

**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)

\_\_\_\_\_  
(підпис)

Грегірчак Н.М.  
(прізвище та ініціали)

« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2020 р.

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

\_\_\_\_\_  
(підпис)

Пирог Т.П.  
(прізвище та ініціали)

« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2020 р.

**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: Культивування *Streptomyces natalensis* для одержання Натаміцину

Виконав: здобувач IV курсу, групи 3

Цапко Софія Олександрівна

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

\_\_\_\_\_  
(підпис)

Керівник Красінько Вікторія Олегівна

(прізвище, ім'я та по батькові повністю)

\_\_\_\_\_  
(підпис)

Консультанти Клименко О.М.

(прізвище та ініціали)

\_\_\_\_\_  
(підпис)

\_\_\_\_\_  
(прізвище та ініціали)

\_\_\_\_\_  
(підпис)

Рецензент Котинський А.В.

(прізвище та ініціали)

\_\_\_\_\_  
(підпис)

Засвідчую, що в цій кваліфікаційній роботі немає запозичень із праць інших авторів без відповідних посилань.

Здобувач \_\_\_\_\_  
(підпис)

Київ – 2020 р.

# НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

(шифр і назва)

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(шифр і назва)

Освітньо-професійна програма "Біотехнології: фармацевтична, промислова,

(назва)

харчова, природоохоронна"

## ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

Пирог Т.П.

«17» березня 2020 року

## ЗАВДАННЯ

### НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Цапко Софії Олександрівні

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Культивування *Streptomyces natalensis* для одержання Натаміцину

керівник роботи Красінько В.О., к.т.н., доцент

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

затверджені наказом вищого навчального закладу від «16» березня 2020 року № 227-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 01 червня 2020 року

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Streptomyces natalensis*,  
цільовий продукт: натаміцин

4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)  
РОЗДІЛ 1. Характеристика натаміцину. РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та  
характеристика біологічного агента. РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування.  
РОЗДІЛ 4. Біосинтез натаміцину. РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми  
виробництва натаміцину. РОЗДІЛ 6. Матеріальний баланс і розрахунок обладнання.  
РОЗДІЛ 7. Специфікація обладнання. РОЗДІЛ 8. Опис технологічної схеми виробництва  
натаміцину. РОЗДІЛ 9. Контроль виробництва натаміцину. РОЗДІЛ 10. Автоматизація  
ділянки виробництва натаміцину

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема виробництва натаміцину – 2 аркуші формату А1. Апаратурна схема  
виробництва натаміцину – 2 аркуші формату А1. Схема автоматизації ділянки  
дезінтеграції клітин і екстракції натаміцину – 1 аркуш формату А3

## 6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
10.	Клименко Олег Миколайович, доцент, к.т.н., кафедра автоматизації та комп'ютерних технологій систем управління	23.03.2020	24.04.2020

7. Дата видачі завдання «17» березня 2020 року

## КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1.	Характеристика натаміцину	20.03.2020 – 25.03.2020	
2.	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	25.03.2020 – 31.03.2020	
3.	Техніко-економічне обґрунтування	01.04.2020 – 07.04.2020	
4.	Біосинтез натаміцину	08.04.2020 – 14.04.2020	
5.	Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва натаміцину	14.04.2020 – 20.04.2020	
6.	Матеріальний баланс і розрахунок обладнання	21.04.2020 – 27.04.2020	
7.	Специфікація обладнання	28.04.2020 – 03.05.2020	
8.	Опис технологічної схеми виробництва натаміцину	04.05.2020 – 10.05.2020	
9.	Контроль виробництва натаміцину.	11.05.2020 – 16.05.2020	
10.	Автоматизація ділянки виробництва натаміцину	17.05.2020 – 20.05.2020	
11.	Оформлення пояснювальної записки	21.05.2020-31.05.2020	
12.	Виконання графічної частину проекту	21.05.2020 - 31.05.2020	

Здобувач \_\_\_\_\_

(підпис)

Цапко С.О. \_\_\_\_\_

(прізвище та ініціали)

Керівник роботи \_\_\_\_\_

(підпис)

Красінько В.О. \_\_\_\_\_

(прізвище та ініціали)

## ЗМІСТ

РЕФЕРАТ.....	6
ВСТУП.....	7
<b>РОЗДІЛ 1. Характеристика натаміцину.....</b>	<b>9</b>
1.1 Фізико-хімічні властивості натаміцину.....	9
1.2 Фармакологічні властивості препарату.....	10
1.3 Застосування натаміцину в клінічній практиці.....	12
1.4 Застосування натаміцину в харчовій промисловості.....	13
<b>РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента.....</b>	<b>15</b>
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	15
2.2. Розрахунок складу поживного середовища.....	24
2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки <i>Streptomyces natalensis</i> NRRL 2651.....	27
2.3. Таксономічний статус біологічного агента.....	33
<b>РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування.....</b>	<b>34</b>
3.1. Потреба населення України в натаміцині.....	34
3.2. Розрахунок потужності виробництва натаміцину.....	37
3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів і геометричного об'єму ферментера для біосинтезу натаміцину.....	40
3.4 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу натаміцину <i>Streptomyces natalensis</i> NRRL 2651.....	41
<b>РОЗДІЛ 4. Біосинтез натаміцину.....</b>	<b>44</b>
4.1. Шляхи катаболізму глюкози у <i>Streptomyces natalensis</i> NRRL2651.....	44
4.2. Біосинтез натаміцину <i>Streptomyces natalensis</i> NRRL2651.....	46
<b>РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва натаміцину.....</b>	<b>49</b>
5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу...49	
5.1.1. Обґрунтування способу культивування.....	49
5.1.2. Обґрунтування стадії підготовки виробничих приміщень, вибору мийних та дезінфікувальних засобів.....	51

5.1.3. Обґрунтування стадії підготовки обладнання і комунікацій.....	57
5.1.4. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря.....	58
5.1.5. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища.....	59
5.2. Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту.....	62
5.2.1. Обґрунтування вибору технології виділення і очищення натаміцину.....	62
5.2.2. Вибір способу відділення біомаси з культуральної рідини і відповідного обладнання.....	66
5.2.3. Вибір способу дезінтеграції клітин продуцента.....	69
5.2.4. Вибір способу екстракції натаміцину і відповідного обладнання.....	72
5.2.5. Вибір технології концентрування розчину натаміцину і відповідного обладнання.....	74
5.2.6. Вибір способу відділення кристалів натаміцину і відповідного обладнання.....	78
5.2.7. Вибір способу сушіння натаміцину і відповідного обладнання.....	80
5.3. Обґрунтування вибору упаковки для готового порошку натаміцину і відповідного обладнання.....	82
5.4. Обґрунтування допоміжних робіт для виділення і очищення натаміцину...	84
5.5. Обґрунтування способів знешкодження відходів.....	85
5.5.1. Знешкодження рідких відходів.....	85
5.5.2. Знешкодження твердих відходів.....	87
5.5.3. Знешкодження газоповітряних відходів.....	88
<b>РОЗДІЛ 6. Матеріальний баланс і розрахунок обладнання.....</b>	<b>89</b>
6.1. Розрахунок матеріального балансу.....	89
6.2. Розрахунок технологічного обладнання.....	108
<b>РОЗДІЛ 7. Специфікація обладнання .....</b>	<b>118</b>
<b>РОЗДІЛ 8. Опис технологічної схеми виробництва натаміцину.....</b>	<b>125</b>
<b>РОЗДІЛ 9. Контроль виробництва.....</b>	<b>142</b>
9.1 Мікробіологічний контроль.....	142
9.1.1. Мікробіологічний контроль стерильності поживних середовищ, ...	142

9.1.2. Мікробіологічний контроль посівного матеріалу і культуральної рідини.....	143
9.2. Контроль показників росту і біосинтезу.....	145
9.2.1. Визначення концентрації біомаси.....	145
9.4.2 Визначення концентрації натаміцину.....	145
9.3. Контроль концентрації вуглецю у культуральній рідині.....	148
9.3.1. Визначення концентрації глюкози глюкозооксидазним методом...	148
9.4. Контроль готового продукту.....	151
9.4.1. Ідентифікація натаміцину у готовому продукті.....	151
9.4.2 Кількісне визначення натаміцину у готовому продукті.....	151
9.4.3 Визначення активності натаміцину у готовому продукті.....	153
9.4.4 Визначення вологості порошку натаміцину.....	154
<b>РОЗДІЛ 10. Автоматизація ділянки виробництва натаміцину .....</b>	<b>164</b>
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....</b>	<b>168</b>
<b>ДОДАТКИ.....</b>	<b>178</b>

## РЕФЕРАТ

Дана робота присвячена розробці проекту виробництва субстанції натаміцину шляхом культивування штаму *Streptomyces natalensis* NRRL2651. Культура синтезує високу концентрацію антибіотика (3,0 г/л) на поживному середовищі з глюкозою, дріжджовим і м'ясним екстрактами за умови внесення розчину солей коротколанцюгових жирних кислот – пропіонату і ацетату натрію – як стимуляторів синтезу натаміцину. Розрахована річна потужність промислового виробництва натаміцину становить 129 кг сухого порошку продукту або 72 м<sup>3</sup> культуральної рідини для одержання субстанції антибіотика.

Технологічна схема виробництва натаміцину включає допоміжні роботи (санітарна підготовка виробництва, приготування і стерилізація поживного середовища для одержання посівного матеріалу, приготування і стерилізація поживного середовища для біосинтезу натаміцину, приготування і стерилізація розчинів для титрування, підготовка і стерилізація піногасника) та технологічні процеси (одержання посівного матеріалу, біосинтез натаміцину, відділення біомаси, дезінтеграція клітин, екстракція натаміцину, центрифугування екстракту, концентрування і очищення екстракту натаміцину, осадження натаміцину, відділення кристалів натаміцину, сушіння кристалів натаміцину), стадію пакування, стадію переробки відходів (регенерація ізопропанолу) та стадію знешкодження відходів.

Загальний обсяг дипломного проекту складає 198 сторінок, з яких 150 сторінок основного тексту. За структурою робота складається зі вступу, десяти розділів, списку використаної літератури (102 позиції), додатків та графічної частини. Робота включає 16 рисунків і 23 таблиці. Графічна частина проекту представлена 4 кресленнями формату А1 і 1 кресленням формату А3.

**Ключові слова:** натаміцин, *Streptomyces natalensis* NRRL2651, німарицин, полієновий антибіотик, кандидоз, протигрибковий агент, біосинтез, виділення, осаджувальне центрифугування, дезінтеграція біомаси, екстракція, ізопропанол, ультрафільтрація у перехресному потоці, осадження, сушіння, сушарка з псевдозрідженням шаром.

## ВСТУП

На сьогоднішній день натаміцин є комерційно успішним антибіотиком у всьому світі завдяки його широкому спектру протигрибкової активності, а також високому профілю безпечності. На відміну від інших антимікотичних препаратів, натаміцин володіє унікальним механізмом дії, який полягає у порушенні транспортної функції білків-переносників та інгібуванні процесів злиття вакуолей, ендо- і екзоцитозу у клітинах патогенних мікроорганізмів [1,2,3]. Така дія антибіотика позбавляє збудників енергетичних субстратів і здатності розмножуватися, що у результаті призводить до їхньої загибелі.

З точки зору фармакокінетики важливим є також високий профіль безпечності натаміцину — препарат добре переноситься при контакті зі шкірою та слизовими оболонками, не піддається системній абсорбції, не викликає сенсibilізації, не проявляє ембріотоксичної і тератогенної дії [4]. Завдяки таким властивостям препарати натаміцину широко використовуються у клінічній практиці як основний антифунгальний агент у лікуванні мікозів різної етіології, зокрема у гінекології, гастроентерології, дерматовенерології, офтальмології та отоларингології.

Нині населення України має попит на препарати натаміцину у формі вагінальних супозиторіїв, кишковорозчинних таблеток і кремів [5]. Проте варто зазначити, що наразі в Україні вітчизняні біотехнологічні підприємства не виробляють власної субстанції натаміцину, а фармацевтичні компанії не випускають власних брендів препаратів натаміцину. Єдиним виключенням є ПАТ «Монфарм», яке виготовляє песарії «Натаміцин» із імпоротної сировини [5]. Слід зауважити, що лікарська форма песаріїв наразі рідко використовується у лікуванні вульвовагінальних кандидозів [6] і тому попит на дану продукцію є невеликим. Так, популярні лікарські форми натаміцину – супозиторії, таблетки і крем, представлені на українському фармацевтичному ринку виключно імпортними брендами. Для імпортозаміщення вже наявних на ринку препаратів натаміцину для України залишається актуальним питання побудови вітчизняних потужностей для виробництва натаміцину. Тим не менш, варто врахувати, що реалізація виробництва субстанції як АФІ і випуск вже готового лікарського препарату на одному підприємстві пов'язано із великими експлуатаційними витратами і відповідно – збільшенням собівартості одиниці

готового продукту. Тому, більш економічно вигідним є випуск натаміцину у формі кристалічного порошку для фармацевтичного застосування як сировини для виготовлення препаратів натаміцину. Це дозволить діючим українським фармацевтичним компаніям купувати не імпортовану сировину натаміцину, а вітчизняну, для надання їй певної лікарської форми і реалізації у вигляді вітчизняного бренду готового препарату натаміцину.

**Актуальність** даної розробки визначається зростаючим попитом населення України на дієві та недорогі антимікотичні препарати, зважаючи на динаміку росту захворювань грибної етіології [36, 37] та високу вартість протигрибкових препаратів: імпортованих та виготовлених вітчизняними фармацевтичними підприємствами з імпортованих субстанцій, що обумовлює необхідність розроблення високоефективної і водночас не складної у реалізації технології виробництва субстанції натаміцину з метою її подальшого можливого використання для одержання цілого ряду лікарських форм вітчизняних антимікотичних лікарських препаратів.

**Новизною** даного дипломного проекту є:

- використання *S. natalensis* NRRL2651 як продуцента для одержання натаміцину в промислових масштабах, що зумовлено здатністю штаму до забезпечення високої концентрації цільового продукту (до 3,0 г/л) при використанні солей коротколанцюгових жирних кислот у якості стимуляторів біосинтезу натаміцину [7];
- систематизація розрізнених даних стосовно існуючих технологій виділення і очищення субстанції натаміцину і розроблення на їх основі найоптимальнішої технології отримання високоочищеного і стабільного продукту, зокрема запропоновано виділяти натаміцин із біомаси продуцента *Streptomyces natalensis* NRRL2651 шляхом екстракції антибіотика з дезінтеграту клітин ізопропіловим спиртом за умови підвищення рН середовища до сильнолужного з метою підвищення розчинення натаміцину у органічних розчинниках.

## РОЗДІЛ 1. Характеристика натаміцину

Натаміцин (пімаріцин, теннецетин, натасин, харчова добавка E235) — це натуральний протигрибковий агент, який знайшов широке застосування у клінічній практиці, харчовій промисловості та сільському господарстві, будучи безпечним і ефективним при невеликих концентраціях [8]. Продуцентами натаміцину є представники роду *Streptomyces* — нитчасті, грампозитивні, кислотостійкі бактерії, які формують добре розвинений міцелій. Особливе значення для одержання натаміцину у промислових масштабах мають наступні види: *S. natalensis*, *S. gilvosporeus* і *S. lydicus* [7, 9, 10].

### 1.1. Фізико-хімічні властивості натаміцину

Натаміцин належить до класу тетраенових макролідів, які містять у своєму складі велике лактонне кільце (25 атомів вуглецю), зв'язане ефірними зв'язками з мікозаміною групою. Емпірична формула натаміцину  $C_{33}H_{47}NO_{13}$ , молекулярна маса становить 666 дальтон. У водних розчинах антибіотик виявляє амфотерні властивості, а його ізоелектрична точка знаходиться при рН 6,5 [4].

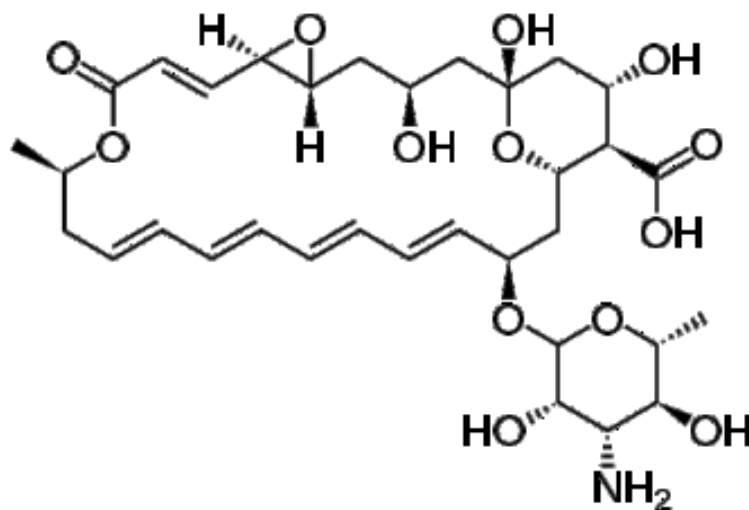


Рис. 1.1. Структурна формула натаміцину [4]

					<b>НУХТ БТЕК 04.03.09 КР ПЗ</b>			
Змн.	Арк.	№ документа	Підпис	Дата				
Розробив		Цапко			РОЗДІЛ 1. Характеристика натаміцину	Літера	Арк.	Аркушів
Консульт.							9	6
Керівник		Красінько				Кафедра БТМ		
Н. контр.								
Зав. каф.		Пирог						

У твердому стані натаміцин має кристалічну структуру. Порушення кристалічної форми антибіотика відбувається при температурі більше 200 °С, причому температура нижче 120 °С не впливає на його антимікотичну активність, якщо тривалість дії температури не більше однієї години. Цю властивість продукту необхідно враховувати при виборі режимів стерилізації або автоклавування середовищ, які містять натаміцин.

Натаміцин погано розчиняється у воді, і добре розчиняється у таких полярних розчинниках як: льодяна оцтова кислота, метилпіролідон, диметилсульфоксид, гліцерин, пропіленгліколь. При цьому натаміцин не розчиняється у вищих спиртах, ефірах, ароматичних та аліфатичних вуглеводнях і кетонах. У розчинах натаміцин стабільний при значеннях рН 6,0 — 9,0, проте швидко інактивується за екстремально низьких та високих значень. Також інактивація натаміцину відбувається під дією ультрафіолетового випромінювання з довжиною хвилі 300—350 нм, а також деяких окислювачів. Наявність антиоксидантів (аскорбінова кислота, хлорофіл) допомагає попередити швидку інактивацію натаміцину.

У сухому стані і вигляді водної суспензії натаміцин є стабільною сполукою, оскільки під час зберігання антибіотика у темному місці протягом 2 років не було виявлено втрат його антимікотичної активності [4].

Таким чином, враховуючи вищенаведені властивості антибіотика, препарати натаміцину повинні зберігатися в темному місці, а таблетки для перорального прийому повинні бути вкриті оболонкою для попередження інактивації натаміцину в кислому середовищі шлунка. Також при розробці комбінованих препаратів натаміцину необхідно звертати особливу увагу на фізико-хімічні кожного з компонентів, оскільки будь-які окислювачі несумісні з натаміцином в одній лікарській формі.

## **1.2. Фармакологічні властивості препарату**

Донедавна для опису механізму дії натаміцину використовувалися характеристики інших полієнових макролідів, зокрема ністатину, оскільки механізм дії натаміцину не був відомим науці. Так, вважалося, що натаміцин зв'язується з ергостерином — основним стеролом клітинних мембран грибів, і утворює напівпору. Злиття двох напівпор призводить до утворення глибокої пори, яка пронизує клітинну

мембрану. Це утворення порушує селективну проникність ліпідного бішару і змінює іонний градієнт, що у результаті призводить до загибелі гриба.

Проте сучасні дослідження фармакологічних властивостей натаміцину виявили, що механізм дії антибіотика пов'язаний не з утворенням пор в мембранах збудників, а з інгібуванням як екзо- і ендоцитозу, так і процесу злиття вакуолей [11]. Більш того, було досліджено, що натаміцин має прямий вплив на функціонування транспортних білків. Так, антибіотик має швидку інгібуючу дію на білки-переносники аргініна та проліна, а також глюкози. Після виведення натаміцину з середовища відновлення транспортної функції білків відбувалося дуже повільно [12].

Також було виявлено, що безпосередня взаємодія натаміцину з ергостерином призводить до морфологічних змін клітин гриба. Так, під час впливу натаміцину на клітини *Candida albicans* спостерігалася нерівномірна зміна товщини їх клітинної мембрани і практично повне руйнування внутрішнього вмісту клітини — у цитоплазмі були присутні ділянки лізису, спостерігалися великі ліпідні утворення, цитоплазматичні структури формували згустки замість гомогенного розподілення, а також був виявлений повний розпад мітохондріальних структур [13].

Отже, механізм дії натаміцину пов'язаний з інгібуванням процесів екзо- і ендоцитозу, злиття вакуолей, а також з порушенням функціонування білків-переносників. Така дія препарату позбавляє грибів енергетичних субстратів і здатності розмножуватися, що у результаті призводить до загибелі збудника.

Таким чином, завдяки специфічному механізму біологічної дії натаміцин володіє широким спектром активності на більшість представників царства *Fungi*, включаючи дріжджові, дріжджеподібні та плісняві гриби родів: *Alternaria*, *Candida*, *Cephalosporium*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Lasiodiplodia*, *Scedosporium*, *Trichophyton* та *Penicillium*. До дії препарату також чутливі деякі представники найпростіших: *Trichomonas intestinalis*, *Trichomonas vaginalis*, *Giardia lamblia*, *Chilomastix mesnili*, окрім *Entamoeba histolytica*. Натаміцин не виявляє дії на грампозитивні та грамнегативні бактерії, оскільки бактерії не містять стеролів у складі клітинної стінки.

З точки зору фармакокінетики важливим є також високий профіль безпечності натаміцину — препарат добре переноситься при контакті зі шкірою та слизовими

оболонками, не піддається системній абсорбції, не викликає сенсibilізації, не володіє ембріотоксичністю та тератогенністю [4].

### 1.3. Застосування натаміцину в клінічній практиці

Завдяки своїм унікальним властивостям, натаміцин знайшов клінічне застосування у якості основного агента в лікуванні широкого спектру грибкових захворювань шкіри та слизових оболонок. На сьогоднішній день препарати натаміцину використовуються в гінекології у формі вагінальних супозиторіїв і песаріїв, у дерматології у формі кремів і мазей для зовнішнього застосування у вигляді як монокомпонентних препаратів, так і в комбінації з гідрокортизоном і неоміцином, в гастроентерології у формі таблеток для санації кишківника від грибів. У багатьох країнах натаміцин також застосовують для лікування офтальмологічних мікозів: грибкових блефаритів, кон'юктивітів, склеритів, ендодальмітів, а також грибкових кератитів. Загалом, натаміцин проявляє активну дію проти широкого кола дріжджових та грибкових патогенних організмів родів: *Alternaria*, *Candida*, *Cephalosporium*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Lasiodiplodia*, *Scedosporium*, *Trichophyton* та *Penicillium* [8].

**Гінекологія.** Препарати натаміцину широко використовуються у гінекології для лікування вульвовагінальних кандидозів, викликаних переважно грибами роду *Candida* та *Rhodotorulla*. При загостренні захворювання використовують препарати натаміцину виключно у вигляді супозиторіїв, а при хронічних рецидивуючих захворюваннях тривалість лікування продовжують і додатково додають таблетовані та крем-форми препарату для елімінації збудників з прилеглих резервуарів шкіри і з кишківника для попередження рецидиву.

Варто також зазначити, що існує клінічна практика використання препаратів натаміцину для лікування вульвовагінітів, викликаних *Candida albicans* або *Trichomonas vaginalis*. Ефективність застосування натаміцину при вагінітах трихомонадної етіології підтверджує дані про чутливість деяких видів найпростіших до дії препарату [6].

Важливим аспектом є можливість застосування натаміцину для вагітних жінок, оскільки даний препарат є один з небагатьох протигрибкових агентів, дозволених для застосування на всіх трьох триместрах вагітності. Також відомо, що вагітна жінка

може стати джерелом анте-, інтра- і перинатального інфікування плода або новонародженого, оскільки передача *Candida spp.* відбувається у 75—80% випадків. Так, у матерів, котрі отримували лікування натаміцином, у 89% випадків народжувались здорові діти, у яких не було виявлено грибів роду *Candida*. Отже, даний факт підтвержує ефективність натаміцина як засобу первинної профілактики кандидоза у новонароджених [14].

**Гастроентерологія.** Натаміцин використовують для лікування дитячого дисбактеріозу кишківника, викликаного надлишковим ростом *C. albicans*. Так, застосування препаратів є високоефективним і безпечним, оскільки у більшості випадків спостерігається відсутність побічних дій та позитивний вплив препарату на перебіг супутнього atopічного дерматиту.

Також існує практика застосування препаратів натаміцину для лікування і профілактики кандидозу ротової порожнини і кишківника у дітей з онкологічними захворюваннями, які отримують хіміо- або променеви терапію [15].

**Дерматовенерологія.** Для зовнішнього використання з метою лікування мікозів шкіри та слизових оболонок широко застосовується натаміцин у формі 2% крему, або у формі комбінованого препарату натаміцину, гідрокортизону і неоміцину сульфату. Варто також відзначити високу чутливість патогенних грибів до натаміцину. Так, спостерігається повне інгібування росту представників роду *Trichophyton*, *Candida* (окрім *C. parapsilosis*, чутливість котрої дещо знижена), а також *Aspergillus fumigatus*. Винятком є вид *Scopulariopsis brevicaulis*, який є малочутливим до дії натаміцину [4].

**Отоларингологія.** У силу високого профілю безпеки натаміцину, його активності проти ключових збудників (*Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.*, *Candida spp.*), а також низької ймовірності виникнення резистентності препарати натаміцину також застосовують у лор-практиці для лікування дифузного зовнішнього отиту грибкової (отомікоз) та змішаної етіології [4].

#### **1.4. Застосування натаміцину в харчовій промисловості**

Оскільки натаміцин характеризується низьким рівнем токсичності на клітини ссавців, препарат широко використовується як харчовий консервант вже більше 40 років. Коли натаміцин контактує з поверхнею харчових продуктів, він не впливає на її органолептичні властивості, володіє подовженою антимікробною активністю і є

безпечним для вживання. Варто відзначити, що натаміцин є наразі єдиним антигрибковим агентом, котрому було присвоєно міжнародний статус безпечності GRAS. Також натаміцин (E235) належить до харчових додатків, дозволених для використання в харчовій продукції в Україні.

Основна мета застосування натаміцину в харчовій промисловості попередження росту і розвитку грибів на поверхні продуктів (зокрема сирів і ковбасних виробів). Для цього продукцію окунають в 0,1-0.25% водного розчину натаміцину. Через низьку розчинність натаміцину у воді препарат залишається в основному на поверхні продукту і мало проникає в його масу.

Натаміцин також є ефективним для контролювання росту *Aspergillus carbonarius* — гриба, який викликає контамінацію винних виробів, винограду, виноградного соку за рахунок охратоксину А. Для попередження псування напоїв, до їх складу додається невелика концентрація натаміцину, котрий є стабільним до впливу різних рівнів рН.

Не менш широкого застосування натаміцин знайшов і в агропромисловості, будучи безпечним продуктом для захисту овочевих культур від *Fusarium oxysporum* та *Lecanicillium fungicola* [8].

Сфери практичного застосування натаміцину систематизовано у вигляді рис. 1.2.



Рис.1.2. Сфери застосування натаміцину [8]

## РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента

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

На сьогоднішній день натаміцин як високоефективний антибіотик має високу комерційну цінність. Це обумовлює необхідність підвищення продуктивності штамів-продуцентів натаміцину для отримання більшого виходу цільового продукту. Як відомо, регуляцію біосинтезу антибіотика можливо здійснити на внутрішньоклітинному та позаклітинному рівнях. Як і інші полієнові макролідні антибіотики, біосинтез натаміцину можна регулювати шляхом оптимізації складу поживного середовища та змін умов культивування. У результаті такої регуляції метаболічні шляхи штаму-продуцента можуть змінитися у бік утворення як первинних, так і вторинних метаболітів [8].

Наразі серед основних методів підвищення продуктивності штамів продуцентів натаміцину виділяють використання методів генної інженерії та оптимізацію складу поживного середовища.

Методи генної інженерії дозволяють підвищити вихід натаміцину у мутантних штамів культур-продуцентів до 460% [19]. Відповідно до даних табл. 2.1 основними культурами-продуцентами, для яких доцільно застосовувати генно-інженерні методи підвищення біосинтезу натаміцину, є *S. natalensis*, *S. lydicus*, *S. chattanoogensis* та *S. gilvosporeus*. У свою чергу, такі методи як надекспресія малоекспресованих активаторів *SncRII* у *S. chattanoogensis* [17], делеція  $\gamma$ -бутиролактон-рецептора *SngR* у *S. natalensis* [19], а також хромосомна інтеграція гену гемоглобіну бактерії *Vitreoscilla spp. vgb* у *S. gilvosporeus* [23] продемонстрували свою максимальну ефективність у підвищенні виходу антибіотика у культур-продуцентів.

Проте варто зазначити, що впровадження методів генної інженерії для покращення біосинтезу цільового продукту на біотехнологічних виробництвах є

					<b>НУХТ БТЕК 04.03.09 КР ПЗ</b>			
Змн.	Арк.	№ документа	Підпис	Дата				
Розробив		Цапко			РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	Літера	Арк.	Аркушів
Консульт.							15	19
Керівник		Красінько				Кафедра БТМ		
Н. контр.								
Зав. каф.		Пирог						

досить високовартісним рішенням, оскільки для його реалізації необхідні додаткове спеціальне устаткування і відповідні кваліфіковані кадри.

Таблиця 2.1

### Генно-інженерні методи покращення біосинтезу натаміцину

Метод	Продуцент	Вихід продукту, %	Література
Надекспресія <i>PimM</i>	<i>S. natalensis</i> Δ <i>p</i> M (мутантний штам)	240	[16]
Надекспресія <i>ScnRII</i>	<i>S. chattanoogaensis</i> L10	330-460	[17]
Надекспресія <i>SlnM</i>	<i>S. lydicus</i> AM01	300	[18]
	<i>S. lydicus</i> AM02	240	
Делеція <i>SngR</i>	<i>S. natalensis</i> <i>sngR</i> - деактивований мутантний штам	460	[19]
Надекспресія <i>SchPPT</i>	<i>S. chattanoogaensis</i> L10	140	[20]
Делеція <i>AlpCD</i>	<i>S. natalensis</i> CAM.04	130	[21]
Делеція <i>KatAL</i>	<i>S. natalensis</i> CAM.05	156	[21]
Делеція <i>PhoRP</i>	<i>S. natalensis</i> (мутантні штами <i>PhoR/PhoP</i> )	180	[22]
Інтеграція гену <i>vgb</i>	<i>S. gilvosporeus</i> <i>vgb2</i> (мутантний штам)	407	[23]

Таким чином, у багатьох випадках раціональним рішенням для підвищення біосинтезу натаміцину є оптимізація складу поживного середовища для культивування культур-продуцентів. Для одержання цільового продукту в промислових масштабах необхідно, щоб обраний продуцент був економічно вигідним, тобто рости на недорогих поживних середовищах, а також достатньо продуктивним щоб забезпечувати високий вихід цільового продукту. Так, на сьогоднішній день існує практика внесення додаткових речовин різного складу і походження до складу поживного середовища з метою підвищення показників біосинтезу. Наприклад, наразі досліджена стимулювальна дія грибних еліситорів на біосинтез натаміцину для штаму *S. natalensis* HW-2. Результати досліджень показали, що додавання простерелізованої і розведеної у воді біомаси *Penicillium chrysogenum* до поживного середовища для культивування *S. natalensis* сприяло збільшенню виходу цільового продукту до 0,875 г/ л. У той же самий час, еліситор, отриманий з

культуральної рідини *P. chrysogenum*, стимулював підвищення біосинтезу натаміцину до 2,12 г/ л [24].

Також цікавою є практика оптимізації складу поживного середовища і відповідно зниження вартості цільового продукту за рахунок використання відходів агротехнічного виробництва [25]. Так, при культивуванні *S. gilvosporeus* Z28 використовують тверде поживне середовище, до складу якого входять з пшеничні висівки, ріпаковий шрот, рисові висівки та неочищений гліцерин. При застосуванні такого методу можливе досягнення виходу натаміцину до 0,9 г/л. Порівняно з іншими методами вихід цільового продукту відносно невисокий, проте низьковартісність компонентів поживного середовища для одержання антибіотика є основною перевагою такої практики.

Проте використання двох вищезазначених методів оптимізації складу поживного середовища має обмеження щодо застосування безпосередньо на біотехнологічних виробництвах. Обмеженням до застосування методу додавання грибних елісіторів є потреба у додатковому приготуванні поживного середовища для культивування штамів грибів роду *Penicillium*, відділенні біомаси і її стерилізації, що в сукупності значно збільшує тривалість виробничого процесу цільового продукту. Обмеженням до застосування відходів агротехнічного виробництва в якості компонентів поживного середовища є непостійність складу компонентів та відносно низький вихід цільового продукту.

Зважаючи на такі обмеження, доцільним є застосування поживних середовищ зі стандартним складом, які містять в якості основного джерела вуглецю глюкозу, джерела азоту — дріжджовий екстракт, м'ясний екстракт, пептон, соєве борошно тощо, джерел магнію, калію, фосфору, сірки та інших елементів — мінеральні солі. У табл. 2.2. було розглянуто приклади оптимізованих поживних середовищ для культивування штамів *S. gilvosporeus* TUST24 [26], *S. natalensis* NRRL2651 [7] та *S. lydicus* G117 [27], які забезпечують високий вихід натаміцину. Для трьох культур-продуцентів характерний двохстадійний процес одержання цільового продукту. На першому етапі накопичують біомасу продуцента, яка потім використовується в якості посівного матеріалу. Другий етап безпосередньо пов'язаний з отриманням цільового продукту при забезпеченні оптимального поживного середовища і умов

культивування.

Дані табл. 2.2 засвідчують, що для біосинтезу натаміцину дотримуються однакових умов біосинтезу для трьох різних культур-продуцентів. Так, інкубування проводять на колбах-качалках при оптимальній температурі  $t$  — 28-30 °С та рН середовища 7,0. Найвищий показник біосинтезу натаміцину (3,0 г/л) спостерігається для штаму *S. natalensis* NRRL2651 при використанні поживного середовища з вмістом коротколанцюгових жирних кислот, які чинять стимулювальну дію на біосинтез антибіотика. Більш того, застосування такого складу поживного середовища дозволяє досягти максимальної концентрації цільового продукту за найменшої тривалості культивування — 84 год. Дещо менший вихід натаміцину (2,66 г/л) можливо досягти при культивуванні штаму *S. lydicus* G117 за 108 год — найбільшої тривалості культивування серед вищезазначених продуцентів.

Зважаючи на однакові умови інкубування і високий вихід натаміцину для трьох штамів, можна зробити висновок, що така порівняльна характеристика технологічно процесу (див. табл. 2.2) є недостатньою. Саме тому на наступному етапі вибору біологічного агента ми порівняли вартість поживних середовищ, які використовують для отримання натаміцину при культивуванні вищезазначених культур-продуцентів (табл. 2.3).

Середовище для культивування *S. lydicus* G117 є найбільш дешевим серед усіх штамів, що більш ніж у 4 рази дешевше ніж середовище для штаму *S. gilvosporeus* TUST24. Проте цих даних недостатньо для остаточного вибору біологічного агента, оскільки при виборі необхідно також враховувати продуктивність штамів, яка визначається кількістю цільового продукту за годину. У табл. 2.4 розраховано умовну вартість 1 г натаміцину та визначено кількість цільового продукту за годину для трьох штамів-продуцентів. Так, найменшу вартість 1 г натаміцину можна досягти при культивуванні *S. lydicus* G117. У той же час найбільша продуктивність утворення натаміцину характерна для штаму *S. natalensis* NRRL2651.

Узагальнивши отримані дані, ми дійшли до висновку, що для отримання натаміцину у промислових масштабах найдоцільніше використовувати штам-продуцент *S. natalensis* NRRL2651. По-перше, використання оптимального поживного середовища для культивування даного штаму дозволяє досягти

найвищого виходу цільового продукту (3,0 г/л) за найменшу тривалість культивування (84 год). По-друге, для даної культури характерна найвища продуктивність утворення антибіотика за годину (0,036 г/год). У порівнянні зі штамом *S. lydicus* G117 умовна вартість 1 г цільового продукту більша. Проте середовище для культивування *S. lydicus* G117 містить природні сполуки, які можуть ускладнювати процеси підготовки поживного середовища. Наприклад, кукурудзяний крохмаль потрібно попередньо заварювати і ретельно перемішувати для уникнення утворення великих грудочок, що можуть спричинити нестерильність середовища. Також наявність кукурудзяного крохмалю може спричинити підвищену в'язкість середовища. Тому для зниження в'язкості необхідно додатково додавати термостійкі амілолітичні ферменти. У свою чергу соєве борошно здатне спричинити підвищене піноутворення, що вимагає додавання відповідних піногасників у процесі стерилізації [28]. Наявність цих факторів може значно підвищувати тривалість передферментаційних процесів і відповідно тривалість виробничого процесу натаміцину загалом. Більш того, для штаму *S. lydicus* G117 характерний найтриваліший процес біосинтезу і найменша продуктивність утворення антибіотика за годину.

Отже, найбільш оптимальним біологічним агентом для отримання натаміцину є штам *S. natalensis* NRRL2651, для культивування якого використовують середовище, що містить глюкозу, м'ясний екстракт, дріжджовий екстракт, аспарагін, монофосфат калію та солі коротколанцюгових жирних кислот.

**Особливості одержання натаміцину за допомогою штамів  
*S. gilvosporeus* TUST24, *S. natalensis* NRRL2651 та *S. lydicus* G117**

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Тривалість культивування, год	Концентрація цільового продукту, г/л	Особливості процесу біосинтезу	Використана література
<i>S. gilvosporeus</i> TUST24	<p><b>Середовище №1:</b> Глюкоза — 20,0 Соевий пептон — 6,0 Натрію хлорид — 10,0</p> <p><b>Середовище №2:</b> Глюкоза — 30 Дріжджовий екстракт — 4,5 Соевий пептон — 20</p>	96	2,45	<p>Двостадійний спосіб культивування. Середовище №1 використовується для одержання посівного матеріалу, середовище №2 - для одержання натаміцину.</p> <p>Культивування для одержання натаміцину проводять в конічних колбах на 500 мл, які містять 50 мл рідкого (рН— 7,0). Інокулят — у формі вегетативних клітин культури-продуцента у експоненційній фазі росту (24 год) кількістю 2% (об'ємних). Колби з інокулятом інкубують при <math>t = 29\text{ }^{\circ}\text{C}</math> на кругових колбах-качалках при 200 об/хв.</p>	[26]
<i>S. natalensis</i> NRRL2651	<p><b>Середовище №1:</b> Глюкоза — 4,0 Солодовий екстракт — 10,0 Дріжджовий екстракт — 4,0</p> <p><b>Середовище №2:</b> Глюкоза — 20,0 М'ясний екстракт — 2,0 Дріжджовий екстракт — 2,0 Монофосфат калію — 0,05</p>	84	3,0	<p>Двостадійний спосіб культивування. Середовище №1 використовується для одержання посівного матеріалу, середовище №2 - для одержання натаміцину.</p> <p>Культивування для одержання натаміцину проводять в конічних колбах на 250 мл, які містять 50 мл рідкого поживного середовища (рН 7,0).</p>	[7]

	Аспарагін — 0,5 Пропіонат натрію — 0,25 Ацетат натрію — 1,75			Інокулянт — у формі вегетативних клітин культури-продуцента у експоненційній фазі росту (24 год) кількістю 5% (об'ємних). Колби з інокулятом інкубують при $t = 30^{\circ}\text{C}$ в колбах на ротаційних качалках при 200 об/хв. У перші години культивування (до 48 год) додають суміш солей оцтової та пропіонової кислот у співвідношенні 7:1 загальною кількістю 2,0 г/л.	
<i>S. lydicus</i> G117	<b>Середовище №1:</b> Розчинний крохмаль — 10,0 Глюкоза — 20,0 Соєве борошно — 20,0 Пептон — 5,0 Магній сірчаноокислий — 1,0 Монофосфат калію — 0,2 Натрію хлорид — 4,0 Кальцій карбонат — 10,0  <b>Середовище №2:</b> Кукурудзяний крохмаль — 45,15 Глюкоза — 10,0 Соєве борошно — 14,80 Натрію хлорид — 5,88 Пептон — 6,0 Амоній сульфат — 7,5 Магній сірчаноокислий — 0,5 Монофосфат калію — 0,3 Кальцій карбонат — 10,0 Термостійка амілаза — 0,05	108	2,66	Культивування проводять в конічних колбах на 500 мл, які містять 80 мл рідкого середовища (рН— 7,0-7,4). Інокулянт — у формі вегетативних клітин культури-продуцента у експоненційній фазі росту (24 год) кількістю 9% (об'ємних). Колби з інокулятом інкубують при $t = 28^{\circ}\text{C}$ в колбах на качалках при 220 об/хв.	[27]

**Вартість компонентів поживного середовища для культивування  
*S. gilvosporeus* TUST24, *S. natalensis* NRRL2651 та *S. lydicus* G117**

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8)*
<i>S. gilvosporeus</i> TUST24	<b>Середовище №1:</b>			
	Глюкоза — 20	26	0,52	<u>1</u>
	Соевий пептон — 4,5	5202	23,41	<u>2</u>
	Натрію хлорид — 10,0	8,40	0,084	<u>7</u>
	Орієнтовна вартість 1 л середовища — 24,02 грн			
	<b>Середовище №2:</b>			
	Глюкоза — 30	26	0,78	<u>1</u>
	Соевий пептон — 4,5	5202	23,41	<u>2</u>
	Дріжджовий екстракт — 20	1632	32,64	<u>3</u>
	Орієнтовна вартість 1 л середовища — 56,83 грн			
<i>S. natalensis</i> NRRL2651	<b>Середовище №1:</b>			
	Глюкоза — 4,0	26	0,104	<u>1</u>
	Солодовий екстракт — 10,0	67,60	0,676	<u>7</u>
	Дріжджовий екстракт — 4,0	1632	6,53	<u>3</u>
	Орієнтовна вартість 1 л середовища — 7,31 грн			
	<b>Середовище №2:</b>			
	Глюкоза — 20	26	0,52	<u>1</u>
	М'ясний екстракт — 2,0	7812	15,62	<u>4</u>
	Дріжджовий екстракт — 2,0	1632	3,26	<u>3</u>
	Аспарагін — 0,5	490	0,245	<u>1</u>
	Монофосфат калію — 0,5	48	0,024	<u>1</u>
	Пропіонат натрію — 1,75	48,86	0,086	<u>5</u>
	Ацетат натрію — 0,25	47,40	0,012	<u>6</u>
Орієнтовна вартість 1 л середовища — 19,77 грн				

<i>S. lydicus</i> G117	<b>Середовище №1:</b>			
	Глюкоза — 20,0	26	0,52	<u>1</u>
	Розчинний крохмаль — 10,0	210	2,1	<u>7</u>
	Соеве борошно — 20,0	109	2,18	<u>7</u>
	Пептон — 5,0	720	3,6	<u>6</u>
	Магній сірчаноокислий — 1,0	20	0,02	<u>7</u>
	Монофосфат калію — 0,2	48	0,0096	<u>1</u>
	Натрій хлорид — 4,0	8,40	0,034	<u>7</u>
	Кальцій карбонат — 10,0	67,20	0,672	<u>7</u>
	Орієнтовна вартість 1 л середовища — 9,14 грн			
	<b>Середовище №2:</b>	19	0,86	<u>7</u>
	Кукурудзяний крохмаль — 45,15			
	Глюкоза — 10	26	0,26	<u>1</u>
	Соеве борошно — 14,80	109	1,6	<u>7</u>
	Натрію хлорид — 5,88	8,40	0,049	<u>7</u>
	Пептон — 6,0	720	4,32	<u>6</u>
	Амоній сульфат — 7,5	9,60	0,07	<u>6</u>
	Магній сірчаноокислий — 0,5	20	0,01	<u>7</u>
	Монофосфат калію — 0,3	48	0,015	<u>1</u>
	Кальцій карбонат — 10	67,20	0,672	<u>7</u>
Термостійка амілаза — 0,05	178	0,009	<u>8</u>	
Орієнтовна вартість 1 л середовища — 10,64 грн				

**Примітка.** \* — ціни наведено станом на травень 2020 р. 1. <https://kodkh.com> 2. <https://www.sigmaldrich.com> 3. <http://agar.com.ua> 4. <https://www.rpicorp.com> 5. <http://starbast.com.ua> 6. <https://www.systopt.com.ua> 7. <https://prom.ua> 8. <https://ferment.enzim.biz>

## Умовна вартість 1 г цільового продукту (натаміцину) при культивуванні

*S. gilvosporeus* TUST24, *S. natalensis* NRRL2651 та *S. lydicus* G117

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація цільового продукту, г/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г	Тривалість культивування, год	Кількість цільового продукту за годину, г/год
<i>S. gilvosporeus</i> TUST24	1) 24,02 2) 56,83	2,45	33	96	0,026
<i>S. natalensis</i> NRRL2651	1) 7,31 2) 19,77	3,0	9,03	84	0,036
<i>S. lydicus</i> G117	1) 7,3 2) 10,64	2,66	6,75	108	0,025

## 2.2 Розрахунок складу поживного середовища

Для біосинтезу цільового продукту і накопичення біомаси поживне середовище для культивування штаму-продуцента повинно містити усі ті хімічні елементи, з яких складається клітина, у формі, яку даний мікроорганізм може засвоїти. Відомо, що до складу бактеріальної клітини входять хімічні елементи у таких відсоткових співвідношеннях до маси абсолютно сухої речовини: Карбон – 50%; Оксиген – 20%; Нітроген – 10...14%; Гідроген – 8%; Фосфор – 3%; Сульфур, Натрій, Калій – 1%; Кальцій, Магній, Хлор – 0,5%; Ферум – 0,2%; решта хімічних елементів – 0,3%. Зважаючи на це, при виборі оптимального поживного середовища необхідно звертати увагу на кількісний вміст хімічних елементів у компонентах поживного середовища, які входять до його складу, і виконувати його перевірочний розрахунок.

Для одержання натаміцину було обрано штам *Streptomyces natalensis* NRRL2651, який забезпечує вихід цільового продукту – 3 г/л, біомаси – 4,2 г/л за 84 год при культивуванні на поживному середовищі наступного складу (г/л) : глюкоза — 20,0;

м'ясний екстракт — 2,0; дріжджовий екстракт — 2,0; аспарагін – 0,5; монофосфат калію — 0,05; суміш ацетату натрію і пропіонату натрію (7:1) як стимулятори біосинтезу натаміцину – 2,0 [7].

**Розрахунок вмісту джерела вуглецевого живлення.** У середовищі наведеного складу у якості основного джерела вуглецю використано глюкозу кількістю 20 г/л.

Перевіримо з теоретичної точки зору, скільки глюкози необхідно використати для одержання натаміцину кількістю 3,0 г/л. Молярна маса натаміцину  $C_{33}H_{47}NO_{13}$  становить 666 г/моль, з якої 396 г/моль – молярна маса вуглецю. Так, за пропорцією в 3 г натаміцину міститься  $(396 \times 3) / 666 = 1,78$  г вуглецю.

Молярна маса глюкози  $C_6H_{12}O_6$  складає 180 г/моль. Відсотковий вміст вуглецю у молекулі глюкози становить:  $W(C) = 6M(C) / M(C_6H_{12}O_6) \times 100\% = (72 / 180) \times 100\% = 40\%$ . Так, у 100 г глюкози міститься 40 г вуглецю. Розрахуємо, у скількох грамах глюкози міститься 1,78 г вуглецю за пропорцією:  $(100 \times 1,78) / 40 = 4,45$ . Отже, 1,78 г вуглецю міститься у 4,45 г глюкози.

Необхідно також враховувати, що при культивуванні продуцентів цільового продукту 40% вуглецевмісного субстрату окислюється до  $CO_2$  для отримання енергії, потрібної для повноцінного функціонування конструктивного метаболізму. Враховуючи витрати субстрату на окиснення, для одержання натаміцину середовище повинне містити  $(4,45 \times 0,4) + 4,45 = 6,23$  г/л глюкози.

Розрахуємо, скільки глюкози необхідно використати для одержання біомаси кількістю 4,2 г/л. Відомо, що біомаса мікроорганізмів містить 50% вуглецю. Так, у 4,2 г біомаси міститься 2,1 г вуглецю. За пропорцією 1 г вуглецю міститься у  $(1 \times 100) / 40 = 5,25$  г глюкози. З урахуванням 40% втрат субстрату на «холосте окислення», для одержання 2 г/л біомаси у середовище необхідно внести  $(5,25 \times 0,4) + 5,25 = 7,35$  г/л глюкози.

Таким чином, за теоретичними розрахунками для одержання 3 г/л натаміцину і 4,2 г/л біомаси поживне середовище повинне містити  $6,23 + 7,35 = 13,58$  г/л глюкози.

Отримане розрахункове значення вмісту глюкози у поживному середовищі менше за експериментальне. Проте, відповідно до досліджень впливу концентрації глюкози кількістю 10 – 60 г/л на вихід цільового продукту і біомаси, було доведено, що концентрація глюкози <20 г/л сприяє зменшенню виходу цільового продукту і біомаси, а концентрація >20 г/л – накопиченню надлишкової глюкози у культуральній рідині [7]. Отже, для забезпечення максимальної концентрації натаміцину і біомаси найбільш оптимальна концентрація глюкози у поживному середовищі становить 20 г/л.

**Розрахунок вмісту джерел азотного живлення.** У якості джерел азоту бактерія *S. natalensis* здатна використовувати як неорганічні ( $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  і  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), так і органічні речовини (сечовина, м'ясний екстракт, дріжджовий екстракт). Проте було досліджено, що використання неорганічних джерел азоту є недоцільним для біосинтезу антибіотика, оскільки вони підтримують виключно ріст клітин. Зважаючи на цей факт, було доведено експериментально, що найкращим джерелом азоту для підтримання біосинтезу натаміцину є м'ясний екстракт. З іншого боку, досліджено, що дріжджовий екстракт є найкращим джерелом азоту для підтримання росту клітин. Тому на практиці є раціональним використання обох органічних джерел азоту у середовищі, що сприяє підвищенню виходу натаміцину у 2 рази, порівняно з середовищами, які містять виключно м'ясний екстракт [7].

У середовищі наведеного складу у якості джерел органічного азоту використано речовини невизначеного складу: м'ясний екстракт – 2,0 г/л і дріжджовий екстракт – 2,0 г/л [7]. Оскільки *S. natalensis* є ауксотрофним мікроорганізмом, він потребує додаткових факторів росту, якими у середовищі є м'ясний і дріжджовий екстракти, аспарагін. Так, окрім джерела азоту м'ясний екстракт є додатковим джерелом вітамінів, попередників жирних кислот, іонів металів, що загалом є необхідним для біосинтезу антибіотика, а дріжджовий екстракт – джерелом готових амінокислот і

пептидів, водорозчинних вітамінів, деяких вуглеводів, “слідів” мікроелементів, необхідних для накопичення біомаси.

Відомо, що біомаса мікроорганізмів містить 10...14% азоту. Так, у 4,2 г біомаси міститься 0,42...0,59 г азоту. Як було вже зазначено, молярна маса натаміцину становить 666 г/моль, з якої 14 г/моль – азот. За пропорцією в 3 г натаміцину міститься  $(14 \times 3) / 666 = 0,06$  г азоту. Сумарний теоретичний вміст азоту, необхідного для одержання 3 г/л натаміцину і 4,2 г/л біомаси складає 0,48...0,65 г.

Концентрація доступного для бактерій органічного азоту у м'ясному екстракті складає 11,5-12,5%, а у дріжджовому екстракті – 8-12%. Отже, у 2 г м'ясного екстракту міститься  $(2 \times 12,5) / 100 = 0,25$  г азоту, а в 2 г дріжджового екстракту –  $(2 \times 12) / 100 = 0,24$  г азоту. Сумарна кількість органічного азоту становить  $0,25 + 0,24 = 0,49$  г.

Отже, за отриманими результатами теоретичний і експериментальний розрахунок вмісту джерел азотного живлення співпадають, що свідчить про збалансованість вмісту компонентів поживного середовища за азотом.

**Інші компоненти середовища.** Для накопичення біомаси бактерії також потребують вмісту магнію, заліза та кальцію. Так, м'ясний і дріжджовий екстракти є джерелами даних елементів, а також таких факторів росту як: лейцин, лізин, валін, аргінін, гліцин, пролін, глютамінова кислота, аспарагінова кислота та ін.

Отже, за результатами перевірного розрахунку поживне середовище наведеного складу для культивування *S. natalensis* NRRL2651 – продуцента натаміцину містить усі необхідні біоелементи і є повноцінним за вмістом джерел вуглецевого і азотного живлення для накопичення цільового продукту і біомаси.

### **2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки**

#### ***Streptomyces natalensis* NRRL2651**

*S. natalensis* — це представник нитчастих, грампозитивних, кислотостійких (за фарбуванням по Цілю-Нельсону) бактерій, які формують добре розвинутий міцелій

(рис. 2.1). На відміну від грибів, даний вид бактерій утворює більш тонкі гіфи, які містять велику кількість нуклеоїдів [29].

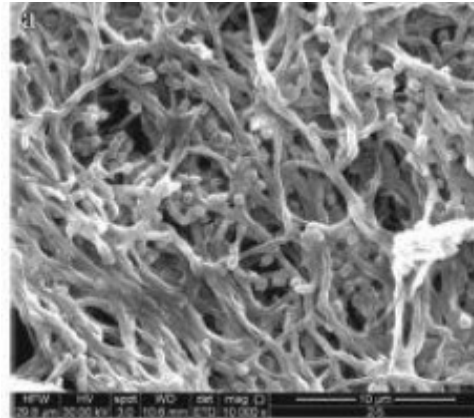


Рис. 2.1 Міцелій *S. natalensis*, електронна мікрофотографія [24]

Життєвий цикл бактерій включає диференціацію та споруляцію. Він починається з моменту, коли спора досягає поживного середовища. Під час проростання спори утворюють ростові трубочки, які подовжуються і гілкуються. Це дає початок розвитку скупчення ниток, котрі врастають всередину і по поверхні агаризованого середовища. Таке скупчення ниток називається субстратним міцелієм.

Колонія продовжує рости, і міцелій в центрі колонії починає процес диференціювання - утворення нового типу клітин — повітряних гіфів. Коли стрімкий ріст диплоїдних повітряних гіфів припиняється, вони зазнають синхронного поділу клітин для утворення гаплоїдних структур, кожна з яких потім розвивається у спору [29].

Утворення спор відбувається на спіральні закручених гілках з п'ятьма витками – спороносіях повітряного міцелію. Ланцюжки спор спостерігають при рості культури на солодовому або вівсяному агарі (рис 4.2). Споруючий повітряний міцелій погано або зовсім не розвивається на крохмальному агарі та на гліцерин-аспарагіновому агарі. Зрілі ланцюжки спор зазвичай мають продовгувату форму і містять більше 10 спор в одному ланцюжку [30].

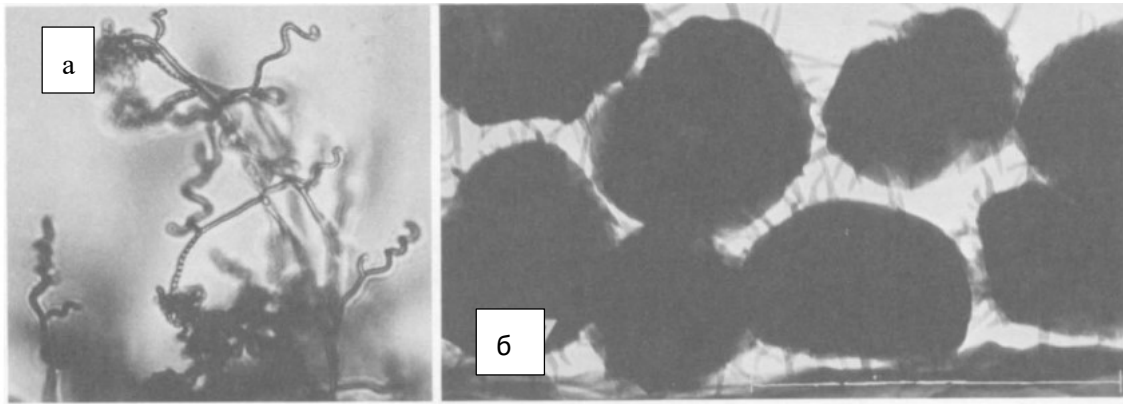


Рис. 2.2. Спори *S. natalensis*:

а - електронна мікрографія 21-добової культури, вирощеної на солодовому агарі; б - скануюча електронна мікрографія 14-добової культури, вирощеної на крохмальному агарі [30]

На агаризованих середовищах (солодовому і вівсяному агарі) культура утворює спорулюючий повітряний міцелій жовто-сірого або коричнево-сірого кольору. Білий неспорулюючий повітряний міцелій утворюється на крохмальному агарі. Зі зворотної сторони колоній не спостерегається пігментоутворення [30].

Штам *Streptomyces natalensis* NRRL 2651 є диким штамом, похідним від першого ізольованого дикого штаму *Streptomyces natalensis* ATCC 27448. У каталозі Всесвітнього інформаційного центру мікроорганізмів (World Data Centre for Microorganisms – WDCM) штаму NRRL 2651 присвоєно такі номери: CBS 668.72, CBS 700.57, IFO 13367, ISP 5357, JCM 4693, JCM 4795, NBRC 13367, RIA 1328 [31].

Штам *Streptomyces natalensis* NRRL2651 на агаризованих середовищах утворює два типи колоній: а) округлі, з плоскою поверхнею із дещо опуклим центром, зморшкуваті, з нерівними краями колонії з білим повітряним міцелієм; б) округлі, з плоскою поверхнею із дещо опуклим центром, гладкі, м'якої консистенції колонії з світло-сірим повітряним міцелієм. Вегетативний міцелій для обидвох типів колоній має жовтий або бежевий колір [32].

Цікавою особливістю *S. natalensis* є здатність бактерій змінювати характер росту

при додаванні до складу поживного середовища грибних елісіторів: колонії утворюють типову S-дисоціацію, тобто колонії мають круглу форму, гладку поверхню, рівні краї, блискучу поверхню та більш щільну консистенцію [24].

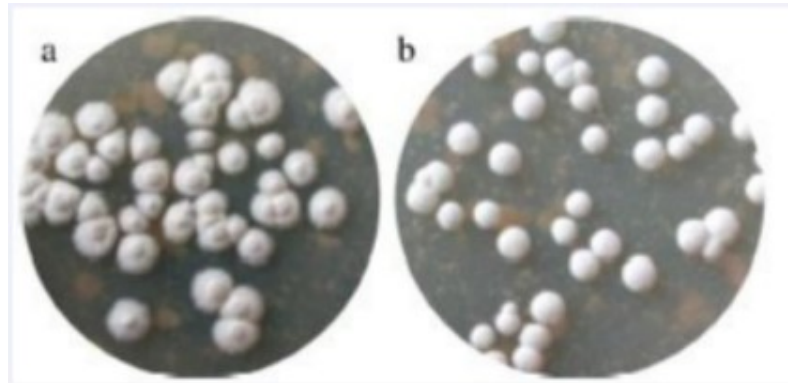


Рис. 2.3 Характер росту *S. natalensis* на агаризованому середовищі без (а) та з додаванням грибних елісіторів (b) [24]

*S. natalensis* - це представники мезофільних бактерій, температурний оптимум яких становить 30°C. Бактерії здатні рости на середовищах з рН 6,5 - 8,0, проте оптимумом є показник рН 7,2 [29].

*S. natalensis* належать до облігатних аеробів, яким необхідний кисень як термінальний акцептор водню. Так, у клітинах *S. natalensis* функціонує повноцінний дихальний ланцюг, до складу якого повна система цитохромів *b*, *c*, *a*. Цитохромні комплекси *bcl* та *aa3* разом становлять один із найголовніших елементів дихального ланцюга для бактерій *S. natalensis*. Ще однією особливістю даного виду є їх здатність синтезувати фермент цитохромоксидазу *bd* за умов росту культури, коли кисень є лімітувальним фактором. *S. natalensis* одержують енергію шляхом окиснення органічних речовин та синтезують АТФ у процесі окислювального фосфорилування.

За типом живлення *S. natalensis* належить до хемоорганогетеротрофів. У якості джерел вуглецю бактерії здатні використовувати моносахариди, дисахариди та полісахариди. При ферментації *S. natalensis* максимальний вихід натаміцину можна отримати лише при використанні наступних джерел вуглецю у порядку від найбільш до найменш ефективного: глюкоза > гліцерин > ксилоза > солодовий екстракт > рибоза

> декстрин> крохмаль> галактоза. Фруктоза та інулін не сприяють виходу натаміцину. Фруктоза та інулін не сприяють виходу натаміцину.

У якості джерел азоту *S. natalensis* здатні використовувати як неорганічні ( $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  and  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) так і органічні речовини (сечовина, м'ясний екстракт, дріжджовий екстракт). Найкращими джерелами азоту для підтримання виробництва натаміцину є м'ясний екстракт. З іншого боку, дріжджовий екстракт є найкращим джерелом азоту для підтримання росту клітин. Тому на практиці є доцільним використання обох органічних джерел азоту у середовищі, що підвищує вихід натаміцину у 2 рази [7].

Особливістю *S. natalensis* здатність гідролізувати лецитин та казеїн. Тести на каталазну активність, утворення сірководню та нітратредукції для *S. natalensis* дають негативні результати [29]. Оскільки даний вид бактерій належить до прототрофних організмів, для їхнього росту додаткові фактори росту непотрібні. Додавання таких факторів росту до складу поживного середовища як: фенол, азид натрію та ацетат талію, не покращує показники росту біомаси та виходу цільового продукту. У той же самий час, для *S. natalensis* характерно використання дріжджового екстракту не в якості додаткового джерела вітамінів, а в якості основного джерела азоту.

Для представників роду *Streptomyces* є притаманним катаболізм глюкози за гліколітичним шляхом. За гліколітичним шляхом глюкоза перетворюється а піруват з виділенням АТФ.

Цікавою особливістю бактерій роду *Streptomyces* є їхня здатність до глюконеогенезу при рості на таких субстратах як аспарагін та глютамін, які виступають в якості єдиних джерел вуглецю [33]. Також для бактерій роду *Streptomyces* ферменти анаплероичних реакцій функціонують не лише під час глюконеогенезу. Коли культури ростуть на глюкозі як єдиному джерелі вуглецю, відбувається реакція карбоксилювання фосфоенолпірувату з утворенням

оксалоацетату за участі фермента *фосфоенолпіруваткарбоксилаза*, карбоксилювання пірувату з утворенням малату за участі ферменту *малатдегідрогеназа*, а також карбоксилювання пірувату з утворенням оксалоацетату за участі фермента *піруваткарбоксилаза*.

Результатом гліколізу є перетворення глюкози на піруват з виділенням АТФ та НАДН. У подальших реакціях піруват окиснюється до ацетил-КоА. Для бактерій роду *Streptomyces* окиснення пірувату відбувається за допомогою піруватдегідрогеназного комплексу, до складу якого входить фермент *піруватдегідрогеназа*.

Бактерії роду *Streptomyces* додатково катаболізують глюкозу за допомогою пентозофосфатного циклу. Однією з основних функцій пентозофосфатного циклу для є постачання НАДФН для реакцій конструктивного метаболізму. У пентозофосфатному циклі *S. natalensis* *глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа* каталізує реакції перетворення глюकोзо-6-фосфату на Д-глюконо-1,5-лактон-6-фосфат з виділенням НАДФН. Основними ферментами *S. natalensis*, які каталізують реакції пентозофосфатного шляху катаболізму глюкози є: *6-фосфоглюконатдегідрогеназа*, *6-фосфоглюконо-σ-лактонлактоназа*, *рибозо-5-фосфатенімераза*, *рибозо-5-ізомераза*, *трансальдолаза*, *транскетолаза* та *глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа* [33].

Варто також зазначити, що шлях Ентнера-Дудорова функціонує не у всіх бактерій. На сьогоднішній день доведено, що серед багатьох представників роду *Streptomyces* КДФГ-шлях активно функціонує лише у *S. tetebrarius*, котрий має унікальний ген *pgd*, відповідальний за активацію КДФГ-шляху. Тим не менш, було виявлено, що велика кількість актиноміцетів містять гомологи гену *pgd* з високим ступенем спорідненості (74-83%). Це підтверджує гіпотезу про те, що КДФГ-шлях катаболізму глюкози все ж притаманний для актиноміцетів. Проте, наявність гомологів гену *pgd* для *S. natalensis* ще не було виявлено [33].

### 2.3. Таксономічний статус біологічного агента

Згідно з першим виданням Керівництва Бергі з систематики бактерій, де була реалізована фенотипова систематика бактерій, *S. natalensis* належать до роду *Streptomyces*, родини *Streptomycetaceae*, порядку *Actinomycetales*, класу *Thallobacteria* (частина №20).

За дев'ятим виданням Керівництва Бергі з ідентифікації бактерій *S. natalensis* було присвоєно штучну групу №25.

Філогенетична систематика бактерій була реалізована у Другому Виданні Бергі з систематики бактерій, де вид *S. natalensis* описаний у томі №5 “The Actinobacteria” за такими таксонами: клас *Actinobacteria*, підклас *Actinobacteridae*, порядок *Actinomycetales*, підпорядок *Streptomycineae*, родина *Streptomycetaceae*, рід *Streptomyces* [34]. Частина філогенетичного дерева порядку *Actinomycetales* представлена на рис. 2.4.

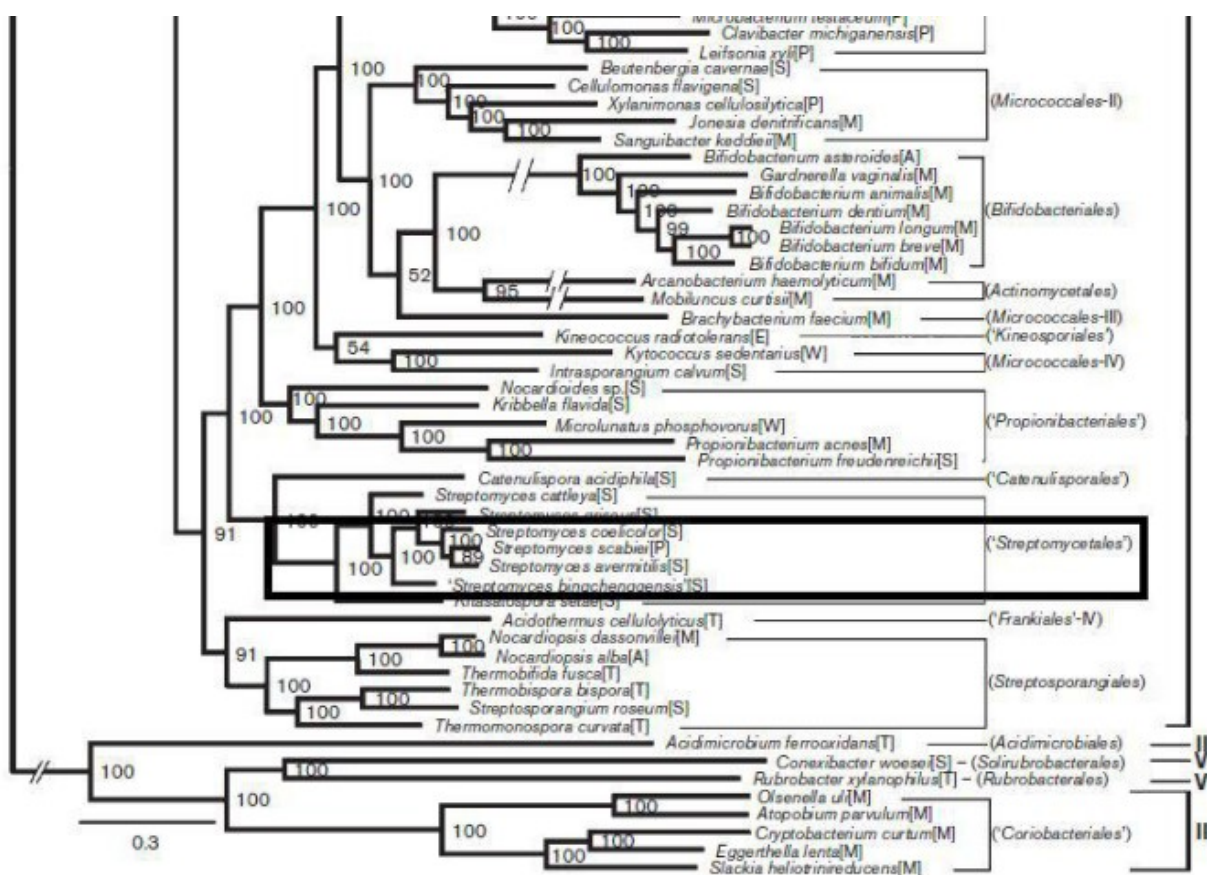


Рис. 2.4 Положення *S. natalensis* у філогенетичному дереві [35]

## РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування

### 3.1. Потреба населення України в натаміцині

Протягом останнього десятиріччя в Україні спостерігається стрімке зростання числа випадків діагностування у пацієнтів кандидозних інфекцій, викликаних дріжджеподібним грибом виду *Candida albicans*. Серед лікарських засобів для лікування кандидозів найбільше визнання в Україні отримали похідні азолів, які на сьогоднішній день є базисними системними антимікотиками. Проте, через тенденцію хворих до самолікування кандидозів, не підтверджених клінічно, азольними препаратами, наразі усе частіше трапляються випадки виділення патогенів *Candida nonalbicans* та набуття патогенами антибіотикорезистентності [36]. Це обумовлює необхідність застосування у клінічній практиці ефективних препаратів для лікування, відмінних від азольних, які володіють широким спектром протигрибкової дії. Такою альтернативою азольним препаратам є антибіотики полієнового ряду, зокрема натаміцин.

