

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ**

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю
Кафедра Біотехнології і мікробіології

«До захисту в ЕК»
Директор інституту(декан факультету)
Наталія ГРЕГІРЧАК
(підпис) (прізвище та ініціали)

«До захисту допущено»
Завідувач кафедри
Віктор СТАБНІКОВ
(підпис) (прізвище та ініціали)

«__» __ лютого __2024р.

«__» __ лютого __2024р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА**

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код та назва спеціальності)

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

на тему: «Біосинтез гентаміцину *Micromonospora echinospora*»

Виконала: здобувачка V курсу, групи 1

Зінченко Олександра Сергіївна
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник Пенчук Юрій Миколайович
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Консультанти _____ (підпис)
(прізвище та ініціали)

_____ (підпис)
(прізвище та ініціали)

_____ (підпис)
(прізвище та ініціали)

Рецензент _____ (підпис)
(прізвище та ініціали)

Я, як здобувач(-ка) Національного університету харчових технологій, розумію і підтримую політику університету з академічної доброчесності. Я не надавав(-ла) і не одержував(-ла) недозволеної допомоги під час підготовки цієї роботи. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

Здобувач _____
(підпис)

Київ – 2024 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

“ 30 ” жовтня 2023 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ЗІНЧЕНКО Олександр Сергійович

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біосинтез гентаміцину *Micromonospora echinospora*

керівник роботи ПЕНЧУК Юрій Миколайович, к.т.н., доц.,

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від 6 листопада 2023 року № 915-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 29.01.2024

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Micromonospora echinospora*, цільовий продукт: гентаміцин, геометричний об'єм ферментеру 10 м³, коефіцієнт заповнення – 0,6.

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)

5. Перелік графічного матеріалу

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 30 жовтня 2023 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

| № | Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи | Строк виконання етапів роботи | Примітка |
|---|--|-------------------------------|----------|
| 1 | Характеристика цільового продукту | 30.10.2023– 09.11.2023 | |
| 2 | Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента | 10.11.2023- 31.11.2023 | |
| 3 | Техніко-економічне обґрунтування | 01.12.2023- 06.12.2023 | |
| 4 | Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва | 07.12.2023- 12.12.2023 | |
| 5 | Специфікація обладнання | 13.12.2023- 26.12.2023 | |
| 6 | Опис технологічної схеми | 28.12.2023- 02.01.2024 | |
| 7 | Контроль виробництва | 03.01.2024- 10.01.2024 | |
| 8 | Оформлення кваліфікаційної роботи | 11.01.2024- 19.01.2024 | |
| 9 | Оформлення графічної частини | 19.01.2024- 22.01.2024 | |

Здобувач _____
(підпис)

Олександра ЗІНЧЕНКО _____
(ім'я та прізвище)

Керівник роботи _____
(підпис)

Юрій ПЕНЧУК _____
(ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота спрямована на розробку технології отримання гентаміцину шляхом культивування продуктивного штаму продуцента *Micromonospora echinospora subs pallida* (МТСС 708), який синтезує до 1,02 г/л в найбільш оптимальних умовах культивування. Досліджено потребу у гентаміцині з використанням техніко-економічного обґрунтування.

Обґрунтовано вибір способу культивування та типу виробничого ферментера. Технологічна частина включає в себе допоміжні роботи, такі як підготовка мийних і дезінфікуючих засобів, підготовка обладнання та комунікацій, забезпечення стерильного аераційного повітря, а також приготування та стерилізацію поживного середовища для вирощування інокуляту та виробничого біосинтезу.

Кваліфікаційна робота складається зі вступу, п'яти розділів, списку використаної літератури з 20 джерел. Загальний обсяг проекту – 72 сторінки, 11 таблиць, 4 рисунка.

Ключові слова: *Micromonospora echinospora subs pallida*, гентаміцин.

ЗМІСТ

| | |
|---|-----------|
| РЕФЕРАТ..... | 1 |
| ВСТУП..... | 4 |
| РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту | 7 |
| РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента..... | 11 |
| 2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування..... | 11 |
| 2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента.. | 17 |
| 2.4. Таксономічний статус біологічного агента..... | 18 |
| РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування..... | 20 |
| 3.1. Потреба у цільовому продукті..... | 20 |
| 3.2. Розрахунок потужності виробництва..... | 22 |
| 3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів..... | 24 |
| 3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу..... | 25 |
| РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту..... | 28 |
| 3.5. 1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента..... | 28 |
| 3.5.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт | 29 |
| РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми..... | 31 |
| 4.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера..... | 31 |
| 4.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря..... | 32 |
| 4.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів | 34 |
| 4.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища..... | 35 |
| РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання..... | 37 |
| РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми..... | 39 |
| РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва..... | 52 |
| 8.1. Карта постадійного контролю доферментаційних процесів..... | 61 |
| 8.2. Мікробіологічний контроль | 62 |
| 8.3. Показники росту і синтезу цільового продукту..... | 62 |
| 8.3.1. Концентрація біомаси..... | 63 |
| 8.3.2. Концентрація цільового продукту..... | 63 |

| | |
|--|-----------|
| 8.3.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту..... | 64 |
| РОЗДІЛ 9. Охорона довкілля | 66 |
| 9.1. Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на місця емісії твердих, рідких та газоподібних відходів..... | 66 |
| 9.2 Перспективи впровадження системи екологізації виробництва..... | 67 |
| 9.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів..... | 68 |
| 9.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів..... | 68 |
| 9.2.3. Система знешкодження газоповітряних викидів..... | 69. |
| 9.2.4. Заходи щодо зменшення об'ємів відходів | 70 |
| ЛІТЕРАТУРА..... | 72 |

ВСТУП

Антибіотики широко використовуються в медицині для лікування та запобігання інфекцій. Їх ефективність неоспорима. Зазначення антибіотиків для хворих із хронічними та гострими інфекціями у більшості випадків є необхідним заходом. Ліки цієї групи широко використовуються для лікування різних інфекційних хвороб, які загрожують вже з дитячого віку. Таким чином, антибіотики відомі практично всім не тільки з літератури, але й з власного досвіду.

Багато хто вважає, що антибіотики – універсальні засоби проти мікробів, які здатні знищувати мікроорганізми при різних інфекціях, від звичайної простуди до холери. Механізм дії антибіотиків пояснюється їх впливом на розмноження та ріст мікроорганізмів, пригнічуючи цей процес. Деякі антибіотики впливають на процес поділу мікроорганізмів, тоді як інші впливають на функцію клітини мікробної.

Однією з найпоширеніших груп антибіотиків є аміноглікозиди, до яких відноситься гентаміцин, отриманий з культуральної рідини стрептоміцетів, зокрема *Micromonospora purpurea*. Світовий ринок біотехнологічної продукції оцінюється різними експертами від 150 до 200 млрд доларів, включаючи продукти для харчової промисловості та сільського господарства, фармацевтичні препарати, ферменти для виробництва мийних засобів, лікувально-косметичні засоби.

Сучасний стан біотехнологічної галузі в Україні характеризується наявністю науково-технічного потенціалу, але практично відсутністю структури, яка сприяла б широкому впровадженню біотехнологічних розробок в медицині, сільському господарстві та промисловості. Використання мікробних біотехнологічних препаратів і процесів у значній мірі залежить від імпортування цієї продукції. З метою повноцінного розвитку біотехнологічної продукції та її успішної імплементації в економіку відсутні відповідні умови та фінансування в інститутах,

| | | | | | | | | |
|-------------|------|----------------|--------|------|--------------------------|-------------|------|---------|
| | | | | | НУХТ БТЕК 05.01.19 КР ПЗ | | | |
| Змн. | Арк. | № докум. | Підпис | Дата | | | | |
| Розроб. | | Зінченко О.С. | | | ВСТУП | Літ. | Арк. | Акрушів |
| Перевір. | | Пенчук Ю.М. | | | | | 7 | 72 |
| Консультант | | | | | | Кафедра БТМ | | |
| Н. Контр. | | | | | | | | |
| Затверд. | | Стабніков В.П. | | | | | | |

а також в державних органах та організаціях, які могли б забезпечити зв'язок між інститутами і підприємствами. Це одна з причин низької інноваційної активності вітчизняних виробників біотехнологічної продукції, зокрема у представників малого і середнього підприємництва.

На ринку фармацевтичної біотехнології в Україні структура відрізняється від світового ринку. Основні сегменти ринку в Україні займають пробіотики, вакцини, сироватки, білки крові, антибіотики, ферменти, та генно-інженерні препарати. Зауважимо, що в Україні розвиток біотехнології тільки на початку свого шляху, хоча традиційні біотехнології застосовуються у виробництві лікарських препаратів протягом більше 20 років. Зараз з 418 обов'язкових імунобіологічних препаратів вітчизняні підприємства виробляють лише близько 40 (9%), із 62 препаратів мікробного походження, які є першочерговими лікарськими засобами, - лише 10-12 найменувань.

Мікроорганізми представляють собою зручний об'єкт для досліджень завдяки швидкому росту, високій адаптивності та іншим цінним властивостям. Вони грають важливу роль у розвитку наук, таких як молекулярна біологія, біофізика, екологія та інші. Виникнення і швидкий розвиток біотехнології базується переважно на використанні мікроорганізмів як продуцентів цінних продуктів (антибіотики, ферменти, органічні кислоти, амінокислоти, вітаміни, полісахариди тощо).

Гентаміцин є ефективним проти широкого спектру мікроорганізмів, і його основна дія полягає в інгібуванні бактеріального синтезу білка. Цей антибіотик високоактивний відносно аеробних грампозитивних бактерій, і мікроорганізми не виявляють стійкості до нього.

Актуальність даної роботи полягає в високій біологічній активності та перспективності гентаміцину. Розробка технології біосинтезу гентаміцину та її впровадження в виробництво може значно знизити ціну препаратів на його основі, роблячи цю тему дійсно актуальною.

Новизною даної роботи є використання мікроорганізма-надсинтетика *Micromonospora*

echinospora як продуцента гентаміцину. Цей організм синтезує гентаміцин з вихідною кількістю 1,02 г/л при культивуванні на промисловому поживному середовищі. Це майже на 50% вище, ніж у продуцентів аналогічного спектру, включаючи споріднені мікроміцети. Такий результат було досягнуто шляхом генетичної модифікації продуцента, оптимізації поживного середовища на основі соєвого борошна та крохмалю, а також параметрів культивування. Комбінація цих факторів дозволила збільшити вихід продукту на практично 30% порівняно з результатом до оптимізації на базі простого середовища, що містить дешеві та доступні компоненти.

РОЗДІЛ 1.

ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Гентаміцин є природним антибіотиком, належить до групи аміноглікозидів.

Цей препарат представляє собою комплекс антибіотиків, які виробляються *Micromonospora purpurea*. Гентаміцин відноситься до аміноглікозидів II покоління і застосовується парентерально. Вперше його синтезували у 1963 році в США групою вчених, що працювали у компанії "Schering Corporation". Зовнішній вигляд гентаміцину - білий порошок або пориста маса з кремовим відтінком, без запаху. Він легко розчиняється у воді, практично нерозчинний в 95% спирті, хлороформі та ефірі, є гігроскопічним. Препарат проявляє характерну реакцію на сульфати.

Гентаміцин добре розчинний у воді, а його водні розчини стабільні протягом 2 тижнів при температурі від -15°C до $+45^{\circ}\text{C}$, витримують кип'ятіння і автоклавування при рН 2,0-14,0. У культуральній рідині продуцента виявляється 16 компонентів, серед яких 5 основних позначаються як гентаміцини А, В, С1, С2 і D. У медичній практиці використовується гентаміцин сульфат, який є сульфатною сіллю з 3 фракцій гентаміцину: 40% фракції С1, 20% - С1а і 40% - С2, загальна формула $\text{C}_{19}\text{-}_{21}\text{H}_{38}\text{-}_{42}\text{N}_{5}\text{O}_7$ і молекулярна маса 448-476. Спосіб застосування гентаміцину включає парентеральне введення, оскільки в Шлунково-кишковому тракті він всмоктується погано.

Після внутрішньом'язового введення гентаміцин швидко та повністю всмоктується. Час досягнення максимальної концентрації (T_{max}) при внутрішньом'язовому введенні складає 0,5-1,5 години; після внутрішньовенної інфузії - 30 хвилин для 30-хвилинної інфузії і 15 хвилин для 60-хвилинної інфузії. Максимальна концентрація (C_{max}) після внутрішньом'язового або внутрішньовенного введення в дозі 1,5 мг/кг становить 6 мкг/мл. Зв'язування з білками плазми низьке (до 10%).

| | | | | | | | | |
|-------------|------|----------------|--------|------|--|-------------|------|---------|
| | | | | | НУХТ БТЕК 05.01.19 КР ПЗ | | | |
| Змн. | Арк. | № докум. | Підпис | Дата | РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту | Літ. | Арк. | Акрушів |
| Розроб. | | Зінченко О.С. | | | | | 10 | 72 |
| Перевір. | | Пенчук Ю.М. | | | | Кафедра БТМ | | |
| Консультант | | | | | | | | |
| Н. Контр. | | | | | | | | |
| Затверд. | | Стабніков В.П. | | | | | | |

Обсяг розподілу у дорослих становить 0,26 л/кг, у дітей - від 0,2 до 0,4 л/кг. Гентаміцин виявляється в терапевтичних концентраціях у різних органах і рідинах, таких як печінка, нирки, легені, плевральна, перикардіальна, синовіальна, перитонеальна, асцитична і лімфатична рідина, сеча, виділення ран, гній, грануляція. З низькими концентраціями він виявляється в жировій тканині, м'язах, кістках, жовчі, грудному молоці, водянистій волозі ока, бронхіальному секреті, мокротинні та спинномозковій рідині.

У дорослих, за нормальних умов, гентаміцин практично не проникає через гематоенцефалічний бар'єр, але при менінгіті його концентрація в лікворі може збільшитися. У новонароджених спостерігаються вищі концентрації в спинномозковій рідині, ніж у дорослих. Також гентаміцин проникає через плаценту.

