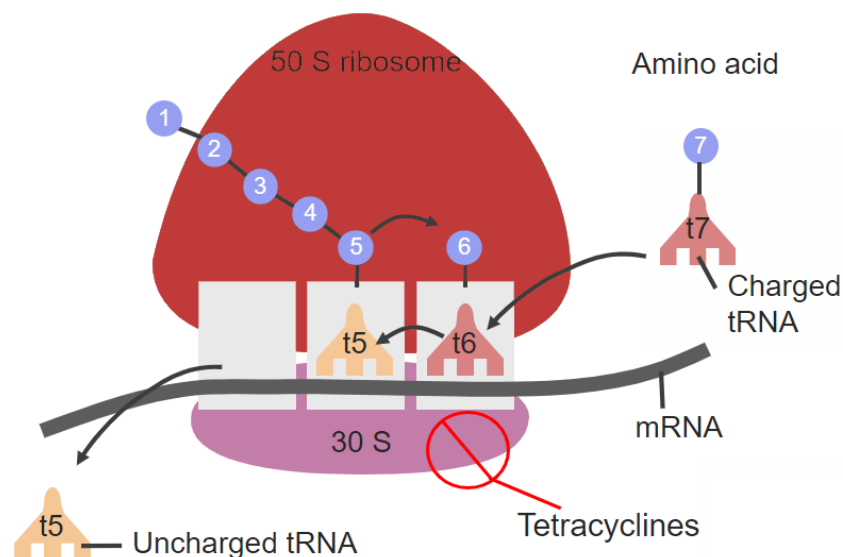


Рис.1.3. Механізм дії тетрацикліну

Тетрациклін здатен впливати як на прокаріотичні, так і на еукаріотичні рибосоми, але клітини бактерій більш чутливі до антибіотику, адже прокаріоти, що не є резистентними, легко засвоюють антибіотик. Еукаріотичні клітини мають вбудовані механізми виводу токсичного тетрацикліну з клітини, як і модифіковані плазмідами прокаріоти.

На здатності тетрацикліну до утворення халатів ґрунтується механізм резистентності бактерій до цього антибіотику. Клітина, що має специфічну плазмиду, продукує білки, у складі яких є Магній. Тетрациклін зв'язується з вільно дрейфуючими по цитоплазмі Mg^{2+} сполуками, а після, комплекс антибіотику та білку виводиться з клітини за допомогою протонного антипорту. [11]

Сфери застосування.

Тетрациклін у складі препаратів застосовують у медицині: при інфекціях дихальних шляхів, сифілісі, хламідіозі, лептоспірозі, сибірській виразці, кишкових інфекціях викликаних чутливою до тетрацикліну мікрофлорою, гонореї та антропозоозах (бруцельоз, туляремія, чума). Також при фурункульозі, інфікованих екземах, вугровому висипі, фолікуліті. [10,14]

Препарати тетрацикліну випускають у формі капсул (з порошком), таблеток в оболонці та очних мазей. Найбільш розповсюдженими є таблетовані та капсульовані препарати. [15]

ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТУ

Одним із найперших продуцентів тетрацикліну є грам-позитивні актинобактерії *Streptomyces aureofaciens*, мутантні штами яких використовуються для синтезу антибіотиків.

Штам *Streptomyces aureofaciens* ТА3 культивується на напівсинтетичному поживному середовищі, і можуть використовувати як джерело вуглецю не тільки чисті вуглеводи (наприклад сахарозу) але й органічні субстрати та відходи виробництва, такі як меляса та різні види борошна. Це дозволяє більш продуктивно використовувати штам *S. aureofaciens* ТА3 при реальному виробництві. Умови культивування *S. aureofaciens* ТА3 також є досить простими: рН 5,8; температура 27 °С та умови аерації, притаманні актиноміцетам. Єдине, що недоліком штаму можна вважати довге культивування – 120 годин. [16]

Попри стабільність і передбачуваність *S. aureofaciens* ТА3 як продуцента, його основним недоліком є обмежена продуктивність: максимальний вихід тетрацикліну у ферментері становить лише 2 г/л, що є типовим, але не високим показником для промислового виробництва антибіотиків. Через це економічна ефективність використання даного штаму викликає сумніви: співвідношення між витратами на культивування та прибутком від реалізації таблетованого препарату антибіотику не дозволяє суттєво знизити собівартість продукції та підвищити її конкурентоспроможність на сучасному фармацевтичному ринку України. Отже, *S. aureofaciens* ТА3 не можна вважати оптимальним продуцентом для масштабного виробництва тетрацикліну, орієнтованого на зниження цін та розширення ринку збуту. [16]

					НУХТ БТЕК 04.02.02 КР ПЗ					
Змн.	Арк	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агенту	Літ.	Арк..	Аркушів		
Розроб.		Ковінченко А.								
Перевір.		Стабніков В.П.					13	96		
Реценз.						Кафедра БТМ				
Н. Контр.										
Затверд.		Стабніков В. П								

Також продуцентом антибіотиків групи тетрациклінів є мікроорганізми штаму *Streptomyces aureofaciens* UV8, що продукує 1,23 г/л тетрацикліну при культивуванні від 96 годин, потребує підтримки рН на рівні 4,5-5,0 та інтенсивній аерації 1,5/1 об/об при температурі 30 °С. Здатність *S. aureofaciens* UV8 до синтезу двох і більше антибіотиків для даної роботи є недоліком, так як при незначних змінах середовища мікроорганізм адаптується та змінює продукт синтезу на більш вигідний для нього хлортетрациклін, що синтезується при присутності хлоридів у складі поживного середовища. Хоча, для даного штаму він зазвичай синтезується разом з тетрацикліном у кількостях <14 мкг/мл, це може заважати при виробництві конкретного антибіотику. Також, недоліком *S. aureofaciens* UV8 є те, що його культивують на багатоконпонентному синтетичному поживному середовищі, що є складно відтворюваним у умовах промислової культивації. Вище перераховані недоліки не дозволяють використовувати *S. aureofaciens* UV8 як продуцент тетрацикліну. [12]

Штам *Streptomyces aureofaciens* ZT04 є рокомбінантним штамом, отриманим шляхом кон'югації дикого штаму *S. aureofaciens* ZT04 з *E. coli*, що містить відповідну плазмідну надсинтезу – це дозволяє зберегти переваги дикого штаму, основною з яких є невибагливість, та підвищити синтез чистого тетрацикліну до вражаючих 18,9 г/л. Культивується штам при стандартній для актиноміцетів інтенсивній аерації (1,5/1 об/об), температурі 30 °С і близькому до нейтрального рН.

Поживне середовище для культивування даного штаму включає крохмаль та соєве борошно як джерела вуглецю. Додатково додається крейда в концентраціях 4-7 г/л. Крейда стабілізує рівень рН протягом усього процесу, що усуває потребу в його безперервному контролі та значно спрощує технологію виробництва. Отже, незважаючи на складність у створенні та підтриманні культури, штам *S. aureofaciens* ZT04 є найперспективнішим серед проаналізованих продуцентів тетрацикліну. [7]

Узагальнені дані наведені у таблиці 2.1, згідно з якими найвигіднішим мікроорганізмом для синтезу тетрацикліну є *Streptomyces aureofaciens* ZT04 через надвисокий синтез цільового продукту та невибагливість до умов культивування характерну для актиноміцетів, що перебивають потребу у додаткових витратах часу і ресурсів при поводженні з рекомбінантними штамми.

Порівняльна характеристика мікроорганізмів, які здатні синтезувати тетрациклін

Біологічний агент	Склад поживного середовища:		Концент- рація ан- тибіотику, г/л	Особливості процесу біосинтезу	Використана література
	Компонент	Концен- трація продук- ту, г/л			
1	2	3	4	5	6
Streptomyces aureofaciens TA3	Інокулят		2	<i>Перша культура:</i> Об'єм: 25 мл на 1000 мл колба з аерацією на шейкері;	Ross, A., & Schügerl, K. (1988). Tetracycline production by Streptomyces aureofaciens: the time lag of production. <i>Applied microbiology and biotechnology</i> , 29, 174-180.
	<i>Перша культура:</i> Глюкоза Дріжджовий екстракт Солодовий екстракт	– 4; – 4; – 10;			
	<i>Друга культура:</i> Кукурудзяний екст- ракт СаСО ₃ Сахароза (NH ₄) ₂ SO ₄ Меляса MgSO ₄ × 7H ₂ O	–20; – 0,6; – 30; – 0,4 – 2; – 0,25;			
	Ферментація			Кількість інокуляту: 500 мл на 10 л середовища; Аерація: шейкер, 400 об/хв.; Температура: 27 °С; Культивування: 30 год; рН – 5,8 250 мл бульйону використовували для інокуляції 65 л середови- ща в головному реакторі. Основне культивування: 120 год.	
	Арахісове борошно Сахароза H ₃ C ₆ H ₅ O ₇ × H ₂ O СаСО ₃ (NH ₄) ₂ SO ₄ MgSO ₄ × 7H ₂ O (NH ₄) ₃ PO ₄	– 12,5; – 10; – 0,25; – 2,5; – 1,3; – 0,2; – 0,2;			

<i>Streptomyces aureofaciens</i> UV8	<i>Інокулят</i>		1,23	Об'єм: 50 мл на 250 мл колба Ерленмейєра або 400 мл на колбу 2000 мл; Аерація: шейкер, 200 об/хв.; Температура: 30 °С; Інокулят: рідка суспензія міцелію; Культивування: 24 год.; рН – 4,5-5,0	Darken, M. A., Berenson, H., Shirk, R. J., & Sjolander, N. O. (1960). Production of tetracycline by <i>Streptomyces aureofaciens</i> in synthetic media. <i>Applied microbiology</i> , 8(1), 46-51
	Сахароза	– 30;			
	Соєве борошно	– 5,0;			
	Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ × 5H ₂ O	– 1,0;			
	(NH ₄) ₂ SO ₄	– 3,3;			
	MgSO ₄ × 7H ₂ O	– 0,25;			
	KH ₂ PO ₄	– 0,10;			
	K ₂ HPO ₄	– 0,10;			
	CaCO ₃	– 1,0;			
	MnSO ₄ × 4H ₂ O	– 0,01;			
ZnSO ₄ × 7H ₂ O	– 0,04;				
CH ₃ COOH	– 0,40				
K ₂ Cr ₂ O ₇	– 0,016 (мг);				
	<i>Ферментація</i>			Об'єм: 15 галонів середовища у ферментер на 25 галонів Інокулят: 3% Культивування: 96 год.; Аерація: 1,5/1 об'ємів повітря на об'єм рідини у хвилину; рН – 5,0	
	Сахароза	– 40;			
	H ₃ C ₆ H ₅ O ₇ × H ₂ O	– 12,8;			
	(NH ₄) ₂ SO ₄	– 6,0;			
	MgSO ₄ × 7H ₂ O	– 0,25;			
	KH ₂ PO ₄	– 0,15;			
	CaCO ₃	– 11,0;			
	MnSO ₄ × 4H ₂ O	– 0,01;			
	ZnSO ₄ × 7H ₂ O	– 0,04;			
	K ₂ Cr ₂ O ₇	– 0,016 (мг);			
<i>Streptomyces aureofaciens</i> ZT04	<i>Інокулят</i>		18,9	Об'єм: 100 мл на колбу 500 мл колбу Ерленмейєра; Культивування: 24 год.; Температура: 30 °С; Інокулят: 10%	

	Кукурудзяний крохмаль	– 40;			Zhu, T., Cheng, X., Liu, Y., Deng, Z., & You, D. (2013). Deciphering and engineering of the final step halogenase for improved chlortetracycline biosynthesis in industrial <i>Streptomyces aureofaciens</i> . <i>Metabolic Engineering</i> , 19, 69-78.
	Соеве борошно	– 20;			
	Дріжджовий екстракт	– 5;			
	Пептон	– 14;			
	KH ₂ PO ₄	– 0,25;			
	MgSO ₄	– 0,25;			
	(NH ₄) ₂ SO ₄	– 3;			
	CaCO ₃	– 4;			
Ферментація					
	Кукурудзяний крохмаль	– 80;			
	Соеве борошно	– 40;		Інокулят: 10% рідкої суспензії міцелію;	
	Дріжджовий екстракт	– 1;		Аерація: 1,5/1 об'ємів повітря на об'єм рідини у хвилину;	
	Кукурудзяне молоко	– 8;		Температура: 30 °C;	
	Пептон	– 14;		Культивування: 96 год.;	
	Соева олія	– 15;			
	MgSO ₄	– 0,25;			
	(NH ₄) ₂ SO ₄	– 3,5;			
	CaCO ₃	– 7;			

2.2. Розрахунок складу поживного середовища

При виборі продуценту важливим фактором є його економічна доцільність. Проведемо розрахунок складу поживного середовища для кожного із обраних продуцентів, що б визначити собівартість отриманого цільового продукту.

Таблиця 2.2

Вартість компонентів та 1 л поживних середовищ

Продуцент	Компонент поживного середовища	Концентрація у ПС, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн.) на 1 л середовища	Джерело інформації
1	2	3	4	5	6
<i>Streptomyces aureofaciens</i> ТА3	Арахісове борошно	12,5;	170	2,125	2
	Сахароза	10;	130	1,3	1
	$\text{H}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}$	0,25;	98	0,025	3
	CaCO_3	2,5;	120	0,3	7
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,3;	70	0,091	4
	$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,2	50	0,01	5
	$(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$	0,2	57,29	0,012	6
Вартість 1 л середовища – 3,863 грн.					
<i>Streptomyces aureofaciens</i> UV8	Сахароза	40	130	5,2	1
	$\text{H}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}$	12,8	98	1,254	3
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	6,0	70	0,42	4
	$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,25	50	0,012	5
	KH_2PO_4	0,15	150	0,023	6
	CaCO_3	11,0	120	1,32	7
	$\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$	0,01	208	0,002	8
	$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,04	87	0,003	9
	$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	0,016 (мг)	1050	0,0000168	10
Вартість 1 л середовища – 8,234 грн.					
<i>Streptomyces aureofaciens</i> ZT04	Кукурудзяний крохмаль	80	65	5,2	12
	Соеве борошно	40	80	3,2	13
	Дріжджовий екстракт	1	165	0,165	14
	Кукурудзяне молоко (екстракт)	8	100	0,8	15
	Пептон	14	1300	18,2	11
	Соева олія	15	116,72	1,75	16
	MgSO_4	0,25	460,80	0,115	17
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3,5	70	0,245	4
	CaCO_3	7	120	0,84	7
Вартість 1 л середовища – 30,515 грн.					

Примітка – ціни наведено станом на 24.05.2025. (детально у додатку 1)

Згідно з розрахунком, умовна вартість поживного середовища для мікроорганізмів складає 3,863 грн./л для ТА3; 8,234 грн./л для UV8 та 32,155 грн./л для ZT04 відповідно. Розрахуємо умовну вартість 1 граму отриманого антибіотику для кожного штаму:

Таблиця 2.3

Умовна вартість 1 г антибіотику

Біологічний агент	Концентрація антибіотику, г/л	Тривалість культивування	Кількість утвореного антибіотику за годину, г/год	Вартість 1 л середовища, грн/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г
1	2	3	4	5	6
<i>Streptomyces aureofaciens</i> ТА3	2	120	0,016	3,863	1,932
<i>Streptomyces aureofaciens</i> UV8	1,23	96	0,012	8,234	4,044
<i>Streptomyces aureofaciens</i> ZT04	18,9	96	0,197	30,515	1,614

Згідно з розрахунком, найбільш економічно вигідним є штам *S. aureofaciens* ZT04, 1 грам тетрацикліну при культивуванні якого коштує 1,614 грн, що дешевше UV8 та ТА3 на 0,318 та 2,43 грн. відповідно.

Згідно з аналізом 3-х штамів-продуцентів антибіотику тетрацикліну (*S. aureofaciens* ТА3/UV8/ZT04), розрахунку умовної вартості поживних середовищ та 1 граму цільового продукту (3,863/8,234/30,515 грн./л та 1,932/4,044/1,614 грн./г відповідно) встановлено, що штам *S. aureofaciens* ZT04 є най економічно вигіднішим. Він має дешеве та доступне за складом поживне середовище яке забезпечує високий вихід антибіотику та його дешевизну на 1 грам.

Перевірочний розрахунок складу поживного середовища

Даний підрозділ демонструє розрахунок складу поживного середовища для мутантного штаму *S. aureofaciens* ZT04, продуценту антибіотику тетрацикліну. Тривалість культивування 96 год, концентрація тетрацикліну 18,9 г/л, концентрація біомаси у статті не зазначена, приймемо середнє значення для актиноміцетів як 8 г/л.

Як основне джерело вуглецю ZT04 використовує кукурудзяний крохмаль та

соєве борошно, а також незначну кількість вуглеводів, що наявні у кукурудзяному молоці та дріжджовому екстракті. Розрахунок буде відштовхуватися від кількості крохмалю та соєвого борошна, так як кількість вищезгаданих вуглеводовмістних у порівнянні з ними є невисокою та не чинить суттєвого впливу на синтез як біомаси, так і цільового продукту.

Розрахунок джерела вуглецю у середовищі:

Синтез тетрацикліну. У молекулі тетрацикліну ($C_{22}H_{24}N_2O_8$) з молекулярною масою 444 ($264+24+28+128=444$) на 444 міститься 264 г карбону, отже в 18,9 г тетрацикліну: $(264 \cdot 18,9) / 444 = 11,237$ г/л карбону.

Розрахуємо, скільки грам вуглеводів потрібно на синтез 18,9 г тетрацикліну. Вміст карбону у крохмалі становить ~40%, отже, 40 г Карбону на 100 г. Для 18,9 г Карбону потрібно: $(18,9 \cdot 100) / 40 = 47,25$ г вуглеводів. Вміст вуглеводів у кукурудзяному крохмалі становить 91%, отже, для одержання 100 г тетрацикліну вміст крохмалю у середовищі має становити ~52 г/л ($47,25 / 0,91 = 51,923$). Так як для одержання енергії мікроорганізм використовує близько половини (~40%) субстрату, то на конструктивний метаболізм залишається ~60%. Отже, для перекриття цього порогу вміст крохмалю у середовищі має становити: $(52 \cdot 0,4) + 52 = 72,8$ г/л.

Синтез біомаси. У біомасі зазвичай міститься близько 50% Карбону, отже, у 8 г/л біомаси $8 \cdot 0,5 = 4$ г/л Карбону. Ця кількість Карбону міститься у $(4 \cdot 100) / 40 = 10$ г крохмалю. Враховуючи, що ~40% мікроорганізм витратить на «холосте окислення», то для накопичення 8 г біомаси потрібно внести: $(10 \cdot 0,4) + 10 = 14$ г/л крохмалю. Отже, загальний вміст джерела вуглецю у середовищі має становити $72,8 + 14 = 86,8$ г/л.

Так як у середовищі присутнє соєве борошно, що може споживатися мікроорганізмом, розрахуємо приблизну кількість Карбону у ньому. Як було вище згадано, кількість вуглеводів, які є переважно крохмалем, у даному виді борошна є низькою, і у складі середовища воно слугує більше як джерело вітамінів, амінокислот та мікроелементів. То ж, якщо вміст вуглеводів становить 21,7 %, то у 40 г/л – 8,68 г вуглеводів. Вміст карбону у крохмалі як борошна, так і кукурудзяному становить ~40%,

то ж прирівняємо їх. Отже, при потребі у $86,8 - 8,68 = 78,12$ г вуглеводів має поступити з кукурудзяного крохмалю. Отже, ~ 86 г/л кукурудзяного крохмалю має бути внесено у середовище ($78,12/0,91 = 85,8$).

Розрахунок джерела азоту у середовищі:

Синтез тетрацикліну. 2 атоми Нітрогену входять до складу молекули тетрацикліну, тобто, на 444 г припадає 28 г. Отже на 18,9 г антибіотику – $(28 \cdot 18,9)/444 = 1,192$ г Нітрогену. Джерелом азоту у даному поживному середовищі слугують соєве борошно, пептон та сульфат амонію $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$. Соєве борошно містить 48,9% білків ($\sim 18\%$ азоту). Отже, у 40 г/л борошна буде $(40 \cdot 0,18)/100 = 0,072$ г/л амінного азоту. Пептон містить азоту 17,5%, тобто, у 14 г/л буде $(14 \cdot 0,175)/100 = 0,0245$ г/л азоту. Молекулярна маса солі становить 132, з яких 28 – Нітроген. Отже, для 18,9 г тетрацикліну: $(132 \cdot 1,192)/28 = 5,619$ г сульфату амонію.

Синтез біомаси. Зазвичай, до складу клітини основні елементи входять у приблизно такій кількості (%): вуглець – 50; кисень – 20; азот – 10-14; водень – 8. Припустимо, що у біомасі *S. aureofaciens* ТАЗ кількість азоту становить 10%. Отже, у 8 г/л вміст азоту буде становити 0,8 г.

Джерелом азоту у поживному середовищі, як було вище згадано, є сульфат амонію. Отже, у 132 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ молекулярний азот становить 28 г, тоді 0,8 г Нітрогену міститься у $(132 \cdot 0,8)/28 = 3,771$ г солі. Отже, загальний вміст солі у середовищі, що б забезпечити синтез як біомаси, так і цільового продукту має становити $3,771 + 5,619 = 9,39$ г/л.

Соєве борошно та пептон, які присутні у середовищі у кількості 40 г/л та 14 г/л відповідно у сумі дають: $0,072 + 0,0245 = 0,0965$ г азоту, які мікроорганізм також може спожити. Потреба у азоті складає $1,192 + 0,8 = 2,792$, то ж так як частина надійде як органічний азот, з сіллю має надійти: $2,792 - 0,0965 = 2,695$ г Нітрогену, що відповідає 4,168 г сульфату амонію.

Розрахунок джерела фосфору у середовищі:

Кількість Фосфору (Р) у клітині становить $\sim 3\%$. То ж, для 8 г/л біомаси потрібно $8 \cdot 0,03 = 0,24$ г/л. У молекулі тетрацикліну Фосфор відсутній. У середовищі

для культивування основним джерелом Фосфору є соєве борошно та кукурудзяне молоко. Розрахуємо, скільки Фосфору мікроорганізми можуть спожити з борошна: у 100 г міститься ~0,3 г Фосфору (0,3%), отже у 40 г/л – 0,12 г. Кукурудзяне молоко містить ~1,75% Фосфору, отже у 8 г/л – 0,14 г. У сумі, середовище містить 0,26 г Фосфору, що є достатнім для синтезу біомаси (потреба – 0,24 г).

Інші компоненти:

Крім основних елементів клітина потребує Магній, Кальцій, залізо, та інші міenorні біoeлементи, джерелом яких є соєве борошно, дріжджовий екстракт та кукурудзяне молоко.

2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агенту

Морфолого-культуральні ознаки

Streptomyces aureofaciens – це грампозитивні актинобактерії роду *Streptomyces*, які характеризуються здатністю до утворення розгалуженого повітряного та субстрального міцелію. Спори, утворені повітряним міцелієм, можуть досягати розмірів у 1 мкм у діаметрі при рості на рідкому поживному середовищі.

Культивують *Streptomyces aureofaciens* на напівсинтетичних та синтетичних поживних середовищах, таких, як, наприклад, М2: Вівсяне середовище, або М8: агар Беннетта. На такому середовищі актинобактерія утворюють дрібні округлі блідо-жовті матові колонії з рихлою бугристою поверхнею, опуклим контуром та ворсинчастим краєм колонії [17].

У рідкому середовищі розгалужений міцелій *S. aureofaciens* утворює муть.



Рис. 2.1. Колонії S. aureofaciens на агарі Беннетта [17]

Також, характерною особливістю *S. aureofaciens* є активна сегментація міцелію при рості на рідких середовищах, та утворення великої кількості бічних ниткоподібних придатків зі спор, через що фрагменти міцелію мають ентомоформний вигляд (схожий на комах).

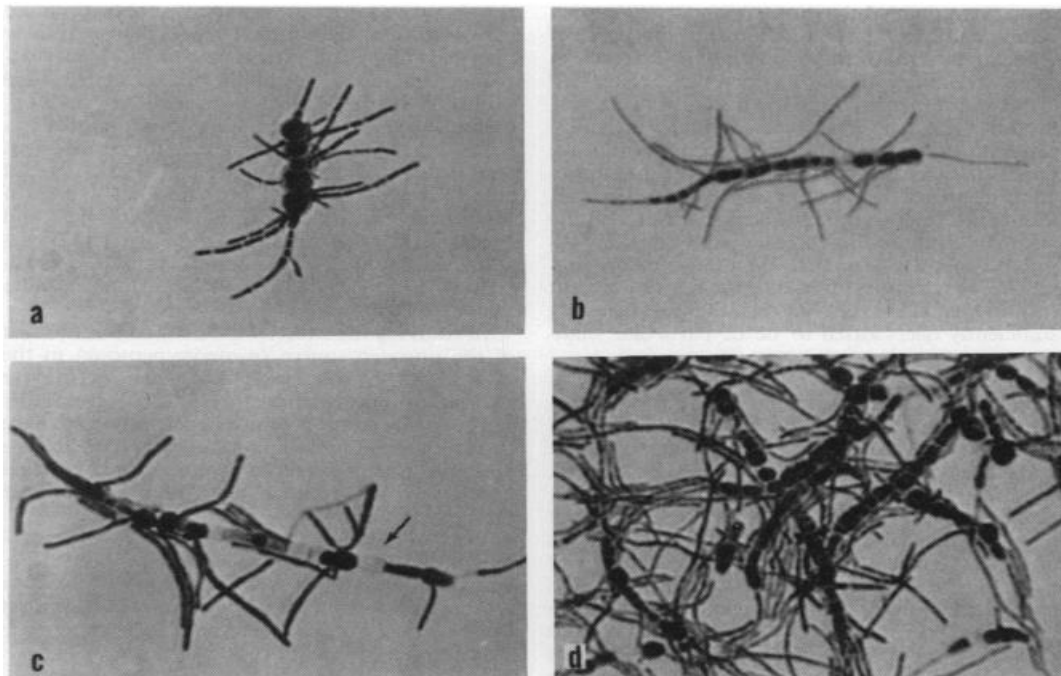


Рис. 2.2. Мікроскопія *S. aureofaciens* при рості на рідкому поживному середовищі (1200x): а, б, в – повністю розвинуті ентомоформні елементи *Streptomyces aureofaciens* NRRL B-1286 (культура, що росла у рідкому середовищі) через 72 години; «порожня» клітина, позначена стрілкою. (d) Агрегація комплексів через 96 годин, що утворює міцелій. [18]

Фізіолого-біохімічні ознаки

Streptomyces aureofaciens є облігатним аеробом, за типом живлення – хемоорганогетеротрофом з метаболізмом окислювального типу. Актинобактерії каталазо-позитивні. Відновлюють нітрат до нітриту.

Оптимальна температура для *S. aureofaciens* – 28-30 °C, отже, по відношенню до температури, як і інші представники роду *Streptomyces*, є мезофілом. Оптимальний рН – 7,5, отже, актинобактерії є нейтрофілом [19].

Факторів росту не потребують, так як мають активну ферментну систему, що дозволяє їм розкладати та використовувати для росту різноманітні сполуки – можуть розкладати аденін, желатину, ескулін, казеїн, гіпоксантин, крохмаль та L-

тирозин. Наприклад, на наведений нижче мікрофотографії показано, як *S. aureofaciens* руйнує міцелій іншого мікрорганізму – грибу *Macrophomina phaseolina*, ушкоджуючи гіфи [20,21].