Так, натаміцин знайшов клінічне застосування як основний агент в лікуванні широкого спектру грибкових захворювань шкіри та слизових оболонок. Препарати натаміцину широко використовуються у гінекології для лікування вульвовагінальних кандидозів, викликаних переважно грибами роду *Candida* та *Rhodotorulla*. Важливим аспектом є можливість застосування натаміцину для вагітних жінок, оскільки даний препарат є один з небагатьох протигрибкових агентів, дозволених для застосування на всіх трьох триместрах вагітності [6]. Також відомо, що вагітна жінка може стати джерелом анте-, інтра- і перинатального інфікування плода або новонародженого, оскільки передача *Candida spp.* відбувається у 75—80% випадків. Так, у матерів, котрі отримували лікування натаміцином, у 89% випадків народжувались здорові діти, у яких не було виявлено грибів роду *Candida*. Отже, даний факт підтверджує ефективність натаміцину як засобу первинної профілактики кандидозу у

Змн.	Арк.	№ документа	Підпис	Дата	НУХТ БТЕК 04.03.09 КР ПЗ			
Розробив		Цапко			РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування	Літера	Арк.	Аркушів
Консульт.							34	10
Керівник		Красінько				Кафедра БТМ		
Н. контр.								
Зав. каф.		Пирог						

новонароджених [14]. Також натаміцин використовують для лікування дисбактеріозу кишківника у дітей і дорослих, викликаного надлишковим ростом *C. albicans*. Для зовнішнього використання з метою лікування мікозів шкіри та слизових оболонок широко застосовується натаміцин у формі 2% крему, або у формі комбінованого препарату натаміцину, гідрокортизону і неоміцину сульфату.

Станом на 2017 рік в Україні було заєстровано на 100 тис. дорослого населення випадків хвороб органів травлення – 18 001,6 [37], з них 1,4 % [38] – грибкові ураження кишківника. Захворюваність жіночого населення на запальні хвороби сечостатевої системи склала 1 300 випадків на 10 тис. жінок репродуктивного віку [37], з них 45% - хвороби грибкової етіології [39, 40]. Серед дитячого населення було зареєстровано на 1 тис. дітей випадків захворюваності органів травлення – 114,23 [37], з них 2,5% [41] – грибкові ураження кишківника, шкіри і підшкірної клітковини – 76,63, з яких 15% складають дерматомікози [41]. Варто також зазначити, що за оцінкою експертів клінічні прояви кандидозу у новонароджених у перші години або дні життя діагностують у 30-33% випадків [39].

Враховуючи, що чисельність жінок репродуктивного віку (18-45 років) складає 8 282 916 осіб, річна кількість хворих на вульвовагінальні кандидози складає:

$$\frac{(1300 \times 8\,282\,916)}{10\,000} \times 45\% = 484\,550 \text{ осіб.}$$

Для лікування вульвовагінальних кандидозів використовують натаміцин у формі супозиторіїв або песаріїв. Добова доза натаміцину – 100 мг, курс лікування – 6 днів. Кількість препарату на 1 людину становить – 600 мг. Отже, для забезпечення даної групи населення препаратом натаміцину необхідно:

$$600 \text{ мг} \times 484\,550 \text{ осіб} = 290\,730\,000 \text{ мг} = 290\,730 \text{ г} = 290,73 \text{ кг.}$$

Враховуючи чисельність дорослого населення України, яка становить 34 607 469 осіб, річна кількість хворих на грибкові ураження кишківника становить:

$$\frac{1801,6 \times 34\,607\,469}{100\,000} \times 10,4\% = 64\,843 \text{ особи.}$$

Для лікування грибкових уражень кишківника дорослих використовують натаміцин у формі таблеток. Добова доза натаміцину – 200 мг, курс лікування – 7 днів.

Кількість препарату на 1 людину становить – 1400 мг. Отже, для забезпечення даної групи населення препаратом натаміцину необхідно:

$$1400 \text{ мг} \times 64 \ 843 \text{ особи} = 90 \ 779 \ 876,3 = 90 \ 779,9 \text{ г} = 90,8 \text{ кг.}$$

Враховуючи чисельність дитячого населення України, яка становить 7 977 633 осіб, річна кількість хворих на грибкові ураження кишківника становить:

$$\frac{114,23 \times 7 \ 977 \ 633}{1000} \times 2,5\% = 22 \ 782 \text{ особи.}$$

Річна кількість хворих на дерматомікози складає:

$$\frac{76,63 \times 7 \ 977 \ 633}{1000} \times 15\% = 91 \ 699 \text{ особи.}$$

Для лікування грибкових уражень кишківника дітей використовують натаміцин у формі таблеток. Добова доза натаміцину – 100 мг, курс лікування – 14 днів. Кількість препарату на 1 людину становить – 1400 мг. Отже, для забезпечення даної групи населення препаратом натаміцину необхідно:

$$1400 \text{ мг} \times 22 \ 782 \text{ осіб} = 31 \ 894 \ 800 \text{ мг} = 31 \ 894,8 \text{ г} = 31,9 \text{ кг.}$$

У свою чергу, для лікування дитячих дерматомікозів використовують натаміцин у формі 2% крему. Добова доза натаміцину – до 40 мг, курс лікування – 14-21 день [14]. Кількість препарату на 1 людину становить – 840 мг. Так, для забезпечення даної групи населення препаратом натаміцину необхідно:

$$840 \text{ мг} \times 91 \ 699 \text{ осіб} = 77 \ 027 \ 078 \text{ мг} = 77 \ 027 \text{ г} = 77 \text{ кг.}$$

Чисельність новонароджених на 2017 рік в Україні склала 363 987 осіб [37]. Так, враховуючи високу ймовірність захворюваності новонароджених на кандидоз, загальна потенціальна кількість хворих становить:

$$363 \ 987 \times 33\% = 120 \ 116 \text{ новонароджених.}$$

Для лікування кандидозу новонароджених використовують таблетовану форму натаміцину у кількості 5-8 мг/ на кг маси тіла 4 рази на добу протягом 7 днів [41]. Необхідно врахувати те, що середня маса новонародженого становить 3,5 кг. Отже, добова кількість препарату складає:

$$3,5 \text{ кг} \times 8 \text{ мг} = 28 \text{ мг}$$

Кількість препарату на 1 людину становить 196 мг. Отже, для забезпечення даної групи населення препаратом натаміцину необхідно:

$$196 \text{ мг} \times 120 \ 116 \text{ осіб} = 23 \ 542 \ 736 \text{ мг} = 23 \ 542,7 \text{ г} = 23,5 \text{ кг.}$$

Таким чином, для річного забезпечення населення України препаратами натаміцину необхідно одержати 513 974,4 г препарату (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

**Вихідні дані для розрахунку річної потреби в натаміцині**

Захворювання	Доза препарату на добу, мг	Тривалість прийому, днів	Кількість препарату (в мг) на 1 людину	Кількість хворих в Україні на 2007-2017 рік	Загальна кількість препарату на всіх хворих, г
Вульвовагінальні кандидози Вагініти	100	6	600	484 550	290 730
Грибкові ураження кишківника (дорослі)	200	7	1400	647 909	90 780
Грибкові ураження кишківника (діти)	100	14	1400	22 782	31 895
Дерматомікоз (діти)	40	14-21	560-840	91 699	77 027
Кандидоз новонароджених	17,5-28	7	122,5-196	120 116	23 543
<b>Разом:</b>				<b>1 397 056</b>	<b>513 974,4</b>

**3.2. Розрахунок потужності виробництва натаміцину**

Станом на вересень 2019 року у Державному реєстрі лікарських засобів України зареєстровано наступні препарати натаміцину (табл. 3.2): у формі супозиторіїв вагінальних — Пімафуцин (Теммлер Італія С.р.Л., Італія), у формі таблеток кишковорозчинних Пімафуцин (Астеллас Фарма Юроп Б. В., Нідерланди), у формі крему — Пімафуцин (Теммлер Італія С.р.Л., Італія), у формі песаріїв — Натаміцин (ПАТ “Монфарм”, Україна). Окрім того, до реєстру внесені комбіновані препарати гідрокортизону, натаміцину та неоміцину — Пімафукорт у формі мазі і крему

(Темплер Італія С.р.Л., Італія) [5]. Таким чином, переважна більшість препаратів натаміцину в Україні є імпорфтними. Єдиний вітчизняний препарат, реалізований на території України, – песарії «Натаміцин» від ПАТ «Монфарм».

Таблиця 3.2

**Препарати натаміцину зареєстровані в Україні станом на травень 2020 р.**

Назва	№ РП	Форма випуску	Діюча речовина	Допоміжні речовини
Пімафуцин	UA/4370/01/01	Супозиторії вагінальні по 100 мг по 3 супозиторії у стрипі; по 1 або 2 стрипи у картонній паці	1 супозиторій містить натаміцину 100 мг	Спирт цетиловий, твердий жир, сорбітантріолеат, полісорбат, натрію гідрокарбонат, кислота адипінова
Пімафуцин	UA/4370/02/01	Крем, 20 мг/г по 30 г у тубі, по 1 тубі в картонній коробці	1 г крему містить 20 мг натаміцину	Децил олеат, воску цетилового ефір, спирт цетостеариновий, натрію лаурилсульфат, метилпарагідроксибензоат (E218),пропілпарагідроксибензоат(E216),пропіленгліколь,вода очищена
Пімафуцин	UA/4370/03/01	Таблетки кишковорозчинні по 100 мг № 20 (20x1) у банках	1 таблетка містить натаміцину 100 мг супозиторій містить натаміцину 100 мг	Крохмаль картопляний; повідон; магнію стеарат; лактоза,моногідрат; желатин;акація (гуміарабік); метилпарагідроксибензоат (E218); кальцію карбонат; каолін; тальк; целюлози ацетилфталат; триацетин; опаглос 6000 (шелак, віск білий, віск карнаубський); титану діоксид (E171); сахароза
Натаміцин	UA/16372/01/01	Песарії по 100 мг у стрипах № 3 або №6 (3x2)	1 песарій містить натаміцину 100 мг	Твердий жир, сорбітантріолеат, полісорбат-80, цетиловий спирт, натрію гідрокарбонат, адипінова кислота
Натаміцин	UA/14963/01/01	Кристалічний порошок (субстанція) у подвійних поліетиленових мішках для фармацевтичного застосування	Натаміцину не менше 90,0 % та не більше 102,0 % в перерахунку на безводну речовину	-
Пімафукорт	UA/4476/01/01	Мазь по 15 г у тубах	1 г мазі містить: натаміцину 10 мг, гідрокортизону 10 мг, неоміцину 3,5 мг	Олеогель поліетиленовий
Пімафукорт	UA/4476/02/01	Крем по 15 г у тубах	1 г крему містить: натаміцину 10 мг; гідрокортизону 10 мг; неоміцину 3,5 мг	Натрію цитрат (E331), емульгатор F спеціальний, сорбітанстеарат (E492), воску цетилові ефіри, децилолеат, макроголу стеарат,метилпарагідроксибензоат(E218), пропілпарагідроксибензоат (E216),вода очищена

Проте, варто зазначити, що дана фармацевтична компанія не має потужностей для отримання субстанції натаміцину і тому для виробництва песаріїв використовує імпортовану діючу речовину – кристалічний порошок натаміцину для фармацевтичного застосування від “Норз Чайна Фармасьютікал Хуачен Ко., Лтд.”, Китай [5].

Таким чином, на сьогоднішній день в Україні відсутнє виробництво власного препарату натаміцину. Проте, зважаючи на високу захворюваність як дорослого, так і дитячого населення України на кандидози і дороговартісність імпортованих препаратів для їхнього лікування, раціональним рішенням є побудова власних потужностей для одержання препаратів натаміцину у різних лікарських формах.

Зважаючи на те, що на українському ринку представлено аналогічні препарати для лікування кандидозних інфекцій (див. табл. 3.2), візьмемо для розрахунку 25% від потреби ринку. Так, для забезпечення населення України препаратами натаміцину за рік необхідно виготовити:

$$G_{\text{гп}} = 514 \text{ кг} \cdot 0,25 = 129 \text{ кг натаміцину.}$$

Для одержання натаміцину у промислових масштабах принципово важливим є вибір оптимального штаму-продуцента, який повинен бути як економічно вигідним, так і достатньо продуктивним щоб забезпечувати високий вихід цільового продукту. Зважаючи на такі критерії, для отримання натаміцину найдоцільніше використовувати штам-продуцент *S. natalensis* NRRL 2651, синтезувальна здатність якого складає 3,0 г/л за 84 год культивування [7].

Маючи такі вихідні дані, ми можемо розрахувати кількість культуральної рідни, необхідної для одержання 129 кг натаміцину:

$$3,0 \text{ г} - 1 \text{ л}$$

$$129 - X \text{ л}$$

$$X = 129 / 3 = 43 \text{ м}^3 \text{ культуральної рідни.}$$

Необхідно також врахувати, що частка втрат під час виділення і очищення натаміцину складає 40% і тому об'єм культуральної рідни повинен становити:

$$V_{\text{кр}} = 43 / (1-0,4) = 72 \text{ м}^3 \text{ культуральної рідни.}$$

Отже, для забезпечення населення України вітчизняною субстанцією натаміцину потужність виробництва повинна складати 129 кг/рік, а кількість культуральної для одержання антибіотика з урахуванням втрат при екстракції і очищенні становить 72 м<sup>3</sup>.

### **3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів і геометричного об'єму ферментера для біосинтезу натаміцину**

Для лікування кандидозів дорослого і дитячого населення України препаратами натаміцину необхідно одержати (з урахуванням втрат при екстракції і очищенні) 72 м<sup>3</sup> культуральної рідини.

Розрахуємо кількість культуральної рідини, яку необхідно отримати за цикл ферментації і кількість стадій приготування посівного матеріалу.

Кількість робочих днів ( $T_{\text{гд}}$ ) становитиме 84 дні (12 тижнів). Таким чином, кількість цільового продукту на добу складатиме:

$$V_{\text{д}} = V_{\text{гп}} / T_{\text{гд}} = 72 \text{ м}^3 / 84 \text{ дні} = 0,86 \text{ м}^3/\text{добу}.$$

Кількість продукту за один цикл ( $V_{\text{кр}}$ ) становитиме:

$$V_{\text{цк}} = (K_1 \cdot V_{\text{д}} \cdot T_{\text{цф}}) / 24 = (1,2 \cdot 0,86 \cdot 90,5) / 24 = 3,9 \text{ м}^3.$$

Цикл роботи ферментера ( $T_{\text{цф}}$ ) включає тривалість ферментації і тривалість підготовчих робіт. Тривалість біосинтезу – 84 год. Підготовчі роботи для ферментера включають (6,5 год): миття та огляд апарату – 1,5 год, перевірка на герметичність – 0,5 год, підігрів апарату – 0,5 год, стерилізація апарату – 1 год, охолодження апарату – 0,5 год, завантаження середовища – 1,5 год, засів – 0,5 год, вивантаження – 0,5 год. Приймаємо коефіцієнт запасу для врахування можливості нестерильних операцій ( $K_1$ ) за 1,2. Так, цикл роботи ферментера становить – 90,5 год.

Розрахуємо геометричний об'єм ферментера ( $V_{\text{г}}$ ) для одержання необхідної кількості культуральної рідини:

$$V_{\text{г}} = V_{\text{цк}} / K_{\text{зп}} = 3,9 / 0,5 = 7,8 \text{ м}^3.$$

Так, оптимальним ферментом для одержання 3,9 м<sup>3</sup> культуральної рідини за цикл є ферментер з геометричним об'ємом  $V_{\text{ф}} = 8,0 \text{ м}^3$ .

Перевіримо, чи підійде обраний коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зп}} = V_{\text{цк}} / V_{\text{ф}} = 3,9 / 8,0 = 0,49, \text{ що не перевищує задане значення.}$$

### 3.4 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу натаміцину *Streptomyces natalensis* NRRL 2651

За один виробничий цикл можливо отримати  $V_{\text{цк}} = 3,9 \text{ м}^3$  культуральної рідини. Необхідно врахувати, що при одержанні культуральної рідини втрати ( $E_{\text{ф}}$ ) в результаті краплевиносу через колектор становить 10-15%. Так, кількість поживного середовища та інокуляту перед виробничим біосинтезом складатиме:

$V_{\text{роб.1}} = V_{\text{цк}} / (1 - E_{\text{ф}}) = 3,9 / (1 - 0,1) = 4,3 \text{ м}^3$ , що становить робочий об'єм ферментера.

Розрахуємо можливий геометричний об'єм ферментера для заданого об'єму культуральної рідини за коефіцієнта заповнення ( $K_{\text{н}}$ ) – 0,5:

$$V_{\text{ф}} = V_{\text{роб.1}} / K_{\text{н}} = 4,3 / 0,5 = 8,6 \text{ м}^3.$$

Для отримання такої кількості культуральної рідини приймаємо стандартний ферментер –  $V_{\text{сф}} = 8,0 \text{ м}^3$  і перераховуємо попередньо заданий коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{н1}} = V_{\text{роб.1}} / V_{\text{сф}} = 4,3 / 8,0 = 0,54.$$

Отримане значення не перевищує значно задане значення, а отже коефіцієнт заповнення було обрано правильно.

Кількість посівного матеріалу ( $X_{\text{ф}}$ ) для засіву ферментера складає 10 % від об'єму поживного середовища. Кількість поживного середовища ( $V_{\text{пс1}}$ ) в обраному ферментері становитиме:

$$V_{\text{пс1}} = V_{\text{роб.1}} / (1 + X_{\text{ф}}) = 4,33 / (1 + 0,1) = 3,9 \text{ м}^3.$$

Так, кількість посівного матеріалу ( $V_{\text{пм1}}$ ) складатиме:

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пс1}} = 4,3 - 3,9 = 0,4 \text{ м}^3.$$

Для одержання  $0,4 \text{ м}^3$  посівного матеріалу в інокуляторі необхідно врахувати втрати у результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря ( $E_{\text{ф}}$ ), що становить 10-15%. Так, кількість поживного середовища ( $V_{\text{пс2}}$ ) і посівного матеріалу ( $V_{\text{пм2}}$ ) складатиме:

$$V_{\text{роб.2}} = V_{\text{цк}} / (1 - E_{\text{ф}}) = 0,4 / (1 - 0,1) = 0,44 \text{ м}^3$$

$$V_{\text{пс2}} = V_{\text{роб.2}} / (1 + X_{\text{ф}}) = 0,53 / (1 + 0,1) = 0,4 \text{ м}^3$$

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 0,44 - 0,4 = 0,04 \text{ м}^3$$

Об'єм інокуляту  $V_{роб.2} = 0,44 \text{ м}^3$  можна одержати під час культивування штаму-продуцента у посівному апараті з геометричним об'ємом:

$$V_{па2} = V_{роб.2} / K_{зап2} = 0,44 / 0,5 = 0,9 \text{ м}^3.$$

Приймаємо стандартний посівний апарат з геометричним об'ємом  $V_{сф2} = 1 \text{ м}^3$ .

Уточнюємо прийнятий коефіцієнт заповнення:  $K_{з2} = V_{роб.2} / V_{сф2} = 0,44 / 1 = 0,44$ .

Для одержання  $0,04 \text{ м}^3$  (40 л) посівного матеріалу в інокуляторі необхідно врахувати втрати у результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря ( $E_{ф}$ ), що становить 10-15%. Так, кількість поживного середовища ( $V_{пс3}$ ) і посівного матеріалу ( $V_{пм3}$ ) складатиме:

$$V_{роб.3} = V_{цк} / (1 - E_{ф}) = 40 / (1 - 0,1) = 44,4 \text{ л}$$

$$V_{пс3} = V_{роб.3} / (1 + X_{ф}) = 44,4 / (1 + 0,1) = 40,36 \text{ л}$$

$$V_{пм3} = V_{роб.3} - V_{пс3} = 44,4 - 40,36 = 4,08 \text{ л}.$$

Об'єм інокуляту  $V_{роб.3} = 44,4 \text{ л}$  можна одержати під час культивування штаму-продуцента у посівному апараті з геометричним об'ємом:

$$V_{па3} = V_{роб.2} / K_{зап3} = 44,4 / 0,5 = 81 \text{ л}.$$

Приймаємо стандартний посівний апарат з геометричним об'ємом  $V_{сф3} = 0,1 \text{ м}^3$ .

Уточнюємо прийнятий коефіцієнт заповнення:  $K_{з3} = V_{роб.3} / V_{сф3} = 0,044 / 0,1 = 0,4$ .

Кількість посівного матеріалу для засіву невеликого ферментера  $V_{пм4} = 4 \text{ л}$  можна одержати під час культивування штаму-продуцента у посівному апараті з геометричним об'ємом:  $V_{па4} = V_{роб.4} / K_{зап4} = 4 / 0,5 = 8 \text{ л}$ . Приймаємо стандартний посівний апарат з геометричним об'ємом  $V_{сф4} = 0,01 \text{ м}^3$ . Уточнюємо прийнятий коефіцієнт заповнення:  $K_{з2} = V_{роб.4} / V_{сф4} = 0,004 / 0,01 = 0,4$ .

Для одержання 4 л посівного матеріалу в інокуляторі необхідно врахувати втрати у результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря ( $E_{ф}$ ), що становить 10-15%. Так, кількість поживного середовища ( $V_{пс4}$ ) і посівного матеріалу ( $V_{пм4}$ ) складатиме:

$$V_{роб.4} = V_{цк} / (1 - E_{ф}) = 4 / (1 - 0,1) = 4,4 \text{ л}$$

$$V_{пс4} = V_{роб.4} / (1 + X_{ф}) = 4,4 / (1 + 0,1) = 4 \text{ л}$$

$$V_{пм4} = V_{роб.4} - V_{пс4} = 4,4 - 4 = 0,4 \text{ л}.$$

Об'єм посівного матеріалу  $V_{\text{пм5}} = 0,4$  л (400 мл) можна отримати шляхом культивування штаму-продуцента в колбах на качалці. Для цього використовують колби Ерленмеєра з  $V_{\text{колб}} = 750$  мл з коефіцієнтом заповнення  $K_3 = 0,2$ .

Кількість колб для отримання посівного матеріалу становитиме:

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{пм4}} / (V_{\text{колб}} \cdot K_3) = 400 / (750 \cdot 0,2) = 2,7 = 3 \text{ колби.}$$

Таким чином, для одержання інокуляту необхідно 3 качалочні колби.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу натаміцину у ферментері об'ємом  $8,0 \text{ м}^3$  з коефіцієнтом заповнення  $0,5$  буде проходити у п'ять етапів. Так, за результатами розрахунків для біосинтезу натаміцину *Streptomyces natalensis* NRRL2651 необхідно встановити наступні апарати: один ферментер об'ємом  $8,0 \text{ м}^3$ , один інокулятор об'ємом  $1 \text{ м}^3$ , один інокулятор об'ємом  $0,1 \text{ м}^3$ , один інокулятор об'ємом  $10,0$  л.

## РОЗДІЛ 4. Біосинтез натаміцину

### 4.1. Шляхи катаболізму глюкози у *Streptomyces natalensis* NRRL2651

Ростовим субстратом у поживному середовищі для біосинтезу натаміцину є глюкоза. Оскільки у Кіотській енциклопедії генів і геномів (KEGG) відсутня інформація стосовно шляхів катаболізму глюкози у *Streptomyces natalensis* NRRL2651, використаємо дані для близькоспорідненого за родовою приналежністю організму – *Streptomyces griseus*. Так, відповідно до KEGG [42], а також літературних джерел [43, 8, 44], катаболізм глюкози здійснюється за шляхом Ембдена-Мейергофа-Парнаса (гліколіз), підтвердженням чого є наявність ключового ферменту шляху – 6-фосфофруктокінази I (КФ 2.7.1.11).

D-глюкоза під дією фермента глюкокінази (КФ 2.7.1.2) перетворюється на глюкозо-6-фосфат. З глюкозо-6-фосфату під дією глюкозо-6-фосфат ізомерази (КФ 5.3.1.9) утворюється фруктозо-6-фосфат, який під дією ключового фермента гліколізу – 6-фосфофруктокінази I (КФ 2.7.1.11) перетворюється на фруктозо-1,6-дифосфат.

Фруктозо-1,6-дифосфат зазнає каталітичного розщеплення ферментом фруктозодифосфатальдолазою (КФ 4.1.2.13) на наступні дві сполуки: гліцеральдегід-3-фосфат і діоксиацетонфосфат. Взаємоперетворення гліцеральдегід-3-фосфату та діоксиацетонфосфату здійснюється ферментом тріозофосфатізомеразою (КФ 5.3.1.1).

Далі перетворення гліцеральдегід-3-фосфату на 1,3-дифосфогліцерат відбувається за участі ферменту гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12). 1,3-дифосфогліцерат під дією фосфогліцераткінази (КФ 2.7.2.3) перетворюється на 3-фосфогліцерат. 3-фосфогліцерат піддається дії фосфогліцератмутази (КФ 5.4.2.12) і перетворюється на 2-фосфогліцерат. Після цього 2-фосфогліцерат зазнає перетворення на фосфоенолпіруват під дією енолази (КФ 4.2.1.11). Заключною реакцією гліколітичного шляху утворення пірувату з фосфоенолпірувату у результаті дії піруваткінази (КФ 2.7.1.40).

					<b>НУХТ БТЕК 04.03.09 КР ПЗ</b>			
Змн.	Арк.	№ документа	Підпис	Дата				
Розробив		Цапко			РОЗДІЛ 4. Біосинтез натаміцину	Літера	Арк.	Аркушів
Консульт.							44	5
Керівник		Красінько				Кафедра БТМ		
Н. контр.								
Зав. каф.		Пирог						

Катаболізм глюкози за шляхом Ембдена-Мейєргофа-Парнаса наведено на рис. 4.1.

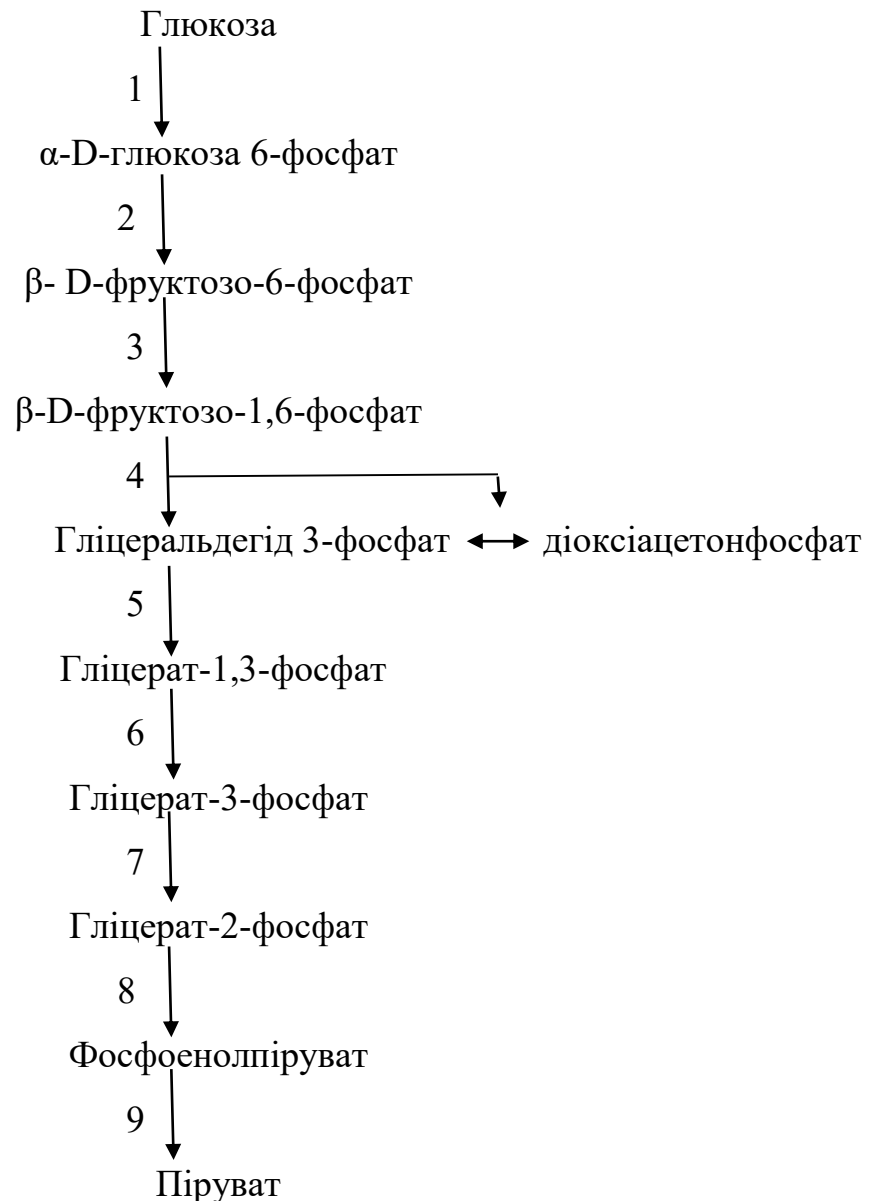


Рис 4.1. Катаболізм глюкози. Шлях Ембдена-Мейєргофа-Парнаса

**Ферменти:** 1 – глюкокіназа (КФ 2.7.1.2); 2 – глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ.5.3.1.9); 3 – 6-фосфофруктокіназа (КФ.2.7.1.11); 4 – фруктозо-1,6-дифосфатальдолаза (КФ.4.1.2.13); 5 – тріозофосфатізомераза (КФ 5.3.1.1); 6 – гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12); 7 – фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3); 8 – 2,3-біфосфатзалежна фосогліцератмутаза (КФ 5.4.2.12); 9 – енолаза (КФ 4.2.1.11).

## 4.2. Біосинтез натаміцину *Streptomyces natalensis* NRRL2651

Катаболізм ростового субстрату – глюкози у *Streptomyces natalensis* NRRL2651 здійснюється за шляхом Ембдена-Мейергофа-Парнаса, у результаті якого глюкоза перетворюється на піруват [42, 43, 8, 44]. Реакцію перетворення пірувату на ацетилдигідроліпоамід-Е каталізує фермент піруватдегідрогеназа (Е1 компонент  $\alpha$ -субодиниця) (КФ 1.2.4.1) із подальшим перетворенням сполуки на ацетил-КоА під дією фермента дигідроліпоамід ацетилтрансферази (КФ 2.3.1.12). Утворений ацетил-КоА залучається до циклу трикарбонових кислот (ЦТК).

Натаміцин як представник полієнових макролідних антибіотиків синтезується шляхом послідовної декарбоксилювальної конденсації ацетатних одиниць із заключною їхньою лактонізацією і приєднанням мікозамінової групи [2,3]. Субстратом для утворення натаміцину є 1 молекула метилмалоніл-КоА і 12 молекул малоніл-КоА. Метилмалоніл-КоА і малоніл-КоА утворюються із інтермедіатів ЦТК – ацетил-КоА і сукциніл-КоА відповідно. Так, для повноцінного функціонування біосинтетичних реакцій, пул інтермедіатів ЦТК – оксалоацетату і малату, поповнюється у результаті функціонування ряду анаплеротичних реакцій. Відповідно до даних KEGG для близькоспорідненого організму – *Streptomyces griseus*, поповнення втрат інтермедіатів ЦТК здійснюється реакціями карбоксилювання фосфоенолпірувату під дією фермента фосфоенолпіруваткарбоксилаза (КФ 4.1.1.32) з утворенням оксалоацетату, карбоксилювання пірувату під дією фермента піруваткарбоксилаза (КФ 4.1.1.27) з утворенням оксалоацетату, та карбоксилювання пірувату під дією фермента малатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.37) з утворенням малату [42].

Інтермедіат ЦТК – ацетил-КоА піддається дії фермента ацетил-КоА карбоксилази (КФ 6.4.1.2) і перетворюється на малоніл-КоА. У свою чергу сукциніл-КоА зазнає перетворення на метилмалоніл-КоА під дією метилмалоніл-КоА мутази (КФ 6.4.1.2). Утворення 26-членного макроциклічного лактону шляхом конденсації малоніл-КоА і метилмалоніл-КоА ініціюється специфічним ферментом полікетид синтазою тип I (PimS4). У результаті реакції утворюється проміжний продукт біосинтезу – натаміцинолід [42, 43].

Мікозамінова група синтезується з гуанозин-дифосфат маннози, яка є похідною сполукою від інтермедіату гліколітичного шляху – фруктозо-6-фосфату. Так, відповідно до даних KEGG, фруктозо-6-фосфат під дією фермента маннозо-6-фосфат ізомераза (КФ 5.3.1.8) перетворюється на D-маннозо-6-фосфат. Фермент фосфоманномутаза (КФ 5.4.2.8) каталізує реакцію перетворення D-маннозо-6-фосфату на D-маннозо-1-фосфат. Далі з D-маннозо-1-фосфату під дією маннозо-1-фосфат гуанілілтрансферази (КФ 5.3.1.8) утворюється гуанозин-дифосфат-D-манноза. Гуанозиндифосфатманноза-4,5-дегідратаза (КФ 4.2.1.47) відщеплює молекулу води у гуанозин-дифосфат-D-манноза і перетворює сполуку на гуанозин-дифосфат-4-кето-6-дезоксид-D-маннозу [42]. Далі гуанозин-дифосфат-4-кето-6-дезоксид-D-манноза піддається дії спонтанно ізомеризується і під дією гуанозиндифосфатманнозо-3-кето-6-дезоксиманнозо-амінотрансферази (PimC) перетворюється на гуанозин-дифосфат мікозамін [43, 8].

Фермент C12-гідроксилаза (PimG) каталізує реакцію окиснення екзоциклічної метильної групи у молекулі натаміциноліді шляхом потрійного гідроксилування із утворенням карбоксильної групи. У результаті реакції натаміцинолід гідроксилується до 12-карбоксинатаміциноліді.

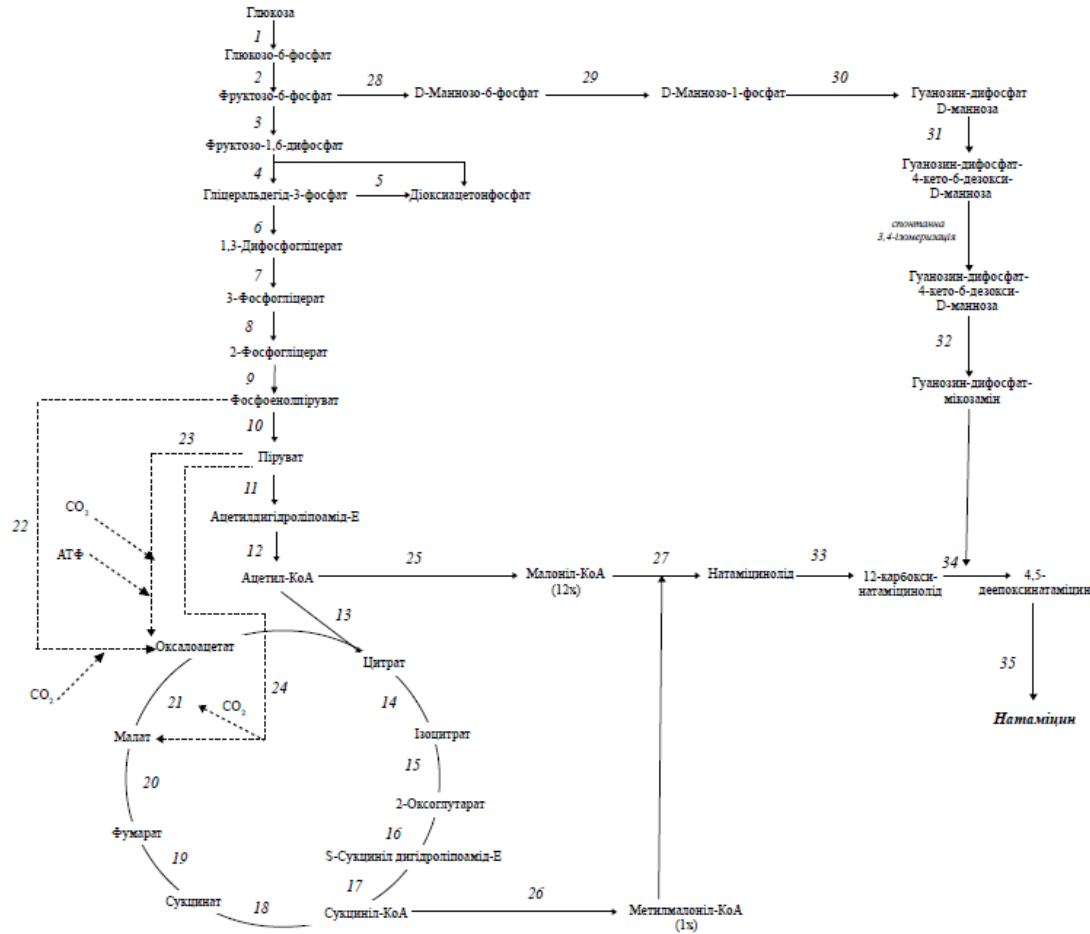
Гуанозин-дифосфат мікозамін (мікозамінова група) приєднується 12-карбоксинатаміциноліді у результаті дії фермента мікозамінтрансферази (PimK) з утворенням 4,5-деепоксинатаміцину [8].

Заключним етапом біосинтезу натаміцину є реакція утворення епоксигрупи між C4 і C5 атомами 4,5-деепоксинатаміцину, яка каталізується ферментом C4,5-епоксидаза (PimD) [8].

Схему перетворення ростового субстрату – глюкози на натаміцин із зазначенням функціонуючих ферментів наведено на рис.4.2.

## Біосинтез натаміцину мікроорганізмом *Streptomyces natalensis* NRRL2651

на ростовому субстраті – глюкоза



**Умовні позначення:** ————— - основний шлях біосинтезу;  
 ..... - анаплеротичні реакції.

### Ферменти:

1. - глюкокіназа (КФ 2.7.1.2)
2. - глюкозо-6-фосфат ізомераза (КФ 5.3.1.9)
3. - 6-фосфофруктокіназа I (КФ 2.7.1.11)
4. - фруктозодифосфатальдолаза, клас II (КФ 4.1.2.13)
5. - тріозофосфатізомераза (КФ 5.3.1.1)
6. - гліцераальдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12)
7. - фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3)
8. - фосфогліцератмутатаза (КФ 5.4.2.12)
9. - енолаза (КФ 4.2.1.11)
10. - піруваткіназа (КФ 2.7.1.40)
11. - піруватдегідрогеназа E1 компонент α-субодиниця (КФ 1.2.4.1)
12. - дигідроліпоамід ацетилтрансфераза (КФ 2.3.1.12)
13. - цитратсинтаза (КФ 2.3.3.1)
14. - аконітат гідратаза (КФ 4.2.1.3)
15. - ізоцитратдегідрогеназа (КФ 1.1.1.42)
16. - 2-оксоглутарат дегідрогеназа E1 (КФ 1.2.4.2)
17. - 2-оксоглутарат дегідрогеназа E2 (КФ 2.3.1.61)
18. - сукциніл-КоА синтетаза β-субодиниця (КФ 6.2.1.5)
19. - сукцинат дегідрогеназа (КФ 1.3.5.4, КФ 1.3.5.1)
20. - фумаратгідратаза, клас II (КФ 4.2.1.2)
21. - малат дегідрогеназа (КФ 1.1.1.37)
22. - фосфоенолпіруват карбоксилаза (КФ 4.1.1.32)
23. - піруваткарбоксилаза (КФ 1.2.4.1)
24. - малатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.37)
25. - ацетил-КоА карбоксилаза (КФ 6.4.1.2)
26. - метилмалоніл-КоА мутаза (КФ 5.4.99.2)
27. - полікетид синтаза, тип I (PimS4)
28. - маннозо-6-фосфат ізомераза (КФ 5.3.1.8)
29. - фосфоманномутаза (КФ 5.4.2.8)
30. - маннозо-1-фосфат гуанілілтрансфераза (КФ 2.7.7.13)
31. - гуанозиндифосфатманноза 4,5-дегідратаза (КФ 4.2.1.47)
32. - гуанозиндифосфатманноза-3-кето-6-дезоксиманноза амінотрансфераза (PimC)
33. - C12-гідроксилаза (PimG)
34. - мікозамін трансфераза (PimK)
35. - C4,5-епоксидаза (PimD)

Рис.4.2

## РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва натаміцину

### 5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

#### 5.1.1. Обґрунтування способу культивування

Виробничий біосинтез натаміцину здійснюють шляхом глибинного культивування мезофільних нейтрофільних бактерій *S. natalensis*. Так, зважаючи на фізіологію даного мікроорганізму, ферментацію необхідно проводити при температурі-оптимумі  $+29\pm 1^\circ\text{C}$  і нейтральному рН 7,0. Під час культивування потрібно також забезпечувати достатній рівень аерації поживного середовища, оскільки *S. natalensis* належать до облігатних аеробів, яким необхідний кисень як термінальний акцептор водню. Так як дана культура-продуцент утворює міцелій, цю особливість також необхідно враховувати під час вибору типу перемішувального пристрою і відповідно режиму перемішування поживного середовища. Сукупність таких фізіологічних особливостей культури-продуцента натаміцину зумовлює необхідність підтримання особливих умов культивування *S. natalensis* NRRL2651 для отримання антибіотика в промислових масштабах.

Біосинтез натаміцину забезпечують у два етапи: перший етап передбачає отримання посівного матеріалу, другий — одержання цільового продукту. Використання біомаси клітин в якості посівного матеріалу дозволяє скоротити лаг-фазу і забезпечити ріст культури одразу з експоненційної фази.

Другим етапом виробничого синтезу натаміцину є культивування продуцента у ферментері відповідного робочого об'єму при аналогічному температурному режимі. Для отримання натаміцину використовують поживне середовище №2 (табл. 2.2).

Варто зазначити, що максимальний вихід натаміцину можливо досягти у стаціонарній фазі росту культури. Після досягнення максимального рівня цільового продукту, його концентрація у культуральній рідині поступово знижується у результаті мікробної дії і зниження концентрації глюкози у середовищі. Це обумовлює необхідність припинення ферментаційного процесу одразу після

					<b>НУХТ БТЕК 04.03.09 КР ПЗ</b>			
Змн.	Арк.	№ документа	Підпис	Дата				
Розробив		Цапко			РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва натаміцину	Літера	Арк.	Аркушів
Консульт.							49	39
Керівник		Красінько				Кафедра БТМ		
Н. контр.								
Зав. каф.		Пирог						

досягнення максимальної концентрації натаміцину у стаціонарній фазі після 84 годин культивування. Таким чином, одержання натаміцину відбувається у періодичній культурі.

Під час ферментаційного процесу протягом перших 48 годин культивування характерне зниження рівня рН з нейтрального 7,0 до кислого 5,5, і поступове підвищення рівня рН після 120 годин культивування. Підкислення культуральної рідини під час експоненційної фази росту культури пов'язують із відділенням органічних кислот ЦТК (наприклад, піруватної, кетоглутарової та молочної кислот) у середовище у невеликих концентраціях. Підвищення рівня рН у стаціонарній фазі росту культури відбувається у результаті зниження росту біомаси і підвищення концентрації антибіотика у культуральній рідині [7]. Зважаючи на такі експериментальні дані, рівень рН середовища у культуральній рідині до 7,0 регулюють додаванням 6% розчину гідроксиду натрію і 6% розчину хлоридної кислоти.

Оскільки обраний продуцент утворює псевдоміцелій, при виборі типу мішалки для перемішування поживного середовища, слід звертати увагу на можливість виникнення надлишкових зрізових зусиль за використання того чи іншого виду перемішувального пристрою. Так, оптимальним вибором для перемішування поживного середовища є турбінні мішалки закритого типу, які забезпечують швидкість перемішування до 300 обертів за хвилину протягом усього часу культивування.

Для аерації середовища використовують стерильне повітря, яке подається через барботер зі швидкістю аерації 1,0 л/ хв. У процесі біосинтезу натаміцину під час аерації середовища можливе утворення піни у культуральній рідині. Це обумовлює необхідність додавання піногасника до середовища. У якості піногасника використовують піногасник Struktol J 673 A, до складу якого входять алкоксильовані естери жирних кислот рослинного походження.

Для стимуляції біосинтезу натаміцину у середовище додають розчин солей коротколанцюгових жирних кислот – ацетату натрію і пропіонату натрію. Додавання цих солей до 24 год культивування збільшує вихід цільового продукту і скорочує загальний час культивування з 96 год до 84 год. Включення даних солей одразу до складу поживного середовища з наступною його стерилізацією не чинило

стимуляційного ефекту на показники біосинтезу натаміцину. Таким чином, ацетат натрію і пропіонат натрію вводять до складу поживного середовища для біосинтезу натаміцину окремою композицією.

### **5.1.2. Обґрунтування стадії підготовки виробничих приміщень, вибору мийних та дезінфікувальних засобів**

Промислове виробництво натаміцину здійснюється протягом 84 робочі дні (див. Розділ 3). Приміщення для виготовлення антибіотика повинне бути обладнане наступними агрегатами: ферментер об'ємом 8,0 м<sup>3</sup>, інокулятор об'ємом 1 м<sup>3</sup>, інокулятор об'ємом 0,1 м<sup>3</sup>, інокулятор об'ємом 10 л, а також збірники відповідних об'ємів для підготовки поживного середовища.

Для вибору оптимальної площі для виробничого приміщення необхідно врахувати приблизну площу устаткування. Площа ферментера об'ємом 8,0 м<sup>3</sup> (d = 2,0 м; h = 3,2 м) становить:  $2 \times \pi \times r \times (h+r) = 2 \times 3,14 \times 1,0 \times (3,2+1,0) = 26,4 \text{ м}^2$ . Площа інокулятора об'ємом 1 м<sup>3</sup> (d = 1,2 м; h = 1,9 м) становить:  $2 \times 3,14 \times 1,1 \times (1,9+1,1) = 20,7 \text{ м}^2$ . Площа інокулятора об'ємом 100 л (d = 0,8 м; h = 1,3 м) становить:  $2 \times 3,14 \times 0,4 \times (0,4+1,3) = 4,3 \text{ м}^2$ . Площа інокулятора об'ємом 10 л (d = 0,2 м; h = 0,6 м) становить:  $2 \times 3,14 \times 0,1 \times (0,1+0,6) = 0,4 \text{ м}^2$ . Так, сумарна площа даного обладнання складає:  $26,4+20,7+4,3+0,4 = 51,8 \text{ м}^2$ .

Варто також врахувати, що у виробничому приміщенні встановлюють збірники для підготовки поживного середовища об'ємом 5 м<sup>3</sup>, 0,4 м<sup>3</sup>, 0,04 м<sup>3</sup>, а також збірник для піногасника об'ємом 0,01 м<sup>3</sup>, збірник для розчину гідроксиду натрію 0,01 м<sup>3</sup>, мірник для розчину хлоридної кислоти об'ємом 0,01 м<sup>3</sup>.

Площа збірника об'ємом 5 м<sup>3</sup> (d = 1,4 м; h = 2 м):  $2 \times 3,14 \times 0,7 \times (0,7+2,0) = 11,9 \text{ м}^2$ . Площа збірника об'ємом 0,4 м<sup>3</sup> (d = 0,8 м; h = 1,2 м) становить:  $2 \times 3,14 \times 0,4 \times (0,4+1,2) = 4 \text{ м}^2$ . Площа збірника об'ємом 0,04 м<sup>3</sup> (d = 0,4 м; h = 0,6 м) становить:  $2 \times 3,14 \times 0,2 \times (0,2+0,6) = 1 \text{ м}^2$ . Площа збірника об'ємом 0,01 л (d = 0,2 м; h = 0,4 м) становить:  $2 \times 3,14 \times 0,2 \times (0,1+0,2) = 0,4 \text{ м}^2$ . Так, сумарна площа даного обладнання складає:  $11,9+4+1+(3 \times 0,4) = 18,1 \text{ м}^2$ .

Так, загальна площа виробничого обладнання складає:  $51,8 + 18,1 = 70 \text{ м}^2$ . Загальний об'єм обладнання складає:  $8+1+0,1+(4 \times 0,01)+5+0,4+0,04 = 14,48 \text{ м}^3$ .

Враховуючи те, що відстань між апаратами і від апаратів до стін, вікон, дверей повинна становити не менше 1 м, оптимальна площа виробничого приміщення складатиме 80 м<sup>2</sup> (10×8 м). Загальна площа стін у приміщенні висотою 3,5 м становить:  $[(10 \times 3,5) + (8 \times 3,5)] \times 2 = 126 \text{ м}^2$ . Площа підлоги у приміщенні – 80 м<sup>2</sup>.

Розрахуємо загальні площі поверхонь, які необхідно мити та/або дезінфікувати впродовж усього періоду виробництва натаміцину (табл. 2.1). Необхідно також врахувати, що кількість цільового продукту за один виробничий цикл становить 3,9 м<sup>3</sup>. Загальна кількість циклів за 84 робочих дні складає:  $84 / 3,9 = 21,5 \approx 22$  цикли. Миття резервуарів обладнання, інвентаря, комунікацій здійснюють перед початком кожного виробничого циклу, а отже, загальна кількість процесів становить 22 рази.

Генеральне прибирання включає обробку спеціальними дезінфікуючими розчинами поверхонь усього обладнання, інвентаря, комунікацій, стелі, стін, повітропроводів, вікон і підвіконь. Прийmemo, що на даному виробництві генеральне прибирання проводять раз на місяць. Так, генеральне прибирання проводять 1 раз.

Щоденне прибирання приміщень включає миття підлоги. Так, загальна кількість щоденних прибирань виробничого приміщення становить 84 рази. Розрахунки кількості процесів і площі миття та/або дезінфекції об'єктів у приміщенні для виробництва натаміцину наведено у табл. 5.1.

Таблиця 5.1

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

Об'єкт миття та/або дезінфекції	Площа (об'єм) об'єкту, який обробляють, м <sup>2</sup> (м <sup>3</sup> )	Кількість процесів миття та/або дезінфекції за весь період виробництва	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції за весь період виробництва, м <sup>2</sup> (м <sup>3</sup> )
Обладнання, інвентар, комунікації	14,48	22	318,56
Підлога	80	84	6 720
Стіни, двері, вікна	126	1	126

Миття резервуарів виробничого обладнання, як правило, здійснюється за допомогою СІР-мийки. Циркуляційна мийка буде застосовуватись для миття виробничого ферментера (8,0 м<sup>3</sup>), посівного апарату (1,0 м<sup>3</sup>), інокулятора (0,1 м<sup>3</sup>), малого інокулятора (10,0 л), а також реакторів-змішувачів для підготовки поживного середовища (0,04 м<sup>3</sup>, 0,4 м<sup>3</sup>, 5,0 м<sup>3</sup>), піногасника (0,01 м<sup>3</sup>), загальний об'єм котрих становить 145,6 м<sup>3</sup>. Об'єм мийного засобу для СІР-мийки для одного циклу становить 20% від кожного з об'ємів обладнання –  $14,48 \times 0,2 = 2,9 \approx 3 \text{ м}^3$ .

Виробниче приміщення, у якому позмінно працюють групи фахівців, має високий ризик контамінації безпосередньо мікробіотою самої людини. Тому при виборі мийного і дезінфікувального засобу для щоденного прибирання і миття підлоги слід звертати особливу увагу на широту спектра антимікробної активності засобу, невисоку агресивність і, головним чином, на екологічну безпечність засобу. Не менш важливим фактором є і вартість засобу, оскільки щоденне прибирання за весь період виробництва включає високу загальну площу миття та або дезінфекції ділянки і відповідно великі об'єми мийного засобу.

При виборі дезінфікуючого засобу для щоденного прибирання особливо важливо враховувати його безпечність для людини. На сьогоднішній день, одними з найбільш безпечних засобів санітарної підготовки приміщень є засоби на основі четвертинних амонієвих сполук. Так, «Дезекон УНВЦПТ» – концентрований високоефективний дезінфікуючий засіб з посиленням миючим ефектом, котрий виявляє антимікробні властивості проти грампозитивних і грамнегативних бактерій, збудників туберкульозу, вірусів герпесу, грипу, коронавірусів, патогенних і пліснявих грибів. Засіб належить до 4 класу безпеки при інгаляційному і наскірному впливі, є екологічно безпечним. Робота із робочими розчинами засобу не вимагає засобів індивідуального захисту. Засіб не залишає п'ятен і нальоту, а також не чинить пошкоджуючої дії на поверхню металевих, пластмасових і гумових об'єктів. Для щоденного прибирання готують 1% робочий розчин [45].

Також завдяки широкому спектру антимікробної дії, добрій розчинності у воді й доступній вартості хлорактивні засоби 2-го покоління часто використовуються для щоденного прибирання виробничих приміщень. Так, «Хлорамін-Б» - натрієва сіль хлораміду монобензолсульфокислоти – дезінфекційний засіб з бактерицидним,

фунгіцидним і віруліцидним ефектом. Засіб чинить активну дію проти збудників інфекційних і шкірних хвороб, переносниками яких є людина, зокрема грампозитивних і грамнегативних бактерій, мікобактерій туберкульозу, збудників гепатитів, поліомієліту, дерматофітів, збудників мікозів та ін. Засіб використовують для санітарної обробки стін, поверхонь обладнання, підлоги, вікон, інвентарю, лабораторного посуду у вигляді 0,75% розчину. Варто зазначити, що робочі розчини «Хлораміну-Б» до 1% не чинять подразливої дії на організм людини. Проте, при роботі з розчином необхідно використовувати респіратор, гумові рукавиці і окуляри [46].

Для приготування 1 л робочого розчину використовують 7,5 г засобу, який розчиняють у воді підігрій до  $t = 50-60^{\circ}\text{C}$ . Для покращення мийних властивостей розчину додатково додають синтетичний мийний засіб у кількості 5,0 г/л. Як мийний засіб для робочого розчину “Хлораміну-Б” можна використовувати універсальний засіб для миття поверхонь “More Goods Professional”.

Для миття резервуарів виробничого обладнання найдоцільніше використовувати циркуляційну СІР-мийку. Даний метод дозволяє зменшити витрати мийного розчину, а також підвищити якість миття апаратури.

При виборі дезінфікувального засобу для обробки ділянки виробництва натаміцину необхідно враховувати те, що штам-продуцент натаміцину є спороутворювальним актиноміцетом, і тому обраний засіб повинен виявляти високу активність проти спор. Саме тому, оптимальним вибором є препарати на основі надоцтової кислоти, які наразі широко використовуються для СІР-мийок.

Для циркуляційної мийки обладнання можна використовувати засіб “Бландіас-А-Форте” – високоефективний дезінфікуючий засіб на основі надоцтової кислоти, який можна використовувати для миття поверхонь з всіх типів нержавіючої сталі. Перевагою даного засобу є його ефективна робота у жорсткій воді, безпечність для навколишнього середовища, відсутність необхідності ополіскування обладнання після мийки засобом. Робочий розчин засобу використовується у концентрації 0,15% (1,5 мл/ л води) [47].

Альтернативою засобам для СІР-мийки на основі кислоти є мийні засоби на основі ПАВ. Прикладом такого засобу є Ecolab P3-COSA СІР 90. Засіб

використовується у концентрації 1-3% для видалення забруднень органічної природи. Засіб застосовують для очищення металічних і пластикових деталей у СІР-системах для обладнання фармацевтичної промисловості і біотехнології [48].

Для генерального прибирання приміщення доцільно використовувати дезінфекуючий засіб з пролонгованою дією. На сьогоднішній день найбільшу пролонгованою дією володіють гуанідинові препарати. Так, «Полідез-А» - безпечний багатофункціональний засіб, пролонгована дія якого створюється за рахунок утворення полімерної плівки, яку за необхідно можна легко змити водою. Засіб добре розчиняється у воді кімнатної температури, не пошкоджує металеві поверхні, є екологічно безпечним. Робочий розчин готують у концентрації 3% [49].

«Велідез-Ензим» - засіб, який використовують для дезінфекції поверхонь високого рівня і передстерилізаційного очищення обладнання. Засіб можна використовувати без попередньої обробки поверхонь. Первагою засобу є його короткий термін експозиції, повний спектр знезаражуючої дії, пролонгований антимікробний ефект (48 год). Робочий розчин готують у концентрації 3% [50].

Проаналізувавши дані із узагальненої характеристики витрат мийних та дезінфікувальних засобів для виробництва натаміцину, наведеної у табл. 5.2, можна зробити наступні висновки:

- для щоденного прибирання доцільно використовувати «Дезекон», оскільки засіб є екологічно безпечним, не потребує при використанні робочих розчинів індивідуальних засобів захисту, а також не потребує додавань інших засобів для покращення мийних властивостей розчину, економічний у використанні;
- для миття резервуарів – «Бландіас-А Форте», оскільки засіб є спеціально призначеним для СІР-мийки, є безпечним для навколишнього середовища, може використовуватися без необхідності подальшого ополіскування обладнання, є більш дешевим;
- для генерального прибирання (миття і дезінфекція стін, дверей, вікон) – «Велідез-Ензим», оскільки препарат є екологічний безпечним, має пролонгований ефект до 48 год і нетривалий час експозиції.

## Узагальнена характеристика витрат мийних та дезінфікуючих засобів для виробництва натаміцину

Назва миючого/ дезінфікуючого засобу (діюча речовина)	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Концентрація робочого розчину, %	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції за весь період виробництва, м <sup>2</sup> (м <sup>3</sup> )	Кількість робочого розчину за весь виробництва, л (м <sup>3</sup> )	Кількість миючого/ дезінфікуючого засобу за весь виробництва, л	Вартість 1 л/кг миючого/ дезінфікуючого засобу, грн**	Загальна вартість миття та/або дезінфекції за весь період виробництва, грн
Хлорамін-Б (хлорамін)	Підлога	0,75	13 860	1386	10,4	17,2	179
More goods Proff (неіоногенні ПАР*)	Підлога	5,0	13 860	1386	6,9	22,8	158
Дезекон (ЧАС*)	Підлога	0,05	13 860	1386	0,7	255	178,5
Бланідас-А Форте (надоцтова кислота, перекис водню)	Обладнання, інвентар, комунікації, тара	0,15	12 376	6 188	92,8	128,25	11 902
РЗ COSA CIP90 (ПАР*)	Обладнання, інвентар, комунікації, тара	0,1	12 376	6 188	61,9	356,2	22 048
Велідез Ензим (ЧАС, 2-пропанол, комплекс ензимів)	Стіни, поверхні обладнання, двері, вікна	1,0	715	71,5	0,72	240	173
Полідез-А (ПМГ-ГХ, ЧАС)	Стіни, поверхні обладнання, двері, вікна	1,0	715	71,5	0,72	245	177

\*ПАР – поверхнево-активні речовини, ЧАС – четвертинні амонієві сполуки, ПМГ-ГХ – полігексаметилгуанідін гідрохлорид

### 5.1.3. Обґрунтування стадії підготовки обладнання і комунікацій

Передферментаційні процеси виробництва натаміцину включають миття і ополіскування ємкісного обладнання, технічний огляд апаратури, перевірку обладнання і комунікацій на герметичність, стерилізацію апаратури і комунікацій.

**Стадія технічного огляду.** Обов'язковою стадією доферментаційної підготовки є технічний огляд обладнання з метою перевірки загальної цілісності обладнання і цілісності мішалок, виявлення будь-яких дефектів і сторонніх об'єктів, виявлення порушень цілісності комунікацій і запірної арматури.

У традиційному методі технічного огляду інспекцію обладнання проводять спеціалісти. Проте, цей метод є доволі тривалим і не виключає людських помилок. Тому сучасною альтернативою даному методу є використання квадрокоптерів для технічного огляду ємкісної апаратури. Так, противоударний квадрокоптер "Flyability Elios" здатний провести інспекцію технічного стану резервуару одного ферментера за один політ тривалістю 8-10 хвилин [51]. Далі відзнятий відеоматеріал аналізують фахівці і роблять висновок стосовно справності і цілісності обладнання і комунікацій. Таким чином, використання дронів для технічного огляду дозволяє значно зменшити тривалість простою обладнання, а також мінімізувати вплив людського фактору при інспекції обладнання.

**Стадія перевірки обладнання і комунікацій на герметичність.** Основною причиною розгерметизації виробничих ферментерів є безпосередньо порушення запірно-регулюючої арматури. Для уникнення випадків розгерметизації апаратів і комунікацій необхідно передбачати спеціальні перевірки герметичності обладнання на всіх етапах біотехнологічного виробництва, починаючи з конструювання і проектування, і закінчуючи самою експлуатацією систем культивування. На сучасних біотехнологічних виробництвах найбільш оптимальним методом випробування обладнання на герметичність є використання галоїдних течіешукачів. Методика його застосування полягає у заливанні фреону-12 у апарат, який досліджується, нагріванні до температури 80 °C і збільшенні тиску до 0,2 МПа. У разі наявності порушень герметичності апаратури, пара фреону-12 проникає через неущільнення, що виявляється при наближенні щупу течіешукача до місця витоку [52]. Перевагами даного методу є відносна простота виконання, висока продуктивність – метод

дозволяє виявляти місця витоку до 0,5 г/рік, швидкість виконання - 1,5-2 год для одного апарату.

#### **5.1.4. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря**

Для біосинтезу натаміцину потрібно забезпечувати достатній рівень аерації поживного середовища, оскільки штам-продуцент *S. natalensis* NRRL2651 належить до облігатних аеробів, якому кисень необхідний як термінальний акцептор водню. Так, для аерації використовують відфільтроване стерильне повітря, яке подають через барботер зі швидкістю аерації 1,0 л/ хв [7]. Зважаючи на необхідність забезпечення аерації під час вирощування посівного матеріалу і біосинтезу цільового продукту, підготовка стерильного аераційного повітря є однією з найважливіших стадій доферментаційних процесів.

Підготовка стерильного аераційного повітря здійснюється за допомогою багатокомпонентної системи стиснення і очищення повітря. На першому етапі атмосферне повітря забирають на висоті 30 м і очищують від пилу і крупних часточок на фільтрах грубої очистки ФВП-G4-66-25/С з класом очистки G2-G4. У таких фільтрах фільтруючим матеріалом є скловолокно з підвищеною щільністю.

Попередньо очищене повітря стискають за допомогою одноступінчастого поршневого компресора низького тиску до 0,5 МПа. Після стиснення повітря досягає високої температури. Для цього повітря охолоджують до температури 25-40°C у теплообміннику-охолоджувачі, який охолоджує повітря шляхом передачі тепла між повітрям, яке проходить через теплообмінник і охолодженою водою, яка міститься в інтегрованому у систему чилері.

Для того щоб вирівняти інтенсивність руху повітря і попередити можливість його нерівномірної подачі, а також видалити зайву вологу з повітря, встановлюють ресивер. У випадку перебою в роботі компресора, ресивер буде подавати необхідну кількість повітря зі свого резервуара. З цією метою передбачають встановлення ресивера. Далі для забезпечення оптимальної температури повітря нагрівають у теплообміннику-нагрівачу до оптимальної температури.

Нагріте до оптимальної температури повітря потрапляє на фільтри тонкої очистки типу ФТОВ Н10-Н14 з фільтроматеріалом – мікроскловолокно. Матеріал для даного типу фільтрів – це гофрований фільтрувальний папір на основі ультра- і

мікротонкого скловолокна. У фільтрувальному матеріалі використовуються скляні волокна діаметром 0,25...1,0 мкм. Такий тип фільтрів дозволяє досягти ефективності очищення повітря до 99,9995 %.

Для абсолютної (фінішної) очистки аераційного повітря використовують фільтри індивідуального очищення, які встановлюють безпосередньо для кожного ферментаційної установки: для малого інокулятора, інокулятора, посівного апарату і виробничого ферментера. Для цього використовують фільтри надвисокоєфективної очистки типу ФяС-У класів очищення U15-U16. Фільтри такого типу складаються зі спеціального анодованого алюмінієвого профілю, всередині якого розміщується фільтруючий пакет мініплісерованого скловолокнистого матеріалу. На виході повітря встановлюють захисну сітку. Варто зазначити, що попередньо індивідуальні фільтри необхідно простерилізувати шляхом нагрівання вологою парою і витримки при температурі 125-130 °С. Застосування фільтрів індивідуального очищення дозволяє отримати стерильне аераційне повітря зі ступенем чистоти близько 99,99995%, що мінімізує ризик контамінації культуральної рідини мікроорганізмами і частками з повітря [26].

#### **5.1.5. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища**

Максимальний синтез натаміцину (3,0 г/л за 84 год) забезпечують за умов культивування штаму-продуцента *S. natalensis* NRRL2651 на поживному середовищі для біосинтезу наступного складу (г/л): глюкоза - 20,0, м'ясний екстракт - 2,0, дріжджовий екстракт - 2,0, аспарагін - 0,5, монофосфат калію - 0,05, пропіонат натрію - 0,5, ацетат натрію - 1,75 [7].

Отримання посівного матеріалу здійснюють за використання поживного середовища простішого складу (г/л): глюкоза - 4,0, солодовий екстракт - 10,0, дріжджовий екстракт - 4,0 [7].

Відповідно до розрахунків, виробничий біосинтез натаміцину буде здійснюватися у ферментері об'ємом 8,0 м<sup>3</sup>. Одержання посівного матеріалу буде відбуватися у чотири етапи: у колбах на качалці, інокуляторі об'ємом 10,0 л, інокуляторі об'ємом 0,1 м<sup>3</sup>, інокуляторі об'ємом 1 м<sup>3</sup>. Допоміжними роботами для отримання інокуляту і виробничого біосинтезу є наступні процеси: приготування і стерилізація розчинів для титрування, підготовка і стерилізація піногасника.

Для вирощування посівного матеріалу *S. natalensis* NRRL2651 і виробничого біосинтезу натаміцину, рН культуральної рідини повинен бути нейтральним – 7,0. Так, рівень рН контролюють додаванням 6% розчину гідроксиду натрію і 6% розчину хлоридної кислоти. Для розрахунку приймаємо, що для титрування культуральної рідини витрачається 2 мл титрувальних агентів на 1 л робочого об'єму ферментаційного обладнання. Приготування і стерилізація розчинів для титрування проводиться для виробничого ферментера об'ємом 8,0 м<sup>3</sup>, посівного апарату об'ємом 1,0 м<sup>3</sup>, інокулятора об'ємом 0,01 м<sup>3</sup> і малого інокулятора об'ємом 10 л.