Препарат не піддається метаболізму. Період напіввиведення ($T_{1/2}$) у дорослих становить 2-4 години. Гентаміцин переважно виводиться нирками в незміненому вигляді, і в першу добу понад 70-95% дози виводиться через сечу, при цьому концентрація в сечі перевищує 100 мкг/мл. У пацієнтів зі зниженою клубочковою фільтрацією виведення гентаміцину значно зменшується. Гентаміцин виводиться при гемодіалізі (зменшення концентрації на 50% кожні 4-6 годин), але перитонеальний діаліз менше ефективний (за 48-72 години виводиться лише 25% дози).

При повторних введеннях гентаміцин може накопичуватися, переважно в лімфатичному просторі внутрішнього вуха та в проксимальних відділах ниркових каналців. При місцевому застосуванні у вигляді очних крапель абсорбція є незначною. При зовнішньому застосуванні практично не всмоктується, але при широкій поверхні пошкодженої шкіри (рана, опік) або гранулюючій тканині відбувається швидке всмоктування.

Хіміко-фізичні властивості:

Гентаміцин - це глікозидний антибіотик, який складається з трьох модифікованих аміноцукрів у кількості трьох одиниць, модифікованих амінограпами глюкози. За своєю детальною структурою гентаміцин поділяється на декілька типів, таких як гентаміцин С1, С1а, С2, С2а. Під час біосинтезу гентаміцину *Micromonospora purpurea* зазвичай утворюється суміш гентаміцину С1, С1а та С2а у співвідношенні 20-40% : 10-30% : 40-60%. Брутто-формула гентаміцину: $C_{21}H_{43}N_5O_7$, молекулярна маса: 477.596 г/моль.

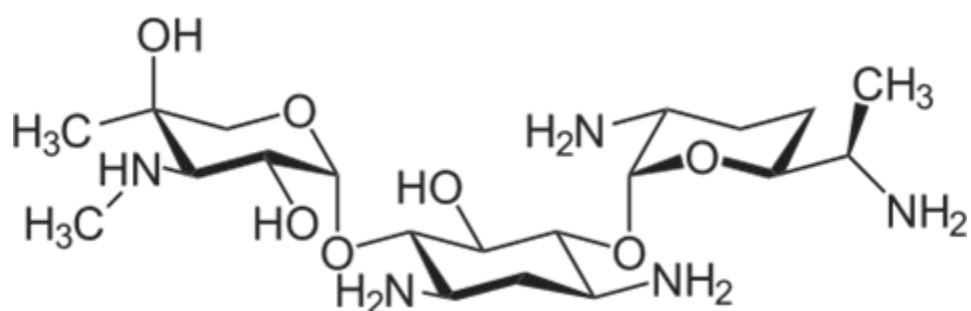


Рисунок 1.1 Гентаміцин , структурна формула.

Механізм дії :

Гентаміцин активно проникає через клітинну мембрану бактерій і необоротно зв'язується з А-сайтом 30S суб'єднаних бактеріальних рибосом (сайт, що відокремлює тРНК). Цей механізм призводить до пригнічення синтезу білка. Антибіотик виявляє високу активність проти аеробних грамнегативних бактерій, таких як кишкова паличка, шигела, сальмонела, ентеробактер, *Klebsiella* spp., *Serratia* spp., *Proteus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp.

Також він виявляє активність проти аеробних грампозитивних коків, зокрема *Staphylococcus* spp. (включаючи штами, стійкі до пеніцилінів та інших антибіотиків), та деяких штамів *Streptococcus* spp. До гентаміцину стійкі деякі мікроорганізми, такі як *Neisseria meningitidis*, *Treponema pallidum*, деякі штами *Streptococcus* spp., а також анаеробні бактерії.

Взаємодія з іншими лікарськими засобами.

Одночасне використання інших нефротоксичних препаратів, таких як інші аміноглікозиди, ванкоміцин, деякі цефалоспорини, а також потенційно отоксичних препаратів, наприклад, фуросемід і етакринова кислота, може підвищувати ризик розвитку нефро- і ототоксичності гентаміцину. Індометацин може збільшити концентрацію гентаміцину в плазмі крові, що може призвести до розвитку токсичності останнього. Гентаміцин може збільшити токсичність дигоксину.

При одночасному застосуванні гентаміцину з міорелаксантами (сукцинілхолін, тубокурарин, декаметоній), анестетиками можливе виникнення порушень функції дихання внаслідок нейром'язової блокади.

Важливо уникати змішування гентаміцину з пеніцилінами і цефалоспоринами в умовах *in vitro*, оскільки гентаміцин може неактивуватися при взаємодії з бета-лактамним кільцем.

Також гентаміцин не слід змішувати в одному шприці з іншими лікарськими засобами.

Умови та термін зберігання. Зберігати при температурі 15 - 25°C у захищеному від світла і недоступному для дітей місці. Термін придатності – 3 роки.

РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

Цільовим продуктом є аміноглікозидний антибіотик, який виробляють актиноміцети роду *Micromonospora*, зокрема *Micromonospora purpurea* та *Micromonospora echinospora*, а також генетично модифікована *E. coli*.

Для вибору найбільш перспективного продуцента для мікробіологічного синтезу гентаміцину будуть порівнюватися продуценти, які найчастіше використовуються в промисловому виробництві. За результатами аналізу зарубіжних досліджень з підвищення ефективності та покращення продуктивності біотехнологічного виробництва гентаміцину були обрані наступні продуценти: *Micromonospora echinospora subs pallida* (MTCC 708), *M. echinospora subsp. pallida* ATCC 15838 та *Micromonospora purpurea* NRRL-2953.

У таблиці 2.1.1 наведено узагальнену характеристику технологічних особливостей отримання цільового продукту з використанням різних продуцентів. З цих даних видно, що для всіх штамів використовується одностадійний метод культивування, і технологія не включає підживлення протягом процесу культивування.

| | | | | | | | | |
|-----------|------|----------------|--------|------|---|-------------|------|---------|
| | | | | | НУХТ БТЕК 05.01.19 КР ПЗ | | | |
| Змн. | Арк. | № докум. | Підпис | Дата | РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика цільового продукту | Літ. | Арк. | Акрушів |
| Розроб. | | Зінченко О.С. | | | | | 14 | 72 |
| Перевір. | | Пенчук Ю.М. | | | | | | |
| Н. Контр. | | | | | | | | |
| Затверд. | | Стабніков В.П. | | | | | | |
| | | | | | | Кафедра БТМ | | |

Таблиця 2.1.1

| Біологічний агент | Склад поживного середовища г/л | Особливості процесу культивування: рН, температура(-Т, °С), тривалість культивування(t, год) | Максимальна концентрація гентаміцину(г/л) | Література |
|--|--|--|---|--|
| <i>Micromonospora echinospora subs pallida</i> (MTCC 708), | Крохмаль – 8.9 Соєве борошно– 3,3 K ₂ HPO ₄ – 0,8 CaCO ₃ - 4 FeSO ₄ – 0.03 NaCl ₂ - 0.1 | рН – 6,8 Т- 31-32 °С t – 72 год | 1,02 | M.Rajasimman and S.Subathra. Process Parameter Optimization for the Production of Gentamicin using Micromonouspora Echiniospora Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry, 2010; 37(1): 973-975 . |
| <i>M. echinospora subsp. pallida</i> ATCC 15838, | Крохмаль – 9 Соєве борошно– 3 K ₂ HPO ₄ – 0,9 CoCL ₂ - 0.01 FeSO ₄ – 0.01 NaCl ₂ - 0.1 | рН – 7.1 Т- 27 °С t - 72 год | 0.880 | M. HIMABINDU, P. RAVICHANDRA, K. VISHALAKSHI, AND ANNAPURNA JETTY. Optimization of Critical Medium Components for the Maximal Production of Gentamicin by Micromonospora echinospora ATCC 15838 Using Response Surface Methodology. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2006; 134(1): 143-146. doi: |
| <i>Micromonospora purpurea</i> NRRL- 2953 | Сахароза- 40 K ₂ HPO ₄ - 2 NH ₄ CL- 2 CaCO ₃ - 20 MgSO ₄ ×7H ₂ O - 0,04 NaCl ₂ - 6 CoCL ₂ - 0.002 MnSO ₄ - 0,02 ZnSO ₄ ×7H ₂ O - 0,06 | рН – 7,4 Т- 29 °С t – 144 год (3 доби) | 1,5 | Gonzalez, Laura Islas, Ana-Maria Obregon, Laura Escalante and Sergio Sanchez. Gentamicin Formation in Micromonosporapurpurea: Stimulatory Effect of Ammonium. E JOURNAL OF ANTIBIOTICS, 1995; 48(6): 479-482. |

Опис таблиці:

Штам *Micromonospora echinospora subs pallida* (MTCC 708) культивується протягом 72 годин при рН 6,8 і температурі 32 °С, і отримується концентрація гентаміцину на рівні 1 г/л. Основним джерелом вуглецю для отримання гентаміцину є полісахарид крохмаль у середовищах. Штам *M. Echinospora subsp. Pallida* ATCC 15838 має приблизно таке ж поживне середовище для культивування, з основним субстратом крохмалем. Він культивується при температурі 27 °С протягом 72 годин. Концентрація гентаміцину, яку отримують з культивування цього продуцента, становить 0,88 г/л. Штам *Micromonospora purpurea* NRRL-2953 має мінеральне поживне середовище з основним субстратом – сахарозою. Час культивування триває 144 години, а параметри культивування схожі з попередніми продуцентами – рН 7,4 і температура 29 °С. Однак цей продуцент має найвищу концентрацію граміцидину – 1,5 г/л. Час культивування є найкоротшим, але низька активність не компенсує це. Для точного порівняння вартості середовищ культивування продуцентів ми порівнюємо таблицю вартості компонентів середовища на основі обсягу 1 літра рідкого середовища.

Порівняння вартості середовищ для культивування

| Біологічний агент | Компонент середовища | Кількість на 1 літр середовища(г) | Ціна 1 кг Компонента, грн | Ціна середовища за 1 л, грн | Ціна компонента у перерахунку на 1 л середовища (грн) | Література |
|---|---|-----------------------------------|---------------------------|-----------------------------|---|---|
| <i>Micromonospora echinospora subs pallida</i> (MTCC 708) | Крохмаль – 8,9 | 8,9 | 38 | 0,88 1 | 0,33 | [10,11 ,12,13 ,14,15] |
| | Соєве борошно– 3,3 | | | | | |
| | K ₂ HPO ₄ – 0,8 | | | | | |
| | CaCO ₃ - 4 | 3,3 | 37 | | 0,12 | |
| | FeSO ₄ – 0,03 | 0,8 | 230 | | 0,18 | |
| | NaCl ₂ – 0,1 | 4 | 62 | | 0,248 | |
| | | 0,03 | 55 | 0,00165 | | |
| | | 0,1 | 19 | 0,0019 | | |
| <i>M. echinospora subsp. pallida</i> ATCC 15838 | Крохмаль–9 Соєве борошно– 3 | 9 | 38 | 0,67 | 0,342 | [10,11 ,12,16 ,14,15] |
| | K ₂ HPO ₄ –0,9 CoCl ₂ -0,01 | 3 | 37 | | 0,111 | |
| | FeSO ₄ –0,01 | 0,9 | 230 | | 0,207 | |
| | NaCl ₂ – 0.1 | 0,01 | 650 | | 0,0065 | |
| | | 0,01 | 55 | | 0,00055 | |
| | | 0,1 | 19 | | 0,0019 | |
| <i>Micromonospora purpurea</i> NRRL- 2953 | Сахароза-40 K ₂ HPO ₄ – 2 | 40 | 150 | 7,9 | 6 | [21,20 ,19,18 ,17,16 ,12,13 ,14,15] |
| | NH ₄ CL-2 | 2 | 230 | | 0,46 | |
| | CaCO ₃ -20 | 2 | 60 | | 0,12 | |
| | MgSO ₄ ×7H ₂ O- 0,04 | 20 | 62 | | 1,24 | |
| | NaCl ₂ – 6 | 0,04 | 84 | | 0,00336 | |
| | CoCl ₂ -0,002 MnSO ₄ - 0,02 ZnSO ₄ ×7H ₂ O – 0,06 | 6 | 19 | | 0,114 | |
| | | 0,002 | 650 | | 0,0013 | |
| | | 0,02 | 81 | | 0,00162 | |
| | | 0,06 | 90 | | 0,0054 | |

Ціни наведено за 2023 рік

Умовна вартість 1 мг цільового продукту

| Біологічний агент | Вартість 1 л середовища грн | Концентрація Гентаміцину (г/л) | Умовна вартість за одиницю маси гентаміцину (грн/г) | Тривалість культивування, год | Продуктивність синтезу гентаміцину (г/л/год) |
|--|-----------------------------|--------------------------------|---|-------------------------------|--|
| Micromonospora echinospora subs pallida (MTCC 708) | 0,881 | 1,02 | 0,86 | 72 | 0,014 |
| M. echinospora subsp. pallida ATCC 15838 | 0,67 | 0,88 | 0,76 | 72 | 0,012 |
| Micromonospora purpurea NRRL- 2953 | 7,9 | 1,5 | 5,2 | 144 | 0,010 |

Штам *Micromonospora echinospora subs pallida* (MTCC 708) має просте поживне середовище, де соєве борошно та крохмаль використовуються як основні субстрати, а солі використовуються як джерела мікроелементів. Час культивування цього штаму становить 72 години, що є середнім значенням серед трьох продуцентів. Рівень рН та температура майже не відрізняються від інших продуцентів, але саме цей штам має найвищу продуктивність гентаміцину - 0,014 грама гентаміцину за годину на 1 літр середовища. Але вартість поживного середовища для цього продуцента не є досить низькою - 0,881 гривні за літр середовища.

M. echinospora subsp. pallida ATCC 15838 має найнижчу концентрацію гентаміцину протягом 72 годин культивування, але використовує дешеве поживне середовище, подібне до продуцента *Micromonospora echinospora subs*

pallida (MTCC 708), з використанням солей та крохмалю. Температура культивування та рівень рН мало відрізняються від умов культивування попереднього продуцента. Один з переваг цього продуцента полягає в найменшій вартості поживного середовища - 0,67 гривень за літр. Проте, з урахуванням параметрів оцінки продуцента, продуктивність по гентаміцину складає 0,012 грама за годину на літр середовища, що свідчить про меншу ефективність цього продуцента порівняно з попереднім.