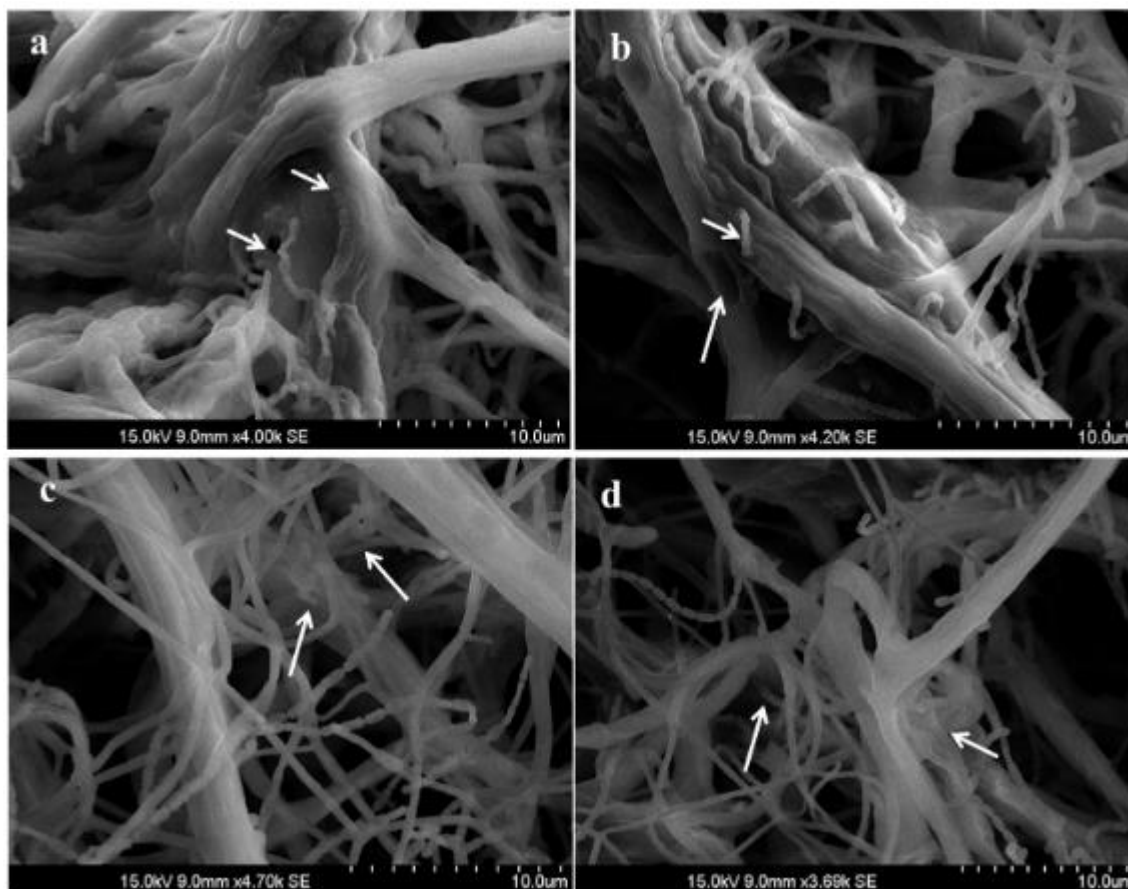


Рис. 2.3. Електронна мікроскопія: *S. aureofaciens* та *M. Phaseolina* (*S. aureofaciens* руйнує міцелій *M. Phaseolina*) [20]

2.4. Таксономічний статус біологічного агенту

Навожу філогенетичну класифікацію *Streptomyces aureofaciens* згідно до другого видання Керівництва Бергі з систематики бактерій [22].

Домен – *Bacteria*;

Тип – *Actinobacteria*;

Клас – *Actinomycetia*;

Порядок – *Streptomycetales*;

Родина – *Streptomycetaceae*;

Рід – *Streptomyces*;

Вид – *aureofaciens*;

Штам – *Streptomyces aureofaciens* ZT04.

РОЗДІЛ 3.

ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба у цільовому продукті

Так як тетрациклін є антибіотиком широкого спектру дії, що активний щодо грам-позитивних та грам-негативних бактерій, сфера його застосування є досить широкою, хоча він був виділений ще у 50-х роках 20-го століття.

Препарати тетрацикліну застосовують при лікуванні інфекцій дихальних шляхів (таких, як бактеріальна пневмонія), кишкових інфекціях, антропоознозах (туляремія, бруцельоз) та очних інфекціях, таких, як кон'юнктивіт. Тетрациклін не рекомендується використовувати при глибоких або колотих ранах через його низьку ефективність, так як велика частина патогенних мікроорганізмів, таких, як стрептококи і пневмококи, резистентні до нього. [15,23,24]

Так як можливості для застосування у тетрацикліну досить широкі, некоректно буде виділити лише одну групу захворювань. Тому, спираючись на існуючу статистику, я пропоную виділити 2 основні групи:

- Кишкові інфекції: 55,6 на 100 тис. населення; [25]
- Бактеріальна пневмонія: 384 на 100 тис. населення. [26]

Дані захворюваності на кишкові інфекції взяті з сайту МОЗ України з документу «Щорічний звіт про стан здоров'я та епідемічну ситуацію за 2022 рік» [25]

МОЗ України не публікує окремо статистику по інфекціям дихальних шляхів, тому захворюваність на пневмонію взята зі статті 2023 р, яка використовує дані 2017 р по Україні. Це дозволяє приблизно визначити кількість хворих на сьогодні. [26]

Отже, сумарно: $55,6 + 384 = 439,6$ на 100 тис. населення. Згідно даних Держстату, станом на 1 лютого 2022 року кількість населення України становила 41 130 432 осіб, але через повномасштабне вторгнення РФ кількість населення скоротилася на

					НУХТ БТЕК 04.02.02 КР ПЗ						
Змн.	Арк	№ докум.	Підпис	Дата							
Розроб.		Ковінченко А.			РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування			Літ.	Арк..	Аркушів	
Перевір.		Стабніков В.П.								25	96
Реценз.								Кафедра БТМ			
Н. Контр.											
Затверд.		Стабніков В. П									

7, 765 млн, і наразі становить 33, 365 млн осіб [27,28]. При такій кількості населення країни, при збереженні тенденції до захворюваності, потенційна кількість хворих становить $(33\,365\,000/100\,000) * 439,6 = 146,672$ або 146,7 тис. осіб.

Згідно з даними громадської організації «Інститут молоді» [29], станом на 1 січня 22 року кількість дітей становила 7 348 531 осіб, тобто 17,9% від усього населення країни, з яких 48,5% діти від 8 до 17 років – ~4 млн осіб, що становить:

$$\frac{7,350 \text{ млн осіб}}{17,9 \%} = \frac{4 \text{ млн осіб}}{x}, \text{ звідси } x = \frac{4 \times 17,9}{7,350} = 9,741 \approx 9,7\%.$$

Тобто, з 146,7 тис. осіб 9,7% відсотків – діти від 8 до 17 років: $146,7 \text{ тис} \times 9,7\% = 146,7 \times 0,097 = 14,2$ тис. потенційних пацієнтів з окремим дозуванням. Доросле населення у такому випадку буде становити 132,5 тис. осіб.

Розраховуючи дозування, слід зазначити, що через підвищені ризики у педіатрії тетрациклін широко не застосовується, а препарати, які містять його як діючу речовину, призначають людям не молодше 8 років. Разова доза для дорослого населення становить 0,25 - 0,5 по кожні 6 годин або 0,5 – 1 г кожні 12 годин, а для дітей віком від 8-ми років – 12,5 - 25 мг/кг маси тіла кожні 12 годин. Для дітей доза розраховується спираючись на масу тіла, тому приймемо середню вагу дітей від 8 до 17 років за 40 кг, як приблизне середньостатистичне для хлопчиків і дівчат цієї вікової категорії. Отже, при 12,5 мг (0,0125 г) кількість діючої речовини становить $(40 * 0,0125) * 2 = 1$ г за добу. [30]

Зазвичай, лікування пневмонії вимагає більшої концентрації антибіотику, то ж, приймемо, що пневмонію за допомогою тетрацикліну у середньому будуть лікувати протягом 10-ти днів, а кишково-шлункові інфекції – 7 днів.

Спираючись на співвідношення хворих (55,6 до 384 на 100%), можна сказати, що кишково-шлункові інфекції будуть становити 12,6% від загальної кількості хворих, а бактеріальна пневмонія – 87,4% відповідно. Отже:

Діти віком від 8-ми до 17 років:

- $14,2 * 12,6\% = 1,79$ тис. осіб для лікування 7 днів;

- $14,2 * 87,4\% = 12,4$ тис. осіб для лікування 10 днів;

Дорослі:

- $132,5 * 12,6\% = 16,7$ тис. осіб для лікування 7 днів;
- $132,5 * 87,4\% = 115,8$ тис. осіб для лікування 10 днів;

Розрахуємо кількість антибіотику, що припадає на 1 людину на курс (таблетка містить 0,25 г тетрацикліну):

- Діти віком від 8-ми до 17 років:
 - $(40 \text{ кг} * 0,0125 \text{ г}) * 2 \text{ рази} = 1 \text{ г}$ за добу (4 таблетки);
 - Кишково-шлункові інфекції: $1 \text{ г} * 7 \text{ днів} = 7 \text{ г}$ за курс;
 - Бактеріальна пневмонія: $1 \text{ г} * 10 \text{ днів} = 10 \text{ г}$ за курс;
- Дорослі:
 - $(0,25 \text{ г} * 2 \text{ таб.}) * 4 \text{ рази} = 2 \text{ г}$ на добу (8 таблеток);
 - Кишково-шлункові інфекції: $2 \text{ г} * 7 \text{ днів} = 14 \text{ г}$ за курс;
 - Бактеріальна пневмонія: $2 \text{ г} * 10 \text{ днів} = 20 \text{ г}$ за курс;

Розрахуємо загальну кількість антибіотику, що припадає обидві категорії:

- Діти віком від 8-ми до 17 років:
 - Кишково-шлункові інфекції: $1,79 \text{ тис. хворих} * 7 \text{ г} = 12,5 \text{ кг}$;
 - Бактеріальна пневмонія: $12,4 \text{ тис. хворих} * 10 \text{ г} = 124 \text{ кг}$;
 - Сумарно: $124 \text{ кг} + 12,5 \text{ кг} = 136,5 \text{ кг}$ для цієї вікової категорії.
- Дорослі:
 - Кишково-шлункові інфекції: $16,7 \text{ тис. хворих} * 14 \text{ г} = 233,8 \text{ кг}$;
 - Бактеріальна пневмонія: $115,8 \text{ тис. хворих} * 20 \text{ г} = 2316 \text{ кг}$;
 - Сумарно: $233,8 \text{ кг} + 2316 \text{ кг} = 2549,8 \text{ кг} \approx 2550 \text{ кг}$ для цієї вікової категорії.

Отже, разом для обох вікових категорій потрібно:

- $2550 \text{ кг} + 136,5 \text{ кг} = 2686,5 \text{ кг}$ чистого антибіотику.

Вхідні дані для розрахунку річної потреби в тетрацикліні

Група пацієнтів	Доза препарату на добу, таблеток	Вміст тетрацикліну в дозі препарату на добу, г	Тривалість прийому, діб	Кількість тетрацикліну на 1 людину, г	Кількість хворих в Україні станом на 2022 р., тис осіб	Загальна кількість тетрацикліну на всіх хворих, кг
1	2	3	4	5	6	7
Діти віком від 8 років	4	1	7/10	7/10	1,79/12,4	136,5
Дорослі	8	2	7/10	14/20	16,7/115,8	2 550
Всього						2 686,5

Примітка. Для розрахунку використано препарат «Resteclin 250 Capsule» Це таблетки, вкриті оболонкою по 250 мг, що є найбільш розповсюдженою формою випуску ліків з тетрацикліном. [15]

3.2. Розрахунок потужності виробництва

Згідно з пошуком по офіційному сайту «Нормативно-директивні документи МОЗ України» на ринку були представлені 7 препаратів тетрацикліну (таблетки, вкриті оболонкою), з яких лише 2 мають у складі діючу речовину чистий тетрациклін (хімічна назва речовини: $[4S-(4\alpha,4aa,5aa,6\beta,12aa)]-4$ (диметил аміно)-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-октагідро-3,6,10,12,12a-пентагідрокси-6-метил-1,11-діоксо-2 нафтаценкар-боксамід), і наразі термін їх реєстраційного посвідчення закінчився (імпортери: РФ та Республіка Білорусь). Більш популярним на ринку наразі України є хлортетрациклін, який наразі випускається під торговою назвою «ТЕТРАЦИКЛІН ГІДРОХЛОРИД» Борщагівським ХФЗ та ПАТ «Вітаміни». Тобто, всі виробники були імпортерами, і наразі на ринку препарати чистого тетрацикліну не представлені, хоча мають значно нижчу токсичність, ніж наявний хлортетрациклін. Існують закордонні препарати чистого тетрацикліну, такі, як Resteclin 250/500 Capsule, які були використані для розрахунку, тому, пропоную спиратися на актуальні препарати.

За попередніми розрахунками, можливий попит складає 2 686,5 кг на рік, то ж, я пропоную для розрахунку виробництва взяти ~25% ринку. Тобто: $2\,686,5 \text{ кг} * 0,25 \approx 672 \text{ кг}$.

Біологічний агент *Streptomyces aureofaciens* ZT04 продукує тетрациклін у кількості 18.9 г/л. [7] Отже, для отримання 672 кг потрібно:

$$672 / 0,0189 = 35\,556 \text{ л.}$$

Якщо враховувати витрати при очищенні цільового продукту, які візьмемо як 40%, то: $35\,556 * 1,4 \approx 50 \text{ м}^3$.

3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера

Для забезпечення потреб ринку на рівні 25% наше ймовірне підприємство має на рік отримати 50 м^3 культуральної рідини. Проведемо розрахунок, скільки культуральної рідини можна отримати за один цикл ферментації. Прийнемо кількість робочих днів як 60, що становить ~ 3 місяці виробництва (21-23 р. д. в середньому на місяць). Така тривалість виробництва дозволить виробляти на рік декілька

видів продукції, покривши річну потребу тетрацикліну приблизно за 1 квартал. Об'єм, який потрібно отримати за добу становить: $50/60 = 0,83 \text{ м}^3$.

Кількість цільового продукту за цикл буде становити:

$$V_{\text{цк}} = (K_1 * V_{\text{кр}} * T_{\text{цф}})/24 = (1,5 * 0,83 * 108)/24 \approx 5,6 \text{ м}^3/\text{цикл}.$$

K_1 – коефіцієнт запасу, прийmemo за 1,5;

$V_{\text{кр}}$ – кількість культуральної рідини за добу;

$T_{\text{цф}}$ – тривалість циклу роботи ферментера з підготовчими операціями (96 год виробничого біосинтезу + 12 годин підготовки);

Кількість культуральної рідини за цикл становить $5,6 \text{ м}^3$, отже, об'єм ферментера з коефіцієнтом заповнення 0,6 (так як *S. aureofaciens* ZT04 є аеробом) становить: $5,6/0,6 = 9,33 \text{ м}^3$.

Згідно з таблицею стандартних об'ємів ферментерів, представлених на ринку, найближчим за об'ємом є ферментер на 10 м^3 .

Перевіримо коефіцієнт заповнення: $5,6 / 10 = 0,56$ що не перевищує заданого коефіцієнта у 0,6 (0,5...0,65).

3.4. Розрахунок кількості стадій для підготовки посівного матеріалу

Згідно з розрахунком, за один виробничий цикл отримують $5,6 \text{ м}^3$ культуральної рідини.

Під час ферментації, особливо у ерліфтних ферментерах, при аерації часточки води безпосередньо виносяться з ферментеру з потоком повітря або перетворюються у пару. Тому, потрібно враховувати краплинонос та конденсат, які зазвичай становлять близько 10-15% від об'єму. Кількість інокуляту, яку використовують для засіву поживного середовища, для *S. aureofaciens* ZT04 становить 10% [7,31].

Отже, розрахуємо:

- Робочий об'єм ферментера:

$$V_{\text{роб}} = V_{\text{кр}} * (1 + E_{\text{ф}}) = 5,6 * 1,1 = 6,2 \text{ м}^3;$$

- Кількість інокуляту для такого об'єму:

$$V_{\text{ін}} = V_{\text{роб}} * 10\% = 6,2 * 0,1 = 0,62 \text{ м}^3;$$

- Кількість поживного середовища:

$$V_{\text{пс}} = V_{\text{роб}} - V_{\text{ін}} = 6,2 - 0,62 = 5,58 \text{ м}^3;$$

- Теоретичний об'єм ферментеру:

$$K_{\text{зп}} = V_{\text{роб}} / 0,6 = 6,2 / 0,6 = 10,33 \text{ м}^3;$$

Найближчим до цього значення є стандартний ферментер на 10 м³.

- Перевіримо коефіцієнт заповнення (0,5...0,65 для аеробів):

$$K_{\text{зп}} = V_{\text{роб}} / V_{\text{го}} = 6,2 / 10 = 0,62. (0,5 < 0,62 < 0,65, \text{ задовільно});$$

- Для отримання 5,6 м³ культуральної рідини обираємо ферментер об'ємом 10 м³.

Згідно з розрахунком, для засіву ферментера на 10 м³ потрібно 0,62 м³ або 620 л посівного матеріалу. Отже, розрахуємо:

- Робочий об'єм інокулятора:

$$V_{\text{роб}} = V_{\text{кр}} * (1 + E_{\text{ф}}) = 0,62 * 1,1 = 0,68 \text{ м}^3;$$

- Кількість інокуляту для такого об'єму:

$$V_{\text{ін}} = V_{\text{роб}} * 10\% = 0,68 * 0,1 = 0,068 \text{ м}^3.$$

- Кількість поживного середовища:

$$V_{\text{пс}} = V_{\text{роб}} - V_{\text{ін}} = 0,68 - 0,068 = 0,61 \text{ м}^3 ;$$

- Теоретичний об'єм ферментеру:

$$K_{\text{зп}} = V_{\text{роб}} / 0,6 = 0,68 / 0,6 = 1,13 \text{ м}^3;$$

Існують стандартні апарати на 1,25 м³.

- Перевіримо коефіцієнт заповнення (0,5...0,65 для аеробів):

$$K_{\text{зп}} = V_{\text{роб}} / V_{\text{го}} = 0,68 / 1,25 = 0,54 (0,5 < 0,54 < 0,65, \text{ задовільно});$$

- Для отримання 0,62 м³ культуральної рідини обираємо інокулятор об'ємом 1,25 м³.

Згідно з розрахунком, для засіву інокулятора на 1,25 м³ потрібно 0,068 м³ або 68 л посівного матеріалу. Отже, розрахуємо:

- Робочий об'єм ферментера:

$$V_{\text{роб}} = V_{\text{кр}} * (1 + E_{\text{ф}}) = 68 * 1,1 = 75 \text{ л};$$

- Кількість інокуляту для такого об'єму:

$$V_{\text{ін}} = V_{\text{роб}} * 10\% = 75 * 0,1 = 7,5 \text{ л};$$

- Кількість поживного середовища:

$$V_{\text{пс}} = V_{\text{роб}} - V_{\text{ін}} = 75 - 7,5 = 67,5 \text{ л};$$

- Теоретичний об'єм ферментеру:

$$K_{\text{зп}} = V_{\text{роб}} / 0,6 = 75 / 0,6 = 125 \text{ л.}$$

Стандартних апаратів такого об'єму немає, тому найближчим буде інокулятор, об'ємом 150 літрів.

- Перевіримо коефіцієнт заповнення (0,5...0,65 для аеробів):

$$K_{\text{зп}} = V_{\text{роб}} / V_{\text{го}} = 75 / 150 = 0,5 \text{ (} 0,5 = \mathbf{0,5} < 0,65, \text{ задовільно)};$$

- Для отримання 75 л культуральної рідини обираємо інокулятор об'ємом 150 літрів.

Згідно з розрахунком, для засіву інокулятору на 150 л потрібно 7,5 л посівного матеріалу. Отже, розрахуємо:

- Робочий об'єм ферментера:

$$V_{\text{роб}} = V_{\text{кр}} * (1 + E_{\text{ф}}) = 7,5 * 1,1 = 8,25 \text{ л};$$

- Кількість інокуляту для такого об'єму:

$$V_{\text{ін}} = V_{\text{роб}} * 10\% = 8,25 * 0,1 = 0,83 \text{ л};$$

- Кількість поживного середовища:

$$V_{\text{пс}} = V_{\text{роб}} - V_{\text{ін}} = 8,25 - 0,83 = 7,42 \text{ л};$$

- Теоретичний об'єм ферментеру:

$$K_{\text{зп}} = V_{\text{роб}} / 0,6 = 8,25 / 0,6 = 13,75 \text{ л.}$$

Стандартних апаратів такого об'єму немає, тому найближчим буде інокулятор, об'ємом 15 літрів.

- Перевіримо коефіцієнт заповнення (0,5...0,65 для аеробів):

$$K_{\text{зп}} = V_{\text{роб}} / V_{\text{го}} = 8,25 / 15 = 0,55 \text{ (} 0,5 < \mathbf{0,55} < 0,65, \text{ задовільно)};$$

- Для отримання 7,5 л культуральної рідини обираємо інокулятор об'ємом 15 літрів.

Згідно з розрахунком, для засіву апарату на 15 л потрібно 830 мл посівного матеріалу. Таку кількість інокуляту можна отримати у колбах на качалці. Для акти-

нобактерій, представником яких є *S. aureofaciens* ZT04, коефіцієнт заповнення для колб буде становити 0,2. Отже, кількість колб становить:

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{ін}} / (V_{\text{колб}} * K_{\text{зп}}) = 830 / (750 * 0,2) = 5,53 \approx 6 \text{ колб.}$$

Отже, за результатами розрахунку, для отримання 5,6 м³ за цикл потрібно встановити: ферментер для виробничого біосинтезу на 10 м³; інокулятор для отримання посівного матеріалу на 1,25 м³; інокулятори на 150 та 15 л, 6 колб.

Отримані дані узагальнені в таблиці 1.2:

Таблиця 3.2

Об'єми середовищ та апаратів для стадій підготовки посівного матеріалу та виробничого біосинтезу

№ стадії	Об'єм культуральної рідини V _{кр} , м ³	Уточнений об'єм культуральної рідини V _{роб} , м ³	Об'єм посівного матеріалу V _{пм} , м ³	Об'єм поживного середовища V _{пс} , м ³	Коефіцієнт заповнення, K _{зп} , частка	Геометричний об'єм ферментера, V _{ст} , м ³
1	2	3	4	5	6	7
I	5,6	6,2	0,62	5,58	0,62	10
II	0,62	0,68	0,068	0,61	0,54	1,25
III	68 л	75 л	7,5 л	67,5 л	0,5	150 л
IV	7,5 л	8,25 л	0,83 л	7,42 л	0,55	15 л
V	830 мл	830 мл	-	830 мл	0,2	6 колб

РОЗДІЛ 4.

БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агенту

Розвинутий ферментний комплекс дозволяє *S. aureofaciens* використовувати у якості ростових субстратів широкий діапазон вуглеводовмісних сполук: ди- та моносахариди, меляса, картопляні очистки, різні види борошна, тощо. Але, розглядаючи переваги різних видів субстрату, варто зазначити, що хоча при рості на простих сполуках (сахароза, глюкоза, мальтоза, тощо) спостерігається швидке накопичення біомаси. При тривалому 96-ти годинному культивуванні їх концентрація у поживному середовищі буде надто високою без реалізації підживлення, що може інгібувати розвиток мікроорганізмів. Також, так як тетрациклін є вторинним метаболітом (антибіотиком), пік його синтезу буде спостерігатися у стаціонарній фазі росту, яка настає після ~48-ї години від початку культивування.

Отже, при виборі субстрату доцільно віддавати перевагу таким сполукам, які не стимулюють надто швидке зростання біомаси, а натомість забезпечують стабільне надходження вуглецю протягом стаціонарної фази — сприяючи синтезу цільового продукту, а не лише розростанню міцелію продуценту.

У основній статті (Zhu, T., Cheng, X., Liu, Y., Deng, Z., & You, D. (2013)) як ростовий субстрат використовували кукурудзяний крохмаль та соєве борошно, основним полісахаридом у складі якого також є крохмаль. Таким чином, подальший розгляд шляхів катаболізму ростового субстрату буде базуватися на припущенні, що джерелом вуглецю у середовищі є саме крохмаль [7].

Згідно Kegg (Киотська енциклопедія генів та геномів) у *S. aureofaciens*, який представлено старою назвою – *Kitasatospora aureofaciens* – катаболізм крохмалю відбувається через гліколіз, про що свідчить наявність активного ферменту

					НУХТ БТЕК 04.02.02 КР ПЗ				
Змн.	Арк	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту				
Розроб.	Ковінченко А.								
Перевір.	Стабніков В.П.								
Реценз.									
Н. Контр.									
Затверд.	Стабніков В. П								
					Літ.	Арк..	Аркушів		
							34	96	
					Кафедра БТМ				

6-фосфоглюкокінази (КФ. 2.7.1.11), який перетворює D-фруктозо-6-фосфат у характерну лише для цього шляху катаболізму D-фруктозо-1,6-фосфат-2. Гліколіз також називають «фруктозо-1,6-дифосфатний шлях» саме через наявність цієї специфічної сполуки.