**Приготування 6% розчину гідроксиду натрію.** Для виробничого ферментера з робочим об'ємом 4,3 м<sup>3</sup> необхідно приготувати 6% розчину гідроксиду натрію:  $0,002 \times 4300 = 8,6 \approx 9$  л. Розчин готують у реакторі-змішувачі об'ємом 0,01 м<sup>3</sup>. Розчин лугу стерилізують у реакторі-змішувачі шляхом подачі гострої пари при температурі 120° С і тиску 0,075 МПа протягом 20 хвилин. Тому, для виробничого ферментера передбачаємо встановлення реактора-змішувача об'ємом 0,01 м<sup>3</sup> для приготування 6% розчину гідроксиду натрію.

Для посівного апарату з робочим об'ємом 0,44 м<sup>3</sup> необхідно приготувати 6% розчину гідроксиду натрію:  $0,002 \times 440 \approx 900$  мл. 6% розчин гідроксиду готують у конічній колбі об'ємом 1 л. Для інокулятора з робочим об'ємом 44,4 л необхідно приготувати 6% розчину гідроксиду натрію:  $0,002 \times 44,4 \approx 90$  мл. 6% розчин гідроксиду готують у конічній колбі об'ємом 250 мл. Для інокулятора з робочим об'ємом 4,4 л необхідно приготувати 6% розчину гідроксиду натрію:  $0,002 \times 4,4 \approx 9$  мл. 6% розчин гідроксиду готують у конічній колбі об'ємом 50 мл. Розчини гідроксиду натрію заданих об'ємів у конічних колбах стерилізують в автоклаві при 120° С протягом 20 хв.

**Приготування 6% розчину хлоридної кислоти.** Через леткість кислоти 6% розчин хлоридної кислоти готують безпосередньо перед подачею у апарат на титрування. Розчин готують з концентрованого 36% розчину хлоридної кислоти шляхом додавання необхідного об'єму кислоти до води. Для приготування 1 л 6% розчину хлоридної кислоти відміряють 13,5 мл 36% розчину хлоридної кислоти і розводять дистильованою водою до загального об'єму 1 л. При приготуванні розчину кислоту подають у воду. Розчин хлоридної кислоти стерилізації не потребує.

Об'єми 6% розчину хлоридної кислоти аналогічні об'ємам 6% гідроксиду натрію. Так, для виробничого ферментера передбачаємо встановлення мірника об'ємом 0,01 м<sup>3</sup> для приготування 6% розчину хлоридної кислоти. Для посівного апарату і інокуляторів приготування розчину хлоридної кислоти проводять у лабораторному посуді.

**Підготовка і стерилізація піногасника.** У процесі вирощування посівного матеріалу і біосинтезу натаміцину під час аерації поживного середовища можливе утворення піни у культуральній рідині. Це обумовлює необхідність додавання піногасника до середовища. У якості піногасника використовують піногасник *Struktol J 673 A*, до складу якого входять алкоксильовані естери жирних кислот рослинного походження. Для усунення надмірного піноутворення у середовищі додають піногасник кількістю 0,2% від робочого об'єму ферментера. Так, об'єм піногасника для виробничого ферментера становить  $\approx 8$  л. Піногасник стерилізують шляхом його нагрівання у збірнику з електротеном до температури 131°C протягом 40 хв.

**Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу.** На першому етапі для одержання посівного матеріалу в колбах на качалці потрібно 400 мл поживного середовища. Компоненти поживного середовища для вирощування посівного матеріалу стерилізуємо в одній композиції в автоклаві при температурі 112° С і тиску 0,05 МПа протягом 30 хвилин. Для стерилізації використовуємо лабораторний автоклав "Tuttnauer 3840 ELV D-Line" з вертикальним завантаженням об'ємом 52 л.

Для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10,0 л необхідно приготувати 4 л поживного середовища. Поживне середовище стерилізують в одній композиції в автоклаві при температурі 112° С і тиску 0,05 МПа протягом 30 хвилин.

Для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 0,1 м<sup>3</sup> необхідно приготувати 44 л поживного середовища. Поживне середовище стерилізують в одній композиції безпосередньо в інокуляторі шляхом подачі гострої пари при температурі 112° С і тиску 0,05 МПа протягом 30 хвилин. Для приготування композиції перед інокулятором передбачаємо встановлення реактора-змішувача об'ємом 0,04 м<sup>3</sup>.

Для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 1,0 м<sup>3</sup> необхідно приготувати 0,44 м<sup>3</sup> поживного середовища. Поживне середовище стерилізують в

одній композиції безпосередньо в інокуляторі шляхом подачі гострої при температурі 112° С і тиску 0,05 МПа протягом 30 хвилин. Для приготування композиції перед інокулятором передбачаємо встановлення реактора-змішувача об'ємом 0,4 м<sup>3</sup>.

**Приготування і стерилізація поживного середовища для біосинтезу натаміцину.** Для виробничого ферментера об'ємом 8,0 м<sup>3</sup> необхідно приготувати 4,3 м<sup>3</sup> поживного середовища. Компоненти поживного середовища для біосинтезу натаміцину умовно поділяють на окремі композиції: композиція А (глюкоза, дріжджовий екстракт, м'яний екстракт, аспарагін), композиція Б (монофосфат калію), композиція В (ацетат натрію, пропіонат натрію).

Для приготування композиції А наважку глюкози, дріжджового екстракту, аспарагіну, м'яного екстракту поміщають через об'ємно-ваговий дозатор у реактор-змішувач об'ємом 5 м<sup>3</sup>. Подають питну воду. Для кращого розчинення компонентів, середовище підігрівають до  $t = 30-40^{\circ}$  С за допомогою електротена. Вмикають мішалку і проводять перемішування протягом 10-15 хвилин. Отриманий розчин зі збірника перекачують за допомогою насосу в попередньо простерилізований виробничий ферментер.

Композицію А стерилізують безпосередньо у виробничому ферментері шляхом подачі гострої пари через барботер при температурі 112° С і тиску 0,05 МПа протягом 30 хвилин. Для приготування композиції перед інокулятором передбачаємо встановлення реактора-змішувача об'ємом 5 м<sup>3</sup>.

Для приготування композиції Б наважку монофосфату калію поміщають у колбу об'ємом 200 мл. Колбу стерилізують в автоклаві при температурі 131° С і тиску 0,15 МПа протягом 40 хвилин.

Композицію В готують і стерилізують у реакторі-змішувачі шляхом подачі гострої пари при температурі 131° С і тиску 0,15 МПа протягом 40 хвилин. Композицію подають у поживне середовище для біосинтезу натаміцину після перших 24 год культивування.

## **5.2. Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту**

### **5.2.1. Обґрунтування вибору технології виділення і очищення натаміцину**

На сьогоднішній відома досить велика кількість методів виділення і очищення натаміцину з культуральної рідини. Переважна більшість процесів виділення

антибіотика вимагають проведення серії етапів з очищення цільового продукту, що в результаті призводить до високих експлуатаційних витрат. Так, донедавна використовувались наступні методи: виділення натаміцину шляхом адсорбції/елюції з використанням бутанолу і ацетону [53], висолювання натаміцину з культуральної рідини з подальшим видаленням розчинника і випарюванням [54], вакуумне концентрування відфільтрованої культуральної рідини для отримання протигрибкового комплексу з наступним виділенням з нього натаміцину [55]. Проте варто зазначити, що зазначені методи є досить складними у реалізації у промислових масштабах, залучають велику кількість обладнання, а також є занадто тривалими у часі. Зважаючи на це, наразі найбільш поширеним і набагато простішим методом виділення і очищення натаміцину є екстрагування органічним розчинником, зокрема метанолом і ізопропанолом.

Відповідно до хімічної структури натаміцину, молекула антибіотика містить макроциклічне лактонне кільце із серією кон'югованих подвійних зв'язків, розташованих напроти гідроксильних груп, яке зв'язане ефірним зв'язком із мікозаміною групою [4]. Така структурна формула натаміцину визначає його розчинність у органічних розчинниках. Так, натаміцин є слабозрозчинним у воді, не розчиняється у спиртах, ефірах, ароматичних і аліфатичних вуглеводнях, проте добре розчиняється у полярних органічних розчинниках, зокрема метилпіролідоні, диметилсульфоксиді і т.д. Ще однією особливістю натаміцину є його амфотерні властивості у водних розчинах, яка визначається наявністю у молекулі полісахаридної групи. Завдяки своїм амфотерним властивостям, розчинність натаміцину у нерозчинних сполуках можна підвищувати шляхом підвищення або зниження рН. Ця властивість відіграє ключову роль у процесах екстракції натаміцину. Якщо для екстракції використовувати органічний розчинник, у якому натаміцин є розчинним, то надалі розчинений натаміцин буде складно виділити із реакційної суміші. Напротивагу цьому, використання органічних розчинників, у яких натаміцин не є розчинним, дозволяє при сильній зміні рН середовища здійснити розчинення натаміцину, а при повторному доведенні рН середовища до ізоелектричної точки антибіотика спричинити його осадження і кристалізацію. Для здійснення екстракції за такою схемою, також необхідно, щоб органічний розчинник також був

водорозчинним. Тому, у процесах екстракції натаміцину органічним розчинником, перевагу надають простим одноатомним водорозчинним спиртам, у яких натаміцин не є розчинним.

Залежно від того, який органічний розчинник використовується, технології виділення і очищення антибіотика мають свої відмінності. Розглянемо дві технології виділення натаміцину методом екстракції метанолом та ізопропанолом.

Натаміцин з високим ступенем очистки можна виділити з культуральної рідини за допомогою екстракції метанолом за умови контролю показників рН і температури.

Технологія 1 [56]:

1. Відділення біомаси і концентрування культуральної рідини до 98% вмісту твердих речовин;
2. Екстракція натаміцину метанолом протягом 3 год;
3. Підкислення екстракційного середовища до рН 2,4 при  $t = 4\text{ C}$ ;
4. Відділення твердої фази;
5. Осадження натаміцину розчином гідроксиду натрію при рН 6,0 – 9,0;
6. Відділення кристалів натаміцину;
7. Промивання кристалів натаміцину;
8. Сушіння.

Переваги технології:

- ✓ технологія дозволяє виділяти натаміцин із ферментаційних середовищ з концентрацією цільового продукту від 2,0 г/л;
- ✓ невеликі витрати метанолу – співвідношення концентрованої культуральної рідини до екстрагенту 1:1,3;
- ✓ можливість регенерації метанолу і його повторного використання у суміші з відгоном;
- ✓ можливість контролювати тривалість процесу екстракції шляхом зміни рівня рН і температури екстракційного середовища.

Недоліки технології:

- чистота виділеного і очищеного натаміцину у перерахунку на безводну основу варіює від 80 до 90%;

- значні втрати натаміцину на етапі відділення твердої фази з екстракційного середовища;
- використання сильних кислот може призвести до кислотної деструкції натаміцину і, як наслідок, зниження виходу і чистоти цільового продукту;
- можливість утворення метилового естеру – побічного продукту, який перешкоджає подальшому екстрагуванню натаміцину і відповідно зниженню виходу цільового продукту;
- сухий натаміцин містить 1,7% домішок від загальної маси продукту.

Інша високоефективна технологія виділення натаміцину високої якості передбачає використання водорозчинного екстрагенту – ізопропілового спирту за лужних значень рН, що виключає можливість кислотної деструкції та інактивації натаміцину [57].

Технологія 2:

1. Відділення біомаси ;
2. Дезінтеграція клітин;
3. Підлучення середовища до рН 10-11;
4. Екстракція натаміцину ізопропанолом;
5. Внесення у реакційну суміш антиоксиданту;
6. Відділення твердої фази суміші;
7. Підкислення фільтрату до рН 6,5;
8. Осадження натаміцину протягом 1-2 год;
9. Відділення і промивання кристалів натаміцину;
10. Сушіння.

Переваги технології:

- ✓ відсутність можливості кислотної деструкції та інактивації натаміцину;
- ✓ збереження стабільності натаміцину протягом усього процесу екстрагування;
- ✓ можливість регенерації ізопропанолу і повторного використання його відгону у наступних процесах екстракції;
- ✓ додавання антиоксидантів сприяє збільшенню виходу натаміцину на 0,2%;

- ✓ чистота виділеного і очищеного натаміцину у перерахунку на безводну основу становить 98%.

Підсумуємо переваги і недоліки технологій виділення натаміцину методом екстрагування метанолом і ізопропанолом (табл. 5.3).

Таблиця 5.3

### Порівняння технологій виділення натаміцину

	Технологія 1	Технологія 2
Простота технічної реалізації процесу	✓	✓
Тривалість процесу	✓	✓
Вартість екстрагенту за 1 л*	37,8 грн	36,3 грн
Регенерація екстрагенту	✓	✓
Відсутність ймовірності кислотної деструкції продукту	-	✓
Відсутність побічних продуктів при екстракції	-	✓
Відсутність високого вмісту домішок у готовому продукті	-	✓
Висока чистота продукту у перерахунку на безводну основу	-	✓

\*Ціни станом на травень 2020 р., джерело <https://www.systopt.com.ua>

Отже, використання технології виділення і очищення натаміцину шляхом екстрагування ізопропіловим спиртом є нескладним у реалізації процесом, який виключає можливість дестабілізації і деструкції продукту під час його виділення та дозволяє отримувати натаміцин високого ступеня очищення.

#### 5.2.2. Вибір способу відділення біомаси з культуральної рідини і відповідного обладнання

Після процесу біосинтезу культуральна рідина містить цільовий продукт – позаклітинний антибіотик натаміцин, псевдоміцеліальну масу продуцента *S. natalensis* NRRL2651, детрит клітин, залишки поживного середовища, а також продукти метаболізму продуцента. Зважаючи на те, що натаміцин є внутрішньоклітинним метаболітом, спочатку необхідно відділити клітинну масу з культуральної рідини. Це можливо реалізувати способом глибинної фільтрації або центрифугування культуральної рідини.

**Поверхнева фільтрація.** Процес фільтрування культуральної рідини базується на затримці клітинної маси на пористій фільтрувальній перегородці. У процесі фільтрації під час руху біомаси у напірному каналі фільтрувального елемента відбувається концентрування дисперсної фази культуральної рідини за рахунок видалення частки води з розчиненими у ній речовинами. Так, через пори

фільтрувального елемента проходить культуральна рідина, яка містить продукти метаболізму, залишки поживного середовища та інші розчинені речовини, утворюючи фільтрат, а на поверхні фільтрувальних елементів накопичується ретентант – біомаса і завислі частки. Проте, такий спосіб відділення біомаси пов'язаний із нашаруванням ретентанту на поверхні фільтрувального елемента, збільшенням питомого опору елемента і, як наслідок, зниженням швидкості проходження рідини через фільтр. Тому, для підвищення швидкості фільтрування культуральної рідини її попередньо обробляють кислотами або солями. Додавання таких речовин може мати негативний вплив на стабільність натаміцину і сприяти його частковій деструкції. Більш того, використання фільтрувальних установок вимагає періодичного оновлення витратних матеріалів – фільтрувальної тканини, картриджів тощо, що додає до вартості загальних експлуатаційних витрат.

**Мембранна (глибинна) фільтрація.** Застосування мембранної фільтрації, а саме мікрофільтрації, дозволяє ефективно відділити культуральну рідину від біомаси та завислих твердих часток. Проте основним недолік даного способу є його невисока швидкість. Зважаючи на великі об'єми культуральної рідини, яку одержують після виробничого біосинтезу, застосування мікрофільтрації у даному випадку є не раціональним.

**Центрифугування.** Найдоцільнішим способом відділення біомаси з культуральної рідини є центрифугування – осадження завислих твердих часток у рідині у полі дії відцентрових сил. Принцип дії центрифуг загалом полягає у тому, що гетерогенна культуральна рідина надходить у ротор центрифуги, у якому рідина утворює кільце для розділення фаз. Так, у полі дії відцентрових сил дисперсна фаза культуральної рідини, яка має більшу густину – біомаса, відкидається до периферії та осідає на стінках ротора центрифуги, а потім вивантажується у ручному або автоматичному режимі [60].

Варто звернути увагу на те, що більшість центрифуг призначено для обробки рідин з достатньо високою об'ємною концентрацією дисперсної фази –  $w = 5-30\%$ . Враховуючи те, що культуральна рідина *Streptomyces natalensis* NRRL2651 після процесу біосинтезу містить близько 0,42% біомаси і 0,3% натаміцину, тобто є низько концентрованою, доцільно використовувати центрифуги-декантери – центрифуги

осаджувального типу дії [58]. Такі центрифуги дозволяють реалізувати водночас два процеси: освітлення і відділення від культуральної рідини твердої фази – біомаси, нерозчинних часток, залишків поживного середовища.

Перевагами осаджувальних центрифуг є:

- ✓ відділення дрібної дисперсної фази з культуральної рідини відбувається без необхідності попередньої обробки рідини;
- ✓ освітлення культуральної рідини;
- ✓ можливість автоматичної регуляції швидкості роботи мішалки;
- ✓ висока швидкість сепарації культуральної рідини;
- ✓ відсутність витратних матеріалів (наприклад, фільтрувальна тканина, картриджі, пластини тощо);
- ✓ вологість осаду після центрифугування становить 10-30%;
- ✓ попередження можливості контамінації продукту завдяки проходженню процесу центрифугування у закритій конструкції;
- ✓ безперервний автоматичний режим роботи центрифуги зводить до мінімуму необхідність керування процесом людиною.

Таким чином, використання центрифуги-декантеру для відділення біомаси з культуральної рідини дозволяє сепарувати рідину на дві фракції без застосування попередньої обробки рідини кислотами або неорганічними електролітами, які можуть сприяти інактивації або частковій деструкції натаміцину. Також закритий тип конструкції сприяє більшій гігієнічності процесу, оскільки така конструкція апарату попереджає ризики контамінації довкілля клітинами біологічного агента. Не менш важливою перевагою центрифуги є її економічність, що забезпечується реалізацією таких факторів: швидкий і високоефективний перебіг процесу сепарування і освітлення культуральної рідини знижує загальні експлуатаційні витрати, відсутність витратних матеріалів позитивно позначаються на собівартості продукту.

Для відділення біомаси з культуральної рідини передбачаємо використання центрифуги-декантера фірми *Flottweg* серії Z моделі C7E продуктивністю до 10 м<sup>3</sup>/год (країна-виробник – Німеччина) [59].

Центрифуга-декантер – це спеціальна ємність з обертовим шнеком для осадження частинок. Під дією сили тяжіння біомаса, густина якої більша за густину

рідини, осідає на дно ємності, утворюючи осадовий шар. Таким чином, у центрифугу відбувається розділення твердої і рідкої фаз під дією відцентрових сил. У барабані, що обертається, під впливом відцентрової сили тверді частинки, які важче рідини, переміщуються до периферії барабана. Вони утворюють шар осаду на його внутрішній поверхні. Оскільки відцентрова сила в центрифугу становить приблизно  $3000 \times G$ , поділ гетерогенних сумішей у центрифугу відбувається набагато швидше і ефективніше [59].

Принцип роботи центрифуги-декантеру полягає у наступному. Культуральна рідина підводиться у завантажувальну зону шнека через центральну трубу. Культуральна рідина набирає швидкості обертання у щадному режимі у напрямку обертання шнека і надходить через отвори в корпусі шнека у циліндричний барабан. Шнек декантера обертається з нижчою диференціальною швидкістю відносно швидкості барабана і просуває осаджену тверду фазу в напрямку конічної частини барабана. Диференціальна швидкість визначає час перебування осаду в барабані. Час перебування твердої фази в барабані є основним фактором, який визначає ступінь зневоднення продукту. У барабані культуральна рідина у полі дії відцентрових сил розподіляється по внутрішній стінці барабана, утворюючи концентричний шар. Біомаса осідає під впливом відцентрової сили на внутрішній поверхні барабана. Звільнена від біомаси культуральна рідина стікає до циліндричної частини барабана і виходить через отвори на його кришці. У цих отворах знаходяться затворні пристрої, за допомогою яких встановлюється рівень шару рідини («глибина ставка») в барабані. Отриманий осад під впливом відцентрової сили надходить у нерухому камеру і видаляється самопливом.



Рис. 5.1. Схема роботи, зовнішній вигляд та графічне позначення на апаратурній схемі центрифуги-декантера [59]

### 5.2.3. Вибір способу дезінтеграції клітин продуцента

Оскільки натаміцин є внутрішньоклітинним метаболітом, для виділення його з біомаси продуцента необхідна дезінтеграція клітин. Біомаса *Streptomyces natalensis*

складається зі скупчення ниток (ниткоподібного міцелію), яке може утворювати конгломерати. Дезінтеграція біомаси спричиняє фрагментацію міцелію продуцента і, як наслідок, лізис клітин, вивільнення і розчинення їхніх складових. Для дезінтеграції клітин використовують такі способи: теплова обробка, зміна рН середовища, обробка біомаси ферментними препаратами або ПАР [61]. Основним критерієм вибору способу дезінтеграції біомаси є відсутність негативного впливу на цільовий продукт – натаміцин. У більшості випадків, натаміцин є стабільною сполукою і не зазнає значних втрат активності. Розглянемо найбільш щадні технології дезінтеграції клітин продуцента.

**Зміна рН середовища.** Доведення рН клітинної суспензії до рівня від 8 до 10 і витримка суспензії за заданого лужного рН протягом 4-8 год є одним із найпростіших і енергоощадних способів реалізації лізису клітин. Недоліком даного способу є те, що довготривала витримка клітинної суспензії за високого значення рН сприяє частковій інактивації натаміцину у лужному середовищі, що може призвести до зниження виходу цільового продукту і зменшення його чистоти.

**Обробка ферментними препаратами і ПАР.** Обробка ферментними препаратами передбачає руйнування клітинної стінки продуцента і розчинення обмежених полімерів під дією таких ферментів як: лізоцим, ксиланаза, целюлаза, протеаза, глюконаза, ліпаза і амілаза. Дезінтеграцію клітин також здійснюють шляхом додавання у клітинну суспензію ПАР, зокрема сполук октилфеноксиполіетоксиетанола у невисокій концентрації 0,01 – 1%. Недоліком даного способу є тривалий час витримування – близько 24 год, необхідність підбору оптимального складу компонентів ферментного препарату і комплексу ПАР задля досягнення максимального рівня дезінтеграції клітин.

**Теплова обробка.** Витримка клітинної суспензії при температурі 30-50 °С протягом 1-8 год спричиняє лізис клітин продуцента і вихід метаболіту у середовище. Така температура не чинить впливу на активність натаміцину. Спосіб є простим у апаратурній реалізації, оскільки процес можна здійснити у будь-якому збірнику, обладнаному паровою сорочкою. Недоліком даного способу є те, що витримка клітинної суспензії при температурі вище 50 °С призводить до флокуляції і коагуляції біомаси, що перешкоджатиме ефективній сепарації цільового продукту з біомаси.

Тому, для уникнення флокуляції і коагуляції біомаси, теплову обробку слід здійснювати протягом 3 год за температури 45 °С. Оскільки дезінтеграцію клітин проводять за невисокої температури, це усуває необхідність охолодження клітинної суспензії до оптимальної температури.

Зважаючи на простоту реалізації даного способу, для дезінтеграції клітин обираємо спосіб теплової обробки клітинної суспензії. Оскільки, наступним етапом виділення натаміцину є екстракція органічним розчинником, то перед цим процесом витриману за встановленою температурою біомасу підлужнюють до рН – 9. Встановлення даного рівня рН водночас сприяє лізису клітин і зміщує ізоелектричну точку натаміцину для покращення його розчинення у органічних розчинниках [12].

Оскільки відсотковий вміст абсолютно сухої біомаси (АСБ) у культуральній рідині складає 0,42 мас. %, а вологовміст клітинної маси становив 0,85 (частка), об'єм вологого осаду, який дезінтегрують становить близько 119 л. Варто врахувати, що у наступному етапі виділення натаміцину у реакційну суміш подають ізопропанол у співвідношенні екстрагенту до біомаси 0,2:1. Таким чином, загальний об'єм реакційної суміші складатиме 129 л. Тому для дезінтеграції клітин передбачаємо встановлення реактора-змішувача фірми WENZHOU L&B FLUID EQUIPMENT CO., LTD (країна-виробник – Китай) об'ємом 0,16 м<sup>3</sup>, габаритні розміри (мм): d = 600; h = 1200; обладнаний сорочкою, мішалкою лопатевого типу, швидкість перемішування до 50 об/хв, матеріал – нержавіюча сталь AISI-304, ASTM.

Для процесів виділення натаміцину, зокрема для дезінтеграції клітин із наступною екстракцією антибіотика органічним розчинником, необхідно довести рівень рН середовища до сильнолужного. Для підлужнення використовують такі реагенти як: гідроксиди натрію і калію, а також карбонати натрію і калію.

Порівняємо вартість кожного підлужнювача за 1 кг і їхній ступінь розчинення у органічних розчинниках (табл 5.4.).

### Порівняння підлужнювачів

Підлужнювач	Вартість за 1 кг*	Розчинність у органічних розчинниках
Натрій гідроксид	23,4	Добре розчинний у метанолі, етанолі, ізопропанолі, не розчинний етоксигетані
Калій гідроксид	39,0	Розчинний в спиртах при температурі +28 °С
Натрій карбонат	9,9	Нерозчинний в етанолі, метанолі, ізопропанолі
Калій карбонат	34,5	Нерозчинний в етанолі, метанолі, ізопропанолі

\*Ціни станом на травень 2020 р., джерело <https://www.systopt.com.ua>

Найдешевшим варіантом є натрій карбонат. Оскільки у процесі екстрагування у реакційну суміш подають ізопропіловий спирт, то, зважаючи на нерозчинність натрію карбонату у спиртах, дана речовина може випадати в осад, що є небажаним явищем. Тому, кращим вибором є підлужнювачі, який добре розчиняються у спиртах: гідроксид натрію або калію. Калій гідроксид є майже вдвічі дорожчим за натрій гідроксид. Тому найбільш вигідним варіантом є використання натрію гідроксиду для підлужнення реакційного середовища для виділення натаміцину.

#### 5.2.4. Вибір способу екстракції натаміцину і відповідного обладнання

Для забезпечення стабільності натаміцину у розчині, а також уникнення можливості кислотної деструкції антибіотика, процес екстракції натаміцину проводять у лужному середовищі.

Екстракцію у лужному середовищі проводять при використанні таких водорозчинних органічних розчинників як: метанол, н-пропанол, ізопропанол, тетрагідрофуран [57]. Порівнюємо вартість 1 л кожного з екстрагентів (табл. 5.5).

Таблиця 5.5

### Порівняння вартості екстрагентів

Екстрагент	Вартість за 1 л*
Метанол	37,8
Н-пропанол	68,0
Ізопропанол	36,3
Тетрагідрофуран	258,0

\*Ціни станом на травень 2020 р., джерело <https://www.systopt.com.ua>

Очевидним недоліком використання тетрагідрофурану є його висока вартість, що робить застосування цього екстрагенту за наявності більш дешевих варіантів недоцільним. Недоліком використання метанолу для екстракції є утворення

небажаного побічного продукту – метилового естеру, який негативно впливає на вихід натаміцину.

Використання н-пропанолу і ізопропанолу для екстракції у лужному середовищі мають однакові властивості. Проте, порівнюючи вартість даних розчинників, ізопропанол є вдвічі дешевшим, що робить його застосування більш економічним, аніж використання н-пропанолу. Тому, для екстракції натаміцину у лужному середовищі найдоцільніше використовувати саме ізопропіловий спирт.

Технологія екстракції натаміцину ізопропанолом заключається у наступному. Після доведення реакційної суміші до необхідного значення рН, у реактор подають товарний ізопропіловий спирт із розрахунку 0,2 об'єму екстрагенту до 1 об'єму біомаси. Для уникнення окиснення натаміцину, у реакційну суміш додають антиоксидант – еріторбат натрію загальною кількістю 0,5 кг. Суміш перемішують протягом 2 год.

Екстракцію натаміцину здійснюють у тому же реакторі, де і проводили дезінтеграцію клітин.

Після екстракції органічний екстракт натаміцину необхідно звільнити від відпрацьованого дезінтеграту клітин. Реакційна суміш після процесу екстракції містить розчинений у ізопропанолі натаміцин і лізовані клітини – дрібнодисперсні твреді часточки, які утворюють каламутні зависі. Для того, щоб сепарувати відпрацьовану біомасу від розчину натаміцину, використовують техніку сепарування суспензій за гравітаційним градієнтом. Дана техніка базується на принципі, що часточки різної густини і/або розміру можуть бути відокремлені, коли ці часточки різної густини і/або розміру піддаються силі тяжіння або рівноцінним силам. Такий вид сепарування суспензій здійснюють у абсорбційних колонах висхідного потоку, гідроциклонах, або осаджувальних центрифугах [61].

Недоліком використання абсорбційних колон висхідного потоку є мала продуктивність, що пов'язано з тим, що ці установки не призначені для обробки великих об'ємів суспензій, оскільки вони зазвичай використовуються для лабораторних цілей.

Недоліком використання гідроциклонів є низька ефективність вилучення фракцій часток з різною дисперсністю. Також у гідроциклонах через інтенсивне

перемішування у нижній частині конусу апарату підвищується ймовірність винесення дрібних часток, що може призвести до значних втрат цільового продукту.

Таких недоліків позбавлені осаджувальні центрифуги безперервної дії. Основними перевагами даних констукцій є високоефективне вилучення дрібнодисперсних часток у відцентровому полі, можливість регулювання швидкості обертання ротора для підбору найоптимальнішого режиму сепарування суспензії, безперервний автоматичний режим роботи центрифуги спрощує процес видалення осаду і зводить до мінімуму необхідність керування процесом людиною [60, 62].

Тому, для відділення відпрацьованої біомаси з екстракту натаміцину передбачаємо встановлення пілотної автоматичної осаджувальної центрифуги безпервної дії фірми Lemites моделі MD 100-Sn продуктивністю до 200 л/год з максимальною швидкістю обертання ротора – до 10 000 об/хв.

#### **5.2.5. Вибір технології концентрування розчину натаміцину і відповідного обладнання**

Після відділення відпрацьованої біомаси отриманий органічний екстракт натаміцину необхідно сконцентрувати і очистити від супутніх домішок – баластних речовин.

Концентрування екстракту можна здійснити шляхом вакуум-випарювання або мембранного фільтрування. Технологія вакуум-випарювання дозволяє отримувати висококонцентровані стабільні екстракти термолабільних речовин, зокрема натаміцину. Суттєвим недоліком даного способу є необхідність подальшої очистки отриманого концентрату від баластних речовин у інших технологічних установках. Такого недоліку позбавлене мембранне фільтрування, яке дозволяє концентрувати і очищувати розчини в одному апараті.

Так, мембранні процеси очищення і концентрування розчинів за допомогою напівпроникних мембран знайшли широке застосування у мікробіологічній, біотехнологічній та фармацевтичній галузях. На відміну від звичайного фільтрування, основним недоліком якого є нашарування осаду на фільтрувальній перегородці зі зниженням продуктивності фільтрування, під час мембранної фільтрації у тангенціальному потоці частинки, які більші за розмір пор фільтрувального елемента, не затримуються на ньому, а вимиваються із системи

потоком у вигляді концентрату. Так, при тангенціональній ультрафільтрації напрям подачі середовища і фільтрації не співпадають, оскільки вони перпендикулярні один одному. У результаті цього частина середовища, яка фільтрується, проходить через мембрани як фільтрат, а основна частина потоку виходить із системи у робочу ємність і потім знову надходить у фільтрувальний контур. При такому режимі фільтрування відбувається самоочищення фільтраційного модуля, що покращує експлуатаційні характеристики ультрафільтраційної установки.

Ще основною перевагою мембранної фільтрації є висока ефективність процесу очищення рідини – утворений концентрат практично не містить домішок. Не менш важливою перевагою даного методу є його енергоефективність, тобто проведення мембранної фільтрації не вимагає великих затрат електроенергії, на відміну від центрифугування [62].

Варто звернути увагу на те, що органічний екстракт натаміцину містить молекули натаміцину, молекули розчинника – ізопропанолу, а також баластні речовини. Молекулярна маса натаміцину складає 665,725 г/моль, а ізопропанолу – 60,1 г/моль. Так, процес мембранної фільтрації повинен забезпечити процес розділення екстракту на 2 фази: високомолекулярну фазу – висококонцентрований екстракт натаміцину, низькомолекулярну фазу – частину ізопропанолу, баластні речовини, метаболіти тощо. Оскільки процес ультрафільтрації застосовується для розділення розчинів, у яких хоча б один із компонентів системи має молекулярну масу від 500 і вище, використання даного процесу є цілком виправданим і доцільним для очищення і концентрування натаміцину.

Для реалізації цього процесу і підвищення ефективності мембранної фільтрації культуральної рідини доцільно застосовувати фільтраційні модулі для перехресної (тангенціональної) фільтрації. Концентрування і розділення розчину у апараті відбувається наступним чином:

- порція рідини, яка містить частинки, розмір який менше діаметру пор фільтрувального елемента під дією тиску проходить через поверхню фільтрувального елемента, промивається водою і виводиться з апарату у безперервному режимі;

- частина рідини, яка містить високомолекулярні частки – розчинений натаміцин затримується селективним шаром і накопичується всередині циркуляційного контура і змивається циркуляційним потоком.

Графічно процес перехресної фільтрації показано на рис.5.2.

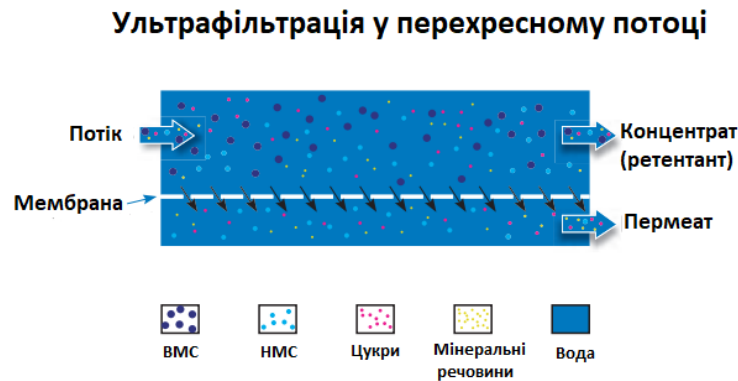


Рис. 5.2 Моделювання процесу перехресної фільтрації

Таким чином, після процесу ультрафільтрації отримують два розчини:

- концентрат – висококонцентрований очищений екстракт натаміцину
- пермеат – баластні речовини, частина ізопропанолу.

Отже, перевагами застосування методу перехресної ультрафільтрації для концентрування і очищення натаміцину є наступні фактори:

- висока енергоефективність процесу;
- можливість реалізації процесу концентрування і очищення натаміцину у одному апараті;
- високий ступінь очищення цільового продукту;
- осад часток не затримується на поверхні мембран і виноситься безперервним потоком рідини;
- установки перехресної фільтрації можуть використовувати мембрани з різним діаметром пор, що дозволяє реалізовувати різні процеси мембранної фільтрації в одному апараті;
- висока стійкість витратних матеріалів – строк служби керамічних мембран складає 3-5 років;
- зменшення експлуатаційних витрат на концентрування і очищення продукту дозволяє знизити його собівартість.

Для концентрації і очищення розчину натаміцину передбачаємо встановлення пілотної модульної установки Alfa Laval PilotUnit Multi продуктивністю до 200 л/год і площею фільтрування до 25 м<sup>2</sup> (країна-виробник – Швеція). Для ультрафільтрації екстракту натаміцину передбачаємо використання мембрани марки UM05 (виробник «Амікон», США) з поліелектролітного, яка здатна затримувати високомолекулярні речовини з молекулярною масою до 700 г/моль.

Принцип роботи установки перехресної фільтрації полягає у наступному. Під час процесу ультрафільтрації за допомогою спіральних мембран поступово зменшується об'єм рідини шляхом видалення води та інших низькомолекулярних речовин. Розчин для фільтрації вводиться в систему подачі і перекачується на ряд етапів мембранної фільтрації, з'єднаних послідовно (петлями). Кожна петля ультрафільтрації складається з декількох корпусів зі спіральними мембранами Alfa Laval. Через спіральні мембрани проходить вода і ізопропанол, утворюючи пермеат. Утворений концентрат складається із розчиненого натаміцину. Концентрація розчину натаміцину збільшується в міру проходження через послідовність петель [63].

Кожен фільтраційний контур має систему насосів рециркуляції, щоб забезпечити для мембран відповідний поперечний потік. Це необхідно для того щоб мінімізувати можливі забруднення мембрани. Установка обладнана також системою охолодження для відведення тепла, яке генерується насосами. Утворений пермеат надходить у систему резервуарів, звідки він випускається для подальшої переробки або знешкодження через систему зливу. Концентрат знаходиться у окремому резервуарі і передається на наступні етапи виділення продукту.

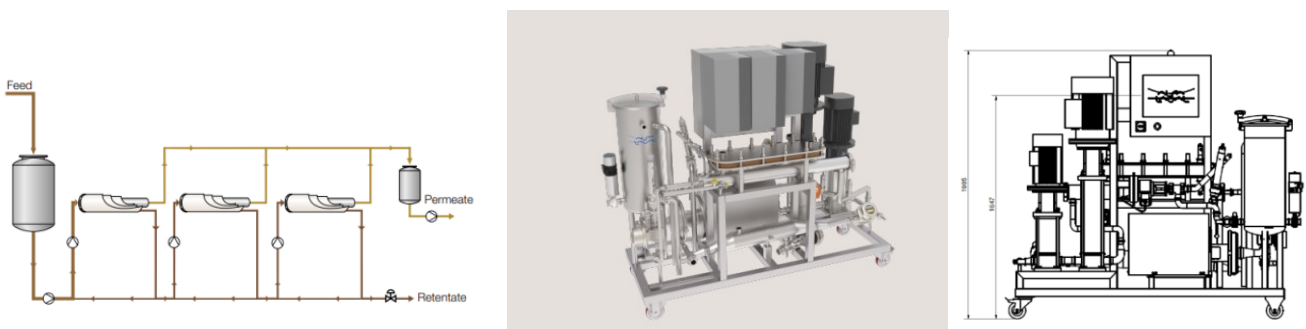


Рис. 5.3 Схема роботи, зовнішній вигляд та графічне позначення пілотної установки перехресної фільтрації [63]

Після концентрування і очищення розчину натаміцину у фільтраційному модулі перехресної фільтрації його перекачують у збірник для подальшого осадження. Для цього рН розчину доводять до значення 6,5 додаванням 5М розчину хлоридної кислоти. Натаміцин випадає у кристалічний осад протягом 1-2 год. Для проведення кристалізації натаміцину передбачаємо встановлення реактора-змішувача фірми WENZHOU L&B FLUID EQUIPMENT CO.,LTD (Китай) об'ємом 0,04 м<sup>3</sup>, габаритні розміри (мм): d = 400; h = 600; обладнаний мішалкою лопатевого типу, швидкість перемішування до 50 об/хв, матеріал – нержавіюча сталь AISI-304,ASTM.

#### **5.2.6. Вибір способу відділення кристалів натаміцину і відповідного обладнання**

Після того, як кристали натаміцину випали в осад, їх необхідно виділити із реакційного середовища. Найпростішим способом відділення кристалів натаміцину є процес продуктового фільтрування рідини, де цільовим продуктом є осад.

Для фільтрації суміші кристалів натаміцину можна використовувати наступні способи. Фільтрування у рамних-фільтр пресах дозволяє проводити процеси розділення суспензії у великій поверхні фільтрування, яка може досягати до 100 м<sup>2</sup>. Апарат дозволяє досягати високого ступеня зневоднення осаду і може використовуватись для кислих і лужних середовищ. Проте, варто врахувати, що рамні фільтр преси стаціонарного типу не відповідають вимогам GMP, оскільки фільтрувальна тканина апарату може стати джерелом мікробної контамінації продукту. Існують також рамні фільтр-преси з касетами для одноразового використання, проте придбання фільтрувальних касет для кожного циклу виробництва є економічно невідним. Тому серед недоліків рамних фільтр-пресів можна назвати наступні:

- велика площа фільтрування не є актуальною для обробки невеликого об'єму суспензії;
- негігієнічність процесу;
- швидке зношування фільтрувальних тканин;
- неповне промивання осаду;
- складність вивантаження осаду [60].

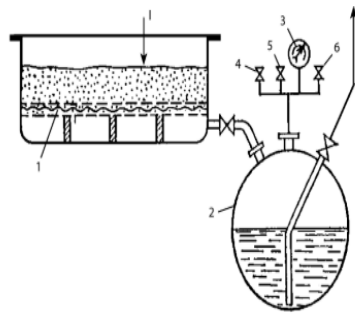
Необхідно зауважити, що для фільтрування буде подаватися невеликий об'єм суспензії, що виключає необхідність застосування фільтраційних апаратів з великою площею фільтрування. Тому альтернативним способом розділення суспензії є використання нутч-фільтрів закритого типу. Дані фільтри забезпечують високу якість фільтрування при відносній простоті конструкції. Найбільш важливою перевагою нутч-фільтрів є відсутність контакту зовнішнього середовища з продуктом, що дозволяє уникати мікробної контамінації продукту. Завдяки можливості заміни скла фільтра на затемнене, у апараті можна фільтрувати світлочутливі субстанції, зокрема натаміцин. Так, основними перевагами застосування нутч-фільтрів є наступні:

- висока якість фільтрування при відносній простоті конструкції;
- відсутність контакту зовнішнього середовища з продуктом, що забезпечує гігієнічність процесу;
- можливість заміни скла апарату на затемнене для фільтрування світлочутливих субстанцій, зокрема натаміцину;
- вібраційне вивантаження осаду.

Зважаючи на такі переваги нутч-фільтрів, відділення кристалів натаміцину з розчину більш доцільно даний вид фільтраційних установок [60].

Для видалення кристалів натаміцину з розчину передбачаємо встановлення нутч-фільтру фірми Buschiglas (країна-виробник Швейцарія) з робочим об'ємом 30 л, робочим тиском -1,0 бар, розміром пор фільтрувального елемента 10 мкм [64].

Принцип роботи фільтру полягає у наступному: при фільтруванні під вакуумом фільтрат проходить крізь пласку фільтруючу перегородку і поступає у збірник. Осад, який утворюється на фільтрувальній перегородці, вивантажується через патрубок.



*Рис. 5.4.* Схема роботи, зовнішній вигляд та графічне позначення на апаратурній схемі нутч-фільтру. Умовні позначення: 1 – фільтрувальна перегородка, 2 – збірник фільтрату, 3 – вакууметр, 4 – патрубок для стисненого повітря, 5 – патрубок для сполучення з атмосферою, 6 – патрубок для сполучення з вакуум-лінією, I – суспензія, II – фільтрат [60, 64].

### **5.2.7. Вибір способу сушіння натаміцину і відповідного обладнання**

У технології одержання антибіотиків процес сушіння, як правило, є заключною стадією виробництва і застосовується для отримання готової лікарської речовини належної якості. Окрім того, сушіння сприяє полегшенню транспортування рідких матеріалів, підвищенню міцності та стабільності при зберіганні. Так, для сушіння рідких суспензій і розчинів антибіотиків зазвичай використовують розпилювальні сушарки. Основними недоліками розпилювального сушіння є високий кінцевий вміст вологи у продукті, складність керування процесом і контролю якісних показників продукту, велика габаритність установок, підвищені енергетичні і матеріальні витрати при експлуатації [62].

Також, окремим стоїть питання вибору сушильних апаратів для сушіння термолабільних речовин, наприклад, натаміцину. Відомо, що у твердому стані натаміцин має кристалічну структуру. Порушення кристалічної форми антибіотика відбувається при температурі більше 200°C, причому температура нижче 120°C не впливає на його антимикотичну активність, якщо тривалість дії температури не більше однієї години. Цю властивість продукту необхідно враховувати при виборі режимів сушіння натаміцину. Отже, для таких речовин необхідно забезпечити мінімальний час контакту речовини з теплоносієм для збереження їхньої біологічної активності. Це можливо досягти при реалізації процесу сушіння в установках з псевдозрідженим шаром. Процес сушіння у псевдозрідженому шарі дозволяє значно збільшити

поверхню контакту між частками матеріалу і сушильним агентом, інтенсифікувати випаровування вологи з матеріалу і скоротити (до декількох хвилин) тривалість сушіння. Тому, основними перевагами сушарок з псевдозрідженим шаром є:

- інтенсивний процес сушіння;
- можливість сушіння при високих температурах, які можуть перевищувати допустимі для даного матеріалу, внаслідок короткої тривалості контакту матеріалу з сушильним агентом;
- можливість автоматичного регулювання параметрів процесу;
- можливість обладнання сушарок сіткою-гранулятором для одночасної грануляції матеріалу.

Завдяки високій продуктивності використання сушарок з псевдозрідженим шаром дозволяє сколотити час сушіння у порівнянні, наприклад, з часом сушіння у полицевих сушарках у 10-30 разів. Тому, зважаючи на низку переваг сушарок з псевдозрідженим шаром, їх доцільно використовувати для сушіння кристалів натаміцину.

Для уникнення ризиків контамінації порошку натаміцину аерозолем пилу сушіння антибіотика необхідно проводити повітрям очищеним на фільтрах попередньої очистки. Так, очищене повітря надходить до калорифера, де шляхом подачі насиченої пари воно нагрівається до температури 90 °С. Гаряче повітря подається під решітку сушарки для створення псевдозрідженого шару.

Для сушіння вологого продукту до залишкової вологи  $W = 2\%$  передбачаємо встановлення «пілотної» сушарки з псевдозрідженим шаром фірми “*STE Tecpharm*” (країна-виробник – Іспанія) об’ємом 30 л, яка відповідає вимогам GMP. Сушарка призначена для одночасного сушіння і грануляції вологого продукту в одному апараті, що позбавляє необхідності додаткового подрібнення кінцевого продукту [65].

Також сушарка дозволяє підбирати оптимальні умови для сушіння продукту за допомогою контролеру із сенсорною панеллю, що дозволяє повністю контролювати процес сушіння, попереджувати можливість перегріву та аттріації часток продукту.

Сушарка з киплячим шаром працює наступним чином. Вологий матеріал за допомогою шнекового живильника подається на верхню газорозподільну решітку.

Повітря, яке забирається з атмосфери, подається за допомогою вентилятору в калорифер, де воно нагрівається до необхідної температури, і надходить у підрешітчатий простір. Теплоносій подається через патрубок під решітку і чітко розподіляється по всій площі решітки, створюючи киплячий шар продукту. Нагріте повітря, виходячи з великою швидкістю з отворів газорозподільної решітки, псевдозріджує і висушує шар матеріалу. За рахунок гідродинамічних властивостей киплячого шару висушений продукт переміщується до краю решітки і пересипається на другу решітку, на якій відбувається процес охолодження висушеного матеріалу. Висушений продукт безперервно вивантажується через патрубок.



*Рис. 5.5.* Схема роботи, зовнішній вигляд сушарки з псевдозрідженим шаром [65]

Таким чином отримують сухий порошок натаміцину, який є готовим для подальшого фасування, пакування і відвантаження.

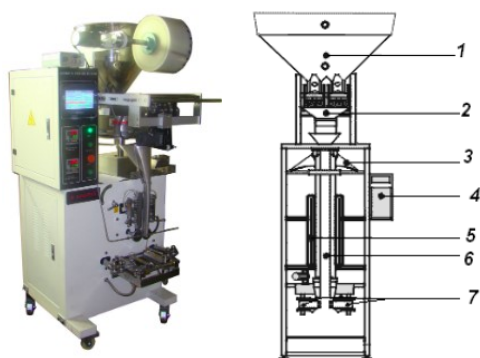
Отже, застосування вищезазначених способів виділення і очищення натаміцину з культуральної рідини дозволяє досягти виходу цільового продукту 60%. Чистота отриманого порошку натаміцину складає 98% у перерахунку на безводну основу.

### **5.3. Обґрунтування вибору упаковки для готового порошку натаміцину і відповідного обладнання**

У сухому стані і вигляді водної суспензії натаміцин є стабільною сполукою. Проте варто враховувати, що натаміцин є світлочутливою речовиною. Так, інактивація натаміцину відбувається під дією ультрафіолетового випромінювання з довжиною хвилі 300—350 нм [4]. Також для збереження антимікотичних властивостей натаміцину необхідно забезпечити захист субстанції від вологообміну з атмосферою і проникнення атмосферної мікрофлори. Дані фактори необхідно враховувати для виборі первинного пакування продукту. Для захисту порошку від вологи і сторонньої мікрофлори і дії світла препарат доцільно пакувати у саше, термозапаяні по шву, виготовлені із комбінованої плівки з фольги і поліетилену товщиною не менше 0,05 мм.

Таким чином, враховуючи вищенаведені властивості антибіотика, передбачаємо фасування порошку натаміцину у саше з комбінованої плівки по 100 г. Для фасування і упакування порошку у саше також передбачаємо встановлення фасувально-пакувального автомату, який у автоматичному режимі дозує, формує пакети типу саше, наповнює їх порошком, герметично запаює шви саше і відрізає їх з рулону. Реалізацію таких процесів можна здійснити у одному фасувально-пакувальному автоматі моделі НР-150.

Стандартна комплектація автомату включає об'ємний дозатор, систему відмотування плівки, вузол формування пакету із рулону матеріалу, вузол зварювання швів пакетів, вузол відрізки пакетів, електронний лічильник кількості виготовлених упаковок. Продуктивність апарату становить 50 упаковок/хв [66].



*Рис. 5.6.* Зовнішній вигляд та графічне зображення фасувально-пакувального автомата. Умовні позначення: 1 – бункер, 2 – дозатор, 3 – воротник, 4 – пульт управління, 5 – система протягування стрічки, 6 – термозварювальний елемент, 7 – ножі для відрізки пакетів [66]

Отже, описана технологія виділення і очищення натаміцину дозволяє досягти високого виходу цільового продукту із біомаси – близько 60%. Чистота виділеного і очищеного натаміцину у перерахунку на безводну основу становить 98%. Готовий порошок натаміцину фасують по 100 г у саше, виготовленого із комбінованої плівки з фольги і поліетилену, яка перешкоджає вологообміну з атмосферою і проникненню світла, які погіршують якість і знижують активність антибіотика.

#### 5.4. Обґрунтування допоміжних робіт для виділення і очищення натаміцину

Як було вже зазначено, перед процесом екстракції супернатант культуральної рідини попередньо підлужнюють для отримання оптимального значення рН 9. Як титрувальні агенти використовують 50% розчин гідроксиду натрію.

**Приготування 50% розчину гідроксиду натрію.** Для приготування 1 л 50% розчину гідроксиду натрію на технічних вагах у скляній або емальованій посудині зважують 0,5 кг гідроксиду натрію. У скляний бутель об'ємом 1 л подають 0,6 л питної води і при постійному перемішуванні поступово вносять 0,5 кг гідроксиду натрію. Після розчинення об'єм розчину доводять 0,4 л питної води.

Для екстракції використовують товарний ізопропіловий спирт з можливістю його подальшої регенерації і отримання 98,8% зневодненого ізопропанолу.

**Приготування 5М розчину хлоридної кислоти.** Для кристалізації натаміцину необхідно приготувати 5М розчин хлоридної кислоти. Припустимо, що необхідно приготувати 1 л 5М розчину хлоридної кислоти із 34% розчину. Відповідно до табличних даних молярність 34% хлоридної кислоти складає 10,90 моль/л (табл. 5.6).

Таблиця 5.6.

#### Фізичні властивості хлоридної кислоти

Концентрація			Густина кг/л	Молярність моль/л	рН	В'язкість мПа·с
кг HCl/кг	кг HCl/м <sup>3</sup>	Баума				
10%	104.80	6.6	1.048	2.87	-0.5	1.16
20%	219.60	13	1.098	6.02	-0.8	1.37
30%	344.70	19	1.149	9.45	-1.0	1.70
32%	370.88	20	1.159	10.17	-1.0	1.80
34%	397.46	21	1.169	10.90	-1.0	1.90
36%	424.44	22	1.179	11.64	-1.1	1.99
38%	451.82	23	1.189	12.39	-1.1	2.10

Для розрахунку користуються формулою:

$$C_1V_1=C_2V_2,$$

де  $C_1$  і  $V_1$  – молярність і об'єм розчину хлоридної кислоти, з якого будуть готувати розчин,  $C_2$  і  $V_2$  – молярність і об'єм розчину, який необхідно отримати.

Відповідно до формули –  $C_1 = 10,90$  моль/л,  $V_1 = x$ ,  $C_2 = 5$  моль/л,  $V_2 = 1$  л.

Знаходимо об'єм 34% хлоридної кислоти, який треба буде розвести водою для отримання 1 л 5М розчину кислоти, за пропорцією:

$$X = (C_2 \cdot V_2) / C_1 = (5 \cdot 1) / 10,9 = 0,460 \text{ л.}$$

Отже, для приготування 1 л 5М розчину хлоридної кислоти у конічну колбу на 1 л додають 400 мл дистильованої води. Потім повільно при постійному перемішуванні у колбу додають 460 мл 34% хлоридної кислоти. Розчин доводять дистильованою водою до мітки 1 л.

**Регенерація екстрагенту.** Після виділення і очищення натаміцину залишаються великі об'єми азеотропної суміші – суміші води з домішками та ізопропілового спирту. Для повторного використання ізопропанолу в процесах екстракції необхідна його дегідратація. Для цього азеотропну суміш зливають у збірник з твердим кислотним катализатором або з шаром іонообмінної смоли, суміш змішують з пропіоновим альдегідом. Суміш витримують близько 48 год. Протягом цього часу у реакторі відбувається розшарування реакційної маси на органічний і водний шари. Для отримання 98,8% зневодненого ізопропанолу, органічну фазу відбирають до ректифікаційної колони. У процесі нагрівання розчину відбувається регенерація пропіонового альдегіду, який відганяють і відбирають як дистилят. У кубовому залишку накопичується регенований безводний ізопропанол, який надалі можна використовувати в якості екстрагенту [67].

## **5.6. Обґрунтування способів знешкодження відходів**

### **5.6.1. Знешкодження рідких відходів**

До складу стічних вод виробництва натаміцину входять: відпрацьовані мийні розчини, фільтрат культуральної рідини, сліди натаміцину (табл. 5.7).

Біохімічне очищення стічних вод виробництва натаміцину здійснюють в аеротенках. Проте, зважаючи на можливу наявність у складі стічних вод ізопропілового спирту, для його кращого вилучення рекомендують додатково застосовувати поліфункціональні катализатори окиснення. Внесення в реакційну суміш, яка складається із стічних вод і активного мулу, гетерогенних металокомплексних катализаторів Гетерогенні металокомплексні катализатори, внесені в реакційну суміш стічних вод і активного мулу, окиснюють забруднювачі за рахунок здатності до оборотного зв'язування кисню за допомогою координуваних іонів перехідних металів. У свою чергу, мікроорганізми активного мулу іммобілізуються на катализаторі, проте не знижують його каталітичну здатність, а

навпаки підвищують її. Прикладом такого каталізатору є діоксид титану, який не розчиняється у воді і легко може бути видалений у відстійниках [67].

Табл. 5.7

### Характеристика рідких відходів у виробництві натаміцину

Назва складової рідких відходів	Речовини, які входять до складу відходів	Клас небезпеки
1% розчин «Дезекон»	Полігексаметиленбігуанід гідрохлорид, дидецилдиметиламоніум хлорид, амінопропілдодецилпропандіамін, сурфактант, регулятор рН, барвник, ароматизатор	IV
3% розчин «Велідез Ензим»	Алкілдиметилбензиламонію хлорид (амін), 2-пропанол, комплекс ензимів, інгібітор корозії, регулятор рН, стабілізатор	IV
1,5% розчин «Бландіас-А Форте»	Надоцтова кислота, перекис водню, оцтова кислота	IV
Фільтрат культуральної рідини	Залишки складових поживного середовища (глюкоза, дріжджовий екстракт, м'ясний екстракт, аспарагін, солі), сліди натаміцину	IV

Процес очищення рідких відходів здійснюється за наступною схемою. Спершу відбувається вилучення твердих і завислих часток на решітках і пісковловлювачах з подальшою механічною очисткою вод у первинних відстійниках. Після цього стічна вода надходить до аеротенку в який надходить каталітичний окиснювач і циркулюючий активний мул, а також стиснене повітря. Далі реакційна суміш надходить до вторинного відстійника, де вона звільняється від суспензії активного мулу. Після цього вода надходить до реактора змішування, куди надходить хлор для знезараження води. Знезаражена вода надходить у контактний резервуар, звідки може випускатися у водойми, або повторно використовуватись для технічних цілей. Узагальнений процес утилізації рідких відходів наведено на рис. 5.7.

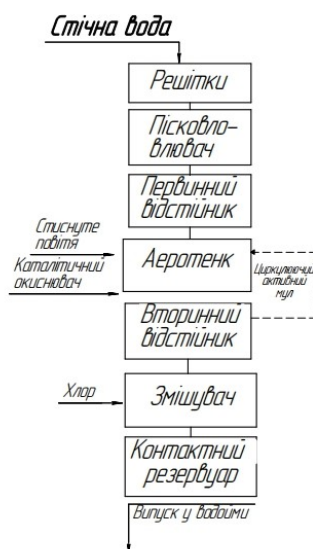


Рис. 5.7. Утилізація рідких відходів

### 5.6.2. Знешкодження твердих відходів

Тверді відходи етапу санітарної підготовки виробництва і підготовки поживних середовищ представлені пакувальною тарою для мийних засобів і компонентів поживного середовища. Тара для мийних засобів виготовлена із поліетилену високої щільності, який піддається вторинній переробці. Деякі компоненти поживного середовища поставляються в упаковці з полівініл хлориду, який вважають важко піддається вторинній переробці і тому його заборонено утилізувати разом з іншими видами пластику.

Після декантації органічного екстракту натаміцину із біомаси за один цикл необхідно утилізувати близько 16,4 кг міцеліальної маси. Оскільки продуцент *S. natalensis* належить до класу безпеки BSL-1, він не є потенційним збудником захворювань людини або тварини, і тому відходи від його культивування не потребують деконтамінації.

Табл. 5.8.

#### Характеристика твердих відходів у виробництві натаміцину

Назва складової рідких відходів	Речовини, які входять до складу відходів	Клас небезпеки
Пластикова тара для мийних засобів	HDPE-2 – поліетилен високої щільності	IV
Упаковка для компонентів поживного середовища	HDPE-2 – поліетилен високої щільності, PVC-3 – полівініл хлорид	IV
Міцеліальна маса	Біомаса культури <i>S. natalensis</i> NRRL2651, сліди натаміцину	IV BSL-1

Зважаючи на невеликі обсяги твердих відходів на даному виробництві, необхідності зменшення їхніх обсягів немає.

Для утилізації тари від мийних засобів і компонентів поживного середовища їх попередньо сортують і відправляють до пунктів прийому вторсировини.

Відпрацьований міцелій представляє собою відпрацьовану біомасу продуцента. Окрім біомаси міцелій може містити сліди натаміцину та залишки органічних кислот, які при надходженні у навколишнє середовище, зокрема ґрунт, можуть мати чинити негативний вплив. Тому, необхідно передбачити заходи звільнення міцеліальної маси від антибіотика і органічних кислот.

Утилізацію міцеліальних відходів можна здійснити шляхом вермикультивування гнійних черв'яків – *Eisenia foetida*. У суміш міцеліальних відходів з 5-25% органічних добавок (деревна стружка, солома, перегній) у весь об'єм запускають черви *Eisenia*

*foetida* (50-200 штук на 1 кг суміші). За 20-30 діб черви мігрують у верхній шар товщиною до 10 см, який можна видалити і використати для повторного засіву наступної партії міцеліальних відходів [69].

Відходи міцелію, які було утилізовано червами, не містять антибіотиків. Такі відходи можна використовувати як добрива у сільському господарстві або направлені на депонування без загрози навколишньому середовищу.

### 5.6.3. Знешкодження газоповітряних відходів

Газоподібні відходи утворюються на етапі отримання посівного матеріалу, виробничого біосинтезу, сушіння кристалів натаміцину. У складі газоподібних відходів наявний вуглекислий газ і аерозоль бактеріальних спор.

Оскільки продуцент натаміцину належить до класу безпеки BLS-1, то газоподібні відходи матимуть клас небезпеки – IV. Натаміцин як антибіотик має клас безпеки BLS-2, і тому його газоподібні відходи матимуть клас небезпеки – III.

Відпрацьоване очищене повітря після ферментації, яке містить вуглекислий газ, можна повторно використовувати в якості поживного газового субстрату при вирощуванні водоростей.

Табл. 5.9.

#### Характеристика газоподібних відходів у виробництві натаміцину

Назва складової рідких відходів	Речовини, які входять до складу відходів	Клас небезпеки
Відпрацьоване повітря після ферментації	Вуглекислий газ, аерозоль бактеріальних спор	<b>IV</b>
Відпрацьоване повітря після сушіння	Аерозоль механічних часток від сухого натаміцину	<b>III</b>

Утилізацію газоповітряних відходів можна здійснювати фізико-хімічним методом. Відпрацьоване повітря за допомогою циркуляційного насоса надходить до трьохсекційної абсорбційної камери. У якості рідкого сорбенту у камері використовують водний розчин перекису водню або хлораміну. Даний етап є першим ступенем очищення повітря від аерозолу спор. Для другого ступеня очищення відпрацьованого повітря для повної стерилізації після абсорберу встановлюють камеру УФ-опромінення [70]. Після 2-ступеневої обробки відпрацьоване повітря можна надалі використовувати у біотехнологічних цілях або випускати у навколишнє середовище.

## РОЗДІЛ 6. Матеріальний баланс і розрахунок обладнання

### 6.1. Розрахунок матеріального балансу

Відповідно до ТЕО річна потреба дорослого і дитячого населення України в субстанції натаміцину складає  $G_{нд} = 129$  кг. Було прийнято, що таку кількість субстанції антибіотика вироблятимуть за  $T_{рд} = 84$  дні (12 тижнів). Згідно з експериментальними даними, максимальний синтез натаміцину (3,0 г/л за 84 год) можливо забезпечити за умов культивування штаму-продуцента *S. natalensis* NRRL2651 на поживному середовищі для біосинтезу наступного складу (г/л): глюкоза – 20,0, м'ясний екстракт – 2,0, дріжджовий екстракт – 2,0, аспарагін – 0,5, монофосфат калію – 0,05, пропіонат натрію – 0,5, ацетат натрію – 1,75. Всього –  $C_{\Sigma\phi} = 26,8$  г/л. Посівний матеріал отримують за використання поживного середовища наступного складу(г/л): глюкоза – 4,0, солодовий екстракт – 10,0, дріжджовий екстракт – 4,0. Всього –  $C_{\Sigma\phi} = 18$  г/л [7].

Концентрація натаміцину у культуральній рідині складає 3,0 г/л, концентрація біомаси у культуральній рідині – 4,2 г/л [7].

Згідно з нормативно-технічною документацією на готовий продукт натаміцину вміст сухих речовин у препараті  $CP_{гп}$  повинен становити не менше 94%. Для розрахунків приймаємо наступні вихідні дані: тривалість циклу роботи ферментера  $T_{цф} = T_{ф} + T_{по} = 84 + 6,5 = 90,5$  год, де  $T_{ф}$  – тривалість ферментації,  $T_{по}$  – тривалість підготовчих операцій; коефіцієнт запасу для врахування можливості нестерильних операцій  $K_1 = 1,2$ ; коефіцієнт заповнення виробничого ферментера  $K_{вф} = 0,5$ ; коефіцієнт заповнення посівних апаратів  $K_{па} = 0,5$ ; коефіцієнт заповнення колб  $K_{кол} = 0,2$ ; коефіцієнт збірників  $K_{зб} = 0,8$ .

Необхідно врахувати, що сумарні втрати під час виділення і очищення субстанції натаміцину складає 40%, звідси частка  $E_{вс} = 0,4$ . Кількість посівного матеріалу для виробничого ферментера становить  $X_{ф} = 0,1$ ; кількість посівного матеріалу для посівних апаратів  $X_{па} = 0,1$ ; кількість посівного матеріалу для качалочних колб

					<b>НУХТ БТЕК 04.03.09 КР ПЗ</b>			
Змн.	Арк.	№ документа	Підпис	Дата				
Розробив		Цапко			РОЗДІЛ 6. Матеріальний баланс і розрахунок обладнання	Літера	Арк.	Аркушів
Консульт.							89	28
Керівник		Красінько				Кафедра БТМ		
Н. контр.								
Зав. каф.		Пирог						

$X_{\text{кол}} = 0,2$ ; втрати культуральної рідини під час біосинтезу  $E_{\text{ф}} = 0,1$ ; втрати посівного матеріалу у процесі його отримання в посівних апаратах  $E_{\text{па}} = 0,1$ ; втрати посівного матеріалу у процесі його отримання в колбах  $E_{\text{кол}} = 0,01$ .

**Розрахунок кількості партій продукту (виробничих циклів).** Кількість продукту на добу становить:

$$G_{\text{пд}} = G_{\text{нт}} / T_{\text{рд}} = 129 \text{ кг} / 84 \text{ дні} = 1,6 \text{ кг/добу.}$$

Кількість антибіотика за цикл складає:

$$G_{\text{цк}} = G_{\text{пд}} \cdot T_{\text{цф}} / 24 = 1,6 \cdot 90,5 / 24 = 6 \text{ кг/цикл.}$$

Об'єм культуральної рідини, яка зливається за один цикл з урахуванням втрат за виробничий цикл становить:

$$V_{\text{кр}} = K_1 \cdot G_{\text{цк}} \cdot C_{\text{РГП}} / P_{\text{кр}} (1 - E_{\text{св}}) = 1,2 \cdot 6 \cdot 0,93 / 3,0 \cdot (1 - 0,4) = 3,6 \text{ м}^3.$$

1.4. Кількість циклів на рік становить:

$$N_{\text{цк}} = G_{\text{нт}} / G_{\text{цк}} = 72 / 6 = 12 = 12 \text{ цикли.}$$

1.5. Вихід препарату у кг з  $1 \text{ м}^3$  культуральної рідини складає:

$$P_{\text{кр}} = G_{\text{цк}} / V_{\text{кр}} = 6 / 3,6 = 1,6 \text{ кг.}$$

**Приготування і стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу.** Кількість поживного середовища та посівного матеріалу в ферментері до культивування буде становити:

$$V_{\text{ф}} = V_{\text{кр}} / (1 - E_{\text{ф}}) = 3,6 / (1 - 0,1) = 4 \text{ м}^3.$$

Кількість поживного середовища у ферментері становитиме:

$$V_{\text{пс}} = V_{\text{ф}} / (1 + X_{\text{ф}}) = 4 / (1 + 0,1) = 3,64 \text{ м}^3.$$

Необхідна кількість посівного матеріалу для засіву ферментера:

$$V_{\text{пмф}} = V_{\text{ф}} - V_{\text{пс}} = 4 - 3,64 = 0,36 \text{ м}^3 (360 \text{ л}).$$

Відповідно до обраного коефіцієнта заповнення ферментера  $K_{\text{зф}} = 0,5$  приблизний геометричний об'єм ферментера становитиме:

$$V_{\text{пф}} = V_{\text{ф}} / K_{\text{зф}} = 4 / 0,5 = 8 \text{ м}^3.$$

**Визначення кількості стадій вирощування посівного матеріалу.** Прийmemo, що кількість посівного матеріалу становить 0,1% від кількості поживного середовища у апараті. Розрахуємо приблизну кількість поживного середовища для кожної стадії вирощування посівного матеріалу.