Micromonospora purpurea NRRL-2953 має більш тривалу період культивування, який становить понад 144 години, та найвищу концентрацію гентаміцину у розмірі 1,5 г/л. Однак, не зважаючи на це, цей продуцент є вкрай вибагливим до складу поживного середовища, оскільки містить понад 7 солей з мікроелементами, що збільшує його вартість. При цьому, розрахована продуктивність біосинтезу гентаміцину становить лише 0,10 грама за годину на літр середовища. Розрахована вартість 1 грама гентаміцину в цьому продуценті є найвищою, а відповідно його економічна доцільність менш вигідна порівняно з попередніми продуцентами.

Отже, порівнявши трьох продуцентів за характеристиками, було прийнято рішення вибрати продуцента *Micromonospora echinospora subs pallida* (MTCC 708). Він має доступне та економічно вигідне поживне середовище вартістю 0,881 гривень за літр, найвищу розрахункову продуктивність синтезу гентаміцину (0,014 г за годину) і невисоку розрахункову вартість гентаміцину. Ці фактори, в поєднанні з доступними компонентами поживного середовища, роблять його перевагу в порівнянні з основними конкурентами-продуцентами.

2.2 Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента

Міцелій *Micromonospora purpurea* проявляє добре розвинену, розгалужену та септовану структуру з діаметром 0,5 мкм. Нерухомі спори утворюються окремо на сидячих або на коротких і довгих спороносцях, які часто групуються в розгалужених пучках. На субстратному міцелії можуть з'являтися одиночні нетермостійкі конідії. Утворення спороносців відбувається моноподіально або симподіально, але спорангії відсутні. Ендоспори не витримують високих температур. Повітряний міцелій відсутній. *Micromonospora purpurea* є грампозитивними, але нестійкими до кислоти.

Фрагментація міцелію може бути розглянута як специфічна форма вегетативного розмноження. Актинобактерії, які переважно мають міцеліальний спосіб життя, розмножуються безстатевим утворенням спор. Утворення субстратного міцелію спостерігається як в занурених, так і в твердих культурах. Субстратний міцелій розвивається з проростаючої спори, а розгалужений субстратний міцелій має моноподіальну структуру. Спори можуть формуватися на субстратному і / або повітряному міцелії у вигляді окремих клітин або ланцюжками різної довжини. У *Micromonospora* спороутворення відбувається безпосередньо на субстратному міцелії, а спори є ізольованими. Колонії *Micromonospora purpurea*, що ростуть на агаризованих середовищах ризоїдної форми, мають широкий спектр кольорів, від теракотового до червоно-бурого. Профіль колонії є припіднятим, поверхня зерниста та зморшкувата, а консистенція в'язка. Край колонії має уривчасту форму, яка не є регулярною. Оптичні властивості колонії спочатку матові, а з часом стають темнішими і набувають блискучого вигляду.



2.3 Таксономічний статус біологічного агенту

Бактерії можна класифікувати на основі їх морфолого-культуральних характеристик, таких як форма клітини, наявність джгутиків, рухливість та утворення спор, а також за фізіолого-біохімічними ознаками, такими як синтез певних ферментів та споживання конкретних субстратів, джерела біогенних елементів. Крім того, бактерії можна класифікувати за генетичними ознаками, включаючи ступінь змін генів у їх геномі.

У першому виданні Визначника бактерій Берги, яке було опубліковане в 1923 році, була представлена перша комплексна класифікація, що ґрунтувалася виключно на морфолого-фізіологічних характеристиках бактерій. Надалі, наступні видання Визначника бактерій почали враховувати також принцип належності видів до конкретних середовищ і їх адаптацію до цих умов. Ці нові мікроорганізми були класифіковані згідно з описаним підходом до 1986 року, аж до 9-го видання Визначника Берги.

Починаючи з 10-го видання Визначника Берги, була введена філогенетична класифікація бактерій, що базується на вивченні генів, що кодують рибосомальні білки. Це призвело до кореневих змін у систематиці більшості бактеріальних доменів, які змінили свої положення. У 1980-1990 роках була розроблена перша класифікація дріжджів, яка базувалася на морфолого-культуральних та фізіолого-біохімічних ознаках. Зокрема, це було виконано в 1984 році. Отже, нові видання Визначника, після публікації філогенетичної класифікації, тепер ґрунтуються не лише на фізіологічних та культуральних ознаках, але й на генетичних ознаках бактерій, що дає більш точну класифікацію.

Класифікації *Micromonospora echinospora* (за останнім виданням керівництва Берги, що спиралася на морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки) *табл.2.3*

| <i>Таксономічна група</i> | <i>Класифікація</i> |
|---------------------------|---------------------|
| Відділ | Firmicutes |
| Клас | Thalobacteria |
| Порядок | Actinomycetales |
| Родина | Micromonosporaceae |
| Рід | Micromonospora |
| Вид | echinospora |

РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування

3.1. Потреба у цільовому продукті

Гентаміцин застосовується як потужний антибіотик проти інфекцій, спричинених мікроорганізмами, чутливими до нього. Його застосування охоплює різні сфери, такі як інфекції дихальних шляхів (пневмонія, профілактика пневмонії після ендотрахеальної інтубації, плеврит, емпієма плеври), менінгіт, перитоніт, сепсис (включаючи сепсис новонароджених), інфекції травного тракту, гострий холецистит, холангіт, інфекції сечостатевої системи, включаючи пієлонефрит, цистит, уретрит, простатит, гонококові інфекції, інфекції при опіках та ранах, гнійні інфекції шкіри та м'яких тканин, менінгіти, інфекції кісток і суглобів і інші.

Для розрахунку потреби у гентаміцині, необхідно врахувати спектр його застосування. Вибір хвороб, таких як інфекції сечостатевої системи, гонококові інфекції та менінгіт, визначається як ключовий крок у цьому процесі. Для оцінки потреби слід отримати інформацію про кількість захворівших на вказані інфекційні захворювання серед населення України за 2023 рік (дані наведені в таблиці 3.1). Також важливо врахувати рекомендовані дози гентаміцину при лікуванні цих захворювань. Зазвичай рекомендовані дози для лікування інфекцій сечовидільних шляхів, статевої системи та менінгіту складають 1,5 - 3 мг/кг маси тіла на добу або 0,5 - 1 мг/кг маси тіла на дозу.

Якщо функція нирок не порушена, або інфекція немає ускладнень, призначають 160 мг препарату один раз на добу або по 80 мг двічі на добу протягом 7-10 днів. Для середньостатистичної людини приймаємо середню розрахункову дозу гентаміцину в розмірі 160 мг один раз на добу.

| | | | | | | | | |
|-----------|------|----------------|--------|------|--|--------------------|------|---------|
| | | | | | НУХТ БТЕК 05.01.19 КР ПЗ | | | |
| Змн. | Арк. | № докум. | Підпис | Дата | РОЗДІЛ 3. Техніко- економічне обґрунтування | Літ. | Арк. | Акрушів |
| Розроб. | | Зінченко О.С. | | | | | 23 | 72 |
| Перевір. | | Пенчук Ю.М. | | | | | | |
| Н. Контр. | | | | | | | | |
| Затверд. | | Стабніков В.П. | | | | | | |
| | | | | | | Кафедра БТМ | | |

Захворюваність населення Україні у 2023 році на окремі види інфекційних захворювань та рекомендовані дози для лікування даних захворювань з застосуванням гентаміцину.

| Тип захворювання | Кількість зареєстрованих хворих осіб за 2023 р. | Дози гентаміцину на 1 людину (мг/добу) | Тривалість курсу лікування |
|-------------------------------|---|--|----------------------------|
| Хвороби сечостатевої системи, | 4188 | 160 | 7-10 |
| Гонококові інфекції | 134 | 160 | 7-10 |
| Менінгіт | 621 | 160 | 7-10 |
| Сумарно | 4943 | 160 | 7-10 |

3.2. Розрахунок потужностей виробництва

Станом на 2023 рік зареєстровано 4188 випадків захворювань сечостатевої системи, 134 гонококові інфекції та 621 випадок менінгіту. У сумі це складає 4943 особи, які потребують лікування гентаміцином у дозі 160 мг щодня протягом 10 днів.

З врахуванням кількості потенційних пацієнтів, дози та тривалості курсу лікування ми розрахували потребу у гентаміцині: $(0,160 \cdot 4943) \cdot 10 = 7908,8$ кг гентаміцину. Для точного розрахунку кількісної потреби у гентаміцині ми врахували втрати при виробництві (припускаємо 20%). Таким чином, річна потужність повинна складати $G_p = 7908,8 + 7908,8 \times 0,2 = 9490,56$ кг.

Знаючи максимальну концентрацію гентаміцину у культуральній рідині при вирощуванні культури *Micromonospora echinospora subs pallida* (MTCC 708) (1,02 г/л), розрахували річний об'єм культуральної рідини, який потрібно виготовити для задоволення потреби. Цей об'єм дорівнює $V_{([кр] \text{ } ^{\wedge} \text{річ})} = 9490,56 \cdot 1000 / 1,02 = 92911$ л, що є еквівалентом 0,092 м³ на рік.

Оскільки гентаміцин представлений на ринку багатьма виробниками,

такими як "KRKA", ТОВ "ПЛУТАРХ-М" та інші, і враховуючи конкурентний ринок, ми зменшили потребу на 33% від загально розрахованої величини (тобто третю частину). Таким чином, остаточна річна потреба складає $G_p = 9490,56 \times 0,33 = 3127$ кг. Розрахунок кількості виробничих циклів для отримання річної потреби цільового продукту

Приймаємо кількість робочих трудовнів: 355. Натомість залишкова кількість робочих трудовнів, що залишаються будуть витрачені на щорічний технічний огляд обладнання його обслуговування та на виробництво інших антибіотиків наприклад тетрацикліну.

1. Кількість робочих днів на рік складає 117. Ефективний фонд робочого часу $N_{\text{еф.}} = 117 \times 24 = 2820,8$ год.

2. Розрахуємо цикл роботи ферментера:

$$T_{\text{цф}} = T_{\text{ф}} + T_{\text{др}} = 72 + 10 = 82 \text{ (год), де}$$

$T_{\text{ф}}$ – тривалість виробничої ферментації (біосинтезу);

$T_{\text{др}}$ – тривалість допоміжних робіт.

Допоміжні роботи включають: миття та огляд апарату (1,5 год), його перевірку на герметичність (1 год), стерилізацію (1,5 год) та оходоження ферментера (1 год), завантаження (0,5 год) та стерилізацію середовища (0,5 год), охолодження середовища (2 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (1 год).

3. Кількість циклів за рік становитиме:

$$n_{\text{ц}} = N_{\text{эф}}/T_{\text{цф}} = 2820,8/82 = 104.$$

4. Об'єм культуральної рідини, який необхідно одержати за цикл:

$$V_{\text{КР}}^{\text{ц}} = V_{\text{КР}}^{\text{річ}}/n_{\text{ц}} = 355,6/104 = 3,4 \text{ м}^3.$$

Обираємо ферментер об'ємом $6,3 \text{ м}^3$ з коефіцієнтом заповнення $K_3 = 0,5$

3.3 Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів

Приймаємо кількість робочих трудоднів у році рівною 355. Однак залишкова кількість робочих трудоднів буде витрачена на різні заходи, такі як щорічний технічний огляд обладнання, його обслуговування, і виробництво інших антибіотиків, наприклад, тетрацикліну та сизоміцину.

1. Кількість робочих днів на рік розрахована як 117. Ефективний фонд робочого часу ($N_{\text{е4}}$) = $117 \times 24 = 2820,8$ год.

2. Розраховуємо цикл роботи ферментера:

Тривалість виробничої ферментації ($T_{4\text{ф}}$) = 72 години,

Тривалість допоміжних робіт ($T_{4\text{др}}$) = 10 годин.

Отже, загальна тривалість циклу роботи ферментера ($T_{4\text{цф}}$) = $T_{4\text{ф}} + T_{4\text{др}} = 82$ години. Допоміжні роботи включають миття та огляд апарату (1,5 год), його перевірку на герметичність (1 год), стерилізацію (1,5 год), охолодження (2 год), завантаження (0,5 год), стерилізацію середовища (0,5 год), охолодження середовища (2 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (1 год).

3. Кількість циклів за рік розраховується як $n_{4\text{ц}} = N_{\text{е4}} / T_{4\text{цф}} = 2820,8 / 82 \approx 34$.

4. Об'єм культуральної рідини, який необхідно одержати за один цикл:

$$V_{4\text{КРц}} = V_{4\text{КРріч}} / n_{4\text{ц}} = 3,4 / 34 \approx 0,1 \text{ м}^3.$$

5. Обираємо ферментер об'ємом $6,3 \text{ м}^3$ з коефіцієнтом заповнення $K_3 = 0,5$.

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Виробниче культивування продуцента для одержання гентаміцину

здійснюють у ферментері об'ємом 6300 л з коефіцієнтом заповнення 0,5.

Відповідно, робочий об'єм ферментера становить:

$$V_{роб} = V_{заг} \times K_{зап} = 6,3 \times 0,5 = 3,15 \text{ м}^3$$

З врахуванням краплиносу поживного середовища та ПМ під час

культивування кількість поживного середовища та ПМ складе:

$$V_{пс1} = V_{роб1} / (1 + X_{ф}) = 3,15 / (1 - 0,1) = 3,5 \text{ м}^3$$

Кількість посівного матеріалу (доза) становить $X_{ф} = 10\%$ від об'єму

поживного середовища, тоді об'єм поживного середовища $V_{пс}$ складе

$$V_{пс1} = V_{роб1} / (1 + X_{ф}) = 3,5 / (1 + 0,1) = 3,185 \text{ м}^3$$

Кількість посівного матеріалу становить

$$V_{пм1} = V_{роб1} - V_{пс1} = 3,5 - 3,185 = 0,315 \text{ м}^3$$

Таку кількість посівного матеріалу, можна одержати під час

культивування продуцента у посівному апараті із стандартним об'ємом

$$V_{па} = 630 \text{ л із коефіцієнтом заповнення } 0,5$$

Робочий об'єм інокулятора з врахуванням втрат при культивування

$E_{ін} = 10\%$ або в частках 10 складе

$$V_{роб2} = V_{пм1} / (1 - E_{па}) = 315 / (1 - 0,1) = 350 \text{ л}$$

Таку кількість посівного матеріалу, можна одержати під час

культивування продуцента в інокуляторі із геометричним об'ємом

$V_{ін} = 630$ л із коефіцієнтом заповнення 0,55.