Крохмаль розкладається позаклітинним ферментом ізоамілазою (КФ 3.2.1.68) до мальтодекстрину, який, у свою чергу під впливом альфа-амілази (КФ 3.2.1.1) розщеплюється до мальтози. Мальтоза під впливом альфа-глюкозидази (КФ:3.2.1.20) перетворюється на D-глюкозу, яка потрапляє у клітину та залучається до гліколізу, трансформуючись у α -D-глюкозо-6-фосфат під впливом фосфо-енолпіруват-вуглеводної фосфотрансферази (КФ 2.7.1.199)

У самому гліколізі у *S. aureofaciens* функціонують майже всі ферменти, лише перетворення гліцерат-1,3-фосфат-2 у гліцерат-3-фосфат відбувається напряду за допомогою фосфогліцераткінази (КФ 2.7.2.3) без утворення гліцерат-2,3-дифосфату. [32,33,34,35,36,37]

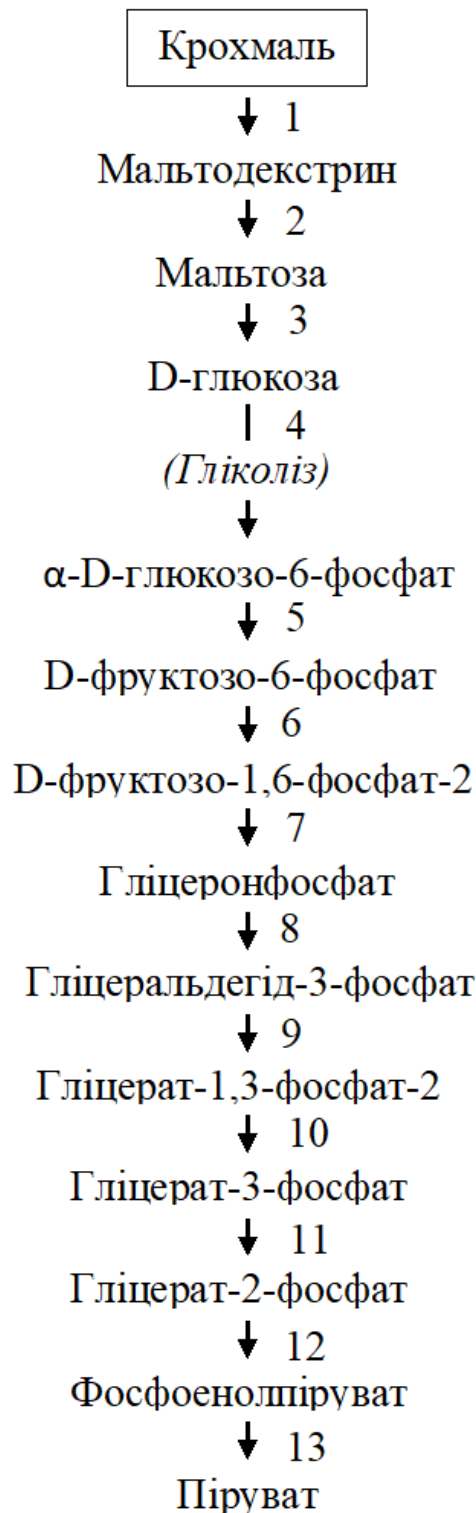


Рис. 4.1. Метаболізм сахарози у *S. aureofaciens*. 1 – ізоамілаза (КФ 3.2.1.68); 2 – альфа-амілаза (КФ 3.2.1.1); 3 – альфа-глюкозидаза (КФ:3.2.1.20); 4 – фосфоенолпіруват-вуглеводна фосфотрансфераза (КФ 2.7.1.199); 5 – глюкозо-6-фосфат-ізомераза (КФ 5.3.1.9); 6 – 6-фосфофруктокіназа (КФ 2.7.1.11); 7 – фруктозо-бісфосфатальдолаза II класу (КФ 4.1.2.13); 8 – тріозофосфатізомераза (КФ 5.3.1.1); 9 – гліцераальдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12); 10 – фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3); 11 – 2,3-бісфосфогліцератзалежна фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.11); 12 – енолаза (КФ 4.2.1.11); 13 – піруваткіназа (КФ 2.7.1.40)

4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

В процесі росту *S. aureofaciens* на крохмалі, цей субстрат розкладаються до глюкози, і шляхом гліколізу з неї утворюється піруват. Піруват під дією фередоксиноксиоредуктази (КФ 1.2.7.11) переходить у ацетил-КоА – однієї з ключових для синтезу тетрацикліну сполук.

У *S. aureofaciens* при рості на вуглеводах функціонують такі анаплеротичні реакції, як карбоксилювання фосфоенолпірувату та карбоксилювання пірувату. Вони слугують для поповнення витрат проміжних продуктів ЦТК, який служить джерелом інтермедіатів, необхідних для біосинтезу. У тому числі, Сукциніл-КоА, який під впливом метилмалоніл-КоА мутази (КФ 5.4.99.2) перетворюється на метилмалоніл-КоА, що є однією з сполук, необхідних для синтезу тетрацикліну.

Згідно з KEGG, ацетил-КоА під впливом ацетил-КоА-карбоксилази (КФ 6.4.2.1) перетворюється у малоніл-КоА, 8 одиниць якого з 1 молекулою метилмалонілу-КоА за участю β -АСР-синтази (КФ 2.3.1.260) конденсуються до 18-карбамоїл-3,5,7,9,11,13,15,17-октаоксооктадеканоїлу. Подальша послідовна конденсація дає 6-метилпрететамід, частина ферментів, що беруть участь у цих перетвореннях, досі не ідентифікована.

Під впливом 6-метилпрететамід 4-монооксигенази (КФ 1.14.13.232) 6-метилпрететамід переходить у 4-гідрокси-6-метилпрететамід, якій далі проходить ланку перетворень до ангідротетрацикліну. Фермент 4-аміно-ангідротетрациклін N4-метилтрансфераза (КФ 2.1.1. 335) утворює з ангінгідротетрацикліну 12-дегидротетрациклін, дія на який 5a,11a-дегидротетрациклінредуктази (КФ1.3.98.4) є останньою ланкою у синтезі антибіотику тетрацикліну.

Схема біосинтезу тетрацикліну у *Streptomyces aureofaciens* ZT04, починаючи з реакцій катаболізму ростового субстрату (крохмалю) наведена нижче:

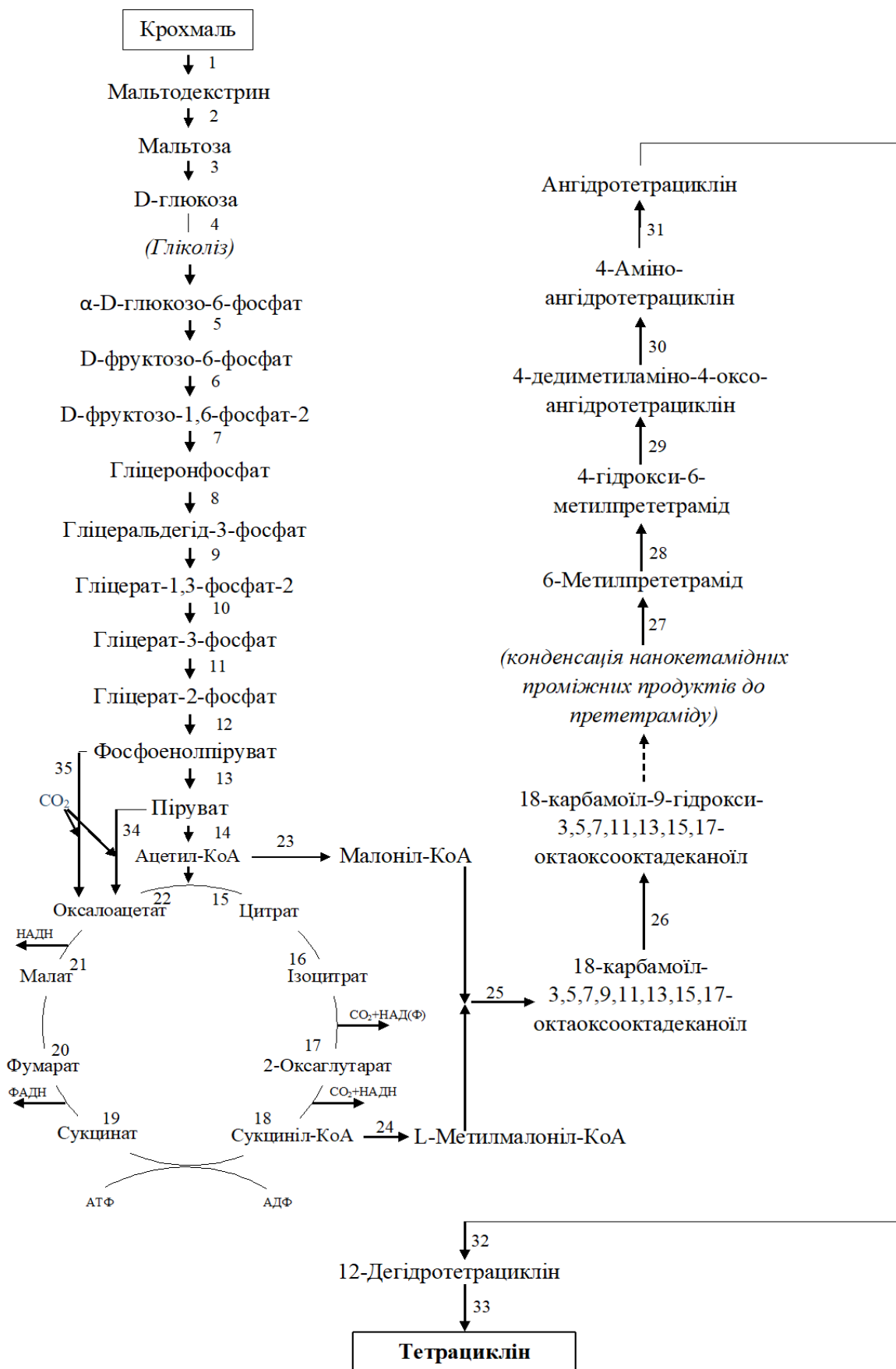


Рис. 4.2. Біосинтез антибіотику тетрацикліну з крохмалю як ростового субстрату у *S. aureofaciens* (перелік ферментів наведено нижче)

Перелік і найменування ферментів, що беруть участь у біосинтезі тетрацикліну з сахарози (1-33):

- 1 – ізоамілаза (КФ 3.2.1.68);
- 2 – альфа-амілаза (КФ 3.2.1.1);
- 3 – альфа-глюкозидаза (КФ:3.2.1.20);
- 4 – фосфоенолпіруват-вуглеводна фосфотрансфераза (КФ 2.7.1.199);
- 5 – глюкозо-6-фосфат-ізомераза (КФ 5.3.1.9);
- 6 – 6-фосфофруктокіназа (КФ 2.7.1.11);
- 7 – фруктозо-бісфосфатальдолаза II класу (КФ 4.1.2.13);
- 8 – тріозофосфатізомераза (КФ 5.3.1.1);
- 9 – гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12);
- 10 – фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3);
- 11 – 2,3-бісфосфогліцератзалежна фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.11);
- 12 – енолаза (КФ 4.2.1.11);
- 13 – піруваткіназа (КФ 2.7.1.40)
- 14 – фередоксиноксидоредуктаза (КФ 1.2.7.11) ;
- 15 – цитратсинтаза (КФ 2.3.3.1);
- 16 – аконітатгідратаза (КФ 4.2.1.3);
- 17 – ізоцитратдегідрогеназа (КФ 1.1.1.42);
- 18 – β -2-оксокислоти фередоксиноксидоредуктаза (КФ 1.2.7.11);
- 19 – β -субодиниця сукциніл-коа-синтетази (КФ 6.2.1.5);
- 20 – залізо-сіркова субодиниця сукцинатдегідрогенази (КФ 1.3.5.1);
- 21 – фумаратгідратаза, клас ii (КФ 4.2.1.2);
- 22 – малатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.37);
- 23 – ацетил-КоА-карбоксилаза (КФ 6.4.2.1);
- 24 – метилмалоніл-КоА мутаза (КФ 5.4.99.2);
- 25 – β -АСР-синтаза (КФ 2.3.1.260);
- 26 – кетоацилредуктаза (КФ 1.1.1.-);
- 27 – С-метилтрансфераза (КФ 2.1.1.-);
- 28 – 6-метилпрететрамід 4-монооксигеназа (КФ 1.14.13.232);
- 29 – 4-гідрокси-6-метилпрететрамід 12а-монооксигеназа (КФ 1.14.13.233);
- 30 – сукцинілдіамінопімелаттрансаміназа;
- 31 – 4-аміно-ангідротетрациклін N4-метилтрансфераза (КФ 2.1.1. 335);
- 32 – 5а,11а-дегідротетрациклін 5-монооксигеназа (КФ 1.14.13.234);
- 33 – 5а,11а-дегідротетрациклінредуктаза (КФ1.3.98.4);
- 34 – піруват, ортофосфатдикіназа (КФ 2.7.9.1)
- 35 – фосфоенолпіруваткарбоксикіназа (GTP) (КФ 4.1.1.32)

РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Продуцент тетрацикліну, мікроорганізм *S. aureofaciens* ZT04, є аеробом, як і всі актиноміцети з оптимумом рН близько 7 та температурою 27-30 С°. Через те, що досить велика кількість мікроорганізмів може розвиватися за таких умов, культивування має відбуватися асептичних умовах. Це передбачає стерилізацію середовища та аераційного повітря, попередню стерилізацію обладнання.

Через те, що забезпечення асептичних умов при поверхневому культивуванні є дорогим та складним процесом, більш раціональним буде глибинне культивування. Також, такий тип культивування забезпечує збільшення площі поглинання поживних речовин і є більш доступним за обладнанням через свою «традиційність».

Також, варто зазначити, що культивування має бути періодичним, через те, що тетрациклін – як і інші антибіотики, – вторинний метаболіт. Вторинні метаболіти накопичуються у стаціонарній фазі росту, тому спроба затримати розвиток культури у експоненційній фазі, що є характерним для безперервного культивування, надзвичайно економічно не вигідна, так як напряду заважає синтезу цільового продукту. [19,38]

Тому, при культивуванні *S. aureofaciens* ZT04 є доцільним використати глибинне періодичне культивування у асептичних умовах. Також, варто додати, що через те, що виробництво тетрацикліну не потребує високих концентрацій солі та джерело вуглецю, що не інгібує розвиток мікроорганізмів, культивування можна реалізувати без підживлення.

Вибір обладнання спирається на особливості біологічного агенту – його морфології та потреб. Так як *S. aureofaciens* ТАЗ є актинобактерією, для яких характерне утворення розгалуженого псевдоміцелію, ферментер зі звичайною мішалкою не дозволить мікроорганізму утворити біомасу, так як під час інтенсивного механічно-

					НУХТ БТЕК 04.02.02 КР ПЗ								
Змн.	Арк	№ докум.	Підпис	Дата									
Розроб.		Ковінченко А.			РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми				Літ.	Арк..	Аркушів		
Перевір.		Стабніков В.П.									40	96	
Реценз.									Кафедра БТМ				
Н. Контр.													
Затверд.		Стабніков В. П											

го процесу перемішування міцелій буде зруйновано. Тому для культивування актинобактерій використовують мішалки з низькою швидкістю обертання (30 об/хв) або барботажно-ерліфтні апарати, які не тільки забезпечать перемішування, але й додатково високий рівень аерації, що потрібен продуценту.

Також, у процесі ферментації та перемішування у апараті буде утворюватися піна, яку можна суттєво зменшити, додавши у середовище піногасники. Так як *S. aureofaciens* не може асимілювати жири, то ж, у якості дешевого піногасника можна використовувати жири та рідкі органічні олії, наприклад, соєву олію. [38,7]

Нагрів до оптимальної температури (30 С°) можна здійснити подачею у сорочку ферментеру глухої пари або здійснювати нагрів рідиною через стінку.

Культивування краще здійснювати з коефіцієнтом заповнення ~ 0.6 , і, враховуючі, що вихід антибіотиків не є високим у порівнянні до об'єму, для економічно вигідного виробництва слід використовувати апарати великої ємності – наприклад, 5 або 10 м³ (5 000 – 10 000 л). Тоді за 1 цикл культивування (~96 годин) можливо отримати ~ 60 кг антибіотику.

Через те, що велика кількість представників актиноміцетів використовують для культивування антибіотиків, на ринку представлена велика кількість готових варіантів ферментерів, спроектованих під цей клас мікроорганізмів – ерліфтний (барботажний) ферментер.

5.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря

Як було вище згадано, актиноміцети потребують досить інтенсивної аерації, яка становить близько 1,5 об'ємів повітря на 1 об'єм поживного середовища за хвилину. Тому для промислового виробництва тетрацикліну необхідно одержати велику кількість стерильного аераційного повітря, так як лише виробничій біосинтез без підготовки посівного матеріалу за 1 цикл ферментації потребує близько 10 м³.

При підготовці посівного матеріалу у колбах, засів здійснюється у стерильному боксі (стерильність досягається за допомогою попередньої стерилізації приміщення УФ-лампами), тому аераційне повітря відразу є стерильним.

При культивування у інокуляторах, посівних апаратах та безпосередньо са-

мому ферментері для виробничого біосинтезу, повітря підводять по стерильним комунікаціям, а його стерилізація відбувається у декілька етапів механічним шляхом.

На першій стадії, повітря за допомогою послідовного пропускання через фільтри очищують від часточок пилу та бруду:

- Компресор закачує атмосферне повітря через вентиляційну шахту, розміщену на найвищій точці будівлі+ 2-3 метра, так як з віддаленням від землі (як джерела забруднення) кількість мікроорганізмів у повітрі суттєво зменшується;
- Потім повітря проходить грубу очистку від часток великого діаметру – фільтри грубої очистки повітря, наприклад, фільтри G1-G4 з поліефірних волокон (до 5 мкм); [38,39]

Після грубої очистки турбокомпресор стискає повітря до 0,35-0,5 МПа, що призводить до його нагрівання до 120-250 °С і збільшення вологості на одиницю об'єму. [7]

Під час остигання волога з повітря конденсується, і може осідати на фільтрах більш тонкої очистки, що є недопустимим. По-перше, зволоження фільтра призводить до злипання його волокон, що значно погіршує його фільтруючу здатність. По-друге, на зволжених волокнах можливий розвиток мікроорганізмів, що осідають на фільтр під час фільтрації. Тому, щоб осушити повітря перед тонкою очисткою, його охолоджують у теплообмінному апараті (наприклад, «труба в трубі або кожухотрубний теплообмінник) до 25-40 °С. що провокує випадіння вологи у краплевловлювачі. [38]

Після того, як повітря було осушене, воно підлягає тонкій очистці:

- Для тонкої очистки повітря від часток діаметром менше 5 мкм використовують фільтри F5-F9 з поліпропіленових волокон. Такі фільтри зазвичай розміщені вже у самому цеху, де відбувається ферментація; [40]

Далі повітря має пройти очистку у індивідуальних фільтрах високої очистки, встановлених безпосередньо на самому ферментері. Але повітря, навіть стерильне,

неможна відразу подати у ферментер, так як воно має підвищену температуру, знижену вологість високий тиск і турбулентний характер потоку, тому, перед індивідуальним фільтром показники повітря потрібно стабілізувати:

- Охолодити до 30 °C (оптимальна для *S. aureofaciens* ZT04 температура);
- Зволожити, щоб знизити втрати вологи (краплевинос) з поживного середовища у ферментері;
- Зниження пульсації повітря до утворення ламінарного потоку;

Після стабілізації очищеного повітря, воно подається на індивідуальний фільтр безпосередньо перед подачею у ферментер. Для стерилізуючої фільтрації повітря від частинок діаметром більше 0,1 мкм варто використати PTFE фільтри, які відповідають за рівнем фільтрації F9-U15, так як зазвичай мікроорганізми мають розмір у 1-0,5 мкм (спори ~0,3 мкм). [41]

Важливо зазначити, що всі вищеописані фільтри мають мати круглу форму, щоб рівномірно розподіляти тиск від потоку повітря по своїй поверхні.

Відпрацьоване повітря також не можна просто напряду вивести у навколишнє середовище, так як воно містить частинки поживного середовища, спори і безпосередньо самих мікроорганізмів та невелику кількість антибіотику. Тому відпрацьоване повітря можна очистити методом каталітичного спалювання – нагрівання повітря до 320-350 °C, що є досить енергоємним, або встановленням сітчастого фільтра. Фільтр є циліндром з кришкою та дном, в середині якого фільтрувальний елемент – сітка з дроту 0,28 мм із нержавіючої сталі, а перед ним встановлено циклон. Це дозволяє очистити відпрацьоване повітря на 99.97% перед викидом у атмосферу. [38, 42]

5.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

5.3.1. Обґрунтування вибору мийних та дезінфікуючих засобів

Під час виробництва антибіотику тетрацикліну для дотримання санітарних норм потрібно проводити очищення обладнання та приміщень. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів для виробництва ґрунтується на їх ефективності, доступності і,

насамперед, вартості потрібного об'єму засобу – тобто, концентрація робочого розчину та кількість концентрату для отримання цього об'єму – на весь період виробництва. На ринку України представлено велику кількість миючих та дезінфікуючих засобів, я пропоную детальніше розглянути 6 із них (посилання у **додатку 2**):

Засіб «Neomscan CP acid 300» – засіб призначений для прибирання виробничих та розливних цехів, контейнерів, апаратів та труб через CIP-мийки. Neomscan CP acid 300 містить фосфорну кислоту і спеціальні змочувальні агенти, і має наступні властивості: розчиняє мінеральні відкладення та ін. кислоторозчинні відкладення, сприяє видаленню органічних відкладень, не спінюється після досягнення температури у 40 °C і вище. Підходить для нержавіючої сталі (наприклад, 1.4301, 1.4571), а також сумісного з кислотами пластику (наприклад, ПВХ, ПП) і ущільнювачів (наприклад, EPDM, PTFE). [1]

Засіб «Neomscan CP alka 140» – призначений для очищення виробничих і розливних систем, апаратів та контейнерів та лінії з використанням CIP-мийок у фармацевтичній та косметичній промисловості. Очищення дрібних і роз'ємних деталей в автоматизованих системах очищення. Neomscan CP alka 140 містить луги та комплексоутворювачі і має наступні властивості: видаляє органічні забруднення, підходить для води будь-якої жорсткості. Не містить ПАР та не спінюється, підходить для нержавіючої сталі (1.4301, 1.4571) і лугостійкого пластику (наприклад, PVC, PP) і ущільнень (наприклад, EPDM, PTFE). Не підходить для алюмінію та легких сплавів, міді, латуні та сплавів кольорових металів. [2]

Засіб «Neomscan FA 18» – призначений для очищення виробничих і наповнювальних установок, апаратів, контейнерів і труб за допомогою CIP-мийок, ферментаційних і накопичувальних резервуарів. Neomscan FA 18 - це лужний миючий засіб з високою комплексоутворювальною здатністю та такими властивостями: ефективно видаляє органічні залишки, не містить активного хлору, ПАР та фосфатів, не спінюється, Підходить для нержавіючої сталі та сумісних з лугами пластиків (PVC, PP). Не підходить для алюмінію, міді, латуні та інших кольорових металів, металевих сплавів, а також луджених і оцинкованих поверхонь [3]

Засіб «Віндез ЧАС-АМ» – призначений для дезінфекції поверхонь, меблів, медичного обладнання та інструментів, технологічного та санітарно-технічного обладнання, а також транспортних засобів. Віндез ЧАС-АМ це засіб на основі четвертинних амонієвих сполук та аміну, що має широкий спектр антимікробної дії та миючі властивості. Має такі властивості: завдяки поєднанню миючої та ефективної дезінфікуючої дії може використовуватися як передстерилізаційний засіб, що спрацьовує протягом 5-ти хвилин. Також, Віндез ЧАС-АМ безпечний для здоров'я людини – має IV клас, тобто, низьку токсичність. Підходить для широкого спектру поверхонь, так як не має корозійних властивостей – від нержавіючої сталі до гуми. [4]

Засіб «Данаклін 3Д» – призначений для очищення та дезінфекції поверхонь, передстерилізаційного очищення на фармацевтичних, біологічних та харчових виробництвах. Має характерний приємний запах. Данаклін 3Д це засіб на основі ЧАС та гуандиниу, а також вміщує мийний комплекс. Не містить окислювачів та добре розчиняється у воді, підходить для різних типів матеріалів, як стійких, так і не стійких до корозії: кераміки, металокераміки, гуми, скла, металу, тощо. Спрацьовує протягом 2-х хвилин, має широкий спектр антимікробної дії. [5]

Засіб «Cif Professional 2in1» – Призначений для очищення та дезінфекції поверхонь у харчовій промисловості. Ефективний засіб з бактерицидними та фунгіцидними властивостями, що може використовуватися з усіма типами жорсткості води. Ефективно видаляє жир та залишки їжі, не містить ароматизаторів, підходить до всіх стандартних типів матеріалів: нержавіюча сталь, пластик, кераміка, тощо. [6]

Узагальнююча таблиця мийних та дезінфікуючих засобів

Назва засобу	Склад	Антимікробна дія	Характеристика	Сумісність з оброблюваними поверхнями	Спосіб застосування (концентрація робочого розчину)	Відомості про державну реєстрацію	Вартість за 1 л/кг	Джерело (додаток 1)
<i>Засоби для очищення обладнання</i>								
Neomoscan CP acid 300	5 - 15 % неіонних поверхнево-активних речовин, 30% фосфатної кислоти	Бактерії, віруси, гриби та дріжджі, спори мікроорганізмів.	Рідкий концентрований засіб, що використовується у водних р-нах, без запаху.	Не чинить шкідливої дії.	2%-вий водний р-н	Наказ від 29.09.2023 №1707 по 29.09.2028	368,87	[1]
Neomoscan CP alk 140	Гідроксид калію; гідроксид натрію.	Бактерії, віруси, гриби та дріжджі, спори мікроорганізмів.	Рідкий концентрований засіб, що використовується у водних р-нах, без запаху.	Не чинить шкідливої дії.	2%-вий водний р-н	Наказ від 29.09.2023 №1707 по 29.09.2028	312,08	[2]
Neomoscan® FA 18	Гідроксид натрію; 2-фосфобутан-1,2,4-трикарбонова кислота.	Бактерії, віруси, гриби та дріжджі, спори мікроорганізмів.	Рідкий концентрований засіб, що використовується у водних р-нах, без запаху.	Не чинить шкідливої дії.	2%-вий водний р-н	Наказ від 29.09.2023 №1707 по 29.09.2028	38,46	[3]
<i>Засоби для очищення приміщень</i>								
Віндез	N,N-біс(3-амінопропіл) додециламін-10%, дидецилдиметиламмонію хлорид-6.5%, ПАР, інгібітор корозії, регулятор рН, стабілізатор, комплексують.	Бактерії, віруси, гриби та дріжджі, спори мікроорганізмів.	Рідкий концентрований засіб, що використовується у водних р-нах, без запаху.	Не чинить шкідливої дії.	0,1%-вий водний р-н	Наказ від 13.05.2021 №921 по 13.05.2026	229,2	[4]
Данаклін 3Д	ЧАС, алкілдиметилбензил амоній хлорид 4,5-5,5%, гексаметилен гуанідин гілрохлорид 0,3-0,5%	Бактерії, віруси, гриби та дріжджі	Рідкий концентрований засіб, що використовується у водних р-нах, має характерний запах.	Не чинить шкідливої дії.	0,25%-вий водний р-н	Наказ від 06.09.2023 №60 по 06.09.2028	274,8	[5]
Cif Professional 2in1	Бензалконію хлорид 3-10%	Бактерії, гриби та віруси	Рідкий концентрований засіб, що використовується у водних р-нах, без запаху.	Не чинить шкідливої дії.	1%-вий водний р-н	Наказ від 28.03.2023 №573 по 28.03.2028	197,6	[6]

5.3.2. Розрахунок витрат мийних та дезінфікуючих засобів

Виробництво антибіотику тетрацикліну (культивуванням *S. aureofaciens* ZT04) здійснюються протягом 60 робочих днів і передбачає отримання 50 м³ культуральної рідини у рік, тобто, 672 кг тетрацикліну на рік. Це 11 циклів культивування при об'ємі культуральної рідини за цикл у 5,6 м³. У попередніх розділах (розділ 3, «Техніко-економічне обґрунтування») було розраховано, що для організації виробництва потрібно встановити:

○ Біореактори для вирощування посівного матеріалу та безпосередньо виробничого біосинтезу:

- Ферментер об'ємом 10 м³;
- Інокулятор об'ємом 1,25 м³;
- Інокулятор об'ємом 150 л;
- Інокулятор об'ємом 15 л;

○ Реактори-змішувачі для стерилізації компонентів поживного середовища та титрантів (6% р-н NaOH), а також збірники для розчинення компонентів:

- Реактор-змішувач на 3 л для стерилізації 6% р-н NaOH;
- Реактор-змішувач на 5 л для композиції А, інокулятору на 15 л;
- Реактор-змішувач на 3 л для композиції Б, інокулятору на 15 л;
- Збірник на 3 л для розчинення компонентів композиції А, інокулятору на 150 л;
- Реактор-змішувач на 50 л для композиції А, інокулятору на 150 л;
- Реактор-змішувач на 30 л для композиції Б, інокулятору на 150 л;
- Реактор-змішувач на 3 л для композиції В, інокулятору на 150 л;
- Збірник на 30 л для розчинення комп. композиції А, інокулятору на 1,25 м³;
- Реактор-змішувач на 500 л для композиції А, інокулятору на 1,25 м³;
- Реактор-змішувач на 150 л для композиції Б, інокулятору на 1,25 м³;
- Реактор-змішувач на 30 л для композиції В, інокулятору на 1,25 м³;

- Реактор-змішувач на 2500 л для заварювання компонентів композиції А перед подачею до УБС-5;
- УБС-5, яка складається з: реактору-змішувачу, реактору УБС, колонки швидкісного нагріву, витримувачу, теплообміннику та насосів.