Об'єм посівного матеріалу для ферментера з посівного апарату:

$$V_{\text{пмф}} = 0,36 \text{ м}^3 \text{ (360 л)}.$$

Об'єм посівного матеріалу для посівного апарату з інокулятора:

$$V_{\text{пма}} = V_{\text{пмф}} \cdot X_{\text{пм}} = 360 \cdot 0,1 = 36 \text{ л}.$$

Об'єм посівного матеріалу для інокулятора з малого інокулятора:

$$V_{\text{пмі1}} = V_{\text{пма}} \cdot X_{\text{ін1}} = 36 \cdot 0,1 = 3,6 \text{ л}.$$

Об'єм посівного матеріалу для малого інокулятора з качалочних колб:

$$V_{\text{пмі2}} = V_{\text{пмі1}} \cdot X_{\text{ін2}} = 3,6 \cdot 0,1 = 0,36 \text{ л (360 мл)}.$$

Таким чином, отримання посівного матеріалу відбуватиметься у чотири стадії.

**Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері.** Згідно з прийнятим складом поживного середовища для біосинтезу натаміцину загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища ( $V_{\text{псф}}$ ) становитимуть:

$$G_{\text{ф}} = V_{\text{псф}} \cdot C_{\Sigma\text{ф}} = 3,64 \cdot 26,8 = 97,6 \text{ кг, у тому числі:}$$

$$\text{Глюкоза: } G_1 = G_{\text{ф}} \cdot C_1 / C_{\Sigma\text{ф}} = 97,5 \cdot 20 / 26,8 = 72,8 \text{ кг.}$$

$$\text{М'ясний екстракт: } G_2 = G_{\text{ф}} \cdot C_2 / C_{\Sigma\text{ф}} = 97,5 \cdot 2 / 26,8 = 7,3 \text{ кг.}$$

$$\text{Дріжджовий екстракт: } G_3 = G_{\text{ф}} \cdot C_3 / C_{\Sigma\text{ф}} = 97,5 \cdot 2 / 26,8 = 7,3 \text{ кг.}$$

$$\text{Аспарагін: } G_4 = G_{\text{ф}} \cdot C_4 / C_{\Sigma\text{ф}} = 97,5 \cdot 0,5 / 26,8 = 1,8 \text{ кг.}$$

$$\text{Монофосфат калію: } G_5 = G_{\text{ф}} \cdot C_5 / C_{\Sigma\text{ф}} = 97,5 \cdot 0,05 / 26,8 = 0,182 \text{ кг.}$$

$$\text{Ацетат натрію: } G_6 = G_{\text{ф}} \cdot C_6 / C_{\Sigma\text{ф}} = 97,5 \cdot 1,75 / 26,8 = 6,4 \text{ кг.}$$

$$\text{Пропіонат натрію: } G_7 = G_{\text{ф}} \cdot C_7 / C_{\Sigma\text{ф}} = 97,5 \cdot 0,5 / 26,8 = 1,8 \text{ кг.}$$

Залежно від способу і обладнання, яке буде використовуватись для стерилізації композицій поживного середовища, частка конденсату у загальній кількості води, яка йде на приготування поживного середовища, є різною. Враховуючи те, що композиція А буде стерилізуватися безпосередньо у ферментері, а композиція В – у реакторі-змішувачі, частки конденсату ( $K_{\text{кон}}$ ) становитимуть відповідно 0,1.

Так, загальна кількість конденсату, що буде утворюватися при стерилізації поживного середовища в ферментері становитиме:

$$V_{\text{к}} = V_{\text{пс}} \cdot K_{\text{кон}} = 3\,640 \cdot 0,1 = 364 \text{ л}.$$

Оскільки композиція Б (монофосфат калію) буде стерилізуватися у колбі в автоклаві, конденсат під час стерилізації утворюватися не буде, і тому частка конденсату буде становити 0.

Загальна кількість води для розбавлення компонентів поживного середовища буде складати:

$$V_{\text{вф}} = V_{\text{псф}} - G_{\text{ф}} - V_{\text{фк}} = 3640 - 97,6 - 364 = 3\ 178\ \text{л.}$$

Розрахуємо кількість води для розчинення покомпонентно, л:

$$\text{Глюкоза: } V_{1\text{в}} = V_{\text{вф}} \cdot C_1 / C_{\Sigma\text{ф}} = 3\ 178,4 \cdot 20 / 26,8 = 2\ 372$$

$$\text{М'ясний екстракт: } V_{2\text{в}} = V_{\text{вф}} \cdot C_2 / C_{\Sigma\text{ф}} = 3\ 178,4 \cdot 2 / 26,8 = 237$$

$$\text{Дріжджовий екстракт: } V_{3\text{в}} = V_{\text{вф}} \cdot C_3 / C_{\Sigma\text{ф}} = 3\ 178,4 \cdot 2 / 26,8 = 237$$

$$\text{Аспарагін: } V_{4\text{в}} = V_{\text{вф}} \cdot C_4 / C_{\Sigma\text{ф}} = 3\ 178,4 \cdot 0,5 / 26,8 = 59$$

$$\text{Монофосфат калію: } V_{5\text{в}} = V_{\text{вф}} \cdot C_5 / C_{\Sigma\text{ф}} = 3\ 178,4 \cdot 0,05 / 26,8 = 6$$

$$\text{Ацетат натрію: } V_{6\text{в}} = V_{\text{вф}} \cdot C_6 / C_{\Sigma\text{ф}} = 3\ 178,4 \cdot 1,75 / 26,8 = 208$$

$$\text{Пропіонат натрію: } V_{7\text{в}} = V_{\text{вф}} \cdot C_7 / C_{\Sigma\text{ф}} = 3\ 178,4 \cdot 0,5 / 26,8 = 59$$

Проте, варто звернути увагу на те, що загальна витрата монофосфату калію становитиме 182 г. Зважаючи на таку невелику кількість компонента, для його стерилізації у колбі в автоклаві раціонально приготувати більш концентрований розчин. Так, замість розрахованого об'єму води 6 л беремо об'єм – 1 л для композиції Б. Решту розрахованої води (5 л) додаємо в композицію А.

Таким чином, загальний об'єм води, який додають до композиції А становитиме:  $2372 + 237 + 237 + 59 + 5 = 2\ 910$  л.

Розрахуємо кількість конденсату покомпонентно, л:

$$\text{Глюкоза: } V_{1\text{к}} = V_{\text{к}} \cdot C_1 / C_{\Sigma\text{ф}} = 364 \cdot 20 / 26,8 = 272$$

$$\text{М'ясний екстракт: } V_{2\text{к}} = V_{\text{к}} \cdot C_2 / C_{\Sigma\text{ф}} = 364 \cdot 2 / 26,8 = 27$$

$$\text{Дріжджовий екстракт: } V_{3\text{к}} = V_{\text{к}} \cdot C_3 / C_{\Sigma\text{ф}} = 364 \cdot 2 / 26,8 = 27$$

$$\text{Аспарагін: } V_{4\text{к}} = V_{\text{к}} \cdot C_4 / C_{\Sigma\text{ф}} = 364 \cdot 0,5 / 26,8 = 7$$

$$\text{Ацетат натрію: } V_{6\text{к}} = V_{\text{к}} \cdot C_6 / C_{\Sigma\text{ф}} = 364 \cdot 1,75 / 26,8 = 23$$

$$\text{Пропіонат натрію: } V_{7\text{к}} = V_{\text{к}} \cdot C_7 / C_{\Sigma\text{ф}} = 364 \cdot 0,5 / 26,8 = 7$$

Наступні розрахунки не беруться до уваги і приведені для уточнення попередніх розрахунків загального об'єму конденсату.

$$\text{Монофосфат калію: } V_{5\text{к}} = V_{\text{к}} \cdot C_4 / C_{\Sigma\text{ф}} = 364 \cdot 0,05 / 26,8 = 0,7 = 1$$

Формування композицій наведено у табл. 6.1.

**Склад композицій для стерилізації компонентів поживного середовища  
для виробничого біосинтезу**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 3,64 м <sup>3</sup> середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	20,0	72,8	А	3338
Дріжджовий екстракт	2,0	7,3		
Аспарагін	0,5	1,8		
М'ясний екстракт	2,0	7,3		
Вода		2 910		
Конденсат		333		
Монофосфат калію	0,05	0,18	Б*	1
Вода		1		
Ацетат натрію	1,75	6,4	В	305
Пропіонат натрію	0,5	1,8		
Вода		267		
Конденсат		30		
<b>Разом:</b>		<b>3 644</b>		<b>3 644</b>

**Примітка:** \* - композиція готується у лабораторному посуді і стерилізується в автоклаві

Композицію А стерилізують безпосередньо у виробничому ферментері шляхом подачі гострої пари при температурі 112° С і тиску 0,05 МПа протягом 30 хвилин.

Композицію Б стерилізують у закритій колбі в автоклаві шляхом подачі глухої пари при температурі 131° С і тиску 0,15 МПа протягом 40 хвилин.

Композицію В стерилізують у реакторі-змішувачі шляхом подачі гострої пари при температурі 131° С і тиску 0,15 МПа протягом 40 хвилин.

**Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу у посівному апараті.** Об'єм поживного середовища та посівного матеріалу у посівному апараті з урахуванням втрат ( $E_{па}$ ) складе:

$$V_{па} = V_{пмф} / (1 - E_{па}) = 0,36 / (1 - 0,1) = 0,4 \text{ м}^3.$$

Об'єм готового поживного середовища для виробничого ферментера складе:

$$V_{псп} = V_{па} / (1 + X_{па}) = 0,4 / (1 + 0,1) = 0,36 \text{ м}^3.$$

Витрати посівного матеріалу для на засіб виробничого ферментера становитиме:

$$V_{пмп} = V_{па} - V_{псп} = 0,4 - 0,36 = 0,04 \text{ м}^3 (40 \text{ л}).$$

Згідно з прийнятим складом поживного середовища для отримання посівного матеріалу у посівному апараті загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища ( $V_{\text{псп}}$ ) становитимуть:

$$G_{\text{заг}} = V_{\text{псп}} \cdot C_{\Sigma\phi} = 0,36 \cdot 18 = 6,4 \text{ кг, у тому числі:}$$

$$\text{Глюкоза: } G_1 = G_{\text{заг}} \cdot C_1 / C_{\Sigma\phi} = 6,4 \cdot 4/18 = 1,4 \text{ кг.}$$

$$\text{Дріжджовий екстракт: } G_2 = G_{\text{заг}} \cdot C_2 / C_{\Sigma\phi} = 6,4 \cdot 4/18 = 1,4 \text{ кг.}$$

$$\text{Солодовий екстракт: } G_3 = G_{\text{заг}} \cdot C_3 / C_{\Sigma\phi} = 6,4 \cdot 10/18 = 3,6 \text{ кг.}$$

Розбавлення поживного середовища конденсатом пари при його стерилізації у реакторі-змішувачі складатиме:

$$V_{\text{к}} = V_{\text{псп}} \cdot K_{\text{кон}} = 0,36 \cdot 0,1 = 0,036 \text{ м}^3 \text{ (36 л).}$$

Загальна кількість води для розбавлення компонентів поживного середовища буде складати:

$$V_{\text{вп}} = V_{\text{псп}} - G_{\text{заг}} - V_{\text{фк}} = 360 - 6,4 - 36 = 318 \text{ л.}$$

Розрахуємо кількість води для розчинення покомпонентно, л:

$$\text{Глюкоза: } V_{1\text{в}} = V_{\text{вп}} \cdot C_1 / C_{\Sigma\phi} = 317,5 \cdot 4/18 = 71$$

$$\text{Дріжджовий екстракт: } V_{2\text{в}} = V_{\text{вп}} \cdot C_2 / C_{\Sigma\phi} = 317,5 \cdot 4/18 = 71$$

$$\text{Солодовий екстракт: } V_{3\text{в}} = V_{\text{вп}} \cdot C_3 / C_{\Sigma\phi} = 317,5 \cdot 10/18 = 176$$

Розрахуємо кількість конденсату покомпонентно, л:

$$\text{Глюкоза: } V_{1\text{к}} = V_{\text{к}} \cdot C_1 / C_{\Sigma\phi} = 36 \cdot 4/18 = 8$$

$$\text{Дріжджовий екстракт: } V_{2\text{к}} = V_{\text{к}} \cdot C_2 / C_{\Sigma\phi} = 36 \cdot 4/18 = 8$$

$$\text{Солодовий екстракт: } V_{3\text{к}} = V_{\text{к}} \cdot C_3 / C_{\Sigma\phi} = 36 \cdot 10/18 = 20$$

Поживне середовище готують у реакторі-змішувачі і стерилізують в одній композиції у інокуляторі шляхом подачі гострої пари при температурі 112° С і тиску 0,15 МПа протягом 30 хвилин.

Формування композицій наведено в табл. 6.2.

**Склад композицій для стерилізації компонентів поживного середовища  
для отримання посівного матеріалу у посівному апараті**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 0,36 м <sup>3</sup> середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	4,0	1,4	А	360
Дріжджовий екстракт	4,0	1,4		
Солодовий екстракт	10,0	3,6		
Вода		318		
Конденсат		36		
<b>Разом:</b>		<b>360</b>		<b>360</b>

**Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу у інокуляторі.** Об'єм поживного середовища та посівного матеріалу у інокуляторі з урахуванням втрат ( $E_{ін}$ ) складе:

$$V_{ін1} = V_{пмп} / (1 - E_{ін}) = 0,04 / (1 - 0,1) = 0,04 \text{ м}^3 (40 \text{ л}).$$

Об'єм готового поживного середовища для виробничого ферментера складе:

$$V_{псі1} = V_{ін1} / (1 + X_{ін}) = 0,4 / (1 + 0,1) = 0,036 \text{ м}^3 (36 \text{ л}).$$

Витрати посівного матеріалу для на засіб виробничого ферментера становитиме:

$$V_{пмі1} = V_{ін1} - V_{псі1} = 0,04 - 0,036 = 0,004 \text{ м}^3 (4 \text{ л}).$$

Згідно з прийнятим складом поживного середовища для отримання посівного матеріалу загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища ( $V_{псі1}$ ) становитимуть:

$$G_{зар} = V_{псі1} \cdot C_{\Sigma\phi} = 0,036 \cdot 18 = 0,64 \text{ кг, у тому числі:}$$

$$\text{Глюкоза: } G_1 = G_{зар} \cdot C_1 / C_{\Sigma\phi} = 0,65 \cdot 4/18 = 0,14 \text{ кг.}$$

$$\text{Дріжджовий екстракт: } G_2 = G_{зар} \cdot C_2 / C_{\Sigma\phi} = 0,65 \cdot 4/18 = 0,14 \text{ кг.}$$

$$\text{Солодовий екстракт: } G_3 = G_{зар} \cdot C_3 / C_{\Sigma\phi} = 0,65 \cdot 10/18 = 0,36 \text{ кг.}$$

Розбавлення поживного середовища конденсатом пари при його стерилізації у реакторі-змішувачі складатиме:

$$V_k = V_{псі1} \cdot K_{кон} = 0,036 \cdot 0,1 = 0,0036 \text{ м}^3 (3,6 \text{ л}).$$

Загальна кількість води для розбавлення компонентів поживного середовища буде складати:  $V_{\text{вi1}} = V_{\text{псi1}} - G_{\text{заг}} - V_{\text{фк}} = 36 - 6,4 - 3,6 = 26$  л.

Розрахуємо кількість води для розчинення покомпонентно, л:

$$\text{Глюкоза: } V_{1\text{в}} = V_{\text{вi1}} \cdot C_1 / C_{\Sigma\text{ф}} = 26 \cdot 4/18 = 5,8$$

$$\text{Дріжджовий екстракт: } V_{2\text{в}} = V_{\text{вi1}} \cdot C_2 / C_{\Sigma\text{ф}} = 26 \cdot 4/18 = 5,8$$

$$\text{Солодовий екстракт: } V_{3\text{в}} = V_{\text{вi1}} \cdot C_3 / C_{\Sigma\text{ф}} = 26 \cdot 10/18 = 14,4$$

Розрахуємо кількість конденсату покомпонентно, л:

$$\text{Глюкоза: } V_{1\text{к}} = V_{\text{к}} \cdot C_1 / C_{\Sigma\text{ф}} = 3,6 \cdot 4/18 = 0,8$$

$$\text{Дріжджовий екстракт: } V_{2\text{к}} = V_{\text{к}} \cdot C_2 / C_{\Sigma\text{ф}} = 3,6 \cdot 4/18 = 0,8$$

$$\text{Солодовий екстракт: } V_{3\text{к}} = V_{\text{к}} \cdot C_3 / C_{\Sigma\text{ф}} = 3,6 \cdot 10/18 = 2$$

Таблиця 6.3

**Склад композицій для стерилізації компонентів поживного середовища для отримання посівного матеріалу в інокуляторі**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 30 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	4,0	0,14	А	30
Дріжджовий екстракт	4,0	0,14		
Солодовий екстракт	10,0	0,36		
Вода		26		
Конденсат		3,6		
<b>Разом:</b>		<b>30</b>		<b>30</b>

Поживне середовище готують у реакторі-змішувачі і стерилізують в одній композиції у інокуляторі шляхом подачі гострої пари при температурі 112° С і тиску 0,05 МПа протягом 30 хвилин. Формування композицій наведено в табл. 6.3.

**Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу у малому інокуляторі.** Об'єм поживного середовища та посівного матеріалу у посівному апараті з урахуванням втрат ( $E_{\text{пi2}}$ ) складе:

$$V_{\text{пмi2}} = V_{\text{пмi1}} / (1 - E_{\text{iн}}) = 4 / (1 - 0,1) = 4,5 \text{ л.}$$

Об'єм готового поживного середовища для виробничого ферментера складе:

$$V_{\text{псi2}} = V_{\text{iн2}} / (1 + X_{\text{iн}}) = 4,5 / (1 + 0,1) = 4,1 \text{ л.}$$

Витрати посівного матеріалу для на засів виробничого ферментера становитиме:

$$V_{\text{пмі2}} = V_{\text{ін2}} - V_{\text{псі2}} = 4,5 - 4,1 = 0,4 \text{ л.}$$

Зважаючи на невеликий об'єм середовища, його стерилізують у автоклаві і тому при розрахунках конденсат не враховують.

Згідно з прийнятим складом поживного середовища для отримання посівного матеріалу загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища ( $V_{\text{псі2}}$ ) становитимуть:

$$G_{\text{заг}} = V_{\text{псі2}} \cdot C_{\Sigma\phi} = 4,1 \cdot 18 = 73,8 \text{ г, у тому числі:}$$

$$\text{Глюкоза: } G_1 = G_{\text{заг}} \cdot C_1 / C_{\Sigma\phi} = 73,8 \cdot 4/18 = 17 \text{ г.}$$

$$\text{Дріжджовий екстракт: } G_2 = G_{\text{заг}} \cdot C_2 / C_{\Sigma\phi} = 73,8 \cdot 4/18 = 17 \text{ г.}$$

$$\text{Солодовий екстракт: } G_3 = G_{\text{заг}} \cdot C_3 / C_{\Sigma\phi} = 73,8 \cdot 10/18 = 41 \text{ г.}$$

Загальна кількість води для розбавлення компонентів поживного середовища буде складати:  $V_{\text{ві2}} = V_{\text{псі2}} - G_{\text{заг}} - V_{\text{к}} = 4,1 - 0,074 = 4,1 - 0,1 = 4 \text{ л.}$

Розрахуємо кількість води для розчинення покомпонентно, л:

$$\text{Глюкоза: } V_{2\text{в}} = V_{\text{ві2}} \cdot C_1 / C_{\Sigma\phi} = 3,6 \cdot 4/18 = 0,9 \text{ л.}$$

$$\text{Дріжджовий екстракт: } V_{2\text{в}} = V_{\text{ві2}} \cdot C_2 / C_{\Sigma\phi} = 3,6 \cdot 4/18 = 0,9 \text{ л.}$$

$$\text{Солодовий екстракт: } V_{3\text{в}} = V_{\text{ві2}} \cdot C_3 / C_{\Sigma\phi} = 3,6 \cdot 10/18 = 2,2 \text{ л.}$$

Формування композицій наведено в табл. 6.4.

Таблиця 6.4

**Склад композицій для стерилізації компонентів поживного середовища  
для отримання посівного матеріалу у малому інокуляторі**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 4 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	4,0	0,017	А	4
Дріжджовий екстракт	4,0	0,017		
Солодовий екстракт	10,0	0,041		
Вода		4,0		
<b>Разом:</b>		<b>4</b>		<b>4</b>

Поживне середовище готують у реакторі-змішувачі і стерилізують в одній композиції у інокуляторі шляхом подачі гострої пари при температурі 112° С і тиску 0,15 МПа протягом 30 хвилин.

**Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу у колбах на качалці.** Об'єм поживного середовища та посівного матеріалу у колбах на качалці з урахуванням втрат ( $E_{\text{кол}}$ ) складе:

$$V_{\text{кол}} = V_{\text{пмі2}} / (1 - E_{\text{кол}}) = 400 \text{ мл} / (1 - 0,01) = 404 \text{ мл.}$$

Об'єм поживного середовища колб складе:

$$V_{\text{пск}} = V_{\text{кол}} / (1 + X_{\text{к}}) = 404 / (1 + 0,1) = 367 \text{ мл.}$$

Витрати посівного матеріалу для на засів колб становитиме:

$$V_{\text{пмк}} = V_{\text{кол}} - V_{\text{псік}} = 404 - 367 = 37 \text{ мл.}$$

Посівний матеріал такої кількості отримують у вигляді спор, які утворюються після відновлення і активної споруляції ліофілізованої музейної культури на відповідному поживному середовищі.

Згідно з прийнятим складом поживного середовища для отримання посівного матеріалу загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища ( $V_{\text{пск}}$ ) становитимуть:

$$G_{\text{заг}} = V_{\text{пск}} \cdot C_{\Sigma\text{ф}} = 0,367 \cdot 18 = 6,7 \text{ г, у тому числі:}$$

$$\text{Глюкоза: } G_1 = G_{\text{заг}} \cdot C_1 / C_{\Sigma\text{ф}} = 6,7 \cdot 4 / 18 = 1,5 \text{ г.}$$

$$\text{Дріжджовий екстракт: } G_2 = G_{\text{заг}} \cdot C_2 / C_{\Sigma\text{ф}} = 6,7 \cdot 4 / 18 = 1,5 \text{ г.}$$

$$\text{Солодовий екстракт: } G_3 = G_{\text{заг}} \cdot C_3 / C_{\Sigma\text{ф}} = 6,7 \cdot 10 / 18 = 3,7 \text{ г.}$$

Оскільки стерилізація поживного середовища буде відбуватися в автоклаві в закритих ємностях, конденсат не враховують.

Загальна кількість води для розбавлення компонентів поживного середовища буде складати:

$$V_{\text{вк}} = V_{\text{пск}} - G_{\text{заг}} = 367 - 6,7 = 360 \text{ мл.}$$

Розрахуємо кількість води для розчинення покомпонентно, мл:

$$\text{Глюкоза: } V_{1\text{в}} = V_{\text{вк}} \cdot C_1 / C_{\Sigma\text{ф}} = 360 \cdot 4 / 18 = 80$$

$$\text{Дріжджовий екстракт: } V_{2\text{в}} = V_{\text{вк}} \cdot C_2 / C_{\Sigma\text{ф}} = 360 \cdot 4 / 18 = 80$$

$$\text{Солодовий екстракт: } V_{3\text{в}} = V_{\text{вк}} \cdot C_3 / C_{\Sigma\text{ф}} = 360 \cdot 10 / 18 = 200$$

Формування композицій наведено в табл. 6.5.

**Склад композицій для стерилізації компонентів поживного середовища  
для отримання посівного матеріалу в автоклаві**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 367 мл середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, V, мл
Глюкоза	4,0	1,5	А	367
Дріжджовий екстракт	4,0	1,5		
Солодовий екстракт	10,0	3,7		
Вода		360		
<b>Разом:</b>		<b>367</b>		<b>367</b>

Поживне середовище стерилізують в одній композиції у закритій колбі в автоклаві шляхом подачі глухої пари при температурі 112° С і тиску 0,15 МПа протягом 30 хвилин.

**Розрахунок кількості абсолютно сухих речовин у культуральній рідині після біосинтезу.** При розрахунках кількості абсолютно сухих речовин у культуральній рідині необхідно врахувати те, що під час біосинтезу складові поживного середовища зазнають перетворення на цільовий продукт – натаміцин, біомасу продуцента *Streptomyces natalensis* NRRL2651, баластні речовини, а також підлягають окисненню до вуглекислоти і води. Тому, ці перетворення необхідно врахувати як втрати при біосинтезі ( $E_{bc}$ ). Приймаємо значення  $E_{bc} = 51\%$ .

Кількість абсолютно сухих речовин в поживному середовищі для виробничого біосинтезу становить  $G_{загф} = 97,6$  кг.

Кількість абсолютно сухих речовин у посівному матеріалі складає  $G_{заг} = 6,4$  кг. Враховуючи втрати при вирощуванні в посівному апараті ( $E_{in} = 0,1$ ), кількість АБС у посівному матеріалі становить:

$$G_{загп} = G_{заг}(1 - E_{п}) = 6,4 (1 - 0,1) = 5,8 \text{ кг.}$$

Так, загальна кількість абсолютно сухих речовин  $G_{срф}$  у середовищі для виробничого біосинтезу становить:

$$G_{срф} = G_{загф} + G_{загп} = 103,4 \text{ кг.}$$

Із врахування втрат у процесі виробничого біосинтезу  $E_{bc}$  кількість абсолютно сухих речовин у культуральній рідині після ферментації становить:

$$G_{сркр} = G_{срф} - (G_{срф} \cdot E_{bc}) = 103,4 - (103,4 \cdot 0,51) = 50,7 \text{ кг.}$$

**Розрахунок стадії відділення біомаси центрифугуванням.** Об'єм культуральної рідини, яка йде на подальшу переробку становить:

$$V_{сус} = V_{кр} = 3,6 \text{ м}^3.$$

Відсотковий вміст абсолютно сухої біомаси (АСБ) у культуральній рідині складає:

$$CP_{асб} = G_{згб}/10 = 4,2/10 = 0,42 \text{ мас. \%}.$$

Прийmemo, що густина біомаси становить  $\rho_{асб} = 1200 \text{ кг/м}^3$ . Маса АСБ у культуральній рідині складає:

$$G_{асб} = V_{сус} \cdot \rho_{асб} \cdot CP_{асб} / 100 = 3,6 \cdot 1200 \cdot 0,42 / 100 = 43,2 \text{ кг.}$$

Вологовміст клітинної маси становить від 65 до 85 %, приймаємо  $W_{кл} = 0,85$  (частка). Відсоток вологої біомаси в культуральній рідині становить:

$$CP_{вб} = CP_{асб} / (1 - W_{кл}) = 0,42 / (1 - 0,85) = 2,8 \text{ мас. \%}.$$

Прийmemo, що густина осаду становить  $\rho_{ос} = 1050 \text{ кг/м}^3$ . Маса вологого осаду в об'ємі культуральної рідини складає:

$$G_{ос} = V_{сус} \cdot CP_{вб} \cdot \rho_{ос} / 100 = 3,6 \cdot 2,8 \cdot 1050 / 100 = 105,84 \text{ кг.}$$

Відомо, що осад культуральної рідини містить 10..15 % міжклітинної вологи. Приймаємо  $W_{мв} = 0,15$  (частка). Загальна кількість вологого осаду, який відділяють із культуральної рідини становить:

$$G_{осв} = G_{ос} / (1 - W_{мв}) = 105,84 / (1 - 0,15) = 124,5 \text{ кг.}$$

Маса вологого осаду, який отримують під час центрифугування 1 м<sup>3</sup> культуральної рідини складає:

$$m_o = G_{осв} / V_{сус} = 124,5 / 3,6 = 34,6 \text{ кг/м}^3$$

Об'єм вологого осаду в суспензії становить:

$$V_{осв} = G_{осв} \cdot 1000 / \rho_{ос} = 124,5 \cdot 1000 / 1050 = 118,6 = 119 \text{ л.}$$

Втрати вологого осаду при центрифугуванні становлять:

$$V_{втц} = V_{осв} \cdot E_{цф} = 119 \cdot 0,08 = 9,5 \text{ л,}$$

де  $E_{цф} = 0,08$  – коефіцієнт втрат при центрифугуванні і дезінтеграції клітин (частка).

Об'єм вологого осаду з урахуванням втрат становить:

$$V_{oc} = V_{ocv} \cdot (1 - E_{цф}) = 119 \cdot (1 - 0,08) = 109,5 \text{ л.}$$

Об'єм отриманого фугату становить (відповідно до кількості культуральної рідини у поз. 17.1):

$$V_{фгм} = V_{сус} - V_{oc} - V_{щ} = 3593 - 109,5 - 9,5 = 3474 \text{ л.}$$

**Розрахунок стадії дезінтеграції клітин тепловою обробкою.** Після центрифугування відділену біомасу піддають тепловій обробці для дезінтеграції клітин з подальшим її підлуженням. Об'єм дезінтеграту з урахуванням втрат суспензії при дезінтеграції ( $E_{дез} = 0,02$ ) становить:

$$V_{дез} = V_{ocv} \cdot (1 - E_{дез}) = 109,5 \cdot (1 - 0,02) = 107 \text{ л.}$$

**Розрахунок стадії екстракції ізопропанолом.** У дезінтеграції подають товарний ізопропіловий спирт із розрахунку 0,2 об'єму екстрагенту до 1 об'єму дезінтеграту. Об'єм екстрагенту становить:

$$V_{із} = V_{дез} \cdot 0,2 = 107 \cdot 0,2 = 21,4 \approx 22 \text{ л.}$$

Загальний об'єм суміші складає:

$$V_{pc} = V_{дез} + V_{із} = 107 + 22 = 129 \text{ л.}$$

Об'єм реакційної суміші з урахуванням втрат при екстракції ( $E_{екс} = 0,03$ ):

$$V_{екс} = V_{pc} \cdot (1 - E_{екс}) = 129 \cdot (1 - 0,03) = 125 \text{ л.}$$

**Розрахунок стадії центрифугування екстракту.** Після екстракції ізопропанолом екстракт натаміцину центрифугують для відділення відпрацьованої біомаси.

Враховуючи масу і густину абсолютно сухої біомаси, знаходимо її об'єм:

$$V_{бм} = (G_{АСБ} / \rho_{АСБ}) \cdot 1000 = (43,2 / 1200) \cdot 1000 = 36 \text{ л.}$$

Відомо, що осад містить 10..15 % міжклітинної вологи. Приймаємо  $W_{мв} = 0,10$  (частка). Загальна кількість вологого осаду, який відділяють із культуральної рідини становить:

$$G_{осв} = V_{бм} / (1 - W_{мв}) = 36 / (1 - 0,1) = 40 \text{ л.}$$

Об'єм освітленого екстракту з урахуванням втрат при центрифугуванні  $E_{ц} = 0,07$  (частка) становить :

$$V_{фуг} = (V_{екс} - G_{осв}) \cdot (1 - E_{ц}) = (125 - 40) \cdot (1 - 0,07) = 79 \text{ л.}$$

Маса абсолютно сухих речовин у екстракті становить:

$$G_{\text{ек}} = G_{\text{сркр}} - G_{\text{АСБ}} = 50,7 - 43,2 = 7,5 \text{ кг.}$$

Вміст сухих речовин у екстракті становить:

$$CP_{\text{ек}} = G_{\text{фт}} \cdot 100/V_{\text{екстр}} = 7,5 \cdot 100/79 = 9,5 \text{ мас. \%}$$

**Розрахунок стадії концентрування і очищення натаміцину методом ультрафільтрації в установці перехресної фільтрації.** Отриманий органічний екстракт натаміцину концентрують і очищують методом ультрафільтрації у фільтраційних модулях перехресної фільтрації.

Приймаємо ступінь концентрування  $K_{\text{уф}} = 3$ .

Об'єм екстракту натаміцину з врахуванням коефіцієнта втрат при ультрафільтрації  $E_{\text{уф}} = 0,1$  (частка) складатиме:

$$V_{\text{кон}} = V_{\text{екстр}} \cdot (1 - E_{\text{уф}}) / K_{\text{уф}} = 79 \cdot (1 - 0,1) / 3 = 24 \text{ л.}$$

Втрати об'єму концентрату при ультрафільтрації становить:

$$V_{\text{втуф}} = V_{\text{екстр}} \cdot E_{\text{уф}} = 79 \cdot 0,1 = 7,9 = 8 \text{ л.}$$

Маса абсолютно сухих речовин в концентраті:

$$G_{\text{уф}} = G_{\text{ек}} \cdot (1 - E_{\text{уф}}) = 7,5 \cdot (1 - 0,1) = 6,75 \text{ кг}$$

Вміст сухих речовин в концентраті становить:

$$CP_{\text{уф}} = G_{\text{ек}} \cdot 100/V_{\text{кон}} = 6,75 \cdot 100/24 = 28,1 \text{ мас. \%}$$

Маса баластних речовин в пермеаті складає:

$$G_{\text{бр}} = G_{\text{ек}} - G_{\text{уф}} = 7,5 - 6,75 = 0,75 \text{ кг.}$$

Об'єм пермеату після концентрування становить:

$$V_{\text{пер}} = V_{\text{екстр}} - V_{\text{кон}} - V_{\text{втуф}} = 79 - 24 - 8 = 47 \text{ л.}$$

**Розрахунок стадії осадження кристалів натаміцину.** Після екстракції і концентрування розчин натаміцину підкислюють для випадіння кристалів в осад. Об'єм концентрату, який надходить на кристалізацію і подальше фільтрування становить  $V_{\text{кон}} = 24 \text{ л.}$

Об'єм перенасиченого розчину з урахуванням втрат ( $E_{\text{ос}} = 0,01$ ) становить:

$$V_{\text{пр}} = V_{\text{кон}} \cdot (1 - E_{\text{ос}}) = 24 \cdot (1 - 0,01) = 23,7 \text{ л.}$$

**Розрахунок стадії відділення кристалів натаміцину фільтрацією у нутч-фільтрі.** Об'єм перенасиченого розчину, який надходить на фільтрування становить  $V_{\text{пр}} = 23,7 \text{ л.}$

Маса абсолютно сухого кристалічного осаду натаміцину з урахуванням втрат ( $E_{\phi} = 0,04$ ) становить:

$$G_{oc} = G_{y\phi} / (1 - E_{\phi}) = 6,75 / (1 - 0,04) = 6,4 \text{ кг.}$$

Вологий кристалічний осад натаміцину у суспензії містить близько 20% вологи. Загальна кількість вологого осаду, який видаляють із суспензії становить:

$$G_{ocv} = G_{y\phi} / (1 - W_{mb}) = 6,4 / (1 - 0,2) = 8,0 \text{ кг.}$$

Розрахуємо об'єм осаду після фільтрації при густині натаміцину становить  $\rho_{oc} = 1350 \text{ кг/м}^3$ :

$$V_{oc} = G_{ocv} \cdot 1000 / \rho_{oc} = 8,0 \cdot 1000 / 1350 = 5,9 \text{ л.}$$

Втрати перенасиченого розчину при фільтрації становлять:

$$V_{v\phi} = V_{pr} \cdot (1 - E_{\phi}) = 23,7 \cdot (1 - 0,04) = 0,9 \text{ л.}$$

**Розрахунок стадії сушіння кристалів натаміцину.** Далі на стадію сушіння у псевдозрідженому шарі надходить відфільтрований осад натаміцину. Маса висушеного натаміцину з врахуванням коефіцієнта втрат при сушінні  $E_{cш} = 0,04$  (частка) сухої речовини з повітрям, що виходить з сушарки, при стандартному вмісті сухих речовин в готовому продукті  $CP_{гп} = (1 - W_{в}) = 0,94$  (частка) становить:

$$G_{cш} = G_{oc} \cdot (1 - E_{cш}) / CP_{гп} = 6,4 \cdot (1 - 0,04) / 0,94 = 6,5 \text{ кг.}$$

Маса води, що підлягає видаленню з врахуванням коефіцієнта втрат при сушінні  $E_{cш} = 0,04$  (частка) становить:

$$G_{в} = G_{ocv} \cdot (1 - E_{cш}) - G_{cш} = 8 \cdot (1 - 0,04) - 6,5 = 1,2 \text{ кг.}$$

Після сушіння отримуємо готовий кристалічний порошок натаміцину для фармацевтичного застосування, який не потребує додавання наповнювача. У подальшому даний порошок може бути використаний як діюча речовина для виготовлення таблеток, супозиторіїв і мазей.

**Розрахунок стадії ПМВ: пакування, маркування, відвантаження.** Сухий порошок натаміцину розфасовують у подвійні поліетиленові саше по 0,1 кг. Втрати при фасуванні складають  $E_{yp} = 0,01$  (частка).

Кількість порошку для фасування з урахуванням втрат складає:

$$G_{yp} = (G_{cш} + G_{нап}) \cdot (1 - E_{yp}) = (6,5 + 0) \cdot (1 - 0,01) = 6,4 \text{ кг.}$$

Кількість пакетів при фасуванні за один цикл складає:

$$N_{пк} = G_{yp} / N_{п} = 6,4 / 0,1 = 64 \text{ саше.}$$

Механічні втрати порошку при фасуванні становлять:

$$v_{\text{тм}} = (G_{\text{сш}} + G_{\text{нап}}) - G_{\text{уп}} = (6,5 + 0) - 6,4 = 0,1 \text{ кг.}$$

Похибка продуктового розрахунку становить:

$$\Delta = (G_{\text{уп}} - G_{\text{цк}}) \cdot 100 / G_{\text{уп}} = (6,4 - 6) \cdot 100 / 6,4 = +6,25 \text{ \%}.$$

Отримане значення менше заданого діапазону точності  $\pm 10 \text{ \%}$ . Отже, можна зробити висновок, що продуктивний розрахунок зроблено вірно.

Таблиця 6.6

**Розрахунок матеріального балансу на один виробничий цикл одержання  
готового порошку натаміцину**

№ З/п	Використано		Отримано	
	Назва сировини і напівпродукту	Кількість, кг, л	Назва кінцевого продукту, відходів та втрат	Кількість, кг, л
1	2	3	4	5
1	<b>ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ВИРОЩУВАННЯ ІНОКУЛЯТУ В КОЛБАХ НА КАЧАЛКАХ (мл, г)</b>			
1.1	Глюкоза	1.5	Нестерильне ПС	366.7
1.2	Дріжджовий екстракт	1.5		
1.3	Солодовий екстракт	3.7		
1.4	Вода	360		
	Всього:	<b>367</b>	Всього:	<b>367</b>
2	<b>СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА В АВТОКЛАВІ (л)</b>			
2.1	Нестерильне ПС	0.367	Стерильне ПС	0.367
	Всього:	<b>0.367</b>	Всього:	<b>0.367</b>
3	<b>ОТРИМАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ ПІД ЧАС КУЛЬТИВУВАННЯ В КОЛБАХ НА КАЧАЛКАХ</b>			
3.1	Стерильне ПС	0.367	Посівний матеріал	0.404
3.2	Посівний матеріал з колби	0.037		
	Всього:	<b>0.404</b>	Всього:	<b>0.404</b>

1	2	3	4	5
4	<b>ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ МАЛОГО ІНОКУЛЯТОРА</b>			
4.1	Глюкоза	0.017	Нестерильне ПС	4.1
4.2	Дріжджовий екстракт	0.017		
4.3	Солодовий екстракт	0.041		
4.4	Вода	4.0		
	Всього:	<b>4.1</b>	Всього:	<b>4.1</b>
5.	<b>СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ МАЛОГО ІНОКУЛЯТОРА В АВТОКЛАВІ</b>			
5.1	Нестерильне ПС	4.1	Стерильне ПС	4.1
	Всього:	<b>4.1</b>	Всього:	<b>4.1</b>
6.	<b>ОТРИМАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ В МАЛОМУ ІНОКУЛЯТОРІ</b>			
6.1	Стерильне ПС	4.1	Посівний матеріал	4
6.2	Посівний матеріал з колб на качалках	0.4		
6.2	Втрати (частка)	0.1		0.45
6.3	Всього:	<b>4.5</b>	Всього:	<b>4.5</b>
7	<b>ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ІНОКУЛЯТОРА</b>			
7.1	Глюкоза	0.14	Нестерильне ПС	26.64
7.2	Дріжджовий екстракт	0.14		
7.3	Солодовий екстракт	0.36		
7.4	Вода	26		
	Всього:	<b>26.64</b>	Всього:	<b>26.64</b>
8.	<b>СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ІНОКУЛЯТОРА</b>			
8.1	Нестерильне ПС	26.64	Стерильне ПС	30.25
8.2	Конденсат	3.6	(втрат немає)	0
	Всього:	30.25	Всього:	30.25
9.	<b>ОТРИМАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ В ІНОКУЛЯТОРІ</b>			
9.1	Стерильне ПС	30.25	Посівний матеріал	30.85
9.2	Посівний матеріал з малого інокулятора	4		

1	2	3	4	5
9.3	Втрати (частка)	0.1		3.4
	Всього:	<b>34.25</b>	Всього:	<b>34.25</b>
10.	<b>ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ПОСІВНОГО АПАРАТУ</b>			
10.1	Глюкоза	1.4	Нестерильне ПС	324.4
10.2	Дріжджовий екстракт	1.4		
10.3	Солодовий екстракт	3.6		
10.4	Вода	318		
	Всього:	<b>324.4</b>	Всього:	<b>324.4</b>
11.	<b>СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ПОСІВНОГО АПАРАТУ</b>			
11.1	Нестерильне ПС	324.4	Стерильне ПС	360.4
11.2	Конденсат	36	(втрат немає)	0
	Всього:	<b>360.4</b>	Всього:	<b>360.4</b>
12.	<b>ОТРИМАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ В ПОСІВНОМУ АПАРАТІ</b>			
12.1	Стерильне ПС	360.4	Посівний матеріал	352
12.2	Посівний матеріал з інокулятора	30.85		
12.3	Втрати (частка)	0.1		39.3
	Всього:	<b>391.3</b>	Всього:	<b>391.3</b>
15.	<b>ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ФЕРМЕНТЕРА</b>			
15.1	Глюкоза	72,8	Нестерильне ПС	3 276
15.2	Дріжджовий екстракт	7.3		
15.3	Аспарагін	1.8		
15.4	М'ясний екстракт	7.3		
15.5	Монофосфат калію	0.18		
15.6	Ацетат натрію	6.4		
15.7	Пропіонат натрію	1,8		
15.8	Вода	3178		
	Всього:	<b>3276</b>	Всього:	<b>3276</b>
16.	<b>СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ФЕРМЕНТЕРА</b>			
16.1	Нестерильне ПС	3276	Стерильне ПС	3 640

1	2	3	4	5
16.2	Розбавлення конденсатом 10%	364		
	Всього:	<b>3 640</b>	Всього:	<b>3 640</b>
17.	<b>ВИРОБНИЧИЙ БІОСИНТЕЗ</b>			
17.1	Стерильне поживне середовище	3 640	Культуральна рідина на центрифугування	3593
17.2	Посівний матеріал з посівного апарата	352		
17.3	Втрати (частка)	0,1	Втрати (кількість)	399
	Всього:	<b>3 992</b>	Всього:	<b>3 992</b>
18.	<b>ЦЕНТРИФУГУВАННЯ КУЛЬТУРАЛЬНОЇ РІДИНИ</b>			
18.1	Культуральна рідина центрифугування, л	3593	Вологий осад	109,5
			Фугат	3 474
18.2	Втрати (частка)	0,08	Втрати	9,5
	Всього:	<b>3 593</b>	Всього:	<b>3 593</b>
19.	<b>ДЕЗІНТЕГРАЦІЯ КЛІТИН ТЕПЛОВОЮ ОБРОБКОЮ</b>			
19.1	Вологий осад	109,5	Дезінтеграт клітин	107
19.2	Втрати (частка)	0,02	Втрати	2,5
	Всього:	<b>109,5</b>	Всього	<b>109,5</b>
20.	<b>ЕКСТРАКЦІЯ НАТАМІЦИНУ ІЗОПРОПАНОЛОМ</b>			
20.1	Дезінтеграт клітин, л	107	Екстракт натаміцину	125
20.2	Екстрагент	22		
20.3	Втрати (частка)	0,03	Втрати	4
	Всього:	<b>129</b>	Всього:	<b>129</b>
21.	<b>ЦЕНТРИФУГУВАННЯ ЕКСТРАКТУ</b>			
21.1	Екстракт натаміцину, л	125	Фугат	79
			Осад	40
21.2	Втрати	0,07	Втрати	6
	Всього	<b>125</b>	Всього	<b>125</b>
22.	<b>КОНЦЕНТРУВАННЯ І ОЧИЩЕННЯ ОРГАНІЧНОГО ЕКСТРАКТУ НАТАМІЦИНУ МЕТОДОМ УЛЬТРАФІЛЬТРАЦІЇ</b>			
22.1	Фугат	79	Концентрат	24

1	2	3	4	5
			Пермеат	47
22.2	Втрати (частка)	0,1	Втрати	8
	Всього:	<b>79</b>	Всього:	<b>79</b>
23.	<b>ОСАДЖЕННЯ КРИСТАЛІВ НАТАМЦІНУ</b>			
23.1	Концентрат	24	Перенасичений розчин	23,7
23.2	Втрати (частка)	0,01		0,3
	Всього:	<b>24</b>	Всього:	<b>24</b>
24.	<b>ВІДДІЛЕННЯ КРИСТАЛІВ НАТАМЦІНУ ФІЛЬТРУВАННЯМ</b>			
24.1	Перенасичений розчин, л	23,7	Вологий осад, кг	8,0
			Фільтрат	14,8
24.2	Втрати (частка)	0,04	Втрати	0,9
	Всього:	<b>23,7</b>	Всього	<b>23,7</b>
25.	<b>СУШІННЯ КРИСТАЛІВ НАТАМЦІНУ У СУШАРЦІ З ПСЕВДОЗРІДЖЕНИМ ШАРОМ</b>			
25.1	Вологий осад, кг	8,0	Сухий антибіотик	6,5
			Видалена волога	1,2
25.2	Втрати (частка)	0,04	Втрати	0,3
	Всього:	<b>8,0</b>	Всього:	<b>8,0</b>
26.	<b>ФАСУВАННЯ, ПАКУВАННЯ ГОТОВОГО ПРОДУКТУ</b>			
26.1	Готовий продукт, кг	6,5	Упакований продукт	6,4
	Пакети			
26.2	Втрати (частка)	0,01	Втрати	0,1
	Всього:	<b>6,5</b>	Всього:	<b>6,5</b>

## 6.2. Розрахунок технологічного обладнання

**Уточнюючий розрахунок ферментаційного обладнання.** За даними продуктового розрахунку і таблиці матеріального балансу проведемо уточнюючий розрахунок ферментаційної і ємкісної апаратури і перевіримо коефіцієнти заповнення обладнання.

Приблизний загальний геометричний об'єм ферментерів при заданому  $K_3 = 0.5$ :

$$V_{гф} = V_{ф}/K_3 = 4/05 = 8 \text{ м}^3.$$

Найближчим за номінальним об'ємом є ферментер  $V_{нф} = 8 \text{ м}^3$ .

Кількість виробничих ферментерів при заданому  $K_3$ :

$$N_{\text{фр}} = V_{\text{рф}}/V_{\text{нф}} = 8/8 = 1.$$

Уточнемо коефіцієнт заповнення вибраного ферментера:

$$K_{\text{зф}} = V_{\text{ф}}/ (V_{\text{нф}} \times N_{\text{фр}}) = 4/(8 \times 1) = 0,5$$

Оскільки уточнений коефіцієнт дорівнює розрахованому, то приймаємо до установки ферментерів  $N_{\text{фр}} + 1$  запасний.

### **3.4.2. Уточнюючий розрахунок кількості посівних апаратів**

Приблизний загальний геометричний об'єм посівного апарата при заданому  $K_3 = 0,5$  становитиме:

$$V_{\text{па}} = V_{\text{па}}/K_3 = 0,4/0,5 = 0,8 \text{ м}^3.$$

Найближчим за номінальним об'ємом є посівний апарат  $V_{\text{ппа}} = 1,00 \text{ м}^3$ .

Кількість посівних апаратів при заданому  $K_3$ :

$$N_{\text{пар}} = V_{\text{па}}/V_{\text{ппа}} = 0,8/1 = 0,8 - \text{приймаємо } 1.$$

Уточнемо коефіцієнт заповнення вибраного посівного апарату:

$$K_{\text{за}} = V_{\text{па}}/ (V_{\text{ппа}} \times N_{\text{пар}}) = 0,4/(1 \times 1) = 0,4.$$

Оскільки уточнений коефіцієнт не перевищує заданих меж (0,5 - 0,65), то приймаємо до установки посівних апаратів  $N_{\text{пар}} + 1$  запасний.

**Уточнюючий розрахунок кількості інокуляторів.** Приблизний загальний геометричний об'єм інокулятора при заданому  $K_3 = 0,5$  становитиме:

$$V_{\text{ін1}} = V_{\text{ін1}}/K_3 = 0,04/0,5 = 0,08 \text{ м}^3.$$

Найближчим за номінальним об'ємом є інокулятор  $V_{\text{інн1}} = 0,10 \text{ м}^3$ .

Кількість інокуляторів при заданому  $K_3$ :

$$N_{\text{інн1}} = V_{\text{ін1}}/V_{\text{інн1}} = 0,08/0,1 = 0,8 - \text{приймаємо } 1.$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення вибраного інокулятора:

$$K_{\text{зін1}} = V_{\text{ін1}}/ (V_{\text{інн1}} \times N_{\text{інн1}}) = 0,04/(0,1 \times 1) = 0,4.$$

Оскільки уточнений коефіцієнт не перевищує заданих меж (0,5 - 0,65), то приймаємо до установки інокуляторів  $N_{\text{інн1}} + 1$  запасний.

**Уточнюючий розрахунок кількості малих інокуляторів.** Приблизний загальний геометричний об'єм інокулятора при заданому  $K_3 = 0,5$  становитиме:

$$V_{\text{ін1}} = V_{\text{ін2}}/K_3 = 4,5/0,5 = 9 \text{ л } (0,009 \text{ м}^3).$$

Найближчим за номінальним об'ємом є інокулятор  $V_{\text{інн2}} = 0,01 \text{ м}^3$ .

Кількість посівних апаратів при заданому  $K_3$ :

$$n_{\text{ін2}} = V_{\text{гін2}}/V_{\text{нін1}} = 0,009/0,01 = 0,9 - \text{приймаємо } 1.$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення вибраного інокулятора:

$$K_{\text{зін2}} = V_{\text{пін2}} / (V_{\text{нін2}} \times N_{\text{пін2}}) = 0,0045 / (0,01 \times 1) = 0,45.$$

Оскільки уточнений коефіцієнт не перевищує заданих меж (0,5 - 0,65), то приймаємо до установки малих інокуляторів  $N_{\text{пін2}} + 1$  запасний.

**Уточнюючий розрахунок кількості качалочних колб.** Приблизний загальний необхідний об'єм качалочних колб при заданому  $K_{\text{зколб}} = 0,2$  становитиме:

$$V_{\text{колб}} = V_{\text{колб}} / K_{\text{зколб}} = 404 / 0,2 = 2020 \text{ мл.}$$

Об'єм 1 колби Ерленмеєра становить  $V_{\text{нколб}} = 750$  мл.

Кількість качалочних колб при заданому  $K_{\text{зколб}} = 0,2$ :

$$n_{\text{колб}} = V_{\text{гколб}} / V_{\text{нколб}} = 2020 / 750 = 2,7 - \text{приймаємо } 3 \text{ колби.}$$

**Уточнюючий розрахунок кількості реакторів змішувачів для приготування середовища для виробничого біосинтезу в ферментері об'ємом 8 м<sup>3</sup>.** Композицію А стерилізують безпосередньо у виробничому ферментері, проте приготування композиції проводять у реакторі-змішувачі.

Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому  $K_{\text{зб}} = 0,8$ :

$$V_{\text{Аг}} = V_{\text{ф}} / K_{\text{з}} = 4,0 / 0,8 = 5 \text{ м}^3.$$

Найближчим за номінальним об'ємом є реактор-змішувач  $V_{\text{нр}} = 5 \text{ м}^3$ .

Кількість посівних апаратів при заданому  $K_{\text{з}}$ :

$$n_{\text{р}} = V_{\text{Аг}} / V_{\text{нр}} = 5 / 5 = 1.$$

Уточнимо коефіцієнт заповнення вибраного реактора-змішувача:

$$K_{\text{зр}} = V_{\text{Ар}} / (V_{\text{Ар}} \times N_{\text{р}}) = 4 / (5 \times 1) = 0,8.$$

Уточнений коефіцієнт не перевищує задані межі (0,7 - 0,85). Отже, приймаємо до установки реакторів - 1 + 1 запасний.

Композицію Б готують у лабораторному посуді і стерилізують в автоклаві, тому розрахунків реакторів для даної композиції не проводять.

Композицію В готують і стерилізують окремо у реакторі-змішувачі. Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому  $K_{\text{зб}} = 0,8$ :

$$V_{\text{Аг}} = V_{\text{ф}} / K_{\text{з}} = 0,305 / 0,8 = 0,38 \text{ м}^3.$$

Найближчим за номінальним об'ємом є реактор-змішувач  $V_{\text{нр}} = 0,5 \text{ м}^3$ .

Кількість реакторів при заданому  $K_{\text{з}}$ :

$$p = V_{Ar}/V_{np} = 0,38/0,5 = 1.$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення вибраного реактора-змішувача:

$$K_{зр} = V_{Ar}/(V_{Ar} \times N_p) = 0,38/(0,5 \times 1) = 0,76.$$

Уточнений коефіцієнт не перевищує задані межі (0,7 - 0,85). Отже, приймаємо до установки реакторів - 1 + 1 запасний.

**Уточнюючий розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування поживного середовища для отримання посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 1 м<sup>3</sup>.** Компоненти поживного середовища для отримання посівного матеріалу готують і стерилізують в одній композиції А.

Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому  $K_{зб} = 0,8$ :

$$V_{Ar} = V_A/K_3 = 0,36/0,8 = 0,45 \text{ м}^3.$$

Найближчим за номінальним об'ємом є реактор-змішувач  $V_{np} = 0,4 \text{ м}^3$ .

Кількість посівних апаратів при заданому  $K_3$ :

$$p = V_{Ar}/V_{np} = 0,45/0,4 = 1,125 - \text{приймаємо } 1.$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення вибраного реактора-змішувача:

$$K_{зр} = V_{Ar}/(V_{Ar} \times N_p) = 0,36/(0,4 \times 1) = 0,9.$$

Уточнений коефіцієнт перевищує задані межі (0,7 - 0,85). Розрахуємо  $K_{зр}$  за кількості реакторів - 2:

$$K_{зр} = V_{Ar}/(V_{Ar} \times N_p) = 0,36/(0,4 \times 2) = 0,45.$$

Оскільки отримане значення також не потрапляє в діапазон допустимих меж, то обираємо інший геометричний об'єм реактора, який замовляємо у виробника  $V_{np} = 0,5 \text{ м}^3$ . Тоді уточнений коефіцієнт заповнення становитиме:

К

Отже, приймаємо до установки реакторів - 1 + 1 запасний.

**Уточнюючий розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування доживного середовища для отримання посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 0,1 м<sup>3</sup>.** Компоненти поживного середовища для отримання посівного матеріалу готують і стерилізують в одній композиції А.

Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому  $K_{зб} = 0,8$ :

$$V_{Ar} = V_A/K_3 = 0,03/0,8 = 0,04 \text{ м}^3.$$

Найближчим за номінальним об'ємом є реактор-змішувач  $V_{np} = 0,04 \text{ м}^3$ .

Кількість реакторів при заданому  $K_3$ :

$$p = V_{Ar}/V_{np} = 0,04/0,04 = 1.$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення вибраного реактора-змішувача:

$$K_{зр} = V_{Ar}/(V_{Ar} \times N_p) = 0,04/(0,04 \times 1) = 0,714.$$

Оскільки уточнений коефіцієнт лежить в заданих межах (0,7 - 0,85), то приймаємо до установки реакторів-змішувачів приготування композиції А - 1 + 1 запасний.

**Уточнюючий розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування поживного середовища для отримання посівного матеріалу в малому інокуляторі об'ємом 0,1 м<sup>3</sup> (10 л).** Компоненти поживного середовища для отримання посівного матеріалу готують і стерилізують в одній композиції А. Зважаючи на невеликий об'єм композиції А (4,1 л), композицію стерилізують в лабораторному посуді в автоклаві, і тому розрахунок реакторів-змішувачів не проводять.

**Розрахунок осаджувальної центрифуги для відділення біомаси.** Вихідними даними для розрахунку є технічні характеристики осаджувальної центрифуги Flottweg Z C7E: внутрішній діаметр  $D_B = 2,6$  м; довжина барабана  $L = 0,76$  м; діаметр барабану  $D_6 = 2,3$  м; швидкість обертання ротора  $w = 45$  с<sup>-1</sup>; коефіцієнт завантаження осадом  $K = 70\%$ .

Прийmemo наступні характеристики суспензії: в'язкість дисперсійної фази  $\mu_c = 1,3 \cdot 10^{-3}$  Па·с; густина частинок  $\rho_{ч} = 1200$  кг/м<sup>3</sup>; густина осаду  $\rho_0 = 1050$  кг/м<sup>3</sup>; крупність розділення  $\delta_k = 1$  мкм. Об'єм культуральної рідини, яку треба переробити, становить 3,6 м<sup>3</sup>.

З вихідних даних знаходимо геометричні розміри осаджувальної центрифуги:

$$2l = (D_B - L) \cdot (1 - K) = (2,6 - 0,76) \cdot (1 - 70) = 0,55 \text{ м};$$

$$2R_{\min} = D_6 + 2l = 2,3 + 0,55 = 2,85 \text{ м};$$

$$R_{\min} = 2,85 / 2 = 1,4 \text{ м};$$

$$R_{\max} = D_B / 2 = 2,6 / 2 = 1,3 \text{ м};$$

$$R_{\text{сер}} = (R_{\min} + L) / 2 = (1,4 + 0,76) / 2 = 1,08 \text{ м}.$$

Так, середня продуктивність осаджувальної центрифуги становить:

$$V_{\Pi} = \frac{\pi R^2 L w^2 (\rho_{ч} - \rho_0) \cdot \delta_k^2}{9 \mu_c} = \frac{3,14 \cdot 1,08^2 \cdot 0,76 \cdot (2 \cdot 3,14 \cdot 45)^2 (1200 - 1050) \cdot (1 \cdot 10^{-6})^2}{9 \cdot 1,3 \cdot 1,3^{-3}} = 2,85 \cdot 10^{-3} \text{ м}^3/\text{с} =$$

$$= 10,2 \text{ м}^3/\text{год}.$$

Отже, розрахована середня продуктивність осаджувальної центрифуги збігається із заявленим значенням  $10 \text{ м}^3/\text{год}$ .

Таким чином, усю культуральну рідину можна переробити за стільки часу:

$$\tau = 3,6 / 10,2 = 0,35 \text{ год} = 22 \text{ хв.}$$

Тому для відділення біомаси з культуральної рідини обираємо центрифугу-декантер фірми Flottweg серії Z моделі C7E з габаритними розмірами (м):  $2,6 \times 0,76 \times 2,3$  і продуктивністю до  $10 \text{ м}^3/\text{год}$ .

**Розрахунок збірника для дезінтеграції і екстракції натаміцину.** Враховуючи, що об'єм біомаси з урахуванням втрат при центрифугуванні і дезінтеграції ( $E_{сп} = 0,1$ ) становить 107 л, а об'єм екстрагенту становить 22 л, загальний об'єм реакційної суміші складає  $V_p = 129 \text{ л} = 0,13 \text{ м}^3$ .

Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому  $K_{зб} = 0,8$ :  
 $V_{ед} = V_p / K_{зб} = 0,13 / 0,8 = 0,16 \text{ м}^3$ .

Найближчим за номінальним об'ємом є реактор-змішувач  $V_{рз} = 0,16 \text{ м}^3$ .

Кількість реакторів при заданому:  $N_p = V_{Аг} / V_{нр} = 0,16 / 0,2 = 0,8 = 1$ .

Уточнюємо коефіцієнт заповнення вибраного реактора-змішувача:

$$K_{зр} = V_{ед} / (V_{рз} \times N_p) = 0,16 / (0,2 \times 1) = 0,8.$$

Оскільки уточнений коефіцієнт лежить в заданих межах (0,7 - 0,85), то приймаємо до установки реакторів-змішувачів для дезінтеграції, екстракції і декантації органічного екстракту натаміцину – 1.

**Розрахунок ультрафільтраційної установки з тангенціальним потоком.** Після екстракції отримують  $V_c = 129 \text{ л}$  органічного екстракту натаміцину, який містить близько  $G_{аб} = 7,5 \text{ кг}$  антибіотика. Для розрахунку ультрафільтраційної установки приймемо наступні вихідні дані: втрати при ультрафільтрації  $E_{уф} = 0,1$  (частка), температура екстракту  $t = 20 \text{ С}$ , густина  $\rho_c = 1050 \text{ кг/м}^3$ , динамічна в'язкість екстракту  $\mu_c = 1,5 \cdot 10^{-3} \text{ Па}\cdot\text{с}$ ; динамічна в'язкість води  $\mu_v = 1,0 \cdot 10^{-3} \text{ Па}\cdot\text{с}$ ; перепад тиску на мембрані  $\Delta P = 0,2 \text{ МПа}$ , час ультрафільтрації  $\tau = 2 \text{ год}$ , ступінь концентрування  $K = 3$ .

Молекулярна маса натаміцину становить  $M = 666 \text{ Да}$ . Відповідно діаметр молекули буде становити:  $D_{мол} = 0,098 \cdot M^{0,38} = 1,159 \text{ нм}$ .

Для розрахунків обираємо мембрану типу УПМ-10, яка має діаметр пор 1 нм, оскільки максимально допустимий діаметр пор задовільняє співвідношення  $k = D_{\text{мол}}/D_{\text{пор}} \geq 0,5 : k = 1,159/1 = 1,159$ .

Для мембрани з розмірами пор 1 нм величина селективності мембрани становить  $\varphi_{d1} = 0,9997$ .

Концентрація антибіотика в екстракті становить:

$$X_c = G_{\text{аб}}/V_c \cdot \rho_c = 7,5 / 0,129 \cdot 1050 = 0,055 \text{ кг/кг.}$$

Концентрація антибіотика в концентраті складає:

$$X_k = X_c \cdot K = 0,055 \cdot 3 = 0,166 \text{ кг/кг.}$$

Розрахуємо середню концентрацію антибіотика у пермеаті (кг/кг пермеату):

$$X_{1\text{ср}} := X_c \cdot \frac{1 - K \cdot \frac{-1}{\varphi_{d1}}}{\frac{-1}{\varphi_{d1}}} = 2,737 \times 10^{-5}$$

Витрати супернатанта складають:

$$L_c = V_c \cdot \rho_c / \tau \cdot 3600 = 0,129 \cdot 1050 / 2 \cdot 3600 = 0,019 \text{ кг/с.}$$

Розрахуємо витрату антибіотика, який подається на ультрафільтрацію разом із екстрактом:

$$L_{\text{аб}} = L_c \cdot X_c = 0,019 \cdot 0,055 = 1,042 \cdot 10^{-3} \text{ кг/с.}$$

Витрата пермеату для мембрани становить:

$$L_{\pi} = L_c \cdot (1 - K \varphi^{-1}) = 0,019 \cdot (1 - K_{0,9997}^{-1}) = 0,013 \text{ кг/с.}$$

Витрата антибіотика з пермеатом для мембрани становить:

$$L_{\text{аб1}} = L_{\pi} \cdot X_{1\text{ср}} = 0,013 \cdot 2,737 \cdot 10^{-5} = 3,434 \cdot 10^{-7} \text{ кг/с.}$$

Розрахуємо втрати антибіотика при використанні мембрани УПМ -10:

$$V_{\text{аб}} = L_{\text{аб1}} \cdot 100 / L_{\text{аб}} = 3,434 \cdot 10^{-7} \cdot 100 / 1,042 \cdot 10^{-3} = 0,033\%.$$

Враховуючи, що продуктивність мембрани за дистильованою водою становить  $V_0 = 15 \text{ дм}^3/\text{м}^2$ , проникливість мембрани за чистою водою складає:

$$A = V_0 \cdot \rho_v / 3600 \cdot 1000 = 15 \cdot 1000 / 3600 \cdot 1000 = 4,167 \cdot 10^{-3} \text{ кг/ (м}^2 \cdot \text{с} \cdot \text{МПа).}$$

Масова продуктивність мембрани за водою становить:

$$G_0 = A \cdot \Delta P = 4,167 \cdot 10^{-3} \cdot 0,2 = 8,333 \cdot 10^{-4} \text{ кг/ (м}^2 \cdot \text{с).}$$

Масова продуктивність мембрани за екстрактом складає:

$$G_c = G_0 \cdot (\mu_v / \mu_c) = 8,333 \cdot 10^{-4} \cdot (1,0 \cdot 10^{-3} / 1,5 \cdot 10^{-3}) = 5,556 \cdot 10^{-4} \text{ кг/ (м}^2 \cdot \text{с)}.$$

Поверхня фільтрування становить:

$$F = L_{\pi} / G_c = 0,013 / 5,556 \cdot 10^{-4} = 22,65 \text{ м}^2.$$

Розрахуємо необхідну кількість фільтрувальних елементів:

$$n = F / 0,25 = 90,58 = 91 \text{ шт.}$$

Отже, для концентрації і очищення екстракту натаміцину передбачаємо встановлення ультрафільтраційної установки, яка має поверхню фільтрування 22,65 м<sup>2</sup>. Запропонована установка Alfa Laval PilotUnit Multi продуктивністю до 200 л/год і площею фільтрування до 25 м<sup>2</sup> відповідає заданим параметрам. Для фільтрування органічного екстракту натаміцину підходить фільтрувальний елемент марки УПМ-10 з діаметром пор 1 нм. Проте для кращої селективності процесу фільтрування передбачаємо встановлення мембран марки UM05 (виробник «Амікон», США) з поліелектролітного комплексу, яка здатна затримувати високомолекулярні речовини з молекулярною масою до 700 г/моль.

**Розрахунок осаджувальної центрифуги для відділення відпрацьованого дезінтеграту.** Вихідними даними для розрахунку є технічні характеристики пілотної осаджувальної центрифуги Lemites MD 100-Sn: внутрішній діаметр  $D_v = 1,2$  м; довжина барабана  $L = 0,6$  м; діаметр барабану  $D_6 = 1,0$  м; швидкість обертання ротора  $w = 6 \text{ с}^{-1}$ ; коефіцієнт завантаження осадом  $K = 80\%$ . Прийmemo наступні характеристики суспензії: в'язкість дисперсійної фази  $\mu_c = 1,3 \cdot 10^{-3} \text{ Па}\cdot\text{с}$ ; густина частинок  $\rho_{\text{ч}} = 1200 \text{ кг/м}^3$ ; густина осаду  $\rho_0 = 1050 \text{ кг/м}^3$ ; крупність розділення  $\delta_k = 1$  мкм. Об'єм культуральної рідини, яку треба переробити, становить  $0,125 \text{ м}^3$ .

З вихідних даних знаходимо геометричні розміри осаджувальної центрифуги:

$$2l = (D_v - L) \cdot (1 - K) = (1,2 - 0,6) \cdot (1 - 80) = 0,12 \text{ м};$$

$$2R_{\min} = D_6 + 2l = 1 + 0,12 = 1,12 \text{ м};$$

$$R_{\min} = 1,12 / 2 = 0,56 \text{ м};$$

$$R_{\max} = D_v / 2 = 1,2 / 2 = 0,6 \text{ м};$$

$$R_{\text{сеп}} = (R_{\min} + L) / 2 = (0,56 + 0,6) / 2 = 0,58 \text{ м}.$$

Так, середня продуктивність осаджувальної центрифуги становить:

$$V_{\pi} = \frac{\pi R^2 L w^2 (\rho_{\text{ч}} - \rho_0) \cdot \delta_k^2}{9 \mu_c} = \frac{3,14 \cdot 0,58^2 \cdot 0,6 \cdot (2 \cdot 3,14 \cdot 60)^2 (1200 - 1050) \cdot (1 \cdot 10^{-6})^2}{9 \cdot 1,3 \cdot 1,3^{-3}} = 0,306 \cdot 10^{-4} \text{ м}^3/\text{с} =$$

$$0,11 \text{ м}^3/\text{год} = 110 \text{ л/год}.$$

Отже, розрахована середня продуктивність осаджувальної центрифуги збігається із заявленим значенням 110 л/год.