28

Кількість посівного матеріалу (доза) становить $X_f = 10\%$ від об'єму

поживного середовища, тоді об'єм поживного середовища $V_{псЗ}$ складе

$$V_{псЗ} = V_{робЗ} / (1 + X_f) = 350 / (1 + 0,1) = 318,8 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу становить

$$V_{пмЗ} = V_{робЗ} - V_{псЗ} = 350 - 318,8 = 31,5 \text{ л}$$

Таку кількість посівного матеріалу можна одержати під час

культивування в посівному апараті об'ємом 63 л з коефіцієнтом заповнення

0,55.

Робочий об'єм інокулятора з врахуванням втрат при культивування

$E_{ін} = 10\%$ або в частках 10 складе

$$V_{роб2} = V_{пм1} / (1 - E_{па}) = 31,5 / (1 - 0,1) = 35 \text{ л}$$

Таку кількість посівного матеріалу, можна одержати під час

культивування продуцента в інокуляторі із геометричним об'ємом

$V_{ін} = 63$ л із коефіцієнтом заповнення 0,55.

Кількість посівного матеріалу (доза) становить $X_f = 10\%$ від об'єму

поживного середовища, тоді об'єм поживного середовища $V_{псЗ}$ складе

$$V_{\text{псз}} = V_{\text{робз}} / (1 + X_{\text{ф}}) = 35 / (1 + 0,1) = 31,85 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу становить

$$V_{\text{пмз}} = V_{\text{робз}} - V_{\text{псз}} = 35 - 31,85 = 3,15 \text{ л}$$

Таку кількість посівного матеріалу можна одержати в колбах на качалках місткістю 2 л.

Тоді кількість колб при коефіцієнті заповненні 0,2 буде становити

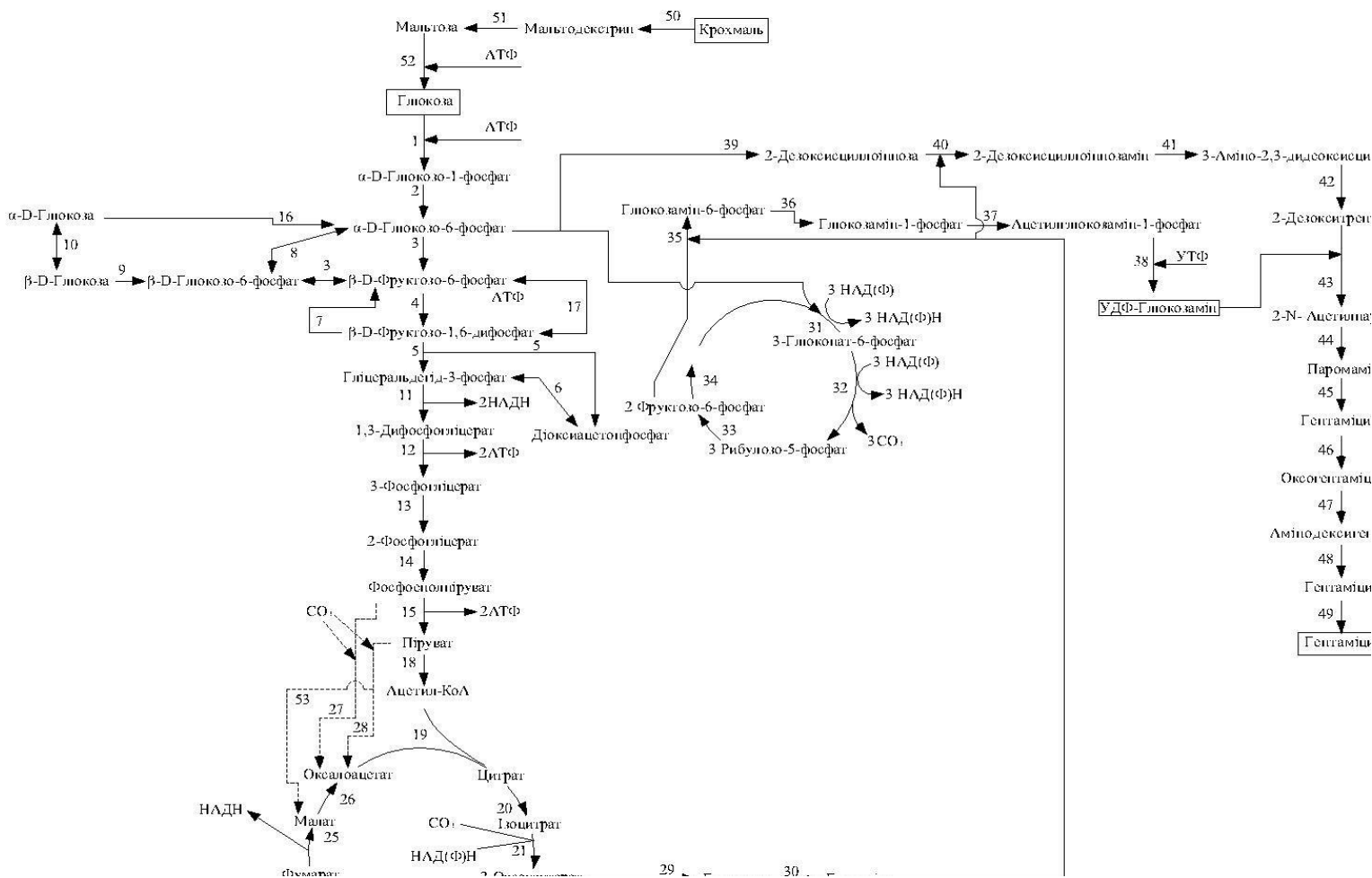
$$N = 3,15 / (0,2 * 2) = 7,8 = 8 \text{ колб.}$$

РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту

4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента

Гентаміцин виникає з аміноциклітолу, деоксистрептаміну, глютаміну і глюкозо-6-фосфату. Деоксистрептамін формується з глюкозо-6-фосфату, а ацетилглюкозамін виникає з фруктозо-6-фосфату та глютаміну. Після синтезу цих двох попередників вони об'єднуються за участі ферментів деокитрептамін-ацетил-глюкозамілтрансферази (КФ 2.4.1.283) та деоксистрептамін-глікозилтрансферази (КФ 2.4.1.284), утворюючи ацетилпароамін. Цей сполук переходить у ключовий інтермедіат, пароамін, який потім використовується для синтезу гентаміцинового ряду антибіотиків. Через взаємодію з пароамінксилотрансферазою (КФ 2.4.2.-), пароамін перетворюється в загальний попередник гентаміцинів, а саме - Гентаміцин А. Після утворення Гентаміцину А він проймає модифікації, які призводять до утворення Гентаміцину С.

| | | | | | | | |
|-----------|------|----------------|--------|------|--------------------------|------|---------|
| | | | | | НУХТ БТЕК 05.01.19 КР ПЗ | | |
| Змн. | Арк. | № докум. | Підпис | Дата | | | |
| Розроб. | | Зінченко О.С. | | | Літ. | Арк. | Акрушів |
| Перевір. | | Пенчук Ю.М. | | | | 30 | 72 |
| Н. Контр. | | | | | Кафедра БТМ | | |
| Затверд. | | Стабніков В.П. | | | | | |



Ключові Ферменти:

1- глюкозокіназа (КФ2.7.1.2); 2- фосфофруктомутаза (КФ 5.4.2.2); 3- глюкозо-фосфатізомераза (КФ 5.3.1.9); 4 – фосфофруктокіназа (КФ 2.7.1.11); 5 – фруктозо-біфосфатальдолаза клас 2 (КФ4.1.2.13); 6 – тріозофосфатізомераза (КФ 5.3.1.1); 7 – фруктозо-1,6-біфосфатаза клас 2 (КФ3.1.3.11), 8- глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ 5.3.1.9), глюкозо-6- фосфатепімераза (КФ 5.1.3.15); 9 – гексокіназа (КФ 2.7.1.2), поліфосфатглюкозокіназа (КФ 2.7.1.63) ; 10 – альдозо-1-епімераза (КФ 5.1.3.3) ; 11- гліцеральдегід- 3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12); 12- фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3); 13 – 2,3 –біфосфатзалежна фосфогліцератмутаза (КФ5.4.2.11); 14 – енолаза (КФ 4.2.1.11)); 15- піруваткіназа (КФ 2.7.1.40), 16 – поліфосфатглюкозокіназа(КФ . 2.7.1.63), глюкозокіназа (КФ 2.7.1.2); 17 – пірофосфат-залежнафосфофруктокіназа (КФ 2.7.1.90); 18- піруваткіназа (КФ 2.7.1.40); 19- цитратсинтаза (КФ 2.3.3.1); 20 - аконітатгідратаза (КФ4.2.1.3); 21 - ізоцитратдегідрогеназа (КФ 1.1.1.42); 22 - дигідроліпоаміддегідрогенази (КФ 1.8.1.4); 23 - сукциніл-КоА синтетаза, альфа-

субодиниця (КФ 6.2.1.5); 24 - сукцинатдегідрогеназа, цитохром b 556 субодиниця; 25 — фумаратгідратаза, клас II (КФ 4.2.1.2); 26 — малатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.37); 27 — фосфоенолпіруваткарбоксилаза (КФ 4.1.1.31); 28 – піруваткарбоксилаза (КФ 6.4.1.1); 29 – глутаматсинтаза НАДН/НАДФН залежна(КФ, 1.4.1.13), глутаматсинтаза НАДН залежна(КФ, 1.4.1.14); 30 – глутамінсинтаза(КФ6.3.1.2); 31- глюкозо-6-фосфатгідрогеназа (КФ1.1.1.49); 32 - глюконат-6-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.44), фосфоглюконатдегідрогеназа декарбоксилувальна (КФ 1.1.1.343); 33 - трансальдолаза (КФ 2.2.1.1); 34 - глюкозо-6-фосфатізомереза (КФ 5.3.1.9); 35 – глюкозамін-фруктозотрансфераза (КФ 2.6.1.16); 36 – фосфоглюказамін мутаза (КФ 5.4.2.10); глюкозамінфосфатацетилтрансфераза (КФ 2.3.1.157); 38 – глюкозамінацетилтрансфераза (КФ 2.7.7.23); 39 - дезоксисциллоинсинтаза (КФ 4.2.3.124); 40 – амінодезоксисцило-амінотрансфераза (КФ 2.6.1.101); 41 - дезоксисцилоіннозаміндегідрогеназа (КФ 1.1.1.329); 42- 23 глутаміндезоксисциллоіннозоамінотрансфераза (КФ 2.6.1.100);, амінодидеоксисциллоіннозоамінотрансфераза(КФ 2.6.1.101); 43- деокитрептамін-ацетил-глюкозамілтрансфераза (КФ 2.4.1.283), деокистрептамін-глікозилтрансфераза (КФ 2.4.1.284); 44 – ацетилпаромаміндеацетилаза (КФ 3.5.1.112), акцетилгліроксинеоміцдеацетилаза (КФ 3.5.1.113); 45- паромамінксилолтрансфераза (КФ 2.4.2.-); 46 – гентаміциНА2-дегідрогеназа(КФ 1.1.1.-); 47 – піридоксинфосфат-залежнаамінотрансфераза (КФ 2.6.1.-); 48 – метилтрансфераза (КФ 2.1.1.-); 49 – кабаламінзалежнаметилтрансфераза(КФ 2.1.1.-); 50 – альфа-глюкан-Д-глікозилмутаза(КФ 5.4.99.15); 51- Бета-амілаза(КФ 3.2.1.2); 52- альфа-глюканоттрансфераза(КФ 2.4.1.25)

РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми

5.1 Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Існують два методи проведення процесу культивування – поверхневий і глибинний. В останній час на підприємствах в основному використовується глибинний метод, оскільки порівняно з поверхневим він має численні переваги:-
Більша питома площа контакту:

Глибинний спосіб культивування забезпечує більш ефективний контакт мікроорганізмів з поживним середовищем.

- Більш компактний:

Процес глибинного культивування є більш компактним, що дозволяє ефективніше використовувати простір та ресурси.

- Більш ефективний та продуктивний:

Глибинний метод є ефективнішим та продуктивнішим, що дозволяє отримати більше гентаміцину на одиницю часу та об'єму.

З метою біосинтезу гентаміцину доцільно використовувати глибинне культивування через більшу поверхню для розвитку мікроорганізмів. Глибинний спосіб надає можливість ефективнішого використання компонентів поживного середовища, а також дозволяє вирощувати аеробних та анаеробних мікроорганізмів та автоматизувати процес.

| | | | | | | | |
|-----------|------|----------------|--------|------|--|------|---------|
| | | | | | НУХТ БТЕК 05.01.19 КР ПЗ | | |
| Змн. | Арк. | № докум. | Підпис | Дата | | | |
| Розроб. | | Зінченко О.С. | | | Літ. | Арк. | Акрушів |
| Перевір. | | Пенчук Ю.М. | | | | 33 | 72 |
| Н. Контр. | | | | | Кафедра БТМ | | |
| Затверд. | | Стабніков В.П. | | | | | |
| | | | | | РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми | | |
| | | | | | | | |

Існують різновиди глибинного культивування, такі як періодичний, безперервний і напівбезперервний режими. Серед двох основних методів глибинного культивування – періодичного і безперервного – останній дозволяє фіксувати культуру в певній фазі, зазвичай експоненційній, через постійне подавання нового поживного середовища та відведення культуральної рідини. Проте періодичний метод практично застосовується частіше через меншу вірогідність контамінації та його простоту проведення.

Також, проведення безперервного процесу культивування вважається неефективним, оскільки синтез антибіотику, головним чином, відбувається на стаціонарній фазі. Іншими словами, немає необхідності "фіксувати" штам продуцента в експоненційній фазі росту, оскільки це може призвести до зниження кінцевої концентрації антибіотику у культуральній рідині.

Тому культивування продуцента буде здійснюватись за періодичним методом. Це дозволить запобігти забрудненню культуральної рідини та спростить процеси виробництва та виділення цільового продукту. У нашому випадку доцільно обрати періодичний метод, оскільки в разі безперервного складно забезпечити асептичні умови, а застосування напівбезперервного методу не є доцільним, оскільки склад поживного середовища не передбачає підживлення.

Обґрунтування вибору ферментера визначається з урахуванням даних про процес культивування, які були розглянуті раніше. Вибір оптимального ферментера, враховуючи значення тепломасопередачі, спрямований на використання апарату з підводом енергії до газової та рідкої фаз. До цієї категорії апаратів входять ферментери з перемішувачами та барботером, що є найбільш поширеними.