Виробництво здійснюється у безпосередньо самому цеху, приміщені для проведення підготовчих і допоміжних операцій (містить автоклави, термостати, стерильний бокс, холодильники та апаратуру для методів контролю) а також приміщення з качалками.

План передбачає два поверхи, перший та другий, ескізи планів яких представлені на рисунку 5.1 та 5.2 відповідно. Перший поверх складається з таких приміщень: цех А (підготовка інокуляту та виробничій біосинтез), приміщення з качалками (К) та мікробіологічна лабораторія (Л).

Другий складається з залізної платформи, що встановлена на висоті у 3 метри від землі, та призначена для обслуговування збірників і реакторів, що встановлені над апаратами. Ця платформа розміщена у цеху А та не є окремим приміщенням.

Також, план враховує приблизні діаметри обладнання та відстань між ними від 1 метра, відстань від стін – від 1,5 метрів. Така відстань між обладнанням є оптимальною для його розміщення цеху та зручності обслуговування.

На рисунках 5.1 та 5.2 наведено приблизний план приміщення для виробництва тетрацикліну шляхом культивування *S. aureofaciens* ZT04.

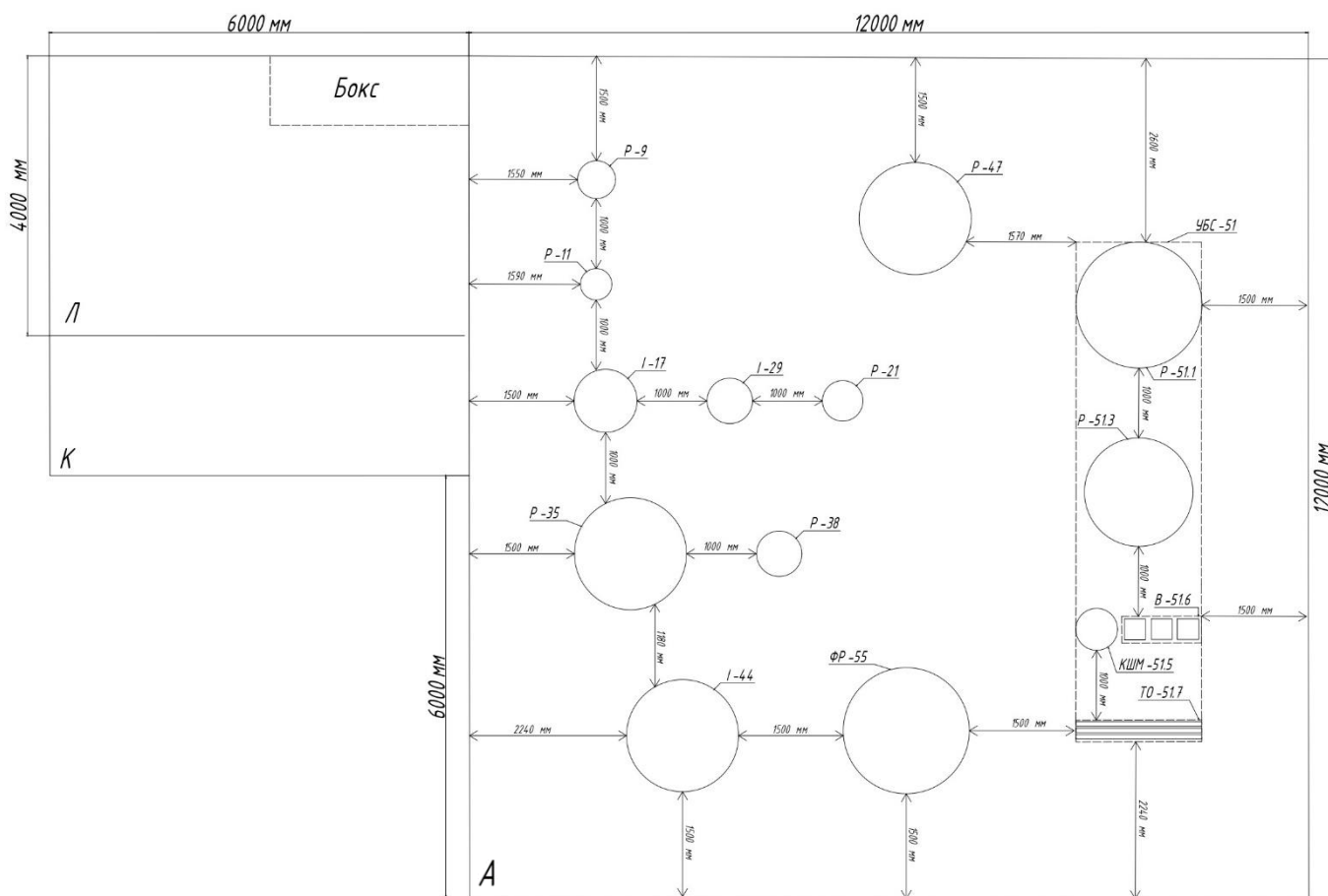


Рис. 5.1. Ескіз плану виробничого приміщення, перший поверх. (А – цех підготовки посівного матеріалу та виробничого біосинтезу; Л – мікробіологічна лабораторія; К – приміщення з качалками; Р-9 – реактор-змішувач для стерилізації 6% р-н NaOH; Р-11 – реактор-змішувач для композиції А, інокулятору на 15 л; І-17 – інокулятор (15 л); Р-21 – реактор-змішувач для композиції А, інокулятору на 150 л; І-29 – інокулятор (150 л); Р-35 – реактор-змішувач для композиції А, інокулятору на 1,25 м³; Р-38 – реактор-змішувач для композиції Б, інокулятору на 1,25 м³; Р-47 – реактор-змішувач для заварювання компонентів композиції перед подачею до УБС-5; УБС-51 – установка безперервної стерилізації на 5 м³, що містить реактор-змішувач на 5 м³, реактор УБС, колонку швидкісного нагріву, витримувач та теплообмінник.

Таблиця 5.2

Габаритні розміри основного обладнання для виробництва антибіотику тетрацикліну культивуванням *S. aureofaciens* ZT04.

Обладнання	Геометричний об'єм, л	Діаметр, м	Висота, м
Ферментер	10 000	1,8	8,7
Інокулятор (1,25 м ³)	1 250	1,6	2,7
Інокулятор (150 л)	150	0,65	1,492
Інокулятор (15 л)	15	0,9	0,9
Реактор-змішувач для стерилізації 6% р-н NaOH	3	0,54	1,26
Реактор-змішувач для композиції А, інокулятору на 15 л	5	0,45	1,5
<i>Реактор-змішувач для композиції Б, інокулятору на 15 л</i>	3	0,54	1,26
<i>Збірник для розчинення компонентів композиції А, інокулятору на 150 л</i>	3	0,54	1,26
Реактор-змішувач для композиції А, інокулятору на 150 л	50	0,58	2,1
<i>Реактор-змішувач для композиції Б, інокулятору на 150 л</i>	30	0,53	1,9
<i>Реактор-змішувач для композиції В, інокулятору на 150 л</i>	3	0,54	1,26
<i>Збірник для розчинення компонентів композиції А, інокулятору на 1,25 м³</i>	30	0,53	1,9
Реактор-змішувач для композиції А, інокулятору на 1,25 м ³	500	1,6	2,7
Реактор-змішувач для композиції Б, інокулятору на 1,25 м ³	150	0,73	2,4
<i>Реактор-змішувач для композиції В, інокулятору на 1,25 м³</i>	30	0,53	1,9
Реактор-змішувач для заварювання компонентів композиції перед подачею до УБС-5	2500	1,6	2,17
УБС-5	5 000	1,8	1,74
Всього	19 722	-	-

* Примітка. *Курсивом* виділено збірники та реактори, що встановлені над апаратами.

Згідно даних табл. 5.1, загальний об'єм обладнання становить $19,722 \text{ м}^3$. Для підтримання чистоти виробничого приміщення, проводиться щоденне прибирання (миття підлоги, робочих поверхонь) тобто, 60 разів за рік. Один раз на місяць здійснюється генеральне прибирання (стіни, підлога, вікна, робочі поверхні, зовнішня поверхня обладнання та комунікацій) тобто, 2 рази на рік.

Для розрахування потреби у мийних засобів необхідно розрахувати приблизну площу, яку необхідно обробити.

Розрахуємо потребу у мийних засобах для виробничих приміщень. Приймемо висоту приміщення з качалками та мікробіологічної лабораторії як 2,5 метра. Висота для цеху А відштовхується від висоти та рівня обладнання, розташованого там, тобто, 12 м.

Щоб розмістити великогабаритне обладнання, таке, як реактор на $2,5 \text{ м}^3$, УБС-5 та ферментер на 10 м^3 , ширина і довжина цеху А має бути 12 м.

Розрахуємо загальну площі поверхні обробки мийними та дезінфікуючими засобами:

- Площа підлоги цеху А становить: $(12 \text{ м} \times 12 \text{ м}) = 144 \text{ м}^2$; площа стін цеху А: $(12 \times 12) \times 4 = 576 \text{ м}^2$; загальна площа цеху А: $(144 \times 2) + 576 = 864 \text{ м}^2$.
- Площа підлоги другого поверху (платформа) є сумою площ 2-х прямокутників через складність форми платформи: $(7,1 \text{ м} \times 5,2 \text{ м}) + (4,8 \text{ м} \times 3,7 \text{ м}) = 54,7 \text{ м}^2$; загальна площа платформи становить: $54,7 \times 2 = 109,4 \text{ м}^2$;
- Площа підлоги мікробіологічної лабораторії становить: $4 \text{ м} \times 6 \text{ м} = 24 \text{ м}^2$; площа стін мікробіологічної лабораторії: $[(4 \times 2,5) + (6 \times 2,5)] \times 2 = 50 \text{ м}^2$; загальна площа мікробіологічної лабораторії: $24 + 50 = 74 \text{ м}^2$.
- Площа підлоги приміщення з качалками становить: $2 \text{ м} \times 6 \text{ м} = 12 \text{ м}^2$; площа стін приміщення з качалками: $[(2 \times 2,5) + (6 \times 2,5)] \times 2 = 40 \text{ м}^2$; загальна площа: $12 + 40 = 52 \text{ м}^2$.

Дані щодо загальної площі поверхні обробки мийними засобами узагальнено у таблиці 5.3:

Таблиця 5.3

Розрахунок загальної площі стін та підлоги виробничих приміщень

Приміщення	Площа підлоги, м ²	Площа стін, м ²	Загальна площа, м ²
Цех підготовки посівного матеріалу та виробничого біосинтезу (А)	144	576	864
Платформа другого поверху (Б)	54,7	-	109,4
Мікробіологічна лабораторія (Л)	24	50	74
Приміщення з качалками (К)	12	40	52
Загальна площа	234,7	666	1099,4

Розрахуємо потребу у миючих засобах для обладнання. Як було вище зазначено, кількість виробничих циклів для синтезу потрібного об'єму тетрацикліну становить 11 циклів. Обладнання очищують миючими засобами після кожного циклу, тобто, на 11 циклів виробництва, миття обладнання буде виконано 12 разів (11 + 1 після останнього циклу).

Отже, загальний об'єм миття становить: $12 \times 19,722 = 236,664 \text{ м}^3$. Дані щодо миття за весь період виробництва узагальнені у таблиці 5.4:

Таблиця 5.4

Розрахунок загальної площі миття оброблювального об'єкта за весь період виробництва антибіотику тетрацикліну

Об'єкт миття та/або дезінфекції	Площа (об'єм) оброблюваного об'єкту, м ² (м ³)	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	19,722	12	236,664
Підлога	234,7	60	14 082
Стіни, двері, вікна	666	2	1 332

Для миття апаратів – реакторів та ферментаційного обладнання - зазвичай використовують СІР-мийки, так як при такому способі очищення досягаються найбільш рівномірне миття, на відміну від ручного очищення. Витрати робочого розчину при очищенні СІР-мійками складають 20-30% від об'єму обладнання, що очищується, тому приймемо витрати у межах 25%.

Отже, для миття та дезінфекції 236 664 м³ обладнання необхідно витратити:

$$236\,664 \times 0,25 = 59\,166 \text{ м}^3 \text{ засобу на рік}$$

При виборі дезінфікуючих та мийних засобів для виробництва необхідно спиратися на їх вартість та ефективність, витрати мийного засобу для очищення 1 м² поверхень (підлоги, стін, вікон, стелі) або 1 м³ для очищення ємнісного обладнання. Зазвичай, для обробки 1 м² вищезгаданих поверхонь потрібно 100 мл робочого розчину мийного або дезінфікуючого засобу. Узагальнені дані щодо вибору мийних засобів наведено у таблиці 5.5.

За результатами розрахунків (таблиця 5.5) серед розглянутих мийних та дезінфікуючих засобів найкращим вибором за ціною та ефективністю є:

- Для обробки обладнання: як основний - «Neomoscan® FA 18», як заміник - «Neomoscan CP alka»;
- Для обробки поверхонь обладнання, підлоги, робочих поверхонь, дверей, стін та вікон: як основний - «Віндез», заміник – «Данаклін 3Д».

Ці засоби є однаково ефективними та з несуттєвими відмінностями, тому для рекомендується змінювати засоби для обробки обох груп (обладнання та поверхні) раз на 3 місяці. Це дозволить зберегти ефективність очищення, запобігаючи розвитку стійких до засобів форм мікроорганізмів.

Узагальнена характеристика витрат мийних та дезинфікуючих засобів для виробництва тетрацикліну

Назва мийного засобу (діюча речовина)	Об'єкт миття	Концентрація робочого розчину	Загальна площа (об'єм) миття об'єкту за весь період виробництва, м ²	Кількість робочого розчину за весь період виробництва, л	Вартість л/кг мийного засобу, грн	Вартість 1 л робочого розчину, грн	Загальна вартість миття за весь період виробництва, грн
Neomoscan CP acid 300 (H ₃ PO ₄)	Обладнання	2%	236 664	59 166	368,87	7,36	435 462
Neomoscan CP alka (NaOH та KOH)	Обладнання	2%	236 664	59 166	312,08	6,24	369 196
Neomoscan® FA 18 (C ₇ H ₁₁ O ₉ P та NaOH)	Обладнання	2%	236 664	59 166	38,46	0,76	44 966
Віндез (ЧАС-АМ)	Поверхні обладнання, підлога, стіни, вікна, двері	0,1%	252 078	25 207,8*	229,2	0,23	5 797,8
Данаклін 3Д (ЧАС)	Поверхні обладнання, підлога, стіни, вікна, двері	0,25%	252 078	25 207,8*	274,8	0,68	17 141,3
Cif Professional 2in1 (бензалконію хлорид)	Поверхні обладнання, підлога, стіни, вікна, двері	1%	252 078	25 207,8*	197,6	1,98	49 911,4

* Розрахунок здійснено за умови, що на 1 м² буде витрачено 100 мл робочого розчину.

Примітка. Всі ціни наведені станом на 02.04.2025 року, і зазначені у додатку 2.

5.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Для правильного росту мікробної культури поживне середовище має містити в собі джерела вуглецю, азоту, фосфору та мікроелементів. Для того, щоб компоненти поживного середовища не втратили своїх властивостей, і залишилися у доступній для мікроорганізмів формі, їх потрібно правильно стерилізувати. Наприклад, при надто високих температурах вуглеводовмісні компоненти, такі як м'яса, можуть оцукрюватися і втрачати свої властивості. Деякі солі, такі як кальцій карбонат та фосфоровмісні компоненти можуть утворювати нерозчинний осад, тому їх потрібно розділити. В залежності від особливостей, існує 3 загальних режими стерилізації: 112-115 С° та тиску 0,05 МПа 20-30 хв для цукрів; 131 С°, тиск 0,15 МПа, 40-60 хв. для солей; 120 С°, тиск 0,1 МПа для м'ясо-пептонних компонентів. [38,19]

Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалці

Середовище для культивування інокуляту у колбах на качалці містить такі компоненти [7,31]:

- Кукурудзяний крохмаль – 40 г/л;
- Соєве борошно – 20 г/л;
- Дріжджовий екстракт – 5 г/л;
- Пептон – 14 г/л;
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 3 г/л;
- MgSO_4 – 0,25 г/л;
- KH_2PO_4 – 0,25 г/л;
- CaCO_3 – 4 г/л;

У даному поживному середовищі присутні солі (фосфати та сульфати) і вуглеводовмісні компоненти, так як їх об'єм не великий, будемо стерилізувати в автоклаві у колбах.

- *Композиція А:* Це кукурудзяний крохмаль та соєве борошно. Борошно

та крохмаль потрібно попередньо заварити у холодній воді 30 хв поступово нагріваючи до 90 °С (це не забезпечить стерилізації). Також композиція містить дріжджовий екстракт та пептон. Стерилізуємо при температурі 112 °С 30 хв.

- *Композиція Б:* Фосфати. Це KH_2PO_4 . Режим стерилізації: 131 С°, 40 хв.
- *Композиція В.* Сульфати. MgSO_4 та $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Режим стерилізації: 131 С°, 40 хв.
- *Композиція Г.* Крейда. Режим стерилізації: 131 С°, 40 хв.

У попередньому розділі у таблиці 1.2 (стовпець 5) було розраховано кількість поживного середовища: 830 мл. У цій таблиці вже розраховано кількість середовища з поправкою на конденсат та без інокуляту.

Таблиця 5.6

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу у колбах на качалці

Компонент поживно-го середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 830 мл середовища (г)	Ком позиція	Об'єм ком-позиції
Кукурудз. крохмаль	40	33,2	А	~530 мл
Соєве борошно	20	16,6		
Дріжджовий екстракт	5	4,2		
Пептон	14	11,6		
Вода	530 мл			
KH ₂ PO ₄	0,25	0,2	Б	~50 мл
Вода	50			
MgSO ₄	0,25	0,2		~100 мл
(NH ₄) ₂ SO ₄	3	2,5		
Вода	100 мл			
CaCO ₃	4	3	Г	~ 150 мл
Вода	150 мл			

Отже, для вирощування посівного матеріалу у колбах на качалці реалізувати стерилізацію потрібної кількості поживного середовища можна у автоклаві, що не потребує додаткових реакторів змішувачів.

Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в посівних апаратах

Інокулят у інокуляторах культивують на середовищі того ж складу, що і колби на качалці.

- *Композиція А:* Це кукурудзяний крохмаль та соєве борошно. Борошно та крохмаль потрібно попередньо заварити у холодній воді 30 хв поступово нагріваючи до 90 °С (це не забезпечить стерилізації). Також композиція містить дріжджовий екстракт та пептон. Стерилізуємо при температурі 112 °С, тиск 0,05 МПа 30 хв.
- *Композиція Б:* Солі. Це KH_2PO_4 , MgSO_4 та $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Для попередження випадіння осаду цю композицію підкислюємо до рН 4,5 за допомогою HCl , а після стерилізації вирівнюємо рН до нейтрального за допомогою стерильного NaOH (детальніше у підрозділі 2.3). Режим стерилізації: 131 С°, тиск 0,15 МПа 40 хв.
- *Композиція В.* Крейда. Режим стерилізації: 131 С°, тиск 0,15 МПа 40 хв.

Також, при стерилізації у ректорі, приблизно 10% пари конденсується, і залишається у апараті у якості додаткової води.

Композицію А, тобто, кукурудзяний крохмаль та соєве борошно, попередньо заварюємо, щоб ці компоненти стали більш доступними для мікроорганізмів. Потім подаємо до заварених компонентів розчин дріжджового екстракту та пептону і стерилізуємо у тому ж реакторі, так як заварювання не забезпечує стерилізації.

Розрахуємо об'єми композицій для стерилізації для кожного апарату:

Таблиця 5.7

**Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу у
інокуляторі на 15 л**

Компонент поживно-го середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 7,5 л середовища (г)	Композиція	Об'єм композиції
Кукурудз. крохмаль	40	300	А	~ 4,4 л
Соєве борошно	20	150		
Дріжджовий екстракт	5	37,5		
Пептон	14	105		
Вода	4 л			
Конденсат (10%)	400 мл			
KH ₂ PO ₄	0,25	1,9	Б	~ 2,2 л
MgSO ₄	0,25	1,9		
(NH ₄) ₂ SO ₄	3	22,5		
Вода	2 л			
Конденсат (10%)	200 мл			
CaCO ₃	4	30		
Вода	900 мл			

Композиція А: Дріжджовий екстракт та пептон розчиняємо у колбі на 2 л з 1 л води, а потім додаємо для стерилізації у реактор на 5 л до попередньо заварених компонентів – кукурудзяний крохмаль та соєве борошно .

Композиція Б: стерилізуємо у реакторі на 3 л з ~2 л води.

Композиція В: стерилізуємо у колбі в автоклаві.

Таблиця 5.8

**Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу у
інокуляторі на 150 л**

Компонент поживно-го середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 68 л середовища (г)	Композиція	Об'єм композиції
Кукурудз. крохмаль	40	2 720	А	~ 38,5 л
Соєве борошно	20	1 360		
Дріжджовий екстракт	5	340		

Пептон	14	952		
Вода	35 л			
Конденсат (10%)	~3,5 л.			
KH ₂ PO ₄	0,25	17	Б	~ 27,3 л
MgSO ₄	0,25	17		
(NH ₄) ₂ SO ₄	3	204		
Вода	24,8 л			
Конденсат (10%)	2,48 л			
CaCO ₃	4	272	В	~ 2,2 л
Вода	2 л			
Конденсат (10%)	200 мл			

Композиція А: Дріжджовий екстракт та пептон розчиняємо у реакторі на 3 л з 1,5 л води, а потім подаємо самопливом для стерилізації у реактор на 50 л до попередньо заварених компонентів – кукурудзяний крохмаль та соєве борошно .

Композиція Б: стерилізуємо реакторі 30 л з ~25 л води.

Композиція В: стерилізуємо у реакторі на 3 л з 2-ма літрами води.

Таблиця 5.9

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу у інокуляторі на 1,25 м³

Компонент поживно-го середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 620 л середовища (кг)	Ком по-зиція	Об'єм ком-позиції
Кукурудз. крохмаль	40	24,8	А	~ 462 л
Соєве борошно	20	12,4		
Дріжджовий екстракт	5	3,1		
Пептон	14	8,7		
Вода	420 л			
Конденсат (10%)	42 л.			
KH ₂ PO ₄	0,25	0,16	Б	~ 136 л
MgSO ₄	0,25	0,16		
(NH ₄) ₂ SO ₄	3	1,9		
Вода	123,5 л			

Конденсат (10%)	12,35 л.			
CaCO ₃	4	2,5	В	~ 22 л
Вода	20 л			
Конденсат (10%)	2 л.			

Композиція А: Дріжджовий екстракт та пептон розчиняємо у реакторі на 30 л з 15 л води, а потім подаємо самопливом для стерилізації у реактор на 500 л до попередньо заварених компонентів – кукурудзяний крохмаль та соєве борошно .

Композиція Б: стерилізуємо у реакторі на 150 л з ~124 л води.

Композиція В: стерилізуємо у реакторі на 30 л з 20 л води.

Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу

Виробничий біосинтез здійснюється на середовищі наступного складу [7]:

- Кукурудзяний крохмаль – 80 г/л;
- Соєве борошно – 40 г/л;
- Дріжджовий екстракт – 1 г/л;
- Пептон – 14 г/л;
- Кукурудзяне молоко – 8 г/л;
- Соєва олія (у якості піногасника) – 15 мл/л;
- (NH₄)₂SO₄ – 3,5 г/л;
- MgSO₄ – 0,25 г/л;
- CaCO₃ – 7 г/л;

У даному поживному середовищі присутні неорганічні солі і вуглеводовмісні компоненти, але я пропоную стерилізацію у УБС.

- *Композиція А.* Компоненти, які потрібно попередньо заварити. Це кукурудзяний крохмаль та соєве борошно. Потрібно попередньо заварити у холодній воді 30 хв поступово нагріваючи до 90 °С (це не забезпе-

чить стерилізації). Після заварювання подаємо у УБС. Кукурудзяне молоко, соєва олія, дріжджовий екстракт, пептон, MgSO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ та CaCO_3 подаємо відразу до УБС-5. Режим стерилізації: $131\text{ }^\circ\text{C}$ при $0,15\text{ МПа}$ 40 хв.

Так як об'єм поживного середовища складає $5,58\text{ м}^3$ доцільно використати УБС-5 продуктивністю 5 м^3 за годину.

Таблиця 5.10

Композиції стерилізації компонентів для виробничого біосинтезу

Компонент поживно-го середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 5 580 л середовища (кг)	Ком по-зиція	Об'єм ком-позиції
Кукурудз. крохмаль	80	446,4	А	~ 5 580 л
Соєве борошно	40	223,2		
Вода	1800 л			
Дріжджовий екстракт	1	5,6		
Кукурудз. молоко	8	44,6		
Пептон	14	78,1		
Соєва олія	15	83,7		
MgSO ₄	0,25	1,4		
(NH ₄) ₂ SO ₄	3,5	19,5		
CaCO ₃	7	39		
Вода	3 273 л			
Конденсат (10%) (разом з завареними компонентами)	~507,3 л.			

Композиція А: кукурудзяний крохмаль, соєве борошно попередньо заварюємо у реакторі на 2500 л, а потім подаємо у УБС-5. Інші компоненти відразу подаємо та стерилізуємо у УБС-5.

Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН та піногасника

Так як одним з джерел вуглецю є соєве борошно, під час ферментації у ерліфтному ферментері буде утворюватися велика кількість піни. Для протидії інтенси-

вному піноутворенню у ферментаційне середовище додається соєва олія у кількості 15 мл на літр поживного середовища. [7]

Для запобігання зміни рН у поживне середовище як для ферментеру, так і для інокуляторів, додається крейда у кількості 7 г/л та 4 г/л.

Але, так як солі фосфатів і сульфатів стерилізуються разом (для інокуляторів), для попередження випадіння осаду рН потрібно знизити до $4,5 \pm 0,5$. У якості титрувальних агентів я пропоную 6%-вий розчини HCl та NaOH з приблизним розходом у 2 мл на 1 л розчину солей.

Розчин HCl готують розчиненням концентрованого розчину кислоти (37%) у відповідній кількості води, використовуючи колбу на 2 л. Реактор встановлювали не потрібно, так як об'єм 6% який потрібен для підкислення композиції Б для усіх 3-х інокуляторів становлять ~ 330 мл ($136 \text{ л} + 27,3 \text{ л} + 2,2 \text{ л} = 165,5$; $165,5 \cdot 2 = 331$ мл).