Таким чином, усю культуральну рідину можна переробити за стільки часу:  $\tau = 125 / 110 = 1,14 \text{ год} \approx 69 \text{ хв}$ .

Продуктивність центрифуги Lemites MD 100-Sn становить до 200 л/год, а отже, відповідно до розрахунків, дана центрифуга підходить за технічними характеристиками.

**Розрахунок збірника для осадження кристалів натаміцину.** Враховуючи, що об'єм концентрату, який надходить на осадження становить  $V_{\text{кон}} = 15 \text{ л}$ , і об'єм промивної води становить  $V_{\text{води}} = 15 \text{ л}$ , загальний об'єм рідини складає  $V_p = 30 \text{ л} = 0,03 \text{ м}^3$ .

Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому  $K_{зб} = 0,8$ :  
 $V_{\text{оп}} = V_p / K_{зб} = 0,03 / 0,8 = 0,04 \text{ м}^3$ .

Найближчим за номінальним об'ємом є реактор-змішувач  $V_{\text{он}} = 0,04 \text{ м}^3$ .

Кількість реакторів при заданому  $K_3$ :

$$n_p = V_{\text{Аг}} / V_{\text{нр}} = 0,04 / 0,04 = 1.$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення вибраного реактора-змішувача:

$$K_{зр} = V_{\text{оп}} / (V_{\text{он}} \times N_p) = 0,04 / (0,04 \times 1) = 0,8.$$

Оскільки уточнений коефіцієнт лежить в заданих межах (0,7 - 0,85), то приймаємо до установки реакторів-змішувачів осадження кристалів натаміцину – 1.

**Розрахунок сушарки з псевдозрідженим шаром.** Маса кристалічного осаду натаміцину з врахуванням коефіцієнта втрат при сушінні ( $E_{\text{сш}} = 0,04$ ), при стандартному вмісті сухих речовин в готовому продукті  $CP_{\text{гп}} = 94\%$  становить:

$$G_{\text{сш}} = G_{\text{ос}} \cdot (1 - E_{\text{сш}}) / CP_{\text{гп}} = 6,4 \cdot (1 - 0,04) / 0,94 = 6,5 \text{ кг}.$$

Маса води, що підлягає видаленню з врахуванням коефіцієнта втрат при сушінні становить:

$$G_{\text{сш}} = G_{\text{осв}} \cdot (1 - E_{\text{сш}}) - G_{\text{сш}} = 8 \cdot (1 - 0,04) - 6,5 = 1,2 \text{ кг}.$$

Зважаючи на невелику масу води, яку необхідно видалити із осаду, прийmemo час сушіння  $\tau_c = 30 \text{ хв} = 0,5 \text{ год}$ .

Витрата вологи, яка підлягає видаленню, становить:

$$G_{\text{сш}} / \tau_c = 0,3 / 0,5 = 2,4 \text{ кг/год}.$$

Прийmemo, що температура сушіння (на вході) становить  $t_{1В} = 90$  °С, температура на виході –  $t_{2В} = 65$  °С, а температура висушеного продукту  $t_{М} = 40$  °С. Розрахуємо питому продуктивність сушарки по волозі, яка випарувалась:

$$G_{\text{сер}} = 0,05 \cdot [(t_{1В} + t_{2В}) / 2] - t_{М} = 0,05 \cdot [(90 + 65) / 2] - 40 = 1,873 \text{ кг/ год.}$$

Орієнтовний об'єм сушарки становить:

$$V_{\text{суш}} = W / G_{\text{сер}} = 2,4 / 1,873 = 12,8 \text{ л.}$$

Отже, для сушіння кристалів натаміцину необхідно встановити сушарку з псевдозрідженим шаром, яка має об'єм резервуара не менше 20 л. Із асортименту сушарок STE такий об'єм мають пілотні установки.

**Розрахунок фасувально-пакувального обладнання.** Маса сухого порошку натаміцину, який йде на фасування, становить  $G_{\text{гп}} = 6,4$  кг. Маса одного пакету-саше з порошком натаміцину становить  $G_{\text{с}} = 0,1$  кг.

$$\text{Кількість саше за цикл становить: } N = G_{\text{гп}} / G_{\text{с}} = 6,4 / 0,1 = 64 \text{ саше.}$$

Використовуємо фасувально-пакувальний апарат моделі НР150 продуктивністю  $G_{\text{ав}} = 50$  уп/хв.

Час фасування партії готового продукту становить:

$$\tau = N / G_{\text{ав}} = 1,22 \text{ хв} \approx 2 \text{ хв.}$$

## РОЗДІЛ 7. Специфікація обладнання

Таблиця 7.1

### Специфікація обладнання для виробництва натаміцину

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
ПЗ-1	Повітрязабірник	1	Повітрязабірник «Екафарм» (Україна), обладнаний металевією сіткою [71]
Ф-2 Ф-58	Фільтр грубої очистки повітря	2	Фільтр моделі ФВП-G4-66-25/С, фільтруючий матеріал – скловолокно з підвищеною щільністю, продуктивність – 3400 м <sup>3</sup> /год, початковий опір на чистому фільтрі – 20 Па [72]
К-3	Компресор	1	Компресор “Dalgakiran” (Туреччина) моделі DKS 600, максимальний тиск на виході повітря з апарату – 0,8 МПа, продуктивність – 1657 л/год, потужність – 7,5 кВт, габаритні розміри (мм) – 1885/650/1300 [73]
ТО-4	Теплообмінник - охолоджувач	1	Теплообмінник “SALDA” (Литва) моделі AVA 100, тип – пластинчастий, продуктивність – 60-165 м <sup>3</sup> /год, потужність – 0,24-0,52 кВт, максимальна температура повітря на виході +20,4 С, витрата охолоджуючої води – 0,01-0,02 л/с, габаритні розміри (мм) – 170/236/365 [74]
РВ-5	Ресивер	1	Ресивер “Галкосервіс” (Україна) моделі Р.500600-14, робочий об’єм – 0,5 м <sup>3</sup> , робочий тиск – 1,0 МПа, максимальна температура повітря – -20 С і +100 С [75]
Т-6	Теплообмінник - нагрівач	1	Теплообмінник “SALDA” (Литва) моделі EKS 500x250/9-3f, тип – змієвиковий, корпус – алюмоцинкова сталь, тен – нержавіюча сталь AISI 304, максимальна температура нагрітого повітря – +50°С, потужність апарату – 6,0 - 36,0 кВт, робоча температура - +5...+40 °С, габаритні розміри (мм) – 500/250/370 [76]

					<b>НУХТ БТЕК 04.03.09 КР ПЗ</b>			
Змн.	Арк.	№ документа	Підпис	Дата				
Розробив	Цапко				РОЗДІЛ 7. Специфікація обладнання	Літера	Арк.	Аркушів
Консульт.							118	7
Керівник	Красінько					Кафедра БТМ		
Н. контр.								
Зав. каф.	Пирог							

1	2	3	4
ФГ-7	Фільтр тонкої очистки повітря	1	Фільтр моделі Н10-Н14, матеріал – фільтрувальний папір на основі ультра- і мікротонкого скловолокна, діаметр волокон – 0,25...1,0 мкм, ефективність очищення повітря – до 99,9995 %, початковий опір потоку повітря 250-280 Па, кінцевий опір – 600 Па, продуктивність – 1200-2000 м <sup>3</sup> /год [77]
СІР-8	СІР-мийка	1	СІР-мийка «Milesta» (Україна), з 2 резервуарами по 400 л, матеріал резервуру – сталь AISI-304, ASTM, матеріал гнучких трубопроводів – SO-SILICONESTART, максимальна продуктивність – до 34 м <sup>3</sup> /год [78]
ДЗ-9 ДЗ-15 ДЗ-19 ДЗ-24 ДЗ-28 ДЗ-31  ДЗ-33 ДЗ-44	Об'ємно-ваговий дозатор	7	Дозатор напівавтоматичний фірми “ABC Tech” моделі ВДСВ-2 (Україна), тип – з вібраційним живильником; межі зважування: найменша межа дозування – 50 г/мл, найбільша межа дозування – 15 кг/мл; об'єм бункера – 420 л; похибка дозування – 0,35% [79] Дозатор напівавтоматичний фірми “ABC Tech” моделі ВДСВ-1 (Україна), тип – вібраційний; межі зважування: найменша межа дозування – 0,5 кг, найбільша межа дозування – 90 кг; похибка дозування – 0,5%
АВ-11	Автоклав для стерилізації поживних середовищ	1	Автоклав “Tuttnauer” (Німеччина) моделі 3840 ELV D-Line”, завантаження – вертикальне, місткість – 52 л, температурний режим – +105-137 °С [80]
ФІ-13 ФІ-17 ФІ-21 ФІ-23 ФІ-28 ФІ-30 ФІ-38 ФІ-39 ФІ-40 ФІ-41	Фільтр індивідуального очищення	10	Фільтр “Фолтер” моделі Е006.1П, клас очищення – U15-U16, ефективність – 99,99995%, номінальна продуктивність при швидкості 0,45 м/с – 900 м <sup>3</sup> /год, матеріал – мініплісероване скловолокно, рамка – нержавіюча сталь AISI 314 [81]
ЗП-12	Засівний пристрій	1	Ємність із боросилікатного скла, об'ємом 500 мл, оснащена клапаном “SACOVA” фірми “Sartorius Stedim” (Німеччина) [82]

1	2	3	4
ІН-14	Інокулятор	1	Біореактор “Bionet” (Іспанія) модель F1/10, геометричний об’єм – 0,01 м <sup>3</sup> , габаритні розміри (мм): d = 277, h = 650; корпус – нержавіюча сталь AISI 316L, боросілікатне скло, без швів зварювання; регулятори рівня подачі повітря, датчики температури, рівня рН, кисню і піногасника; управління процесами – програмне забезпечення ROSA+; перемішування – турбінна мішалка закритого типу, швидкість перемішування – 100 – 300 об/хв, передача посівного матеріалу – стиснутим повітрям [83]
РТ-16	Реактор-змішувач для приготування поживного середовища для отримання інокуляту	1	Реактор-змішувач фірми WENZHOU L&B FLUID EQUIPMENT CO.,LTD (Китай) об’ємом 0,04 м <sup>3</sup> , габаритні розміри (мм): d = 400; h = 600; обладнаний електротеном, мішалкою лопатевого типу, швидкість перемішування до 100 об/хв, матеріал – нержавіюча сталь AISI-304,ASTM [84]
ІН-18	Інокулятор	1	Біореактор “Bionet” (Іспанія) модель F1/100, геометричний об’єм – 0,1 м <sup>3</sup> , габаритні розміри (мм): d = 830, h = 1328; корпус – нержавіюча сталь AISI 316L, боросілікатне скло, без швів зварювання; регулятори рівня подачі повітря, датчики температури, рівня рН, кисню і піногасника; управління процесами – програмне забезпечення ROSA+; перемішування – турбінна мішалка закритого типу, швидкість перемішування – 100 – 300 об/хв, передача посівного матеріалу – стиснутим повітрям [83]
РТ-20	Реактор-змішувач для приготування поживного середовища для отримання інокуляту	1	Реактор-змішувач фірми WENZHOU L&B FLUID EQUIPMENT CO.,LTD (Китай) об’ємом 0,5 м <sup>3</sup> , габаритні розміри (мм): d = 800; h = 1200; обладнаний електротеном, мішалкою лопатевого типу, швидкість перемішування до 100 об/хв, матеріал – нержавіюча сталь AISI-304,ASTM [84]

1	2	3	4
ПА-22	Посівний апарат	1	Біореактор “Bionet” (Іспанія) модель F3/1000, геометричний об’єм – 1,0 м <sup>3</sup> , габаритні розміри (мм): d = 1210, h = 1920; корпус – нержавіюча сталь AISI 316L, боросілікатне скло, без швів зварювання; регулятори рівня подачі повітря, датчики температури, рівня рН, кисню і піногасника; управління процесами – програмне забезпечення ROSA+; перемішування – турбінна мішалка закритого типу, швидкість перемішування – 100 – 1300 об/хв, передача посівного матеріалу – стиснутим повітрям [83]
РТ-34	Реактор-змішувач для приготування композиції А для біосинтезу	1	Реактор-змішувач фірми WENZHOU L&B FLUID EQUIPMENT CO.,LTD (Китай) об’ємом 5,0 м <sup>3</sup> , габаритні розміри (мм): d = 1400; h = 2100; обладнаний електротеном, мішалкою лопатевого типу, швидкість перемішування до 100 об/хв, матеріал – нержавіюча сталь AISI-304,ASTM [84]
РП-25	Реактор-змішувач для приготування композиції В для біосинтезу	1	Реактор-змішувач фірми WENZHOU L&B FLUID EQUIPMENT CO.,LTD (Китай) об’ємом 0,5 м <sup>3</sup> , габаритні розміри (мм): d = 800; h = 1200; обладнаний паровою сорочкою, мішалкою лопатевого типу, швидкість перемішування до 100 об/хв, матеріал – нержавіюча сталь AISI-304, ASTM [84]
РТ-32	Збірник з електротеном для стерилізації піногасника	1	Збірник фірми WENZHOU L&B FLUID EQUIPMENT CO.,LTD (Китай) об’ємом 0,01 м <sup>3</sup> , габаритні розміри (мм): d = 250; h = 400 ; обладнаний електротеном, матеріал – нержавіюча сталь AISI-304,ASTM [84]
РП-29	Реактор-змішувач для приготування і стерилізації 6% розчину гідроксиду натрію	1	Реактор-змішувач фірми WENZHOU L&B FLUID EQUIPMENT CO.,LTD (Китай) об’ємом 0,01 м <sup>3</sup> , габаритні розміри (мм): d = 250; h = 400; обладнаний паровою сорочкою, мішалкою лопатевого типу, швидкість перемішування до 100 об/хв, матеріал – нержавіюча сталь AISI-316 [84]

1	2	3	4
MP-26 MP-50	Мірник для приготування розчину хлоридної кислоти	1	Мірник фірми «ЗВАРХІМПРИЛАД» моделі КІР-10 (Україна), геометричний об'єм 10 л, габаритні розміри (мм): 400x680; матеріал – нержавіюча сталь AISI-321; похибка при 20°C – 0,02% [85]
ФВ-35	Ферментер виробничий	1	Промисловий ферментер “Frings” (Німеччина) моделі Proreact-8000В геометричний об'єм 8 м <sup>3</sup> , габаритні розміри (мм): d = 2000; h = 3200; корпус – нержавіюча сталь 1.4301/1.4404, перемішувач – турбінна мішалка закритого типу зі швидкістю перемішування - 100-300 об/хв, апарат обладнаний датчиками для контролю температури, рівня рН, концентрації розчиненого кисню, рівня піни, керування процесами – контролер SIEMENS SPS із сенсорною панеллю [86]
НБ-10 НБ-36 НБ-37 НБ-39 НБ-54	Насос відцентровий безсальникового типу	3	Насос відцентровий безсальникового типу з магнітною муфтою “Vaterpass” моделі JS, продуктивність – до 100 м <sup>3</sup> /год, робочий тиск – до 0,7 МПа, матеріал – нержавіюча сталь, шланги типу PFA / ETFE [87]
ЗБ-38	Збірник для культуральної рідини		Збірник фірми WENZHOU L&B FLUID EQUIPMENT CO.,LTD (країна-виробник – Китай) об'ємом 5,0 м <sup>3</sup> , габаритні розміри (мм): d = 1400; h = 2100; матеріал – нержавіюча сталь AISI-304, ASTM [84]
ЦО-40  ЦО-45	Центрифуга осаджувальна безперервної дії		Центрифуга-декантер фірми Flottweg серії Z моделі С7Е (країна-виробник – Німеччина), продуктивність до 10 м <sup>3</sup> /год, діаметр резервуара d = 2,6 м, max швидкість обертання ротора w = 3000 об/хв, диференційна швидкість – 45 с <sup>-1</sup> , габаритні розміри (м) : 2,6×0,76×2,3, матеріал – корозіє- і кислотостійка нержавіюча сталь марки 4.4571 с [59] Пілотна осаджувальна центрифуга фірми Lemitec (країна-виробник – Німеччина) моделі MD100-Sn, продуктивність – до 200 л/год, густина часток – до 5 г/мл, діаметр барабану – 100 мм, максимальна швидкість – 10 000 об/хв, габаритні розміри (мм) = 1200x600x1600, матеріал – нержавіюча сталь DIN 1.4404/ 316 L

НШ-41 НШ-44 НШ-46 НШ-48 НШ-51	Насос шестиреначастий		Насос шестиреначастий низького тиску фірми Tarflo серії PTL09 (країна-виробник - Швеція), продуктивність до 20-80 л/год, частота обертання – 20-80 об/хв, відносний тиск – до 4 бар, тиск на вході – до 4 бар, тиск на виході – до 0,6 бар, матеріал – нержавіюча сталь, шланги – NBR Food [88]
P3-42	Реактор-змішувач для приготування 50% розчину лугу		Реактор-змішувач фірми WENZHOU L&B FLUID EQUIPMENT CO.,LTD (Китай) об'ємом 0,01 м <sup>3</sup> , габаритні розміри (мм): d = 250; h = 400; обладнаний, мішалкою лопатевого типу, швидкість перемішування до 100 об/хв, матеріал – нержавіюча сталь
P3-43	Реактор-змішувач для дезінтеграції клітин і екстракції натаміцину		Реактор-змішувач фірми WENZHOU L&B FLUID EQUIPMENT CO.,LTD (Китай) об'ємом 0,16 м <sup>3</sup> , габаритні розміри (мм): d = 600; h = 1200; обладнаний паровою сорочкою, мішалкою лопатевого типу, швидкість перемішування до 200 об/хв, матеріал – нержавіюча сталь AISI-316 [84]
УФ-47	Установка перехресної фільтрації		Модульна пілотна установка перехресної фільтрації для мікро- і ультрафільтрації фірми Alfa Laval моделі PilotUnit Multi (країна-виробник – Швеція), робочий об'єм – до 500 л; продуктивність – до 200 л/год, площа фільтрування до 15 м <sup>2</sup> ; тиск – 0-40 бар; робоча температура – 1-80 С; потужність – 27 кВт; встановлено мембрани типу P&F M39, Spiral 3.8", матеріал – нержавіюча сталь марки 4.4571 [63]
P3-49	Реактор-змішувач для осадження натаміцину		Реактор-змішувач фірми WENZHOU L&B FLUID EQUIPMENT CO.,LTD (Китай) об'ємом 0,04 м <sup>3</sup> , габаритні розміри (мм): d = 400; h = 600; обладнаний мішалкою лопатевого типу, швидкість перемішування до 50 об/хв, матеріал – нержавіюча сталь AISI-316 [84]

1	2	3	4
НФ-52	Нутч-фільтр	1	Нутч-фільтр фірми Buschiglas (країна-виробник Швейцарія), робочий об'єм – до 30 л; робочий тиск -1,0...+1,0 бар, розмір пор фільтрувального елемента 10 мкм, робоча температура – -60...+200 °С, матеріал резервуара – боросилікатне скло, з'єднувальні елементи марки PTFE, PFA, ETFE [64]
СП-53	Сушарка з псевдозрідженим шаром	1	Сушарки з псевдозрідженим шаром фірми “STE Тесрharm” (країна-виробник – Іспанія), продуктивність – 30 л/год, відповідає вимогам GMP, контролер із сенсорною панеллю типу PCL + HMI, матеріал – AISI 316L [65]
ВЦ-55	Вентилятор	1	Вентилятор радіальний відцентровий ВАНСІVAN АОРВ 180-80 (країна-виробник – Туреччина), потужність – 605 Вт, продуктивність – 1200 м <sup>3</sup> /год, частота обертання – 2750 об/хв, тиск – 800 Па.
КФ-56	Калорифер	1	Паровий калорифер КПСК-2-1 (країна-виробник – Україна), теплоносій – суха насичена пара з робочим тиском $P = 0,6$ МПа; максимальна температура нагрівання – 190 °С; масова швидкість повітря у потоці – 1,5 кг/ м <sup>2</sup> ; площа поверхні теплообміну – 6,7 м <sup>2</sup> [90]
УП-57	Фасувально-пакувальний апарат		Фасувально-пакувальний апарат моделі НР150 (країна-виробник – Італія), тип пакету – 3- або 4-шовне саше, продуктивність – 50 уп/хв, дозування – 50-150 г, ширина пакету (мм) – 130, довжина пакету (мм) – 190, потужність – 1,8 Вт, габаритні розміри (мм) – 700x900x1650, матеріал, який контактує з продуктом – нержавіюча сталь марки

## РОЗДІЛ 8. Опис технологічної схеми виробництва натаміцину

Технологічна схема виробництва натаміцину включає допоміжні роботи (санітарна підготовка виробництва, приготування і стерилізація поживного середовища для одержання посівного матеріалу, приготування і стерилізація поживного середовища для біосинтезу натаміцину, приготування і стерилізація розчинів для титрування, підготовка і стерилізація піногасника) та технологічні процеси (одержання посівного матеріалу, біосинтез натаміцину, відділення біомаси, дезінтеграція клітин, екстракція натаміцину, центрифугування екстракту, концентрування і очищення екстракту натаміцину, осадження натаміцину, відділення кристалів натаміцину, сушіння кристалів натаміцину), стадію пакування, стадію переробки відходів (регенерація ізопропанолу) та стадію знешкодження відходів.

### ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

#### ДР 1.1. Підготовка миючих і дезінфікуючих розчинів

##### ДР 1.1.1. Приготування розчину «Дезекон»

Для приготування 10 л 0,2% робочого розчину «Дезекону» (Кх 1.1.1.) мірним циліндром відміряють 20 мл засобу. У промарковану тару місткістю 10 л додають відміряний об'єм засобу і 10 л води, розчин перемішують.

##### ДР 1.1.2. Приготування розчину «Велідез Ензим»

Для приготування 10 л 0,1% робочого розчину «Велідез Ензиму» (Кх 1.1.2.) мірним циліндром відміряють 10 мл засобу. У промарковану тару місткістю 10 л додають відміряний об'єм засобу і 10 л води, розчин перемішують.

##### ДР 1.1.3. Приготування розчину «Бландіас-А Форте»

Для приготування 2,7 м<sup>3</sup> 0,15% робочого розчину «Бландіас-А Форте» (Кх 1.1.3.) у апарат для СІР-мийки (СІР-8) через об'ємно-ваговий дозатор (ДЗ-14) подають 4 л засобу, відкривають вентиль подачі води водопровідної і подають 2700 л води. Для кращого розчинення розчин нагрівають до  $t = 45\text{ }^{\circ}\text{C}$  шляхом подачі глухої пари у сорочку апарата (Кт 1.1.3.). Вмикають мішалку і проводять перемішування розчину

					<b>НУХТ БТЕК 04.03.09 КР ПЗ</b>			
Змн.	Арк.	№ документа	Підпис	Дата				
Розробив		Цапко			РОЗДІЛ 8. Опис технологічної схеми виробництва натаміцину	Літера	Арк.	Аркушів
Консульт.							125	17
Керівник		Красінько				Кафедра БТМ		
Н. контр.								
Зав. каф.		Пирог						

протягом 10 хв. Готовий робочий розчин перекачують насосом (Н-9) до резервуарів обладнання для миття.

### *ДР 1.2. Підготовка виробничих приміщень*

#### *ДР 1.2.1. Щоденне прибирання*

Щоденне прибирання приміщень включає миття підлоги, протирання поверхонь устаткування розчином «Дезекон» (від ДР 1.2.1) з часом експозиції мийного засобу 20 хв. Після проведення прибирання перевіряють чистоту приміщення на відсутність бруду і пилу (Кт 1.2.1.)

#### *ДР 1.2.2. Генеральне прибирання*

Генеральне прибирання включає обробку розчином «Велідез Ензим» (від ДР 1.2.2.) поверхонь усього обладнання, інвентаря, комунікацій, стелі, стін, повітропроводів, вікон і підвіконь, дверей кожні 5 днів з часом експозиції мийного засобу 30 хв. Після проведення прибирання перевіряють чистоту приміщення на відсутність бруду і пилу (Кт 1.2.2.)

### *ДР 1.3. Підготовка виробничого обладнання*

#### *ДР 1.3.1. Миття обладнання*

Циркуляційне миття резервуарів виробничого обладнання здійснюється за допомогою СІР-мийки (СІР-8) шляхом подачі розчину «Бландіас-А Форте» (від ДР 1.2.3.) через розпилюючі форсунки у резервуар апаратів. Миття апаратів проводять протягом 1,5 год (Кт 1.4.1.). Для видалення залишків мийного розчину обладнання ополіскують водою питною. Після проведення операції обладнання перевіряють на відсутність бруду і залишків середовищ (Кт 1.3.1.).

#### *ДР 1.3.2. Технічний огляд*

Технічний огляд обладнання проводять з метою перевірки загальної цілісності обладнання і цілісності мішалок, виявлення будь-яких дефектів і сторонніх об'єктів у резервуарах, виявлення порушень цілісності комунікацій і запірної арматури (Кт 1.3.2). У разі виявлення неущільнень здійснюють підтягування різьбових з'єднань.

#### *ДР 1.3.3. Перевірка на герметичність*

Для перевірки цілісності запірно-регулюючої арматури, у апараті, який досліджується, закривають усю запірну арматуру, подають фреон-12. У сорочку апарату подають глуху пару. Показом манометра регулюють тиск у апараті до

$P = 0,02$  МПа (Кт 1.3.4.). У разі наявності порушень герметичності апаратури, пара фреону-12 проникає через неущільнення, що виявляється при наближенні щупу течієшукача до місця витоку.

#### *ДР 1.3.4. Стерилізація обладнання*

Стерилізацію обладнання здійснюють шляхом подачі гострої пари. Після досягнення тиску усередині апарату  $0,15$  МПа за показниками манометра починають відлік часу стерилізації – 1 год (Кт 1.3.4.).

### **ДР 2. Підготовка повітря**

#### *ДР 2.1 Підготовка аераційного повітря*

##### *ДР 2.1.1. Забір атмосферного повітря*

Забір атмосферного повітря здійснюється через повітрязабірник на висоті не менше  $30$  м від поверхні землі. (ПЗ-1) (Кт 2.1.1.).

##### *ДР 2.1.2. Очищення повітря від пилу і механічних часток*

Повітря очищується від пилу і механічних часток на фільтрах грубої очистки (Ф-2) до ефективності очищення  $E=90\%$ . Перепад тисків на вході і виході повітря з фільтру перевіряють за показами манометра (Кт 2.1.2.)

##### *ДР 2.1.3. Компресування повітря*

Очищене від пилу і механічних часток повітря (від ДР 2.2) стискають у компресорі (К-3) до тиску  $P = 0,35-0,5$  МПа за показами манометра (Кт 2.1.3.).

##### *ДР 2.1.4. Охолодження повітря*

Стиснуте повітря (від ДР 2.3.) охолоджують до  $t = 20-40$  °С у теплообміннику-охолоджувачі (ТО-4) (Кт 2.1.4.).

##### *ДР 2.1.5. Видалення зайвої вологи*

Охолоджене повітря (від ДР 2.4.) нормалізують за вмістом вологи шляхом видалення зайвої вологи у ресивері (РВ-5) до вмісту вологи  $W = 60\%$  (Кт 2.1.5.).

##### *ДР 2.1.6. Нагрівання повітря*

Кондиційоване повітря (від ДР 2.5.) нагрівають до оптимальної температури  $t = 35-40$  °С у теплообміннику (Т-6) (Кт 2.1.6.).

##### *ДР 2.1.7. Очищення повітря в головному фільтрі*

Нагріте кондиційоване повітря (від ДР 2.6.) очищується у головному фільтрі (ФГ-7) до ефективності очищення  $E=99,996\%$ . Розмір і концентрацію завислих

частинок у відфільтрованому повітрі автоматично реєструють портативним детектором. Перепад тисків на вході і виході повітря з фільтру перевіряють за показами манометра (Кт 2.1.7)

#### *ДР 2.1.8. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі*

Перед подачею в інокулятори і ферментер, повітря (від ДР 2.6.) очищується у індивідуальному фільтрі (ФІ-13, ФІ-17, ФІ-21, ФІ-30) до ефективності очищення  $E=99,999\%$ . Розмір і концентрацію завислих частинок у відфільтрованому повітрі автоматично реєструють портативним детектором (Кт 2.1.8.)

#### *ДР 2.2. Підготовка сушильного агента*

##### *ДР 2.2.1. Очищення і нагрівання сушильного повітря*

Атмосферне повітря забирається вентилятором (ВТ-54) і очищується від пилу і механічних часток на фільтрах грубої очистки (ФП-53) до ефективності очищення  $E=90\%$ . Перепад тисків на вході і виході повітря з фільтру перевіряють за показами манометра. Попередньо очищене повітря направляється до калориферу (КФ-55) і нагрівається до температури  $t = 90\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Кт 2.2.1.). Очищене і нагріте повітря подається під решітку сушарки (СП-51) для створення псевдозрідженого шару.

### **ДР 3. Приготування розчинів для титрування**

#### *ДР 3.1. Приготування і стерилізація 6% розчину гідроксиду натрію*

Для приготування 9 л 6% розчину гідроксиду натрію через об'ємно-ваговий дозатор (ДЗ-27) зважують 550 г гідроксиду натрію і завантажують у збірник (РП-29). Відкривають вентиль подачі питної води і подають 9 л води. Вмикають мішалку і проводять перемішування розчину протягом 10 хв. Розчин лугу стерилізують у реакторі-змішувачі шляхом подачі гострої пари при температурі  $120^{\circ}\text{C}$  і тиску 0,075 МПа протягом 20 хвилин. (Кх, Км 3.1).

Для приготування 1 л 6% розчину гідроксиду натрію в колбах на технічних вагах у емальованій або скляній посудині зважують 60 г гідроксиду натрію і поміщають наважку в конічну колбу об'ємом 1 л. 1 л дистильованої води відміряють за допомогою мірного циліндру об'ємом 1 л. У колбу з наважкою гідроксиду натрію додають 500 мл води, вміст колби ретельно перемішують скляною паличкою. Додають решту 500 мл води, вміст колби перемішують, колбу закривають ватно-

марлевою пробкою і стерилізують у автоклаві (АВ-11) при температурі 120 °С і тиску 0,075 МПа протягом 20 хвилин.

#### *ДР 3.2. Приготування 6% розчину хлоридної кислоти*

Розчин хлоридної кислоти готують безпосередньо перед подачею на титрування. 6% розчин хлоридної кислоти готують з концентрованого розчину хлоридної кислоти (36,5%). Для приготування 9 л 6% розчину хлоридної кислоти у мірник (МР-26) подають 8,9 л води питної. Вмикають електротен і нагрівають воду до 120° С протягом 20 хвилин. Після стерилізації у сорочку апарату подають воду холодну технічну для охолодження простерилізованої води до температури 15-20° С. З балону з армованими шлангами подають 125 мл 36% розчину хлоридної кислоти до загального об'єму розчину 9 л.

Для приготування 1 л 6% розчину хлоридної кислоти у колбах відміряють 1 л стерильної води за допомогою мірного циліндра об'ємом 1 л і 15 мл 36% розчину хлоридної кислоти за допомогою мірного циліндра об'ємом 25 мл. У конічну колбу об'ємом 1 л додають стерильну воду і поступово додають 36% розчин хлоридної кислоти. Отриманий розчин стерилізації не потребує.

#### *ДР 3.3 Приготування 50% розчину гідроксиду натрію*

Для приготування 5 л 50% розчину гідроксиду натрію на технічних вагах у скляній або емальованій посудині зважують 2,5 кг гідроксиду натрію. Через воронку збірника вручну завантажують наважку луку. Відкривають вентиль подачі питної води і подають у збірник (РЗ-42) 5 л води. Вмикають мішалку і проводять перемішування розчину протягом 10 хв (Кт, Кх 3.3).

#### *ДР 3.4 Приготування 5М розчину хлоридної кислоти*

Розчин хлоридної кислоти готують безпосередньо перед подачею на титрування. Для приготування 5 л 5М розчину хлоридної кислоти у мірник (МР-49) подають 2,5 л води питної. З балону з армованими шлангами подають по мірнику подають 2,3 л 34% розчину концентрованої хлоридної кислоти до загального об'єму розчину 9 л. Розчин доводять до мітки мірника 5 л подачею води (Кх 3.4).

#### **ДР 4. Підготовка і стерилізація піногасника**

##### *ДР 4.1. Стерилізація піногасника «Struktol J673A»*

Через об'ємно-ваговий дозатор (ДЗ-31) подають 8 л піногасника у збірник з електротеном (РТ-29). Піногасник стерилізують шляхом нагрівання середовища до температури 131°C протягом 40 хв (Кт, Км 4.1.). Охолодження простерилізованого піногасника здійснюють шляхом подачі води технічної холодної у сорочку апарату. Простерилізований і охолоджений піногасник подається самопливом до виробничого ферментера (ФВ-35).

#### **ДР 5. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту**

Згідно з розрахунками табл. 6.6 необхідно отримати 400 мл посівного матеріалу (поз. 3.1.). Об'єм нестерильного поживного середовища для отримання такої кількості посівного матеріалу становить 370 мл (поз. 2.1.). Загальна кількість води, яку потрібно додати для приготування середовища, становить 360 мл (поз. 1.4.).

##### *ДР 5.1 Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках*

###### *ДР 5.1.1. Приготування і стерилізація композиції А*

На технічних вагах зважують 1,5 г глюкози і 1,5 г дріжджового екстракту. За допомогою мірного циліндра об'ємом 10 мл відміряють 3,7 мл солодового екстракту. У колбу на 0,75 л спершу поміщають наважку солодового екстракту, змиваючи її 10 мл теплої води. До колби з солодовим екстрактом додають наважки глюкози і дріжджового екстракту, і додають 350 мл теплої води, перемішують до отримання гомогенного розчину. Колбу закривають ватно-марлевими пробками і стерилізують у автоклаві (АВ-11) при температурі 112° С і тиску 0,05 МПа протягом 30 хвилин (Кт, Км 5.1.1.).

Розчин А: 360 мл води + 1,5 г глюкози + 1,5 г дріжджового екстракту + 3,7 мл солодового екстракту  $\approx$  370 мл.

##### *ДР 5.2 Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 0,01 м<sup>3</sup>*

Згідно з розрахунками табл. 6.6 необхідно отримати 4 л посівного матеріалу. Об'єм нестерильного поживного середовища для отримання такої кількості посівного

матеріалу становить 4,1 л (поз. 5.1.). Загальна кількість води, яку потрібно додати для приготування середовища, становить 4,0 л (поз. 4.4.).

#### *ДР 5.2.1. Приготування і стерилізація композиції А*

На технічних вагах зважують 17,0 г глюкози і 17,0 г дріжджового екстракту. За допомогою мірного циліндра об'ємом 50 мл відміряють 41,0 мл солодового екстракту. У колбу на 5,0 л спершу поміщають наважку солодового екстракту, змиваючи її 200 мл теплої води. До колби з солодовим екстрактом додають наважки глюкози і дріжджового екстракту, і додають 3,8 л води, перемішують до отримання гомогенного розчину. Колбу закривають ватно-марлевими пробками і стерилізують у автоклаві (АВ-11) при температурі  $t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$  і тиску  $P = 0,05\text{ МПа}$  протягом 30 хвилин (Кт, Км 5.2.1.). Стерильне поживне середовище подають у малий інокулятор (ІН-14) за допомогою балону з армованими шлангами і конекторами.

Розчин А: 4,0 л води + 17,0 г глюкози + 17,0 г дріжджового екстракту + 41,0 мл солодового екстракту = 4,1 л.

*ДР 5.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 0,1 м<sup>3</sup>*

Згідно з розрахунками табл. 6.6 необхідно отримати 30,85 л посівного матеріалу (поз. 9.1). Об'єм нестерильного поживного середовища для отримання такої кількості посівного матеріалу становить 26,64 л (поз. 8.1.). Загальна кількість води, яку потрібно додати для приготування середовища, становить 26,0 л (поз. 7.4.).

#### *ДР 5.3.1. Приготування і стерилізація композиції А*

Через об'ємно-ваговий дозатор (ДЗ-15) зважують і завантажують 140,0 г глюкози, 140,0 г дріжджового екстракту, 360 мл солодового екстракту до реактора-змішувача об'ємом 0,04 м<sup>3</sup> (РТ-16). Відкривають вентиль подачі води питної і подають 26,0 л води. Середовище підігрівають до  $t = 30\text{-}40\text{ }^{\circ}\text{C}$  за рахунок роботи електротена для покращення розчинення компонентів середовища. Вмикають мішалку і перемішують компоненти протягом 10-15 хвилин. Отриманий розчин зі збірника подають самопливом в попередньо простерилізований інокулятор (ІН-18) об'ємом 0,1 м<sup>3</sup>. Починають процес стерилізації середовища шляхом подачі гострої пари через барботер. Після досягнення тиску всередині апарату 0,05 МПа, який контролюють за показниками манометра (Кт 5.3.1), починають відлік часу, необхідного для

стерилізації середовища при температурі 112 °С. Загальний час стерилізації композиції складає 30 хвилин (Кт, Км 5.3.1.).

Розчин А: 26,0 л води + 0,14 кг глюкози + 0,14 кг дріжджового екстракту + 0,36 л солодового екстракту = 26,64 л.

*ДР 5.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 1,0 м<sup>3</sup>*

Згідно з розрахунками табл. 6.6 необхідно отримати 352,0 л посівного матеріалу (поз. 12.1). Об'єм нестерильного поживного середовища для отримання такої кількості посівного матеріалу становить 324,4 л (поз. 11.1.). Загальна кількість води, яку потрібно додати для приготування середовища, становить 318,0 л (поз. 10.4.).

*ДР 5.4.1. Приготування і стерилізація композиції А*

Через об'ємно-ваговий дозатор (ДЗ-19) зважують і завантажують 1,4 кг глюкози, 1,4 кг дріжджового екстракту, 3,6 л солодового екстракту до реактора-змішувача об'ємом 0,5 м<sup>3</sup> (РТ-20). Відкривають вентиль подачі води питної і подають 318,0 л води. Середовище підігрівають до  $t = 30-40$  °С за рахунок роботи електротену для покращення розчинення компонентів середовища. Вмикають мішалку і перемішують компоненти протягом 10-15 хвилин. Отриманий розчин зі збірника перекачують самопливом в попередньо простерилізований інокулятор (ІН-22) об'ємом 1,0 м<sup>3</sup>. Починають процес стерилізації середовища шляхом подачі гострої пари через барботер. Після досягнення тиску всередині апарату 0,05 МПа, який контролюють за показниками манометра (Кт 5.4.1), починають відлік часу, необхідного для стерилізації середовища при температурі 112 °С. Загальний час стерилізації композиції складає 30 хвилин не(Кт, Км 5.4.1).

Розчин А: 318,0 л води + 1,4 кг глюкози + 1,4 кг дріжджового екстракту + 3,6 л солодового екстракту = 324,4 л.

**ДР 6. Приготування і стерилізація поживного середовища для біосинтезу натаміцину**

Згідно з розрахунками табл. 6.6 необхідно отримати 3,6 м<sup>3</sup> культуральної рідини. Об'єм нестерильного поживного середовища для отримання такої кількості посівного матеріалу становить 3298,5 л (поз. 16.1.). Загальна кількість води, яку потрібно додати для приготування середовища, становить 3178,0 л (поз. 15.8.).

### *ДР 6.1. Приготування і стерилізація композиції А*

Через об'ємно-ваговий дозатор (ДЗ-33) зважують і завантажують 72,8 кг глюкози, 7,3 кг дріжджового екстракту, 17,3 кг м'ясного екстракту, 1,8 кг аспарагіну до реактора-змішувача об'ємом 5,0 м<sup>3</sup> (РТ-26). Відкривають вентиль подачі води питної і подають 3165 л води. Середовище підігривають до  $t = 30-40$  °С за рахунок роботи електротена для покращення розчинення компонентів середовища. Вмикають мішалку і перемішують компоненти протягом 10-15 хвилин. Отриманий розчин зі збірника перекачують за допомогою відцентрового насосу (Н-27) в попередньо простерилізований виробничий ферментер (ФВ-35) об'ємом 8,0 м<sup>3</sup>. Починають процес стерилізації середовища шляхом подачі гострої пари через барботер. Після досягнення тиску всередині апарату 0,05 МПа, який контролюють за показниками манометра (Кт 5.6.), починають відлік часу, необхідного для стерилізації середовища при температурі 112 °С. Загальний час стерилізації композиції складає 30 хвилин.

Розчин А: 3165 л води + 72,8 кг глюкози + 7,3 кг дріжджового екстракту + 7,3 кг м'ясного екстракту + 1,8 кг аспарагіну = 3 255 л.

### *ДР 6.2 Приготування і стерилізація композиції Б*

На технічних вагах зважують 180 г монофосфату калію. У засівну колбу об'ємом 2 л поміщають наважку солі, додають 1 л питної води, поміщають на водяну баню для покращення показників розчинення солі і ретельно перемішують. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують у автоклаві (АВ-11) при температурі 131 °С і тиску 0,15 МПа протягом 40 хвилин (Кт, Км 6.2).

Розчин Б: 1 л води + 0,18 г монофосфату калію  $\approx$  1 л.

### *ДР 6.3. Приготування і стерилізація композиції В*

Через об'ємно-ваговий дозатор (ДЗ-24) зважують і завантажують 1,8 кг пропіонату натрію і 6,4 кг ацетату натрію до реактора-змішувача (РП-25). Відкривають вентиль подачі води питної і подають 267 л води. Вмикають мішалку, здійснюють перемішування розчину протягом 10 хв. Починають процес стерилізації середовища шляхом подачі гострої пари. Після досягнення тиску всередині апарата 0,15 МПа, який контролюють за показниками манометра (Кт 6.3.), починають відлік часу, необхідного для стерилізації середовища при температурі 131 °С. Загальний час стерилізації композиції складає 40 хвилин. Після стерилізації композицію

охолоджують шляхом подання води холодної технічної в сорочку апарата. Простерилізовану і охолоджену композицію за допомогою насосу (НБ-54) перекачують у виробничий ферментер (ФВ-35).

Розчин В: 267 л води + 1,8 кг пропіонату натрію +6,4 кг ацетату натрію = 275 л.

## **ТП 7. Підготовка посівного матеріалу**

*ТП 7.1. Активація колекційної ліофілізованої культури Streptomyces natalensis NRRL2651*

Штам *Streptomyces natalensis* NRRL2651 зберігають у ліофілізованому стані (колекція Leibniz-Intitut DSMZ). В асептичних умовах із пробірки зі стерильним солодово-дріжджовим бульйоном (ISP №2) об'ємом 5,0-6,0 мл відбирають 0,5-1,0 мл середовища за допомогою стерильної піпетки на 1,0 мл і переносять у ампулу з ліофілізованим штамом. В асептичних умовах стерильною піпеткою 0,5-1,0 мл суспензії клітин знову до пробірки з бульйоном, ретельно перемішують. Контроль за чистотою культури здійснюють мікроскопіюванням (Км 7.1.).

*ТП 7.2. Відновлення колекційної культури на агаризованому середовищі*

В асептичних умовах 3-5 крапель суспензії клітин (від ТП 7.1) стерильною піпеткою на 1,0 мл переносять у чашки Петрі з солодово-дріжджовим агаром (ISP №2). Для отримання ізольованих колоній посівний матеріал розподіляють по поверхні агаризованого середовища за допомогою бактеріологічної петлі технікою «виснаженого штриха». Чашки Петрі інкубують при температурі 26 °С протягом 96 год (Кт 7.2). Контроль за чистотою культури здійснюють мікроскопіюванням(Км 7.2).

*ТП 7.3. Вирощування культури у пробірках з рідким поживним середовищем*

Після закінчення інкубації культури (від ТП 7.2.), із ізольованих колоній на агаризованому середовищі бактеріологічною петлею відбирають клітинну масу для засіву пробірок зі стерильним солодово-дріжджовим бульйоном (ISP №2). Інкубування посівів здійснюють протягом 4-7 діб год при температурі 30°С (Кт 7.3) до настання активної споруляції культури. Контроль за чистотою культури здійснюють мікроскопіюванням (Км 7.3). Після закінчення інкубації отриманий посівний матеріал використовуються для засіву колб на качалці.

#### *ТП 7.4. Вирощування культури в колбах на качалці*

400 мл простерилізованого поживного середовища для вирощування посівного матеріалу (від ДР 5.1.1) в асептичних умовах розливають по 200,0 мл в 2 стерильні колби об'ємом 0,75 л. Для засіву однієї колби використовують 18-20 мл посівного матеріалу (від ТП 7.3.) Колби інкубують при температурі 30° С на качалці при 200 об/хв впродовж 96 год (Кт 7.4). Після закінчення культивування вміст качалочних колб у асептичних умовах (у боксі) зливають у засівну колбу. Вміст засівної колби біля полум'я факела переносять до засівного пристрою (ЗП-12) для малого інокулятора (ІН-14).

#### *ТП 7.5. Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 0,01 м<sup>3</sup>*

Для вирощування 4,5 л посівного матеріалу у інокуляторі об'ємом 0,01 м<sup>3</sup> (ІН-14), у апарат за допомогою стерильного балону з армованими шлангами подають 4,1 л стерильного поживного середовища (від ДР 5.2.1.). За допомогою засівного пристрою (ЗП-12) вносять посівний матеріал (від ТП 7.4). Культивування проводять при температурі 30 °С, швидкості перемішування 200 обертів/хв тривалістю 96 год (Кт 7.5). За сигналом рН-метра у середовище автоматично подається розчин простерилізованого 6% стерильного розчину гідроксиду натрію або 6% стерильного розчину хлоридної кислоти зі стерильних балонів з армованими шлангами (Кх 7.5). За сигналом датчика піноутворення у культуральну рідину автоматично подається простерилізований піногасник з стерильного балону з армованими шлангами (Кт 7.5.). Після завершення процесу культивування посівний матеріал надходить через стерильну трубу перетискування до наступної стадії масштабування посівного матеріалу до ІН-19 (до ТП 7.6 ).

#### *ТП 7.6. Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 0,1 м<sup>3</sup>*

Для вирощування 30,85 л посівного матеріалу у інокуляторі об'ємом 0,1 м<sup>3</sup> (ІН-18), який містить 26,64 л простерилізованого поживного середовища (від ДР 5.3.1), до апарату за допомогою стерильної труби перетискування подають 4,5 л посівного матеріалу (від ТП 7.5 ). Культивування проводять при температурі 30° С, швидкості перемішування 200 обертів/хв протягом 96 год (Кт 7.6). За сигналом рН-метра у середовище автоматично подається розчин простерилізованого 6% стерильного розчину гідроксиду натрію або 6% стерильного розчину хлоридної кислоти зі

стерильних балонів з армованими шлангами (Кх 7.6). За сигналом датчика піноутворення у культуральну рідину автоматично подається простерилізований піногасник з стерильного балону з армованими шлангами (Кт 7.6.). Після завершення процесу культивування посівний матеріал передають через стерильну трубу перетискування до наступної стадії масштабування посівного матеріалу до ПА-24 (до ТП 7.6.).

#### *ТП 7.7. Вирощування культури в посівному апараті об'ємом 1,0 м<sup>3</sup>*

Для вирощування 352 л посівного матеріалу у інокуляторі об'ємом 1,0 м<sup>3</sup> (ПА-22), який містить 324,4 л простерилізованого поживного середовища (від ДР 5.4.1), до апарату за допомогою стерильної труби перетискування подають 26,64 л посівного матеріалу (від ТП 7.6.). Культивування проводять при температурі 30° С, швидкості перемішування 200 обертів/хв протягом 96 год (Кт 7.7.). За сигналом рН-метра у середовище автоматично подається розчин простерилізованого 6% стерильного розчину гідроксиду натрію або 6% стерильного розчину хлоридної кислоти зі стерильних балонів з армованими шлангами (Кх 7.7). За сигналом датчика піноутворення у культуральну рідину автоматично подається простерилізований піногасник зі стерильного балону з армованими шлангами (Кт 7.7.). Після завершення процесу культивування посівний матеріал передають через стерильну трубу перетискування до виробничого ферментера (ФВ-35).

### **ТП 8. Біосинтез**

#### *ТП. 8.1 Виробниче культивування у ферментері об'ємом 8 м<sup>3</sup>*

У виробничий ферментер (ФВ-35) з попередньо простерилізованою і охолодженою до температури 29±1 °С композицією А (від ДР 6.1.) об'ємом 3255 л у асептичних умовах за допомогою стерильного балону з армованими шлангами подають 1 л стерильної композиції Б (від ДР 6.2). Засів поживного середовища проводиться шляхом перетискування стерильним стисненим повітрям 352 л посівного матеріалу з посівного апарату (ПА-22) (від ТП 7.7.) через стерильну трубу до виробничого ферментера (ФВ-35). Процес біосинтезу натаміцину проводять за наступних умов: температура 29 °С, швидкість перемішування – до 300 об/хв, швидкість аерації середовища стерильним повітрям – 1,0 л/ хв (Кт 8.1). За сигналом рН-метра у середовище автоматично самопливом подається розчин

простерилізованого 6% стерильного розчину гідроксиду натрію або 6% стерильного розчину хлоридної кислоти (від ДР 3.1, ДР 3.2.) (Кх 8.1). За сигналом датчика піноутворення у культуральну рідину автоматично самопливом подається простерилізований піногасник (від ДР 4.1.). У перші години культивування (до 24 год) через гребінку виробничого ферментера за допомогою насосу (НБ-54) перекачують 275 л стерильної композиції В (від ДР 6.3).

Протягом культивування кожні 8 год здійснюють відбір проб в асептичних умовах (Кт 8.1) для контролю вмісту натаміцину у культуральній рідині хроматографічним методом, контролю концентрації біомаси методом висушування до постійної сухої маси. Загальна тривалість культивування становить 84 год. Культуру вирощують до стаціонарної фази росту, у якій досягається максимальна концентрація натаміцину 3,0 г/л [7]. По досягненні цієї концентрації цільового продукту культивування припиняють.

## **ТП 9. Відділення біомаси**

### *ТП 9.1 Центрифугування культуральної рідини*

Культуральна рідина зі збірника (ЗБ-38) за допомогою насосу (НБ-39) надходить у завантажувальну зону шнека через центральну трубу осаджувальної центрифуги (ЦО-40). Частота обертання барабану становить 2000 об/хв, час роботи – 22 хв (Кт 9.1).

Отриманий вологий осад під впливом відцентрової сили надходить у нерухому камеру циліндричної частини барабана і перекачується за допомогою насосу (НШ-41) до збірника (РЗ-43) до стадії дезінтеграції клітин (ТП 10.1).

Відділена від біомаси культуральна рідина стікає до циліндричної частини барабана і відправляється на стадію знешкодження рідких відходів (ЗВ 17.2).

## **ТП 10. Дезінтеграція клітин**

### *ТП 10.1 Теплова обробка клітинної суспензії*

Клітинну суспензію від ТП 9.1 перекачують за допомогою насосу (НШ-41) у збірник (РЗ-43). У сорочку реактора подають глуху пару і нагрівають суспензію до температури 45 °С. Суспензію витримують при заданій температурі 3 год (Кт 10.1).

Вмикають мішалку, задають швидкість перемішування – 200 об/хв. У дезінтеграт самопливом подають 50% розчин гідроксиду натрію (від ДР 3.3) до досягнення рН середовища 9. Реакційну суміш перемішують протягом 1 год (Кт, Кх 10.1).

## **ТП 11. Виділення натаміцину**

### *ТП 11.1 Екстракція натаміцину*

До дезінтеграту клітин у збірник (РЗ-43) через об'ємно-ваговий дозатор (ДЗ-44) подають 22 л товарного ізопропілового спирту (у розрахунку співвідношення ізопропанолу до дезінтеграту 0,2:1). Для екстракції також можна використовувати регенований 98,8% безводний ізопропанол (від ПВ 16.1).

Для попередження окиснення натаміцину через об'ємно-ваговий дозатор (ДЗ-44) подать натрію еріторбат кількістю 0,5 кг. Реакційну суміш витримують протягом 2 год при постійному перемішуванні 200 об/хв (Кт 11.1). По досягненню часу мішалку вмикають.

### *ТП 11.2 Центрифугування екстракту*

Реакційна суміш з реактора (РЗ-43) за допомогою насосу (НШ-44) надходить у безперевному режимі у завантажувальну зону осаджувальної центрифуги (ЦО-45). Частота обертання барабану становить 3500 об/хв, час роботи – 69 хв (Кт 11.2). Отриманий фугат – органічний екстракт натаміцину за допомогою насосу (НШ-46) перекачують до резервуара ультрафільтраційної установки (УФ-47). Відділений осад – дезінтегат клітин, надходить у нерухому камеру циліндричної частини барабана і відправляється на стадію знешкодження твердих відходів (ЗВ 17.1).

## **ТП 12. Концентрування і очищення екстракту**

### *ТП 12.1 Ультрафільтрація екстракту*

Органічний екстракт об'ємом 79 л (від ТП 11.2) перекачують за допомогою насосу (НШ-46) до резервуара ультрафільтраційної установки з перехресним потоком (УФ-47). У процесі ультрафільтрації органічний екстракт у перехресному потоці рухається по ультрафільтраційним модулям, обладнаними напівпроникними мембранами з діаметром пор 700 кДа, за робочого тиску – 40 бар (Кт 12.1). У процесі баромембранного розділення відбувається одночасне очищення органічного екстракту натаміцину від баластних речовин і його концентрування 3 рази. 24 л концентрату натаміцину за допомогою насосу (НШ-48) перекачують до збірника (РЗ-

49) на стадію осадження натаміцину (ТП 13.1). Пермеат зливають і направляють на стадію регенерації ізопропанолу (ПВ 16.1).

### **ТП 13. Осадження натаміцину**

#### *ТП 13.1 Осадження натаміцину*

Концентрат натаміцину від ТП 12.1 за допомогою насосу (НШ-48) перекачують у реактор-змішувач (РЗ-49). У реактор при постійному перемішуванні (50 об/хв) з мірника (МР-50) самопливом подають 5М розчин хлоридної кислоти від (ДР 3.4) до досягнення рН 6,5 (Кт, Кх 13.1). Реакційну суміш витримують протягом 2 год для випадіння кристалів натаміцину в осад. По досягненню часу мішалку вимикають і перекачують суміш за допомогою насосу (НШ-51) до резервуару нутч-фільтра на стадію відділення кристалів натаміцину (ТП 13.2).

#### *ТП 13.2 Відділення кристалів натаміцину*

Реакційну суміш (від ТП 13.1) перекачують за допомогою насосу (НП-51) до резервуару нутч-фільтра (НФ-52). Відкривають вентиль подачі води питної і подають 25 л води для промивання кристалів натаміцину. За показами манометра задають і контролюють вакуумний тиск (Кт 13.2). Під вакуумом фільтрат проходить крізь пласку фільтруючу перегородку, поступає у нижню частину апарату і відправляється до стадії регенерації ізопропанолу (ПВ 16.1). Кристалічний осад, який утворюється на фільтрувальній перегородці, вібраційно вивантажується через патрубок і вручну переноситься до сушильної установки (СП-52).

### **ТП 14. Отримання сухого натаміцину**

#### *ТП 14.1 Висушування кристалів натаміцину*

Вологі кристали натаміцину (від ТП 13.2) вручну подаються у камеру сушарки з псевдозрідженим шаром (СП-53). Вологий матеріал за допомогою шнекового живильника протискається через сітку гранулятора і подається на верхню газорозподільну решітку. Попередньо підготоване повітря (від ДР 2.2.1) надходить у підрешітчатий простір апарату, псевдозріджує і висушує шар матеріалу при  $t = 90\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Кт 14.1). Висушений натаміцин переміщується до краю решітки і пересипається на другу решітку, на якій відбувається процес його охолодження. Відпрацьоване сушильне повітря направляється на стадію знешкодження відходів (ЗВ 17.3). Отриманий сухий порошок натаміцину відправляють на стадію фасування і

упакування (ПМВ 15.1). Готовий кристалічний порошок натаміцину контролюють за показниками якості: ідентифікація, рН, кількісний вміст продукту, активність (Кт, Кх 14.1).

### **ПМВ 15. Пакування, маркування, відвантаження**

#### *ПМВ 15.1 Фасування, пакування, маркування саше порошку натаміцину*

Сухий кристалічний порошок натаміцину від ТП 14.1 вручну подають у бункер фасувального апарату (УП-57). Продукт у автоматичному режимі фасується по 100 г у саше із комбінованої плівки із фольги і поліетилену і термозапаюється по чотирьом швам (Кт 15.1). Готове саше маркують із зазначенням наступної інформації: назва препарату, виробник, дата виготовлення, термін зберігання, умови зберігання.

### **ПВ 16. Переробка відходів**

#### *ПВ 16.1 Регенерація ізопропанолу*

Пермеат від ТП 12.1 і фільтрат від ТП 13.2 зливають у збірник з шаром іонообмінної смоли. У збірник додають пропіоновий альдегід (у розрахунку пропіонового альдегіду до азеотропної суміші 2:1). Вмикають мішалку і при постійному перемішуванні суміш витримують 48 год. Протягом цього часу у реакторі відбувається розшарування реакційної маси на органічний і водний шари. Суміш декантують і перекачують верхню фазу до ректифікаційної колони. Під нагрівання розчину відбувається регенерація пропіонового альдегіду, який відганяють і відбирають як дистиллят. У кубовому залишку накопичується регенерований 98,8% безводний ізопропанол, який надалі можна використовувати для процесів екстракції.

### **ЗВ 17. Знешкодження відходів**

#### *ЗВ 17.1 Знешкодження твердих відходів*

Знешкодження відпрацьованого дезінтеграту клітин (від ТП 11.2) здійснюється шляхом використання відходів у якості субстрату для вермикультивування гнійних черв'яків – *Eisenia foetida*. Відпрацьований дезінтеграт клітин змішують з 5-25% органічних добавок (деревна стружка, солома, перегній) і культивують червами *Eisenia foetida* (50-200 штук на 1 кг міцеліальної маси). Після вермикультивування відходи можна використовувати як добрива у сільському господарстві, або направляти на депонування без загрози навколишньому середовищу.

Залишки пакувальних матеріалів (від ПМВ 15.1) попередньо сортують і відправляють до пунктів прийому вторсировини.

### *ЗВ 17.2 Знешкодження рідких відходів*

Знешкодження відпрацьованих миючих розчинів (від ДР 1.3.1) та фільтрату культуральної рідини (від ТП 9.1) здійснюють в аеротенках із застосуванням поліфункціональних каталізаторів окиснення. Після очищення воду можна використовувати у технічних цілях.

### *ЗВ 17.3 Знешкодження газоповітряних відходів*

Відпрацьоване повітря (від ДР 1.3.3., ТП 7.5, 7.6, 7.7, 8.1, 14.1) за допомогою циркуляційного насосу перекачується до трьохсекційної абсорбційної камери, де воно деконтамінується водним розчином перекису водню із подальшої обробкою УФ-випромінюванням. Знешкожене відпрацьоване повітря можна надалі використовувати у біотехнологічних цілях або випускати у навколишнє середовище

## РОЗДІЛ 9. Контроль виробництва натаміцину

Під час промислового виробництва натаміцину здійснюють періодичні відбори проб для мікробіологічного контролю поживних середовищ, посівного матеріалу, культуральної рідини під час біосинтезу, а також для контролю показників росту і біосинтезу: концентрації біомаси, концентрації натаміцину. Оскільки до складу поживного середовища для біосинтезу входить глюкоза, передбачаємо специфічний метод визначення концентрації D-глюкози у культуральній рідині. Також варто врахувати, що джерелами азоту в поживному середовищі для біосинтезу є речовини невизначеного складу, і тому визначення концентрації азоту у середовищі не є раціональним. Для проведення контролю необхідно забезпечити асептичні умови відбору проб з апаратів для попередження ризиків контамінації культуральної рідини сторонньою мікрофлорою.

Карту постадійного контролю біосинтезу натаміцину наведено у табл. 9.1.

### 9.1 Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль здійснюють для контролю стерильності поживного середовища для вирощування посівного матеріалу і поживного середовища для біосинтезу цільового продукту, а також для виявлення сторонньої мікробіоти у посівному матеріалі і культуральній рідині під час біосинтезу.

#### 9.1.1. Мікробіологічний контроль стерильності поживних середовищ

Мікробіологічний контроль стерильності поживних середовищ здійснюють шляхом розсівання проби простерилізованого поживного середовища для вирощування інокуляту і біосинтезу на чашки Петрі з відповідним агаризованим поживним середовищем: СА – для виявлення грибів і дріжджів і МПА – для виявлення бактерій.

Посіви здійснюють шляхом відбору стерильною піпеткою 0,1 мл з об'єма проби простерилізованого поживного середовища і нанесення її на поверхню відповідного поживного середовища. Внесену пробу рівномірно розподіляють по

Змн.	Арк.	№ документа	Підпис	Дата	НУХТ БТЕК 04.03.09 КР ПЗ			
Розробив		Цапко			РОЗДІЛ 9. Контроль виробництва натаміцину	Літера	Арк.	Аркушів
Консульт.							142	22
Керівник		Красінько				Кафедра БТМ		
Н. контр.								
Зав. каф.		Пирог						

поверхні середовища за допомогою стерильної бактеріологічної петлі або стерильного шпателя Дригальського. Чашки з посівами завертають у папір і поміщають у термостат для інкубації при температурі 32-34 °С протягом 1-2 діб для МПА та при температурі 24-26 °С протягом 3-5 діб для СА. На поверхні поживних середовищ візуально визначають відсутність ознак росту мікроорганізмів.

### **9.1.2. Мікробіологічний контроль посівного матеріалу і культуральної рідини**

Мікробіологічний контроль посівного матеріалу і культуральної рідини можна здійснювати наступним методом: прямим висівом на агаризоване середовище технікою «виснаженого штриха» для виділення ізольованих колоній із наступним мікроскопіюванням виділених колоній.

*Підготовка чашок Петрі.* У попередньо простерилізовані в сухожаровій шафі чашки Петрі розливають по 20-30 мл розплавлених на киплячій водяній бані солодово-дріжджовий агар (ISP №2). Чашки залишають на рівній поверхні для рівномірного застигання агару і витримують протягом 2-3 діб при температурі 30 °С кришками донизу. Для маркування на зворотній стороні чашки Петрі маркером рисують букву Т для розділення чашки на три сектори.

*Виконання посівів технікою «виснаженого штриха».* У стерильну пробірку об'ємом 10 мл у асептичних умовах відбирають 1 мл інокуляту або культуральної рідини. Бактеріологічну петлю стерилізують у полум'ї пальника, охолоджують. В асептичних умовах бактеріологічну петлю занурюють у пробірку з культурою. Петлею з культурою зигзагом наносять штрихи на поверхні сектора 1. Чашку закривають, петлю стерилізують у полум'ї пальника і охолоджують. Петлею проводять по поверхні сектора 1 і наносять штрихи зигзагом по поверхні сектора 2. Аналогічну операцію проводять і для сектора 3. Чашки з посівами перевертають кришкою донизу, завертають у папір і поміщають у термостат за температури 32-34°С протягом 2-3 діб.

*Аналіз колоній.* Після інкубації візуально оцінюють колонії, які вирости, підраховують їх кількість. На чашках з посівами інокуляту і культуральної рідини повинні бути виявлені лише колонії виробничого штаму *S. natalensis* NRRL2651 і повна відсутність сторонньої мікробіоти (Рис. 9.1). На агаризованих середовищах

*S. natalensis* утворюють, як правило, колонії білого кольору, круглої форми, з плоскою поверхнею із дещо опуклим центром, нерівними краями та м'якою консистенцією. Відсутність мікробіоти на чашках з посівами поживних середовищ свідчить про дотримання правильного режиму стерилізації середовищ.



Рис. 9.1 Колонії штаму *S. natalensis* NRRL 2651 з колекції Leibniz-Institut DSMZ [91]

**Мікроскопіювання зразків.** Для мікроскопіювання ізольованих колоній готують препарат «роздавлена крапля». Для приготування препарату «роздавлена крапля» на чисте і знежирене спиртом предметне скло наносять краплю дистильованої води. Бактеріологічну петлю стерилізують у полум'ї пальника, охолоджують. Петлею відбирають мікробну масу з поверхні колонії і рівномірно її розподіляють у краплі води. Краплю отриманої суспензії покривають чистим покривним скельцем, не залишаючи пухирців повітря під ним. Надлишок ріднини на склі відбирають за допомогою фільтрувального паперу. Мікроскопування препарату здійснюють зі збільшенням об'єктива x40.

Під час мікроскопіювання у препараті «роздавлена крапля» *S. natalensis* виявляють як нитчасту, грампозитивну, кислотостійку (за фарбуванням по Цілю-Нельсону) бактерію, яка формує добре розвинутий міцелій з тонкими гіфами, які містять велику кількість нуклеоїдів (Рис. 9.2).

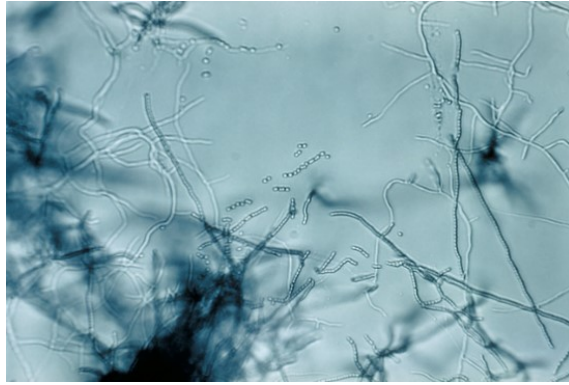


Рис. 9.2. Клітини штаму *S. natalensis* NRRL 2651 у світловому мікроскопі [92]

## 9.2. Контроль показників росту і біосинтезу

### 9.2.1. Визначення концентрації біомаси

*Підготовка проби для аналізу.* У стерильну градувальну пробірку для центрифугування відбирають 50 мл культуральної рідини у різні проміжки часу культивування. Пробу культуральної рідини центрифугують при 5000 обертах/хв протягом 20 хв. Супернатант відбирають стерильною піпеткою. Для промивання відцентрифугованих клітин у пробірку піпеткою додають дистильовану воду до мітки. Пробу знову центрифугують при 5000 обертах/хв протягом 20 хв. Утворений супернатант відбирають стерильною піпеткою.

*Визначення кількості абсолютно сухої біомаси.* У сухожаровій шафі висушують алюмінієву зважувальну чашу протягом 20 хв і визначають її масу на технічних вагах. Відцентрифуговану біомасу переносять на охолоджену зважувальну чашу. Біомасу, яка залишилася на стінках колби для центрифугування, змивають 1-2 мл дистильованої води і виливають у зважувальну чашу. Чашу з біомасою поміщають у сухожарову шафу і висушують до постійної маси при 80 °С. Процес сушіння у середньому займає 6-24 год залежно від температури сухожарової шафи і густини біомаси. Після висушування розраховують різницю у масі і виражають кількість сухої біомаси у г/л. [7, 93].

### 9.4.2 Визначення концентрації натаміцину

Якісне визначення вмісту натаміцину у культуральній рідині за допомогою біологічних методів базується на порівнянні ступенів пригнічення росту чутливих мікроорганізмів (тест-культур) у результаті дії антибіотика, який випробовується, і розчину антибіотика стандартного зразка з відомими концентраціями.

**Метод дифузії.** Даний метод передбачає використання відповідного поживного середовища, яке містить тест культуру, стерильних циліндрів, до яких вносять випробовуваний зразок антибіотика, і розчини стандартного зразка з відомими концентраціями.

Для приготування середовища з тест-культурою бактеріологічною петлею відбирають клітини *Saccharomyces cerevisiae* 776521 з пробірок зі скошеним агаром і переносять до колб об'ємом 250 мл з 50 мл середовища YPD. Культивування проводять за температури 29 °С у колбах на качалках при 170 обертах/хв до досягнення концентрації клітин  $10^7$ /мл. У чашки Петрі, які містять 10 мл застиглого середовища YPG, встановлюють стерильні фарфорові або з нержавіючої сталі циліндри і розливають по 15 мл середовища з тест-культурою. Паралельно готують розчини стандартного зразка з відомими концентраціями натаміцину. У циліндри вносять проби попередньо відцентрифугованої культуральної рідини і розчини стандартних зразків. Проби культуральної рідини і розчини стандартних зразків розміщують на чашці таким чином, щоб виключити можливість взаємодії більш концентрованих розчинів. Чашки інкубують при температурі 28 °С протягом 24 год. Після завершення інкубації вимірюють діаметри або площі круглих зон затримки росту тест-культури з точністю не менше 0,1 мм і розраховують активність антибіотика, застосовуючи відповідні статистичні методи [7, 94].

На відміну від біологічних методів, які дозволяють провести якісне визначення вмісту натаміцину у культуральній рідині, методи високоефективної рідинної хроматографії дозволяють швидко і точно визначити концентрацію натаміцину у культуральній рідині.

**Метод ВЕРХ.** Хроматографічне розділення виконують на установці моделі, наприклад, Agilent Eclipse XBD C18, обладнаною колонкою з геометричними розмірами 250 x 4,6 x 5 мм. Швидкість потоку рухомої фази становить – 1 мл/хв за температури 25 °С. Об'єм проби, яка вводиться – 50 мл, довжина хвилі детектора – 304 нм [95].

*Приготування розчину рухомої фази.* Для приготування 100 мл розчину рухомої фази у конічну колбу об'ємом 250 мл додають 75 мл розчину солей амонію (0,3 %  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0,02%  $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{CO}_2$ ), 20 мл ацетонітрилу і 5 мл тетрагідрофурану,

вміст колби перемішують скляною паличкою.

*Приготування стандартного розчину.* 100 мг стандартного препарату натаміцину розчиняють у 100 мл нітрилу оцтової кислоти у чистій конічній колбі об'ємом 250 мл для отримання розведення 1,0 мг/мл. Із стандартного розчину готують ряд розведень розчином рухомої фази для отримання концентрації натаміцину: 10 мг/мл, 20 мг/мл, 30 мг/мл, 40 мг/мл, 50 мг/мл. Розчини з відповідним розведенням послідовно інжектують до системи ВЕРХ для побудови лінійного графіку концентрації натаміцину.

*Підготовка проби культуральної рідини для аналізу.* У стерильну мірну склянку об'ємом 50 мл вносять 1 мл культуральної рідини. До колби додають 9 мл метанолу. У склянку занурюють ультразвуковий екстрактор і проводять екстрагування натаміцину при 35 кГц протягом 1 хв. Для відновлення органічного розчинника пробу переносять у градуювальну пробірку для центрифугування і центрифугують при 10 000 об/хв. Утворений супернатант відбирають піпеткою до пробірки. Пробірку поміщають у холодильник на 60 хв. Охолоджений вміст пробірки використовують для проведення кількісного визначення натаміцину [95,96,97].

Результати визначень представляють у вигляді хроматограми. Графік лінійності будують шляхом порівняння концентрації натаміцину і області хроматографічного піку. Типова хроматограма визначення концентрації натаміцину представлена на рис. 9.3.

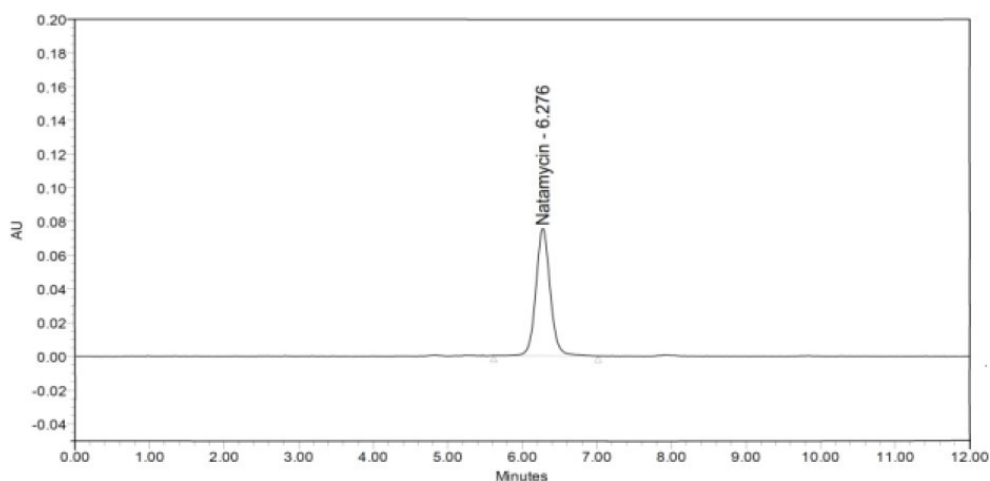


Рис. 9.3 Приклад хроматограми визначення концентрації натаміцину [97]

### 9.3. Контроль концентрації вуглецю у культуральній рідині

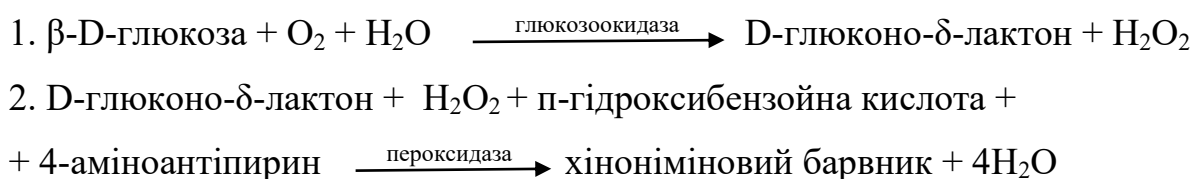
#### 9.3.1. Визначення концентрації глюкози глюкозооксидазним методом

Для швидкого і точного визначення концентрації глюкози в культуральній рідині використовують колориметричний глюкозооксидазний метод. Фермент глюкозооксидаза каталізує окиснення  $\beta$ -D-глюкози до D-глюконо- $\delta$ -лактону і гідроген пероксиду. Реакція є специфічною для  $\beta$ -D-глюкози, і тому не проводиться для визначення концентрації  $\alpha$ -D-глюкози.

Враховуючи те, що для проведення реакції необхідна велика кількість реагентів, на практиці користуються готовими аналітичними тест-системами, наприклад, D-Glucose GOD-POD AK00161 компанії NZYtech (країна-виробник – Португалія). Інтенсивність забарвлення реакційної суміші визначають за допомогою спектрофотометру ULAB моделі 101 (країна-виробник-Україна).

**Принцип методу.** Глюкозооксидаза каталізує реакцію окиснення  $\beta$ -D-глюкози до D-глюконо- $\delta$ -лактону з виділенням гідроген пероксиду. У присутності ферменту пероксидази гідроген пероксид вступає у реакцію з пара-гідроксибензойною кислотою і 4-аміноантіпірином, утворюючи хінонімінову сполуку, інтенсивність забарвлення якої вимірюють за довжини хвилі 510 нм за допомогою спектрофотометру [98].

Хімізм реакцій:



**Підготовка проби.** У асептичних умовах відбирають 10 мл проби культуральної рідини з виробничого ферментера. Пробу культуральної рідини витримують у термостаті за температури 90-95 °C протягом 10 хв для інактивації ферментів, центрифугують при 5000 об/хв протягом 20 хв. Отриману надосадову рідину використовують для визначення концентрації глюкози.

**Приготування розведень.** Концентрація глюкози у пробі, яка аналізується, повинна становити від 100 – до 1000 мг/л. Для цього готують 1:100 розведення отриманої надосадової рідини. З пробірки з надосадовою рідиною піпеткою відбирають 1 мл рідини. Вміст піпетки вносять у пробірку, яка містить 9 мл

дистильованої води, пробірку струшують. З отриманого розведення піпеткою відбирають 1 мл і переносять у наступну пробірку з 9 мл дистильованої води, пробірку струшують. Для визначення концентрації глюкози у пробі відбирають 0,1 мл вмісту пробірки з розведенням 1:100.

### **Приготування реагенту глюкозооксидази-пероксидази (GOD-POD).**

Аналітичний тест-набір D-Glucose GOD-POD AK00161 включає 3 ампули з реагентами.

*Розчин 1:* буферний розчин 0,42М монофосфату калію, 0,35М пара-гідроксибензойної кислоти, консервант – азид натрію (0,64% об).

*Розчин 2:* ліофілізований порошок глюкозооксидази (> 12 000 ОД), пероксидази (> 650 ОД), 4-аміноантіпірин (80 мг).

*Розчин 3:* стандартний розчин D-глюкози (5 мл; 1,0 мг/мл) в 0,2% розчині бензойної кислоти.

Вміст ампули з розчином 1 переносять у суху конічну колбу об'ємом 1 л і розводять дистильованою водою до загального об'єму 1 л. Вміст ампули з розчином 2 переносять у пробірку об'ємом 50 мл, додають 20 мл розчину 1, перемішують струшуванням. Отриманий розчин знову переносять до колби із рештою розчину 1. Колбу обгортають алюмінієвою фольгою для захисту розчину від дії світла. Готовий розчин стабільний протягом 3 місяців за температури 2-5 °С або протягом 12 місяців за температури -20 °С [99].

**Техніка виконання.** Кювети спектрофотометру попередньо ополіскують дистильованою водою і два рази розчином для аналізу.

Вимірювання інтенсивності забарвлення проводять проти кювети з розчином-порівняння.

*Приготування розчину-порівняння.* У попередньо підготовану кювету для розчину-порівняння за допомогою піпетки додають 0,1 мл дистильованої води і 3,0 мл розчину глюкозооксидази-пероксидази. Вміст кювети обережно перемішують скляною паличкою.

*Приготування стандартного розчину.* У другу попередньо підготовану кювету за допомогою піпетки додають 0,1 мл стандартного розчину D-глюкози (розчин 3) і

3,0 мл розчину глюкозооксидаз-пероксидази. Вміст кювети обережно перемішують скляною паличкою. Розчин інкубують за температури 40-50°C протягом 20 хв.

Вимірювання інтенсивності забарвлення стандартного розчину проводять проти кювети з розчином-порівняння за довжини хвилі 510 нм за допомогою спектрофотометру, отримують значення  $\Delta A_{\text{стандартний розчин}}$ .

*Приготування розчину для аналізу.* У попередньо підготовану кювету за допомогою піпетки додають 0,1 мл розведення культуральної рідини і 3,0 мл розчину глюкозооксидаз-пероксидази. Вміст кювети обережно перемішують скляною паличкою. Розчин інкубують за температури 40-50°C протягом 20 хв.

Вимірювання інтенсивності забарвлення розчину для аналізу проводять проти кювети з розчином-порівняння за довжини хвилі 510 нм за допомогою спектрофотометру, отримують значення  $\Delta A_{\text{розчин для аналізу}}$  [99].

**Розрахунок концентрації D-глюкози.** Концентрацію D-глюкози (мг/л) у аналізованому зразку розраховують за формулою:

$$C_{(D\text{-глюкози})} = \frac{\Delta A_{\text{розчин для аналізу}}}{\Delta A_{\text{стандартний розчин}}} \cdot 1000 \cdot K_{\text{розведення}},$$

де  $K_{\text{розведення}}$  – коефіцієнт розведення розчину для аналізу.

Отже, мікробіологічний контроль стерильності поживних середовищ здійснюють шляхом прямого висіву на агаризовані поживні середовища СА і МПА. Мікробіологічний контроль посівного матеріалу і культуральної рідини проводять прямим висівом на агаризоване середовище технікою «виснаженого штриха» для виділення ізолюваних колоній із наступним мікроскопіюванням виділених колоній у препараті «роздавлена крапля». Концентрацію біомаси визначають шляхом висушування проби до постійної маси. Кількісне визначення концентрації натаміцину у культуральній рідині визначають методом ВЕРХ на установці Agilent Eclipse XBD C18. Концентрацію глюкози у культуральній рідині визначають глюкозооксидазним методом. Концентрацію загального азоту у культуральній рідині не визначають через невизначеність складу джерел азоту у поживному середовищі.

## 9.4. Контроль готового продукту

Під час процесів виділення і очищення натаміцину необхідно контролювати технічні і хімічні параметри, зокрема температуру, рівень рН, швидкість обертання мішалки, швидкість обертання ротора центрифуги тощо.

Готовий кристалічний порошок натаміцину контролюють за такими показниками якості, наведеними у Американській Фармакопеї, як ідентифікація, рН, вологовміст, кількісний вміст речовини, активність. Розглянемо методики контролю якості готового кристалічного порошку натаміцину [100].

### 9.4.1. Ідентифікація натаміцину у готовому продукті

Ідентифікацію натаміцину проводять спектрофотометричним методом. Для досліду на технічних вагах зважують 50 мг порошку натаміцину і вносять наважку до колби об'ємом 200 мл. У колбу додають 5 мл води для змочування порошку. Додають 100 мл 1:1000 спиртового розчину льодяної оцтової кислоти, перемішують скляною паличкою до розчинення компонентів. Об'єм розчину доводять до мітки спиртовим розчином льодяної оцтової кислоти.

Відбирають 2 мл розчину у колбу об'ємом 100 мл, об'єм доводять до мітки спиртовим розчином льодяної оцтової кислоти і перемішують. Визначають максимальний і мінімальний УФ-спектр заломлення розчину.

Для натаміцину максимальне заломлення спостерігають при 290 нм, 303 нм і 318 нм, мінімальне – при 250 нм, 295,5 нм та 311 нм [100].

### 9.4.2 Кількісне визначення натаміцину у готовому продукті

Кількісне визначення натаміцину у готовому кристалічному порошку проводять хроматографічним методом. Дослід проводять за умов без прямого доступу сонячного світла.

*Приготування рухомої фази.* У колбу об'ємом 1,0 л додають 3,0 г ацетату амонію і 1,0 г хлористого амонію і 760 мл дистильованої води, розчини перемішують. Додають 5,0 мл тетрагідрофурану і 240 мл ацетонітрилу, перемішують. Розчин фільтрують через фільтр з діаметром пор 0,5 мкм.

*Приготування стандартного розчину.* На технічних вагах зважують 20 мг стандартного препарату натаміцину («USP Natamycin RS»). Наважку препарату вносять у колбу об'ємом 100 мл, додають 5,0 мл тетрагідрофурану. Розчин

диспергують за допомогою ультразвуку протягом 10 хв. Додають 60 мл метанолу, перемішують. Розчин охолоджують за кімнатної температури, доводять об'єм розчину до мітки дистильованою водою, фільтрують.

*Приготування розчину для розділення.* У колбі об'ємом 100 мл розчиняють 20 мг порошку натаміцину, який досліджується, у 99 мл метанолу і 1 мл 0,1 Н хлоридної кислоти, витримують 2 год. Отриманий розчин необхідно використати протягом 1 год.

*Приготування розчину для аналізу.* У колбу об'ємом 100 мл додають 20 мг порошку натаміцину, який досліджується, і 5,0 мл тетрагідрофурану. У колбу приливають 99 мл метанолу і 1 мл 0,1 Н хлоридної кислоти, розчин перемішують і витримують 2 год. Отриманий розчин необхідно використати протягом 1 год.

*Методика виконання досліду.* Для аналізу використовується хроматограф, обладнаний 303 нм детектором і колоною розміром 4,6 мм × 25 см. Швидкість потоку – 3,0 мл/хв. Проводять хроматографування стандартного розчину і фіксують аналітичний сигнал піку за таких умов: аналітичний сигнал піку не перевищує 3000 теоретичних тарілок, коефіцієнт асиметрії піку – не менше 0,8 і не більше 1,3, а відносне стандартне відхилення не більше 1,0%.

Проводять хроматографування розчину для розділення і фіксують аналітичний сигнал піку за таких умов: розділення піків (R) між натаміцином і його метиловим естером не менше 2,5; відносний час утримання для натаміцину – 0,7, для метилового естеру натаміцину – 1,0.

Після цього у хроматографічну колону послідовно впорскують рівні об'єми стандартного розчину і розчину для аналізу. Записують хроматограми і вимірюють значення найвищих піків.

Кількісний вміст натаміцину у аналізованому розчині визначають за формулою:

$$0,1 \cdot (W_s \cdot P_s / W_u) \cdot (r_U / r_S), \text{ де}$$

$W_s$  – маса стандартного препарату натаміцину, мг;

$P_s$  – зазначений кількісний вміст натаміцину у стандартному препараті, мг;

$W_u$  – маса аналізованого препарату натаміцину, мг;

$r_U$  – аналітичний сигнал піку для аналізованого препарату;

$r_S$  – аналітичний сигнал піку для стандартного препарату.

Препарат витримує випробування на кількісний вміст натаміцину, якщо вміст натаміцину складає не менше 90,0% і не більше 102,0% у перерахунку на безводну основу [100].

#### 9.4.3 Визначення активності натаміцину у готовому продукті

Визначення активності натаміцину у готовому продукті здійснюють за допомогою фармакопейного методу дифузії в агар, який базується на здатності молекул субстанції антибіотика дифундувати в агар і утворювати зони пригнічення росту чутливих мікроорганізмів (тест-культур). Принцип даного методу полягає у логарифмічній залежності ступеня пригнічення росту тест-культури від концентрації антибіотика.

Даний метод передбачає використання відповідного поживного середовища, яке містить тест культуру, стерильних циліндрів, до яких вносять випробовуваний зразок антибіотика, і розчини стандартного зразка з відомими концентраціями.

Для приготування середовища з тест-культурою бактеріологічною петлею відбирають клітини *Saccharomyces cerevisiae* 776521 з пробірок зі скошеним агаром і переносять до колб об'ємом 250 мл з 50 мл середовища YPD.

Культивування проводять за температури 29 °C у колбах на качалках при 170 обертах/хв до досягнення концентрації клітин  $10^7$ /мл. У чашки Петрі, які містять 10 мл застиглого середовища YPG, встановлюють стерильні фарфорові або з нержавіючої сталі циліндри і розливають по 15 мл середовища з тест-культурою.

Паралельно готують розчини стандартного зразка з відомими концентраціями натаміцину («USP Natamycin RS») і розчин досліджуваного порошку натаміцину. У циліндри вносять розведення розчинів досліджуваного порошку натаміцину і стандартних зразків. Проби розміщують на чашці таким чином, щоб виключити можливість взаємодії більш концентрованих розчинів. Чашки інкубують при температурі 28 °C протягом 24 год.

Після завершення інкубації вимірюють діаметри або площі круглих зон затримки росту тест-культури з точністю не менше 0,1 мм<sup>2</sup> і розраховують активність антибіотика, застосовуючи відповідні статистичні методи [94]. Стандартна активність натаміцину складає  $A = 1,0846$  од/мг [101].

#### 9.4.4 Визначення вологості порошку натаміцину

Визначення вологості порошку натаміцину здійснюють термогравіметричним методом за допомогою ІЧ-вологомірів MA150 (Sartorius).

Принцип методу полягає у висушуванні проби ІЧ-випромінюванням з автоматичним зважуванням у процесі сушіння, що дозволяє визначити вологість речовини за значенням втрати маси при нагріванні.

На відміну від методу повітря-теплого сушіння, під час якого процеси тепломасопереносу напряму залежать від фізико-хімічних характеристик аналізованого матеріалу, під час сушіння ІЧ-випромінюванням ефективно нагрівання проби досягається співпадінням спектральної щільності падаючого випромінювання зі смугою максимального поглинання матеріалу, що значно знижує час аналізу і підвищує його точність.

*Методика проведення дослідів.* На технічних вагах зважують 10 г порошку натаміцину. Наважку натаміцину переносять і рівномірно розподіляють у кюветі (діаметром не більше 100 мм) сушильної камери. ІЧ-вологомір фіксує початкову масу наважки, в автоматичному режимі визначає втрати маси під дією ІЧ-випромінювання і здійснює перерахунок в одиниці вмісту води з урахуванням початкової маси проби. Результати проведеного аналізу виводяться на дисплей апарату і можуть бути далі передані на периферійні прилади [102]. Стандартний вміст води у порошку натаміцину складає –  $W =$  до 6% [101].

## Карта контрольних точок виробництва натаміцину

<i>Номер контрольної точки та назва стадії</i>	<i>Об'єкт контролю та показник, що визначається</i>	<i>Засоби та методи контролю</i>	<i>Періодичність перевірки та відбору проб</i>	<i>Нормативні значення показника</i>
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>
Кх, Кт 1.1.1 <i>Приготування робочого розчину «Дезекон»</i>	Концентрація розчину «Дезекон»	Метод титрування	Після приготування розчину	C = 1,0%
Кх, Кт 1.1.2. <i>Приготування робочого розчину «Велідез Ензим»</i>	Концентрація розчину «Велідез Ензим»	Метод титрування	Після приготування розчину	C = 1,0%
Кх, Кт 1.1.3. <i>Приготування робочого розчину «Бландіас-А Форте»</i>	Концентрація розчину «Бландіас-А Форте»	Метод титрування	Після приготування розчину	C = 0,15%
Кт 1.2.1. <i>Щоденне прибирання</i>	Підлога, чистота	Візуальний контроль	Щоденно, після прибирання	Відсутність бруду і пилу, чистота приміщення
Кт, Км 1.2.2. <i>Генеральне прибирання</i>	Підлога, стіни, поверхня обладнання, вікна, двері, чистота, загальне мікробне обнасення	Візуальний контроль, люмінометричний метод	Після генерального прибирання	Чисте приміщення, $\tau = 30$ хв, $\leq 1 \times 10^2$ КУО/см <sup>2</sup>
Кт 1.3.1. <i>Миття обладнання</i>	Мийний розчин, температура мийного розчину, тривалість миття, чистота резервуарів	Термометр, годинник, візуальний контроль	Після проведення миття резервуарів обладнання	t = 35-40 °C, $\tau = 1,5$ год, відсутність бруду, залишків середовищ

Продовження табл. 9.1

1	2	3	4	5
Кт 1.3.2. <i>Технічний огляд</i>	Технічний стан обладнання, комунікацій, інвентаря, відсутність пошкоджень, сторонніх предметів у резервуарах	Візуальний контроль	Під час технічного огляду	Відсутність несправностей, пошкоджень, корозії, сторонніх предметів у резервуарах
Кт 1.3.3. <i>Перевірка на герметичність</i>	Герметичність роботи обладнання, тиск, тривалість перевірки	Галогеновий течіешукач, манометр, годинник	Під час перевірки	$P = 0,02$ МПа, $\tau = 30$ хв, відсутність ділянок розгерметизації обладнання
Кт, Км 1.4.4. <i>Стерилізація обладнання</i>	Обладнання, тиск, час стерилізації	Манометр, годинник	Температура і тиск визначаються безперервно під час стерилізації	$P = 0,15$ МПа, $t = 125 \pm 2$ °С, $\tau = 1$ год
Кт 2.1.1. <i>Забір атмосферного повітря</i>	Висота повітрязабірника	Висотомір	Постійно	$H = 30$ м
Кт 2.1.2 <i>Очищення повітря від пилу і механічних часток</i>	Повітря на виході з фільтра грубої очистки, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, автоматична перевірка концентрації дрібнодисперсних часток і пилу на портативних аналізаторах, перевірка ступеня очищення згідно з паспортом фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	$E = 90\%$ , тиск відповідно до зазначеного в паспорті фільтра
Кт 2.1.3 <i>Компресування повітря</i>	Стиснене повітря, температура, тиск	Манометр, термометр	Після компресування повітря	$P = 0,35-0,5$ МПа, $t = 220-250$ °С

Продовження табл. 9.1

1	2	3	4	5
Кт 2.1.4 <i>Охолодження повітря</i>	Охолоджене повітря, температура	Термометр, психрометр	Після охолодження повітря	t = 20-40 °С,
Кт 2.1.5. <i>Видалення зайвої вологи</i>	Охолоджене повітря після видалення вологи, вологість	Психрометр	Після охолодження повітря і видалення зайвої вологи	W= до 60%
Кт 2.1.6. <i>Нагрівання повітря</i>	Нагріте повітря, температура	Термометр	Після нагрівання повітря	t = 35-40 °С
Кт 2.1.7 <i>Очищення повітря в головному фільтрі</i>	Повітря на виході з головного фільтру, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, автоматичне визначення розмірів і концентрації звислих часток портативним детектором Solair 3100 перевірка ступеня очищення згідно з паспортом фільтра	Після очистки повітря у головному фільтрі	E=99,996%, тиск відповідно до зазначеного в паспорті фільтра
Кт 2.1.8. <i>Очищення повітря в індивідуальному фільтрі</i>	Очищене повітря, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, автоматичне визначення розмірів і концентрації завислих часток портативним детектором Solair 3100, перевірка ступеня очищення згідно з паспортом фільтра	Після очистки повітря у індивідуально му фільтрі	E=99,999%, тиск відповідно до зазначеного в паспорті фільтра

Продовження табл. 9.1

1	2	3	4	5
Кт 2.2.1 <i>Очищення і нагрівання сушильного повітря</i>	Повітря, ступінь очищення, перепад тисків, температура	Манометр, автоматична перевірка концентрації дрібнодисперсних часток і пилу на портативних аналізаторах, перевірка ступеня очищення згідно з паспортом фільтра, термометр	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	E=90%, тиск відповідно до зазначеного в паспорті фільтра, t = 90 °C
Кх, Км 3.1. <i>Приготування і стерилізація 6% розчину гідроксиду натрію</i>	Розчин гідроксиду натрію, концентрація, тиск, температура, час, концентрація, відсутність мікробіоти	Метод титрування, манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, концентрація визначається після приготування робочого розчину, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,075 МПа, t = 120 °C, τ = 20 хв, C= 6%, відсутність мікробіоти
Кх 3.2. <i>Приготування і 6% розчину хлоридної кислоти</i>	Розчин хлоридної кислоти, концентрація	Метод титрування	Після приготування робочого розчину кислоти	C = 6%
Кх 3.3. <i>Приготування 50% розчину гідроксиду натрію</i>	Розчин гідроксиду натрію, концентрація, час перемішування	Метод титрування, годинник,	Концентрація визначається після приготування робочого розчину,	τ = 20 хв, C= 50%,
Кх 3.4. <i>Приготування 5М розчину хлоридної кислоти</i>	Розчин хлоридної кислоти, концентрація	Метод титрування	Після приготування робочого розчину кислоти	C = 5М

Продовження табл. 9.1

1	2	3	4	5
Кт, Км 4.1 <i>Стерилізація піногасника “Struktol J673A”</i>	Піногасник Struktol J673A, температура, час, стерильність	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 40\text{ хв}$ , відсутність мікробіоти
Кт, Км 5.1.1, 5.2.1, 5.3.1, 5.4.1. <i>Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту Приготування і стерилізація композиції А</i>	Композиція А, тиск, температура, час, стерильність	Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P = 0,05\text{ МПа}$ , $t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 30\text{ хв}$ , відсутність мікробіоти
Кт, Км 6.1 <i>Приготування і стерилізація композиції А</i>	Композиція А, тиск, температура, час, стерильність	Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P = 0,05\text{ МПа}$ , $t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 30\text{ хв}$ , відсутність мікробіоти
Кт, Км 6.2 <i>Приготування і стерилізація композиції Б</i>	Композиція Б, тиск, температура, час, стерильність	Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P = 0,15\text{ МПа}$ , $t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 40\text{ хв}$ , відсутність мікробіоти

Продовження табл. 9.1

1	2	3	4	5
Кт, Км 6.3. <i>Приготування і стерилізація композиції В</i>	Композиція В, тиск, температура, час, стерильність	Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P = 0,15$ МПа, $t = 131$ °С, $\tau = 40$ хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 7.2 <i>Вирощування культури на агаризованому середовищі</i>	Колекційна культура <i>Streptomyces natalensis</i> NRRL2651, морфологічна однорідність, відсутність сторонньої мікробіоти, відсутність неконтрольованих мутацій	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль проводять кожні 8 год	$t = 26$ °С, $\tau = 96$ год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 7.3 <i>Вирощування культури на рідкому середовищі</i>	Колекційна культура <i>Streptomyces natalensis</i> NRRL2651, температура, тривалість вирощування, мікробіологічна чистота культури	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль проводять кожні 8 годин до настання активної споруляції культури	$t = 30$ °С, $\tau = 4-7$ діб, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 7.4 <i>Вирощування культури в колбах на качалках</i>	Посівний матеріал, температура, тривалість вирощування, частота обертів качалки, концентрація біомаси, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, технічний тахометр, мікробіологічний контроль	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично протягом всього часу вирощування, мікроскопіювання – кожні 8 годин	$t = 30$ °С, $\tau = 24$ год, $\omega = 200$ об/хв, $X = 4,2$ г/л відсутність сторонньої мікробіоти

Продовження табл. 9.1

1	2	3	4	5
Кт, Кх, Км 7.5 <i>Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 0,01 м<sup>3</sup></i>	Посівний матеріал, температура, тривалість вирощування, частота обертів мішалки, концентрація біомаси, мікробіологічна чистота культури, морфологічна відповідність організмів	Термометр технічний, годинник, технічний тахометр, датчик рН, датчик піноутворення, мікроскоп	Температура, швидкість обертання, рН, рівень піни контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікроскопіювання – кожні 8 годин	t = 30 °С, τ = 24 год, ω = 200 об/хв, X = 4,2 г/л рН = 7,0, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Кх, Км 7.6 <i>Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 0,1 м<sup>3</sup></i>	Посівний матеріал, температура, тривалість вирощування, частота обертів мішалки, концентрація біомаси, мікробіологічна чистота культури, морфологічна відповідність організмів	Термометр технічний, годинник, технічний тахометр, датчик рН, датчик піноутворення, мікроскоп	Температура, швидкість обертання, рН, рівень піни контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікроскопіювання – кожні 8 годин	t = 30 °С, τ = 24 год, ω = 200 об/хв, X = 4,2 г/л відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Кх, Км 7.7. <i>Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 1,0 м<sup>3</sup></i>	Посівний матеріал, температура, тривалість вирощування, частота обертів мішалки, концентрація біомаси, мікробіологічна чистота культури, морфологічна відповідність організмів	Термометр технічний, годинник, технічний тахометр, датчик рН, датчик піноутворення, мікроскоп	Температура, швидкість обертання, рН, рівень піни контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікроскопіювання – кожні 8 годин	t = 30 °С, τ = 24 год, ω = 200 об/хв, X = 4,2 г/л рН = 7,0, відсутність сторонньої мікробіоти

Продовження табл. 9.1

1	2	3	4	5
Кт, Кх, Км 8.1 <i>Виробниче культивування у ферментері об'ємом 8 м<sup>3</sup></i>	Культуральна рідина, температура, тривалість культивування, частота обертів мішалки, рівень рН, рівень піни, мікробіологічна чистота культури, концентрація натаміцину	Годинник, термометр технічний, технічний тахометр, датчик рН, датчик піноутворення мікроскоп	Температура, швидкість обертання мішалки, рівень рН, рівень піни контролюються і підтримуються автоматично весь час культивування; мікроскопіювання – кожні 8 годин	t = 30 °С, τ = 84 год, ω = 300об/хв, рН = 7,0, рівень піни відсутність сторонньої мікробіоти С натаміцину = 3,0 г/л
Кт 9.1 <i>Центрифугування культуральної рідини</i>	Культуральна рідина, швидкість обертання барабану, час	Датчик Холла, годинник	Під час процесу	w = 2000 об/хв, τ = 22 хв
Кт, Кх 10.1 <i>Теплова обробка клітинної суспензії</i>	Клітинна суспензія, температура, час, швидкість перемішування, рН	Термометр, годинник, тахометр, датчик рН	Під час процесу	t = 45 °С, τ = 3 год, w = 200 об/хв, рН = 9,0
Кт 11.1 <i>Екстракція натаміцину</i>	Реакційна суміш, час, швидкість перемішування	Годинник, тахометр	Під час процесу	τ = 2 год, w = 200 об/хв
Кт 11.2 <i>Центрифугування екстракту</i>	Органічний екстракт, швидкість обертання, час	Датчик Холла, годинник	Під час процесу	w = 3500 об/хв, τ = 69 хв
Кт 12.1 <i>Ультрафільтрація екстракту</i>	Органічний екстракт натаміцину, тиск, діаметр пор мембрани, ступінь концентрування	Манометр, перевірка діаметру пор згідно з технічним паспортом мембрани	Під час процесу	P = 40 бар, d = 700 кДа, K = 3
Кт, Кх 13.1 <i>Осадження концентрату</i>	Концентрат, рН, час, швидкість перемішування	Датчик рН, годинник, тахометр	Під час процесу	рН = 6,5, w = 50 об/хв, τ = 2 год

Закінчення табл. 4.1

1	2	3	4	5
Кт 13.2 <i>Виділення кристалів натаміцину</i>	Перенасичений розчин, тиск	Вакууметр	Під час процесу	P = -1,0 бар
Кт, Кх 14.1 <i>Висушування і гранулювання кристалів натаміцину</i>	Кристалічний порошок, температура сушіння, ідентифікація, рН, кількісний вміст, вологість, активність	Термометр, ідентифікація, хроматографічний аналіз відповідно до методик USAP, рН-метр, термогравіметричний метод, ІЧ-вологомір, мікробіологічний метод дифузії в агар	Температура сушильного агента під час процесу, оцінка якості порошку після сушки	t = 90 °C, рН = 5,0 – 7,5 С = 90-102% (у перерахунку на безводну основу), W = до 6%, А = 1,0846 од/мг
Кт 15.1 <i>Фасування, пакування, маркування саше порошку натаміцину</i>	Упаковка, цілісність, якість маркування	Візуальний огляд	Під час процесу	Цілісність термозапаяних звів, достовірні інформація у маркування

## РОЗДІЛ 10. Автоматизація ділянки виробництва натаміцину

У результаті аналізу технологічного процесу дезінтеграції клітин продуцента і екстракції натаміцину було зроблено висновки, що система керування технологічним процесом повинна виконувати наступні задачі.

1. Контроль і регулювання температури у збірнику шляхом зміни подачі пари у парову сорочку апарату і зміну подачі води холодної у водяну сорочку апарату.
2. Контроль рівня рідини у збірнику із сигналізацією по досягненню рідиною верхнього допустимого рівня.
3. Контроль витрати ізопропілового спирту при подачі його у збірник.
4. Контроль і регулювання рівня рН середовища шляхом зміни подачі лугу зі збірника для 5% розчину гідроксиду натрію у збірник для екстракції натаміцину.
5. Управління насосом перекачки органічного екстракту натаміцину зі збірника для екстракції до наступної технологічної установки.

Відповідно до сформованих задач системи керування технологічним процесом було сформовано наступні завдання на розробку системи автоматизації (табл. 10).

Таблиця 10.1

### Завдання на розробку системи автоматизації

№ з.п	Машина, агрегат, установка	Параметр, місце відбору сигналу	Припуск-тиме значення параметра	Вид автоматизації	Характер контролю чи управління	Засоби уп-равління та контролю, реалізації управляючої дії
	Збірник для дезінтеграції клітин, екстракції та декантації натаміцину	Температура	С С	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
				Регулювання	Підтримання на заданому значенні, відображення, реєстрація	АРМ оператора - вплив на подачу пари і подачу води у сорочку апарату
		Рівень рідини в апараті	150±5 л	Контроль	Сигналізація	АРМ оператора
		Витрата екстрагенту	20±2 л	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
		Рівень рН	од.рН	Контроль	Відображення, реєстрація, сигналізація	АРМ оператора
Регулювання	Стабілізація			АРМ оператора - вплив на подачу лугу зі збірника		

### НУХТ БТЕК 04.03.09 КР ПЗ

Змн.	Арк.	№ документа	Підпис	Дата				
Розробив	Цапко				РОЗДІЛ 10. Автоматизація ділянки виробництва натаміцину	Літера	Арк.	Аркушів
Консульт.	Клименко						164	4
Керівник	Красінько					Кафедра БТМ		
Н. контр.								
Зав. каф.	Пирог							

	Насос відкачки рідини зі збірника до наступної технологічної установки	Стан насосу	Увімкнено/ вимкнено	Управління	Ручне, дистанційне	Пуск, зупинка з АРМа оператора і кнопка «Стоп» по місцю
--	--	-------------	------------------------	------------	-----------------------	---

**Перший контур** автоматичного контролю і управління передбачає контроль і регулювання температури, яка має регламентоване значення 45 °С і допустимі відхилення  $\pm 1$  °С. Зміни температури під час процесу відображаються і реєструються неперервно у часі на АРМі оператора. При перевищенні допустимих відхилень температури передбачається сигналізація на АРМі оператора. Температура вимірюється термометром опору моделі 1-3, ТСП (Pt100) з уніфікованими сигналами 4...20 мА. Управляючий сигнал 4...20 мА поступає на перетворювач електричного сигналу в пневматичний – Fisher i2P-100 (16) і далі передається на пневматичний привід для управління кранами КУР (1в). Регулювання і підтримання температури на заданому рівні здійснюється шляхом управління кранами подачі насиченої пари і холодної води у сорочку збірника.

**Другий контур** автоматичного контролю і управління передбачає контроль рівня в збірнику, який має регламентоване значення 150 л і допустимі відхилення  $\pm 5$  л. Рівень вимірюється магнітострікційним поплавковим датчиком рівня NMT (3а) із сигналізацією досягнення верхнього припустимого рівня. Сигналізація про досягнення верхнього рівня передбачається на АРМі оператора-технолога.

**Третій контур** автоматичного контролю і управління передбачає контроль кількості екстрагенту, який поступає у збірник, турбінним лічильником води Meitwin DN 50/50 (4а) з оптичним передаванням імпульсів (10 л/ імпульс) на АРМ оператора.

**Четвертий контур** автоматичного контролю і управління передбачає контроль і регулювання рівня рН, який має регламентоване значення 9,0 і допустимі відхилення  $\pm 0,1$ . Зміни рН під час процесу відображаються і реєструються неперервно у часі на АРМі оператора. При перевищенні допустимих відхилень рН передбачається сигналізація на АРМі оператора. Рівень рН вимірюється рН електродами APS (5а). Вимірювання рН поступають на перетворювач вимірювання рН і окисно-відновного потенціалу ПП-10 (5б) і виводиться у аналоговому сигналі постійного струму

пропорційний діапазону значення рН. Підтримання рН на заданому рівні здійснюється шляхом управління краном подачі лугу зі збірника за допомогою перетворення електричного сигналу у пневматичний за допомогою перетворювача ПП-10 (5б) і з наступним передаванням пневматичного сигналу на пневматичний привід для управління кранами КУР (5в).

**П'ятий контур** автоматичного контролю і управління передбачає контроль увімкненого або вимкненого стану насосу. Управління здійснюється з АРМа оператора включенням-відключенням насосу, у ручному режимі управління шляхом включення-відключення насосу на щиту перетворювачів. Аварійне відключення насосу здійснюють шляхом натискання «Пуск» на моторі М.

Таблиця 10.2

### Специфікація на прилади і засоби автоматизації

Позиція	Місце установки	Найменування характеристика приладу	Тип моделі	Виробник
1а	По місцю	Термометр опору, матеріал виготовлення – нержавіюча сталь, градувальна характеристика Pt100, діапазон вимірювань: -50...+250 °С, максимальний допустимий тиск 25 бар, клас точності – 0,10, приєднання G1/2, максимальний опір для вихідних сигналів - 50 Ом, вихідний сигнал – аналоговий 4...20 мА або RS 485 (протокол RTU або T-bus), термоопір – RS485	1-3, ТСП	ПАО „Тера”, Україна
1б 4б	На щиті	Електропневмоперетворювач, вхідний сигнал - електричний 4...20 мА, вихідний сигнал - пневматичний 0,2 - 1,0 бар, гістерезис - 0,4% від повного діапазону вихідного сигналу	i2P-100	
1в 5в	По місцю	Пневматичний привід для управління кранами та заслінками, управляючий сигнал 20...100кПа, крутний момент 5...30 нм/бар, кут повороту 90°		
3а	По місцю	Магнітострикційній поплавковий датчик рівня, матеріал: нержавіюча сталь; діапазон вимірювань 300-4000 мм, густина 0,7кг/дм <sup>3</sup> , максимальна допустима температура +70 °С, максимальний допустимий тиск 10 бар, під'єднання G2, аналоговий вихід 4...20 мА		
4а	По місцю	Турбінний лічильник води, мінімальна витрата 0,02 м <sup>3</sup> /год, максимальна витрата – 90,0 м <sup>3</sup> /год, номінальний тиск 1,6 кПа; максимальна температура 50 °С, клас точності – С, тип приєднання – DN50, монтажна довжина – 270,0 мм, перепад тиску – 21 КПа, імпульсний вихід точності – 0,075, обладнаний оптичним передавачем імпульсів OPTO OD, ціна імпульсу – 10 л, тип сигналу – електричний імпульсний		

5а	По місцю	pH електроди, матеріал скло, пластик, діапазон вимірювань pH 1...12, максимальна температура до 80°C, максимальний допустимий тиск 6 бар		
5б	По місцю	Перетворювач вимірювання pH і окисно-відновного потенціалу, вихідний сигнал - аналоговий постійного струму пропорційний діапазону значення pH, аналоговий сигнал 4...20 мА, максимальний опір для вихідних сигналів - 0,5 кОм, довжина зв'язку - не більше 4 м.	ПП-10	Мікрол
КМЗ	На щиті	Магнітний пускач, робочий струм 7А, потужність двигуна 3кВт, управляючий сигнал 220В		
	На щиті	Перемикач 3-х позиційний (автоматичний-ручний з щита – ручний по місцю) з фіксацією		

Отже, нами було запропоновано схему автоматизації ділянки дезінтеграції клітин і екстракції натаміцину. Розроблена система керування технологічним процесом повинна виконувати наступні п'ять задач: контроль і регулювання температури у збірнику, контроль рівня рідини у збірнику із сигналізацією по досягненню рідиною верхнього допустимого рівня, контроль витрати ізопропілового спирту при подачі його у збірник, контроль і регулювання рівня pH, управління насосом перекачки органічного екстракту натаміцину. Автоматичне регулювання заданих технічних параметрів має на меті звести до мінімуму технічні помилки при реалізації процесів виділення натаміцину і, як наслідок, забезпечити стабільний вихід стабільного і високоочищеного антибіотика.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *te Welscher Y. M., Jones L., van Leeuwen M. R., et al.* Natamycin inhibits vacuole fusion at the priming phase via a specific interaction with ergosterol // *Antimicrob Agents Chemother.* — 2010. — Vol. 54, N 6. — doi: 10.1128/AAC.01794-09.
2. *te Welscher Y. M., van Leeuwen M. R., de Kruijff B., et al.* Polyene antibiotic that inhibits membrane transport proteins // *Proc Natl Acad Sci USA.* — 2012. — Vol. 109, N 28. — doi:10.1073/pnas.1203375109.
3. *Hopsu-Havu, V. K., Nevalainen, T. J.* Electronmicroscopic Observations on Natamycin Effect in *Candida albicans* Cell Wall // *Mycoses.* — 1979. — Vol. 22. — P. 364-370. — doi: 10.1111/j.1439-0507.1979.tb01686.x.
4. *Малова И. В., Петрунин Д. Д.* Натамицин как противогрибковое средство класса полиеновых макролидов с необычными свойствами // *Вестник дерматологии и венерологии* — 2012. — С. 164-181.
5. *Державний реєстр лікарських засобів України* [Електронний ресурс]. — Режим доступу: <http://www.drlez.com.ua/>.
6. *Мальбахова Е. Т., Арзуманян В. Г., Комиссарова Л. М.* Натамицин и препараты азолового ряда: клиническая и лабораторная эффективность при вульвовагинальном кандидозе у небеременных // *Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии.* — 2012. — Том 11, №3.
7. *Elsayed A. E., Farid M., Enshasy H.* Improvement in natamycin production by *Streptomyces natalensis* with the addition of short-chain carboxylic acids // *Pr Biochem.* — 2013. — Vol.48, №12, — P.1831-1832. — doi: 10.1016/j.procbio.2013.09.009.
8. *Aparicio, J.F., Barreales, E.G., Payero, T.D. et al.* Biotechnological production and application of the antibiotic pimaricin: biosynthesis and its regulation // *Appl Microbiol Biotechnol.* — 2016. — Vol. 100, N 61. — doi.org/10.1007/s00253-015-7077-0.
9. *Chen G., Lu F., Du L.* Natamycin Production by *Streptomyces gilvosporeus* Based on Statistical Optimization // *J Agric Food Chem.* — 2008. — Vol. 56. — P. 5057–5061. — doi: 10.1021/jf800479u.
10. *Yan D., Lu C., Wang J. et. al.* Optimization of Fermentation Medium Components for Natamycin Producing by *Streptomyces lydicus* G117 // *Acta Agriculturae Boreali-*

Sinica. SINICA. — 2015. — Vol.30, N S1. — P.296-302. — doi: 10.7668/hbnxb.2015.S1.054.

11. *te Welscher Y. M, Jones L, van Leeuwen M. R., et al.* Natamycin inhibits vacuole fusion at the priming phase via a specific interaction with ergosterol // *Antimicrob Agents Chemother.* — 2010. — Vol. 54, N 6. — doi: 10.1128/AAC.01794-09.

12. *te Welscher Y. M., van Leeuwen M. R, de Kruijff B., et al.* Polyene antibiotic that inhibits membrane transport proteins // *Proc Natl Acad Sci USA.* — 2012. — Vol. 109, N 28. — doi:10.1073/pnas.1203375109.

13. *Hopsu-Havu, V. K., Nevalainen, T. J.* Electronmicroscopic Observations on Natamycin Effect in *Candida albicans* Cell Wall // *Mycoses.* — 1979. — Vol. 22. — P. 364-370. — doi: 10.1111/j.1439-0507.1979.tb01686.x.

14. *Герасимова Н. М., Кениксфест Ю. В., Кохан М. М.* Тактика врача при урогенитальном кандидозе у беременных и кандидозе кожи и слизистых у новорожденных детей (терапевтические и профилактические аспекты) // *Здоровье женщины.* — 2006. — №1. — С. 63-68.

15. *Войтова Е. В., Клиорина Т. А., Побуцкая И. И.* Пимафуцин в лечении дисбактериоза у детей // *Современная педиатрия.* — 2006. — №2. — С.62-63.

16. *Antón N, Santos-Aberturas J, Mendes MV., et. al.* PimM, a PAS domain positive regulator of pimarinic acid biosynthesis in *Streptomyces natalensis* // *J Microbiol.* — 2007. — Vol. 53. — P. 3174–3183. — doi: 10.1099/mic.0.2007/009126-0.

17. *Du YL, Chen SF, Cheng LY, et. al.* Identification of a novel *Streptomyces chattanoogensis* L10 and enhancing its natamycin production by overexpressing positive regulator ScnR11 // *J Microbiol.* — 2009. — Vol. 47. — P. 506–513. — doi: 10.1007/s12275-009-0014-0.

18. *Wu H, Liu W, Dong D, Li J, Zhang D, Lu C.* SlnM gene overexpression with different promoters on natamycin production in *Streptomyces lydicus* A02 // *J Ind Microbiol Biotechnol.* — 2014. Vol.41. — P. 163–172. — doi: 10.1007/s10295-013-1370-7.

19. *Lee KM, Lee CK, Choi SU, Park HR, et. al.* Cloning and in vivo functional analysis by disruption of a gene encoding the gamma-butyrolactone autoregulator receptor from *Streptomyces natalensis* // *Arch Microbiol.* — 2005. — Vol. 184. — P. 249–257. — doi: 10.1007/s00203-005-0047-7.

20. Jiang H, Wang YY, Ran XX, et al. Improvement of natamycin production by engineering of phosphopantetheinyl transferases in *Streptomyces chattanoogensis* L10 // Appl Environ Microbiol. — 2013. — Vol. 79. — P. 3346–3354. — doi: 10.1128/AEM.00099-13.

21. Beites T, Pires SDS, Santos CL, Osório H, et al. Crosstalk between ROS Homeostasis and Secondary Metabolism in *S. natalensis* ATCC 27448: Modulation of Pimaricin Production by Intracellular ROS // PloS ONE. — 2011. — Vol.6, N 11. — doi.org/10.1371/journal.pone.0027472.

22. Mendes MV, Tunca S, Antón N, Recio E, Sola-Landa A, et al. The two-component phoR-phoP system of *Streptomyces natalensis*: Inactivation or deletion of phoP reduces the negative phosphate regulation of pimaricin biosynthesis // Metab Eng. — 2007. — Vol. 9, N 2. — P. 217-227.

23. Wang S, Liu F, Hou Z, Zong G, Zhu X, Ling P. Enhancement of natamycin production on *Streptomyces gilvosporeus* by chromosomal integration of the *Vitreoscilla* hemoglobin gene (*vgb*) // World J Microbiol Biotechnol. — 2014. — Vol. 30. — P. 1369–1376. — doi: 10.1007/s11274-013-1561-4.

24. Wang, D., Wei, L., Zhang, Y. et al. Physicochemical and microbial responses of *Streptomyces natalensis* HW-2 to fungal elicitor // Appl Microbiol Biotechnol. — 2017.— Vol. 101, N 17. — doi: 10.1007/s00253-017-8440-0.

25. Zeng X., Miao W., Zeng H., et al. Production of natamycin by *Streptomyces gilvosporeus* Z28 through solid-state fermentation using agro-industrial residues // Bioresource Technology. — 2018. — doi:10.1016/j.biortech.2018.11.009.

26. Chen G., Lu F., Du L. Natamycin Production by *Streptomyces gilvosporeus* Based on Statistical Optimization // J Agric Food Chem. — 2008. — Vol. 56. — P. 5057–5061. — doi: 10.1021/jf800479u.

27. Yan D., Lu C., Wang J. et al. Optimization of Fermentation Medium Components for Natamycin Producing by *Streptomyces lydicus* G117 // Acta Agriculturae Boreali-Sinica. SINICA. — 2015. — Vol.30, N 1. — P.296-302. — doi: 10.7668/hbxb.2015.S1.054.

28. Пурог Т. П., Ігнатова О. А. Загальна біотехнологія: Підручник. — К.: НУХТ, 2009. — 336 с.

29. *Hasani A., Kariminik A., Issazadeh K. Streptomyces: Characteristics and Their Antimicrobial Activities // IJABBR. — 2014. — Vol. 2, N 1. — P. 63-75.*

30. *Shirling E. B., Gottlieb D. Cooperative Description of Type Strains of Streptomyces // International Journal of Systematic Bacteriology. — 1972. — Vol. 22, N 4. — P. 265-394.*

31. *Streptomyces sp. DSM 40357 // DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures Catalogue [Електронний ресурс]. — Режим доступу: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-40357>.*

32. *ATCC Streptomyces natalensis Product Sheet [Електронний ресурс]. — Режим доступу: [https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/27448.aspx?geo\\_country=ua#documentation](https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/27448.aspx?geo_country=ua#documentation).*

33. *van Keulen G., Siebring, J., Dijkhuizen L. Central Carbon Metabolic Pathways in Streptomyces. Streptomyces: Molecular Biology and Biotechnology. // Caister Academic Press.— 2011. — P. 105-124.*

34. *Whitman W. B., Goodfellow M., Kämpfer P., Busse H., et al. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 5: The Actinobacteria. // Springer Science & Business Media. — 2012. — P. 2083.*

35. *Sen A., Daubin V., Abrouk D., et al. Phylogeny of the class Actinobacteria // Int J Syst Evol Microbiol. — Vol. 64, №11. — doi:10.1099/ijs.0.063966-0.*

36. *Голубка О. В. Поширеність кандидозів, загальна характеристика збудника, особливості лабораторної діагностики // Анналі Мечниковського інституту. — 2011. — №2. — С. 51-58.*

37. *Щорічна доповідь про стан здоров'я населення, санітарно-епідемічну ситуацію та результати діяльності системи охорони здоров'я України. 2016 рік / МОЗ України, ДУ «УІСД МОЗ України». — Київ, 2017. — 516 с.*

38. *Бондаренко Т. В. Орофарингеальний кандидоз у хворих на патологію езофагогастродуоденальної зони / Т. В. Бондаренко // Гастроентерологія. — 2012. — № 46. — С. 309-318.*

39. *Сергиенко М. Ю. Современные стандарты терапии вульвовагинального кандидоза / М. Ю. Сергиенко // Здоровье женщины. — 2015. — № 6. — С. 55-58.*

40. *Степаненко В. І., Коновалова Т. С. Сучасні підходи до діагностики та лікування сечостатевого кандидозу у жінок з урахуванням особливостей клінічного*

перебігу та порушень складу мікрофлори піхви і кишечника // ДВКС. – 2007 – №1-4 (10) – С. 19-33.

41. Самсыгина Г. А. Кандидоз новорожденных детей // Педиатрия: журнал им. Г.Н. Сперанского. – 2008. – №5. – С. 111-115.

42. Kanehisa M., Goto S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes // Nucleic Acids Research. – 2000. – Vol.28, N 1. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>.

43. Kallscheuer N. Engineered Microorganisms for the Production of Food Additives Approved by the European Union—A Systematic Analysis // Front. Microbiol. – 2018. – Vol. 9. – doi:10.3389/fmicb.2018.01746.

44. van Keulen G., Siebring, J., Dijkhuizen L. Central Carbon Metabolic Pathways in *Streptomyces*. *Streptomyces: Molecular Biology and Biotechnology*. // Caister Academic Press.— 2011. — P. 105-124.

45. Приготовление рабочих растворов средства Дезекон [Електронний ресурс]. — Режим доступу: <http://www.teflex.ru/images/norm/metod-tefvetmd-pril.pdf>.

46. Инструкция по применению средства «Хлорамин-Б» [Електронний ресурс]. — Режим доступу: [http://www.niid.ru/s/210/files/instrukcii\\_dezsredstva/dezinfekciya\\_i\\_sterilizaciya/128154\\_578.pdf](http://www.niid.ru/s/210/files/instrukcii_dezsredstva/dezinfekciya_i_sterilizaciya/128154_578.pdf).

47. Засіб дезінфекційний «Бландіас-А Форте» [Електронний ресурс]. — Режим доступу: <https://blanidas.com.ua/blanidas-a-forte-20l>.

48. COSA CIP 90 Safety Data Sheet [Електронний ресурс]. — Режим доступу: [https://safetydata.ecolab.com/svc/GetPdf/COSA\\_CIP\\_90\\_English?sid=901597&cntry=US&langid=en-US&langtype=RFC1766LangCode&locale=en&](https://safetydata.ecolab.com/svc/GetPdf/COSA_CIP_90_English?sid=901597&cntry=US&langid=en-US&langtype=RFC1766LangCode&locale=en&).

49. Нормативні документи щодо застосування дезінфекційного засобу «Полідез» з метою дезінфекції та передстерилізаційного очищення виробництва ТОВ НТЦ «Вербена» [Електронний ресурс]. — Режим доступу: <http://aitas.pp.ua/upload/Polidez.pdf>.

50. Інструкція щодо застосування засобу дезінфікуючого «Велідез Ензим» з метою дезінфекції, дезінфекції високого рівня (ДВР) та передстерилізаційного

очищення [Електронний ресурс]. — Режим доступу: [http://www.disinfector.com.ua/upl/admin\\_upload/dana/velidez.pdf](http://www.disinfector.com.ua/upl/admin_upload/dana/velidez.pdf).

51. Осмотр ферментеров и биореакторов промышленной системой телеинспекции на базе противоударного квадрокоптера ELIOS [Електронний ресурс]. — Режим доступу: <https://www.pergam.ru/articles/novozymes-elios.htm>

52. Луканин А. В. Инженерная биотехнология: основы технологии микробиологических производств: Учебное пособие / Луканин А.В. - М.:НИЦ ИНФРА-М, 2016.

53. New Antifungal Substance, Pimaricin, And Method Of Producing Same: GB 846933 A, American Cyanamid Co; 07 September 1960; C12P19/626.

54. *Eisenschink, Michael A.* et al. Fermentation process for producing natamycin: United States Patent 5231014; Bio-technical, Resources; 27 June 1993, 435/76.

55. *Maldonado F. S.* et al. A process for the preparation of polyene antifungal antibiotics and new tetraene antifungal antibiotic: GB 2,106,498; 13 Apr 1983.

56. *Olson, Phillip T.* et al. Natamycin recovery: United States Patent 5,591,438; Bio-Technical Resources L.P., Manitowoc, Wis., 3 May 1994.

57. *Borden, George W.* et al. Process for natamycin recovery: United States Patent 5,942,611; Cultor Ltd., Finland, 24 Aug 1999.

58. Decanter Technology [Електронний ресурс]. — Режим доступу: [https://www.flottweg.com/fileadmin/user\\_upload/data/pdf-downloads/Zentrifugen-Technik-EN.pdf](https://www.flottweg.com/fileadmin/user_upload/data/pdf-downloads/Zentrifugen-Technik-EN.pdf).

59. Flottweg Decanter Zentrifugen [Електронний ресурс]. — Режим доступу: <https://www.flottweg.com/product-lines/decanter/>

60. *Стасевич М. В.* Обладнання технологічних процесів фармацевтичних та біотехнологічних виробництв: навч. Посібник для студ.вищ.навч.заклад./ М. В. Стасевич, А. О. Милянч, І.О. Гузьова [та ін.] ; за ред.В.П.Новікова. - Вінниця : Нова Книга, 2012. - 408 с.

61. *Gist-Brocades B.V.* Natamycin recovery : US Patent for Natamycin recovery, 6,150,143; Bierman, 21 Nov. 2000.

62. *Сидоров Ю. І., Чушинов В. І., Новіков В. П.* Процеси і апарати хіміко-фармацевтичної промисловості. – Вінниця: НОВА КНИГА, 2009. – 816 с.

63. Alfa Laval Membrane-UF System [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <https://www.alfalaval.com/globalassets/documents/products/separation/membranes/production-units/almem-uf/alfa-laval-membrane-uf-system.pdf>.

64. Nutsch Filter. Multipurpose glass pilot reactor and pilot plant [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <https://www.buchiglas.com/en/products/glass-reactors-plants-pilot-plants/nutsch-filter-10-300-liter/nutsch-filter.html>

65. STE FLUIDIZED BED DRYER [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <https://stetecpharm.com/our-products/fluidized-bed-dryers/fluidized-beddryer>.

66. Фасовочное оборудование сыпучих продуктов [Электронный ресурс]. — Режим доступа: [http://www.b2business.ru/index.php?option=com\\_content&view=article&id=355&lang](http://www.b2business.ru/index.php?option=com_content&view=article&id=355&lang).

67. *Ахметзянов А. М., Синяшин К. О.* Способ обезвоживания спиртосодержащей смеси: пат. RU(11) 2 426 716; заявл.06.04.2010; опуб.20.08.2011; Бюл.№23.

68. *Баландина А. Г., Хангильдин Р. И., Мартяшева В. А.* Каталитические процессы очистки трудноокисляемых сточных вод и их аппаратурное оформление // Баш. хим. ж. 2015. №3.

69. *Голубятников М. И., Ануфриев М. А., Бартошевич Ю. Е.* Способ утилизации мицелиальных отходов промышленности антибиотиков: пат. С05F1108. № а 2011 09738 ; заявл. 05.08.2015 ; опубл. 11.03.2016, Бюл. № 5.

70. *Перушкина Е.В., Хабибуллина А.Р., Александровский С.А.* Выбор способа очистки отработанного воздуха при культивировании спорообразующих бактерий // Вестник Казанского технологического университета. 2014. №19.

71. Воздуховоды «ЕКАФАРМ» [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <http://ekapharm.com/page-44.html>.

72. Фильтр воздушный панельный (ФВП, ФЯП, ВП) класс очистки G2-G4 из стекловолокна [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <http://www.el-vent.ru/ventilyaciya-i-kondicionirovanie/filtry-dlya-ventilyacii/gruboy-ochistki/klass-g4-eu4/filtr-vozdushnyj-panelnyj-fvp-fyap-vp-klass-ochistki-g2-g4-iz-steklovolokna/>.

73. Поршневые одноступенчатые компрессоры Dalgakiran [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <https://dalgakiran.ua/store/product/Odnostupenchatyie>.

74. Круглый водяной охладитель SALDA AVA 100 [Электронный ресурс]. — Режим доступа: [https://js.com.ua/catalog/ventiljacija\\_promyshlennaja/raskhodnye\\_mater/holod\\_voda\\_krug/ava\\_100/](https://js.com.ua/catalog/ventiljacija_promyshlennaja/raskhodnye_mater/holod_voda_krug/ava_100/)
75. Ресивер P 500.600-14 [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <https://prom-kompressors.com.ua/wp-content/uploads/2018/11/R-500.600-14.pdf>
76. Канальный нагреватель SALDA EKS [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <http://www.aeromag.com.ua/article1416.html>
77. Фильтр тонкой очистки воздуха (ФТОВ, НЕРА, ХЕПА) [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <https://tehnofilter.ua/ru/goods/view/6364274/all/filtr-tonkoj-ochistki-vozduha-ftov-hepa-hepa/>.
78. Установки автоматической мойки CIP [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <https://milesta.ua/cip>.
79. ABC Tech Дозирующее оборудование [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <https://abctech.com.ua/>.
80. Tuttnauer Vertical Autoclaves ELV D-Line [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <https://profilab24.com/en/laboratory/autoclaves/tuttnauer-vertical-autoclaves>
81. Фильтры ULPA сверхвысокоэффективной очистки воздуха типа ФяС-U классов U15-U17 [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <http://folter.com.ua/pdf/pritVozduh/fyas-s.pdf>.
82. Комплексные решения для производства биопрепаратов: Дополнительные устройства для биореакторов BIOSTAT® | аналитические методы BioPAT® [Электронный ресурс]. — Режим доступа: [http://sartorius-sd.com.ua/files/Bioreactors/Complete\\_Upstream\\_Solutions.pdf](http://sartorius-sd.com.ua/files/Bioreactors/Complete_Upstream_Solutions.pdf)
83. Bionet: Bioreactors & Fermenters Catalogue [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <https://bionet.com/technology/bioreactors-and-fermenters/>.
84. Heating agitator tanks [Электронный ресурс]. — Режим доступа: [https://www.blstank.com/en/38-product\\_show.html](https://www.blstank.com/en/38-product_show.html).
85. Мерники для измерения объема и веса жидкости ООО «ЗВАРХІМПРИЛАД» [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <https://zvarhimprylad.uaprom.net/g2046310-merniki-dlya-izmereniya>.

86. PROREACT B: Large scale sterile bioreactors [Электронный ресурс]. — Режим доступа: [https://www.frings.com/ PROREACT-B-Large-Scale.181+M52087573ab0.0.html](https://www.frings.com/PROREACT-B-Large-Scale.181+M52087573ab0.0.html).
87. Гигиенические центробежные насосы [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <https://vaterpass.ua/gigienicheskie.html>
88. Насосы PT&PTL [Электронный ресурс]. — Режим доступа: [https://tapflo.ua/images/pdf\\_uk/pt\\_ptl\\_ua.pdf](https://tapflo.ua/images/pdf_uk/pt_ptl_ua.pdf).
89. Радиальный вентилятор ВАНЦИVAN AORB 180-80 [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <http://allvent.in.ua/shop/155/desc/aorb-180-80>.
90. Калорифер паровой КПСк 2-1 [Электронный ресурс]. — Режим доступа: [https://energol.com/catalog/teploobmennoe\\_oborudovanie/kalorifery/parovoy\\_kalorifer\\_kpsk/16692/](https://energol.com/catalog/teploobmennoe_oborudovanie/kalorifery/parovoy_kalorifer_kpsk/16692/).
91. Catalogue DSM-40357 [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/DSM-40357.html>.
92. The Influence of Inoculation And The Culture Conditions Of Natamycin In Producing *Streptomyces natalensis* [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <https://www.natamycinvgp.com/the-influence-of-inoculation-and-the-culture-conditions-of-natamycin-in-producing-streptomyces-natalensis/#prettyPhoto>.
93. Wang N. S. Measurements of Cell Biomass Concentration [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <http://terpconnect.umd.edu/~NSW/ench485/lab9c.htm>.
94. Державна фармакопея України /Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». І-е вид. – Харків: ПІПЕГ, 2001. – 556 с.
95. Wang S, Liu F, Hou Z, Zong G, Zhu X, Ling P. Enhancement of natamycin production on *Streptomyces gilvosporeus* by chromosomal integration of the *Vitreoscilla* hemoglobin gene (vgb) // World J Microbiol Biotechnol. — 2014. — Vol. 30. — P. 1369–1376. — doi: 10.1007/s11274-013-1561-4.
96. Wang, D., Wei, L., Zhang, Y. et al. Physicochemical and microbial responses of *Streptomyces natalensis* HW-2 to fungal elicitor // Appl Microbiol Biotechnol. — 2017.— Vol. 101, N 17. — doi: 10.1007/s00253-017-8440-0.

97. *Thangabalani B., Vijayaraj Kumar P.* Analytical method development and validation of natamycin by RP-HPLC // *Asian J Pharm Clin R.* – 2013. – Vol. 6, N 1. – P. 134-135.

98. Megazyme Glucose Oxidase Assay Procedure [Электронный ресурс]. — Режим доступа: [https://www.megazyme.com/documents/Booklet/K-GLOX\\_DATA.pdf](https://www.megazyme.com/documents/Booklet/K-GLOX_DATA.pdf)

99. D-Glucose GOD-POD, colorimetric method. Catalogue number: AK00161 [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <https://www.nzytech.com/products-services/analytical-products/analytical-test-kits/ak00161/>

100. *The United States pharmacopeia.* National formulary. Vol. 31. Rockville (MD): United States Pharmacopeial Convention; 2017. – Collodion. – P. 1490.

101. *Code of Federal Regulations.* U.S. General Services Administration, National Archives and Records Service, Office of the Federal Register, 1993. – P. 296.

102. *Сергеева А. С., Московкин Д. Л.* Применение инфракрасных термогравиметрических влагомеров для измерения влажности // *Пищевая промышленность.* – 2013. - №10. – С. 14-16.

## ДОДАТКИ

*Додаток 1*

### **Перелік публікацій за період навчання на бакалавріаті (2018 - 2020)**

#### **Статті у міжнародних журналах:**

1. *Hrehirchak N. M., Slobodyan O. P., Tsapko S. O.* Assessment of hazards associated with instant noodles production // *SWorld Journal & D. A. Tsenov Academy of Economics*. – 2020. – V. 1, № 3. – P. 16-22.

#### **Тези у збірниках міжнародних та всеукраїнських конференцій:**

1. *Tsapko S., Krasinko V.* Optimization of Natamycin biosynthesis mediated by *Streptomyces natalensis* NRRL2651 // Матеріали 86 Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті» (м. Київ, НУХТ, 2-3 квітня 2020 р.). – Ч. 1. – С. 369.

УДК 664.694

**ASSESSMENT OF HAZARDS ASSOCIATED WITH INSTANT NOODLES PRODUCTION**  
**АНАЛІЗ РИЗИКІВ ПРИ ВИРОБНИЦТВІ ВЕРМІШЕЛІ ШВИДКОГО ПРИГОТУВАННЯ**

**Hrehirchak N. M. / Грегирчак Н. М.**  
*с.п.с., ас.проф./к.т.н., доц.*  
**Slobodyan O. P. / Слободян О. П.**  
*с.п.с., ас.проф./к.т.н., доц.*  
**Tsapko S. O. / Цапко С. О.**

*National University of Food Technologies, Kyiv, Volodymyrska 68, 01033*

*Анотація.* У статті розглянуто небезпечні фактори, які можуть становити ризики для якості вермішелі швидкого приготування. Встановлено критичні контрольні точки для кожного етапу виробництва продукції, визначено критичні межі, запропоновано попереджувальні дії, наведено сучасні методи контролю і періодичності проведення заходів для моніторингу.

*Ключові слова:* НАССР, критичні контрольні точки, якість, безпека, вермішель швидкого приготування, контроль, попереджувальні дії.

**Вступ.**

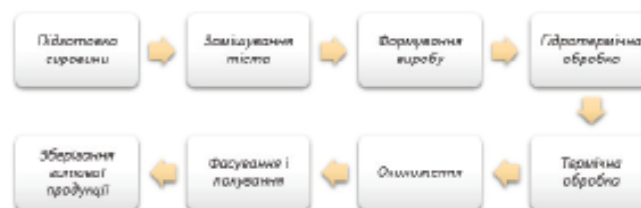
Макаронними виробами швидкого приготування називають вермішель і локшину, приготовані способом дегідратації (випарювання води), котрі мають тривалі терміни придатності і споживання. Сировиною для виробництва вермішелі швидкого приготування є пшеничне борошно, вода і збагачувачі. Від мікробіологічної якості сировини значною мірою залежать якість і стійкість готових виробів. Низький вміст вологи (11-13%) забезпечує тривале зберігання макаронних виробів [1]. Проте зниження якості продукції під впливом мікроорганізмів може спостерігатися і в процесі виготовлення, і в процесі зберігання. Причиною зазвичай служать високе обсіменіння мікроорганізмами сировини, порушення технологічного процесу, низький санітарний рівень виробництва.

Для попередження випуску неякісної харчової продукції виробництво повинне підпорядковуватись принципам НАССР – запобіжного інструмента, який зобов’язує виробника контролювати і попереджувати ризики на кожному технологічному етапі. У даній статті проаналізовано критичні контрольні точки (ККТ) у виробничому процесі, які можуть становити небезпеку для якості вермішелі швидкого приготування, запропоновано критичні межі і попереджувальні дії для кожної ККТ, а також розглянуті заходи моніторингу для виявлення критичних точок.

**Основний текст.**

Якість вермішелі швидкого приготування напряму залежить від якості використаної сировини і технології виробництва. Узагальнена схема виробництва вермішелі швидкого приготування представлена на рис. 1.

Розглянемо етапи виробництва вермішелі швидкого приготування, які мають критичне значення для безпеки і якості готової продукції.



**Рис. 1. Схема виробництва вермішелі швидкого приготування**  
*Розробка авторів*

**Вхідний контроль сировини.**

Борошно пшеничне відносять до сировини, яка не є стійкою до мікроорганізмів, що здатна викликати її псування. Зважаючи на стандартну вологість борошна 15%, а також можливість порушення умов зберігання, транспортування продукту, воно може бути уражене спорами і конідіями грибів. Проте, у подальших технологічних процесах борошно буде піддаватися термічній обробці за високої температури, яка здатна знешкодити вегетативні форми мікроорганізмів і форми їхнього спокою, тому визначення мікробіологічних показників у борошні як сировині не є доцільним [2].

Іншими біологічними показниками, які можуть впливати на якість борошна як сировини, є шкідники хлібних запасів та продукти життєдіяльності птахів, гризунів. Попереджувальними діями є щомісячний моніторинг зараженості сировини, своєчасне проведення дезінсекції і дератизації [3].

Одним із найнебезпечніших факторів ризику при виготовленні вермішелі швидкого приготування є наявність у борошні мікотоксинів. Оптимальними умовами для продукування мікотоксинів є температура 20-30 °С і відносна вологість повітря 85%. Це означає, що порушення умов зберігання зерна або борошна може стати причиною пліснявого ураження сировини і як наслідок – утворення мікотоксинів. Верхні межі вмісту мікотоксинів у борошні встановлено відповідно до регламенту комісії ЄС № 1881/2006.

Окрім контролю вмісту мікотоксинів, борошно контролюють за вмістом токсичних елементів (Pb, As, Cd и Hg), радіонуклідів (Cs-137 і Sr-90), пестицидів, а також на вміст сторонніх включень різного походження.

Питна вода, призначена для виготовлення харчової продукції, повинна відповідати таким гігієнічним вимогам: бути безпечною в епідемічному та радіаційному відношенні, мати сприятливі органолептичні властивості і нешкідливий хімічний склад. Гігієнічну оцінку безпечності та якості питної води проводять за показниками епідемічної безпеки: мікробіологічні, паразитарні показники відповідно до ДСанПіН 2.2.4-171-10. У табл.1 наведені критичні контрольні точки контролю на етапі вхідного контролю сировини.

**Вхідний контроль тари і упаковки.** Неякісний пакувальний матеріал може стати причиною забруднення або зараження готової продукції. Першим етапом вхідного контролю тари і упаковки є перевірка супроводжувальних на продукцію документів. При відсутності документів необхідно повідомити про

це постачальників. Пакувальні матеріали перевіряють на наявність сторонніх предметів, наявність пилу, забруднень продуктами життєдіяльності птахів, гризунів. Попереджувальними діями є контроль випробувального центру, дотримання вимог інструкцій з попередження потрапляння сторонніх предметів і схеми вхідного і виробничого контролю, механічна очистка тари [3] (табл.2).

Таблиця 1

№	Етап контролю	Показник	Допустимі межі		Моніторинг	
			Нижня	Верхня	Методи	Періодичність проведення
ККТ 1.	Відной шпатель сировини					
ККТ 1.1	Борошно пшеничне	Мікотоксини	Не встановлено (мг/кг)	Афлатоксин В1 – 0,005, зеаралонин - 1,0; Т-2 токсин - 1,0	Тест-система Agri-Screen Reveal і Reveal SQ	Для кожної партії
ККТ 1.2	Шкідники хлібних запасів		Відсутність		Просівання на ситах	Щомісяця
ККТ 1.3	Продукти життєдіяльності гризунів, птахів		Відсутність		Просівання на ситах	Для кожної партії
ККТ 1.4	Токсичні елементи, радіонукліди, пестициди		Відповідно до вимог ДСанПіН 8.8.1.2.3 4-000-2001		Методика ДСанПіН 2.3.2.107НВ-01	Для кожної партії
ККТ 1.5	Вода пиття	Мікробне обчислення	Не встановлено	1*10 <sup>6</sup> КУО/л, БГКП - відсутність	Мембранна фільтрація	1 раз на декаду
ККТ 1.6		Перевищення вмісту хімічних речовин	Відповідно до вимог ДСанПіН 2.2.4-171-10		Методика ДСанПіН 2.3.2.107В-01	1 раз на декаду

Розробка авторів

Таблиця 2

№	Показник	Допустимі межі		Методи	Періодичність проведення
		Нижня	Верхня		
ККТ 2.1	Мікробне обчислення поверхонь складського приміщення	Не встановлено	1*10 <sup>6</sup> КУО/см <sup>2</sup>	Аналіз змивів з поверхонь	Після санітарної підготовки
ККТ 2.2	Температурний режим	5	15	Вимірювання термометром	Під час зберігання
ККТ 2.3	Відносний вміст вологи у повітрі	60%	65%	Вимірювання гігрометром	Під час зберігання
ККТ 2.4	Наявність шкідників хлібних запасів	Відсутність		Просівання на ситах	Під час зберігання
ККТ 2.5	Наявність забруднень продуктами життєдіяльності птахів, гризунів	Відсутність		Візуальний контроль	Перед санітарною підготовкою приміщення

Розробка авторів

**Зберігання сировини і пакувальних матеріалів.** При погіршенні умов зберігання сировини (борошна) зростають ризики її зараження сторонньою мікрофлорою. Оптимальними для зберігання борошна є температура +5...+15°C і відносна вологість повітря 60 – 65 %. Основні види псування борошна, пов'язані з порушенням правил його зберігання є пліснявіння і прокисання [2,4]. Склади, призначені для зберігання борошна й крупи, повинні бути чистими, сухими, добре провітрюваними. Їх треба періодично дезінфікувати, навіть якщо немає ознак зараження шкідниками. Попереджувальними діями на даному етапі є: дотримання санітарних вимог і норм зберігання сировини, механічна очистка поверхонь, дотримання вимог інструкцій з попередження потрапляння сторонніх предметів і схеми вхідного і виробничого контролю, своєчасні процедури дератизації приміщень, щомісячний моніторинг зараженості (табл.3).

Таблиця 3

№	Показник	Допустимі межі		Моніторинг	
		Нижня	Верхня	Методи	Періодичність проведення
ККТ 3.1	Мікробне обчислення поверхонь складського приміщення	Не встановлено	1*10 <sup>6</sup> КУО/см <sup>2</sup>	Аналіз змивів з поверхонь	Після санітарної підготовки приміщення
ККТ 3.2	Температурний режим	5	15	Вимірювання термометром	Під час зберігання
ККТ 3.3	Відносний вміст вологи у повітрі	60%	65%	Вимірювання гігрометром	Під час зберігання
ККТ 3.4	Наявність шкідників хлібних запасів	Відсутність		Просівання на ситах	Під час зберігання
ККТ 3.5	Наявність забруднень продуктами життєдіяльності птахів, гризунів	Відсутність		Візуальний контроль	Перед санітарною підготовкою приміщення

Розробка авторів

**Замішування і вистоювання тіста.** Довготривале перебування тіста у тістозамішувальних і вистоювальних апаратах при підвищеній температурі сприяє активному розвитку мікроорганізмів. Одним з найнебезпечніших мікроорганізмів для якості готової вермішелі є молочнокислі бактерії (*Lactobacillus brevis*, *L. plantarum*, *L. fermenti* та ін.), які підвищують кислотність тіста, призводять до спучування тіста і, як наслідок, є причиною утворення пустот і горбистого поверхні у готових виробках. Наприклад, гомоферментативна бактерія *Lactobacillus brevis* активно росте при температурі 15 °C, і не росте при температурі більше 45 °C. Бактерія також здатна рости за концентрації солі у субстраті 4% [5]. При ферментації субстрату утворює молочну кислоту і вуглекислий газ, які і приводять до спучування макаронних виробів. Замішування і вистоювання тіста проводять за температури 15-30°C, що є оптимальною температурою для росту термофільних молочнокислих бактерій. Проте, для росту молочнокислих бактерій у тісті необхідно, щоб воно знаходилося у замішувальних і вистоювальних апаратах тривалий час [2,4]. Попереджувальними діями на даному етапі є строге дотримання норм технологічного процесу (табл.4).

Таблиця 4

ККТ на етапі замішування і вистоювання тіста					
№	Показник	Допустимі межі		Моніторинг	
		Нижня	Верхня	Методи	Періодичність проведення
ККТ 4.1	Мікробіологічна чистота обладнання	Не встановлено	$1 \times 10^2$ КУО/см <sup>2</sup>	Аналіз змивів	Після санітарної підготовки
ККТ 4.2	Молочнокислі бактерії у тісті	Відсутність		Вісія на тест-пластині "PetriFilm 6461 LAB"	1 раз на виробничій цюк
ККТ 4.3	Тривалість замішування і вистоювання	20 хв	30 хв	Перевірка часу за секундоміром	Під час процесу

Розробка авторів

**Гідротермічна і термічна обробка продукту.** Після того як тісто сформували, його відправляють на гідротермічну обробку паром і термічну обробку шляхом обжарювання. Термічна обробка паром дозволяє зменшити вологість напівфабрикату до 50-68% і знищити більшість вегетативних форм мезофільних бактерій і дріжджів. Наступний етап обробки – прожарювання у пальмовій олії при температурі, яка знижує вологість продукту до 5,5 - 6,0% і знищує залишкові спори. На даному етапі необхідно контролювати температурний режим обробки і масову частку вологи у продукті (табл.5).

Таблиця 5

ККТ на етапі гідротермічної і термічної обробки напівпродукту

№	Етап контролю	Показник	Допустимі межі		Моніторинг	
			Нижня	Верхня	Методи	Періодичність проведення
ККТ 4.4	Гідротермічна обробка	Температурний режим	98°C	100°C	Вимірювання термометром	Під час процесу
ККТ 4.5		Вміст вологи у продукті	50%	68%	Вимірювання ІЧ-воломіром	Під час процесу
ККТ 4.6		Тривалість процесу	105 с	160 с	Перевірка часу за секундоміром	Під час процесу
ККТ 4.7	Термічна обробка	Температурний режим	130°C	170°C	Вимірювання термометром	Під час процесу
ККТ 4.8		Вміст вологи у продукті	5,5%	6,0%	Вимірювання ІЧ-воломіром	Під час процесу
ККТ 4.9		Тривалість процесу	120 с	180 с	Перевірка часу за секундоміром	Під час процесу

Розробка авторів

**Охолодження продукту.** На даному етапі відбувається охолодження брикетів вермішелі на сітчастому конвеєрі у вентиляційній камері, у якій створений рівномірний повітряний потік. Для уникнення обнаєнення продукту мікрофлорою повітря, необхідно контролювати повітря на вміст спор плісневих грибів. Також контролюють вміст вологи у охолоджену продукті, оскільки далі продукт йде на фасування. Попереджувальні дії: мікробіологічний контроль повітря не рідше 1 разу на тиждень, встановлення багатоступеневої системи очищення атмосферного повітря (табл.6).

Таблиця 6

ККТ на етапі охолодження продукту

№	Показник	Допустимі межі		Моніторинг	
		Нижня	Верхня	Методи	Періодичність проведення
ККТ 4.10	Вміст спор плісневих грибів у повітрі	Не встановлено	$\leq 2,5 \times 10^3$ КУО/м <sup>3</sup>	Седиментаційний метод	1 раз на тиждень
ККТ 4.11	Вміст вологи у продукті	5,5%	6,0%	Вимірювання ІЧ-воломіром	Після процесу

Розробка авторів

**Фасування.** На етапі фасування можливий безпосередній контакт рух персоналу з готовою продукцією, що може призвести до її контамінації БГКП і *Staphylococcus aureus*. Тому персонал контролюють за дотриманням особистої гігієни, а готову продукцію після фасування перевіряють за мікробіологічними показниками. Також на даному етапі контролюють масову частку вологи у продукції, перевіряють продукцію на наявність металомігнітних домішок і сторонніх предметів. Попереджувальні дії: дотримання технологічних параметрів процесу, дотримання належних санітарних норм (табл.7).

Таблиця 7

ККТ на етапі фасування продукту

№	Показник	Допустимі межі		Моніторинг	
		Нижня	Верхня	Методи	Періодичність проведення
ККТ 5.1	Мікробіологічна чистота продукту	Не встановлено	КМАФАнМ - $\leq 1 \times 10^4$ КУО/см <sup>2</sup> БГКП - відсутність, <i>S. aureus</i> - відсутність	Вісія на відповідне позначне середовище	Для кожної нової партії
ККТ 5.2	Масова частка вологи в продукті	5,5%	6,0%	Вимірювання ІЧ-воломіром	Для кожної нової партії
ККТ 5.3	Наявність сторонніх предметів	Відсутність		Візуальний контроль	Для кожної нової партії

Розробка авторів

**Зберігання готової продукції.** Вермішель швидкого приготування є гігроскопічною і має підвищену адсорбційну здатність.

Таблиця 8

ККТ на етапі зберігання готової продукції

№	Показник	Допустимі межі		Моніторинг	
		Нижня	Верхня	Методи	Періодичність проведення
ККТ 6.1	Мікробі обсаєнення поверхонь складського приміщення	Не встановлено	$1 \times 10^3$ КУО/см <sup>2</sup>	Аналіз змивів з поверхонь	Після санітарної підготовки приміщення
ККТ 6.2	Температура у приміщенні	15°C	18°C	Вимірювання термометром	Під час зберігання
ККТ 6.3	Відносина вологість у приміщенні	60%	65%	Вимірювання гігроскопом	Під час зберігання
ККТ 6.4	Наявність пилу, продуктів життєдіяльності грибоків	Відсутність		Візуальний контроль	Після санітарної підготовки приміщення

Розробка авторів

Тому упаковану вермішель зберігають у складських приміщеннях за відносної вологості повітря 60...65 % і при температурі 15...18° С. Приміщення для зберігання макаронних виробів повинно бути чистим, сухим, добре провітраним, не зараженим амбарними шкідниками. Продукцію, упаковану в картонні ящики і мішки, вкладають у штабелі, висота яких повинна бути не більше шести ящиків або семи мішків [1]. ККТ на етапі зберігання готової продукції наведені у табл.8.

#### Висновки.

На основі проведеного аналізу ризиків, які можуть виникати на кожному етапі виробництва вермішелі швидкого приготування, було складено таблиці критичних контрольних точок, визначено критичні межі, а також запропоновано методи контролю і періодичності проведення моніторингу. Впровадження принципів HACCP на виробництві вермішелі швидкого приготування дозволяє мінімізувати ризики, які створюються небезпечними факторами на виробництві і гарантувати безпечність і якість продукції для споживача.

#### Література:

1. Назаренко В. О. Формування якості товарів / В. О. Назаренко, О. П. Юдічева, В. А. Жук. – К.: Центр учбової літератури, 2012. – 386 с.
2. Еремина И. А. Микробиология продуктов растительного происхождения / И. А. Еремина, Н. И. Лузина. – Кемерово: КемТИПП, 2003. — 87 с.
3. Акименко Е. А. Внедрение системы управления безопасностью пищевой продукции // Стандарты и качество. – 2008. – № 2. – С. 90-92.
4. Шмалько Н. А. Способы повышения биологической ценности макаронных изделий. – М.: Пищевая технология, № 5-6 – 2007. – С. 159.
5. Wheather D. M. The Characteristics of *Lactobacillus plantarum*, *L. helveticus* and *L. casei* // J. gen. Microbial. – Vol. 12. – P.133-139.

#### References:

1. Nazarenko V. O. Formation of the quality of goods / V. O. Nazarenko, O. P. Yudicheva, A. P. Zhuk. – K.: Centre of study materials, 2012. – 386 p.
2. Yeremina I. A. Microbiology of vegetable products / I. A. Yeremina, N. I. Luzina. – Kemerovo: KemTIPP, 2003. — 87 p.
3. Akimenko E. A. Adoption of food safety management system// Standards and quality. – 2008. – № 2. – P. 90-92.
4. Shmalko N. A. Methods of biological value enhancement for pasta. – M.: Food Technology, № 5 – 6 – 2007. – P.159-162.
5. Wheather D. M. The Characteristics of *Lactobacillus plantarum*, *L. helveticus* and *L. casei* // J. gen. Microbial. – Vol. 12. – P.133-139.

*Abstract. The article touches upon the issue of hazards that can jeopardize the quality of instant noodles. Much attention is given to critical control points and advanced control techniques, along with monitoring intervals.*

*Key words: HACCP, critical control points, quality, safety, instant noodles, control, preventive actions.*

Стаття відправлена: 06.02.2020 р.

© Грегірчак Н. М., Слободян О. П., Цапко С. О.

2. Optimization of Natamycin biosynthesis mediated  
by *Streptomyces natalensis* NRRL2651

Sofia Tsapko, Viktoriia Krasinko

National University of Food Technologies, Kyiv, Ukraine

**Introduction.** Over the matter of Ukraine population's rising incidence of candidiasis and demand on domestic Natamycin preparations [1], a technology adoption of the Natamycin substance production on domestic biopharmaceutical entities remains pertinent.

**Materials and methods.** Literature data and statistics were submitted to thorough analysis and used for reference in the estimation of productive capacity and selection of optimal biosynthesis conditions for Natamycin production.

**Results and discussion.** Presently, the vast majority of Natamycin preparations available in the Ukrainian pharmaceutical market are foreign-made. According to our calculations, it is required to produce 129 kg of Natamycin substance or 72 m<sup>3</sup> of cultural broth in a year for substituting a fourth of the imported Natamycin preparations with the domestic ones.

For Natamycin production on an industrial scale, it is critical to select a well-balanced and cost-effective culture medium content. The maximum Natamycin yield can be reached by cultivation in a broth medium composed of (g/l): glucose – 20.0, beef extract – 2.0, yeast extract – 2.0, asparagine – 0.5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0.05. During the first 48 hours of cultivation, the cultivation broth is complementarily supplemented by carboxylic acid salts (g/l): C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub> – 0.25, C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>NaO<sub>2</sub> – 1.75. The addition of short-chained carboxylic acid salts as the prosecutors of Natamycin biosynthesis to the cultural broth is a non-complicated and at the same time cost-effective solution for increasing antibiotic yield. The addition of acetate-propionate mixture at the 7:1 ratio at the total concentration of 2.0 g/l during the exponential phase of culture growth (during the first 24 hours) contributes to the increase in Natamycin yield to 3.0 g/l by *Streptomyces natalensis* NRRL2651 cultivation. It should be noted that Natamycin concentration in the cultural broth individually supplemented by sodium acetate or sodium propionate is significantly lower by 33% and 28% respectively. The addition of biosynthesis prosecutors during the first 12 hours of cultivation has a stimulatory effect on Natamycin yield but at the same time has a negative impact on biomass production. Supplementing the culture broth with the carboxylic salts in the stationary phase (after 72 hours) has no stimulatory effect on Natamycin production [2].

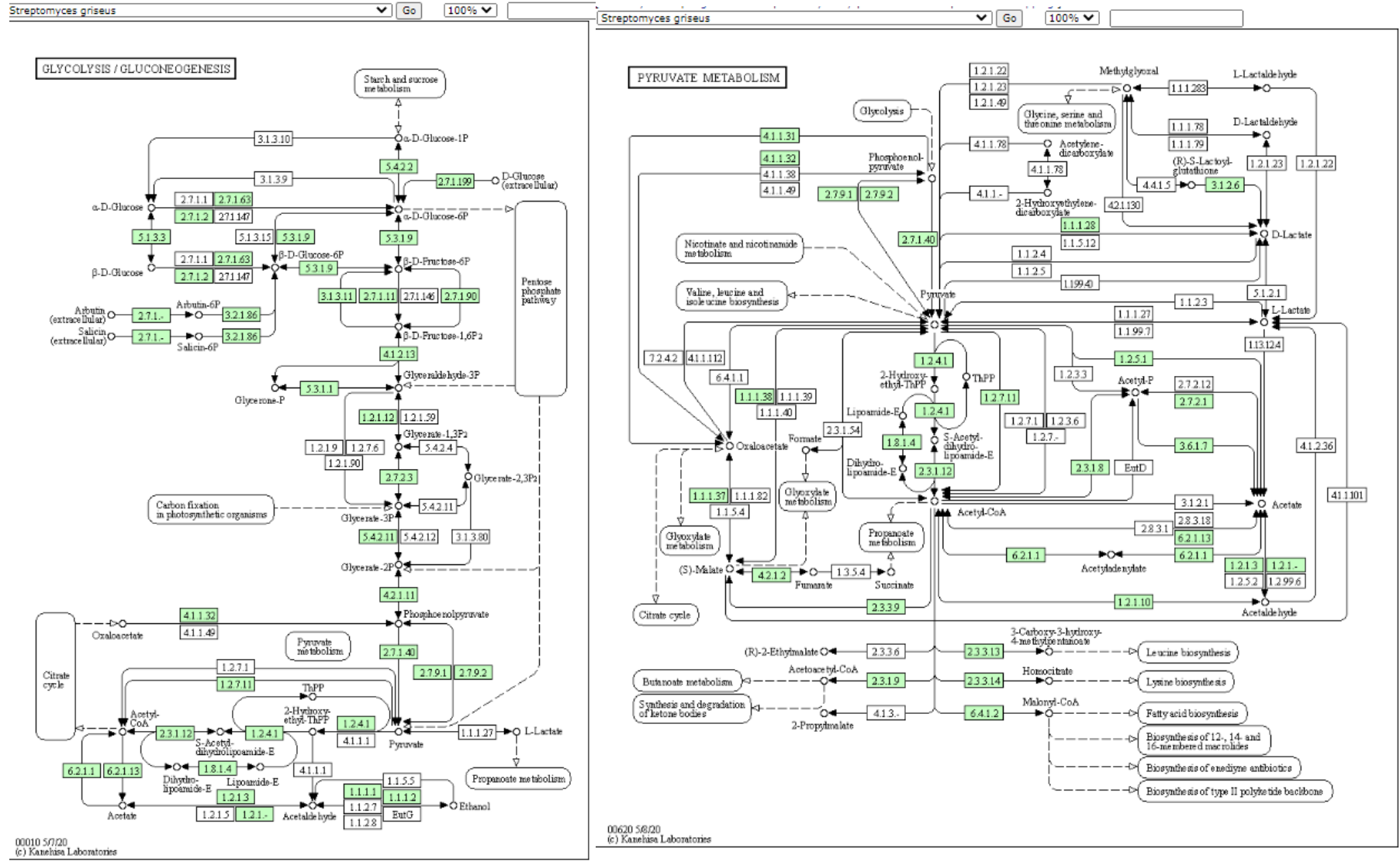
For transferring the aforementioned technology on the production scale, we suggest conducting biosynthesis in the bioreactor "Frings Proreact-8000B" at temperature – 30°C, pH – 7.0, agitation rate – to 300 rpm, aeration rate – 1.0 L/min for 84 hours. It was calculated that the adherence to the aforementioned cultivation conditions allows producing an annual quantity of Natamycin substance for 84 working days (12 weeks).

**Conclusions.** The introduction of the proposed technology of Natamycin biosynthesis offers a means of increasing an antibiotic yield for one working cycle and thereby decreasing the number of working days and total production operating expenses.

**References**

1. Голубка О.В. (2011), Поширеність кандидозів, загальна характеристика збудника, особливості лабораторної діагностики, *Аннали Мечниковського інституту*, 2, с. 51-58.
2. Elsayed A.E., Farid M., Enshasy H. (2013), Improvement in natamycin production by *Streptomyces natalensis* with the addition of short-chain carboxylic acids, *Process Biochemistry*, 48 (12), p. 1831-1832.

## Схеми біотрансформації ростового субстрату з енциклопедії KEGG для близькоспорідненого організму *Streptomyces griseus*



## Основні статті та першоджерела

Process Biochemistry 48 (2013) 1831–1838



Contents lists available at ScienceDirect

Process Biochemistry

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

Improvement in natamycin production by *Streptomyces natalensis* with the addition of short-chain carboxylic acidsElsayed Ahmed Elsayed<sup>a,b</sup>, Mohamed Abdel Fattah Farid<sup>b</sup>, Hesham Ali El Enshasy<sup>c,d,\*</sup><sup>a</sup> Zoology Department, Faculty of Science, King Saud University (KSU), Saudi Arabia<sup>b</sup> Natural and Microbial Products Department, National Research Centre, Dokki, Cairo, Egypt<sup>c</sup> Institute of Bioproduct Development (IBD), Universiti Teknologi Malaysia (UTM), Johor Bahru, Johor, Malaysia<sup>d</sup> Bioprocess Development Department, City of Scientific Research and Technology Applications, New Burg Al Arab, Alexandria, Egypt

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 5 April 2013

Received in revised form 29 August 2013

Accepted 8 September 2013

Available online 16 September 2013

## Keywords:

*Streptomyces natalensis*

Antibiotic production

Natamycin

Short-chain carboxylic acids

Submerged culture

## ABSTRACT

Natamycin is an important tetraene (polyene) antibiotic produced in submerged culture by different strains of *Streptomyces* sp. In the present work, the effects of the addition of short-chain carboxylic acids (acetic, propionic and butyric) on cell growth and the kinetics of natamycin production were investigated during submerged cultivation of *Streptomyces natalensis*. The addition of acetic and propionic acids showed stimulatory effects on natamycin production when added to the fermentation medium at concentrations below 2 g L<sup>-1</sup> at the beginning of cultivation. In addition, when acetic and propionic acids were added in a mixture (7:1) at a total concentration of 2 g L<sup>-1</sup>, antibiotic production increased significantly, reaching 3.0 g L<sup>-1</sup> (approximately 223% and 250% increases in volumetric and specific antibiotic production, respectively, compared with the control culture). Moreover, the addition of carboxylic acids not only increased the antibiotic yield but also decreased the production time from 96 h to only 84 h in shake-flask cultures. A further enhancement in natamycin production was achieved by cultivation in a 2-L stirred-tank bioreactor under controlled pH conditions. The maximum volumetric production of 3.98 g L<sup>-1</sup> was achieved after 84 h in carboxylic acid-supplemented culture (acetate and propionate in a ratio of 7:1).

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Natamycin (pimaricin, pimaricin) is a commercially important antibiotic produced in submerged culture by various strains of actinomycetes, such as *Streptomyces natalensis*, *Str. gilvosporeus*, and *Str. chattanoogensis*. This antibiotic has strong antifungal activity against various types of fungal pathogens, such as *Candida*, *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Trichoderma*. Thus, it has diverse applications in the medical field as a potent antifungal antibiotic and is used for the treatment of a variety of mold and yeast diseases, such as yeast keratomycosis [1], *Aspergillus* keratitis [2], bronchopulmonary aspergillosis [3], and various types of candidiasis [4]. This antibiotic is currently available in the pharmaceutical market in different formulas, including eye drops, ointments, and creams under various trade names, e.g., Natamycin<sup>®</sup>, Myconat<sup>®</sup>, Natamet<sup>®</sup>, and Pimafusin<sup>®</sup>. In addition, due to its low toxicity, natamycin is one of the few antibiotics that is still regarded as a GRAS (generally regarded as safe) chemical compound according to Food and

Drug Administration (FDA) guidelines. Therefore, natamycin applications are not limited to medical fields but are also extended to the food sector as a potentially safe preservative agent in the cheese, olive, meat, and fruit processing industries [5–7]. Furthermore, natamycin is also used as a natural and safe product for crop protection [8,9]. This antibiotic is mainly produced in submerged culture by strains of actinomycetes belonging to *Streptomyces* sp., such as *Str. natalensis* [10], *Str. gilvosporeus* [11,12], and *Str. chattanoogensis* [13]. Different approaches have been used to increase the antibiotic production yield to cope with its high market demand. These studies include optimization of medium composition [11,14], improvement of cultivation conditions [10,12], and strain gene manipulation by simple mutation and genetic engineering techniques to increase strain productivity [15–17].

Natamycin has the chemical formula C<sub>23</sub>H<sub>47</sub>NO<sub>13</sub>, a molecular mass of 665.725, and the Chemical Abstract Service Registry Number CAS #7681–93–8. This anti-mycotic compound consists of a large lactone ring of 22 carbon atoms linked to a mycosamine moiety, an amino sugar, by a glycosidic linkage (Fig. 1). Based on the presence of four conjugated double bonds, natamycin belongs to the polyene antibiotic group. Like other typical polyene macrolides, the biosynthesis of the natamycin basic chain follows the biosynthesis of fatty acids, which is composed of the decarboxylative

1832

E.A. Elsayed et al. / Process Biochemistry 48 (2013) 1831–1838

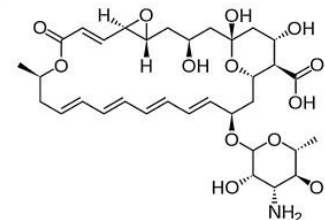


Fig. 1. Chemical structure of natamycin.

condensation of simple carboxylic acids [18]. This is performed by the repeated head-to-tail condensation of starting units, e.g., acetate, propionate or *p*-aminobenzoate coenzyme A, with a highly variable number of malonate or methylmalonate units [19], as presented in Fig. 2. After this step, polyene antibiotic biosynthesis involves the assembly and cyclization of a polyketide chain, followed by the oxidative modification, and glycosylation of the macrolactone ring [20]. Recently, a natamycin gene cluster has been identified by DNA hybridization, sequencing and analysis; the cluster spans approximately 100 kb, and contains 18 genes that encode 13 polyketide synthase (PKS) modules with 5 multifunctional enzymes (PimS0–PimS4) [21]. The PimS0 protein containing the domain structure carboxylic acid CoA ligase initiates natamycin synthesis. The CoA ligase is believed to activate the conversion of acetate to acetaldehyde, thus catalyzing the transfer of the growing polyketide chain to the acyl carrier protein ACP and feeding the acetyl moiety to the ketide synthase protein 1, PimS1, for the first elongation step [22]. Additionally, the acyltransferase on the PKS protein module 7 is thought to incorporate a propionate extender unit.

Therefore, the addition of low-molecular weight precursors such as carboxylic acids and amino acids was considered to be an inexpensive, scalable and easy approach to increase the production of different antibiotics, such as in the case of rapamycin [23], tylosin [24], pneumocandin [25], ramoplanin [26], glycopeptide antibiotic A40926 [27], bitespiramycin [28], and natamycin [29,30].

In the first part of this study, we investigated the effect of the type and concentration of short-chain carboxylic acids (acetate, propionate, and butyrate) on natamycin production. Furthermore, the optimal ratio between acetic and propionic acid in a supplemented solution was investigated to increase the stimulatory effect. After full optimization of the carboxylic acid addition strategy, the kinetics of cell growth and natamycin production in medium with and without carboxylic acid addition were investigated at the bioreactor level.

## 2. Materials and methods

## 2.1. Microorganisms

The current study was performed using the natamycin producer strain *S. natalensis* NRRL 2651. This strain was obtained in lyophilized form from ARS culture collection (Peoria, IL, USA). The strain was initially activated through cultivation for 4 days in ISP-2 broth medium composed of (g L<sup>-1</sup>): malt extract, 10.0; yeast extract, 4.0; and glucose, 4.0. The germinated spores were subcultured for 10 days in ISP-2 agar medium (prepared by the addition of 20.0 g L<sup>-1</sup> agar to ISP-2 broth). The pH of the medium was adjusted to 7.0 before sterilization. After incubation at 30 °C for 10 days, the arisen spores were collected in a 50% glycerol solution (v v<sup>-1</sup>). The harvested cell suspension was stored in 2 mL cryovials (Nalgene Nunc, Inc., Rochester, NY, USA) at –80 °C in an ultra-deep freezer as the master cell bank. To minimize intra-population and inoculum quality variations during this study, each experiment was started by revival of one glycerol vial in ISP-2 vegetative broth culture.

The viability of the stored cells was checked periodically to ensure cell stability during storage.

## 2.2. Inoculum preparation and natamycin production medium

For each experiment, 1 vial of the deeply frozen culture was removed from the freezer and activated on ISP-2 medium for 7 days at 30 °C. The arisen spores were collected in saline solution (NaCl 0.9%, w v<sup>-1</sup>) and diluted until reaching a countable level between 10<sup>5</sup> and 10<sup>6</sup> spores mL<sup>-1</sup>. Spore counts were performed using a hemocytometer slide and were used to inoculate the vegetative medium at a level of 2 × 10<sup>6</sup> spore mL<sup>-1</sup>. After 24 h of cultivation, the obtained cells were used to inoculate the production medium at a concentration of 5% (v v<sup>-1</sup>). Unless otherwise mentioned, the production medium used in this study was composed of (g L<sup>-1</sup>): glucose, 20.0; beef extract, 2.0; yeast extract, 2.0; asparagine, 0.5; and KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. The inoculation medium used in this study was composed of (g L<sup>-1</sup>): glucose, 4.0; malt extract, 10.0; yeast extract, 4.0. The pH of the medium was adjusted to 7.0 and sterilized by autoclaving at 121 °C for 15 min. Glucose was sterilized separately by autoclaving at 115 °C for 20 min and was added to the medium before inoculation. All media additives were sterilized by filtration and were added to the fermentation medium under sterile conditions.

## 2.3. Cultivation conditions

For shake-flask experiments, the cultivations were performed in 250 mL Erlenmeyer flasks with a 50 mL working volume. The inoculum was in the form of 24-h-old vegetative cells at a concentration of 5% (v v<sup>-1</sup>) as described previously. The inoculated flasks were incubated at 30 °C on a rotary shaker at 200 rpm for 96 h. Samples in the form of three flasks each were withdrawn intermittently for dry cell weight, antibiotic, and glucose determination. Cultivations in the bioreactor were performed using a 2-L stirred-tank bioreactor (Bioflo 110, New Brunswick Scientific Co., New Brunswick, NJ, USA) with a working volume of 1.2 L. The stirrer was equipped with two 6-bladed Rushton turbine impellers (*d*<sub>impeller diameter</sub>) = 52 mm; *d*<sub>tank diameter</sub>) = 125 mm, *d*<sub>d</sub>) = 1.0416. Agitation was adjusted to 300 rpm throughout the cultivation process. Aeration was performed using filtered sterile air at a rate of 1.0 v v<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>. The dissolved oxygen concentration in the culture was analyzed using a polarographic electrode (Mettler-Toledo, Urdorf, Switzerland). During cultivation, foam was suppressed by the addition of the antifoam agent Struktol (Schill + Seilacher GmbH, Hamburg, Germany).

## 2.4. Sample preparation and dry cell weight determination

Samples in the form of 3 flasks of 50 mL broth each, or 10 mL broth in the case of bioreactor cultures, were taken at different time intervals during cultivation in pre-weighed sterile Falcon centrifuge tubes (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) and were centrifuged at 5000 rpm for 20 min. A small fraction of the supernatant was frozen at –20 °C for glucose and antibiotic determination, and the remaining centrifuged cells were washed twice using distilled water, followed by centrifugation. The centrifuge tubes were then dried to a constant weight at 80 °C to determine the dry cell weight.

## 2.5. Determination of glucose

Glucose was determined enzymatically using a glucose determination kit based on the glucose oxidase–glucose peroxidase method (Glucose kit Cat No. 10009582, Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, USA). The intensity of the developed color was determined at 514 nm using a Novaspec II spectrophotometer (Pharmacia Biotech, Cambridge, England).

## 2.6. Determination of natamycin

The quantitative determination of natamycin in the culture was performed using the agar diffusion method with a natamycin-sensitive strain of *Saccharomyces cerevisiae* as a test organism. A biological standard curve was drawn between the logarithm of different concentrations of natamycin standard and the inhibition zone diameter of the standard strain as recorded after a 24-h incubation at 30 °C. The authentic sample of natamycin was kindly provided by the DSM Company (Delft, the Netherlands).

## 3. Results and discussion

## 3.1. Kinetics of cell growth and natamycin production during cultivation in submerged culture

A time course study of cell growth, glucose consumption and natamycin production in the submerged culture of *Str. natalensis* is presented in Fig. 3. As shown, there was no lag phase observed because the inoculum was in the form of an activated cell mass previously grown for 24 h in vegetative growth medium. Thus,

\* Corresponding author at: Institute of Bioproduct Development (IBD), Universiti Teknologi Malaysia (UTM), Johor Bahru, Johor, Malaysia. Tel.: +6 07 5531573. E-mail addresses: enshasy@yahoo.com, heshasy@ibd.utm.my (H.A. El Enshasy).

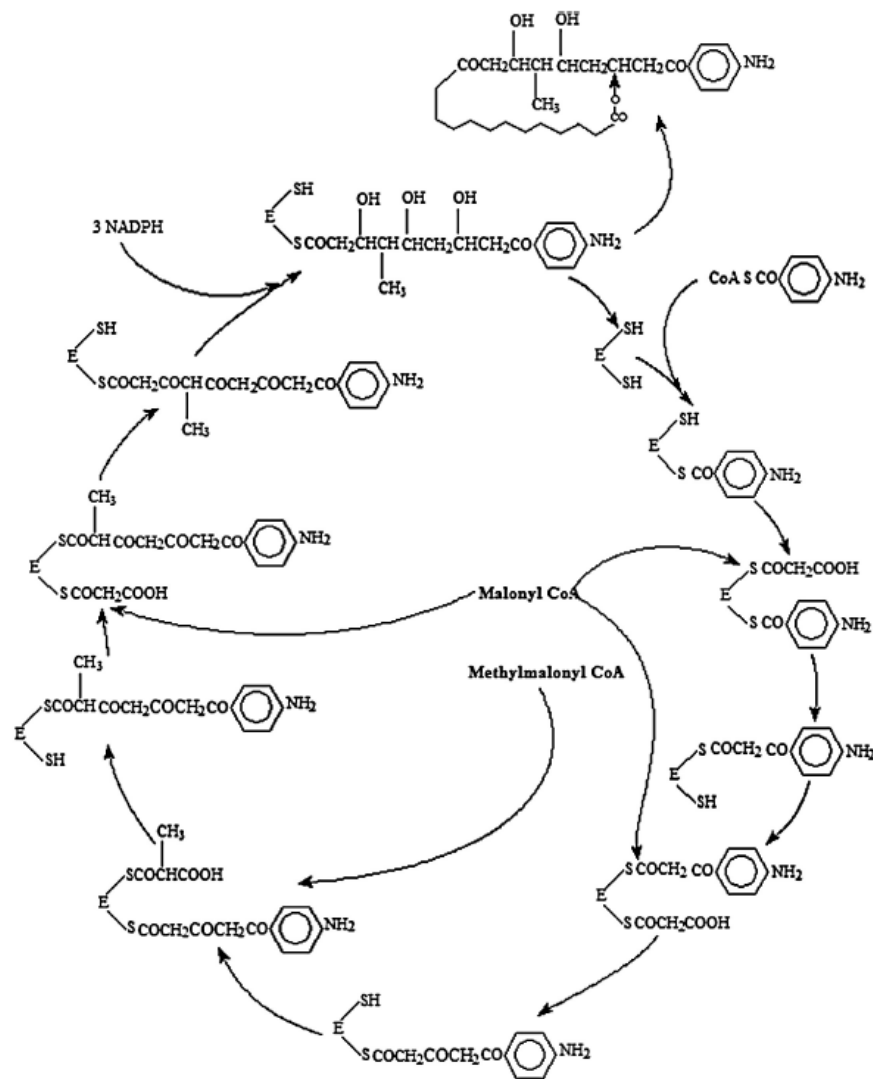


Fig. 2. Pathway for the formation of the oligoketide chain of aromatic polyene macrolide antibiotics [19].

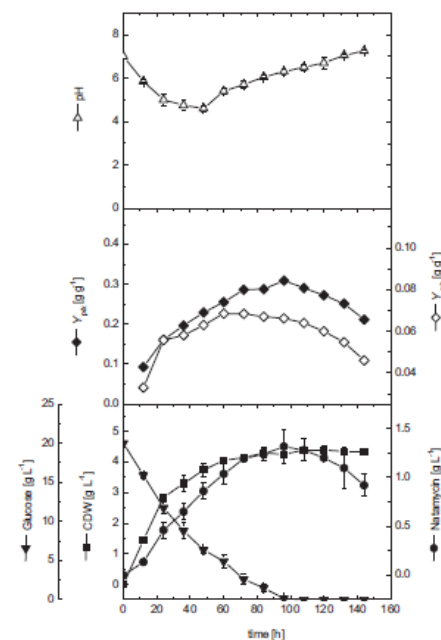


Fig. 3. Time profiles of cell growth and natamycin production during submerged shake-flask cultivation of *Str. natalensis* (values are mean  $\pm$  standard deviation,  $n=3$ ).

immediately after inoculation, cells grew exponentially with a growth rate of  $0.067 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , reaching a maximal biomass of  $4.3 \text{ g L}^{-1}$  after 84 h that was maintained more or less constantly for the rest of the cultivation. In parallel with cell growth, natamycin accumulated in the culture and was produced at a constant rate of approximately  $0.014 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , reaching  $1.31 \text{ g L}^{-1}$  after 96 h. The termination of natamycin production resulted from glucose limitation in the culture. During the active growth and production phase, glucose concentration decreased in culture with a constant rate of  $0.207 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  and reached almost zero after 96 h. Once the antibiotic reached its maximal value, natamycin decreased gradually in the culture at a low rate of  $0.008 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Although natamycin is one of the most stable antibiotics in its pure liquid form, the observed gradual decrease in antibiotic concentration in the fermentation broth could be related to microbial activity and degradation under carbon limitation. Based on these data, cultivations in the subsequent experiments were terminated after 96 h to reduce the possibility of a reduction in antibiotic concentration in the culture after its maximal concentration was reached.

### 3.2. Effect of the addition of different carboxylic acids on natamycin production

In this experiment, three parallel cultivations were conducted to investigate the effect of the addition of short-chain carboxylic acids on natamycin production. Carboxylic acids (acetic, propionic and butyric acids), in the form of sodium salts, were added

separately at the beginning of the cultivation time at different concentrations ranging from  $0.5$  to  $2.5 \text{ g L}^{-1}$ . Fig. 4 indicates that the natamycin production increased upon supplementation of the fermentation medium with acetate or propionate salts at concentrations between  $0.5$  and  $2 \text{ g L}^{-1}$ . The maximal antibiotic production of  $2.35 \text{ g L}^{-1}$  was achieved in  $2 \text{ g L}^{-1}$  propionate-supplemented culture. A further increase in propionic acid concentration resulted in a significant reduction in both cell growth and natamycin production. The addition of acetate to the fermentation medium also showed a stimulatory effect on natamycin production when added at a concentration between  $0.5$  and  $2 \text{ g L}^{-1}$ . The maximal antibiotic production of  $2.25 \text{ g L}^{-1}$  was obtained in  $2 \text{ g L}^{-1}$  supplemented culture. Like the propionate-supplemented culture, a further increase in acetate concentration beyond  $2 \text{ g L}^{-1}$  resulted in a significant decrease in both cell growth and antibiotic production. On the other hand, the stimulatory effect of butyrate on volumetric natamycin production was much lower compared with acetate and propionate. A maximal antibiotic production of  $1.65 \text{ g L}^{-1}$  was obtained in a  $1.5 \text{ g L}^{-1}$  butyrate-supplemented culture. This value was only approximately 12% higher than the antibiotic produced in the control culture without the addition of carboxylic acids. To better understand the stimulatory effect of different carboxylic acids on natamycin production, the antibiotic-specific production yields are reported in Fig. 5. As shown, the yield of antibiotic production increased gradually by increasing either acetic or propionic acid concentrations in the culture from  $0.0$  to  $2.5 \text{ g L}^{-1}$  and decreased thereafter. Thus, the increase in volumetric antibiotic production in acetate- and propionate-supplemented cultures was not related to the change in the biomass but to the increased cell productivity. However, the specific natamycin production was lower for all butyric acid concentrations than the control. Thus, the observed slight increase in antibiotic production in this culture was attributed to the higher biomass production compared with the control rather than an increase in cell productivity. Based on these results, the addition of acetic acid or propionic acid to the fermentation medium at a low concentration of  $2.0 \text{ g L}^{-1}$  was chosen as the best precursors for natamycin production in the subsequent experiments. The maximal values of volumetric natamycin production of  $2.25 \text{ g L}^{-1}$  and  $2.35 \text{ g L}^{-1}$  in cultures supplemented with  $2 \text{ g L}^{-1}$  acetate and propionate, respectively, were higher than those reported in previously published work using the same strain or its recombinant in batch culture under optimal cultivation conditions in medium without carboxylic acid addition ( $0.2 \text{ g L}^{-1}$ ; [31]), ( $1.5 \text{ g L}^{-1}$ ; [14]), and ( $1.7 \text{ g L}^{-1}$ ; [10]). In contrast, the addition of butyric acid did not show any significant effect on volumetric natamycin production at any of the concentrations applied.

The observed stimulatory effects of propionate on natamycin production were also reported in the previous study of Jing et al. [30], in which propionate increased natamycin production in a submerged culture of *Str. gilvosporeus* by approximately 82% when added to the production medium at a concentration of  $6 \text{ g L}^{-1}$ . A further increase in propionate concentration resulted in significant reductions in both cell growth and antibiotic production. In this study, *Str. natalensis* cells were more sensitive to propionate addition above  $2 \text{ g L}^{-1}$  than *Str. gilvosporeus*. In the same study [30], sodium acetate also increased natamycin production by 43% when added to the medium at a concentration as low as  $1 \text{ g L}^{-1}$ . However, *Str. natalensis* produces less biomass in culture compared with other natamycin-producing strains. Thus, the values of specific antibiotic production by *Str. natalensis* in acetate- or propionate-supplemented cultures (Table 1) were much higher than the maximal value obtained in a  $6 \text{ g L}^{-1}$  propionate-supplemented culture of *Str. gilvosporeus* ( $0.20 \text{ g g}^{-1}$ ; [30]). The positive effect of C-3 alcohol (n-propanol) on other polyketide antibiotics, such as erythromycin, was also previously reported [32]. The stimulatory effect of propionate was attributed to the induction of

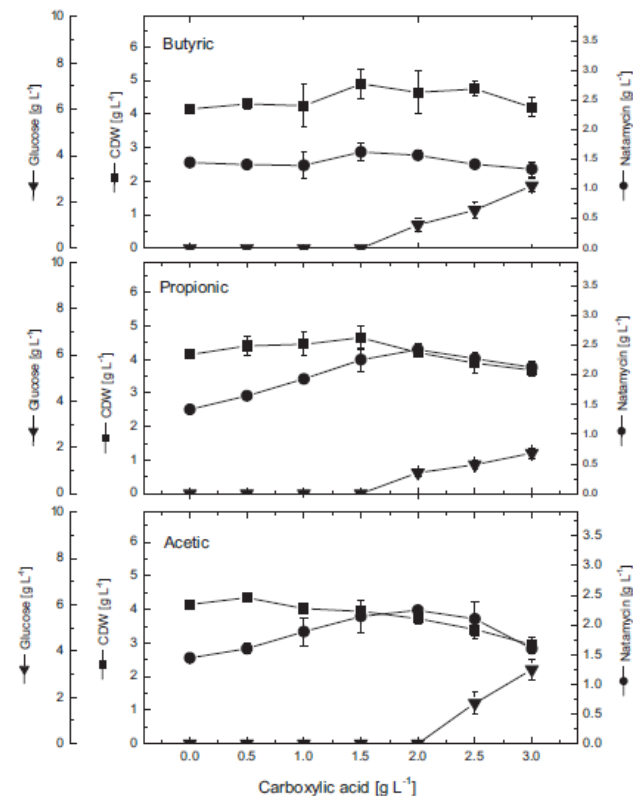


Fig. 4. Effect of different types and concentrations of short-chain carboxylic acids on biomass and natamycin production during shake-flask cultivation of *Str. natalensis*. Data were taken after 96 h of cultivation in 50 mL flasks at 30 °C and 200 rpm (values are mean  $\pm$  standard deviation,  $n=3$ ).

Table 1

Comparison of fermentation parameters for cell growth and natamycin production after the addition of carboxylic acid in shake-flask and bioreactor cultures.

Culture	Growth parameters			Production parameters			Substrate parameter		
	$X_{max}$ [g L <sup>-1</sup> ]	$dX/dt$ [g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	$\mu_{max}$ [h <sup>-1</sup> ]	$t_f$ [h]	$P_{max}$ [g L <sup>-1</sup> ]	$Q_p$ [g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	$Y_{gs}$ [g g <sup>-1</sup> ]	$t_f$ [h]	$Q_s$ [g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]
<b>Shake-flask cultures</b>									
Control	4.55 $\pm$ 0.53	0.054	0.024 $\pm$ 0.002	84	1.48 $\pm$ 0.28	0.015	0.33 $\pm$ 0.07	96	0.21
AASC	3.72 $\pm$ 0.16	0.044	0.024 $\pm$ 0.001	84	2.25 $\pm$ 0.07	0.023	0.60 $\pm$ 0.03	96	0.24
PAASC	4.20 $\pm$ 0.14	0.050	0.024 $\pm$ 0.001	84	2.35 $\pm$ 0.11	0.024	0.56 $\pm$ 0.03	96	0.24
BUASC	4.90 $\pm$ 0.42	0.058	0.024 $\pm$ 0.002	84	1.56 $\pm$ 0.08	0.016	0.34 $\pm$ 0.03	96	0.21
AA/PA SC (7:1)	3.66 $\pm$ 0.22	0.044	0.024 $\pm$ 0.001	84	3.00 $\pm$ 0.07	0.036	0.82 $\pm$ 0.05	84	0.22
<b>Bioreactor cultures</b>									
Control	5.40 $\pm$ 0.25	0.075	0.028 $\pm$ 0.001	72	1.87 $\pm$ 0.03	0.022	0.35 $\pm$ 0.02	84	0.27
AA/PA SC (7:1)	4.15 $\pm$ 0.21	0.058	0.028 $\pm$ 0.001	72	3.98 $\pm$ 0.05	0.047	0.96 $\pm$ 0.05	84	0.27

$X_{max}$ , maximal dry cell weight;  $dX/dt$ , growth rate;  $\mu_{max}$ , specific growth rate;  $P_{max}$ , maximal volumetric natamycin production;  $Q_p$ , natamycin production rate;  $Y_{gs}$ , specific natamycin production (g natamycin/g biomass);  $t_f$ , fermentation time;  $Q_s$ , glucose consumption rate; AASC, acetic acid supplemented shake-flask cultivation; PAASC, propionic acid supplemented shake-flask cultivation; BUASC, butyric acid supplemented shake-flask cultivation; AA/PA SC (7:1), acetic acid and propionic acid supplemented shake-flask cultivation at a ratio of 7:1 (all acid mixtures were supplemented at a total concentration of 2 g L<sup>-1</sup> of sodium salts).

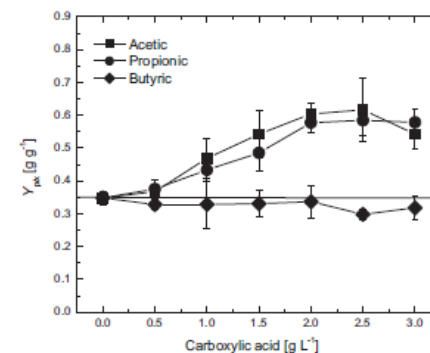


Fig. 5. Yield coefficient of natamycin production by *Str. natalensis* in cultures supplemented with different types and concentrations of short-chain carboxylic acids. The vertical straight line shows the value of the yield coefficient of the control culture (without carboxylic acid addition). Data were taken after 96 h of cultivation in 50 mL flasks at 30 °C and 200 rpm (values are mean  $\pm$  standard deviation,  $n=3$ ).

propionyl-CoA carboxylase and other polyketide synthases, thus increasing the enzyme machinery involved in the biosynthesis of the antibiotic [33].

### 3.3. Addition of carboxylic acids at different acetate:propionate ratios

Experiments were conducted to investigate the effect of concomitant addition of acetate and propionate at different ratios (acetate:propionate ratios ranging from 1:9 to 9:1). The concentration of total carboxylic acids supplemented for all ratios used was 2 g L<sup>-1</sup>. As shown in Fig. 6, cell growth decreased gradually when the acetate ratio in the mixture was increased from 1:9 to 9:1. On the other hand, the effectiveness of carboxylic acid

supplementation on natamycin production was more pronounced at all applied ratios when a mixture was used compared with single carboxylic acid experiments. The maximal volumetric natamycin production of 3 g L<sup>-1</sup> was achieved in culture supplemented with acetate:propionate at a ratio of 7:1. This value was higher than the control culture by approximately 121% and was also higher than in cultures individually supplemented with acetate or propionate by approximately 33% and 28%, respectively. However, not only was volumetric production increased, but the specific natamycin yield was also increased to 0.93 g g<sup>-1</sup> from 0.60 g g<sup>-1</sup> (acetate-supplemented culture) or 0.56 g g<sup>-1</sup> (propionate-supplemented culture). The fermentation parameters for cultures with and without the addition of carboxylic acids at different scales of cultivation are compared in Table 1. The observed stimulatory effect of the acetate:propionate mixture in this study is also supported by the early work of Gil and Martin [34], who found that during the polyketide synthesis pathway of the natamycin macrolide ring, the formation of the polyene skeleton requires 12 units of acetate and 1 unit of propionate. The positive effect of the addition of exogenous acetate and propionate on macrolide lactone ring formation is effective only in glucose-supplemented medium. Glucose usually undergoes an amination reaction and is attached to the macrolactone ring as a final stage of polyene synthesis during the secretion of the antibiotic [35]. Another study, which focused on the production of candicidin (an aromatic polyene antibiotic produced by *Streptomyces griseus*), also showed that the maximal stimulatory effect of acetate and propionate was obtained when the two were added to glucose medium at a ratio of approximately 6:1 (acetate:propionate) [36].

### 3.4. Effect of the addition time of carboxylic acids on natamycin production

In addition to the effect of the ratio of carboxylic acids on natamycin production, the time of addition also played a significant role in this enhancement effect. The maximal yield of antibiotic production was achieved when carboxylic acids were added at the beginning or during the first 48 h of cultivation. If carboxylic acids were added after 72 h (during the late exponential growth phase-early stationary phase), the positive effect of the addition of carboxylic acids on natamycin biosynthesis was almost negligible (Fig. 7). The maximal volumetric and specific natamycin production of 3.0 g L<sup>-1</sup> and 0.93 g g<sup>-1</sup>, respectively, were achieved when the carboxylic acid mixture was added after 12 h. However, cell growth was slightly influenced by the addition of carboxylic acids. It was clearly observed that the earlier the addition time, the higher the negative effect on biomass production. Once cells entered the stationary phase (after 72 h), no effect of carboxylic acids on biomass was observed. The results also showed that to achieve the stimulatory effect of carboxylic acids, they should be added to the cultivation medium during the first 24 h of cultivation. This may be because the antibiotic biosynthesis in this strain started during the exponential growth phase parallel to cell growth. This was attributed to the fact that propionic acid needs to be converted into propionyl-CoA to act as a precursor for polyene ring synthesis. The enzyme system controlling this step is more active during the exponential growth phase [30,33].

### 3.5. Batch cultivation in shake flasks with and without carboxylic acid addition

Based on the above results, cultivation with and without the addition of carboxylic acids was conducted in shake flasks to give clear and direct data concerning the stimulatory effect of carboxylic acids on natamycin production by *Str. natalensis* in submerged culture. Fig. 8 shows that immediately after inoculation, the cells

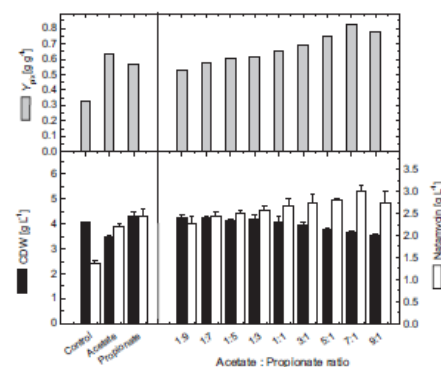
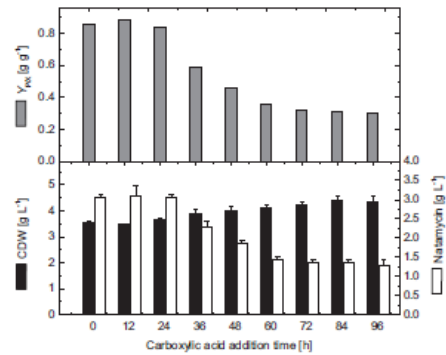
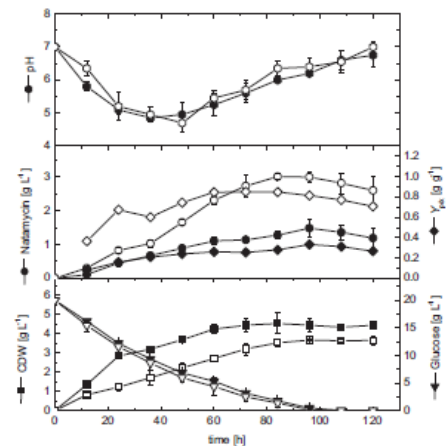


Fig. 6. Effect of different acetate:propionate ratios on cell growth and natamycin production by *Str. natalensis* in shake-flask cultivation. (Both carboxylic acids were added simultaneously as a mixture to a final concentration of 2 g L<sup>-1</sup> at the beginning of the cultivation time before inoculation.)

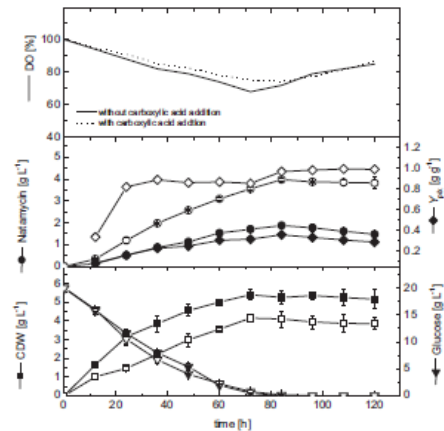


**Fig. 7.** Effect of carboxylic acid addition time on cell growth and natamycin production by *Str. natalensis* in shake-flask cultivation. (Carboxylic acids were added as a mixture of acetate and propionate at a ratio of 7:1 and a final concentration of  $2 \text{ g L}^{-1}$ .)

grew exponentially in both cultures and reached a maximal value of  $4.55 \text{ g L}^{-1}$  and  $3.66 \text{ g L}^{-1}$  after 84 h in control and carboxylic acid-supplemented cultures, respectively. However, although glucose consumption rates in both cultures were similar (Fig. 8 and Table 1), the antibiotic production rates in both cultures were different. For the carboxylic acid-supplemented culture, natamycin was produced at a rate of  $0.036 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (more than double the antibiotic production rate in the control culture) and reached a maximal concentration of  $3.0 \text{ g L}^{-1}$  after only 84 h (compared with only  $1.48 \text{ g L}^{-1}$  after 96 h in the control culture). To obtain a direct



**Fig. 8.** Kinetics of cell growth and natamycin production by *Str. natalensis* in shake-flask cultures with and without carboxylic acid addition. (Closed and open symbols correspond to results obtained in cultivations without and with carboxylic acid addition, respectively. Carboxylic acids were added as a mixture of acetate and propionate at a ratio of 7:1 and a final concentration of  $2 \text{ g L}^{-1}$  after 12 h cultivation.)



**Fig. 9.** Kinetics of cell growth and natamycin production by *Str. natalensis* in a 2-L bioreactor (working volume 1.2 L, agitation 300 rpm, aeration  $1 \text{ v v}^{-1} \text{ min}^{-1}$ , temp.  $30^\circ \text{C}$ ) with and without carboxylic acid addition. (Closed and open symbols correspond to results obtained in cultivations without and with carboxylic acid addition, respectively. Carboxylic acids were added as a mixture of acetate and propionate at a ratio of 7:1 and a final concentration of  $2 \text{ g L}^{-1}$  after 12 h cultivation.)

indication about cell performance in both cultures, the antibiotic yields were calculated. The addition of the carboxylic acid mixture increased antibiotic yield from  $0.33 \text{ g g}^{-1}$  to  $0.93 \text{ g g}^{-1}$ . Thus, the increase in volumetric natamycin production was directly related to higher cell productivity in the carboxylic acid-supplemented culture. However, the changes in the pH in both cultures were similar to typical natamycin producing actinomycetes. The pH value decreased gradually from 7 to approximately 5.5 during the first 48 h of cultivation time and increased again gradually to neutral pH after 120 h. During the growth phase, the pH drop as a result of excretion of TCA organic acids such as pyruvic,  $\alpha$ -ketoglutaric and lactic acids in low concentration. The excess carbon in medium could be used to produce organic acids if not oxidized aerobically to  $\text{CO}_2$  for energy production [37]. In the subsequent incubation period, the pH increased gradually as a result of the decrease of cell growth and the increase in antibiotic production.

### 3.6. Natamycin production during batch cultivation in a 2-L stirred-tank bioreactor with and without carboxylic acid addition

Based on the above studies, cultivations were transferred to bioreactor level to investigate the possibility of industrialization of this process. Medium composition and cultivation conditions were the same as in shake flasks. The pH of the culture was controlled at 7.0 by the continuous addition of NaOH and HCl to the culture medium. Fig. 9 shows cell growth, natamycin production and glucose concentration in culture medium in a 2-L bioreactor. During cultivation without carboxylic acid addition, the maximal cell mass was  $5.4 \text{ g L}^{-1}$ . This value was higher than the biomass obtained in carboxylic acid-supplemented culture by approximately 30%.

The maximal value of natamycin in acetate-propionate supplemented culture was  $3.98 \text{ g L}^{-1}$  after 84 h (approximately 113% higher than the control culture). In both cultures, the glucose concentration in the bioreactor decreased at a faster rate than in shake-flask cultures, and the glucose was completely consumed

after 72 h. This was because bioreactor cultivation provides better oxygen availability in the cultivation vessel due to the continuous aeration and better agitation compared with shake flasks; this increased oxygen availability is positively reflected on the physiological activity of aerobic microorganisms. The higher cell metabolic activities led to higher cell growth and antibiotic production rates compared with shake-flask culture (Table 1). In general, antibiotic production by aerobic microorganisms is usually higher in bioreactors compared with shake flasks due to the pH control of culture, better mixing, and a continuous oxygen supply, which leads to higher dissolved oxygen concentration in the culture. The increase in cell antibiotic production during bioreactor cultivation under non-oxygen-limited conditions was also reported in other processes for antibiotic production by aerobic microorganisms, such as in the case of cyclosporine production by *Tolypocladium inflatum* [38] and rifamycin production by *Amicycolatopsis mediterranea* [39]. However, the changes in dissolved oxygen DO in both cultures were similar, decreasing successively during the exponential growth phase (the first 72 h of cultivation), increasing gradually thereafter and reaching approximately 85% saturation by the end of the cultivation.

## 4. Conclusions

From the obtained results, we infer that the addition of a carboxylic acid mixture of acetic and propionic acids at a ratio of 7:1 in a total concentration of  $2 \text{ g L}^{-1}$  at the beginning of the cultivation is an easily applicable and inexpensive strategy to increase natamycin production in submerged culture by *Str. natalensis*. This approach could also be scalable for large-scale production of natamycin as it also showed higher natamycin yields in small-scale bioreactor culture. Production of other polyene antibiotics, which share the same pathway of polyene ring synthesis via the condensation of short-chain carboxylic acids, could also be improved through the addition of a short-chain carboxylic acid mixture as shown in this research. To the best of our knowledge, this is the first report using an acetate-propionate mixture as a precursor to enhance natamycin production in *Str. natalensis* at both the shake-flask and bioreactor levels.

## Acknowledgement

This work was supported by the Deanship of Scientific Research, College of Science Research Center, King Saud University. The Authors are also thankful for Research Management Centre, Universiti Teknologi Malaysia.

## References

- [1] Saleem M, Rahman A, Afza A. Natamycin treatment of experimental *Candida albicans* induced keratomycosis in rabbits. *West Indian Med J* 2007;56:526–9.
- [2] Jain V, Mhatre K, Nair AG, Shome D, Natarajan S. Aspergillus keratitis in vernal shield ulcer – a case report and review. *Int Ophthalmol* 2010;30:641–4.
- [3] Tillie-Leblond L, Tonnel A-B. Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Allergy* 2005;60:1004–13.
- [4] Christensen ES, Buch A. Vaginal *Candida albicans* treated with three different concentrations of natamycin (Pimaricin) for 6 days. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1982;61:325–8.
- [5] Pintado CMBS, Ferreira MASS, Sousa I. Control of pathogenic and spoilage microorganisms from cheese surface by whey proteins films containing malic acid, nisin and natamycin. *Food Control* 2010;21:240–6.
- [6] Arroyo-López FN, Bautista-Gallego J, Romero-Gil V, Rodríguez-Gómez F, Grillo-Ferriández A. Growth/no growth interfaces of table olive related yeasts for natamycin, citric acid and sodium chloride. *Int J Food Microbiol* 2012;155:257–62.
- [7] Blierhals ACK, da Silva MA, Kieckbusch TG. Natamycin release from alginate/pectin films for food packaging applications. *J Food Eng* 2012;110:18–25.
- [8] Dayan FE, Cantrell CL, Duke SO. Natural products in crop protection. *Bioorg Med Chem* 2009;17:4022–34.
- [9] Copping LG, Duke SO. Natural products that have been used commercially as crop protection agents. *Pest Manage Sci* 2007;63:524–54.

- [10] El-Enshary HA, Farid MA, Elsayed EA. Influence of inoculum type and cultivation conditions on natamycin production by *Streptomyces natalensis*. *J Basic Microbiol* 2000;40:333–42.
- [11] Chen G-Q, Lu F-P, Du L-X. Natamycin production by *Streptomyces griseus* based on statistical optimization. *J Agric Food Chem* 2008;56:5057–61.
- [12] Liang J, Xu Z, Liu T, Lin J, Cen P. Effects of cultivation conditions on the production of natamycin with *Streptomyces griseus* LK-196. *Enzyme Microb Technol* 2008;42:145–50.
- [13] Du Y-L, Chen S-F, Cheng L-Y, Shen X-L, Tian Y, Li Y-Q. Identification of a novel *Streptomyces chaitanogens* L10 and enhancing its natamycin production by overexpressing positive regulator ScnR11. *J Microbiol* 2009;47:506–13.
- [14] Farid MA, El-Enshary HA, El-Diwayny AI, Elsayed EA. Optimization of the cultivation medium for natamycin production by *Streptomyces natalensis*. *J Basic Microbiol* 2000;40:157–66.
- [15] Jianguo W, Min W, Dongjing Y, Lianxiang D. Screening of high natamycin producing strain *Streptomyces griseus*. *Chinese J Antibiot* 2004;29:332–4.
- [16] Liang J, Lin J, Xu Z, Su W, Cen P. Space-flight mutation of *Streptomyces griseus* for enhancing natamycin production. *Chinese J Chem Eng* 2007;15:720–4.
- [17] Luo J-M, Li J-S, Liu D, Liu F, Wang Y-T, Song X-R, et al. Genome shuffling of *Streptomyces griseus* for improving natamycin production. *J Agric Food Chem* 2012;60:6026–36.
- [18] Aparicio JF, Mendes MV, Antón N, Recio E, Martín JF. Polyene macrolide antibiotic biosynthesis. *Curr Med Chem* 2004;11:1645–56.
- [19] Gil JA, Liras P, Martín JF. The polyenes: properties, biosynthesis, and fermentation. In: Vandamme EJ, editor. *Biotechnology of Industrial Antibiotics*. New York and Basel: Marcel Dekker Inc.; 1984. p. 513–29.
- [20] Caffrey P, Aparicio JF, Malpartida F, Zoteche ZB. Biosynthetic engineering of polyene macrolides towards generation of improved antifungal and antiparasitic agents. *Curr Topic Med Chem* 2008;8:639–53.
- [21] Aparicio JF, Colina AJ, Ceballos E, Martín JF. The biosynthetic gene cluster for the 26-membered ring polyene macrolide pimaricin: a new polyketide synthase organization encoded by two subclusters separated by functionalization genes. *J Biol Chem* 1999;274:10133–9.
- [22] Martín JF, Aparicio JF. Enzymology of the polyenes pimaricin and candidin biosynthesis. In: Abelson JN, Simon MI, editors. *Methods in enzymology*, vol. 459. London, UK: Elsevier; 2009. p. 215–42.
- [23] Cheng YR, Fang R, Derman AL. Effect of amino acids on rapamycin biosynthesis by *Streptomyces hygroscopicus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 1995;43:1096–8.
- [24] Nguyen LT, Nguyen KT, Spitze J, Bihel V. The tylosin producer, *Streptomyces fradiae*, contains a second valine dehydrogenase. *Microbiology* 1995;141:139–45.
- [25] Petersen LA, Hughes DL, Hughes R, DiMichele L, Salmon P, Connors N. Effects of amino acid and trace element supplementation on pneumocandin production by *Gibberia izoyensis*: impact on titer, analog levels, and the identification of new analogues of pneumocandin B<sub>0</sub>. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2001;26:216–21.
- [26] Brunati M, Vava A, Marinelli F, Lancini G. Influence of leucine and valine on rapamycin production by *Actinoplanes sp.* ATCC 33076. *J Antibiot* 2005;58:473–8. <http://dx.doi.org/10.1038/ja.2005.63>.
- [27] Jovetic S, Ferroglio M, Marinelli F, Lancini G. Factors influencing cell fatty acid composition and A40926 antibiotic complex production in *Nonomuraea sp.* ATCC 39727. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2008;35:1131–8.
- [28] Li Z-L, Wang Y-H, Chu J, Zhuang Y-P, Zhang S-L. Effect of branched chain amino acids, valine, isoleucine and leucine on the biosynthesis of streptamycin 4-O-acetylpyromycin. *Brazil J Microbiol* 2009;40:734–46.
- [29] Liu N, Jin ZH, Luo JM, Cen PL. Effect of precursor on natamycin biosynthesis. *Chinese J Antibiot* 2005;30:328–31.
- [30] Jing K, Hao X, Lu Y. Effect of propionate on the production of natamycin with *Streptomyces griseus* XM-172. *Afr J Biotechnol* 2011;10:10030–3.
- [31] Jang B-Y, Hwang Y-I, Choi S-U. Effects of p<sub>trmM</sub> and p<sub>trmR</sub> on the increase of natamycin production in *Streptomyces natalensis*. *J Kor Soc Appl Biol Chem* 2011;54:141–4.
- [32] El-Enshary HA, Mohamed NA, Farid MA, El-Diwayny AI. Improvement of erythromycin production by *Saccharopolyspora erythraea* in molasses based medium through cultivation medium optimization. *Bioresour Technol* 2008;99:4263–8.
- [33] Bibb MJ. Regulation of secondary metabolism in *Streptomyces*. *Curr Opin Microbiol* 2005;8:208–15.
- [34] Gil JA, Martín JF. Polyene antibiotics. In: Strohl WK, editor. *Biotechnology of antibiotics*. 2nd edn. New York: Dekker; 1997. p. 551–75.
- [35] Gil J, Campelo-Díez A. Candidin biosynthesis in *Streptomyces griseus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2003;60:633–42.
- [36] Martín JF, McDaniel LE. Biosynthesis of candidin by phosphate-limited resting cells of *Streptomyces griseus*. *Eur J Appl Microbiol* 1976;3:135–44.
- [37] Ayar-Kayali H, Tarhuan L. Vancomycin antibiotic production and TCA-glyoxalate pathway depending on the glucose concentration in *Actinoplanes orientalis*. *Enzyme Microb Technol* 2006;38:727–34.
- [38] El-Enshary HA, Beshay UI, El-Diwayny AI, Omar HM, El-Kholly AE, El-Najjar R. Improvement of rifamycin production by *Amicycolatopsis mediterranea* in batch and Fed-batch cultures. *Acta Microbiol Polonica* 2003;51:301–11.

## Biotechnological production and application of the antibiotic pimaricin: biosynthesis and its regulation

Jesús F. Aparicio<sup>1</sup> · Eva G. Barreales<sup>1</sup> · Tamara D. Payero<sup>1</sup> · Cláudia M. Vicente<sup>2</sup> · Antonio de Pedro<sup>1</sup> · Javier Santos-Aberturas<sup>3</sup>

Received: 1 September 2015 / Revised: 6 October 2015 / Accepted: 11 October 2015 / Published online: 29 October 2015  
© The Author(s) 2015. This article is published with open access at Springerlink.com

**Abstract** Pimaricin (natamycin) is a small polyene macrolide antibiotic used worldwide. This efficient antimycotic and antiprotozoal agent, produced by several soil bacterial species of the genus *Streptomyces*, has found application in human therapy, in the food and beverage industries and as pesticide. It displays a broad spectrum of activity, targeting ergosterol but bearing a particular mode of action different to other polyene macrolides. The biosynthesis of this only antifungal agent with a GRAS status has been thoroughly studied, which has permitted the manipulation of producers to engineer the biosynthetic gene clusters in order to generate several analogues. Regulation of its production has been largely unveiled, constituting a model for other polyenes and setting the leads for optimizing the production of these valuable compounds. This review describes and discusses the molecular genetics, uses, mode of action, analogue generation, regulation and strategies for increasing pimaricin production yields.

**Keywords** Antifungal agent · Cheese · Gene regulation · Keratitis · Metabolic engineering · Polyene macrolide · Preservative E-235 · *Streptomyces*

Jesús F. Aparicio  
jesus.aparicio@unileon.es

<sup>1</sup> Area of Microbiology, Faculty of Biology, Universidad de León, 24071 León, Spain

<sup>2</sup> Dynamique des Génomes et Adaptation Microbienne, UMR 1128, INRA, Université de Lorraine, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy, France

<sup>3</sup> Department of Molecular Microbiology, John Innes Centre, Norwich Research Park, Norwich NR4 7UH, UK

### Introduction

Pimaricin (PIM), also called natamycin, tenneccin, natacyn and E235, is a natural product produced by given members of the genus *Streptomyces*, a class of filamentous soil-dwelling bacteria that undergo a complex life cycle involving differentiation and sporulation. It belongs to the polyene class of macrolide polyketides, and displays a strong and broad spectrum mould inhibition activity, yet being safe and effective at very low concentrations. Because its molecular target is ergosterol, an essential constituent of fungal membranes, and bacteria do not contain sterols in their membranes, it is inactive against bacteria. For the same reason, it is extremely reluctant to microbial resistance since the only way fungi would have to evade its action would be to change sterols from their membranes. For these reasons, and because of its low toxicity to mammalian cells, this molecule has become one of the major mould inhibitors used in the food industry. Its use was approved in 1967 as a cheese preservative, and since then, it has been extended to a wide variety of foods and beverages. In addition, PIM has been regarded as the most important agent in the management of fungal keratitis, a leading cause of blindness in corneal diseases, which is relatively common in warm climates and developing countries. Furthermore, it is also used as a crop protection agent to prevent mould contamination. Besides its antifungal action, it is also active against protozoa having ergosterol in their membranes.

Useful reviews about polyene macrolide biosynthesis and analogue generation are available in the literature (Aparicio et al. 2003; Aparicio et al. 2004; Caffrey et al. 2008; Kong et al. 2013). This mini-review provides a general view of the applicability of PIM, describes its particular mode of action and highlights the recent advances in the molecular genetics and metabolic engineering of its biosynthetic pathway to produce PIM derivatives with enhanced properties. It also

provides important insights about the considerable progress attained in recent years aimed to unveil the complex network of regulators involved in its biosynthesis and discusses different strategies for increasing production yields.

### Discovery and structure

PIM is a small-sized polyene antibiotic. Its name derives from the South African region of Natal ('Christmas' in Portuguese, Vasco da Gama having landed on its shores on 25 December 1497), where the first producing strain, *Streptomyces natalensis*, was isolated (Struyk et al. 1957–1958). In addition, other strains like *S. gilvosporeus*, *S. lydicus* and *S. chatanoogensis* have also been identified as PIM producers.

Its structural core is a 26-membered macrolactone ring with four conjugated double bonds (chromophore) (Fig. 1). Its tetracene nature was unveiled shortly after its discovery (Patrick et al. 1958), but its correct covalent structure was not solved until 1966 (Golding et al. 1966) and its stereochemical structure some 24 years later (Lancelin and Beau 1990). More recently, its solution NMR structure has been described (Volpon and Lancelin 2002). Like most glycosylated polyenes, its molecule contains a mycosamine (3-amino-3,6-dideoxy-D-mannose) moiety linked to the macrolactone ring via a  $\beta$ -glycosidic bond at C15. In the aglycone, the most characteristic features are the presence of an epoxide group at C4–C5, which originates from a double bond (Mendes et al. 2001, 2005); an exocyclic carboxyl function at C12 that derives from a methyl group (Caffrey et al. 2008; Martín and

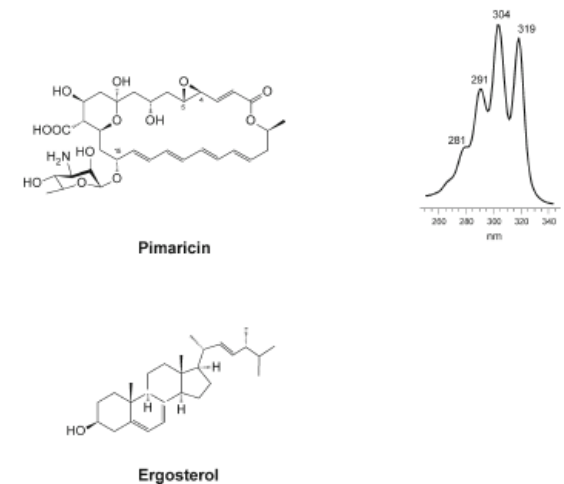
Aparicio 2009; Qi et al. 2015; Liu et al. 2015b); and an internal hemiketal ring resulting from spontaneous cyclisation between a keto group at C9 and a hydroxyl group at C13 (Aparicio et al. 2000) (Fig. 1). Because of the presence of the chromophore in its structure, PIM shows characteristic physicochemical properties, including a strong UV-visible light absorption and photolability. The UV-visible light absorption spectrum of PIM shows a characteristic shape due to its multiplex pattern (Fig. 1). Like in all polyenes, the chromophore is located opposite to a number of hydroxyl functions, making PIM strongly amphiphatic, the region where the chromophore lies has a planar and rigid lipophilic nature, whilst the hydroxylated region is typically flexible and hydrophilic (Bolard 1986). This feature allows the molecule to interact with the sterol molecules present in fungal cell membranes (predominantly ergosterol), by means of hydrophobic interactions between the hydrophobic portion of the polyene and the sterol, which results in cell death (Aparicio et al. 2004).

Because of its amphiphilic nature, it is poorly soluble in water and almost insoluble in non-polar solvents. As a powder, it is stable in the dark, with no loss of activity, but it is light sensitive in aqueous suspensions. Its CAS number is 7681-93-8.

### Bioactivity

PIM has a strong antifungal activity on most fungi (minimal inhibitory concentrations are in the micromolar range). For many years, it was thought that its mode of action on

**Fig. 1** Structures of PIM and its target ergosterol. The UV-visible absorption spectrum of PIM is also included



fungal membranes was to act as a permeabilising agent, as occurs with other polyenes (Bolard 1986). However, in clear contrast to large glycosylated polyenes like nystatin or amphotericin B that kill fungi by forming ion-permeable pores upon binding to ergosterol (Fujii et al. 1997; Baginski et al. 1997, 2006), or to the small polyene filipin which lacks the mycosamine moiety and also the carboxyl group, and is thought to interact with sterols by forming a sandwich-like structure embedded within the hydrophobic core of the lipid bilayer, which results in membrane fragmentation and cellular leakage (de Kruijff and Demel 1974; Knopik-Skrocka and Bielawski 2002), PIM blocks fungal growth by binding specifically to ergosterol but without permeabilising the membrane (te Welscher et al. 2008).

Thus, unlike other polyene antibiotics, PIM does not seem to form membrane disruption complexes and its action must be correlated with the alteration of the normal functioning of ergosterol in the fungal membrane. Ergosterol is the principal sterol in fungal cells, and has been correlated with multiple functions, including endocytosis, exocytosis, vacuole fusion, polarity and morphogenesis (Munn 2001; Kato and Wickner 2001; Heese-Peck et al. 2002; Martin and Konopka 2004; Wachtler and Balasubramanian 2006; Mysyakina and Funtikova 2007; Takeshita et al. 2008; Jin et al. 2008). Recently, Van Leeuwen et al. (2009) have proven that PIM inhibits endocytosis in germinating conidia of *Penicillium discolor* without causing extensive cell damage (i.e. without membrane permeabilisation), and Breukink and his group have also found that PIM impairs vacuole fusion via perturbation of ergosterol-dependent priming reactions that precede membrane fusion (te Welscher et al. 2010). Given that the priming phase consists solely on protein rearrangements, they pointed out to a more general mode of action such as the disturbance of ergosterol-dependent protein functions (te Welscher et al. 2010). This hypothesis was demonstrated only 2 years later, when they proved that PIM inhibits growth of yeasts and fungi via the immediate inhibition of amino acid and glucose transport across the plasma membrane by an ergosterol-dependent inhibition of transport proteins (te Welscher et al. 2012).

Because its molecular target is ergosterol, a structural constituent of fungal membranes, PIM, is extremely unlikely to provoke microbial resistance (Aparicio et al. 2004).

Besides its antifungal action, PIM has been involved in the immune response activation by triggering interleukin-1 $\beta$  secretion through activation of the NLRP3 inflammasome (Darisipudi et al. 2011). The mechanism of activation relies on the induction of potassium efflux from the cells as well as on phagocytosis-dependent lysosome destabilisation. This suggests that besides inhibiting fungal growth directly, it may also suppress fungal growth indirectly via activating innate host defence.

Additionally, this polyene has also been found to be active 'in vitro' against several protozoa such as *Trypanosoma* (Rolón et al. 2006) or *Acanthamoeba* (Sunada et al. 2014). These organisms have ergosterol-derived compounds as components of their membranes, making PIM or its derivatives also potentially useful as antiparasitic agents.

## Applications

### Therapy

PIM has found clinical application as a topical agent in the treatment of various fungal infections, including oral, intestinal or vulvovaginal candidiasis (Cevher et al. 2008). But the most important playground for PIM is in the treatment of ophthalmic mycoses. PIM was the first antifungal agent approved by the Food and Drug Administration (FDA) of the United States (in 1978); it can be used for the treatment of fungal blepharitis, conjunctivitis, scleritis and endophthalmitis (Thomas 2003) and constitutes the first-line treatment in fungal keratitis (Ansari et al. 2013). It possesses activity against a great variety of yeast and filamentous fungal pathogens, including *Alternaria*, *Candida*, *Cephalosporium*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Lasiodiplodia*, *Scedosporium*, *Trichophyton* and *Penicillium* spp. (Kaliyamurthy et al. 2004; Thomas and Kaliyamurthy 2013; Hsiao et al. 2014), and is currently considered the most effective medication against *Fusarium* and *Aspergillus* (Laliha et al. 2007). Additionally, PIM is also effective for the treatment of keratitis produced by protozoa such as *Acanthamoeba* (Sunada et al. 2014).

### Food

Because of its broad spectrum of activity, its low likelihood of causing microbial resistance and especially its low toxicity to mammalian cells (Arima et al. 2014), PIM has been widely used as a food preservative for more than 40 years (Fig. 2). It is significantly more effective than sorbate, another commonly used antifungal preservative (Shibata et al. 1991; Pipek et al. 2010). When applied on the surface of foods, it does not affect its organoleptic properties (taste, texture and colour), and has prolonged antimicrobial activity, being safe for consumption because its oral absorption is negligible (Juneja et al. 2012). It has been authorised by the European Food Safety Authority (EFSA) (additive E235), the World Health Organisation (WHO) and the FDA for protecting foods from yeast and mould contamination and possible inherent risks of mycotoxin poisoning. Notably, it is the only antifungal agent with a generally regarded as safe (GRAS) status.

Since bacterial membranes are devoid of sterols, PIM is not active against bacteria, thus making it an ideal antimicrobial during bacterial ripening and fermentation processes for fermented foods. Thus, it has been traditionally used as a

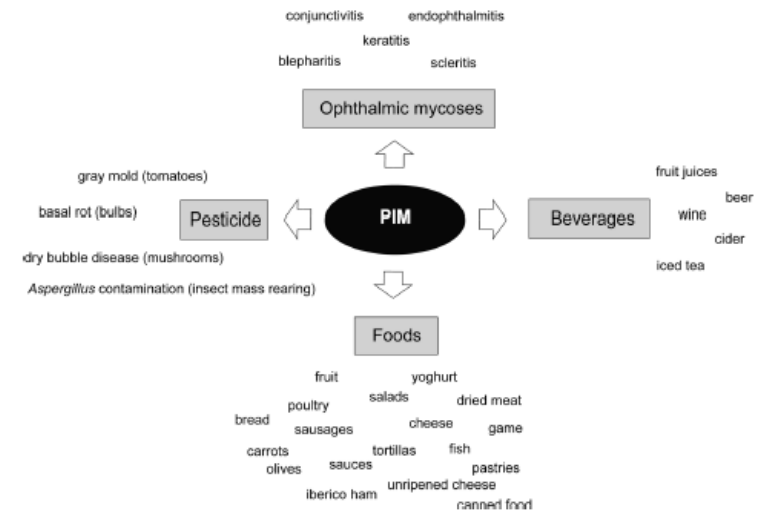


Fig. 2 Applications of PIM

preservative in cheese and cured sausage production (Stark 2003). It is used for the surface treatment of almost every type of cheese, either added as an emulsion for coating the cheese rind or applied by dipping or spraying. Under these conditions, PIM crystals remain on the surface of the product, and the soluble fraction hardly penetrates (Stark 2003), thus not interfering with the internal microorganisms that confer their organoleptic properties to these products. Sausages are treated with PIM by dipping or spraying to prevent fungal growth during ageing.

Besides its major application on cheese and sausages, PIM can also be used to prevent mould growth in yoghurt and other dairy products such as unripened cheese (e.g. cream cheese, cottage cheese and mozzarella) or whey protein cheese (e.g. ricotta), also in dried uncooked meats and in iberico and prosciutto hams. PIM can also be used to extend the shelf life of different fruit and vegetable preparations, salad mixes, baking products, sauces, fish, poultry, etc. (Fig. 2). Recently, PIM has been used to successfully inhibit the growth of fungi during natural black olive fermentation (Hondrodinou et al. 2011) and to prevent carrot spoilage in refrigerated storage facilities (de Vries et al. 2008).

Besides its direct application on foods, PIM has been successfully incorporated into different packaging films/coatings (de Oliveira et al. 2007; Pintado et al. 2010; Hamusová et al. 2010; Jiang et al. 2013b), including some that are edible (Fajardo et al. 2010), where it has proven to be gradually

released over long periods of time, thus extending the shelf life of the product. This 'active packaging' is receiving great attention, since in several countries, there are restrictions on the direct use of PIM with certain foods.

### Beverages

PIM has also been described to be very effective for controlling growth of *Aspergillus carbonarius*, the fungus responsible for contamination of wine, grapes and grape juice with ochratoxin A (one of the most abundant mycotoxins) (Medina et al. 2007). PIM is used to prevent fungal spoilage in other beverage products before their packaging, as it is effective at low concentrations, it is stable if kept protected from light and it is not affected by a wide range of pH values (Juneja et al. 2012). Regulations vary from one country to another but depending on the country; it may be used in fruit juices, beer, wine, cider or iced tea (Mann and Bauchat 2008; Siricurumata et al. 2013) (Fig. 2).

### Pesticide

Furthermore, PIM is also used as a natural and safe product for crop protection. It is used to control various fungal diseases but especially basal rots on ornamental bulbs such as daffodils that are caused by *Fusarium oxysporum* (Copping and Duke 2007). Its efficacy to control tomato gray mould disease

caused by *Botrytis cinerea* in greenhouse conditions has also been reported (Lu et al. 2008). In 2012, it has been approved as a biopesticide by the US Environmental Protection Agency for its use in enclosed mushroom production facilities to prevent dry bubble disease caused by *Lecanicillium fungicola*, a devastating pathogen in the mushroom industry. Recently, its efficacy controlling *Aspergillus niger* contamination in rice leafhopper larvae (*Cnaphalocrocis medinalis*, a *Lepidoptera* important for rice growth) mass-rearing facilities has been reported (Su et al. 2014).

Other applications include its use in selective growth media to prevent growth of yeast and filamentous fungi, such as in the isolation of *Brucella* (Stack et al. 2002) or *Legionella* spp. (Edelstein and Edelstein 1996).

### Biosynthesis and export

PIM, like other macrocyclic polyketides, is synthesised by the action of so-called type I modular polyketide synthases (PKSs) (Aparicio et al. 2003) that sequentially assemble carbon chains from small acyl precursors, in a fashion that mechanistically resembles fatty acid biosynthesis. But, whereas in fatty acid biosynthesis, each elongation step is followed by a complete set of reactions including ketoreduction, dehydration and enoylreduction; in the synthesis of PIM and other macrolides, the product of each decarboxylating condensation may undergo all, some or none of the abovementioned modifications, thus resulting in alkanes, double bonds, hydroxyl groups or ketones at defined positions of the polyketide chain. Finally, a thioesterase domain located at the C-terminal end of the last PKS (PimS4) releases the chain by lactonisation. Once the first macrolide intermediate is formed (pimaricinolide), it becomes the substrate of three functionalisation enzymes that carry out specific oxidations and a glycosylation to yield the final PIM molecule (see below).

Biosynthetic genes from *S. natalensis* were the first described for a polyene macrolide (Aparicio et al. 1999), and since then, the whole cluster responsible for the biosynthesis of PIM (*pim*) from 12 acetate and one propionate units has been thoroughly studied (Martin and Aparicio 2009) (Table 1). The cluster from another PIM producer such as *S. chattanoogensis* has been described later and named *scn* (Du et al. 2011a). The cluster from *S. natalensis* is divided into two subclusters which encode a highly complex PKS distributed in five multifunctional polypeptides (PimS0 to PimS4) harbouring 13 homologous sets of enzyme activities (modules) and a total of 60 catalytic domains (Aparicio et al. 2000). The DNA region contains 15 additional open reading frames which govern post-PKS modification of the polyketide skeleton, export and regulation of gene expression (Table 1).

Both clusters show a large degree of synteny. Compared with the *scn* cluster, the *pim* cluster contains only two major strain-specific differences, which correspond to *pimH*, an

efflux pump-encoding gene (Aparicio et al. 2000), and *pimT* that encodes an amino acid exporter (Vicente et al. 2009) involved in modulating PIM production via secretion of the PIM inducer 2,3-diamino-2,3-bis(hydroxymethyl)-1,4-butanediol (PI factor) (Recio et al. 2004). Both genes are located at the two ends of the cluster (Table 1). In turn, the *scn* cluster contains a putative transposase gene located downstream from *scnS1*, the PKS in charge of the first elongation step in polyketide construction. Interestingly, although the coding regions of the two clusters are highly conserved, the intergenic regions are much more variable, thus accounting for a different transcriptional organisation between them (Du et al. 2011a) (Table 1).

The construction of PIM macrolide skeleton is initiated by PimS0 and ends at PimS4 that thanks to its terminal thioesterase domain releases the growing chain from the enzyme and cyclises it to yield a 26-membered macrocyclic lactone (pimaricinolide) (Fig. 3). The fidelity of chain construction has been demonstrated to be dependent on *scnI* (the *pimI* orthologue from *S. chattanoogensis*). This discrete thioesterase plays an important editing role in the selection of starter acyl units and in the removal of aberrant extender units during PIM biosynthesis (Wang et al. 2014a). It can be complemented by other discrete thioesterases (Wang et al. 2014a), and it is conceivable that it could also have a complementary role with the terminal thioesterase domain of PimS4. Once the aglycone is synthesised, a cytochrome P450 enzyme, *pimG*, was proposed to catalyse an oxidation of the exocyclic methyl group at C12 via triple hydroxylations, to form a carboxyl group, yielding 12-carboxypimaricinolide (Martin and Aparicio 2009). This hypothesis has recently been proven by inactivation of *pimG* orthologue *scnG* from *S. chattanoogensis* L10 (Liu et al. 2015b). Then, the amino sugar mycosamine is attached to the macrocyclic aglycone at C15 by the glycosyltransferase *pimK* to yield 4,5-deepoxypimaricin (Fig. 3) (Mendes et al. 2005; Liu et al. 2015b), and finally, another P450 monooxygenase, *pimD*, catalyses the last oxidation step to yield an epoxy group between C4 and C5 from a double bond generated by the PKS (Mendes et al. 2001, 2005). The X-ray structure of this latter P450 has been resolved, both substrate-free and in complex with 4,5-deepoxypimaricin (Kells et al. 2010).

The mycosamine sugar is synthesised from guanosine diphosphate (GDP)-mannose derived from fructose-6-phosphate (Nic Lochlainn and Caffrey 2009). Inactivation of *pimJ* orthologue *amphDIII* in the amphotericin-producing strain *S. nodosus* resulted in accumulation of amphoteronolides demonstrating that mycosamine is biosynthesised from GDP-mannose (Byrne et al. 2003), and heterologous expression of the orthologue from nystatin biosynthesis *nysDIII* has proven that the first step in the mycosamine-specific pathway is carried out by GDP-mannose 4,6-dehydratase (Nedal et al. 2007) (Fig. 3). Thus, *pimJ* is proposed to catalyse conversion of GDP-mannose to GDP-4-keto-6-deoxymannose, which

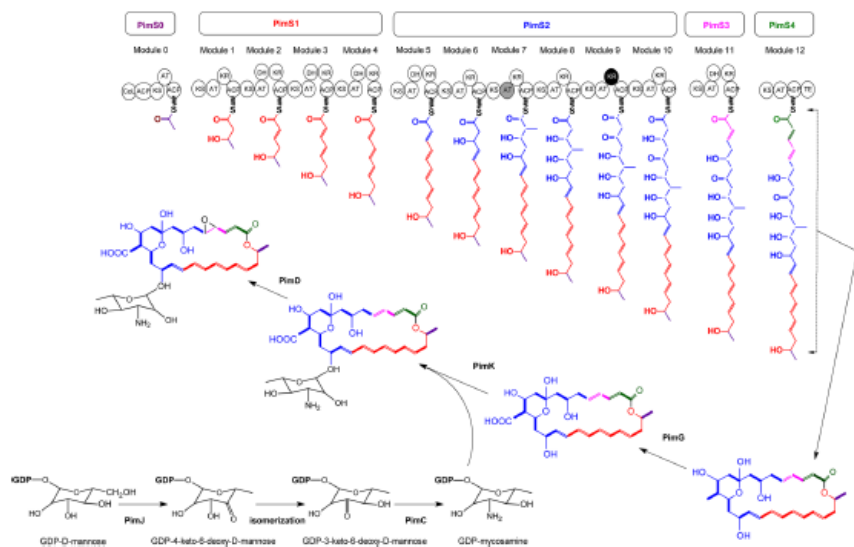
**Table 1** Comparison of PIM clusters and transcriptional units from *S. natalensis* and *S. chattanoogensis*

<i>S. natalensis</i>		Function	<i>S. chattanoogensis</i>	
Gene			Gene	
<i>pimT</i>	↑	PIM inducer PI factor secretion	A	
<i>pimM</i>	↑	PAS-LuxR regulator	<i>scnRII</i>	↑
<i>pimR</i>	↓	SARP-LAL regulator	<i>scnRI</i>	↓
<i>pimK</i>	↓	Mycosamine transferase	<i>scnK</i>	↓
<i>pimS4</i>	↑	PKS Extension module 12, cyclisation and chain release	<i>scnS4</i>	↑
<i>pimS3</i>	↑	PKS Extension module 11	<i>scnS3</i>	↑
<i>pimS2</i>	↑	PKS Extension modules 5-10	<i>scnS2</i>	↑
<i>pimI</i>	↑	Thioesterase (type II)	<i>scnI</i>	↑
<i>pimJ</i>	↑	GDP-mannose 4,6-dehydratase	<i>scnJ</i>	↑
<i>pimA</i>	↓	ABC transporter (PIM export)	<i>scnA</i>	↓
<i>pimB</i>	↓	ABC transporter (PIM export)	<i>scnB</i>	↓
<i>pimE</i>	↓	Cholesterol oxidase	<i>scnE</i>	↓
<i>pimC</i>	↓	GDP-3-keto-6-deoxymannose aminotransferase	<i>scnC</i>	↓
<i>pimG</i>	↓	P450 monooxygenase (C12 hydroxylase)	<i>scnG</i>	↓
<i>pimF</i>	↓	Ferredoxin	<i>scnF</i>	↓
<i>pimS0</i>	↓	PKS Loading module	<i>scnS0</i>	↓
<i>pimL</i>	↓	Tyrosine phosphatase	<i>scnL</i>	↓
A		Transposase	<i>tnp</i>	↑
<i>pimS1</i>	↑	PKS Extension modules 1-4	<i>scnS1</i>	↑
<i>pimD</i>	↓	P450 monooxygenase (C4,5 epoxidase)	<i>scnD</i>	↓
<i>pimH</i>	↑	PIM efflux pump	A	

Arrows indicate the organization of transcriptional units. A = absent

presumably undergoes a spontaneous 3,4-isomerisation to give GDP-3-keto-6-deoxymannose (Aparicio et al. 2003), the substrate of the aminotransferase *pimC* for biosynthesis of GDP-3-

amino-3,6-dideoxymannose (GDP-mycosamine). Finally, the glycosyltransferase *pimK* catalyses the attachment of mycosamine to the pimaricinolide (Mendes et al. 2005).



**Fig. 3** Biosynthesis of PIM. Each circle represents an enzymatic domain. ACP acyl carrier protein, AT acyltransferase, CoL carboxylic acid:CoA ligase, DH  $\beta$ -hydroxyacyl-thioester dehydratase, KR  $\beta$ -ketoacyl-ACP reductase, KS  $\beta$ -ketoacyl-ACP synthase, and TE

thioesterase. The KR domain in black (module 9) is predicted to be inactive. The AT in module 7 (grey) is predicted to incorporate a propionate extender unit. Biosynthetic pathway for mycosamine is also included. The isomerisation step is thought to be spontaneous

Due to its mode of action, PIM does not have any antibacterial activity and thus should not represent a threat to the producing organism; however, its accumulation inside the cell may be harmful, which suggests that producing organisms should ensure an active efflux. The products of three genes in the cluster might be involved in PIM export in *S. natalensis*. Two of them belong to type III ATP-binding cassette (ABC) transporter proteins, which combine both ATPase and transmembrane domains within the same polypeptide (Mendez and Salas 2001). These, *pimA* and *pimB*, are thought to associate forming a heterodimer (Aparicio et al. 2003), and their role in PIM secretion has been deduced upon inactivation of the *pimA* and *pimB* homologues, *nysH* and *nysG*, which encode the nystatin ABC heterodimer transporter. Such mutants still exported some amount of nystatin, suggesting the existence of alternative transport systems for this antifungal antibiotic (Sletta et al. 2005). Such alternative transport system, in the case of PIM, could be constituted by the putative efflux pump encoded by *pimH* (Aparicio et al. 2000).

#### Metabolic engineering and semi-synthetic derivatives

In the search for improvement of PIM properties, a good number of semi-synthetic derivatives have been described in the

literature, including esters (Bonner et al. 1972; Falkowski et al. 1979), N,N-dialkyl (Paquet and Carreira 2006), N-alkyl (Suloff et al. 2003), N-acyl (Nirgudkar et al. 1988), N-glycosyl (Falkowski et al. 1980), N-aryl (Belakhov et al. 2010) and hydrophosphoryl derivatives (Belakhov et al. 2008), amongst others. Liposomal preparations have been also studied (Bouaoud et al. 2015).

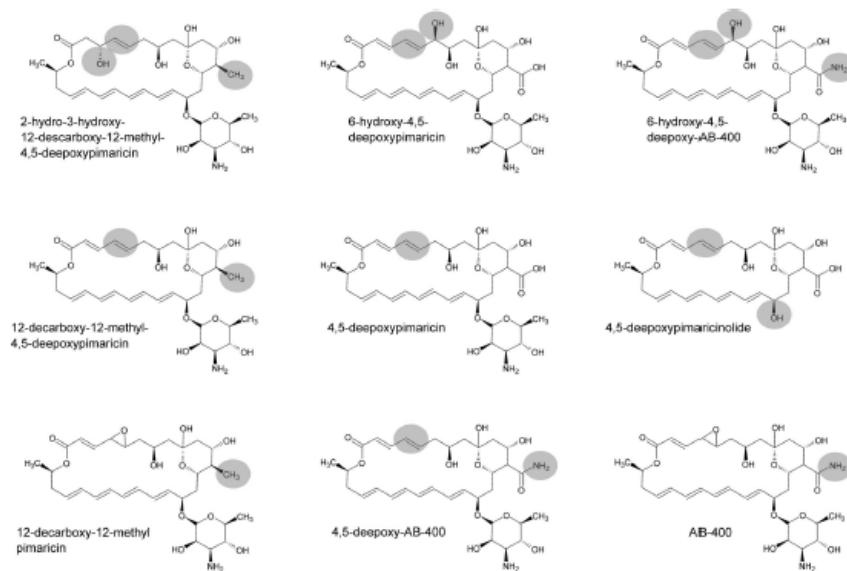
Moreover, the knowledge of PIM biosynthetic pathway, and the development of an efficient conjugation system for *S. natalensis* (Enriquez et al. 2006), has allowed the generation, by genetic manipulation, of a number of less toxic or more water-soluble derivatives (Caffrey et al. 2008; Kong et al. 2013).

The first PIM derivative obtained by genetic engineering of *S. natalensis* was its immediate precursor, 4,5-deepoxypimaricin (DEP) (Mendes et al. 2001). This was obtained by disruption of *pimD*, the gene encoding the cytochrome P450 monooxygenase responsible for epoxidation at C4-C5 that constitutes the last step of PIM biosynthesis (Mendes et al. 2005; Kells et al. 2010). This compound showed a clear decrease in antifungal activity, thus highlighting the importance of the epoxide group in the interaction of PIM with the fungal membrane. Recently, it has been shown that DEP can be accepted as a substrate by *nysL*, the *pimD* homologue

responsible for the introduction of the last hydroxylation in the biosynthesis of nystatin (Volkhan et al. 2006), thus generating 6-hydroxy-4,5-deepoxypimaricin (6-OH-DEP) (Santos-Aberturas et al. 2015), which does not show an improvement in antifungal activity compared to DEP. Additionally, it has been shown that both DEP and 6-OH-DEP can undergo carboxamidation reactions catalysed by the amidotransferase PscA, thus resulting in carboxamidated derivatives (4,5-deepoxy-AB-400 and 6-hydroxy-4,5-deepoxy-AB-400, respectively; see Fig. 4) exhibiting improved antifungal activity in comparison with their carboxylated precursors (Santos-Aberturas et al. 2015). PscA and its homologous protein, PscB, are responsible for the natural occurrence of tetraene carboxamidated compounds (Seco et al. 2005, 2010; Miranzo et al. 2010), including AB-400, the PIM carboxamidated derivative (Cañedo et al. 2000). PscA has shown a much broader substrate that scope PscB, a fact that makes it a stronger candidate for the development of future polyene derivatives (Seco et al. 2010; Santos-Aberturas et al. 2015).

The recent manipulation of the PIM biosynthetic pathway in *S. chatanoogensis* has led to the production of new PIM derivatives by knocking out *scnG*, which encodes the P450 monooxygenase (homologous to *pimG*) proposed to be

responsible for the formation of the carboxyl exocyclic group (Martin and Aparicio 2009) (Fig. 3). This gene disruption resulted in the accumulation of 4,5-deepoxy-12-decarboxy-12-methyl PIM, thus indicating that glycosyltransferase *scnK* is able to add the mycosamine moiety to the decarboxylated aglycone whilst *scnD* is unable to introduce the epoxide group (Fig. 3) (Liu et al. 2015b). In contrast, the inactivation of the same gene by Qi et al. (2015) resulted in accumulation of 12-decarboxy-12-methyl PIM in addition to that of 4,5-deepoxy-12-decarboxy-12-methyl PIM (Fig. 4), thus suggesting that *scnD* might be able to introduce the epoxide group to some extent. 12-Decarboxy-12-methyl PIM might be interesting since it shows decreased haemolytic effects together with a twofold increase of the original PIM antifungal activity levels (Qi et al. 2015). These authors have also characterised the bioactivity of 4,5-deepoxy-12-decarboxy-12-methyl PIM, showing that it maintains the PIM antifungal activity whilst exhibiting a decreased haemolytic effect. Interestingly, the mutant obtained by Qi et al. (2015) also accumulated the non-antifungal and non-haemolytic 2-hydro-3-hydroxy-4,5-deepoxy-12-decarboxy-12-methyl PIM (Fig. 4), suggesting that the *scnG*-catalysed carboxylation might occur during the PKS assembly and not after it. In addition, the disruption of



**Fig. 4** PIM derivatives obtained by metabolic engineering of the biosynthetic gene cluster. The grey circles highlight structural differences from the original PIM molecule



US005942611A

**United States Patent** [19]  
**Borden et al.**

[11] **Patent Number:** **5,942,611**  
 [45] **Date of Patent:** **Aug. 24, 1999**

[54] **PROCESS FOR NATAMYCIN RECOVERY**

[75] Inventors: **George Wayne Borden**, Cape Haze, Fla., **John Michael Maher**, East Lyme, Conn., **Constantine Sklavounos**, Waterford, both of Conn.

[73] Assignee: **Cultor Ltd.**, Finland

[21] Appl. No.: **08/696,841**

[22] PCT Filed: **Jan. 19, 1995**

[86] PCT No.: **PCT/IB95/00040**

§ 371 Date: **Aug. 28, 1996**

§ 102(e) Date: **Aug. 28, 1996**

[87] PCT Pub. No.: **WO95/27073**

PCT Pub. Date: **Oct. 12, 1995**

[51] **Int. Cl.**<sup>6</sup> ..... **C07H 1/00**

[52] **U.S. Cl.** ..... **536/127; 536/6.5; 536/16.9**

[58] **Field of Search** ..... **536/6.5, 127, 16.9**

[56] **References Cited****U.S. PATENT DOCUMENTS**

3,378,441	4/1968	Bridge	536/127
3,892,850	7/1975	Struyk et al.	435/76
4,568,740	2/1986	Oppici et al.	536/7.5
5,231,014	7/1993	Eisenschink et al.	435/76

**FOREIGN PATENT DOCUMENTS**

846933	9/1960	United Kingdom
2106498	4/1983	United Kingdom
9210580	6/1992	WIPO
9507998	3/1995	WIPO

*Primary Examiner*—Elli Pescelev

[57] **ABSTRACT**

A new process for recovering high purity natamycin from fermentation broth containing natamycin comprises the steps of adjusting the pH of the broth to above about 10 and adding an amount of a water-miscible solvent, such as isopropanol, sufficient to dissolve the natamycin in the broth, followed by removing insoluble solids from the pH-adjusted broth, followed by lowering the pH of the broth to a level sufficient to precipitate the natamycin, and removing the natamycin from the broth.

**12 Claims, No Drawings**

**1**  
**PROCESS FOR NATAMYCIN RECOVERY**

**BACKGROUND OF THE INVENTION**

Natamycin, also known as pimaricin, was first isolated in 1955 from the fermentation broth of a culture of *Streptomyces natalensis* obtained from soil taken near the town of Pietermaritzburg in Natal, South Africa. (A. P. Struyk et al, *Antibiotics Annual*, 878 (1957-1958)). Pimaricin, designated natamycin by the WHO, is produced either from *Streptomyces natalensis* or *Streptomyces gilvosporeus*.

Early patents describe recovery processes requiring multiple purification steps and involving relatively expensive unit operations. British patent GB 846,933 discloses an adsorption/elution recovery of natamycin from fermentation broth using water miscible polar solvents such as methanol, butanol and acetone. U.S. Pat. No. 3,892,850 discloses recovery from fermentation broth by extraction into an organic solvent having limited water miscibility, followed by recovery from the solvent. U.S. Pat. No. 3,378,441 claims recovery of natamycin by salting it out of fermentation broth followed by solvent dissolution and evaporative precipitation. A later patent, GB 2,106,498, describes vacuum concentration or butanol extraction of filtered fermentation broth to obtain a raw antifungal complex from which natamycin can be isolated. WO 92/10580 discloses solubilization of natamycin with methanol at low pH, followed by removal of broth solids. Under these conditions, natamycin is susceptible to acid degradation, with potential for depressed recovery yield and reduced product purity. Thus, the prior art does not teach an efficient method for recovery of high quality natamycin.

**SUMMARY OF THE INVENTION**

The present invention concerns a new, simple and efficient process to recover high quality natamycin from fermentation broth using a substantially water-miscible solvent at alkaline pH. Specifically, natamycin is recovered from the fermentation broth via a process comprising the steps:

- adjusting the pH of the broth to greater than about 10 and adding an amount of a substantially water-miscible solvent sufficient to dissolve the natamycin in the broth;
- removing insoluble solids from the pH-adjusted broth;
- lowering the pH of said broth to a level sufficient to precipitate the natamycin from the broth; and
- removing the natamycin from the broth.

In its preferred embodiment, the pH of the broth is adjusted to between 10 and 11 in step a) and to between 5.5 and 7.5 in step c). Any of several methods may be used in steps b) and d), for example, centrifugation, depth filtration and crossflow filtration, with a preferred method being crossflow filtration. It is preferred that, prior to the recovery process, the fermentation broth is concentrated, for example, to a concentration of from 10 to 50% solids, on a weight/volume basis. For greater stability of the natamycin during the recovery process, an antioxidant such as BHA, BHT, ascorbic acid or sodium erythorbate can be added.

**DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION**

The production of natamycin by fermentation is well known. The aforementioned British patent, GB 846,933, is representative and discloses the production of natamycin via fermentation using *Streptomyces gilvosporeus*. The fermentation method itself is not critical to the present invention.

Fermentation broth containing natamycin may be concentrated, if desired, through any suitable method such

5,942,611

**2**

as evaporation, depth filtration, crossflow filtration or centrifugation, with a preferred method being crossflow filtration. Concentration to a range of about 10 to 50% solids on a weight/volume basis is preferred. During concentration, the broth may be heated to a range of 50 to 70° C. to improve evaporation or filtration rate.

The broth is then adjusted to a pH greater than about 10, preferably between about 10 and about 11, using an appropriate basifying agent such as, for example, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, KOH, NaOH, or a combination thereof. Depending on the degree of water removal in the concentration step, dilution of the concentrate with water or a water-miscible solvent may be necessary to facilitate agitation during the pH adjustment. Further, a substantially water-miscible solvent is added to the pH-adjusted concentrate in an amount sufficient to solubilize natamycin. Suitable water-miscible solvents include, for example, ethanol, propanol, isopropanol, acetone, tetrahydrofuran and combinations of the foregoing. Of these, isopropanol is preferred. Typically, one to two volumes of isopropanol is required per volume of concentrate.

Although the solubility of natamycin is low in either water or isopropanol ("Solubility of Antibiotics in Twenty-Six Solvents," Journal of the Association of Official Analytical Chemists, vol. 50, no. 2, 1967), it is soluble at 40 to 120 g/l or more in the solvent mixture at elevated pH. Although the literature reports that natamycin is unstable at alkaline pH (H. Brik in "Analytical Profiles of Drug Substances"), in fact it is reasonably stable under the conditions of the present invention. If desired, stability can be further improved through addition of antioxidants such as ascorbic acid, erythorbic acid, BHA and BHT, at levels up to about 0.2 weight percent of the natamycin activity. Under the conditions of low pH recovery processes such as that disclosed in WO 92/10580, natamycin is susceptible to rapid activity loss and to the formation of natamycin analogs which are not readily separated from natamycin.

Inactive broth solids are removed from the natamycin solution by any of several methods such as depth filtration, crossflow filtration, or centrifugation. If desired, the solids may be washed, for example with 40 to 60% aqueous isopropanol, to extract residual natamycin activity and improve recovery yield. Crossflow filtration is a preferred method for removal of broth solids. Crossflow filtration, as defined by J. M. Walker and M. Cox in "The Language of Biotechnology" (American Chemical Society, Washington, D.C., 1988) is "an operating regime for a filtering device in which the main fluid flow is parallel to the filter, such that the fluid passes through the filter perpendicular to the main flow. This regime minimizes the buildup of filter cake and also the consequential reduction in filtration rate. It allows rapid filtration without the need for filter aids or flocculants." In the process claimed herein, crossflow filtration gives rapid filtration rates and high final solids concentrations without addition of filter aids. The ceramic filter elements which are used allow high crossflow rates, imparting an effective sweep of the filtration surfaces. They can be used at high temperatures, allowing further flux enhancement. Their stability to harsh pH and temperature conditions facilitates frequent cleaning, and they can be backpulsed during operation to minimize plugging.

The pH of the product-rich solution is then adjusted with a suitable acid such as hydrochloric acid to effect precipitation of natamycin. The choice of acid is not critical; for economy and simplicity, hydrochloric acid is preferred. The precipitated natamycin crystals are then isolated by an appropriate method such as, for example, depth filtration,

crossflow filtration or centrifugation. This can be followed by further known purification steps, for example, washing with a water-isopropanol mixture followed by drying. Isolation of natamycin by centrifugation or crossflow filtration requires that the filtration mother liquor be displaced with a wash of similar solvent composition to avoid precipitating water-insoluble impurities. The dry product typically has a purity of at least 94% on an anhydrous basis. Recovery yields of 40–70% are typical. Crossflow filtration, as defined above, is a preferred method for isolation of natamycin, giving rapid removal of the mother liquor and wash liquid. The product in this case is a concentrated crystal slurry which can be converted to a dry solid by any of a number of methods, for example, evaporation or spray drying.

In crystalline form, natamycin is temperature stable (H. A. Morris, et al., *Cultured Dairy Products Journal*, p 23, (August 1978)). Sustained drying temperatures of 70° C. are acceptable as long as the product moisture is not driven below about 6%. Natamycin normally exists as a trihydrate. Anhydrous natamycin is less stable than the hydrate, so excessive drying adversely affects product purity.

Dry product purities of 94 to 99% (calculated on an anhydrous basis) and recovery yields of 40 to 70% are typically achieved through the inventive recovery process.

#### EXAMPLES

##### Example 1

On a rotary evaporator, 1027 ml of fermentation broth with a natamycin concentration of 10.5 g/l, was concentrated to 500 ml. The pH was adjusted to 10.5 with 10 M sodium hydroxide, and 500 ml of isopropanol was added. The mixture was stirred for about two hours, then centrifuged. The clear dark natamycin-rich solution was decanted, adjusted to pH 6.5–7.5 with 12 M hydrochloric acid, and allowed to crystallize for several hours. Natamycin crystals were isolated by centrifugation, transferred to a filter funnel with 40 ml of 1:1 water-isopropanol, filtered, washed with three 20 ml portions of 1:1 water-isopropanol, and dried to constant weight at 35° C. in a vacuum oven, yielding 8 g of natamycin solids which were 96.2% pure on an anhydrous basis. The yield from broth was 69%.

##### Example 2

A 10.2 liter portion of fermentation broth concentrate with a natamycin concentration of 134 g/l, was adjusted to pH 10.6 by addition of 1100 g of sodium carbonate, 140 ml of 50% sodium hydroxide solution, and sufficient water (1.3 l) to allow the heavy concentrate to be mixed during pH adjustment. To the resulting slurry, 6 kg of isopropanol containing 6 g of BHA was added, and the mixture was stirred to dissolve natamycin. Broth solids were removed by crossflow filtration at 25–30° C. During this operation, as the retained slurry of broth solids thickened, 10 l of 1:1 isopropanol-water was added to wash out residual natamycin. The filtrate was adjusted to pH 6.6 with 5 M hydrochloric acid, and natamycin was allowed to crystallize for 1–2 hours. Natamycin was isolated by filtration on a Buchner funnel, washed with about 500 ml of 40:60 isopropanol-water followed by about 500 ml of water, and dried in a laboratory hood to 550 g of natamycin solids which were

greater than 97% pure on an anhydrous basis. The yield from broth concentrate was about 40%.

#### Example 3

A 9600-gallon volume of fermentation broth containing 1.06% natamycin was concentrated to a volume of 535 gallons by crossflow filtration at 55–60° C. During this operation, as the retained slurry thickened, 915 gallons of water was added as a wash. When the retained washed broth concentrate was no longer filterable, it was adjusted to pH 10.6 with sodium carbonate and sodium hydroxide, 8000 kg of isopropanol was added to dissolve natamycin, and one pound of sodium erythorbate was added to protect against oxidation. Broth solids were removed by crossflow filtration at 23–28° C. During this operation, as the retained slurry of broth solids thickened, 1625 gallons of 1:1 isopropanol-water was added to wash out residual natamycin. The filtrate containing natamycin was adjusted to pH 6.5 with hydrochloric acid. Natamycin was allowed to crystallize for 1–2 hours, then isolated by filtration, washed with water and dried, giving about 240 kg of natamycin which was 98% pure on an anhydrous basis. The yield was about 60%.

We claim:

1. A process for recovering natamycin from fermentation broth containing natamycin comprising the steps:

- a) adjusting the pH of said broth to greater than about 10 and adding an amount of a substantially water-miscible solvent sufficient to dissolve the natamycin in said broth;
- b) removing insoluble solids from said pH-adjusted broth;
- c) lowering the pH of said broth to a level sufficient to precipitate the natamycin; and
- d) removing the natamycin from said broth.

2. A process according to claim 1 wherein said water-miscible solvent is selected from the group consisting of ethanol, propanol, isopropanol, acetone, tetrahydrofuran and combinations thereof.

3. A process according to claim 2 wherein said water-miscible solvent is isopropanol.

4. A process according to claim 1 wherein, in step a), the pH of said broth is adjusted to between 10 and 11.

5. A process according to claim 3 wherein, in step a), the pH of said broth is adjusted to between 10 and 11.

6. A process according to claim 1 wherein, in step c), the pH of said broth is lowered to between 5.5 and 7.5.

7. A process according to claim 5 wherein, in step c), the pH of said broth is lowered to between 5.5 and 7.5.

8. A process according to claim 1 wherein step b) utilizes crossflow filtration.

9. A process according to claim 7 wherein step b) utilizes crossflow filtration.

10. A process according to claim 1 further comprising the preliminary step of concentrating said broth.

11. A process according to claim 10 wherein said broth is concentrated to a concentration of 10 to 50% solids on a weight/volume basis.

12. A process according to claim 10 wherein said preliminary step utilizes crossflow filtration.

\* \* \* \* \*

# Natamycin recovery

Feb 7, 1997 - Gist-Brocades B.V.

A process for the recovery of natamycin from a fermentation broth containing biomass and natamycin, which comprises: (a) disintegrating the biomass; and (b) separating the natamycin from the thus treated fermentation broth.

## Description

This invention relates to a process for recovering natamycin.

Natamycin, also known as pimarinol or tennecetin, is a polyene antibiotic which has been known since the late fifties (Struyk, et al, *Antibiot. Ann.* 1957-1958, 878).

For more than 20 years, natamycin has been used to prevent the growth of mould and yeast on cheese and sausages. More recent developments on the use of natamycin have been described in WO 93/00913 (Use of natamycin for the treatment and prevention of poultry mycosis), WO 93/01720 (Natamycin treatment of dried whole kernel grains), WO 93/00911 (Use of natamycin for the control and prevention of poultry Aspergillosis) and WO 93/00912 (Use of natamycin for the prevention and control of poultry Dactylarthritis).

Natamycin is prepared by fermentation processes such as those disclosed in GB-A-844289 using *Streptomyces natalensis*, or those disclosed in GB-A-846933, WO 93/03169, WO 93/03170 and WO 93/03171 using *Streptomyces gilvosporeus*.

After the natamycin has been produced, for example by the fermentation processes described above, the natamycin is recovered by extraction processes such as those described in GB-A-844289, GB-A-846933, WO 92/10580, WO 95/07998 or WO 95/27073. All these recovery processes require large amounts of organic solvent. More recently described recovery processes (e.g. those disclosed in WO 92/10580, WO 95/07998 and WO 95/27073) use a procedure wherein an organic solvent is added to the broth and the pH of the broth is adjusted to solubilize the natamycin. Thereafter the suspended solids are removed by filtration. Lastly the pH of the filtrate is re-adjusted to precipitate the natamycin and the precipitated natamycin is removed from the remaining liquid.

Both WO 92/10580 and WO 95/07998 use methanol as the organic solvent. The pH of the broth is adjusted to 1-4.5 to solubilize the natamycin, the broth is filtered and the natamycin is precipitated again by raising the pH to 6-9.

In WO 95/27073 isopropanol is used as the organic solvent. The isopropanol is added after the pH has been adjusted to 10-11, and subsequently the insoluble solids are removed by crossflow filtration and the natamycin is precipitated by adjustment of the pH to 5.5-7.5.

In the recovery processes described above there is a (partial) removal of water before the recovery procedure starts, in order to minimize the amount of organic solvent required. Drying and solid/liquid separation techniques are described to remove water. All of these recovery processes use organic solvents, which results in high recovery costs and in environmental drawbacks.

The present invention provides a process for the recovery of natamycin from a fermentation broth containing biomass and natamycin which comprises:

(a) disintegrating the biomass; and

(b) separating the natamycin from the thus treated fermentation broth.

Fermentations producing natamycin usually result in a fermentation broth comprising natamycin, biomass solids, dissolved or suspended nutrients, other fermentation products and water.

The fermentation broth in general contains at least 2 g/l natamycin, preferably at least 7 g/l natamycin. For example the natamycin concentration in the fermentation broth can be about 7 g/l as disclosed in WO 93/03170. Since natamycin has a very low solubility in water, the natamycin is mainly present in solid form in the fermentation broth. Solid natamycin means 'natamycin not dissolved in water'. The solid form of natamycin present in the fermentation broth may preferably comprise natamycin particles. Natamycin particles are natamycin crystals which, for example, may have the following forms: needle-formed crystals, disc-formed crystals or the like. During the fermentation natamycin particles are formed. The natamycin particles usually have diameters of from 0.5-20 micrometer. The diameter of the natamycin particle is the largest distance from one part of the particle to the other end of the particle. Needle-formed natamycin particles with diameters of more than 40 micrometer have been observed. Diameters may be determined using a microscope.

The biomass of the *Streptomyces* organisms used in the production of natamycin generally consists of clusters (mycelia) of threads, although other forms of biomass, e.g. the so-called "pellets", may be present as well. In these threads (hyphae) compartments are present, in which cellular activities are localized. The size of these threads as present in the clusters is in general from 10-30 micrometer (diameters ranging from 0.5-1.0 micrometer).

Up to now separation of the natamycin from the biomass and other impurities was not possible without using an organic solvent.

Surprisingly, we found that when the size of the particles of the biomass is reduced, the biomass can subsequently be efficiently separated from the natamycin particles in the aqueous phase.

Thus, in the present invention, after the fermentation, the fermentation broth is treated to disintegrate the biomass. Disintegration of the biomass may result in lysis, solubilization of cell matters, and fragmentation (size reduction) of the clusters and threads. Disintegration of the biomass may be checked by viewing the biomass with a microscope (magnification 400.times.). Disintegration is complete if hardly any clusters or threads of the biomass can be viewed with a microscope. Disintegration of the biomass can also be determined by measuring the viscosity of the fermentation broth. For example during the disintegration of a biomass of the cluster-type, the viscosity decreases. If the viscosity does not substantially decrease on further treatment, the biomass will be sufficiently disintegrated. Although different fermentation conditions or different Streptomyces organisms used in the production of natamycin may result in somewhat different forms of biomass present at the end of the fermentation, one skilled in the art is able to find a suitable duration for the disintegration of the biomass of any fermentation broth.

Homogenization, high shear mixing and ultrasonic techniques or heat-, pH- (alkaline), or enzymatic treatments or treatment with surface active agents can, for example, be used alone or in combination to disintegrate the biomass. The disintegration techniques are chosen in such a way that disintegration is obtained without substantially affecting the natamycin. Most of the natamycin, at least 80%, preferably up to 100%, keep their solid form and natamycin activity will not substantially reduce. Furthermore, it will be clear to one skilled in the art that the disintegration techniques may not substantially affect the natamycin particle size. If particle size of natamycin is reduced like the particle size of the biomass, then separation of the natamycin from the biomass would be difficult. An efficient example of disintegration is the use of a heat treatment optionally combined with a pH-treatment.

A heat treatment can be applied to the fermentation broth at the end of the fermentation (e.g. in the fermenter, after all supplies (e.g. oxygen, carbon or nitrogen sources) have ceased). The heat treatment may be carried out, for example, for 1 to 8 hours and, for example, at 30 to 50.degree. C. Preferably the heat treatment may be carried out at 30 to 50 degree. C. Higher temperatures may result in flocculation, precipitation and coagulation, which would adversely affect separation of the biomass from the natamycin particles.

A pH-treatment for, for example, 1 to 8 hours and, for example, at a pH of 8 to less than about 10 can also be easily conducted at the end of the fermentation in the fermenter. At pH's above 10 natamycin will become more soluble and more vulnerable to inactivation, which would adversely affect recovery yield and purity of the final natamycin. Sodium hydroxide or any other compatible caustic material, for example ammonium hydroxide or potassium hydroxide, can be used to increase the pH. After the alkaline incubation the broth is neutralized by hydrochloric acid or another compatible acid, for example phosphoric acid, sulphuric acid or acetic acid. Preferably neutralization takes place after separating the natamycin from the fermentation broth.

Enzymatic-treatments can involve the incubation with cell wall decomposing and/or organic polymer decomposing enzymes such as lysozym, xylanase, cellulase, protease,

glucanase, lipase and amylase. The enzymes alone or as mixtures of enzymes, are generally incubated under the optimum conditions for the enzymes to operate. The enzymes contribute to the lysis of cells and to the solubilization of organic polymers.

Homogenization can involve the use of a Manton-Gaulin type homogenisator. The fermentation broth is forced through an orifice. Due to pressure forces the biomass will disintegrate.

Disintegration of the biomass by ultrasonic techniques can be obtained by applying ultrasonic waves to the fermentation broth, that will provide for oscillation of cell liquid which the cell walls cannot withstand.

Disintegration of the biomass by high shear mixing involves the application of high shear forces to the biomass. These high shear forces can be obtained by stirring or other mechanical agitation. Certain fermentors may for example be equipped with stirring devices which are capable of providing the required high shear forces in order to disintegrate the biomass. During fermentation stirring will be adapted to the optimal growth or natamycin production conditions for the biomass. After fermentation stirring will be adapted in order to disintegrate the biomass for example by applying high stirring velocities. High shear mixing may also for example be accomplished by using high shear Waring (or other) blenders.

Disintegration of the biomass by treatment with surface active agents may involve for example the use of octylphenoxypolyethoxyethanol compounds, such as Triton type compounds. The fermentation broth may be incubated with for example 0.01 to 1% for example Triton X-100 during for example 1 to 24 hours.

After the biomass disintegration-step, the natamycin is separated from the biomass. Due to the disintegration treatment, the biomass now mainly consists of small solid particles and/or solubilized matter. Where conventional separation techniques used in the recovery processes for fermentation products are mainly used to separate the solid from the liquid phase, the separation techniques used in the present invention preferably separates solid particles from other solid particles, for example on the basis of size differences or density differences. The separation techniques used in the present invention will not result in a clear liquid phase, but will result in a troubled liquid phase that contains most of the smaller or less dense solid particles (mainly comprising the disintegrated biomass).

In order to separate the biomass from the natamycin particles the fermentation broth can, for example, be treated using a gravity gradient separation technique. The gravity gradient separation technique separates the natamycin particles from both soluble and insoluble impurities. Gravity gradient separation techniques include, for example gravity gradient centrifugation, and may, for example, use upflow columns and hydrocyclones. Gravity gradient separation techniques make use of the principle that particles of different densities and/or sizes can be separated when these particles of different densities and/or sizes are subjected to gravity or equivalent forces.

During the biomass disintegration the biomass particles become smaller. This makes it possible to separate the biomass from the natamycin particles. Usually more than 90% of the disintegrated biomass and other impurities can be removed with the gravity gradient separation technique. Separation efficiency can be increased by adding water and/or a salt (e.g. sodium chloride) to the broth.

The use of gravity gradient separation techniques has the advantage that it is possible to easily modify or direct the process according to the desired purity and yield of the final product. By varying the operation conditions, the purity or the yield can be increased. In general when the purity increases, the yield will decrease and vice versa. The process according to the invention can for example provide natamycin of about 70 w/w % (anhydrous basis) on dry matter with a yield of about 90%. Using different process parameters natamycin of about 90 w/w % purity (anhydrous basis) on dry matter with a yield of about 80% can also be obtained with the process of the present invention. It is even possible to produce several products of different qualities from one fermentation broth.

Gravity gradient separation techniques will give better results, e.g. higher purities and/or yields, if the difference in particle density and/or size between the product particles and the impurities is increased. Therefore it is preferred that the fermentation broth contains natamycin particles having an average particle diameter of at least 2 micrometer. Preferably the average natamycin particle diameter is at least 5 micrometer, more preferable at least 10 micrometer. Fermentation broths containing natamycin particles with an average diameter of about 25 micrometer have been observed. Since natamycin may be present in the fermentation broth with diameters ranging from below 0.05 micrometer to about 40 micrometer, it will be clear to one skilled in the art that the smallest particles may be lost during separation. Furthermore, it will be clear to one skilled in the art that fractions of natamycin particles with large diameters of high purity may be obtained using the gravity gradient separation technique. The conditions under which the gravity gradient separation technique is operated determine which fraction of the natamycin will be recovered. In general larger natamycin particles can, for example, be obtained by using low shear conditions during the fermentation, or by seeding the fermentation with small natamycin particles or by prolonging the fermentation.

Gravity gradient centrifugation can be simulated on laboratory scale by operating a batchwise centrifuge for a shorter time or with a lower number of revolutions per minute as compared to the standard operation of the centrifuge, which would result in a clear separation of the solids from the liquids.

On a production scale the centrifuge is usually operated continuously. As compared to the standard operation of this type of centrifuge, the hold up time in the centrifuge is decreased in order to separate the natamycin from the disintegrated biomass. The lower the hold up time, the higher the purity and the lower the yield of the obtained natamycin. One skilled in the art is able to find a suitable hold up time corresponding to an optimized or desired purity:yield ratio.

After the separation step the natamycin suspension may, for example, be dried in order to obtain a dry product. Any convenient drying technique can be used, e.g. vacuum drying, conduction drying or convection drying. Since natamycin is stable in the crystalline form thereof [natamycin.3H.sub.2 O], it is critical not to dry the product to a moisture content below about 7%. Vacuum drying is preferably conducted at about 40.degree. C.

After the separation step the natamycin suspension may be further purified, if desired, by a second round of a disintegration step, followed by a second separation step. Several rounds of this process may be used to result in natamycin of about 90 w/w % purity (anhydrous basis) on dry matter, with a yield of about 80%.

The present invention will now be further described in the following Examples.

#### **EXAMPLE 1**

A fermentation broth of *Streptomyces natalensis* containing natamycin having an average particle diameter of about 10 micrometer was incubated at a temperature of 30.degree. C. for 3 hours. This thermally treated broth was further treated to a gravity gradient centrifugation. An Alfa-Laval type Feux standard nozzle centrifuge was operated under such conditions that part of the biomass solids was removed together with the supernatant. This treatment resulted in a natamycin suspension of 70 w/w % natamycin (anhydrous basis) on dry matter. The natamycin yield was about 97%.

#### **EXAMPLE 2**

To 20 liters of end-product of Example 1, which contained 3.2 kg natamycin, sodium hydroxide was added to adjust the pH to 9.5 to disintegrate the remainder of the impurities. 10 liters of water was added to the alkaline suspension to lower the viscosity and to increase the efficiency of the following gravity gradient centrifugation step.

The diluted, alkaline suspension was centrifuged twice by gravity gradient centrifugation to remove the remainder of the impurities and to concentrate the natamycin suspension. For the gravity gradient centrifugation a Beckmann type J-6M/E centrifuge, using a rotor-type JS 5.2, was operated at 3,500 rpm for 3 minutes. After centrifugation the supernatant was removed and the natamycin containing debris was resuspended in water.

The pH of the purified natamycin suspension was adjusted to 7 by adding hydrochloric acid to the suspension. The suspension was dried.

A dry active product was obtained which had a purity of 92 w/w % natamycin (anhydrous basis) on dry matter.

The total recovery yield of the combined processes of Examples 1 and 2 was about 85%.

### EXAMPLE 3

The pH of a fermentation broth of *Streptomyces natalensis* containing of natamycin particles was adjusted to 9.5 by addition of 25 wt % NaOH-solution and incubated for two hours at a temperature of 30.degree. C.

The thus treated fermentation was centrifuged by gravity gradient centrifugation using a Beckmann centrifuge (type J-6M/E; using a rotor type JS 5.2) for 3 minutes at 3500 rpm.

The supernatant was discarded and the pellet containing natamycin particles was resuspended in water of pH 9.5. After resuspension the suspension was centrifuged as before.

After the second centrifugation the supernatant was removed and the pH of the pellet containing natamycin particles was adjusted to 7.0 by addition of 25 wt % HCl solution.

The pellet was dried for 10 hours under vacuum at a temperature of 40.degree. C. A dry active product was obtained containing 90 wt % natamycin (on anhydrous basis).

### EXAMPLE 4

A fermentation broth of *Streptomyces natalensis* containing natamycin particles was diluted with water.

The diluted fermentation broth was divided in two parts:

Part A was incubated for three hours at 45.degree. C. at a pH of 9.5, resulting in disintegrated biomass. The thus obtained broth was divided in two parts (A1 and A2).

Part B was directly divided in two parts (B1 and B2).

From part A and Part B the first parts (A1 and B1) were centrifuged at 5000 rpm for 10 minutes and the second parts (A2 and B2) were centrifuged at 3500 rpm for 5 minutes.

After centrifugation the natamycin yield and the natamycin contents of the pellets were determined. The results are shown in Table 1. Centrifugation was performed using a Beckmann type J-6M/E centrifuge and a rotor type JS5.2.

TABLE 1

Centrifuge conditions				
bowl	speed	time	% natamycin	
			yield on dry matter	
	(rpm)	(min)		% natamycin
A1	5000	10	96	43
A2	3500	5	93	68
B1	5000	10	99	29.6
B2	3500	5	97	31.0

Centrifugation at 5000 rpm for 10 minutes resulted in clear supernatants, whereas centrifugation at 3500 rpm for 5 minutes resulted in turbid supernatants.

Samples A1 and A2 relating to fermentation broths with disintegrated biomass show enhanced natamycin purities compared to samples B1 and B2 relating to the original diluted fermentation broths.

Sample A2, obtained after centrifugation of the disintegrated biomass under gravity gradient centrifugation conditions resulting in solid/solid separation, shows a remarkable increase in natamycin purity.