Основними вимогами до ферментерів є можливість проведення культивування продуцента в асептичних умовах при інтенсивних аераційних та масообмінних процесах всередині біореактора.

З метою забезпечення високого тепломасообміну внутрішнім

простором ферментера, обов'язковим елементом є перемішуючий пристрій. Вибір типу мішалки повинен враховувати фізіологічні особливості штаму продуцента. Наприклад, штам *M. echinospora subs pallida* (MTCC 708), як аероб, не вимагає конкретного типу мішалки, і можуть бути використані різні типи перемішуючих пристроїв.

Важливою вимогою є постійна аерація поживного середовища, яку можна забезпечити за допомогою барботера, встановленого в нижній частині ферментера. Барботер повинен забезпечувати ефективну аерацію культуральної рідини на рівні 1 об'єм повітря на 1 об'єм культуральної рідини.

Також необхідна теплова сорочка для регулювання температурного режиму під час культивування. З урахуванням мезофільної природи продуцента, оптимальною температурою є 35 °C.

Рекомендується використовувати ферментер виробництва BIORUS з геометричним об'ємом 10 м³. Він має турбінні мішалки, що забезпечують інтенсивне перемішування культуральної рідини по всьому об'єму ферментера. Такий ферментер має ряд вигідних характеристик, включаючи стерильну систему відбору проб, просту конструкцію та економічний споживання енергії. Також, він оснащений програмним забезпеченням BIORUS-Ver8.0 для управління, запису та аналізу даних процесу культивування.

5.2 Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря

Продуцент гентаміцину вимагає строгого аераційного режиму, тому під час культивування в інокуляторах та ферментері повітря повинно бути стерильним для задоволення біологічних потреб мікроорганізму у кисні.

Сучасні технологічні методи отримання та очищення стисненого повітря включають кілька етапів: попередню (грубу) очистку від механічних домішок, стиснення, охолодження, відділення сконденсованих парів вологи та масла (застосовуючи поршневі компресори) та стерилізацію.

Забір атмосферного повітря проводиться в екологічно чистій зоні на висоті 20-30 м для забезпечення максимальної якості повітря. Атмосферне повітря проходить через фільтр попередньої очистки, який розташований перед компресором і забезпечує видалення великих часток шляхом інерційного осадження.

Після стиснення повітря, яке супроводжується його нагріванням, відбувається охолодження до оптимальної температури для культивування продуцента. Це відбувається у теплообміннику, після чого відокремлюється у вологовідділювачі від утвореного аерозолі.

Очищення повітря від мікроорганізмів включає фільтрацію в фільтрі грубої бактеріальної очистки та фільтрі тонкої бактеріальної очистки. Фільтри грубої очистки здійснюють уловлювання основної маси забруднень, а фільтри тонкої очистки використовуються для основного процесу стерилізації повітря. Ступінь очищення після стерилізації досягає 99,999%.

5.3 Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Дотримання чистоти на виробництві має вирішальне значення для успішного процесу ферментації. Залишки від попереднього культивування та будь-яке забруднення можуть стати причиною контамінації культуральної рідини, що призведе до формування низькоякісної продукції. Отже, особливу увагу слід приділяти вибору мийних та

дезінфікуючих засобів для обробки приміщень та обладнання.

Мийні засоби повинні бути не лише вартісними, але й ефективними, що є ключовими критеріями при виборі мийних речовин. Для очищення обладнання, такого як фільтри, комунікації та біореактори різних типів і об'ємів, рекомендується використовувати розчин каустичної соди. Це ефективний та економічний засіб, який легко розчиняє забруднення різного виду.

Каустична сода, хоча вона є доступною за ціною, має токсичні властивості, і при контакті з шкірою може викликати опіки та подразнення. Тому рекомендується використовувати захисне обладнання, таке як захисні окуляри, гумові рукавички та прорезинений хімічностійкий одяг при роботі з нею.

Для забезпечення санітарно-гігієнічного стану виробництва рекомендується проводити регулярне прибирання. Для цих цілей можна використовувати універсальний миючий засіб, такий як Dez-3, який ефективно видаляє забруднення різного виду з різних поверхонь.

Dez-3 має кілька переваг, таких як "ефект лотоса", ефективність в низьких концентраціях, можливість використання для хромованих виробів та дезінфікуючий ефект. Його оптимальна ціна робить його економічно вигідним та доцільним для використання на підприємстві.

5.4 Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Для здійснення стерилізації поживного середовища необхідно його розділити на дві композиції з різними складовими та режимами стерилізації.

У складі композиції А містяться крохмаль, соєве борошно та дріжджовий автолізат, і її стерилізація відбувається за температурного режиму 121°C протягом 20 хвилин. Вибір компонентів обґрунтовується їхньою термолабільністю, відсутністю хімічної взаємодії між ними та необхідністю попереднього заварювання крохмалю та борошна.

Композиція Б включає K_2HPO_4 , $CaCO_3$, $FeSO_4$, $NaCl$, і її стерилізація проводиться за більш жорстким режимом - $131^\circ C$ протягом 20 хвилин. Вибір компонентів обґрунтовується їхньою здатністю витримувати більш високі температури та відсутністю взаємодії між ними. Стерилізація виконується у реакторі-стерилізаторі періодичної дії. Для уникнення утворення нерозчинних сполук під час стерилізації композиції Б рекомендується додавати певну кількість підкислюючого агента, зокрема розчину соляної кислоти, до досягнення рН рівня 4,5.

Розділ 6. Специфікація обладнання

Специфікація обладнання наведеного на технологічній схемі розписана у таблиці 6.1.

Таблиця 6.1

Специфікація обладнання для апаратурної схеми виробничого біосинтезу та допоміжних робіт при одержанні доксорубіцину

| Позиція | Найменування | Кількість | Технічна характеристика(виробник) |
|---------------------------------------|--|-----------|---|
| 1 | 2 | 3 | 4 |
| P-1,P-2, | Реактор-змішувач для приготування розчину для миття обладнання для | 2 | Реактор змішувач фірми «НПОФастовський Завод Химического Машиностроения типу «СРЕН» об'ємом 630 л оснащений мішалкою та рубашкою |
| P-3, P-4 | Реактори для приготування композицій А та Б | 2 | Реактор змішувач фірми «НПОФастовський Завод Химического Машиностроения типу «СРЕН» об'ємом 0,063 м ³ оснащений мішалкою та рубашкою |
| ПЗ-5 | Повітрязабірник | 1 | Повітрязабірник радиальный Dunag CM 21,4 |
| Ф-6 | Фільтр грубої очистки | 1 | Фільтр для сжатого воздуха з акрилового волокна WHFIT 030 525PP част до 3 мкм E=90% продукт 315 м ³ /год «ТОВ OMEGA Air» |
| К-7 | Компресор | 1 | Компресор GX 7 фірми Atlas Copco, потужн 14 л/с, робоч тиск 1 МПа |
| Т-8 | Теплообмінник охолоджувач | 1 | Теплообмінник-охолоджувач серії AFR 11 «Уралкомпресормаш» |
| РЕ-9 | Ресивер | 1 | Ресивер РВ 320/10 «Уралкомпресормаш» |
| Т-10 | Теплообмінник -нагрівач | 1 | Теплообмінник ВОП N Airone(Росія) |
| Ф-11 | Фільтр тонкої очистки | 1 | Фільтр для сжатого воздуха з боросилікатного волокна WHFIT 030 525PM част до 0.1 мкм E= 99,99 % продукт 315 м ³ /год «ТОВ OMEGA Air» |
| Н-12,Н-13, Н-14, Н-15, Н-16,Н-17,Н-18 | Насоси перистальтичні | 4 | Насос відцентровий Vortex 30-потужністю до 500000 л/год фірми ТОВ «Ватерпасс» |
| ФІ-15 | Ферментер-інокулятор | 1 | Інокулятор обладнаний стандартною системою функцій для технологічного процесу на 63 л «БИОТЕХНО» |

НУХТ БТЕК 05.01.19 КР ПЗ

| Змн. | Арк. | № докум. | Підпис | Дата | | | | |
|-------------|------|----------------|--------|------|--------------------------------------|-------------|------|---------|
| Розроб. | | Зінченко О.С. | | | РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання | Літ. | Арк. | Акрушів |
| Перевір. | | Пенчук Ю.М. | | | | | 39 | 72 |
| Консультант | | | | | | Кафедра БТМ | | |
| Н. Контр. | | | | | | | | |
| Затверд. | | Стабніков В.П. | | | | | | |

| | | | |
|--|---|---|---|
| ФПА-16 | Ферментер посівний апарат | 1 | Ферментер об'ємом 630 л компанії «BIORUS» обладнаний системою багатофункціонального культивування аеробних мікроорганізмів |
| ФВ-17 | Ферментер виробничий | 1 | Ферментер об'ємом 6300 л компанії «Frings» обладнаний системою багатофункціонального культивування аеробних мікроорганізмів |
| Р-18, Р-19 | Реактори для приготування композицій А та Б | 2 | Реактор змішувач фірми «НПОФастовський Завод Химического Машиностроения типу «СРЕН» об'ємом 0,63 м ³ оснащений мішалкою та рубашкою . |
| Р-20, Р-21 | Реактори для приготування композицій А та Б | 2 | Реактор змішувач фірми «НПОФастовський Завод Химического Машиностроения типу «СРЕН» об'ємом 6,3 м ³ оснащений мішалкою та рубашкою . |
| ФІ-31 ФІ-32 ФІ-33 | Фільтри індивідуальної очистки | 3 | Фільтр для стисненого повітря воздуха з боросилікатного волокна WHFIT 030 525PS част до 0,01 мкм продукт 315 м ³ /год «ТОВ ОМЕГА Air» ,Е=99,9999 |
| Д-33,Д-34 Д-35,Д-36, Д-37, Д-38, Д-39,Д-40 | Дозатори об'ємно вагові | 4 | Дозатор фірми «АСВІК ЦЕНТР» ДВП-6 |

РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми.

Опис технологічної схеми для біосинтезу цільового продукту включає ряд допоміжних робіт (позначених як "ДР"), таких як підготовка і стерилізація поживних середовищ, санітарна підготовка, підготовка повітря, технічний огляд та стерилізація обладнання. Також включений технологічний процес (позначений як "ТП"), який включає підготовку посівного матеріалу і біосинтез антибіотика гентаміцину з використанням продуцента мікроміцета *Micromonospora echinospora*.

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва та персоналу.

ДР1.1 Підготовка мийних та дезинфікувальних засобів

Для забезпечення дезінфекції та очищення поверхонь у приміщенні застосовують розчин хлорного вапна з концентрацією 2%.

ДР 1.1.1. Приготування 0,2 % Dez-3

У реакторі об'ємом 630 літрів проводять процес приготування мийних розчинів Р-1. Спочатку вносять відмірену кількість хлорного вапна, після чого доливають питну воду у встановленій кількості. Після включення перемішуючого пристрою отримують готовий до використання робочий розчин хлорного вапна.

ДР 1.1.2. Приготування 2 % робочого розчину каустичної соди

Для процесу миття та дезінфекції обладнання необхідно використовувати половину об'єму цього обладнання робочого розчину каустику. У реакторі об'ємом 630 л (Р-2) вносять відповідну кількість каустичної соди та питної води. Після цього проводиться перемішування до повного розчинення.

ДР 1.2 Підготовка виробничих приміщень

ДР1.2.1 Генеральне прибирання

| | | | | | | | | | | | |
|-----------|------|---------------|--------|------|------------------------------------|--|--|-------------|------|---------|----|
| | | | | | НУХТ БТЕК 05.01.19 КР ПЗ | | | | | | |
| Змн. | Арк. | № докум. | Підпис | Дата | РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми | | | Літ. | Арк. | Акрушів | |
| Розроб. | | Зінченко О.С. | | | | | | | | 41 | 72 |
| Перевір. | | Пенчук Ю.М. | | | | | | | | | |
| Н. Контр. | | | | | | | | | | | |
| Затверд. | | Стабніков | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | Кафедра БТМ | | | |

Генеральне прибирання проводиться один раз на місяць. Для звичайної мийки поверхонь вимагається використання не менше 100 мл робочого розчину хлорного вапна на квадратний метр. У випадку генерального прибирання ця кількість збільшується удвічі.

ДР1.2.2 Щоденне прибирання

Щоденне прибирання включає мийку поверхностей шляхом протирання з використанням 0,2% розчину Dez-3 (згідно з ДР 1.1.1). Ця мийка проводиться один раз на добу. Перед початком роботи персонал повинен пройти санітарно-гігієнічну підготовку, включаючи миття рук туалетним або господарським милом і дезінфекцію за допомогою 76%-ного етилового спирту. Також обов'язковою є наявність медичного халату та шапочки.

ДР1.3 Підготовка обладнання

ДР1.3.1 Миття обладнання

Миття обладнання буде виконуватися вручну з використанням 2% розчину каустичної соди. Кількість цього робочого розчину визначена в ДР2.2.1. Температура миття становитиме 70-80 °С.

ДР1.3.2 Технічний огляд обладнання

Обладнання пройде наступні етапи: загальний технічний огляд, перевірка герметичності, пробний пуск і налаштування параметрів. Технічний огляд апаратури проводиться після миття та перед запуском процесу з метою виявлення наявності або відсутності дефектів.

ДР1.3.3 Перевірка на герметичність.

Ця стадія перш за все стосується основного ферментера і інокулятора. Для цього усі з'єднання апарату герметично затягуються, і до них подається аераційне повітря з надлишковим тиском в діапазоні 0,1-0,2 МПа. Потім заблоковується подача повітря, і

Потім повітря направляється на процес переохолодження для видалення вологості на краплеприймачі (Т-8), де його охолоджують до температури 25-30 °С. Після цього воно поступає до резервуара (ресивера).

ДР2.5 Нагрівання повітря

Після проходження процесу переохолодження на теплообміннику, повітря підігрівається до температури 37 °С.

ДР2.6 Фільтрування на фільтрах високої очистки

Проводиться високоякісна очистка повітря за допомогою фільтрів другого і третього рівнів, використовуючи матеріали, такі як мікроскловолокно та фторопласт (Ф-9).

ДР 2.7 Фільтрування на фільтрах індивідуальної очистки перед ферментерами.

Перед тим, як повітря потрапляє до ферментера, воно проходить через окремий фільтр, в даному випадку використовуються фільтри з фторопластовим матеріалом, що забезпечує очищення повітря на рівні 99,999% (ФІ14,15).