Розчин кислоти не стерилізують. Розчин NaOH отримують розчиненням сухої наважки у відповідній кількості води, готують і стерилізують реакторі на 3 л. Хоча розвиток мікроорганізмів у концентрованих розчинах лугів неможлива, вони можуть містити спори мікроорганізмів, які почнуть розвиватися потрапивши у поживне середовище.

Отже, технологічна схема має містити таку допоміжну операцію, як підготовку аераційного повітря. Також, окрім основного ферментеру на 10 м^3 потрібно встановити інокулятори на 15 л, 150 л та $1,25 \text{ м}^3$ для підготовки посівного матеріалу.

Також потрібні такі реактори-змішувачі: на $2,5 \text{ м}^3$, 500 л, 150 л, 50 л, 5 л, 3 реактори по 30 л, 4 реактори 3 л та УБС-5.

СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біо- синтезу тетрацикліну

Позиція	Найменування	Кі- льк ість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
<i>Підготовка повітря</i>			
ПЗ-1	Повітрезабірник	1	Даховий повітрезабірник круглий ZL-160 ZS, Оцинкована сталь ZS, Діаметр Ød, мм: 160 мм, макс. швидкість повітря, м3/год: 430, вільний перетин, м2:0,055. [1]
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр G4 для круглого каналу, фільтруючий матеріал – тканина із синтетичних волокон. [2]
ТК-3	Турбокомпресор	1	Турбокомпресори ID TURBO COMPRESSOR серії T2 (5.5-8.8 бар, 23-37 м3/хв), виробник: «dalgakiran» [3]
Р-4	Ресивер	1	Ресивер Повітряний Лідер 10 бар 900 к. с. РВ900.818.01 для компресора (PRM011528), Об'єм: 900 л; Макс. роб. Тиск: 10 бар; Роб. темп: +5...+40°С; Виробник: «ООО ЗЕО Лідер», Україна [5]
Т-5	Теплообмінник-охолоджувач	1	Осушувач рефрижераторного типу ATS DSI 60 (023145), 1000 л/хв, виробник: «ATS» [4]
Ф-6	Головний фільтр очистки	1	Магістральний фільтр ATS FGO 36 М (1 мікрон) (PRM014170). Потік повітря: 621л/хв; Макс. роб. тиск: 16 бар; Макс. температура стиснутого повітря +100 °С; Виробник: «ATS», Італія. [7]
Т-7	Теплообмінник-нагрівач	1	Кожухотрубний підігрівач, виробник: ОПЭКС (TRANter); робочі температури (°С): -60...+400; Умовний тиск (МПа): 0.6; 1.0; 1.6; 2.5; 4.0 [6]

					НУХТ БТЕК 04.02.02 КР ПЗ						
Змн.	Арк	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання			Літ.	Арк..	Аркушів	
Розроб.		Ковінченко А.								64	96
Перевір.		Стабніков В.П.									
Реценз.											
Н. Контр.											
Затверд.		Стабніков В. П									
					Кафедра БТМ						

Д-8	Об'ємний дозатор для подачі води	1	Автоматичний дозатор води SERV_W21, діапазон дозування: 0,1 ... 999,9 л; відносна похибка дозування: $\pm 1,5\%$; потужність: 30 В. Виробник: «НВП SERVотехніка», Україна [9]
Р-9	Реактор-змішувач (3 л, для 6%-го р-ну NaOH)	1	3 л реактор з нержавіючої сталі; макс. температура: $+350^{\circ}\text{C}$; Швидкість перемішування: 0-1000 грт; потужність: 80-245W; Тиск: -0,1...+30 МПа; Країна: Китай, ZZKD. Габарити: $\sim 540 \times 540 \times 1260$ [19]
<i>Підготовка посівного матеріалу</i>			
Д-10	Об'ємний дозатор для подачі води	1	Автоматичний дозатор води SERV_W21, діапазон дозування: 0,1 ... 999,9 л; відносна похибка дозування: $\pm 1,5\%$; потужність: 30 В. Виробник: «НВП SERVотехніка», Україна [9]
Р-11	Реактор-змішувач (5 л, комп. «А» для інокулятора на 15 л)	1	5 л хімічний реактор із сорочкою з нержавіючої сталі, модель: LSR-5L; роб. температура: $-120 \dots +260^{\circ}\text{C}$; Швидкість перемішування: 0-460 грт; потужність: 120 W; Тиск: -0,1...+0.3 МПа. Габарити: $450 \times 480 \times 1500$ мм. Виробник: «LABOAO», Китай. [20]
Н-12	Насос перистальтичний ($\sim 6,5$ л/хв)	1	Перистальтичний шланговий насос ASP25/15IX, 385 л/год, 10 бар [11]
Д-13	Об'ємний дозатор для подачі води	1	Автоматичний дозатор води SERV_W21, діапазон дозування: 0,1 ... 999,9 л; відносна похибка дозування: $\pm 1,5\%$; потужність: 30 В. Виробник: «НВП SERVотехніка», Україна [9]
Р-14	Реактор-змішувач (3 л, комп. «Б» для інокулятора на 15 л)	1	3 л реактор з нержавіючої сталі; макс. температура: $+350^{\circ}\text{C}$; Швидкість перемішування: 0-1000 грт; потужність: 80-245W; Тиск: -0,1...+30 МПа; Країна: Китай, ZZKD. Габарити: $\sim 540 \times 540 \times 1260$ [19]
Д-15	Об'ємний дозатор для подачі води	1	Автоматичний дозатор води SERV_W21, діапазон дозування: 0,1 ... 999,9 л; відносна похибка дозування: $\pm 1,5\%$; потужність: 30 В. Виробник: «НВП SERVотехніка», Україна [9]
ІФ-16	Індивідуальний фільтр	1	Магістральний фільтр ATS FGO 170 Н (0.1 мікрон) (PRM014173). Потік повітря: 2833 л/хв; Макс. температура стиснутого повітря $+100^{\circ}\text{C}$; Виробник: «ATS», Італія. [8]

I-17	Інокулятор (15 л)	1	Біореактор з нержавіючої сталі 15 л для мікробної та клітинної культури BR500Pro-C1, оснащений мішалкою, датчиком піни, pH, барботером, сорочкою з нержавіючої сталі (водяна баня). Країна походження: Китай. Габарити: 900×1800×900 мм. [15]
Д-18	Об'ємний дозатор для подачі води	1	Автоматичний дозатор води SERV_W21, діапазон дозування: 0,1 ... 999,9 л; відносна похибка дозування: ±1,5%; потужність: 30 В. Виробник: «НВП SERVотехніка», Україна [9]
P-19	Реактор-змішувач (3 л, комп. «А» для інокулятору на 150 л)	1	3 л реактор з нержавіючої сталі; макс. температура: +350°C; Швидкість перемішування: 0-1000 грм; потужність: 80-245W; Тиск: -0,1...+30 МПа; Країна: Китай, ZZKD. Габарити: ~ 540×540×1260 [19]
Д-20	Об'ємний дозатор для подачі води	1	Автоматичний дозатор води SERV_W21, діапазон дозування: 0,1 ... 999,9 л; відносна похибка дозування: ±1,5%; потужність: 30 В. Виробник: «НВП SERVотехніка», Україна [9]
P-21	Реактор-змішувач (50 л, комп. «А» для інокулятору на 150 л)	1	50 л реактор із подвійної оболонки з нержавіючої сталі, модель: LSR-50L; роб. температура: -120...+260°C; Швидкість перемішування: 0-460 грм; потужність: 200 W; тиск: -0,1...+0,3 МПа. Виробник: «LABOAO», Китай. Габарити: 580×580×2100 мм [22]
Н-22	Насос перистальтичний (~6,5 л/хв)	1	Перистальтичний шланговий насос ASP25/15IX, 385 л/год, 10 бар [11]
Д-23	Об'ємний дозатор для подачі води	1	Автоматичний дозатор води SERV_W21, діапазон дозування: 0,1 ... 999,9 л; відносна похибка дозування: ±1,5%; потужність: 30 В. Виробник: «НВП SERVотехніка», Україна [9]
P-24	Реактор-змішувач (30 л, комп. «Б» для інокулятору на 150 л)	1	30 л реактор із подвійної оболонки з нержавіючої сталі, модель: LSR-30L; роб. температура: -120...+260°C; Швидкість перемішування: 0-460 грм; потужність: 200 W; тиск: -0,1...+0,3 МПа. Виробник: «LABOAO», Китай. Габарити: 530×530×1900 мм [21]

Д-25	Об'ємний дозатор для подачі води	1	Автоматичний дозатор води SERV_W21, діапазон дозування: 0,1 ... 999,9 л; відносна похибка дозування: $\pm 1,5\%$; потужність: 30 В. Виробник: «НВП SERVотехніка», Україна [9]
Р-26	Реактор-змішувач (3 л, комп. «В» для інокулятора на 150 л)	1	3 л реактор з нержавіючої сталі; макс. температура: $+350^{\circ}\text{C}$; Швидкість перемішування: 0-1000 грт; потужність: 80-245W; Тиск: $-0,1 \dots +30$ МПа; Країна: Китай, ZZKD. Габарити: $\sim 540 \times 540 \times 1260$ [19]
Д-27	Об'ємний дозатор для подачі води	1	Автоматичний дозатор води SERV_W21, діапазон дозування: 0,1 ... 999,9 л; відносна похибка дозування: $\pm 1,5\%$; потужність: 30 В. Виробник: «НВП SERVотехніка», Україна [9]
ІФ-28	Індивідуальний фільтр	1	Магістральний фільтр ATS FGO 170 Н (0.1 мікрон) (PRM014173). Потік повітря: 2833 л/хв; Макс. температура стиснутого повітря $+100^{\circ}\text{C}$; Виробник: «ATS», Італія. [8]
І-29	Інокулятор (150 л)	1	Біореактор з нержавіючої сталі 150 л для мікробної та клітинної культури BR500Pro-C1, оснащений мішалкою, датчиком піни, рН, барботером, сорочкою з нержавіючої сталі (водяна баня). Країна походження: Китай. Габарити: $650 \times 650 \times 1492$ мм [16]
Д-30	Ваговий дозатор	1	Ваговий дозатор ФС-125, робочий діапазон ваги від 0,15 до 50 кг, 0,5-1 кВт/год, виробник «ТехноМашСтрой», Україна. [10]
Д-31	Об'ємний дозатор для подачі води	1	Автоматичний дозатор води SERV_W21, діапазон дозування: 0,1 ... 999,9 л; відносна похибка дозування: $\pm 1,5\%$; потужність: 30 В. Виробник: «НВП SERVотехніка», Україна [9]
Р-32	Реактор-змішувач (30 л, комп. «А» для інокулятора на 1,25 м ³)	1	30 л реактор із подвійної оболонки з нержавіючої сталі, модель: LSR-30L; роб. температура: $-120 \dots +260^{\circ}\text{C}$; Швидкість перемішування: 0-460 грт; потужність: 200 W; тиск: $-0,1 \dots +0,3$ МПа. Виробник: «LABOAO», Китай. Габарити: $530 \times 530 \times 1900$ мм [21]

Д-33	Об'ємний дозатор для подачі води	1	Автоматичний дозатор води SERV_W21, діапазон дозування: 0,1 ... 999,9 л; відносна похибка дозування: $\pm 1,5\%$; потужність: 30 В. Виробник: «НВП SERVотехніка», Україна [9]
Д-34	Ваговий дозатор	1	Ваговий дозатор ФС-125, робочий діапазон ваги від 0,15 до 50 кг, 0,5-1 кВт/год, виробник «ТехноМашСтрой», Україна. [10]
Р-35	Реактор-змішувач (500 л, комп. «А» для інокулятора на 1,25 м ³)	1	500 л реактор із сорочкою з нержавіючої сталі, роб. температура: 0...+350°C; Швидкість перемішування: 0-120 грм; тиск: -1...+4 бар. Виробник: «НХСНЕМ», Китай. Габарити: ~1600×1600×2700 мм [23]
Н-36	Насос перистальтичний (~25 л/хв)	1	Peribest I35AAA0000/1.5/28 - Насос шланговий, 1500 л/год, 10 бар, 1,5 кВт, шланг NR [12]
Д-37	Об'ємний дозатор для подачі води	1	Автоматичний дозатор води SERV_W21, діапазон дозування: 0,1 ... 999,9 л; відносна похибка дозування: $\pm 1,5\%$; потужність: 30 В. Виробник: «НВП SERVотехніка», Україна [9]
Р-38	Реактор-змішувач (150 л, комп. «Б» для інокулятора на 1,25 м ³)	1	150 л промисловий вибухозахищений реактор із сорочкою з нержавіючої сталі, модель: LEXSR-150L; роб. температура: -120...+260°C; Швидкість перемішування: 0-460 грм; потужність: 750 W. Виробник: «LABOAO», Китай. Габарити: 730×730×2400 мм [25]
Н-39	Насос перистальтичний (~25 л/хв)	1	Peribest I35AAA0000/1.5/28 - Насос шланговий, 1500 л/год, 10 бар, 1,5 кВт, шланг NR [12]
Р-40	Об'ємний дозатор для подачі води	1	Автоматичний дозатор води SERV_W21, діапазон дозування: 0,1 ... 999,9 л; відносна похибка дозування: $\pm 1,5\%$; потужність: 30 В. Виробник: «НВП SERVотехніка», Україна [9]
Р-41	Реактор-змішувач (30 л, комп. «В» для інокулятора на 1,25 м ³)	1	30 л реактор із подвійної оболонки з нержавіючої сталі, модель: LSR-30L; роб. температура: -120...+260°C; Швидкість перемішування: 0-460 грм; потужність: 200 W; тиск: -0,1...+0,3 МПа. Виробник: «LABOAO», Китай. Габарити: 530×530×1900 мм [21]

Д-42	Об'ємний дозатор для подачі води	1	Автоматичний дозатор води SERV_W21, діапазон дозування: 0,1 ... 999,9 л; відносна похибка дозування: $\pm 1,5\%$; потужність: 30 В. Виробник: «НВП SERVотехніка», Україна [9]
ІФ-43	Індивідуальний фільтр	1	Магістральний фільтр ATS FGO 170 Н (0.1 мікрон) (PRM014173). Потік повітря: 2833 л/хв; Макс. температура стиснутого повітря +100 °С; Виробник: «ATS», Італія. [8]
І-44	Інокулятор (1,25 м³)	1	Система з барботажно-ерліфтним ферментером на 1,25 м³, що оснащений контролерами рН, піногансика, рівня рідини, температури та системами автоматичної корекції цих показників. Виробник: «LABOAO», Китай. Габарити: ~1060×1600 мм[19]
<i>Виробничий біосинтез</i>			
Д-45	Ваговий дозатор	1	Ваговий дозатор ФС-125, робочий діапазон ваги від 0,15 до 50 кг, 0,5-1 кВт/год, виробник «ТехноМашСтрой», Україна. [10]
Д-46	Об'ємний дозатор для подачі води	1	Автоматичний дозатор води SERV_W21, діапазон дозування: 0,1 ... 999,9 л; відносна похибка дозування: $\pm 1,5\%$; потужність: 30 В. Виробник: «НВП SERVотехніка», Україна [9]
Р-47	Реактор-змішувач (2500 л, комп. «А» для ферментеру)	1	Реактор з мішалкою 2500 л, робоча температура: -30...200 °С, швидкість перемішування: 235 rpm; Робочий тиск: 3,2 бар; Виробник: «CMR Brevetti», Нідерланди. Габарити: 1600×2170 мм [24]
Н-48	Насос перистальтичний (~400 л/хв)	1	Перистальтичний насос ELRO, IP; макс. продуктивність: 25 м³/год, тиск: 13 бар, макс. темп. +80 °С. [13]
Д-49	Ваговий дозатор	1	Ваговий дозатор ФС-125, робочий діапазон ваги від 0,15 до 50 кг, 0,5-1 кВт/год, виробник «ТехноМашСтрой», Україна. [10]
Д-50	Об'ємний дозатор для подачі води	1	Автоматичний дозатор води SERV_W21, діапазон дозування: 0,1 ... 999,9 л; відносна похибка дозування: $\pm 1,5\%$; потужність: 30 В. Виробник: «НВП SERVотехніка», Україна [9]

УБС-51	Установка безперервної стерилізації (5 м ³)	1	Потужність: 5 м ³ /год; матеріал: нержавіюча сталь, температура стерилізації: 131 °С; Виготовлена на замовлення. Складається з: Реактору-змішувачу (Р-40.1), насосу (Н-40.2), реактору УБС (Р-40.3), насосу (Н-40.4), колонки швидкісного нагріву (КШН-40.5), витримувачу (В-40.6), теплообміннику (ТО-40.7).
Н-52	Насос перистальтичний (~400 л/хв)	1	Перистальтичний насос ELRO, IP; макс. продуктивність: 25 м ³ /год, тиск: 13 бар, макс. темп. +80 °С. [13]
Д-53	Об'ємний дозатор для подачі води	1	Автоматичний дозатор води SERV_W21, діапазон дозування: 0,1 ... 999,9 л; відносна похибка дозування: ±1,5%; потужність: 30 В. Виробник: «НВП SERVотехніка», Україна [9]
ІФ-54	Індивідуальний фільтр	1	Магістральний фільтр ATS FGO 170 Н (0.1 мікрон) (PRM014173). Потік повітря: 2833 л/хв; Макс. температура стиснутого повітря +100 °С; Виробник: «ATS», Італія. [8]
ФР-55	Ферментер	1	Система з барботажно-ерліфтним ферментером на 10 м ³ , що оснащений контролерами рН, піногансика, рівня рідини, температури та системами автоматичної корекції цих показників. Виробник: «LABOAO», Китай. Габарити: ~1800×8700 мм [18]
Н-56	Насос відцентровий для перекачування культуральної рідини у збірник	1	Насос відцентровий 1.5кВт Нmax 13м Qmax 700л/хв нерж LEO 3.0 ABK200D (775535) виробник: «Leo», Китай [14]

Примітка: всі посилання надані у «Додаток З».

РОЗДІЛ 7.

ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Технологічна схема виробництва тетрацикліну, що детально описана у даному розділі, включає як допоміжні етапи, так і сам технологічний процес.

ДР1. Підготовка та очищення аераційного повітря

ДР1.1. Забір атмосферного повітря

Технічне повітря закачують через повітрозабірник (ПЗ-1), що розташований на висоті 2-3 метра від найвищої точки будівлі, так як зі збільшенням висоти концентрація КУО у повітрі знижується. На цьому етапі повітря попередньо очищується через решітку повітрозабірника від великих об'єктів, таких, як листя дерев, пір'я птахів, тощо. Це попереджує перекриття фільтруючої поверхні наступних фільтрів великими об'єктами, що суттєво знизить їх ефективність роботи.

ДР1.2. Очищення фільтром грубої очистки

Повітря проходить через фільтри G1-G4 (Ф-2) з поліефірних волокон, які відсіюють частки діаметром більше 5 мікрон, такі як пил та великі часточки бруду.

ДР1.3. Стиснення повітря за допомогою турбокомпресора

Очищене від великих частинок бруду повітря стискають до 0,35-0,5 МПа за допомогою потужного компресора (ТК-3). При цьому, через стиснення, вологовміст та температура повітря підвищується до 120-250 °С.

ДР1.4 Стабілізація термодинамічних показників повітря

Після проходження всіх попередніх стадій потік повітря має турбулентний характер, за допомогою ресивера (Р-4) знижують його пульсацію до отримання ламинарного потоку.

ДР1.5. Осушення та охолодження повітря теплообмінним апаратом

Отримане атмосферне повітря містить багато зайвої вологи, яка буде осаджу

					НУХТ БТЕК 04.02.02 КР ПЗ			
Змн.	Арк	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми			
Розроб.		Ковінченко А.						
Перевір.		Стабніков В.П.						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В. П						
					Літ.	Арк..	Аркушів	
							71	96
					Кафедра БТМ			

ватися на наступних фільтрах провокуючи на них розвиток м/о та знизить якість фільтрації склеюючи волокна фільтра. Для цього повітря осушують у теплообміннику рефрижераторного типу (Т-5) шляхом охолодження до 25-30 °С, це знижує вологості повітря, що провокує утворення конденсату і знижує загальну вологість потоку до 40-50%.

ДР1.6. Очищення фільтрами тонкої очистки

Для очищення повітря від часток діаметром більше 0,5 мікрон використовують головний фільтр (Ф-6) F5-F9 з поліпропіленових волокон. Для подальшої очистки на фільтрі надтонкого очищення і подачі у ферментер повітря нагрівають за допомогою кожухотрубного теплообмінника (Т-7) до $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ та звожують до 80-90%.

ДР1.7. Очищення індивідуальним фільтрами

Для очищення повітря від часток діаметром більше 0,1 мікрон використовують індивідуальний фільтр РТФЕ фільтр який відповідає за рівнем фільтрації фільтрам F9-U15, що встановлені безпосередньо перед самими біореакторами.

ДР2. Приготування та стерилізація розчинів титрувальних агентів та піногасника

ДР2.1. Приготування та стерилізація розчину NaOH

На лабораторних вагах зважують 93,7 г сухої наважки NaOH та у реакторі (Р-9) на 3 л розводять 1312,3 мл питної води, отримуючи 1406 мл 6% розчину, стерилізують при 131 °С та 0,15 МПа 30 хв.

(Розрахунок: $(1406 \text{ мл} \cdot 6) / 90 \approx 93,7 \text{ г}$; $1406 - 93,7 = 1312,3 \text{ мл}$)

ДР2.2. Приготування розчину HCl

За допомогою мірного циліндра поступово відміряють 60 мл концентрованого розчину соляної кислоти (37%) і у колбі на 2 л розводять 270 мл питної води, отримуючи 330 мл 10% р-ну. Стерилізації розчин соляної кислоти не потребує.

(Розрахунок: $(100 \cdot 93,7) / 37 \approx 253 \text{ мл}$; $(330 \cdot 253) / 1406 \approx 60 \text{ мл}$; $330 - 60 = 270 \text{ мл}$)

ДР3. Приготування і стерилізація поживних середовищ

ДР3.1. Приготування і стерилізація поживного середовища для колб на качалці.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів та композицій для приготування середовища для колб на качалках проведено у розділі 5, таблиці 5.6.

ДР3.1.1 Заварювання соєвого борошна та кукурудзяного крохмалю

На лабораторних вагах зважують 16,6 г соєвого борошна, 33,2 г кукурудзяного крохмалю, і вмішують у колбу на 2 л, суспендують у 330 мл холодної питної води і поступово нагрівають на водяній бані до 70-90 С° витримавши при даній температурі 30 хв. Заварені компоненти подають до стадії ДР 2.1.2.

ДР3.1.2 Приготування і стерилізація композиції А.

На лабораторних вагах зважують 4,2 г дріжджового екстракту та 11,6 г пептону, вмішують у колбу об'ємом 500 мл і додають 200 мл питної води, перемішують та закривають пробкою. Розчин додають до заварених компонентів. Стерилізують у автоклаві при 112 С° 30 хв. Стерильну композицію подають до ТП-4.5.

ДР3.1.3 Приготування і стерилізація композиції Б.

На лабораторних вагах зважують 0,2 г K_2HPO_4 вмішують у колбу об'ємом 250 мл, додають 50 мл питної води, перемішують та закривають. Стерилізують у автоклаві при 131 С° 40 хв. Стерильну композицію подають до ТП-4.5.

ДР3.1.4 Приготування і стерилізація композиції В.

На лабораторних вагах зважують 0,2 г MgSO_4 та 2,5 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ вмішують у колбу об'ємом 500 мл, додають 100 мл питної води, перемішують та закривають пробкою. Стерилізують у автоклаві при 131 С° 40 хв. Стерильну композицію подають до ТП-4.5.

ДР3.1.5 Приготування і стерилізація композиції Г.

На лабораторних вагах зважують 3 г крейди, вмішують у колбу об'ємом 500 мл, додають 150 мл питної води, перемішують та закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують у автоклаві при 131 С° 40 хв. Стерильну композицію подають до ТП-4.5.

ДР3.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для інокулятору 15 л.

Використовуються дані з таблиці 5.7 розділу 5. Після стерилізації всіх композицій поживне середовище об'єднують у І-17: Б додають через засівну колбу, композицію В подають до І-17 самоплином, композицію А подають пересатльтичним насосом (Н-12).

Після завершення культивування культуральну рідину з І-17 (ТП 4.6) перекачують трубою перетискання до стадії ТП 4.7 у І-29.

ДР3.2.1. Заварювання соєвого борошна та кукурудзяного крохмалю

На лабораторних вагах зважують 150 г соєвого борошна та 300 г кукурудзяного крохмалю, вмішують у реактор на 5 л (Р-11), суспендують у 3 л холодної питної води яку подають через дозатор (Д-10) і поступово нагрівають до 70-90 С° подаючи у сорочку апарату глуху пару. Витримують при даній температурі 30 хв. Заварені компоненти залишають у Р-11 до стадії ДР 3.2.1.2.

ДР3.2.2 Приготування і стерилізація композиції А.

На лабораторних вагах зважують 37,5 г дріжджового екстракту та 105 г пептону, вмішують у колбу об'ємом 2 л і додають 1 л питної води, перемішують та подають до заварених компонентів у Р-11. Стерилізують при 112 С° та тиску 0,05 МПа 30 хв. Стерильну композицію перистальтичним насосом (Н-12) подають до І-17 на стадію ТП-4.6.

ДР3.2.3 Приготування і стерилізація композиції Б.

На лабораторних вагах зважують 1,9 г KH_2PO_4 , 1,9 г MgSO_4 , 22,5 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ вмішують у реактор-змішувач (Р-14) об'ємом 3 л, додають 2 л питної води через об'ємний дозатор Д-13, вмикають перемішуючий пристрій до повного розчинення компонентів і доводять хлоридною кислотою рН до 4,5 (від ДР2.2) для попередження випадіння осаду солей при стерилізації. Стерилізують при 131 С° та тиску 0,15 МПа 40 хв. Стерильну композицію самоплином подають до І-17 на стадію ТП-4.6.

ДР3.2.4 Приготування і стерилізація композиції В.

На лабораторних вагах зважують 30 г CaCO_3 та вміщують у колбу об'ємом 2 л. Додають 900 мл питної води, перемішують до утворення рівномірної суспензії та закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують у автоклаві при 131 С° 40 хв. Стерильну композицію подають до І-17 на стадію ТП-4.6.

ДР3.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для інокулятора 150 л.

Використовуються дані з таблиці 5.8 розділу 5. Композицію В подаємо по стерильним комунікаціям до інокулятора (І-29), композицію А перекачуємо насосом (Н-22), композицію Б подаємо самоплином до І-29.

Після завершення культивування культуральну рідину з І-29 (ТП 3.7) перекачують за допомогою труби перетискання до стадії ТП 4.8 у І-44.

ДР3.3.1 Заварювання соєвого борошна та кукурудзяного крохмалю

На технічних терезах зважують 1,36 кг соєвого борошна та 2,72 кг кукурудзяного крохмалю, вмішують у реактор-змішувач (Р-21) на 50 л, суспендують у 33,5 л холодної питної води яку подають через об'ємний дозатор (Д-20), і поступово нагрівають до 70-90 С° подаючи у сорочку апарату глуху пару. Витримують при даній температурі 30 хв. Заварені компоненти залишають у Р-21 та переходять до стадії ДР 3.3.2.

ДР3.3.2 Приготування і стерилізація композиції А.