ДР 3 Приготування і стерилізація допоміжних розчинів ,

ДР 3.1. Приготування допоміжних титрувальних розчинів

Для регулювання рівня рН приблизно береться 3-4 мл на літр середовища (культуральної рідини) кожного з компонентів, таких як 6% розчин соляної кислоти та 10% розчин гідроксиду натрію. У виробничому ферментері, де кількість культуральної рідини на початку процесу становить 33 л, і у інокуляторі - 3,3 л, для приготування допоміжних розчинів потрібно взяти на 37 л культуральної рідини, що складає 150 мл (при умові взяття 4 мл на літр).

ДР 3.1.1. Приготування розчину НСІ

До колби об'ємом 250 мл додають 124,5 мл питної води та 25,5 мл 36% соляної кислоти, що призводить до утворення 150 мл 6% хлорної кислоти. Після цього проводиться стерилізація в автоклаві при температурі 131 °С протягом 40 хвилин.

ДР 3.1.2. Приготування та стерилізація розчину NaOH

На технічних вагах вимірюють 15 г гідроксиду натрію, який переносять у колбу об'ємом 250 мл, а потім додають 135 мл питної води. Після цього проводиться стерилізація в автоклаві при температурі 131 °С протягом 40 хвилин.

ДР 3.2 Приготування та стерилізація розчину піногасника

На технічних вагах вимірюють 350 г піногасника, який потім переносять у колбу об'ємом 3000 мл. До колби додають 1410 мл питної води і проводять перемішування. Після цього здійснюється стерилізація в автоклаві при температурі 131 °С протягом 30 хвилин.

ДР 4. Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 4.1 Приготування і стерилізація поживного середовища для одержання посівного матеріалу у колбах на качалках.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 3150 мл середовища.

Табл.4.1.

| Компоненти поживного середовища | Концентрація компонентів г/л | Кількість компонентів поживного середовища на 2835 мл, г | Композиція | Об'єм композиції, мл |
|---|-------------------------------------|---|-------------------|-----------------------------|
| Крохмаль Соєве борошно | 8,9 3,3 | 27,9 10,37 | А | 1500 |
| K ₂ HPO ₄ CaCO ₃ FeSO ₄ NaCl | 0,8 4 0,03 0,1 | 2,5 12,6 0,093 0,308 | Б | 1650 |

ДР 4.1.1 Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах вимірюють 27,9 г крохмалю та 10,37 г соєвого борошна. Потім цю вагу переносять у колбу об'ємом 4000 мл, до якої вже налито 1500 мл води, що нагрівається до 80°C. Доданий матеріал перемішують, а потім витримують при цій температурі, продовжуючи перемішувати протягом 10 хвилин, щоб забезпечити повне заварювання. Після цього суміш фільтрують через паперовий фільтр і переносять у колбу об'ємом 4000 мл. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 121°C протягом 20 хвилин.

ДР 4.1.2 Приготування і стерилізація композиції Б

На аналітичних вагах вимірюють 2,5 г гідрофосфату калію, 12,6 г карбонату кальція, 0,093 г сульфату феруму та 0,308 г хлориду натрія. Потім цю наважку поміщають у колбу об'ємом 2000 мл і додають 1650 мл питної води. Змішують розчин. Далі розчин підкислюють додаванням розчину соляної кислоти до досягнення рН 4.5 (згідно з документом рецептури 3.1). Після цього колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C протягом 20 хвилин.

ДР 4.3 Приготування і стерилізація 31.85 л поживного середовища для одержання посівного матеріалу у посівному апараті об'ємом 63 л

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 31,85 л середовища.

Табл.4.2

| Компоненти поживного середовища | Концентрація компонентів г/л | Кількість компонентів поживного середовища на 31.85 л, г | Композиція | Об'єм композиції, л |
|--|-------------------------------------|---|-------------------|----------------------------|
| Крохмаль | 8.9 | 279 | А | 15 |
| Соєве борошно | 3.3 | 103,7 | | |
| K ₂ HPO ₄ | 0,8 | 25 | Б | 16,5 |
| CaCO ₃ | 4 | 126 | | |
| FeSO ₄ | 0,03 | 0,93 | | |
| NaCl | 0,1 | 3,08 | | |

ДР 4.2.1 Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах вимірюють 279 г крохмалю та 103,7 г соєвого борошна. Потім цю наважку поміщають у реактор об'ємом 64 л, де налито 15 л води, і нагрівають до 80 °С. Після цього наважку додають поступово у реактор і перемішують. Реактор змістом утримують при даній температурі протягом 10 хвилин з постійним перемішуванням для повного заварювання. Далі отриманий розчин фільтрують і перекачують у ферментер об'ємом 63 л. Після цього запірні арматура ферментера закривається, а сам ферментер стерилізується в автоклаві при температурі 121 °С протягом 20 хвилин.

ДР 4.2.2 Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах вимірюють 25 г гідрофосфату калія, 126 г карбонату кальція, 0,93 г сульфату феруму та 3,08 г хлориду натрія. Цю наважку поміщають у реактор об'ємом 63 л, додають 16,5 л питної води і перемішують. Далі розчин підкислюють за допомогою розчину соляної кислоти з рН 3.1 до рН 4.5. Закривають запірну арматуру і проводять стерилізацію в цьому реакторі при температурі 131 °С протягом 20 хвилин.

ДР 4.3 Приготування і стерилізація 318,5 л поживного середовища для одержання посівного матеріалу у посівному апараті об'ємом 630 л.

Табл.4.3

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 318,5 л середовища.

| Компоненти поживного середовища | Концентрація компонентів г/л | Кількість компонентів поживного середовища на 318.5 л, г | Композиція | Об'єм композиції, л |
|--|-------------------------------------|---|-------------------|----------------------------|
| Крохмаль | 8,9 | 2790 | А | 150 |
| Соєве борошно | 3,3 | 1037 | | |
| K ₂ HPO ₄ | 0,8 | 250 | Б | 165 |
| CaCO ₃ | 4 | 1260 | | |
| FeSO ₄ | 0,03 | 9,3 | | |
| NaCl | 0,1 | 30,8 | | |

ДР 4.3.1 Приготування і стерилізація композиції А

Через об'ємно-ваговий дозатор вимірюють 2790 г крохмалю та 1037 г соєвого борошна. Ці речовини поміщають у реактор об'ємом 630 л, додають 150 л води і нагрівають до 80 °С. Наважку додають у реактор поступово і перемішують. При даній температурі витримують протягом 10 хвилин, щоб забезпечити повне заварювання. Потім отриманий розчин фільтрують через фільтр і перекачують у ферментер об'ємом 630 л. Після цього запірна арматура закривається, і проводиться стерилізація при температурі 121 °С протягом 20 хвилин.

ДР 4.3.2 Приготування і стерилізація композиції Б

Через об'ємно-ваговий дозатор вимірюють 250 г гідрофосфату калія, 1260 г карбонату кальція, 9,3 г сульфату феруму та 30,8 г хлориду натрія. Ці речовини поміщають у реактор об'ємом 630 л, додають 165 л питної води і перемішують. Після цього розчин кислоти соляної від ДР 3.1 підкислюють до досягнення рН 4.5. Запірна арматура закривається, і проводиться стерилізація у цьому реакторі при температурі 131 °С протягом 20 хвилин.

ДР 4.4 Приготування і стерилізація 3185 л поживного середовища для одержання гентаміцину у виробничому ферментері об'ємом 6300 л

Табл.4.4

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 3185 л середовища.

| Компоненти поживного середовища | Концентрація компонентів г/л | Кількість компонентів поживного середовища на 2835 л, кг | Композиція | Об'єм композиції, л |
|--|-------------------------------------|---|-------------------|----------------------------|
| Крохмаль | 8,9 | 27,9 | А | 1500 |
| Соєве борошно | 3,3 | 10,37 | | |
| K ₂ HPO ₄ | 0,8 | 2,5 | Б | 1650 |
| CaCO ₃ | 4 | 12,6 | | |
| FeSO ₄ | 0,03 | 0,093 | | |
| NaCl | 0,1 | 0,308 | | |

ДР 4.4.1 Приготування і стерилізація композиції А

Через об'ємно-ваговий дозатор вимірюють 27,9 кг крохмалю та 10,37 кг соєвого борошна. Ці компоненти поміщають у реактор об'ємом 6300 л, додають 2000 л води та нагрівають до 80 °С. Наважені речовини додаються поступово у реактор та здійснюється перемішування. При даній температурі із перемішуванням витримують протягом 10 хвилин для повного заварювання. Після цього розчин фільтрують через фільтр та перекачують у ферментер об'ємом 6300 л. Запірна арматура закривається, і проводиться стерилізація при температурі 121 °С протягом 20 хвилин.

ДР 4.4.2 Приготування і стерилізація композиції Б

Через об'ємно-ваговий дозатор вимірюють 2,5 г гідрофосфату калія, 12,6 кг карбонату кальція, 0.093 кг сульфату феруму та 0,308 кг хлориду натрія. Ці компоненти поміщають у реактор об'ємом 2000 л, додають 1650 л питної води та здійснюють перемішування. Для підкислення розчину з рівня рН 3.1 до рН 4.5 використовують розчин соляної кислоти. Після цього запірна арматура закривається, і проводиться стерилізація в цьому реакторі при температурі 131 °С протягом 20 хвилин.

ТП 5. Підготовка посівного матеріалу

ТП 5.1 Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру *Micromonospora echinospora subs pallida* (МТСС 708) зберігають у формі ліофільно-висушеної культури, яка знаходиться у ампулах. Це необхідно, оскільки звичайне зберігання на скошеному агарі чи у холодильнику у формі суспензійної культури може призвести до втрати продуцентних властивостей через реверсію ознак. Перед початком біосинтезу, культуру висіюють у пробірки зі скошеним МПА. Усі маніпуляції з колекційною культурою проводяться виключно в асептичних умовах.

ТП 5.2 Одержання робочої культури на агаризованих середовищах.

Колекційну культуру відновлюють шляхом висіву у пробірки з МПА, після чого за допомогою мікробіологічної петлі розсівають її на ізолювані колонії на чашки Петрі з МПА. Культуру вирощують протягом 48 годин при температурі 32 °С.

ТП 5.3 Вирощування культури на агаризованих середовищах

Отримані ізолювані колонії від ТП 5.2 переносять до пробірок зі скошеним МПА. Для засіву однієї пробірки використовується одна ізолювана колонія. При пересадці до пробірок зберігають відстань не менше 1-2 см між колоніями. Вирощування проводять протягом 48 годин при температурі 32 °С.

ТП 5.4 Вирощування культури в колбах на качалках

Для вирощування посівного матеріалу використовують колбу об'ємом 0.5 л. У асептичних умовах додають усю композицію А (від ДР 4.1.1) та композицію Б (від ДР 4.1.2) до колби і перемішують. Загалом отримується 315 мл розчину. Розчин перемішують і розливають по 100 мл у трійку стерильних качалочних колб об'ємом 750 мл. До кожної колби додають посівний матеріал з пробірок, що були засіяні продуцентом раніше на МПА. Параметри культивування включають температуру 32 °С та тривалість 48 годин.

ТП 5.5 Вирощування культури в посівному апараті об'ємом 63 л (коефіцієнт заповнення 0,5 – отримання культури об'ємом 31,85 л,)

До посівного апарату об'ємом 63 л додають стерильну композицію А (ДР 4.2.1) та стерильну композицію Б з ДР 4.2.2. Далі, через трубу перетиснення з коли на качалках (ТП.5.4), вводять 3,15 л посівного матеріалу. Додають стерильний розчин піногасника від ДР 1.1. Здійснюють перемішування та починають процес культивування. Параметри культивування включають рН-6.8, температуру 32 °С, тривалість 48 годин і аерацію з перемішуванням швидкістю 250 об/хв.

ТП 5.6 Вирощування культури в посівному апараті об'ємом 630 л (коефіцієнт заповнення 0,5 – отримання культури об'ємом 318,5 л,)

У посівний апарат об'ємом 630 л, де вже міститься стерильна композиція А (ДР 4.3.1), додають стерильну композицію Б (ДР 4.3.2). Потім вводять 31,85 л посівного матеріалу з попередньої стадії вирощування, який був зібраний у 63-літровому посівному апараті (ТП.5.5), через трубу перетиснення. Здійснюють перемішування та додають стерильний розчин піногасника від ДР 1.1, після чого розпочинають процес культивування. Параметри культивування включають рН-6.8, температуру 32 °С, тривалість - 48 годин, аерацію і перемішування швидкістю 250 об/хв.

ТП 6. Біосинтез

ТП 6.1 Виробниче культивування

Виробниче культивування здійснюють у ферментері з робочим об'ємом 6,3 м³. У ферментер, де вже міститься композиція А (від ДР 5.4.1), в асептичних умовах вводять розчин композиції Б (від ДР 5.4.2) та посівний матеріал через трубу перетиснення. Кількість посівного матеріалу становить 318,5 л і він поступає з посівного апарата об'ємом 630 л (ТП 5.6). Під час процесу культивування підтримують аерацію на рівні розчиненого кисню (рО₂) в межах 40-50% від насичення повітрям. Також додають розчин піногасника від ДР 1.1. Параметри культивування включають температуру 32 °С, рН 6,8 і перемішування зі швидкістю 250 об/хв. Культивування триває протягом 72 годин, а культуру вирощують до середини стаціонарної фази росту. Кожні 4 години беруть проби для аналізу процесу ферментації, включаючи концентрацію гентаміцину, кількість джерел вуглецю і азоту у культуральній рідині та концентрацію біомаси. Процес ферментації триває орієнтовно до 72 годин, а зупиняють його, коли досягнута максимальна концентрація гентаміцину, яка становить 1,02 г/л.

РОЗДІЛ 8

Контроль виробництва

Під час виробничого культивування періодично (кожні 4 години) забирають проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю, визначення концентрації біомаси та вмісту джерела вуглецю. Об'єм кожної проби становить 100 мл.

8.1. Карта постадійного контролю

Карта постадійного контролю виробництва гентаміцину.

| Номер контрольної точки та назва стадії | Об'єкт контролю та показник, що визначається | Засоби та методи контролю | Періодичність перевірки та порядок відбору проб | Нормативна характеристика показника, що визначається |
|--|--|---------------------------|---|--|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Кх, 1.1.1 Приготування розчину хлорного вапна | Концентрація розчину засобу Dez-3 | Хімічний метод | Після приготування розчину | C=2% |
| Кх, 1.1.2 Приготування розчину засобу Біомой | Концентрація розчину каустичної соди | Хімічний метод | Після приготування розчину | C=0,3% |

| | | | | | | | | |
|-------------|------|----------------|--------|------|--------------------------------|-------------|------|---------|
| | | | | | НУХТ БТЕК 05.01.19 КР ПЗ | | | |
| Змн. | Арк. | № докум. | Підпис | Дата | | | | |
| Розроб. | | Зінченко О.С. | | | РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва | Літ. | Арк. | Акрушів |
| Перевір. | | Пенчук Ю.М. | | | | | 52 | 72 |
| Консультант | | | | | | Кафедра БТМ | | |
| Н. Контр. | | | | | | | | |
| Затверд. | | Стабніков В.П. | | | | | | |

Таблиця 8.1

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---|--|----------------------------------|---|---|
| Кт 1.2.1 Підготовка виробничих приміщень | Підлога, стіни, обладнання ,чистота | Візуальний огляд | Після прибирання | Чисте приміщення, відсутність пилу та бруду |
| Кт 1.3.1 Миття розбірних частин обладнання | Розбірні частини обладнання, мийний розчин, його температура, чистота | Термометр технічний | Під час проведення операції | $T = 45^{\circ}\text{C}$ |
| Кт 1.3.2 Миття обладнання | Мийний розчин для обладнання, температура мийного розчину, чистота | Термометр технічний, годинник | Під час проведення операції | $T = 45^{\circ}\text{C}$ t- 1-2 год |
| Кт 1.3.3 Перевірка на герметичність | Герметичність роботи обладнання, час роботи, тиск | Манометр технічний, годинник | Тис визначається безперервно під час виконання операції | t- 0,5 год $P = 0.07\text{мПа}$ |

| | | | | |
|--|---|---|--|---|
| Кт 1.3.4 Стерилізація обладнання | Обладнання, температура стерилізації, час | Термометр, годинник | Температура визначається безперервно під час виконання операції | t- 0,5 год T=135 ⁰ С |
| Кт 2.2.2 Грубе очищення повітря | Повітря на виході з фільтрів грубої очистки, ступінь очищення, перепад тисків | Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорта фільтра | Після очистки повітря на фільтрі грубої очистки | E= 80 |
| Кт 2.2.3 Компресування повітря | Стиснене повітря, температура, тиск | Манометр технічний, термометр технічний | Після компресування повітря | P= 0,35-0,5 МПа, t= 220-250 ⁰ С |
| Кт 2.2.4 Охолодження повітря | Охолоджене повітря, температура | термометр технічний | Після охолодження повітря | t= 25-40 ⁰ С |
| Кт 2.2.5 Видалення зайвої вологи | Повітря після видалення вологи | Психрометричний метод | Після видалення зайвої вологи | W=60% |
| Кт 2.2.6 Нагрівання повітря | Нагріте повітря, температура | термометр технічний | Після нагрівання повітря | t= 37 ⁰ С |

| | | | | |
|---|--|--|---|--|
| Кт 2.2.7 Тонке очищення повітря | Очищене повітря, ступінь очищення, перепад тисків | Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорта фільтра | Після очищення повітря у фільтрі тонкої очистки | E= 99% |
| Кт 2.2.8 Очищення повітря на індивідуальному фільтрі | Очищене повітря, ступінь очищення | Перевірка ступеня очищення згідно паспорта фільтра | Під час очищення повітря у фільтрі | E= 99,99% |
| Кт, Кх 3.1.1 Приготування і стерилізація розчину соляної кислоти | Концентрат соляної кислоти, температура, час, стерильність, концентрація | Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль | Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після | C= 6% T=131 ⁰ C t=40 хв Відсутність мікробіоти |
| Кт, Кх 3.1.2 Приготування і стерилізація розчину гідроксиду натрію | Сухий гідроксид натрію, температура, час, стерильність, концентрація | Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль | Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після | C= 6% T=131 ⁰ C t=40 хв відсутність мікробіоти |

| | | | | |
|---|--|--|---|--|
| Кт, Кх 3.2 Приготування і стерилізація розчину піногасника | Сухий гідроксид натрію, температура, час, стерильність, концентрація | Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль | Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після | C= 10 % T=131 ⁰ C t=30 хв відсутність мікробіоти |
| Кт, Км 4.1.1 Приготування і стерилізація композиції А | Композиція А, температура, час, стерильність. | Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль | Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після | T=121 ⁰ C t=20 хв Відсутність мікробіоти |
| Кт, Км 4.1.2 Приготування і стерилізація композиції Б | Композиція В, температура, час, стерильність. | Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль | Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після | T=131 ⁰ C t=20 хв Відсутність мікробіоти |
| Кт, Км 4.2.1 Приготування і стерилізація композиції А | Композиція А, температура, час, стерильність. | Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль | Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний | T=121 ⁰ C t=20 хв |

| | | | | |
|--|---|--|---|---|
| | | | контроль- після | Відсутність мікробіоти |
| Кт, Км 4.2.2 Приготування і стерилізація композиції Б | Композиція Б , температура, час, стерильність. | Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль | Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після | T=131 ⁰ C t=20 хв Відсутність мікробіоти |
| Кт, Км 4.3.1 Приготування і стерилізація композиції В | Композиція В , температура, час, стерильність. | Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль | Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після | T=131 ⁰ C t=20 хв Відсутність мікробіоти |
| Кт, Км 4.3.1 Приготування і стерилізація композиції А | Композиція А , температура, час, стерильність. | Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль | Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після | T=121 ⁰ C t=20 хв Відсутність мікробіоти |

| | | | | |
|--|--|---|--|--|
| Кт, Км 4.3.2 Приготування і стерилізація композиції Б | Композиція Б , температура, час, стерильність. | Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль | Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після | T=131 ⁰ C t=20 хв Відсутність мікробіоти |
| Кт, Км 4.4.1 Приготування і стерилізація композиції А | Композиція А , температура, час, стерильність. | Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль | Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після | T=121 ⁰ C t=20 хв Відсутність мікробіоти |
| Кт, Км 4.4.2 Приготування і стерилізація композиції Б | Композиція Б , температура, час, стерильність. | Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль | Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після | T=131 ⁰ C t=20 хв Відсутність мікробіоти |

| | | | | |
|--|---|--|--|--|
| <p>Кт, Км, Кх 5.4</p> <p>Вирощування посівного матеріалу у колбах на качалках</p> | <p>Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість</p> <p>перемішування, чистота культури</p> | <p>Термометр технічний, годинник, тахометр, рН-метр</p> <p>мікробіологічний контроль</p> | <p>Під час вирощування посівного матеріалу в інокуляторі</p> | <p>$T=32^{\circ}\text{C}$</p> <p>$t=48$ год</p> <p>Відсутність сторонньої мікробіоти</p> |
| <p>Кт, Км, Кх 5.5</p> <p>Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі на 63 л</p> | <p>Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість</p> <p>перемішування, чистота культури</p> | <p>Термометр технічний, годинник, тахометр, рН-метр</p> <p>мікробіологічний контроль</p> | <p>Під час вирощування посівного матеріалу в інокуляторі</p> | <p>$T=32^{\circ}\text{C}$</p> <p>$t=48$ год</p> <p>$\text{pH}=6,8$</p> <p>Відсутність сторонньої мікробіоти</p> |

| | | | | |
|---|---|--|--|--|
| <p>Кт, Км, Кх 5.6</p> <p>Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі на 630 л</p> | <p>Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, чистота культури</p> | <p>Термометр технічний, годинник, тахометр, рН-метр мікробіологічний контроль</p> | <p>Під час вирощування посівного матеріалу в інокуляторі</p> | <p>$T=32^{\circ}\text{C}$ $t=48$ год\ $\text{pH}=6,8$ Відсутність сторонньої мікробіоти</p> |
| <p>Кт, Км, Кх 6.1</p> <p>Виробничий біосинтез у ферментері на 50 л</p> | <p>Культуральна рідина, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, чистота культури, концентрація доксорубіцину.</p> | <p>Термометр технічний, годинник, тахометр, рН-метр мікробіологічний контроль, фотоколориметричний метод визначення концентрації доксорубіцину</p> | <p>Під час вирощування культури в ферментері, відбір проб: кожні 6-8 годин</p> | <p>$T=32^{\circ}\text{C}$ $\text{pH}=6,8$ $t=72$ год Відсутність сторонньої мікробіоти, $C = 1.02$ г/л</p> |

8.2 Мікробіологічний контроль

Для мікроскопування за фарбуванням по Граму використовують препарати, які називаються "роздавлена крапля". Приготування препарату "роздавлена крапля" включає нанесення невеликої краплі культуральної рідини на знежирене предметне скло, покриття його накривним скельцем і подальше спостереження під об'єктивом збільшення 40х або з імерсійною системою на $\times 90$. Під час оцінки морфолого-культуральних ознак продуцента особливу увагу звертають на характерні особливості клітин.

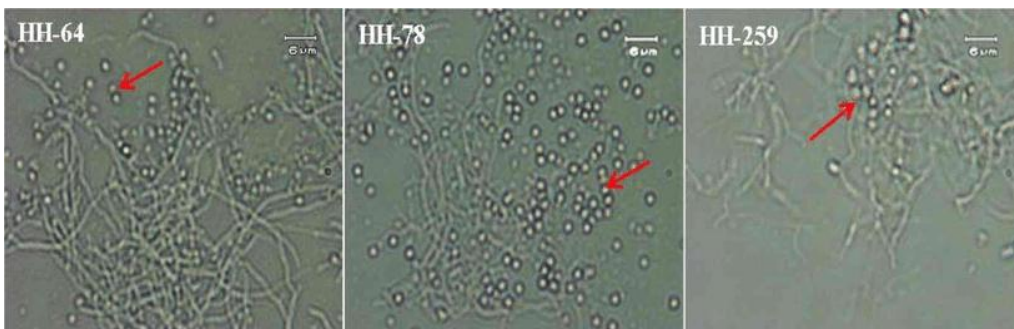


Рисунок 8.2 *Micromonospora echinospora* при світловій мікроскопії.

8.3 Показники росту і синтезу цільового продукту

8.3.1 Концентрація біомаси.

Для визначення концентрації біомаси у *Micromonospora echinospora* можна використовувати різні методи, в залежності від доступних засобів та вимог дослідження. Один із широко застосовуваних методів - це вимірювання оптичної щільності культурної рідини за допомогою спектрофотометра.

1. Підготування проби: Зібрати достатню кількість культурної рідини *Micromonospora echinospora*. Відфільтрувати розчин через мембранний фільтр, щоб видалити дрібні частинки та клітини.
2. Вимірювання оптичної щільності: Використовуючи спектрофотометр, виміряти оптичну щільність культурної рідини при довжині хвилі, що відповідає максимальному поглинанню *Micromonospora echinospora*

(зазвичай близько 600-700 нм).

3. Калібрування: Провести калібрування спектрофотометра з відомими концентраціями біомаси *Micromonospora echinospora* для створення градуювальної кривої.
4. Визначення концентрації: За допомогою градуювальної кривої встановити відповідність між оптичною щільністю і концентрацією біомаси *Micromonospora echinospora*. Визначити концентрацію біомаси в пробі, використовуючи виміряну оптичну щільність.

Цей метод можна комбінувати з іншими техніками, такими як вимірювання сухої маси клітин після їх вагового визначення, що дозволяє отримати більш точні результати. Залежно від специфіки дослідження та доступних ресурсів, можуть бути використані інші методи, наприклад, визначення концентрації біомаси за допомогою газової хроматографії, спектроскопії ядерного магнітного резонансу тощо.

8.3.2 Концентрація цільового продукту

Для визначення гентаміцину застосовується фотометричний метод, який ґрунтується на утворенні забарвленої сполуки під час реакції з ацетоацетоном. Ця сполука вимірюється фотоелектроколориметром. Принцип методу полягає у формуванні стійкої сполуки між гентаміцином та ацетоацетоном, інтенсивність забарвлення якої відображає концентрацію гентаміцину. Цю концентрацію можна визначити за допомогою градуювального графіка.

Для початку беруть 25 мл культурної рідини, яку центрифугують протягом 5 хвилин зі швидкістю 6000 обертів на хвилину. Отриманий супернатант переносять до окремої колби. До цієї колби додають 5 мл 0.1% розчину соляної кислоти, перемішують і залишають у темному місці протягом 5 хвилин. Потім оброблений супернатант розбавляють водою у співвідношенні 1:10.

Також готують допоміжні реактиви. Для отримання реактиву С для проведення кольорової реакції, у мірний циліндр об'ємом 150 см³ вносять 50 см³ буферної суміші з рН 2,56, 4,0 см³ ацетоацетону та 10,0 см³ 30% розчину формальдегіду.

Потім все перемішують і доводять об'єм до 150 см³ буферною сумішшю.

Буферну суміш з рН 2,56 готують шляхом змішування реактиву А та реактиву Б.

Для приготування реактиву А вагу (22,530 ± 0,001) г ортофосфорної кислоти з масовою часткою основної речовини 87% поміщають у хімічний стакан об'ємом 100 см³, до якого додають приблизно 50 см³ дистильованої води і перемішують. Аналогічним чином розчиняють вагу (12,000 ± 0,001) г льодяної оцтової кислоти та вагу (12,360 ± 0,001) г борної кислоти. Отримані розчини переносять у мірну колбу об'ємом 1000 см³, в яку додають від 200 см³ до 300 см³ дистильованої води і доводять об'єм до мітки дистильованою водою.

Реактив Б є розчином натрію гідроксиду з молярною концентрацією 1 моль/дм³.

Далі змішують 1000 см³ реактиву А з 150 см³ реактиву Б, який виміряно за допомогою мірного циліндра. Значення рН вимірюють потенціометрично. Для градуювання готують розчини з гентаміцину сульфату з чистотою не менше 85%. Масова концентрація основного градуювального розчину складає 1000 мкг/см³, а робочого градуювального розчину - 20 мкг/см³.