На технічних терезах зважують 340 г дріжджового екстракту та 952 г пептону, вміщують у реактор-змішувач (Р-19) об'ємом 3 л додають 1,5 л питної води (Д-18), перемішують та подають до заварених компонентів. Стерилізують при 112 С° 30 хв. Стерильну композицію подають насосом (Н-22) до І-29 на стадію ТП-4.7.

ДР3.3.3 Приготування і стерилізація композиції Б.

На технічних терезах зважують 17 г KH_2PO_4 , 17 г MgSO_4 та 204 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ вміщують у реактор-змішувач (Р-24) об'ємом 30 л, додають 2 л питної води (Д-23), вмикають перемішуючий пристрій до повного розчинення компонентів і доводять

хлоридною кислотою рН до 4,5 (від ДР2.2) для попередження випадіння осаду солей при стерилізації. Стерилізують при 131 С° та тиску 0,15 МПа 40 хв. Стерильну композицію самоплином подають до І-29 на стадію ТП-4.6.

ДР3.3.4 Приготування і стерилізація композиції В.

На технічних терезах зважують 272 г CaCO₃, вміщують у реактор (Р-26) об'ємом 3 л, через дозатор (Д-25) додають 2 л питної води і вмикають перемішувачий пристрій до утворення суспензії. Стерилізують при 131 С° та 0,15 МПа 40 хв.

ДР3.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для інокулятору 1,25 м³.

Використовуються дані з таблиці 5.9 розділу 5. Після стерилізації всіх композицій поживне середовище об'єднують у І-44: композицію А перекачують у І-44 за допомогою насоса (Н-36), композицію В подаємо по стерильним комунікаціям самоплином, композицію Б перекачуємо насосом (Н-39).

Після завершення культивування культуральну рідину з І-44 (ТП 4.8) перекачують за допомогою труби перетискання до стадії ТП 5 у ФР-55.

ДР3.4.1 Заварювання соєвого борошна та кукурудзяного крохмалю

За допомогою вагового дозатору (Д-34) зважують 12,4 г соєвого борошна та 24,8 кг кукурудзяного крохмалю, вміщують у реактор-змішувач (Р-35) на 500 л, суспендують у 405 л холодної питної води яку подають через об'ємний дозатор (Д-33), і поступово нагрівають до 70-90 С° подаючи у сорочку апарату глуху пару. Витримують при даній температурі 30 хв. Заварені компоненти залишають у Р-35 і переходять до стадії ДР 3.2.3.2.

ДР3.4.2 Приготування і стерилізація композиції А.

За допомогою вагового дозатору (Д-30) зважують 3,1 кг дріжджового екстракту та 8,7 кг пептону, вміщують у реактор (Р-32) об'ємом 30 л додають 15 л питної води (Д-31) і вмикають перемішувачий пристрій. Після повного перемішування компонентів концентрат самоплином подають у реактор на 500 л (Р-35) до заварених компонентів. Вмикають перемішувачий пристрій до повного перемішування. Стери-

лізують при 112 С° та тиску 0,05 МПа 30 хв. Стерильну композицію подають насосом (Н-36) до І-44 на стадію ТП-4.8.

ДР3.4.3 Приготування і стерилізація композиції Б.

На технічних терезах зважують 160 г KH_2PO_4 , 160 г MgSO_4 та 1,9 кг $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, вміщують у реактор-змішувач (Р-38) об'ємом 150 л, додають 123,5 л питної води яку подають через дозатор (Д-37), вмикають перемішуючий пристрій до повного розчинення компонентів і доводять хлоридною кислотою рН до 4,5 (від ДР2.2) для попередження випадіння осаду солей при стерилізації. Стерилізують при 131 С° та тиску 0,15 МПа 40 хв. Стерильну композицію насосом (Н-39) подають до І-44 на стадію ТП-4.8.

ДР3.4.4 Приготування і стерилізація композиції В.

На технічних терезах зважують 2,5 кг CaCO_3 , вміщують у реактор-змішувач (Р-41) об'ємом 30 л, додають 20 л питної води (Д-40), і вмикають перемішуючий пристрій. Стерилізують при 131 С° та тиску 0,15 МПа 40 хв, а потім подають самоплином до інокулятора (І-44).

ДР3.5. Приготування і стерилізація поживного середовища для ферментеру

Виробничий біосинтез здійснюється на середовищі іншого складу, композиції для якого були розраховані у розділі 5 підрозділі 2.2.3 і узагальнені у таблиці 5.10. Після стерилізації поживне середовище з УБС-5 (УБС-51) за допомогою насосу (Н-52) подають у ФР-55.

ДР3.5.1 Заварювання соєвого борошна та кукурудзяного крохмалю

За допомогою вагового дозатору (Д-45) зважують 223,2 кг соєвого борошна та 446,4 кг кукурудзяного крохмалю, вміщують у реактор-змішувач на 2500 л (Р-47) і суспендують у 1800 л холодної питної води, що подають через об'ємний дозатор (Д-46) і поступово нагрівають до 70-90 С° подаючи у сорочку апарату глуху пару. Витримують при даній температурі 30 хв. Заварені компоненти перекачують до УБС-5 за допомогою насосу (Н-48).

ДР3.5.2 Приготування і стерилізація поживного середовища.

За допомогою вагового дозатору (Д-49) зважують 5,6 кг дріжджового екстракту, 44,6 кг кукурудзяного молока, 78,1 кг пептону, 39 кг крейди, 1,4 кг $MgSO_4$ та 19,5 кг $(NH_4)_2SO_4$, вміщують у реактор УБС-5 (УБС-51) додають 3 273 л питної води (Д-50), за допомогою насосу (Н-48) у реактор УБС подають заварені компоненти з Р-47. Вмикають перемішувач до повного перемішування компонентів. Стерилізують при 131 °С 5 хв та витримують. Після, стерилізовану композицію за допомогою насосу (Н-52) подають до ферментеру (ФР-55) на стадію ТП-5.

ТП4. Підготовка посівного матеріалу

ТП4.1. Підтримка колекційної культури

Культуру *Streptomyces aureofaciens* ZT04 зберігають на скошеному агарі з середовищем YM (Yeast medium) при температурі 2-4 °С та пересівають чашки кожні 3-4 місяці, перевіряючи наявність плазмід антибіотиками-маркерами.

ТП4.2. Селекція активних рекомбінант

Музейну культуру методом виснаженого штриха висівають на агаризоване поживне середовище YM з 50 мкг/мл апраміцину як антибіотику-маркеру для виявлення клітин з активною плазмідною (*Streptomyces aureofaciens* ZT04 ΔctcP).

ТП4.3. Одержання робочої культури

Виявлені активні рекомбінанти засівають методом виснажливого штриха на чашку Петрі з середовищем YM. Інкують 30 ± 0,5 °С, 48 години.

ТП4.4. Вирощування на агаризованих поживних середовищах

Стерильною мікробіологічною голкою отримані колонії пересівають на пробірки зі скошеним агаризованим середовищем (YM). Інкують у термостаті при 30 ± 0,5 °С, 24 години.

ТП4.5. Вирощування інокуляту у колбах на качалці

Простерилізовані композиції А,Б та В (від ДРЗ.1.2-4) у стерильних умовах об'єднують у колбі на 2 л і розливають поживне середовище по рівну у 6 колб (по 138 мл) засівають (~8 мл) змиву з чашок Петрі. Інкують на качалці при 30± 0,5 °С 24 годин.

ТП4.6. Вирощування інокуляту у інокуляторі об'ємом 15 л.

У простерилізований посівний апарат об'ємом 15 л (І-17) за допомогою перистальтичного насосу (Н-12) подають композицію А, композицію Б подають самоплином з Р-14, композицію В вносять до І-17 через засівну колбу. Поживне середовище має у інокуляторі кисле через композицію Б (солі), яку підкислювали для випадіння осаду. Хлоридну кислоту нейтралізують стерильним 6%-вим розчином NaOH (від ДР 2.1).

Через засівну колбу вносять інокулят у кількості 830 мл і культивують 24 годин при $30 \pm 0,5$ С°.

Після завершення культивування інокулят з І-17 за допомогою труби перетискання подають у І-29 з підготованим у ньому поживним середовищем.

ТП4.7 Вирощування інокуляту у інокуляторі об'ємом 150 л.

У простерилізований посівний апарат об'ємом 150 л (І-29) по герметичним комунікаціям за допомогою перистальтичного насосу (Н-22) вносять стерильну композицію А. Композицію Б та В з реактору Р-24 та Р-26 відповідно вносять самоплином.

Трубою перетискання з І-17 до І-29 вносять 7,5 л інокуляту і культивують 24 годин при $30 \pm 0,5$ С°.

Після завершення культивування інокулят з І-29 за допомогою труби перетискання подають у І-44 з підготованим у ньому поживним середовищем.

ТП4.8 Вирощування інокуляту у інокуляторі об'ємом 1,25 м³.

У простерилізований посівний апарат об'ємом 1,25 м³ (І-44) по герметичним комунікаціям перестальтичним насосом (Н-36) вносять стерильну композицію А. Композицію Б з реактору (Р-38) перекачують насосом (Н-39), композицію В подають самоплином.

Трубою перетискання з І-29 до І-44 вносять 68 л інокуляту і культивують 24 годин при $30 \pm 0,5$ С°.

Після завершення культивування інокулят з І-44 за допомогою труби перети-

скання подають у ФР-55 з підготованим у ньому поживним середовищем.

ТП5. Виробничий біосинтез

У простерилізований ферментер (Ф-44) об'ємом 10 м³ по герметичним комунікаціям за допомогою насоса (Н-41) вносять стерильне поживне середовище з УБС-5 (УБС-40).

Через трубу перетискання вносять 620 л інокуляту від І-44 і культивують 96 годин при $30 \pm 0,5$ С°, аерації 1,5/1 об'єм повітря на об'єм поживного середовища. З ферментеру відбирають проби раз у 12 годин.

Після внесення всіх частин поживного середовища для синтезу антибіотику культивування продовжують концентрації цільового продукту у 18,9 г/л, що має відбутися приблизно на 96-ту годину культивування. Культуральну рідину перекачують у збірник за допомогою насоса (Н-56).

РОЗДІЛ 8.

ОСНОВНІ ЕТАПИ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Тетрациклін є екзометаболітом, який виділяють шляхом осадження культуральної рідини. В цілому, технологія виробництва тетрацикліну передбачає звичні для антибіотиків стадії, такі, як попередня обробка культуральної рідини, концентрування антибіотиків (багаторазове розчинення кислотою, осадження лугами та фільтрування отриманого осаду), отримання технічних продуктів і отримання товарних продуктів. [13]

У процесі виділення для контролю рН використовують: концентрований розчин сірчаної кислоти, концентровану сірчану кислоту, а також розчин NaOH який необхідно завчасно приготувати. Концентровані кислоти не потребують розведення (93-98% для сірчаної та 37% для соляної), а розчин NaOH готують розводячи суху наважку питною водою до концентрації у 6%. [43]

Необхідність підкислення культуральної рідини пов'язана зі специфікою тетрацикліну, а саме схильності антибіотику до утворення нерозчинних продуктів з наявними у культуральній рідині речовинами: солі кальцію та магнію, білки, тощо. Хоча антибіотики, і тетрациклін також, є екзоклітинними метаболітами, утворені нерозчинні комплекси накопичуються у міцелії продуценту. Висловлюючись не науково, «застрягають» у ньому. Тому концентрація антибіотику у культуральній рідині безпосередньо після завершення виробничого біосинтезу є порівняно низькою. [13]

Але, при значеннях рН 1,5-2,5 тетрациклін вивільнюється з цих комплексів у культуральну рідину, що дозволяє осадити значно більшу кількість антибіотику за одну ферментацію. Також, при первинному обробленні культуральної рідини осаджується велика частина домішок – іони заліза та кальцію, коагулюють білки. Це дозволяє забезпечити повне відділення міцелію при наступному фільтруванні для подальшого очищення антибіотику з культуральної рідини. [13,43]

Блок-схема процесу виділення тетрацикліну зазначена за рисунку 3.1:

					НУХТ БТЕК 04.02.02 КР ПЗ								
Змн.	Арк	№ докум.	Підпис	Дата									
Розроб.		Ковінченко А.			РОЗДІЛ 8. Основні етапи виділення та очищення цільового продукту				Літ.	Арк..	Аркушів		
Перевір.		Стабніков В.П.									81	96	
Реценз.									Кафедра БТМ				
Н. Контр.													
Затверд.		Стабніков В. П											

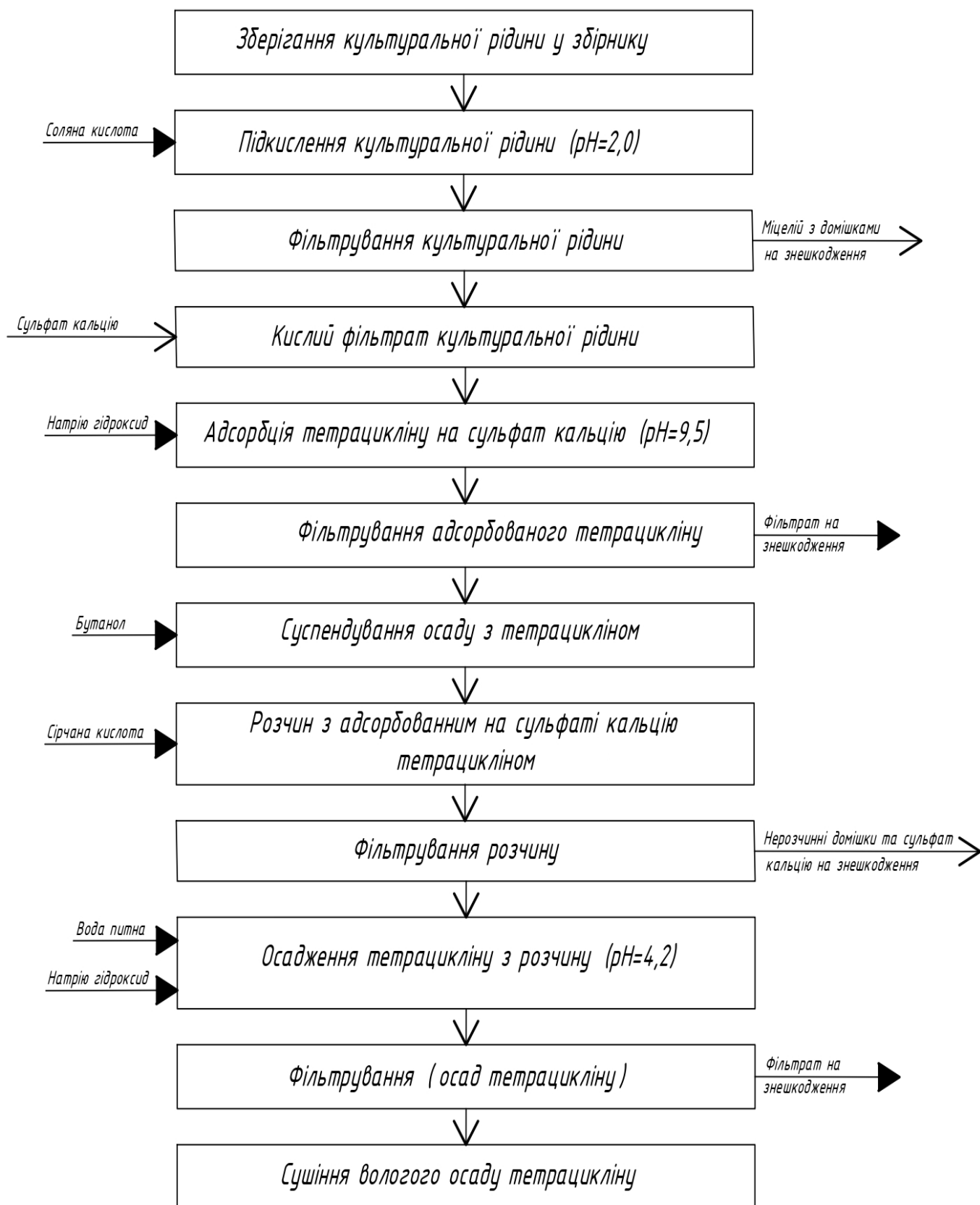


Рис. 8.1. Схема післяферментаційних етапів отримання антибіотику тетрацикліну, отриманого шляхом ферментації *Streptomyces aureofaciens* ZT04 [43]

Опис процесу виділення:

- 1. Зберігання культуральної рідини у збірнику.** Після завершення виробничого біосинтезу, отриману культуральну рідину за допомогою відцентрового насосу перекачують у збірник і зберігають до стадії виділення продукту.
- 2. Підкислення культуральної рідини (рН=2,0).** Щоб вивільнити тетрациклін з нерозчинних комплексів культуральну рідину підкислюють соляною кислотою до значення рН 2. [43]
- 3. Фільтрування культуральної рідини.** Отриманий кислий розчин перемішують протягом 15 хв, а потім відфільтровують міцелій та частину домішок, так як при зниженому рН антибіотик вивільняється з комплексів у розчин. [43]
- 4. Кислий фільтрат культуральної рідини.** До отриманого кислого фільтрату додають дрібнодисперсний сульфат кальцію (CaSO_4) у співвідношенні 1:100. Тобто, 10 г CaSO_4 на 1 л початкової культуральної рідини (не фільтрат). [43]
- 5. Адсорбція тетрацикліну на сульфат кальцію (рН=9,5).** Як було вище згадано, тетрациклін схильний до утворення комплексів із сполуками, наявними у культуральній рідині. У даному випадку, при підвищенні рН до 9,5 за допомогою розчину NaOH , тетрациклін утворює такі комплекси з сульфатом кальцію. Розчин перемішують 30 хв, що б забезпечити повну адсорбцію тетрацикліну на сульфаті кальцію. [13,43]
- 6. Фільтрування адсорбованого тетрацикліну.** Отриманий осад відфільтровують, відпрацьований фільтрат відводять на знешкодження. На даному етапі тетрациклін зв'язаний з сульфатом кальцію, і фільтрат містить залишки антибіотику з активністю 50 од./мл у низьких кількостях, що не представляють комерційного інтересу. [43]
- 7. Суспендування осаду з тетрацикліном.** Отриманий осад сульфату кальцію суспендують у бутанолі у співвідношенні 1:10. Тобто, 100 мл бутанолу на 1 л початкової культуральної рідини. [43]

- 8. Розчин з адсорбованим на сульфаті кальцію тетрацикліном** обробляють концентрованою сірчаною кислотою до значення рН 2. Для повного переходу вивільнення тетрацикліну у розчин суміш перемішують протягом 30 хв. [43]
- 9. Фільтрування розчину.** Отриманий кислотний розчин фільтрують. Осад нерозчинних сполук та сульфат кальцію відводять на знешкодження, цей відпрацьований осад зберігає 2% від початкової активності і не становить комерційного інтересу. [43]
- 10. Осадження тетрацикліну з розчину (рН=4,2).** До фільтрату додають питну воду у співвідношенні 20 мл води на 1 л початкової культуральної рідини та за допомогою розчину NaOH підвищують рН до 4,2. Розчин перемішують 2-3 години до повного випадіння в осад тетрацикліну. [43]
- 11. Фільтрування (осад тетрацикліну).** Отриманий осад відфільтровують, фільтрат відводять на знешкодження. [43]
- 12. Сушіння вологого осаду тетрацикліну.** Сушіння отриманого вологого осаду тетрацикліну здійснюють у вакуумній сушарці при 60°C протягом 8 годин. [9,13,43]

Перелік та опис апаратури, яка використовується для виділення:

Для фільтрування осаду я пропоную використовувати автоматичний фільтр-прес, та самоочисний свічковий фільтр VZTF для відділення міцелію. Для сушіння осаду я пропоную використовувати вакуумну сушарку з подвійним конусом.

- Автоматичний фільтр-прес має можливість відразу промити осад водою, працює під тиском від 0,6 МПа до 1,6 МПа та температурою 45-100 °С, призначений для хімічної та фармацевтичної промисловості. [44]
- Вакуумна сушарка з подвійним конусом та обсягом завантаження 175 л речовини. Дозволяє висушити антибіотик при невисоких температурах до дуже низького вмісту води ($\leq 0,5\%$). [45]
- Самоочисний свічковий фільтр VZTF має рівень фільтрації 1-1000 мкм та площу фільтрації 1-200м². Фільтр створений для в'язких речовин і здатен до роботи під високим тиском. [46]

РОЗДІЛ 9.

КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА ТЕТРАЦИКЛІНУ

Для коректного протікання біотехнологічного процесу потрібно відслідковувати такі показники як концентрація джерел вуглецю та азоту концентрація біомаси, цільового продукту і відсутність контамінації, так як передбачуваний та відтворюваний біотехнологічний процес – основа для досягнення запланованого результату. Проба відбирається раз у 8-12 годин, частина проби використовується для аналізу хімічних показників, інша – для мікробіологічного аналізу.

9.1. Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль стерильності поживних середовищ

Щоб перевірити стерильність поживного середовища відібраний зразок висівають методом виснаженого штриха, на агаризовані поживні середовища: МПА для виявлення бактерій та СА для виявлення грибів і дріжджів. Якщо через 24-48 години не виявлено росту будь-яких мікроорганізмів, поживне середовище стерильне.

Як більш швидкий метод можна використовувати мікроскопіювання на імерсійному мікроскопі: краплю культуральної рідини (0,1 мл) наносять на предметне скло та висушують без нагрівання, на сухий препарат наносять декілька крапель імерсійного масла та проводять аналіз. Після роботи, ватою змоченою у спирті, змивають з об'єктиву мікроскопу залишки масла

Мікробіологічний контроль посівного матеріалу

Мікробний контроль посівного матеріалу зазвичай здійснюють прямим висівом на поживні агаризовані середовища [39,20], МПА для виявлення бактерій, СА для грибів та дріжджів. *S. aureofaciens* на твердих поживних середовищах, таких, як агар Беннетта або середовище УМ, має утворювати дрібні округлі блідо-жовті матові колонії з рихлою бугристою поверхнею, опуклим контуром та ворсинчастим краєм колонії: краплю зразку, очищеному від зависі шляхом фільтрування (так як по-

					НУХТ БТЕК 04.02.02 КР ПЗ			
Змн.	Арк	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 9. Контроль виробництва тетрацикліну			
Розроб.		Ковінченко А.						
Перевір.		Стабніков						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.			Кафедра БТМ			
					Літ.	Арк..	Аркушів	
							85	96

живні середовища містять крохмаль і борошно, що може ускладнити аналіз) у об'ємі 0,1 мл наносять на очищене предметне скло та висушують без нагрівання, на сухий препарат наносять краплю імерсійного масла та проводять аналіз. Після роботи, ваткою зі спиртом, очищують об'єкти мікроскопу від залишків масла.

Але висів на селективне середовище з подальшим аналізом утворених колоній є досить довгим, так як мікроорганізм потрібен час для росту. Як більш швидкий метод можна використовувати мікроскопіювання, так як *S. aureofaciens* на рідких поживних середовищах (що використовуються у даній роботі для біосинтезу тетрацикліну) утворюють характерні енторморфні комплекси через сегментацію міцелію і утворення великої кількості бічних ниткоподібних придатків зі спор [18].

9.2. Показники росту і синтезу цільового продукту

Для аналізу пропоную використовувати ваговий метод для контролю біомаси та ВЕРХ для контролю концентрації тетрацикліну.

9.2.1. Концентрація біомаси

Через те, що актинобактерії *S. aureofaciens* утворюють розгалужений міцелій, для визначення концентрації біомаси можливо використати досить простий гравіметричний метод. Відбирають пробу з ферментеру у об'ємі 50 мл і фільтрують через сухий попередньо зважений паперовий фільтр. Фільтрат зливають, а осад на фільтрі промивають дистильованою водою. Після, отриману відмиту біомасу на фільтрі висушують до постійної маси у сушильній шафі при 105 °С упродовж 24 годин. Висушений фільтр помістити в ексікатор, охолодити до кімнатної температури та зважити використовуючи аналітичні терези. Різниця між вагою фільтру з біомасою при двох послідовних зважуваннях має бути не більше ніж декілька одиниць у четвертому знаку після коми. [47, 48]

На основі отриманих даних розраховують загальну кількість біомаси на перерахунку на 1 л культуральної рідини за формулою:

$$X = \frac{(A-B) \cdot 1000}{V},$$

Де: X – кількість сухої біомаси в г/л; A – маса фільтрату з осадом в г; B – маса фільтру без осаду в г; V – об'єм проби культуральної рідини, мл. [48]

9.2.2. Концентрація цільового продукту

Кількість цільового продукту (тетрацикліну) вимірювали за допомогою ВЕРХ, системі Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS з мас-спектрометричним детектором.

Після відбирання проби її підкислювали щавлевою кислотою до pH 15-2, відділяли біомасу центрифугуванням та вже з отриманого супернатанту визначали антибіотик. Усі зразки аналізували на колонці Agilent TC-C18 (5 мкм, 4,6 мм x 250 мм²). Мас-спектрометр працював зі швидкістю потоку сушильного газу 5,0 л/хв при 300 °C, під тиском розпилювача 35 фунтів на квадратний дюйм і в режимі позитивних іонів. Розділення було досягнуто при постійній швидкості потоку 1,0 мл/хв з 80% буфером А (містить 20 мМ щавлевої кислоти та 20 мМ триетиламіну, pH 2,0) і 20% буфером В (містить автентичний ацетонітрил). Тетрациклін контролювали при 360 нм і кількісно визначали на основі площі піків в порівнянні до стандартних кривих за допомогою програмного забезпечення Mass Hunter. [7]

9.2.3. Концентрація джерел вуглецю і азоту

Визначення концентрації амінного азоту

Основним видом азоту є аміний азот, який міститься у кукурудзяному молоці, пептоні та у соєвому борошні. Для його визначення я пропоную стандартний метод К'ельдаля. Азот визначають з культуральної рідини, попередньо відфільтрувавши міцелій продуценту, так як він містить частину спожитого азоту. [49]

Аналіз здійснюють за такою методикою:

1. Розкладання сполук азоту сірчаною кислотою (H_2SO_4) для вивільнення газоподібного азоту;
 - 1.1 Для пришвидшення і покращення результату використовують каталізатори, такі як селен (Se), сульфат міді (CuSO_4) або сульфат руті (HgSO_2) у кількості 30-50 мг на 1 мл концентрованої сірчаної кислоти;
 - 1.2 Також до сірчаної кислоти зазвичай додають солі. Зазвичай це фосфат калію, сульфат калію або натрію. Додавання солей підвищує температуру кипіння сірчаної кислоти та дозволяє краще контролювати про-

цес. Співвідношення 1,2 г K_2SO_4 на 1,5 мл H_2SO_4 забезпечить температуру $370^\circ C$ без зразку;

1.3 Температура, при якій проводиться розкладання, має становити 360-410 $^\circ C$, але бажаною температурою є $\sim 390^\circ C$.

1.4 Час, необхідний для розкладання сполук, становить приблизно 30 хв – 1 година при $390^\circ C$ і вищезгаданому співвідношенні сполук 1,2 г K_2SO_4 на 1,5 мл H_2SO_4 .

2. Оцінка виділеного аміаку з подальшим титруванням (якщо у якості каталізатора використовували ртуть, потрібно спочатку розкласти ртутно-амонієві комплекси). Для титрування використовують тіосульфат натрію.

2.1 Найпопулярнішою процедурою є дистиляція з водяною парою. Процедура дистиляції Ma and Zuazagas з використанням повністю скляного дистиляційного апарату Markham дає дуже задовільні результати для кількостей від 0,3 до 2 мг N. Для уловлювання дистильованого аміаку його збирають в стандартній кислоті (борна або сірчана кислота) та визначають кількість отриманого NH_3 шляхом зворотного титрування стандартним лугом (тіосульфатом натрію). Це двоступеневий індикатор, який попереджає про наближення кінцевої точки, змінюючи колір із зеленого на синій, а в кінцевій точці — із синього на жовтий. Розрахунок проводять перерахунком на тіосульфат натрію за відповідною формулою. [49]

Визначення концентрації джерела вуглецю – крохмалю

Для визначення концентрації джерела вуглецю, яким для обох середовищ є крохмаль, пропоную використати метод гідролізу крохмалю ферментами та наступного вимірювання глюкози у розчині при довжині хвилі 510 нм на спектрофотометрі та розрахунку за формулою. [50]

Аналіз здійснюють за такою методикою:

1) *Підготовка зразку*: зразок культуральної рідини центрифугують для очищення від біомаси, так як міцелій, що утворюють актиноміцети, завадить пода-

льшим діям. Для аналізу використовують супернатанат.

1 частину зразку розбавляють 3-ма частинами води (5 мл зразку на 15 мл води) і ретельно перемішують 30 секунд.

2) *Хіміко-механічна солюбілізація загального крохмалю*: 0,2 г отриманого розчину поміщають у центрифужну пробірку об'ємом 50 мл із конічним дном та кришкою. До пробірки додали восьмикутний магніт (мішалка, 7,9:12,7 мм) та 0,2 мл 50% р-ну гліцерину (для зменшення злипання зразку). Пробірку помістили на мішалку і перемішували зі швидкістю 150 об/хв, додавши 5 мл 0,5 М р-ну NaOH 15 хв. Наприкінці перемішування до пробірки додали 29,8 мл 0,1 М натрій-оцтового буфера кислотністю 4,75. Після завершення перемішування для нейтралізації натрій гідроксиду додали 5 мл 0,5 М HCl. Суміш загальним об'ємом 40 мл у пробірці знову ретельно перемішати на високих обертах 10 с. Всі дії виконують при кімнатній температурі.

3) *Ферментний гідроліз солюбілізованого крохмалю до D-глюкози*: після завершення обробки до пробірки, що містить по 40 мл нейтральної та забуференої суспензії зразку, відразу після завершення перемішування на високих обертах протягом 10 с, відібрали по 2 мл суспензії зразку та перенесли у скляну пробірку на 15 мл. Отримали 2 зразки – один пустий та один дослідний. До дослідного зразку додали 10 мкл основного розчину ферменту (AGS, 33 од), до пустого зразку додали по 10 мкл води. Зразки інкубували при 37 °C у водяній бані 45 хв і перемішували кожні 15 хв протягом 5 с. Після інкубації кожну пробірку розбавили до об'єму у 10 мл 0,05 М фосфатним буфером pH 7,4 і обережно перемішали протягом 10 с.

4) *Вимірювання D-глюкози*: вміст глюкози визначали за допомогою процедури аналізу «Megazyme GOPOD»: хромогенний реагент готували шляхом розведення 50 мл конц. буфера для реагентів (1 М фосфату калію, pH 7,4, 0,22 М п-гідроксибензойної кислоти та 0,4% мас./об. азиду натрію) до 1000 мл деіонізованої води та розчиненням вмісту одного флакона реагенту GOPOD (також відомого як реагент для визначення глюкози) у цьому розведеному буфері (0,05 М фосфатний буфер, pH 7,4). З дослідного зразка або пробірки з пустим зразком, приготовлених

на попередньому етапі, відбирали 0,4 мл і переносили в кювету на 4 мл (12,5 x 12,5 x 45 мм). Потім до кожної кювети додавали 1 мл реагенту GOPOD. Холостий реагент складався з 0,4 мл 0,05 М фосфатного буфера (рН 7,4) і 1 мл реагенту GOPOD. Кювети з доданими реагентами перемішували та інкубували при 37°C протягом 30 хвилин у закритій водяній бані. Після кольорової реакції спектрофотометром (Genesys 6, Thermo Electron Corp. Waltham, MA) зчитували абсорбцію при 510 нм для дослідного зразка та пустого зразка проти холостого реагенту.

5) *Підрахунок результатів*: кількість загального крохмалю визначають за формулою:

$$C_k(\%) = (A_{510} - A_{510B}) \times F \times \frac{FV}{SV} \times \frac{100}{W} \times \frac{162}{180} = (A_{510} - A_{510B}) \times 2250F, \text{ де:}$$

A_{510} – поглинання дослідного зразку;

A_{510B} – поглинання холостого зразки;

F – коефіцієнт перетворення 1 одиниці поглинання на 1 мг D-глюкози;

FV – Кінцевий об'єм розчиненого і ферментативно гідролізованого зразку ($40 \times 10/2 = 200$ мл у цьому методі);

SV – об'єм зразку використаний для кольорової реакції (0,4 мл у цьому методі);

W – маса зразку в мг (20 у цьому методі);

$100/W$ – коефіцієнт вмісту крохмалю як % від маси зразку;

$162/180$ – коригування переходу вільної глюкози до безводної.

Отримане значення буде і відсотковим співвідношенням крохмалю у культуральній рідині. [50]

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Радіо Свобода (2024), Новини Приазов'я, Олена Бадюк. Як лікуються на окупованих південних територіях України. [Електронний ресурс]:
<https://www.radiosvoboda.org/a/novyny-pryazovya-stan-medytsyny-v-okupatsiyi-krytychnyy/33028142.html>
2. Радіо свобода (2023), Новини Приазов'я, Олександр Янковський, Олена Бадюк. Загроза епідемій через затоплення Херсонщини [Електронний ресурс]:
<https://www.radiosvoboda.org/a/novyny-pryazovya-potop-khersonshchyna-kholera-hepatyt-spalakh-epidemiy/32459344.html>
3. Радіо Свобода (2022), Новини Приазов'я, Олександр Янковський. «Місто просто замерзає». Зимівля окупованого Маріуполя. [Електронний ресурс]:
<https://www.radiosvoboda.org/a/novyny-pryazovya-mariupol-zamerzaye-opalennya-nemaye-smertnist-roste/32176864.html> ;
4. Gdzie po lek – opinie-i-pytania [Електронний ресурс]:
<https://www.gdziepolek.pl/opinie-i-pytania/120637/witam-biore-tetracyklinum-250-mg-na-helicobacter-przez-14-dni-2?lang=ru> ;
5. Tetracycline – StatPearls – NCBI Bookshelf [Електронний ресурс]:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK549905/>
6. MSD довідник – Тетрациклін – інфекційні хвороби [Електронний ресурс]:
<https://www.msdmanuals.com/uk/professional/infectious-diseases/bacteria-and-antibacterial-medications/tetracyclines> ;
7. Zhu, T., Cheng, X., Liu, Y., Deng, Z., & You, D. (2013). Deciphering and engineering of the final step halogenase for improved chlortetracycline biosynthesis in industrial *Streptomyces aureofaciens*. *Metabolic Engineering*, 19, 69-78. [Режим доступу]:
<https://link.springer.com/article/10.1007/BF01982898>
8. Nguyen, F., Starosta, A. L., Arenz, S., Sohmen, D., Dönhöfer, A., & Wilson, D. N.

					НУХТ БТЕК 04.02.02 КР ПЗ		
Змн.	Арк	№ докум.	Підпис	Дата	СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ		
Розроб.	Ковінченко А.						
Перевір.	Стабніков В.П.						
Реценз.							
Н. Контр.							
Затверд.	Стабніков В. П				Кафедра БТМ		
					Літ.	Арк..	Аркушів
						91	96

- (2014). Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms. *Biological chemistry*, 395(5), 559-575.[Режим доступу]:
<https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/hsz-2013-0292/html>
9. National library of medicine: Tetracycline [Електронний ресурс]:
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tetracycline> ;
10. Фармацевтична енциклопедія: Тетрацикліни [Електронний ресурс]:
<https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/2181/tetraciklini> ;
11. David P. Clark, ... Michelle R. McGehee, in *Molecular Biology (Third Edition)*, 2019: Chapter 23 – Plasmids [Режим доступу]:
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813288-3.00023-9> ;
12. Darken, M. A., Berenson, H., Shirk, R. J., & Sjolander, N. O. (1960). Production of tetracycline by *Streptomyces aureofaciens* in synthetic media. *Applied microbiology*, 8(1), 46-51 [Режим доступу]:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1057549/pdf/applmicro00327-0054.pdf>
13. Буценко Л.М., Пенчук Ю.М., Пирог Т.П. Технології мікробного синтезу лікарських засобів: Навч. посіб. — К.: НУХТ, 2010. - 323 с. ISBN 987-966-612-093-2;Сторінка 92; [Режим доступу]:
<https://www.google.com/url?sa=t&source=web&rct=j&opi=89978449&url=https://dspace.nuft.edu.ua/server/api/core/bitstreams/7078e40d-b329-445d-aeb3-fad4ee2e8ae9/content&ved=2ahUKEwjNi4rdx52MAxW9FBAIHewXHegQFnoECD EQAQ&usg=AOvVaw0eRI7nGGEtYuR47iuWDsJE> ;
14. Компедіум: тетрациклін [Електронний ресурс]:
<HTTPS://COMPENDIUM.COM.UA/UK/AKT/84/2773/TETRACYCLINUM/>
15. Resteclin Tetracycline 250mg Capsule [Електронний ресурс]:
<https://www.indiamart.com/proddetail/tetracycline-250mg-capsule-25985896173.html?srltid=AfmBOorX4T0N7egPv-rx9RCpF5UDhONbrmKtHAbYlxu-27AhlDi62cFy> ;

16. Ross, A., & Schügerl, K. (1988). Tetracycline production by *Streptomyces aureofaciens*: the time lag of production. *Applied microbiology and biotechnology*, 29, 174-180. [Режим доступу]:
<https://link.springer.com/article/10.1007/BF01982898>
17. КОЛЕКЦІЯ КУЛЬТУР МІКРООРГАНІЗМІВ ПРОДУЦЕНТІВ АНТИБІОТИКІВ Львівський національний університет імені Івана Франка [Електронний ресурс]:
http://lv-microbcollect.lviv.ua/strain_card/id/72/ ;
18. Tresner, H. D., Hayes, J. A., & Backus, E. J. (1967). Morphology of submerged growth of Streptomycetes as a taxonomic aid: I. morphological development of *Streptomyces aureofaciens* in agitated liquid media. *Applied Microbiology*, 15(5), 1185-1191. [Режим доступу]:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC547162/pdf/applmicro00235-0217.pdf>
19. Пирог Т. П. Загальна мікробіологія: Підруч. –2-е вид., доп. і перероб. – К.: НУХТ, 2010. – 632 с. ISBN978-966-612-103-8;
20. Shrivastava, P., Kumar, R., & Yandigeri, M. S. (2017). In vitro biocontrol activity of halotolerant *Streptomyces aureofaciens* K20: A potent antagonist against *Macrophoma phaseolina* (Tassi) Goid. *Saudi journal of biological sciences*, 24(1), 192-199. [Режим доступу]:
<https://core.ac.uk/download/pdf/82675254.pdf> ;
21. Streptomyces | справочник Пестициды.ru [Електронний ресурс]:
https://www.pesticidy.ru/pathogens_genus/Streptomyces ;
22. Bergey's manual of Systematic Bacteriology Second Edition [Режим доступу]:
<https://link.springer.com/book/10.1007/0-387-28022-7> ;
23. Tabletki.ua: Інструкція для Тетрациклін [Електронний ресурс]:
<https://tabletki.ua/uk/%D0%A2%D0%B5%D1%82%D1%80%D0%B0%D1%86%D0%B8%D0%BA%D0%BB%D0%B8%D0%BD/#productCardInstructions> ;
24. MSD довідник: Тетрациклін: інфекційні хвороби [Електронний ресурс]:
<https://www.msdmanuals.com/uk/professional/infectious-diseases/bacteria-and-antibacterial-medications/tetracyclines> ;

25. МОЗ України: Щорічний звіт про стан здоров'я та епідемічну ситуацію за 2022 рік [Режим доступу]:
<https://moz.gov.ua/uk/dokumenti-2> ;
26. Chernii, V. I. (2023). Severe community-acquired pneumonia: principles of diagnostics and intensive therapy. *Infusion & Chemotherapy*, (3), 7-15. [Режим доступу]:
<https://infusion-chemotherapy.com/index.php/journal/article/view/392/381> ;
27. Державна служба статистики: чисельність населення по регіонах (за оцінкою) на 1 лютого 2022 року та середня чисельність у січні 2022 року [Електронний ресурс]:
http://db.ukrcensus.gov.ua/PXWEB2007/ukr/news/op_popul.asp ;
28. International monetary fond [Електронний ресурс]:
<https://www.imf.org/en/Countries/UKR>
29. Громадська організація «Інститут молоді» [Електронний ресурс]:
<https://inmol.org/chyselnist-ditej-ta-molodi-v-ukraini/> ;
30. Mayo Clinic: Tetracycline (class) (oral route, parenteral route), instructions [Електронний ресурс]:
<https://www.mayoclinic.org/drugs-supplements/tetracycline-class-oral-route-parenteral-route/description/drg-20069585> ;
31. Deciphering and engineering of the final step halogenase for improved chlortetracycline biosynthesis in industrial *Streptomyces aureofaciens* (SI, додаток) [Режим доступу]:
<https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S1096717613000633-mmc1.doc>
32. KEGG Pathway Database: Starch and sucrose metabolism - *Kitasatospora aureofaciens* [Режим доступу]:
<https://www.genome.jp/pathway/kau00500>
33. KEGG Pathway Database: Glycolysis / Gluconeogenesis - *Kitasatospora aureofaciens* [Режим доступу]:
<https://www.genome.jp/pathway/kau00010>;

34. KEGG Pathway Database: Citrate cycle (TCA cycle) - *Kitasatospora aureofaciens* [Режим доступу]:
<https://www.genome.jp/pathway/kau00020> ;
35. KEGG Pathway Database: Tetracycline biosynthesis - *Kitasatospora aureofaciens* [Режим доступу]:
<https://www.genome.jp/pathway/kau00253> ;
36. KEGG Pathway Database: Valine, leucine and isoleucine degradation - *Kitasatospora aureofaciens* [Режим доступу]:
<https://www.genome.jp/pathway/kau00280> ;
37. KEGG Pathway Database: Pyruvate metabolism - *Kitasatospora aureofaciens* [Режим доступу]:
<https://www.genome.jp/pathway/kau00620> ;
38. Пирог Т. П., Ігнатова О. А. Загальна біотехнологія: Підручник. — К.: НУХТ, 2009. — 336 с. ISBN 978-966-612-083-3;
39. Полотно фільтрувальне "G4" 200x15 - AS FILTER [Електронний ресурс]:
<https://asfilter.com.ua/catalog/filtromaterial-dlya-ventilyatsii/filtromaterial-g4-200x15-mm/> ;
40. Е-Katalog: Від G1 до U17: Класифікація повітряних фільтрів за ступенем очищення повітря [Електронний ресурс]:
<https://ek.ua/ua/post/3783/90-ot-g1-do-u17-klassifikaciya-vozdushnyh-filtrov-po-stepeni-ochistki-vozduha/> ;
41. Фільтроматеріал PTFE (F9-U15) - COFON [Електронний ресурс]:
<https://ua.cofonmedia.com/ptfe-membrane/ptfe-membrane-air-filter.html> ;
42. Air separators - Schenck Process - Qlar [Електронний ресурс]:
<https://www.qlar.com/technologies/filtration/air-separators> ;
43. United States Patent Office, METHOD FOR PURIFYING TETRACYCLINE John Vandeputte, Milltown, and Leon J. Heuser, Princeton, N.J., assignors to Olin Mathieson Chemical Corporation, New York, N. Y., a corporation of Virginia [Режим доступу]:
<https://patentimages.storage.googleapis.com/08/6d/43/414fb9f2513ac2/US2847471.pdf>

44. Junyifilter: автоматичний фільтр-прес для хімічної та фармацевтичної промисловості [Електронний ресурс]:
<http://uk.junyifilter.com/fully-automatic-hydraulic-filter-press-product/>
45. Griffin Machinery: вакуумна сушарка з подвійним конусом [Електронний ресурс]:
<https://www.griffinmachinery.com/uk/%d0%b2%d0%b0%d0%ba%d1%83%d1%83%d0%bc%d0%bd%d0%b0-%d1%81%d1%83%d1%88%d0%b0%d1%80%d0%ba%d0%b0-%d0%b7-%d0%bf%d0%be%d0%b4%d0%b2%d1%96%d0%b9%d0%bd%d0%b8%d0%bc-%d0%ba%d0%be%d0%bd%d1%83%d1%81%d0%be%d0%bc/>
46. Автоматичний самоочисний свічковий фільтр VZTF [Електронний ресурс]:
<https://www.vithyfiltration.com/vztf-automatic-self-cleaning-candle-filter-product/>
47. El-Enshasy, H. A., Farid, M. A., & El-Sayed, E. S. A. (2000). Influence of inoculum type and cultivation conditions on natamycin production by *Streptomyces natalensis*. *Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms*, 40(5-6), 333-342. [Режим доступу]:
[https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/1521-4028\(200012\)40:5/6%3C333::AID-JOBM333%3E3.0.CO;2-Q](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/1521-4028(200012)40:5/6%3C333::AID-JOBM333%3E3.0.CO;2-Q) ;
48. БІОТЕХНОЛОГІЯ ТА БІОІНЖЕНЕРІЯ. ЧАСТИНА 1. ОСНОВИ БІОТЕХНОЛОГІЇ РЕКОМЕНДАЦІЇ ДО ВИКОНАННЯ ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ (Навчальний посібник) [Режим доступу]:
<https://ela.kpi.ua/server/api/core/bitstreams/b000bb79-fcd3-4dc3-b4c3-be8f0f9d9b83/content>
49. Fleck, A., & Munro, H. N. (1965). The determination of organic nitrogen in biological materials: a review. *Clinica Chimica Acta*, 11(1), 2-12. [Режим доступу]:
[https://www.wellesu.com/10.1016/0009-8981\(65\)90083-5](https://www.wellesu.com/10.1016/0009-8981(65)90083-5) ;
50. Liu, K., & Liu, Q. (2020). Enzymatic determination of total starch and degree of starch gelatinization in various products. *Food Hydrocolloids*, 103, 105639. [Режим доступу]:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/am/pii/S0268005X19316030> ;

ДОДАТКИ

Додаток 1.

*Посилання та ціни наведено станом на 25.05.2025

№	Компонент	Ціна за 1 кг/1 л	Точне посилання
1	Сахароза	130	https://prom.ua/ua/p5251530-saharoza.html
2	Арахісове борошно	170	https://prom.ua/ua/p1973724162-muka-arahisovaya.html?token=v2%3AVdtN34hpD04J9yLvHjCtEQGLt_xDriEBRTmeDCY2PAM4S4bQe7coV06hPZo_xpVt7FZD3hYbQ1vV8Ipi_qXfsqyms6KTBjbYO38MPR5pB9YagCf3F9svGndwmACcW7-&campaign_id=3756942&product_id=1973724162&source=prom%3Asearch%3Atag%3Aserp&locale=uk&category_ids=300&from_spa=true
3	Лимонна кислота	98	https://vprok.ua/vesovayaprodukciya/lymonna-kyslota-1-kh-tm-vprok?utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=Sales-Performance_Max-1&utm_id=Sales-Performance_Max-1&utm_term=&utm_content=&gad_source=1&gad_campaign_id=20757237283&gclid=CjwKCAjw3MXBBhAzEiwA0vLXQc4BeM45mIygcIlvievVwu9rlKiNyu_TYn3jdolOWvnOQIL8zC_aBoCZTAQAvD_BwE
4	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	70	https://prom.ua/ua/p2056876651-sulfat-amoniyu-amonij.html
5	$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	50	https://gardentime.com.ua/ru/sulfat-mahnija-mahnij-sirchanokyslyi-semyvodnyi-mgso4-7h2o-300-gr/
6	KH_2PO_4	150	https://prom.ua/p1091383043-monofosfat-kaliya-kalij.html
7	CaCO_3	120	https://prom.ua/p2171172319-karbonat-kaltsiya-mychem.html?token=v2%3ACQ6k0zkOEOftJZRegBsFG3FKkg3RErHuWL3vEu_0xN0GjKRIBDkzOXldfI1aLGcSEoHfURq02YXis0hfe5RjKIXLFBcuF_IIt2is-HZfUWIl7nhoDds3ltaHRang2sVyK&campaign_id=3923972&product_id=2171172319&source=prom%3Asearch%3Atag%3Aserp&locale=ru&category_ids=81906&from_spa=true
8	$\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$	208	https://flagma.ua/marganec-hloristy-4-h-vodny-o3316899.html
9	$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	87	https://shop.hlr.ua/cink-sernokislyy-257203.html?gclid=CjwKCAjw3MXBBhAzEiwA0vLXQcPtV6WC6FSy7LtY9CPhRMtFSdY_Eo1mAze2tYp00GaG5SZdZ8zg_BoCpEQQAvD_BwE&utm_medium=cpc&utm_source=google&utm_campaign=VsetovaryTorgovayaUkraina&utm_content=25720317526
10	$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	1050	https://allhim.kh.ua/ua/p1034615948-kalij-dvuhromovokislyj-hch.html
11	Пептон	1300	https://shop.hlr.ua/ua/pepton-fermentativnyy-pan-gis-12817.html?gclid=CjwKCAjw3MXBBhAzEiwA0vLXQTEe43cZ8Yfh8L1UApfizs9i3ZZPIhOW74hl3wgYcOJng4G0eMUHxoCcnoQAvD_BwE&utm_medium=cpc&utm_source=google&utm_campaign=Brosheni_korzini/Performance_Max&utm_content=1281717526

			<u>_content=</u>
12	Крохмаль ку- курудзяний	65	https://vprok.ua/vesovayaprodukciya/krokhmal-kukurudzyanyy-1-kh-tm-vprok?utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=Sales-Performance_Max-1&utm_id=Sales-Performance_Max-1&utm_term=&utm_content=&gad_source=1&gad_campaign_id=20757237283&gclid=CjwKCAjw3MXBBhAzEiwA0vLXQT3yg00SqZFTcarVLve9WviQl0N9ijEXrdfyVVMOZzmWGaG9Q3QQHBoC0CUQAvD_BwE
13	Соєве борошно	80	https://shustriycarp.com.ua/muka-soevaya
14	Дріжджовий екстракт (по- рошок)	165	https://www.alibaba.com/product-detail/Flavour-Enhancer-Yeast-Extract-Culture-Media_1601356610697.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_title.5ef013a01VLhIU
15	Екстракт куку- рудзяний, 1 літр, CSL (Corn Steep Liquor)	100	https://chocolife.com.ua/ua/p1617573483-moloko-kukurudzyane-suhe.html?srsId=AfmBOopLYUEp0PF0wGxGIeGheBWne0g55E386N7lZARiDEzojAzouKfj https://prom.ua/ua/p2499693266-ekstrakt-kukurudzyanij-litr.html?utm_source=google_product&utm_medium=cpc&utm_content=pla&utm_campaign=KT_cpc_1_5297199152&gad_source=4&gad_campaignid=20983226771&gclid=CjwKCAjw3MXBBhAzEiwA0vLXQcMtM09OaI4Ert-Of6dc1fVP-_jGDpabnUJWf8NMxxAAjtbqe9d8cBoC_WEQAvD_BwE
16	Соєва олія	116,72	https://prom.ua/ua/p1850288387-maslo-soevoe-pervogo.html?srsId=AfmBOop29CtG3iCu9Rx2SKoGRz-UrIB8prSd7rV3MNN2s8LcRMMy2QeOd5u4&gRefinements=SHORT_BY:%D0%9F%D0%BE+%D1%86%D0%B5%D0%BD%D0%B5+(%D0%BF%D0%BE+%D0%B2%D0%BE%D0%B7%D1%80%D0%B0%D1%81%D1%82%D0%B0%D0%BD%D0%B8%D1%8E)
17	MgSO ₄	50,4	https://shop.hlr.ua/ua/magniy-sernokislyy-farm-98131.html
18	(NH ₄) ₃ PO ₄	57,29	https://shop.hlr.ua/ammoniy-fosfornokislyy-3-zameshchennyy-chda-12913.html

Додаток 2.