Для підготовки градуювальних розчинів, до кожної пробірки додають по 2,5 см³ реактиву С. Після цього пробірки перемішують та нагрівають на водяній бані протягом 15 хвилин. Охолоджені пробірки з розчинами доводять об'єми до 5 см³, додавши дистильовану воду. Потім їх знову перемішують і вимірюють оптичну густину відносно розчину порівняння (розчин № 1 в таблиці 1). За отриманими даними будується градуювальний графік, де на вісі ординат відображається оптична густина розчину, а на вісі абсцис - маса речовини у мікрограмах. Для встановлення градуювальної залежності використовується метод найменших квадратів, який дозволяє визначити коефіцієнти а та b лінійної градуювальної функції.

8.3.3 Концентрація джерела вуглецю і азоту

Основним джерелом вуглецю в середовищі є крохмаль, який складається з

глюкози. Концентрація глюкози відповідатиме концентрації крохмалю. Однак для визначення цієї концентрації потрібно підготувати пробу. Культуральну рідину об'ємом 50 мл переносять у центрифужні пробірки та центрифугують протягом 10 хвилин при швидкості 3000 обертів за хвилину. Після цього відцентрифуговану суспензію фільтрують через фільтрувальний папір, а фільтрат відбирають у окрему ємність для подальших аналізів. До осаду додають ферментний препарат альфа-амілази і нагрівають суміш до 45-50 °C протягом 10-15 хвилин. Після цього фільтрують суспензію і до фільтрату додають препарат ферменту глюкаомілази. Утримують при тій самій температурі протягом 20 хвилин. Після цього суспензію фільтрують і використовують для визначення концентрації глюкози. Вимірювання концентрації глюкози проводиться за допомогою амперометричного перетворювального пристрою, що складається з триелектродної системи, включаючи платиновий робочий електрод, електрод порівняння та допоміжний електрод, всі об'єднані в одному друкованому електроді SensLab. Платинові друковані електроди SensLab були перевірені на відтворюваність та працездатність у потенціальному діапазоні від 0 до +600 мВ. Вимірювання проводяться, опускаючи датчик амперометричного пристрою до розчину з глюкозооксидазою та підготовленою культуральною рідиною.

Вимірювана величина є силою струму, яка виражається у наноамперах (нА). Концентрацію глюкози визначають за градуовальним графіком, який показує залежність між силою струму (нА) і концентрацією глюкози (мМ). Отримане значення концентрації спочатку множать на ступінь розведення, а потім переводять концентрацію з мілімоля на грами у певному об'ємі або грами на літр. Вміст вуглецю в глюкозі становить 40%, що означає, що 1 грам глюкози відповідає 0,4 граму вуглецю.

8.4 Показники якості готового продукту

Показники якості гентаміцину можуть варіюватися в залежності від форми випуску (порошок для приготування розчину, ін'єкційні розчини тощо) і виробника.

1. **Масова частка діючої речовини:** Зазвичай виражається у відсотках і визначає кількість гентаміцину у відповідній формі випуску.
2. **Розчинність:** Визначається умовами розчинення гентаміцину в різних розчинниках.
3. **Вологість:** Кількість води, яка може бути присутня в гентаміцині, визначається відсотками.
4. **Зовнішній вигляд:** Визначається стан гентаміцину (порошок, розчин тощо).
5. **Масова частка домішок:** Параметр, що вказує на вміст домішок і інших речовин, які не є гентаміцином.
6. **Стабільність:** Довготривала стабільність препарату при зберіганні та використанні.
7. **Мікробіологічні властивості:** Визначення відсутності мікроорганізмів та пірогенів.
8. **Ефективність:** Підтвердження здатності гентаміцину боротися з бактеріями та іншими мікроорганізмами.

РОЗДІЛ 9. Охорона довкілля

9.1. Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на місця емісії твердих, рідких та газоподібних відходів

Підприємство, під час своєї діяльності, генерує відходи, які потрібно видалити. До цих відходів входять вентиляційне та технологічне повітря, конденсат, культуральна рідина, промислові стоки та бракований матеріал. Для очищення повітря та культуральної рідини від продуктів метаболізму застосовують сепаратори та скрубери для їх виділення та подальшої очистки з метою повторного використання.

Некондиційний сівозмішувач та некондиційну культуральну рідину з ферментеру піддають термічній обробці, використовуючи гарячу пару під тиском 0,2 МПа та температурою 120 °С протягом 40 хвилин. Після цього рідину охолоджують до 25 °С, розбавляють водою і коригують рН середовища до рівня 7,0. Очищену рідину можна відпускати в загальну каналізаційну систему. Розчини дезінфікуючих і миючих засобів та відпрацьовану воду направляють до збірника для нейтралізації. Розводять водою та доводять рН середовища до 7,0 і також зливають в каналізаційну систему. Тверді відходи, такі як скло, рукавички, упаковочні матеріали, браковані флакони утилізуються на міському сміттєзвалищі.

9.2 Перспективи впровадження системи екологізації виробництва

Впровадження системи екологізації виробництва гентаміцину може мати численні переваги для довкілля та суспільства в цілому. Деякі з можливих перспектив включають:

| | | | | | | | | |
|-------------|------|----------------|--------|------|-------------------------------|-------------|------|---------|
| | | | | | НУХТ БТЕК 05.01.19 КР ПЗ | | | |
| Змн. | Арк. | № докум. | Підпис | Дата | | | | |
| Розроб. | | Зінченко О.С. | | | РОЗДІЛ 9. Охорона довкілля | Літ. | Арк. | Акрушів |
| Перевір. | | Пенчук Ю.М. | | | | | 66 | 72 |
| Консультант | | | | | | Кафедра БТМ | | |
| Н. Контр. | | | | | | | | |
| Затверд. | | Стабніков В.П. | | | | | | |

1. Зменшення викидів: Впровадження чистіших технологій і методів виробництва може допомогти зменшити викиди шкідливих речовин та забруднюючих речовин у навколишнє середовище.
2. Використання зелених технологій: Впровадження зелених технологій та інновацій може сприяти зменшенню використання шкідливих хімікатів і поліпшенню процесів виробництва.
3. Оптимізація використання ресурсів: Екологізація виробництва може призвести до ефективнішого використання ресурсів, таких як вода, енергія та сировина.
4. Вплив на біорізноманіття: Можливе вплив на розподіл антибіотиків у навколишньому середовищі і його можливий вплив на біорізноманіття. Дослідження цього питання може визначити можливі наслідки та сприяти розробці стратегій для мінімізації негативних впливів.
5. Посилення стандартів безпеки: Екологічні ініціативи можуть вимагати вдосконалення стандартів безпеки для промислових підприємств, що виробляють гентаміцин.
6. Створення позитивного іміджу компанії: Підприємства, які враховують екологічні аспекти виробництва, можуть здобути позитивний імідж в очах споживачів та покращити свою репутацію.

9.2.1 Система знешкодження та утилізації рідких відходів

Стічні води і їх очистка. В процесі отримання продуктів Мікробіологічний синтез споживає значну кількість води, яка потенційно може бути забруднена мікроорганізмами, мінеральними солями або органічними компонентами. У водостічних водах важливо контролювати вміст речовин, які можуть бути окислені бактеріями. Ступінь забруднення стічних вод оцінюється за показниками хімічного

споживання кисню (ХСК) і біологічного споживання кисню (БСК).

Існують різні методи очищення стічних вод, включаючи:

Механічний метод: використання решіток, сит, гідроциклонів, відстійників і сітчастих фільтрів для видалення твердих частинок.

Хімічний метод: додавання реактивів для осадження домішок або виділення газів для зменшення хімічної забрудненості.

Фізико-хімічний метод: використання процесів коагуляції, флокуляції, сорбції та флотації для видалення забруднень.

Біологічний метод: використання хімічних перетворень та утилізації органічних решток мікроорганізмами для зменшення біологічної забрудненості.

Ці методи дозволяють ефективно очищувати стічні води перед їх викидом в навколишнє середовище.

9.2.2. Система знешкодження та утилізація твердих відходів

Для обробки на цьому виробництві використовують фільтрувальні матеріали, які можна відновлювати за допомогою методу вимочування в гарячій воді та обробки дезінфікуючими розчинами. Ці матеріали постачаються з етапу очистки повітря.

Крім того, конденсат, що утворюється при нагріванні повітря, також піддається обробці, зокрема фільтруванню та очищенню, і подальше може бути використаний повторно.

9.2.3 Система знешкодження газоповітряних викидів

Основні заходи для зниження викидів у атмосферу включають проведення досліджень газоповітряних викидів мікробіологічних

підприємств та впровадження заходів, спрямованих на зменшення кількості мікроорганізмів, що потрапляють в атмосферу. Виявлено, що значний вміст мікроорганізмів спостерігається під час сушіння, упаковки та підготовки поживних середовищ

Очищення повітря від шкідливих домішок виконується за допомогою різних методів, серед яких важливі:

Абсорбція: цей метод використовується для очищення газових потоків від парів соляної кислоти, аміаку, оксиду сірки. Він полягає в поглинанні абсорбентами забруднюючих речовин, в результаті чого вони розчиняються або зв'язуються з газами.

Адсорбція: використовується для видалення шкідливих сполук з газів за допомогою адсорбентів, таких як активоване вугілля, цеоліти, силікагель.

Термічна нейтралізація: цей метод базується на здатності горючих токсичних елементів окислюватися до менш токсичних сполук за умов високої температури та наявності вільного кисню в газовій суміші.

Хемосорбція — це процес поглинання газів твердими і рідкими речовинами з утворенням слабозчинних сполук. Для реалізації цього методу використовуються спеціальні пристрої, такі як скрубери та Вентурі.

Каталітичний метод передбачає перетворення токсичних компонентів промислових викидів у менш шкідливі речовини за допомогою каталізаторів, введених у систему. Цей метод сприяє зниженню впливу викидів на навколишнє середовище.

9.2.4 Заходи щодо зменшення об'ємів відходів

Один із важливих заходів для зменшення викидів мікроорганізмів в

навколишнє середовище - це герметизація всього обладнання, такого як ферментери, сушарки і обладнання вузла сепарації [Бортников, Босенко, 1982]. Концентрація шкідливих речовин в повітрі обслуговуваної зони апаратів і всередині апаратів повинна дотримуватися гранично допустимих значень, визначених в ГОСТ 12.1.005 [ГОСТ 12.1.005-88. Система стандартів безпеки праці. Загальні санітарно-гігієнічні вимоги до повітря робочої зони].

Склади мікробіологічних підприємств призначені для зберігання сировини, допоміжних матеріалів і кінцевої продукції. Під час їх проектування враховується зручність розміщення, безпека проведення робіт і уникнення можливості пожег та вибухів. З особливою увагою слід зберігати речовини, які можуть бути шкідливими для здоров'я людини, зокрема кислоти, луки та інші токсичні сполуки.

На виробництві обов'язковий регулярний контроль за наявністю у повітрі токсичних і хімічних речовин, а також перевірки параметрів вологості, температури і тепловиділення. Створення оптимальних умов досягається за допомогою автоматизації обладнання та систем вентиляції.

Відповідальність за дотримання правил безпеки, виконання заходів і виконання вказівок, зазначених у відповідних актах, несуть керівники підприємства, головні інженери, спеціалісти, начальники цехів та керівники підрозділів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Антибіотики останнього покоління та їх використання в медицині України [Електронний ресурс] // Центральна Всеукраїнська бібліотека. – Режим доступу: <http://xn--80aja6bcnk.com.ua/referati/24-medicina/1137-referat-na-temu-antibiotikiostannogo-pokolinnja.html>
2. Т.П. Пирог, О.А. Ігнатова. Загальна біотехнологія. / Підручник. – К.: НУХТ, 2009. – 9-18с.
3. Satoko Yoshizawa et al. Structural origins of gentamicin antibiotic action. The EMBO Journal (1998) 17, 6437 — 6448. doi:10.1093/emboj/17.22.6437
4. Гентаміцин, характеристика препарату [Електронний ресурс] : режим доступу: <http://mozdocs.kiev.ua/likiview.php?id=3374>
5. Розчин для інекцій [Електронний ресурс] : режим доступу: https://vetmarket.biz.ua/catalog/antibakterialnye_preparaty/gentamitsin_4_rastvor_dlya_inektsiy_100_ml_o_1_kar_olkar/
6. Фізико-хімічні властивості гентаміцину [Електронний ресурс] : режим доступу: <https://ru.wikipedia.org/wiki/Гентамицин> Гентаміцин, характеристика препарату [Електронний ресурс] : режим доступу: <http://mozdocs.kiev.ua/likiview.php?id=3374>
7. Засібмиючий. Електронний ресурс: [режим доступу] : https://primaterra.ua/p1079244645-miyuchij-zasib-dlya.html?gclid=EAIaIQobChMI-JG6qPuF7QIVRBV7Ch2bQQi7EAYYBCABEgLTfhD_BwE
8. Концентрація біомаси [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://studfiles.net/preview/5194349/page:18/>
9. Горюшкіна Т. Б, О. В. Остроухова. В. О, Солдаткін.О .П, Дзядевич С. В. Оптимізація методики визначення вмісту глюкози у виноматеріалі ензимним амперометричним біосенсором//– УДК 577.15:573.6. БІОТЕХНОЛОГІЯ. - 2009. – Т 2 , N 1. – . Ст . 89-93.

10. Визначення концентрації гентаміцину [Електронний ресурс] – Режим доступу: <http://protox.medved.kiev.ua/index.php/ru/categories/method-of-toxicological-and-toxicological-hygienic-testing/item/92-the-procedure-of-measuring-the-mass-concentration-of-gentamicin-sulfate-in-the-working-zone-air-by-the-spectrophotometric-method>
11. Neubauer, P., & Cruz, N. (2012). Microbial processing of oxygenated terpenoids. *Applied microbiology and biotechnology*, 95(4), 863-875.
12. Ogawara, H. (2014). Biosynthesis of aminoglycosides and their derivatives. *Journal of bioscience and bioengineering*, 118(3), 267-271.
13. Pantazaki, A. A., & Pritsa, A. A. (2013). Enhancing antibiotic production through genetic engineering of *Streptomyces* species. *Current pharmaceutical biotechnology*, 14(9), 839-857.
14. Pawlik, K., Kotowska, M., & Łażewska, D. (2018). Antibiotic resistance: current problems and possible solutions. *Acta biochimica polonica*, 65(4), 379-394.
15. Singh, G., Kapoor, M., Sobti, R. C., & Arya, R. K. (2016). Isolation and characterization of novel indigenous actinomycetes for antibiotic production from soil samples of Uttarakhand region, India. *Acta microbiologica et immunologica Hungarica*, 63(2), 199-210.