№	Назва засобу	Посилання
1	Neomoscan® CP acid 300, 24 kg	• https://www.haeberle-lab.de/en/neomoscan-cp-acid-300-24-kg-canister-cleaner-un-1805-8-iii-e/6286149?srsltid=AfmBOoqtT4Yc9bzogankusmilexibt1VBeXzZNkGuenJYpFJRraCHKqB • https://www.drweigert.com/com/products-system-solutions/product/neomoscan-cp-acid-300
2	Neomoscan® CP alka 140, 24 kg	• https://www.haeberle-lab.de/en/neomoscan-cp-alka-140-24-kg-canister-alkalinic-cleaner-un-1719-8-ii-e/6286148 • https://www.drweigert.com/com/products-system-solutions/product/neomoscan-cp-alka-140
3	Neomoscan® FA 18, 24 kg	• https://www.detergenti-online.ro/products/detergent-alkalin-instalatii-neomoscan-fa-18 • https://www.drweigert.com/com/products-system-solutions/product/neomoscan-fa-18
4	Віндез ЧАС-АМ, 5 л	• https://hlorka.in.ua/ua/p961299450-vindez-chas.html?srsltid=AfmBOopgWqB9EiwUgDq-2ExKml-mRDD8AwLmtCyWIB3UqgxxrJCVStTa
5	Данаклін 3Д, 5000 мл	• https://hlorka.in.ua/ua/p2512257991-danaklin-5000.html
6	Cif Professional 2in1 Cleaner Disinfectant conc, 5L	• https://clean-ua.com/ru/cif-professional-2in1-cleaner-disinfectant-conc-5l/

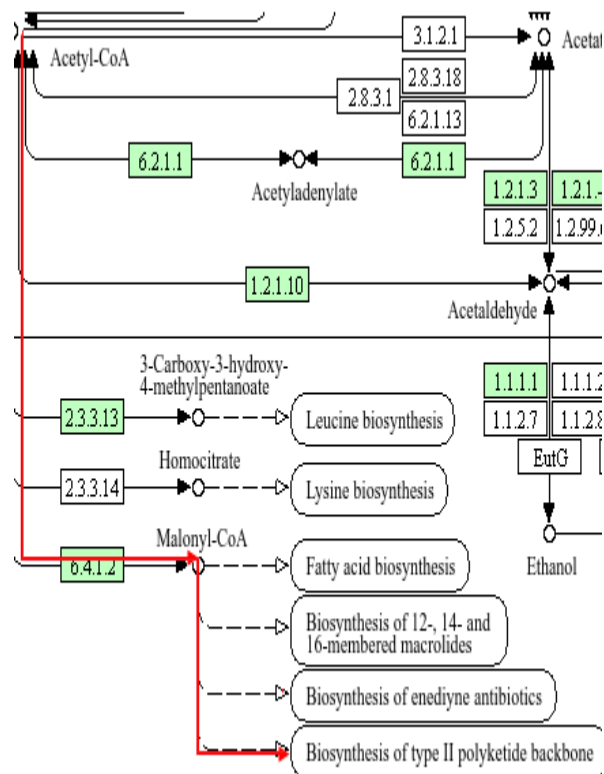
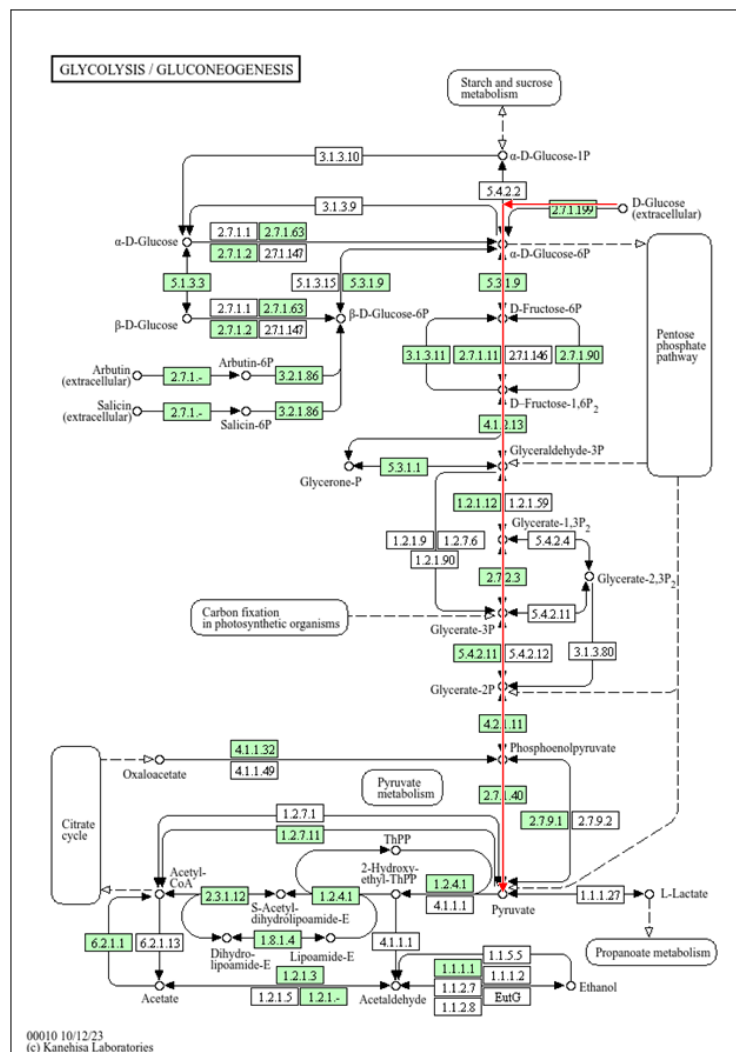
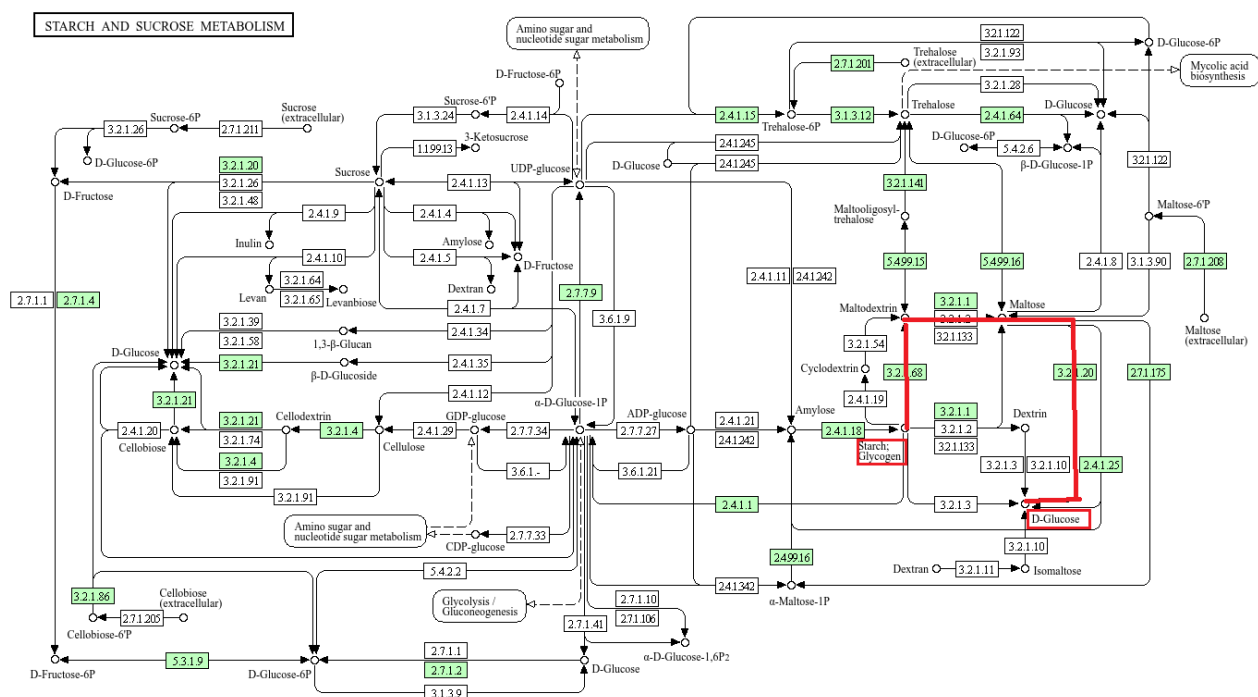
Додаток 3

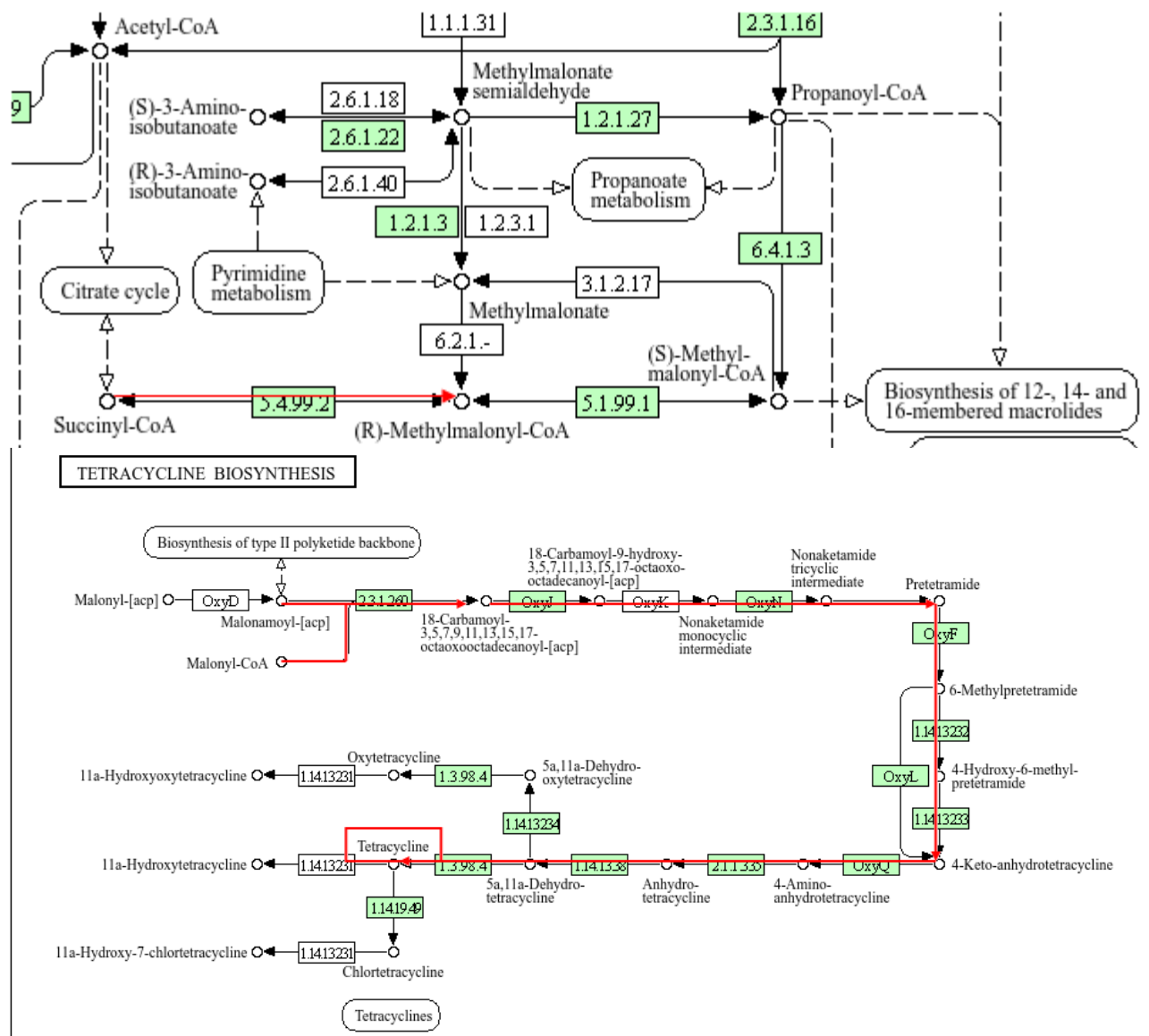
*Посилання наведено станом на січень 2025 року.

№	Найменування	Технічна характеристика (виробник)
<i>Очищення повітря та допоміжні роботи</i>		
1	Повітрезабірник	https://ccktm.prom.ua/ua/p550087783-kryshnyj-vozduhozabornik-kruglyj.html
2	Фільтр грубої очистки повітря	https://www.aff.com.ua/filter-g4-dlia-kruglogo-kanala-150
3	Турбокомпресор	https://dalgakiran.ua/ru/products/centrobezhnye-kompressory-ih-dalgakiran-serii-t2/
4	Теплообмінник-охолоджувач	https://tusk.ua/ua/product/osushitel-refrizheratornogo-tipa-dsi-60-230/1/50/
5	Ресивер	https://tusk.ua/ua/product/resiver-vozdushnyj-lider-10-bar-900-l-rv90081801-dlya-kompressora/
6	Теплообмінник-нагрівач	https://opeks.ua/ua/kozhuxotrubni-pidigrivachi/
7	Головний фільтр очистки	https://tusk.ua/ua/product/filtr-fgo-36/
8	Індивідуальний фільтр	https://tusk.ua/ua/product/filtr-fgo-170-01-mikron/
9	Об'ємний дозатор для подачі води	http://servotehnika.in.ua/dozator_serv_w21.html
10	Ваговий дозатор	https://tehnomashstroy.com.ua/ua/p1345836234-vesovoj-dozator-125.html
11	Перистальтичний насос (~6,5 л/хв)	https://dosingtech.com.ua/product/peristalticheskij-shlangovyj-nasos-asp25-15ix-385-l-ch-10-bar/
12	Перистальтичний насос (~25 л/хв)	https://www.trade-flow.eu/peribest-i35aaa0000-1-5-28-hose-pump-1500-l-h-10-bar-1-5-kw-nr-hose-p4215/
13	Перистальтичний насос (~400 л/хв)	https://emerem.com.ua/industrial-pumps/peristaltic-pumps/peristalticheskij-nasos-serii-ip/
14	Насос відцентровий для перекачування культуральної рідини у збірник	https://ovs.com.ua/ru/dacha-sad-ogorod/nasosnaya-tekhnika/poverkhnostnye-nasosy/nasos-tsentrobegnyj-1-5kvt-hmax-13m-qmax-700l-min-nerg-leo-3-0-abk200d-775535
<i>Біореактори</i>		
15	Інокулятор (15 л)	https://eshop.lab1st.com/products/15l-stainless-steel-bioreactor-for-microbial-and-cell-culture-br500-c1
16	Інокулятор (150 л)	https://eshop.lab1st.com/products/50l-stainless-steel-bioreactor-for-microbial-fermentation-with-2-gas-inlets-br500-m1-1

17	Інокулятор (1 250 л)	https://www.laboao.com/products/stainless-steel-fermenter-bioreactor/multiple-stainless-steel-fermenter-system
18	Ферментер (10 000 л)	https://www.laboao.com/products/stainless-steel-fermenter-bioreactor/multiple-stainless-steel-fermenter-system
<i>Реактори-змішувачі</i>		
19	Реактор-змішувач (3 л)	https://kedayq.en.made-in-china.com/product/pwdfLDXTnMrq/China-3L-Stainless-Steel-Anti-Explosion-Lab-High-Temperature-Hstelloy-High-Pressure-Reactor.html
20	Реактор-змішувач (5 л)	https://www.laboao.com/products/stainless-steel-reactor/5l-lab-jacketed-stainless-steel-reactor
21	Реактор-змішувач (30 л)	https://www.laboao.com/products/stainless-steel-reactor/30l-double-layer-stainless-steel-reactor-for-distillation
22	Реактор-змішувач (50 л)	https://www.laboao.com/products/stainless-steel-reactor/50l-double-layer-jacketed-stainless-steel-reactor
23	Реактор-змішувач (500 л)	https://www.huixinmach.com/product-500l-stainless-steel-chemical-reactor.html
24	Реактор-змішувач (2 500 л)	https://www.machinesseeker.com.ua/cmr+brevetti-2500+ltr+-+stainless+steel+reactor/i-6508537
25	Реактор-змішувач (150 л)	https://www.laboao.com/products/stainless-steel-reactor/100l-150l-200l-300l-industrial-explosion-proof-jacketed-stainless-steel-reactor

▶







Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Metabolic Engineering

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ymben

Deciphering and engineering of the final step halogenase for improved chlortetracycline biosynthesis in industrial *Streptomyces aureofaciens*[☆]

Tao Zhu^a, Xueqing Cheng^a, Yuntian Liu^b, Zixin Deng^a, Delin You^{a,*}^a State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences & Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 20030, China^b Jinhe Biotechnology Co., Ltd., Hohhot 010200, China

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 March 2013

Received in revised form

27 May 2013

Accepted 14 June 2013

Available online 22 June 2013

Keywords:

Microbial natural products

Type II polyketide

Tetracycline

Biosynthetic pathway

Halogenations

Yield improvement

ABSTRACT

Chlortetracycline (CTC) is an important member from antibiotics tetracycline (TC) family, which inhibits protein synthesis in bacteria and is widely involved in clinical therapy, animal feeds and aquaculture. Previous works have reported intricately the biosynthesis of CTC from the intermediates in random mutants of *Streptomyces aureofaciens* and the crucial chlorination remained unclear. We have developed the genetic manipulation in an industrial producer, in which about 15.0 g/l CTC predominated along with 1.2 g/l TC, and discovered that chlorination by *ctcP* (an FADH₂-dependent halogenase gene) is the last inefficient step during CTC biosynthesis. Firstly, the $\Delta ctcP$ strain accumulated about 18.9 g/l "clean" TC without KBr addition and abolished the production of CTC. Subsequently, CtcP was identified to exhibit a substrate stereo-specificity to absolute TC (4S) rather than TC (4R), with low k_{cat} of $0.51 \pm 0.01 \text{ min}^{-1}$, while it could halogenate several TC analogs. Accordingly, we devised a strategy for overexpression of *ctcP* in *S. aureofaciens* and improved CTC production to a final titer of 25.9 g/l. We anticipate that our work will provide a biotechnological potential of enzymatic evolution and strain engineering towards new TC derivatives in microorganisms.

© 2013 The Authors. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Tetracyclines (TCs) comprise a group of broad spectrum, orally active antibiotics produced by species of *Streptomyces*. Several natural and semisynthetic members of TCs are widely used in human medicine, animal feeds and aquaculture. Chlortetracycline was isolated from *S. aureofaciens* as the first member of TCs by Cyanamid scientist, Benjamin Minge Duggar, in 1948 (Duggar, 1948) and followed by Pfizer's discovery of oxytetracycline (OTC) from *S. rimosus* in 1950. Subsequently, TC was isolated in small quantities from spent broth of both *S. aureofaciens* (Backus et al., 1954) and *S. rimosus* (Perlman et al., 1960). By forming complexes with bivalent metal ions, such as magnesium, TCs target the 30S ribosomal subunit and inhibit bacterial protein synthesis with relatively few side effects (Brodersen et al., 2000; Nelson, 2002; Pioletti et al., 2001). The biomedical success of TC, saving countless lives over the past six decades, has generated plenty of scientific disciplines, such as biochemistry, crystallography, semisynthesis,

spectrum, biological model of activity and resistance of TCs ranging from nature products to the third generation semisynthetic tigecycline approved for clinical use in 2005.

Nevertheless, great value of TCs did not make the number of publications concerning the genetics of their producer, *S. aureofaciens*, significant (Petkovic et al., 2006). The main features of the TC biosynthetic pathway were deduced from early feeding studies and extensive studies of mutant strains of *S. aureofaciens* with genetic blocks. In the course of "cross-feeding" experiments, blocked mutants produced diffusible compounds that enabled other blocked mutants to produce the final products (McCormick et al., 1960a). The promiscuity of some of the enzymes involved in the product allowed many of the later steps to proceed even if one step was not achievable. In the case of industrial manufacturing, CTC product could be inhibited in the normal strain of *S. aureofaciens* by supplying cultures with either aminopterin for demeclocycline, or mercaptothiazole/potassium bromide for TC (Fig. 1). A great deal of microbiological research has been made to meet TCs commercial requirement, ranging from random approach by NTG or X-ray to rational metabolic engineering (Olano et al., 2008; Tang et al., 2011; Yu et al., 2012).

Now, molecular microbiological research indicates that TCs are synthesized by type II polyketide synthase. The minimal PKS generates the poly β -ketone backbone, through successive Claisen like decarboxylative condensations of malonyl-CoA extender units (Fu et al., 1994; Vaněk et al., 1971, 1973). The nonaketamide

[☆]This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-No Derivative Works License, which permits non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

* Corresponding author. Fax: +86 21 62932418.

E-mail address: dlyou@sjtu.edu.cn (D. You).

United States Patent Office

2,847,471

Patented Aug. 12, 1958

1

2,847,471

METHOD FOR PURIFYING TETRACYCLINE

John Vandeputte, Milltown, and Leon J. Heuser, Princeton, N. J., assignors to Olin Mathieson Chemical Corporation, New York, N. Y., a corporation of Virginia

No Drawing. Application March 4, 1955
Serial No. 492,295

6 Claims. (Cl. 260—559)

This invention relates to methods of purifying antibiotics, and more particularly to a method for isolating tetracycline from a fermentation broth or other aqueous medium containing the antibiotic.

Prior to this invention, it had been shown that a potent antibiotic, called tetracycline, is present in the culture liquids obtained when suitable strains of certain *Streptomyces* species are grown in or on liquid nutrient media (of, for example, Minieri et al., *Antibiotic Annual*, 1953–1954, 81–87; and U. S. patent application of Donovick, et al., Serial No. 443,952, filed July 16, 1954, now abandoned). It was further known that when tetracycline is produced by a fermentation process, the tetracycline formed is mixed with various (solid and liquid) genetic contaminants, often including a second antibiotic, chlortetracycline, formed concurrently. Before this invention, however, no simple and efficient method was known for separating the tetracycline from the solids (e. g. the mycelia, spores, and other sedimentable solids), other antibiotics concurrently formed, and inactive materials in the culture medium.

An object of this invention, therefore, is the provision of an improved method of recovering tetracycline from a fermentation broth containing it and genetic contaminants.

Another object of this invention is the provision of a method of separating tetracycline from other antibiotics produced concurrently in a fermentation process utilizing a tetracycline-producing *Streptomyces*.

Still another object of this invention is the provision of a method of separating tetracycline from inactive impurities present in a culture filtrate which has previously been separated from the culture medium in a fermentation process involving a tetracycline-producing *Streptomyces*.

These objects are achieved by the method of this invention, which essentially comprises adsorbing tetracycline from a filtrate of a culture of a tetracycline-producing *Streptomyces* by treating the filtrate with an inorganic metal compound, and then recovering the tetracycline from the compound. The inorganic metal compounds useful in the practice of this invention are the relatively water-insoluble salts or bases (compounds having a solubility in water of less than about 0.005 gram compound per ml. water) of a polyvalent light metal, such as a light metal selected from the groups IIA and IIIB of Mendeleeff's periodic table. Metals whose salts and/or bases fulfill the above requirements include, inter alia, calcium, strontium, barium, and aluminum. Examples of inorganic metal compounds suitable for the purposes of this invention include the salts and bases of the alkaline earth metals [group IIA] (e. g. calcium sulfate, calcium carbonate, strontium sulfate, barium sulfate, barium carbonate and calcium oxide) and the salts and oxides of the non-heavy metals of group IIIB (e. g. aluminum oxide). Of these, calcium sulfate is preferred. The salts and bases must not be highly water soluble, since the operability of the process depends on the ability of particles of the inorganic metal compounds to adsorb and

2

thereby remove the tetracycline from an aqueous medium. Throughout the specification and claims this ability of particles of the inorganic metal compounds to remove the tetracycline is referred to as an "adsorption," but we do not wish to be limited to any particular theory for the phenomenon; accordingly, the term "adsorption" is to be understood to include complex-formation, occlusion, or any other mechanism whereby the tetracycline is tied up with the inorganic metal compound and thereby removed from solution.

Preparatory to the addition of the inorganic metal compound, the whole culture (broth) of a tetracycline-producing *Streptomyces* is acidified to a pH of less than about 2.5 (preferably about 2) with an acid such as hydrochloric acid, and the culture liquid is removed from the residual culture solids, as by filtering or centrifuging. The acidified culture filtrate, which contains the main portion of the tetracycline in the broth, is then treated with the inorganic metal compound. Either after, with, or prior to, the addition of the inorganic metal compound, the pH of the culture filtrate is adjusted to the basic side, preferably to a range of about 9 to 10 (optimally about 9.5), by treatment with a base, such as an alkali metal base (e. g. sodium hydroxide); and the resulting mixture is then filtered to separate the undissolved inorganic metal compound and adsorbed tetracycline from the soluble inactive impurities in the culture filtrate. This insoluble association of inorganic metal compound and tetracycline, which usually contains some water, will be referred to hereinafter as "the wet cake." The proportion of inorganic metal compound to filtrate is not critical; but to insure complete adsorption of tetracycline, at least 1% by weight of compound per volume of filtrate should be employed. This step in the process, as well as all subsequent steps, can be carried out at normal temperatures such as ambient temperature. In order to prevent any possible decomposition of the tetracycline, however, the temperature should not be permitted to rise above about 35° C.

The tetracycline is recovered from the wet cake by elution therefrom. This elution is accomplished by slurring the wet cake in an organic solvent to form a slurry of wet organic solvent, the inorganic metal compound and tetracycline. By "wet organic solvent" is meant a mixture of a solvent and water wherein the water is present in the range of 5% to 50% v./v. based on the total mixture, the requisite moisture usually being supplied by the water content of the wet cake. Suitable organic solvents utilizable in this step of the process are those wherein tetracycline is soluble, and include alcohols, such as alkanols (e. g. methanol, isopropanol, butanol, and pentasol), ketones, such as acetone and the cellosolves (e. g. methyl and ethyl), and esters such as the alkyl esters of lower fatty acids (e. g. amyl acetate). For this elution step, the pH of the slurry is adjusted to an acid value by means of an acid, such as a mineral acid (e. g. hydrochloric acid, sulfuric acid, and nitric acid). By this procedure, the tetracycline is desorbed from the inorganic metal compound and passes into solution in the wet organic solvent.

To precipitate the metal cation of the adsorbing salt or base, the acid used in adjusting the pH of the slurry to said acid value is so chosen that the anion of the acid forms a salt with the metal cation which is insoluble in the wet solvent at the pH of the solution. Thus, if a water-immiscible solvent, such as butanol or pentasol, is used as the organic solvent, and a calcium salt or base is used as the inorganic metal compound, then by adjusting the slurry to a pH in the range of about 1.5 to 2.5 (preferably about 2) with sulfuric acid, insoluble calcium sulfate is formed, which may be removed by filtration and can thereafter be recovered and reused in the purification.

vation vessel, volume of medium, the shaking speed and medium viscosity (VAN SUIJDAM *et al.* 1978, HENZLER and SCHEDEL 1991, KURA *et al.* 1993).

On the other hand, type and concentration of inoculum play also a critical role in the determination of growth morphology in submerged culture. The cell morphology does not only influence the kinetic of growth but also reflect in the antibiotic yield (BUSHELL *et al.* 1997, PARK *et al.* 1997). It is therefore important to select the suitable inoculum in respect to type, size and age to obtain a high yield of the desired product (ELIBOL *et al.* 1995).

However, very little has been published on the effect of cultivation conditions on the production of polyene antibiotics. In the present work, the effect of aeration and type of inoculum on the production of natamycin by *Streptomyces natalensis* is described.

Materials and methods

Microorganisms: These studies were carried out with *Streptomyces natalensis* NRRL 2651 obtained from ARS culture collection, Northern Regional Research Laboratory, Peoria, Illinois, USA. *Saccharomyces cerevisiae*, a natamycin-sensitive strain, was used for the biological assay of natamycin.

Inoculum preparation: In case of using spores as an inoculum, spores were obtained from 7 days old cultures grown on ISP solid medium. The spore suspension was prepared by gentle scratching of the ISP slant surface with 0.9% saline solution. The spores were counted under microscope by means of a Thoma counting chamber and added to cultivation medium under sterile conditions.

Media: The solid medium (ISP-2) was used for sporulation. This medium contained per liter of distilled water: glucose, 4.0; yeast extract, 4.0; malt extract, 10.0; and agar, 20.0, with a pH of 6.8–7.0.

The natamycin production medium used in this study was as described previously (FARID *et al.* 2000) and contained per liter of distilled water: glucose, 20; beef extract (Difco), 8.0; yeast extract (Difco), 2.0; asparagine, 0.5 and potassium dihydrogen phosphate, 0.05. The pH of the medium was adjusted to 7.0 before sterilization by autoclaving at 121 °C for 15 minutes. Glucose was autoclaved separately at 110 °C for 20 min and added to the medium before inoculation.

Cultivation conditions: Unless otherwise stated, a 250-ml Erlenmeyer flask containing 50 ml of natamycin production medium was shaken at 200 rpm on a rotary shaker (New Brunswick, NJ, USA) with eccentricity of 2.0 cm for 96 h and the cultivation temperature was 28 °C.

Measurement of cell growth: Determination of cell dry weight (CDW) was carried out by filtering 50 ml of culture broth through a dry pre-weighed filter paper (Whatman 1, Whatman International, U.K.). Filtrate was collected and frozen for further assays (antibiotic and glucose). The filter paper was washed with distilled water prior to drying in an oven at 105 °C for 24 h. Dry weight was estimated after cooling and desiccation for a constant weight.

Natamycin determination: Natamycin present in the culture medium was determined by an agar diffusion method with *Saccharomyces cerevisiae* as the test organism. The biological assay was performed at 30 °C and the diameters of the inhibition zones were recorded after 24 h. The authentic sample of natamycin was kindly provided by DSM-Gist Brocades (Delft, The Netherlands).

Glucose determination: Glucose concentrations in the supernatant fluid was determined enzymatically using a glucose enzyme determination kit (Glucose kit Cat. No. 4611, Biocon Diagnostik GmbH, Burbach, Germany).

Results

Effect of aeration on natamycin production

This investigation was undertaken to verify the effect of aeration on cell growth and production of natamycin. For this purpose three different methods for varying the dissolved oxygen concentration in the cultivation medium in shake flasks were applied in the following experiments: