

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

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

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

« » червня 2023р.

«До захисту допущено»
Завідувач кафедри
Віктор СТАБНІКОВ
(підпис) (ім'я та прізвище)

« » червня 2023р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА**

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

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

на тему: «Біосинтез пікроміцину *Streptomyces lividans*»

Виконала: здобувачка 4 курсу, групи 1

ТРОМПАК Вероніка Юріїна
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник КРАСІНЬКО Вікторія Олегівна
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Консультанти _____
(ім'я та прізвище) (підпис)

(ім'я та прізвище) (підпис)

(ім'я та прізвище) (підпис)

Рецензент Андрій КОТИНСЬКИЙ
(ім'я та прізвище) (підпис)

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

Здобувач _____
(підпис)

Київ – 2023 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

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

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

біотехнології і мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

«01» березня 2023 року

ЗАВДАННЯ

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ТРОМПАК Вероніки Юріївни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи «Біосинтез пікроміцину *Streptomyces lividans*»

керівник роботи КРАСІНЬКО Вікторія Олегівна, к.т.н., доцент

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від «28» березня 2023 року №193-кс

2. Строк подання здобувачем роботи 05.06.2023

3. Вихідні дані до роботи: біологічний агент: *Streptomyces lividans*; цільовий продукт: пікроміцин; геометричний об'єм ферментера: 2м³; коефіцієнт заповнення: 0,6

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Характеристика цільового продукту; обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента; біосинтез цільового продукту; обґрунтування вибору технологічної схеми; специфікація обладнання; опис технологічної схеми; контроль виробництва; аналіз перспектив впровадження системи екологізації виробництва.

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема біосинтезу пікроміцину - 1 аркуш формату А1

Апаратурна схема біосинтезу ергостерину - 1 аркуш формату А1

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01 березня 2023 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1.	<i>Характеристика цільового продукту</i>	<i>01.03.23-12.03.23</i>	
2.	<i>Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента</i>	<i>13.03.20-26.03.23</i>	
3.	<i>Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу</i>	<i>27.03.23-31.03.23</i>	
4.	<i>Біосинтез цільового продукту</i>	<i>01.04.23-09.04.23</i>	
5.	<i>Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва</i>	<i>10.04.23-23.04.23</i>	
6.	<i>Специфікація обладнання</i>	<i>24.04.23-30.04.23</i>	
7.	<i>Опис технологічної схеми</i>	<i>01.05.23-14.05.23</i>	
8.	<i>Контроль виробництва</i>	<i>15.05.23-21.05.23</i>	
9.	<i>Аналіз перспектив впровадження системи екологізації виробництва</i>	<i>22.05.23-26.05.23</i>	
10.	<i>Нормативно-технічна документація, використана під час проектування виробництва</i>	<i>26.05.23-28.05.23</i>	
9.	<i>Оформлення кваліфікаційної роботи</i>	<i>29.05.23-31.05.23</i>	
10.	<i>Оформлення графічної частини</i>	<i>29.05.23-31.05.23</i>	

Здобувач

_____ (підпис)

Вероніка ТРОМПАК

_____ (ім'я та прізвище)

Керівник роботи

_____ (підпис)

Вікторія КРАСІНЬКО

_____ (ім'я та прізвище)

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	6
ВСТУП.....	7
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	9
1.1. Фізико-хімічні властивості пікроміцину	9
1.2. Синтез пікроміцину	10
1.3. Застосування пікроміцину.....	11
РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....	12
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	12
2.2. Розрахунок складу поживного середовища	17
2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки продуцента підкроміцину.....	19
2.4. Таксономічний статус біологічного агента	23
РОЗДІЛ 3. РОЗРАХУНОК КІЛЬКОСТІ СТАДІЙ ПІДГОТОВКИ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ	24
РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ.....	26
4.1. Шлях катаболізму ростового субстрату у біологічного агента	26
4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт	28
РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	32
5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничий біосинтез.....	32
5.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.....	32
5.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря	33
5.1.3. Вибір мийних та дезинфікуючих засобів	34
5.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища	39
5.2. Основні етапи післяферментаційного одержання продукту	48
5.2.1. Вибір способу відділення біомаси та відповідного обладнання.....	49
5.2.2. Вибір способу виділення цільового продукту із супернатанта	50
5.2.3. Вибір способу сушіння та сушарки	52
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ	54
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ	58
РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	69

8.1. Мікробіологічний контроль	69
8.2. Показники росту і синтезу цільового продукту.....	71
8.2.1. Концентрація біомаси.....	71
8.2.2. Концентрація цільового продукту	71
8.2.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту	72
8.3. Показники якості готового продукту	73
8.3.1. Ідентифікація пікроміцину.....	73
8.3.2. Біологічна дія пікроміцину	74
8.4. Карта постадійного контролю доферментаційних процесів	75
РОЗДІЛ 9. АНАЛІЗ ПЕРСПЕКТИВ ВПРОВАДЖЕННЯ СИСТЕМИ ЕКОЛОГІЗАЦІЇ ВИРОБНИЦТВА	81
9.1. Система знешкодження рідких відходів.....	81
9.2. Система знешкодження газоподібних відходів	83
9.3. Система знешкодження твердих відходів	86
РОЗДІЛ 10. НОРМАТИВНО-ТЕХНІЧНА ДОКУМЕНТАЦІЯ, ВИКОРИСТАНА ПІД ЧАС ПРОЕКТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА.....	87
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	89
ДОДАТКИ.....	98

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробленню технологічної та апаратурної схем біосинтезу антибіотику пікроміцину *Streptomyces lividans* Pk 102, який під час культивування на синтетичному поживному середовищі синтезує 333,7 мг/л даного антибіотику.

Технологічна схема біосинтезу пікроміцину включає допоміжні роботи (підготовка аераційного повітря, підготовка титруючих агентів (6%-ий розчин натрій гідроксиду та соляної кислоти), приготування розчину мікроелементів, підготовка запасного 40%-го розчину сахарози для підживлення, підготовка та стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес (три стадії вирощування посівного матеріалу (у колбах на качалках, в інокуляторах 20 та 200 м³) та біосинтез у ферментері об'ємом 2 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,6). Технологія отримання пікроміцину передбачає використання одностадійної схеми культивування глибинним періодичним способом.

У роботі наведено склад поживного середовища для культивування *S.lividans* Pk 102. З урахуванням особливостей середовища було запропоновано схему його підготовки та підібрано необхідні режими стерилізації. Розраховано кількість стадій підготовки посівного матеріалу. Наведено опис основних стадій технологічного процесу, а також обрано методи та запропоновано обладнання для післяферментаційного виділення продукту.

Розроблено карту посадійного контролю доферментаційних процесів і виробничого біосинтезу та зазначено методи контролю концентрації біомаси, цільового продукту (пікроміцину), джерела вуглецю та азоту.

Дипломний проєкт викладений на 97 сторінок, містить 17 таблиць, 18 рисунків, складається зі вступу, десяти розділів, списку використаної літератури (83 найменування), 1 додатку, технологічної (формат А1, 1 аркуш) та апаратурної (формат А1, 1 аркуш) схем.

Ключові слова: *пікроміцин, Streptomyces lividans Pk 102, біосинтез, антибіотик, бактерії, поживне середовище.*

ВСТУП

В наш час, біотехнологи приділяють велику увагу дослідженню, вдосконаленню і виробництву антибіотичних речовин. Антибіотики — найбільший клас фармацевтичних сполук, що одержуються мікробіологічним синтезом. Необхідність розробки та вдосконалення антибіотиків дуже актуальна, оскільки, на сьогодні, дуже сильно розвинена антибіотикорезистентність мікроорганізмів.[1]

Стійкість до антибіотиків є однією із найсерйозніших загроз глобальній охороні здоров'я. Вона зростає до небезпечно високих рівнів у всіх частинах світу, негативно впливаючи на здатність лікувати інфекційні хвороби та зводячи нанівець багато досягнень охорони здоров'я і медицини. [1] Тому, якраз таки, досліджуваний антибіотик - пікроміцин розглядається як актуальна базова субстанція для одержання на його основі похідних, які вводяться у медичну практику за для боротьби з антибіотикорезистентністю.

Пікроміцин - це макролідний антибіотик, що чинить бактеріостатичну дію та є активний проти деяких грампозитивних бактерій. Він був першим відкритим, виділеним та дослідженим антибіотиком із родини макролідів в 1950р. [2] Він не належить до клінічних антибіотиків, проте є важливою субстанцією для одержання нових напівсинтетичних кетолідних антибіотиків, зокрема нових епотилонів (протипухлинних агентів).[3]

На сьогодні, пікроміцин синтезується тільки біосинтетичним способом з використанням різних штамів мікроорганізмів. Продуцентами його можуть бути штами *S.venezuelae* ATCC 15439 та *S. lividans* Pk 102. [4,5] Однак генно-модифікований штам бактерій *S. lividans* Pk 102 має суттєву перевагу над іншим, адже утворює пікроміцин на відносно простому та дешевому (13,5 грн) поживному середовищі, і головне, синтезує найвищу концентрацію цього антибіотику (333,7 мг/л).

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.24 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	ВСТУП	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
<i>Розроб.</i>		<i>Тромпак В.Ю</i>					2	97
<i>Перевір.</i>		<i>Красінько В.О</i>						
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П</i>						
						<i>Кафедра БТМ</i>		
						7		

Актуальністю обраної мною теми є розробка оптимальної схеми біосинтезу антибіотику, який є важливою базовою субстанцією для одержання на його основі похідних, які вводяться у медичну практику за для боротьби з антибіотикорезистентністю.

Новизною моєї роботи є використання генно-інженерного штаму бактерій *S. lividans* Pk 102, який характеризується високою здатністю продукувати антибіотик пікроміцин. Також у роботі пропонується новий варіант технології культивування – дробне внесення субстрату, для швидшого вирощування бактерій та максимального одержання продукту. Це пов'язано з тим, що *S. lividans* Pk 102 споживає велику кількість сахарози для одержання пікроміцину, однак для того щоб зменшити тривалість лаг-фази та інгібування росту продуцента спочатку додають невелику кількість ростового субстрату (40 г/л), а вже потім решту вносять дробно порціями.

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Пікроміцин – це макролідний антибіотик, що є інгібітором пролілендопептидази та є активним проти грампозитивних бактерій. Вперше був відкритий і досліджений Брокманном та Хекелем ще в 1950р. та був першим виділеним антибіотиком – макролідом. [2]

Хімічна формула пікроміцину – $C_{28}H_{47}NO_8$. Його молекулярна маса дорівнює – 525,67. Структурна формула пікроміцину представлена на *рис 1.1* і складається з 14-членного макролідного кільця, заміщеного дезозамінним вуглеводом та гідроксильною групою. [6]

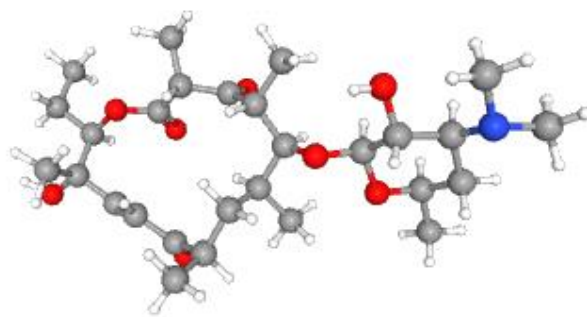
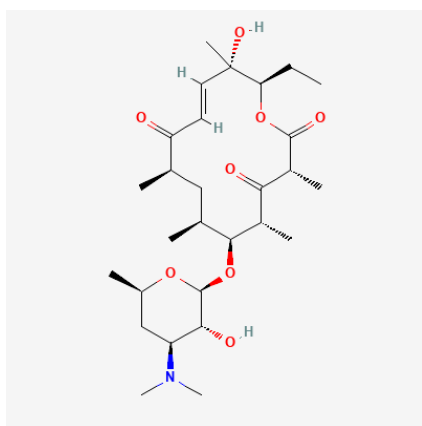


Рис 1.1. Структурна формула пікроміцину [6]

1.1. Фізико-хімічні властивості пікроміцину

Даний антибіотик має досить гіркий смак (через це він і має таку назву), виділяють його в твердому стані, у вигляді білої кристалічної речовини. Пікроміцин погано розчинний у воді, помірно розчинний в диетиловому ефірі, добре розчинний у C_6H_6 , $CHCl_3$ і розбавлених кислотах, із якими утворює солі. Також розчинний в диметилсульфооксиді (ДМСО). У розчині пікроміцин в основному міститься у вигляді циклічного напівацеталю. Зберігають даний антибіотик при температурі $-20^{\circ}C$ в умовах висихання до 12 місяців. [7,8]

При м'якому гідролізі (рН 6,5-8,4 при $60^{\circ}C$) пікроміцин розщеплюється на лактон і азотовмісну частину. Під дією лугу він легко відщеплює

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.24 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Тромпак В.Ю</i>			РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Красінько В.О</i>					3	97
<i>Н. Контр.</i>					<i>Кафедра БТМ</i>			
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П</i>			9			

диметиламін із своєї структури. Під дією HgO пікроміцин окиснюється до пікроміцинової кислоти, що є стійкою до дії лугу. Також пікроміцин дає позитивну йодоформну реакцію. [8]

1.2. Синтез пікроміцину

Пікроміцин, на сьогодні, не синтезують хімічним способом. Виробляють його лише біосинтетичним способом, використовуючи різні штами мікроорганізмів. Основними продуцентами пікроміцину є штами бактерій *Streptomyces venezuelae* ATCC 15439. [4] Також він може виробляється актиноміцетами *Streptomyces felleus* та *Actinomyces* Во. [8] Для синтезу пікроміцину використовуються і генно-модифіковані штами мікроорганізмів *Streptomyces lividans* Pik102, які синтезують велику кількість пікроміцину. [5]

За біосинтез пікроміцину відповідає полікетидсинтаза. На *рис. 1.2.* показано полікетидсинтазу пікроміцину, що складається із одного модуля завантаження і шести модулів продовження, що охоплюють чотири поліпептидні ланцюги (PikAI – PikAIV).

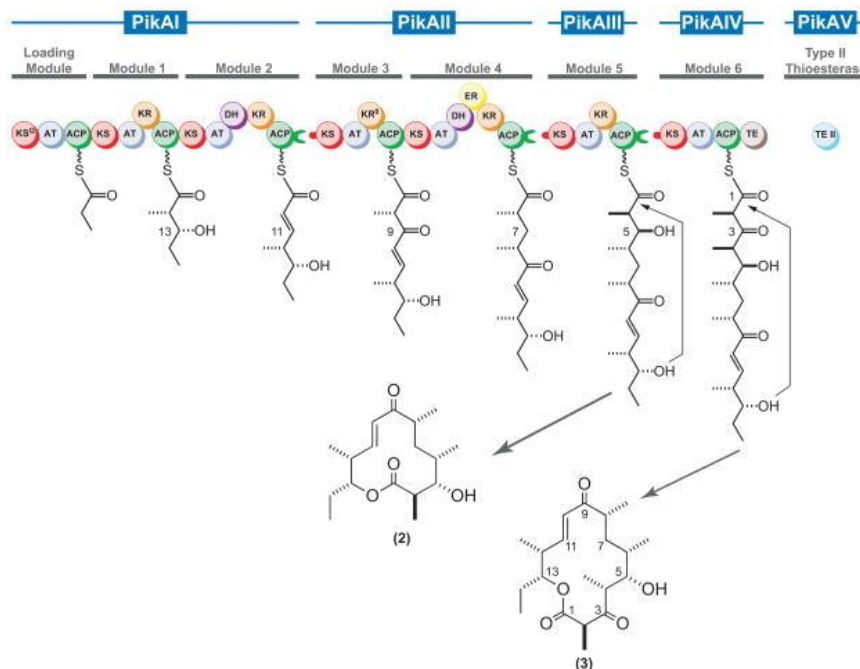


Рис 1.2. Полікетидсинтаза пікроміцину [9]

Подовження ланцюга через PikAIII із наступним каталізованим тіоестеразою припиненням призводить до утворення 12-членного кільцевого макролактону, 10-дезоксиметинолідру (2), тоді як продовження подовження полікетидного ланцюга

дає 14-членний кільцевий макролактон, нарбонолід (3). Обидва продукти проходять подальшу обробку за допомогою глікозилтрансферази і Р450 гідроксилази, щоб отримати набір антибіотика пікроміцину. РікAV є тіоестеразою типу II, яка функціонує для видалення передчасно декарбоксільованих подовжувачів з доменів АСР. [9]

Із культуральної рідини пікроміцин виділяють екстракцією. Отриману речовину розчиняють в ефірі, змішують з розбавленою хлоридною кислотою, далі водний розчин підлужнюють до рН 8-9, після чого пікроміцин виділяють в вигляді ефіру. [8]

1.3. Застосування пікроміцину

Пікроміцин, не використовують в медицині, адже, на сьогодні, він не є клінічно корисним антибіотиком. Практичному використанню пікроміцину перешкоджає його досить висока токсичність (наприклад, для мишей LD_{50} дорівнює 0,1 – 0,7 г/кг при внутрішньому введенню). [8]

Пікроміцин застосовують як важливу субстанцію для синтезу інших корисних антибіотиків з родини макролідів, таких як еритроміцин, а також для синтезу нових напівсинтетичних кетолідних антибіотиків, зокрема нових епотилонів (протипухлинних агентів).[3] Його виготовляють і реалізують в якості субстанції у вигляді білого кристалічного порошку. [7]

РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

Антибіотик пікроміцин, в основному, синтезується тільки типовим штамом *Streptomyces venezuelae* ATCC 15439. Однак, він може вироблятися в різній кількості (табл. 2.1), залежно від складу поживного середовища, де культивується.

Дані, наведені в таблиці 2.1, свідчать, що приблизно однакову кількість антибіотика синтезує штамом *S.venezuelae* ATCC 15439, вирощений на рідкому комплексному поживному середовищі R2YE з додатково підібраними речовинами (25 та 35,5 мг/л пікроміцину) [10,11]. Цей самий штам бактерій, тільки на іншому середовищі (індивідуально підбраному) синтезує майже в 4 рази більше антибіотику (123,25 мг/л пікроміцину). [4]

Крім, *S. venezuelae* ATCC 15439, відомий й генно-інженерний мікроорганізм здатний до синтезу пікроміцину. *Streptomyces lividans* Pk102 може виробляти найбільшу концентрацію антибіотику (333,7 мг/л), що є суттєвою перевагою. [5]

Приблизно однакова тривалість культивування в штаму *S.venezuelae* ATCC 15439, однак різні поживні середовища. Деяко більша тривалість культивування у *S. lividans* Pk102, однак концентрація продукту, який він виробляє, значно більша ніж у типового штаму, тому на наступному етапі розрахуємо вартість середовища для культивування вибраних мікроорганізмів. (табл. 2.2)

Як видно з даних, наведених у таблиці 2.2, різні середовища для культивування *S.venezuelae* ATCC 15439 мають і різну вартість. Рідке комплексне поживному середовище R2YE і в одному і в іншому випадку є дорожчим за індивідуально підібране поживне середовища типового штаму бактерій. До того ж, концентрація продукту, синтезована на ньому найнижча, тому мікроорганізми

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.24 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Тромпак В.Ю</i>			РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Красінько В.О</i>					12	97
<i>Н. Контр.</i>						12 <i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П</i>						

вирощенні на середовищі R2YE відкидаємо. Трохи дорожчим є і середовище для культивування *S. lividans* Pk102, однак концентрація продукту, вироблена цим мікроорганізмом є в кілька разів вища за концентрацію антибіотика яку виробляє *S.venezuelae* ATCC 15439. Тому для остаточного вибору найефективнішого біологічного агента розраховуємо умовну вартість 1 мг цільового продукту. (табл.2.3.)

Дані наведені у таблиці 2.3, засвідчують, що умовна вартість антибіотика, синтезована генно-інженерним штамом *S. lividans* Pk102 є найнижчою (0,04 грн/мг), а кількість утвореного антибіотика за 1 годину – найвищою (2,78 мг/год).

Отже, врахувавши економічну складову у виробництві продукту, яка відіграє суттєво важливу роль, а саме чим нижча собівартість кінцевого продукту, тим дешевша технологія виробництва і, відповідно, – більший прибуток виробнику, найкращим продуцентом пікроміцину є саме генно-інженерний штам бактерій *Streptomyces lividans* Pk102.

Таблиця 2.1

Особливості одержання антибіотика на суміші ростових субстратів

Біологічний агент	Склад поживного середовища:		Тривалість культивування, год	Концентрація антибіотику, мг/л	Особливості процесу біосинтезу	Література
	компонент	концентрація, г/л				
<i>Streptomyces venezuelae</i> ATCC 15439	Неочищений гідробізований соєвий білок	30	48	123,25	Культивування у виробничому середовищі при 30°C і струшуванні 200 об/хв.	<i>Abdel-Fattah Y.</i> Application of Factorial Design for the Development of Production Media for the Pikromycin Macrolide Family by <i>Streptomyces venezuelae</i> . <i>Academic Journals Inc.</i> , 2007, 2(6): 472-482. doi: 10.3923/taer.2007.472.482.
	Розчинний крохмаль	25				
	Глюкоза	25				
	NaNO ₃	1				
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5				
	Ксилоза	0,5				
<i>Streptomyces lividans</i> Pik102	Сахароза	103	120	333,7	Культивування при 30°C	<i>Pyeon H., Nah H., Kang S., Choi S., Kim E.</i> Heterologous expression of pikromycin biosynthetic gene cluster using <i>Streptomyces</i> artificial chromosome system. <i>Pyeon et al. Microb Cell Fact.</i> , 2017, 16(96): 1-9. Doi: 10.1186/s12934-017-0708-7.
	Глюкоза	10				
	K ₂ SO ₄	0,25				
	MgCl ₂ ·6H ₂ O	10,12				
	KH ₂ PO ₄	1				
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,18				
	Казамінова к-та	0,1				
	L-пролін	0,16				
	Розчин мікроелементів	2 мл				
	Дріжджовий екстракт	5				
	Буфер TES	5,73				
<i>Streptomyces venezuelae</i> ATCC 15439	Сахароза	139	60	35,5	Культивування у 100 мл середовища при 30°C зі струшуванням при 200 об/хв протягом 18 год. Потім 200 мг	<i>Yi J., Kim M., Kim S., Kim B.</i> Effects of Sucrose, Phosphate, and Calcium Carbonate on the Production of Pikromycin from <i>Streptomyces venezuelae</i> . <i>J.</i>
	Глюкоза	20				
	Пептон	10				
	(NH ₄) ₂ SO ₄	2,5				
	K ₂ HPO ₄	5,29				

	NaCl MgSO ₄ ·7H ₂ O CaCO ₂	1 1 0,081			клітин інокулювали в 50 мл середовища і вирощували при 30°C і 200 об/хв струшуванням 60 год.	<i>Microbiol. Biotechnol.</i> , 2015, 25(4): 496-502. doi: 10.4014/jmb.1409.09009.
<i>Streptomyces venezuelae</i> ATCC 15439	Сахароза K ₂ SO ₄ MgCl ₂ ·6H ₂ O Глюкоза Казамінова к-та Дистильвана вода	103 0,25 10,12 10 0,1 800 мл	60	25	Культивування у колбах об'ємом 250 мл з 50 мл середовища. (t=30°C; n=200 об/хв)	<i>Yi J., Kim M., Kim S., Kim B.</i> Production of pikromycin using branched chain amino acid catabolism in <i>Streptomyces</i> <i>venezuelae</i> ATCC 15439. <i>Journal</i> <i>of Industrial Microbiology &</i> <i>Biotechnology.</i> , 2018, 45: 293-303. doi: 10.1007/s10295-018-2024-6.

Вартість поживних середовищ для культивування продуцентів антибіотиків

Продуцент	Компонент поживного середовища	Концентрація у ПС, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації (1,2,3)*
<i>Streptomyces venezuelae</i> ATCC 15439	Неочищений гідролізований соєвий білок	30	265	7,95	2
	Розчинний крохмаль	25	26	0,65	1
	Глюкоза	25	23	0,575	1
	NaNO ₃	1	16	0,016	3
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5	19	0,095	1
	Ксиліоза	0,5	288	0,144	2
	Вартість 1 л середовища - 9,43 грн				
<i>Streptomyces lividans</i> Pik102	Сахароза	103	23,10	2,3793	2
	Глюкоза	10	23	0,23	1
	K ₂ SO ₄	0,25	23	0,00575	1
	MgCl ₂ ·6H ₂ O	10,12	15,5	0,15686	1
	Казамінова кислота	0,1	5525,25	0,552525	6
	Розчин мікроелементів	2 мл	123,3 грн/л	0,2466	5
	Дріжджовий екстракт	5	539,88	2,6994	3
	Буфер TES	5,73	1120	6,4176	4
	KH ₂ PO ₄	1	296,6	0,3	2
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,18	20	0,0236	1
	L-пролін	0,16	3000	0,48	2
	Вартість 1 л середовища - 13,5 грн				
<i>Streptomyces venezuelae</i> ATCC 15439	Сахароза	139	23,10	3,2109	2
	Глюкоза	20	23	0,46	1
	Пептон	10	1060	10,6	2
	(NH ₄) ₂ SO ₄	2,5	19	0,0475	1
	K ₂ HPO ₄	5,29	150	0,7935	2
	NaCl	1	5	0,005	1
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	1	11	0,011	1
	CaCO ₂	0,081	6	0,000486	1
Вартість 1 л середовища - 15,13 грн					
<i>Streptomyces venezuelae</i> ATCC 15439	Сахароза	103	23,10	2,3793	2
	K ₂ SO ₄	0,25	23	0,00575	1
	MgCl ₂ ·6H ₂ O	10,12	15,5	0,15686	1
	Глюкоза	10	23	0,23	1
	Казамінова кислота	0,1	5525,25	0,552525	6
	Дистильована вода	800 мл	12 грн/л	9,6	2
	Вартість 1 л середовища - 12,93 грн				

Примітка. * – Ціни наведено станом на лютий 2023 р. 1 - www.kiev.flagma.ua, 2 - <http://prom.ua>, 3 - <https://www.systopt.com.ua>; 4- <https://us.vwr.com/store/product/21762273/test-buffer-1x-ready-to-use-ph-7-8>; 5- <https://auchan.ua/ua/koncentrirovannyj-rastvor-mikrojelementov-129443/>; 6- <https://www.rpicorp.com/products/growth-media/powder/casamino-acids-500-g.html>

Таблиця 2.3

Умовна вартість 1 г антибіотиків, синтезованих на суміші ростових субстратів

Біологічний агент	Концентрація антибіотика, мг/л	Тривалість культивування, год	Кількість утвореного антибіотика за годину, мг/год	Вартість 1 л середовища, грн/л	Умовна вартість 1 мг цільового продукту, грн/мг
<i>Streptomyces venezuelae</i> ATCC 15439	123,25	48	2,57	9,43	0,076
<i>Streptomyces lividans</i> Pk102	333,7	120	2,78	13,5	0,04

2.2. Розрахунок складу поживного середовища

Тривалість культивування – 120 год, концентрація пікроміцину в культуральній рідині 0,3337 г/л, а концентрація біомаси – 5 г/л

Розрахунок вмісту в середовищі джерела вуглецевого живлення.

Потреби для синтезу пікроміцину. Як основне джерело вуглецю для одержання пікроміцину використовується сахароза.

Розрахуємо, скільки вуглецю (за елементом С) міститься в 0,3337 г пікроміцину. Молекулярна маса пікроміцину $[C_{28}H_{47}NO_8]$ становить 526. Отже, у 526 г пікроміцину міститься 336 г Карбону, а в 0,3337 г пікроміцину $(336 \cdot 0,3337) / 526 = 0,21$ г Карбону.

Далі розраховуємо, у скількох грамах сахарози міститься 0,21 г Карбону, враховуючи, що молекулярна маса сахарози становить 342. Отже, у 342 г сахарози міститься 144 г Карбону, а в 0,21 г Карбону міститься $(0,21 \cdot 342) / 144 = 0,5$ г сахарози. Враховуючи, що при вирощуванні мікроорганізмів на сахарозі близько 40% субстрату окиснюється до CO_2 для одержання енергії, необхідної для конструктивного метаболізму, вміст сахарози у середовищі становитиме $(0,5 \cdot 0,4) + 0,5 = 0,7$ г/л

Потреби для синтезу біомаси. У біомасі міститься 50% Карбону, отже вміст Карбону у 5 г/л біомаси становить $5 \cdot 0,5 = 2,5$ г. Ця кількість Карбону міститься у $(2,5 \cdot 334) / 144 = 5,8$ г сахарози. Враховуючи 40 % втрат субстрату на «холосте окиснення», для одержання 5 г/л біомаси у середовище необхідно внести $(5,8 \cdot 0,4) + 5,8 = 8,12$ г/л сахарози.

Також джерелом вуглецевого живлення у середовищі може бути глюкоза. Тому розрахуємо скільки її потрібно для синтезу пікроміцину та біомаси.

Потреби для синтезу пікроміцину. Розраховуємо, у скількох грамах глюкози міститься 0,21 г Карбону, враховуючи, що молекулярна маса глюкози становить 180. Отже, у 180г глюкози міститься 72 г Карбону, а 0,21 г Карбону міститься у $(0,21 \cdot 180) / 72 = 0,53$ г глюкози.

Враховуючи, що при вирощуванні мікроорганізмів на глюкозі близько 40% субстрату окиснюється до CO_2 для одержання енергії, необхідної для конструктивного метаболізму, вміст глюкози у середовищі становитиме $(0,53 \cdot 0,4) + 0,53 = 0,74$ г/л.

Потреби для синтезу біомаси. У біомасі міститься 50% Карбону, отже вміст Карбону у 5 г/л біомаси становить $5 \cdot 0,5 = 2,5$ г. Ця кількість Карбону міститься у $(2,5 \cdot 180) / 72 = 6,25$ г глюкози. Враховуючи 40 % втрат субстрату на «холосте окиснення», для одержання 5 г/л біомаси у середовище необхідно внести $(6,25 \cdot 0,4) + 6,25 = 8,75$ г/л глюкози.

Отже, загальний вміст сахарози та глюкози (джерела вуглецевого живлення) у середовищі, необхідний для синтезу біомаси (5 г/л) та пікроміцину (0,3337 г/л), становить $(8,75 + 0,74) + (0,7 + 8,12) = 18,31$ г/л.

Розрахунок вмісту в середовищі джерела азотного живлення.

Розрахунок вмісту органічного азоту в дріжджовому екстракті. Дріжджовий екстракт є джерелом органічного Нітрогену, який засвоюється продуцентом пікроміцину. Таким органічним Нітрогеном є амінний Нітроген і частково білковий. Концентрація доступного для бактерій органічного Нітрогену (за елементом N) у дріжджовому екстракті становить 1,9%. Отже, у 5 г дріжджового екстракту міститься $(1,9 \cdot 5) / 100 = 0,1$ г Нітрогену.

Також джерелом азотного живлення в поживному середовищі може бути казамінова кислота. Вона є також джерелом органічного Нітрогену (амінний Нітроген). Концентрація доступного для бактерій органічного Нітрогену (за елементом N) у казамновій кислоті становить 2%. Отже, у 0,1 г казамінової кислоти міститься $(2 \cdot 0,1) / 100 = 0,002$ г Нітрогену.

Сумарний вміст органічного Нітрогену в поживному середовищі $0,1 + 0,002 = 0,102$ г.

Розрахунок вмісту Фосфору у середовищі

У біомасі міститься близько 3% Фосфору (за елементом P). Отже, для синтезу 5 г/л біомаси вміст Фосфору у середовищі повинен становити $5 \cdot 0,03 = 0,15$ г/л. Джерелом Фосфору у поживному середовищі є двозаміщений Калій фосфорнокислий – K_2HPO_4 . Його молекулярна маса становить 174 г/моль, з вміст Фосфору – 31. Відповідно, концентрація цієї солі в середовищі дорівнює $(0,15 \cdot 174) / 31 = 0,08$ г/л.

Інші компоненти середовища

Джерелами таких необхідних для росту бактерій елементів, як Кальцій, Калій, Ферум, Натрій, Магній, Хлор, Сульфур у даному поживному середовищі є солі (K_2SO_4 , $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$) та розчин мікроелементів. Зазвичай, вони не можуть лімітувати ріст продуцента, оскільки вносяться у середовища у надлишку, тому їх кількість не розраховано.

Отже, зробивши перевірочний розрахунок складу поживного середовища, можна зробити висновок, що поживне середовище зі статті достатнє для культивування генно-інженерного штаму *Streptomyces lividans* Pk102, тому ним і будемо керуватися.

2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки продуцента пікроміцину

Продуцентом антибіотику пікроміцину є новий селекціонований штам бактерій *Streptomyces lividans* Pk102, який містить полікетидсинтазну систему I типу, за допомогою якої синтезується даний продукт.

Одержання мутантного штаму *Streptomyces lividans* Pik102

Штам отриманий шляхом гетерологічної експресії кластера біосинтетичних генів пікроміцину з використанням штучної хромосомної системи *Streptomyces*

Перший етап отримання генно-інженерного штаму бактерій – виділення кластера генів біосинтезу пікроміцину. Кластер біосинтетичного гена пікроміцину не має унікального сайту рестриктази на кордонах, тому один із сайтів розпізнавання *Hind* III був введений перед *pik* RII, а інший сайт розпізнавання *Hind* III був інтегрований поруч із *pikD* у штучний хромосомний вектор. Далі цей кластер був виділений шляхом перетравлення сайтом *Hind* III модифікованої хромосомної ДНК та її самолігування, потім названого рPik. Після конструювання рPik, фрагмент ДНК був вставлений у сайт розпізнавання *Avr* II рPik для генерації рекомбінантного вектора названого рPik001. Далі цей вектор було введено в бактерії *S. lividans* шляхом кон'югації, яка створила *S. lividans* Pik 101. [5]

Щоб збільшити продуктивність пікроміцину, додаткову копію його кластера ввели в *S. lividans* Pik101, що містить одну копію кластера пікроміцину. Щоб представити другу копію кластера генів пікроміцину, ген стійкості до апраміцину в рPik001 був замінений на ген стійкості до гігроміцину та названий рPik003. Потім цей рPik003 вводили в *S. lividans* Pik101 шляхом кон'югації і отримували потрібний нам штам, названий *Streptomyces lividans* Pik102.[5]

Морфолого-культуральні ознаки *Streptomyces lividans* Pik102

Streptomyces lividans – ниткоподібні бактерії, із високим вмістом ГЦ в ДНК. Дані бактерії характеризуються здатністю утворювати вегетативні гіфи, розміром у діаметрі 0,5 – 2,0 мкм, і утворювати розгалужений міцелій, що може інколи розпадатися на фрагменти (рис. 2.1.). В зрілому стані міцелій несе ланцюжки із трьох або більше спор. За Грамом, бактерії *S. lividans* відносяться до грампозитивних. [12]

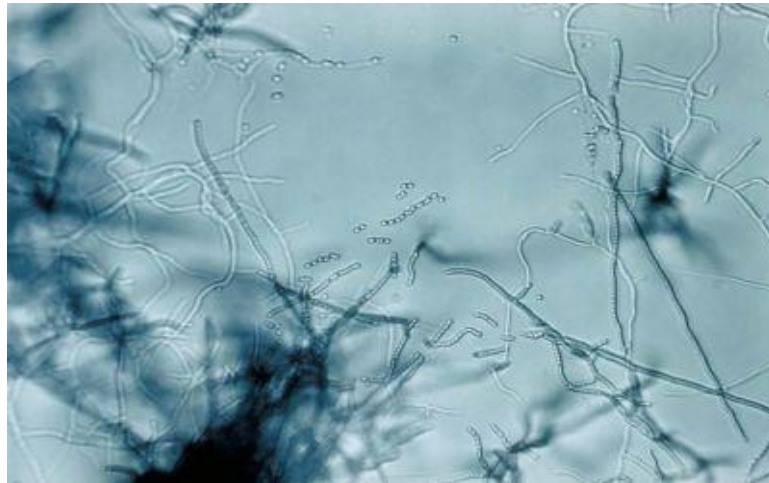


Рис 2.1. Світлова мікроскопія клітин *S. lividans* [13]

Ці бактерії утворюють спори, що розташовуються на спорангіях та є нерухомими, овальними. Спочатку спори проростають, утворюючи мультигеномний субстратний міцелій із розгалужених гіфів, який в свою чергу дає початок повітряним гіфам, на яких згодом знову утворюються спори або навіть ланцюжок спор. (рис. 2.2.) [12,14]



Рис. 2.2. Електронна мікрофотографія бактерій *S. lividans*, яка показує утворення спірального спорового ланцюга. [15]

Щодо культуральних ознак, то молоді колонії більш тонкі, плоскі та круглі, можуть цілком зніматись з поверхні середовища петлею. Зрілі культури – гладкі та смугасті, складчасті, м'якої воскоподібної консистенції. Вони міцніше з'єднуються із поживним середовищем за допомогою густих або пухких відростків. [12]



Рис. 2.3. Колонії *S. lividans* на середовищі з вівсяним агаром. [16]

Streptomyces lividans найчастіше росте на вівсяному агарі. Повітряний міцелій світло-сірий, бархатний; субстратний міцелій жовто-бурий та утворює розчинний пігмент буро-червоного кольору (рис. 2.3.). [12]

Фізіолого-біохімічні ознаки *Streptomyces lividans* Pk102

S. lividans є облігатними аеробними мікроорганізмами, для життєдіяльності яких необхідний кисень. За типом живлення – хемоорганогетеротрофи [12].

Оптимальна температура росту становить 30°C, а значення рН – 7,5[14]. Отже, за відношенням до температури *S. lividans* є мезофільним мікроорганізмом, а за відношенням до рН – нейтрофільним.

Дані бактерії є позитивними до каталази, оскільки здатні синтезувати фермент, який розщеплює перекис водню в кисні і воді. Також вони є кислото- і спиртостійкі.

Streptomyces lividans не вибагливий щодо поживного середовища та не потребує особливих факторів росту. Найкращим джерелом вуглецю для розвитку та утворення антибіотику є глюкоза. Також добре росте на середовищах з фруктозою, сахарозою, ксилозою, але не росте на середовищах із арабінозою, сорбітом, інозитом. [12]

Штам зберігається у вигляді ліофілізованої спорової суспензії при 0-4°C та на щільному середовищі Чапека [12]

2.4. Таксономічний статус біологічного агента

Філогенетичну класифікацію для *S. lividans* наведено відповідно до другого видання Керівництва Бергі з систематики бактерій [18]

Домен – *Bacteria*

Тип – *Actinobacteria*

Клас – *Actinobacteria*

Підклас – *Actinomycetales*

Порядок – *Actinomycetales*

Ряд – *Streptomycineae*

Родина – *Streptomycineae*

Вид – *lividans*

Висновки стосовно кількості стадій і об'ємів підготовки посівного матеріалу представимо у вигляді таблиці 3.1.

Таблиця 3.1

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

Об'єм ферментера, м ³	Коефіцієнт заповнення	Робочий об'єм ферментера, м ³	Об'єм посівного матеріалу (10%), м ³	Конденсат (10%), м ³	Об'єм підготовки поживного середовища, м ³
2	0,6	1,2	0,12	0,12	0,96
0,2	0,6	0,12	0,012 (12 дм ³)	0,012(12 дм ³)	0,096 (96 дм ³)
0,02 (20 дм ³)	0,6	0,012 (12 дм ³)	0,0012 (1,2дм ³)	-*	0,0096 (9,6дм ³)

Примітка: *Конденсат не враховано, оскільки стерилізація композицій поживного середовища відбуватиметься у колбах в автоклаві.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу пікроміцину у ферментері 2 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити у три етапи.

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

4.1. Шлях катаболізму ростового субстрату у біологічного агента

Основним ростовим субстратом для біосинтезу пікроміцину за допомогою *Streptomyces lividans* Pk 102 є сахароза [5], тому катаболізм розпочинаємо саме з цієї сполуки.

У Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) [18] відсутня інформація про шлях катаболізму ростового субстрату саме у штаму *Streptomyces lividans* Pk 102, але можна припустити, що він подібний до такого, як у загального виду *Streptomyces lividans* (без штаму). Тому для побудови шляху метаболізму сахарози обираємо його.

Згідно KEGG катаболізм сахарози у *S. lividans* відбувається шляхом перетворення ростового субстрату у D-фруктозу та D-глюкозу за допомогою ферменту альфаглюкозидази (КФ 3.2.1.20). [18] D-глюкоза за участі ферментного компонента ЕПА системи цукорфосфотрансферази (КФ 2.7.1.199) перетворюється у α -D-глюкозо-6-фосфат, який далі піддається перетворенню у β -D-фруктозо-6-фосфат за допомогою глюкозо-6-фосфатізомерази (КФ 5.3.1.9). [19] В свою чергу D-фруктоза зразу перетворюється у β -D-фруктозо-6-фосфат за участі фруктокінази (КФ 2.7.1.4). [20]

Далі згідно KEGG β -D-фруктозо-6-фосфат перетворюється у β -D-фруктозо-1,6-дифосфат за участі фосфотруктокінази (КФ 2.7.1.11), яка в свою чергу піддається перетворенню за участі фруктозо-біфосфаталядолази (КФ 4.1.2.13) до гліцеральдегід-3-фосфату. Далі відбувається перетворення до 1,3-фосфогліцерату під дією ферменту гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (КФ 1.2.1.12) з наступною трансформацією до 3-фосфогліцерату за участі фосфогліцераткінази. В свою чергу 3-фосфогліцерат перетворюється в 2-фосфогліцерат, а той в фосфоенолпіпуват за участі фосфогліцератмутази (КФ 5.4.2.11) та енолази (КФ 4.2.1.11) відповідно. І на останок, під дією ферменту піруваткінази (КФ 2.7.1.40)

					НУХТ БТЕК 04.01.24 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Тромпак В.Ю			РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	Літ.	Арк.	Акрушіє
Перевір.		Красінько В.О					6	97
						26		
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Затверд.		Стабніков В.П						

фосфоенолпіруват трансформується у піруват. [19]

Сема катаболізму сахарози наведено на *рис. 4.1*

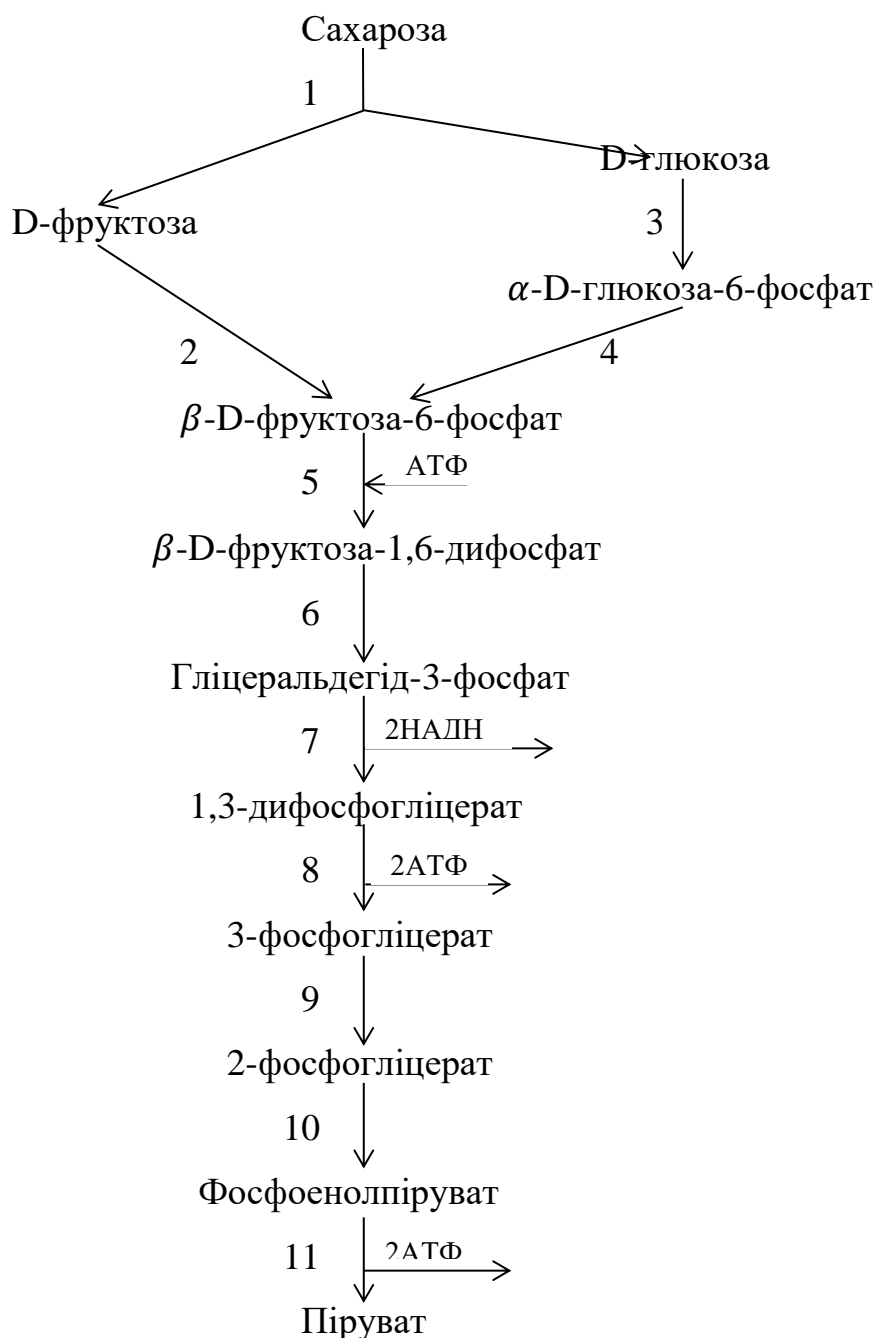


Рис. 4.1. Катаболізм сахарози у Streptomyces lividans згідно KEGG [18,19,20].

Ферменти: 1 – альфаглюкозидаза (КФ 3.2.1.20); 2 – фруктокіназа (КФ 2.7.1.4); 3 – компонент ЕПА системи цукорфосфотрансферази (КФ 2.7.1.99); 4 – глюкозо-6-фосфат ізомераза (КФ 5.3.1.9); 5 – фосфотруктокіназа (КФ 2.7.1.11); 6 – фруктозо-біфосфатальдолаза (КФ 4.1.2.13); 7 – гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12); 8 – фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3);

9 – фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.11); 10 – енолаза (КФ 4.2.1.11); 11 – піруваткіназа (КФ 2.7.1.40).

4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

Під час росту *Streptomyces lividans* Pk 102 з використанням сахарози, внаслідок її катаболізму, утворюється піруват, який згодом під дією ферредоксиноксидоредуктази (КФ 1.2.7.11) перетворюється на ацетил-КоА. Далі ацетил-КоА залучається до циклу трикарбонових кислот (ЦТК) [19]

Так як у KEGG [18] відсутня інформація про шляхи біотрансформації ростового субстрату у штаму *S. lividans* Pk 102, то для побудови шляху подальшого метаболізму обираємо загальний вид *Streptomyces lividans* (без штаму). (рис. 4.2)

Анаплеретичними реакціями, які забезпечують поповнення інтрмедіату ЦТК будуть компенсуватися карбоксилюванням фосфоенолпірувату та пірувату під дією фосфоенолпіруваткарбоксікінази (КФ 4.1.1.49) і піруваткарбоксілази (КФ 6.4.1.1) відповідно. [21]

Пікроміцин – антибіотик, який утворюється з малоніл-КоА, метилмалоніл-КоА та d-TDP-дезозаміну.

Малоніл-КоА утворюється з ацетил-КоА за участі ферменту ацетил-КоА карбоксілази (КФ 6.4.1.2). [22]

Оксалоацетат, що утворився в ЦТК, піддається трансформації до амінокислот аспартату, треоніну та ізолейцину відповідно. [21] Ізолейцин перетворюється на (S)-3-метил-2-оксопентаноат під дією ферменту амінотрансферази з розгалуженим ланцюгом (КФ 2.6.1.42), а той деформується у 2-метил-1-гідроксибутил-ThPP за участі 2-оксоізовалератдегідрогенази E1 компонента (КФ 1.2.4.4). Далі відбувається перетворення на S-(2-метилбутаноїл)-дигідроліпомід під дією того ж ферменту з наступною трансформацією до (S)-2-метилбутаноїл-КоА за участі 2-оксоізовалератдегідрогенази E2 компонента (КФ 2.3.1.168). Тоді 2-метилбутаноїл-КоА під дією ацетил-КоА дегідрогенази (КФ 1.3.8.5) перетворюється на транс-2-метил-2-еноїл-КоА, а той відповідно в (S)-3-гідрокси-2-метилбутаноїл-КоА за участі еноїл-КоА гідратази (КФ 4.2.1.17).

Згодом, остання перетворюється на 2-метил-ацетоацетат-КоА під дією 3-гідрокиацетил-КоА-дегідрогенази (КФ 1.1.1.35) з наступною трансформацією у пропаноїл-КоА за участі ацетил-КоА ацеттрасфрезази (КФ 2.3.1.16). І на останок, під дією ферменту біотин карбоксилази (КФ 6.4.1.3) пропаноїл-КоА перетворюється на метилмалоніл-КоА, який є вихідною сполукою для синтезу пікроміцину. [23]

З α -D-глюкозо-6-фосфату, утвореного при гліколізі, синтезується D-глюкозо-1-фосфат під дією ферменту фосфоглюкомутази (КФ 5.4.4.2). Далі ця речовина трансформується в dTDP-глюкозу за участі глюकोзо-1-фосфаттимідилтрансферази (КФ 2.7.7.24), яка згодом перетворюється на dTDP-4-окси-6-деокси-D-глюкозу під дією dTDP-глюкоза-4,6-дегідратази (КФ 4.2.1.46). Далі відбувається трансформація на dTDP-4-аміно-4,6-дидеокси-D-глюкозу за участі dTDP-4-аміно-4,6-дидеокситрансамілази (КФ 2.6.1.33) з наступним перетворенням до d-TDP-3-оксо-4,6-дидеокси-D-глюкозу під дією dTDP-4-аміно-4,6-дидеоксиаміакліази (КФ 4.3.1.30). І на останок, під дією ферменту dTDP-3-аміно-3,4,6-тридеокситрансамінази (КФ 2.6.1.106) остання перетворюється на d-TDP-3-аміно-3,4,6-тридеокси-D-глюкозу, яка трансформується під впливом dTDP-3-аміно-3,4,6-тридезоксі-альфа-D-глюкопіраноза N,N-диметилтрансферази (КФ 2.1.1.234) до вихідної сполуки - d-TDP-дезозамін. [24]

Після синтезу всіх вихідних сполук утворюється антибіотик пікроміцин. Спочатку, метилмелоніл-КоА та меланіл-КоА трансформуються у норбонолін під дією 10-дезоксиметинолідсинтази (КФ 2.3.1.239). Далі до норбоноліну залучається d-TDP-дезозамін і вони перетворюються на норбоміцин за участі 10-дезоксиметиноліддезозамінілтрансферази (КФ 2.4.1.277). І на останок, під впливом ферменту пікроміцинсинтази (КФ 1.14.15.33) норбоміцин перетворюється на пікроміцин. [25]

Нижче наведені фермени 1 - 42, які беруть участь у біосинтезі пікроміцину (рис. 4.2.):

- 1 – альфаглюкозидаза (КФ 3.2.1.20);
- 2 – фруктокіназа (КФ 2.7.1.4);

- 3 – компонент ЕПА системи цукорфосфотрансфераза (КФ 2.7.1.99);
- 4 – глюкозо-6-фосфат ізомераза (КФ 5.3.1.9);
- 5 – фосфофруктокіназа (КФ 2.7.1.11);
- 6 – фруктозо-біфосфатальдолаза (КФ 4.1.2.13);
- 7 – гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12);
- 8 – фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3);
- 9 – фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.11);
- 10 – енолаза (КФ 4.2.1.11);
- 11 – піруваткіназа (КФ 2.7.1.40);
- 12 - ферредоксиноксидоредуктаза (КФ 1.2.7.11);
- 13 – цитратсинтаза (КФ 2.3.3.1);
- 14 – аконітатгідратаза (КФ 4.2.1.3);
- 15 – ізоцетратдегідрогеназа (КФ 1.1.1.42);
- 16 – 2-оксоглутаратдегідрогеназа (КФ 2.3.1.61);
- 17 – сукциніл-КоА-синтетаза (КФ 6.2.1.5);
- 18 – сукцинатдегідрогеназа (КФ 1.3.5.1);
- 19 – фумаратгідратаза (КФ 4.2.1.2);
- 20 – малатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.37);
- 21 - фосфоенолпіруваткарбоксикіназа (КФ 4.1.1.49);
- 22 - піруваткарбоксилаза (КФ 6.4.1.1);
- 23 - ацетил-КоА карбоксилаза (КФ 6.4.1.2);
- 24 - амінотрансфераза з розгалуженим ланцюгом (КФ 2.6.1.42);
- 25 - 2-оксоізовалератдегідрогеназа Е1 компонента (КФ 1.2.4.4);
- 26 – дигідроліпоаміддегідрогеназа (КФ 1.8.1.4);
- 27 - 2-оксоізовалератдегідрогеназа Е2 компонента (КФ 2.3.1.168);
- 28 - ацетил-КоА дегідрогеназа (КФ 1.3.8.5);
- 29 - еноіл-КоА гідратаза (КФ 4.2.1.17);
- 30 - 3-гідроацетил-КоА-дегідрогеназа (КФ 1.1.1.35);
- 31 - ацетил-КоА ацеттрасфераза (КФ 2.3.1.16);
- 32 - біотин карбоксилаза (КФ 6.4.1.3);
- 33 - 10-дезоксиметинолідсинтаза (КФ 2.3.1.239);
- 34 - фосфоглюкомутаза (КФ 5.4.4.2);
- 35 - глюкозо-1-фосфаттимідилтрансфераза (КФ 2.7.7.24);
- 36 - dTDP-глюкоза-4,6-дегідратаза (КФ 4.2.1.46);
- 37 - dTDP-4-аміно-4,6-дидеокситрансамілаза (КФ 2.6.1.33);
- 38 - dTDP-4-аміно-4,6-дидеоксиаміакліаза (КФ 4.3.1.30);
- 39 - dTDP-3-аміно-3,4,6-тридеокситрансаміназа (КФ 2.6.1.106);
- 40 - dTDP-3-аміно-3,4,6-тридеокси-альфа-D-глюкопіраноза N,N-диметилтрансфераза (КФ 2.1.1.234);
- 41 - 10-дезоксиметиноліддезозамінілтрансфераза (КФ 2.4.1.277);
- 42 - пікроміцинсинтаза (КФ 1.14.15.33).

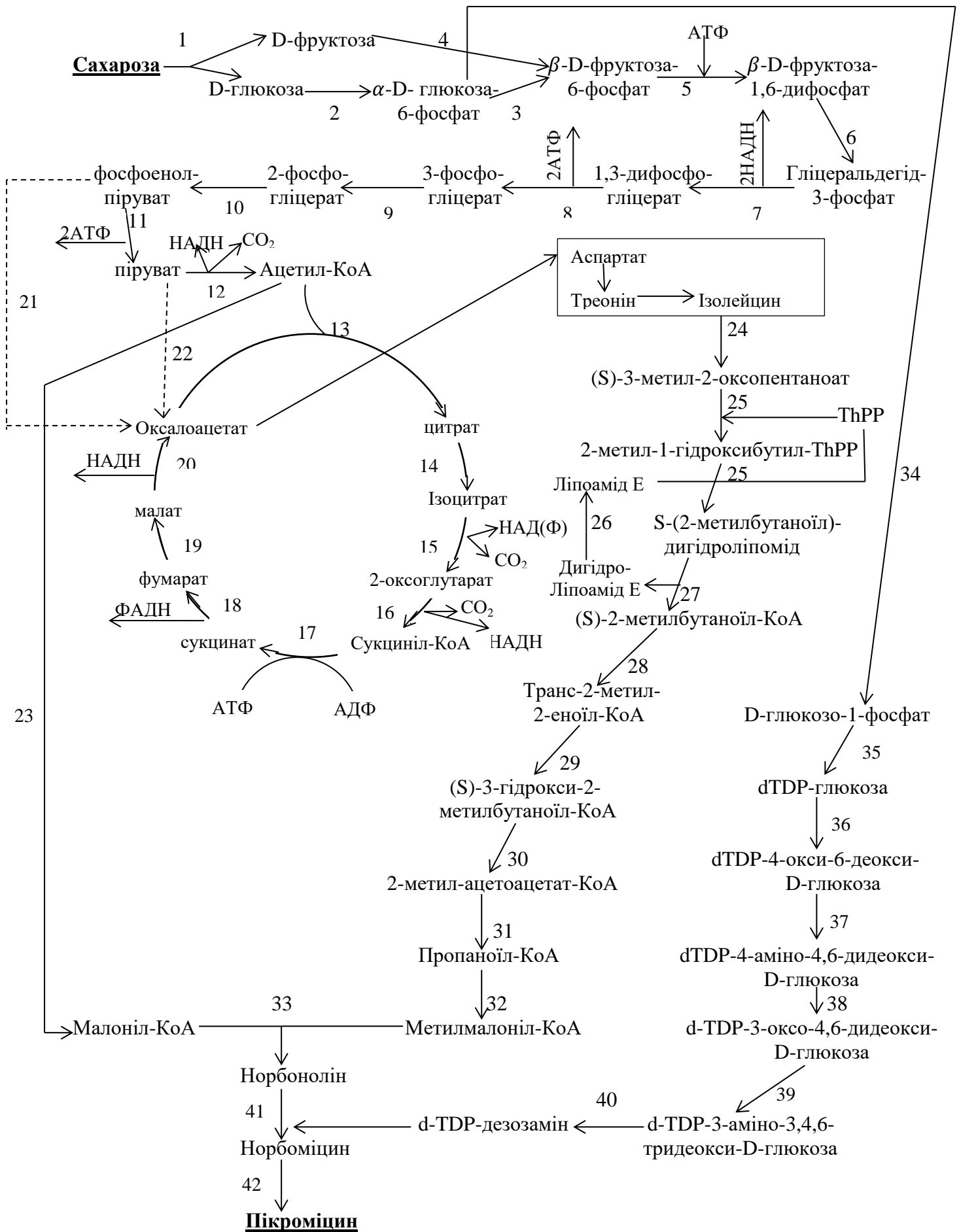


Рис. 4.2. Схема біотрансформації сахарози *S. lividans* Pk 102 у пікроміцин

РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничий біосинтез

Допоміжними стадіями під час культивування генно-інженерного штаму бактерій *Streptomyces lividans* Pk 102 є санітарна підготовка виробництва, підготовка аераційного повітря, підготовка та стерилізація поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках, посівних апаратах та для виробничого біосинтезу. Також додатково потрібно вибрати розчини для регуляції рН під час культивування бактерій.

5.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Культивування *S. lividans* Pk102 для синтезу пікроміцину здійснюють глибинним способом. Це пояснюється тим, що оптимальна температура для культивування даного штаму є 30°C, а оптимальне значення рН приблизно нейтральне (рН=7,5), то можливий ризик контамінації сторонніми мезофільними і нейтрофільними мікроорганізмами. [5] Тому, є необхідність забезпечення асептичних умов під час біосинтезу, чого не можливо досягти при поверхневому (твердо-фазному) культивуванні. Асептичні умови також забезпечуються стерилізацією обладнання і комунікацій, поживного середовища та аераційного повітря, необхідного для забезпечення росту *S. lividans* та синтезу ним продукту, оскільки біологічний агент є облігатним аеробом. Для запобігання контамінації в ферментері під час біосинтезу, в ньому створюється надлишковий тиск завдяки подачі стерильного аераційного повітря. [26]

Незважаючи на суттєві переваги безперервного культивування перед періодичним, біосинтез пікроміцину здійснюється у періодичному процесі, оскільки максимальний синтез антибіотика відбувається у стаціонарній фазі росту продуцента. Тому, «підтримання» генно-інженерного штаму бактерій в експоненційній фазі росту є недоцільним, оскільки у цьому разі спостерігається

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.24 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Тромпак В.Ю</i>			РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушіє</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Красінько В.О</i>					22	97
<i>Н. Контр.</i>					32 <i>Кафедра БТМ</i>			
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П</i>						

зниження концентрації антибіотика пікроміцину в культуральній рідині. [26]

Отже, культивування *S. lividans* Pk102 проводять глибинним періодичним способом, в асептичних умовах з посиленою аерацією.

Визначившись зі способом культивування (глибинне) *Streptomyces lividans* Pk102, далі обираємо необхідне оснащення для ферментера, яке б забезпечило створення необхідних нам умов.

По-перше, у процесі культивування даних бактерій, аеробні умови створюються в результаті подачі стерильного повітря через барботер, тому ферментер обов'язково повинен бути ним оснащений. По-друге, для збільшення швидкості розчинності кисню, ферментер повинен бути оснащений перемішувальним пристроєм для збільшення поверхні розподілу фаз. Однак, так як бактерії *S.lividans* Pk102 утворюють міцелій, потрібно використовувати ферментери з невеликим рівнем турбогіробізу (220 об/хв). По-третє, для забезпечення сталої температури культивування, ферментер оснащується сорочкою, в яку подають охолоджену воду або нагріту пару в залежності від потреб. По-четверте, для технологічного контролю за процесом біосинтезу, ферментер повинен бути оснащеним датчиком температури, зондом рН, датчиком концентрації розчинного кисню, датчиком для контролю швидкості перемішуючого пристрою. [27]

Також ферментер повинен відповідати основним вимогам, таким як: можливістю проведення процесу в асептичних умовах за інтенсивної аерації середовища; має бути абсолютно герметичними, для підтримання асептичних умов, а всі трубопроводи мають витримувати жорстку стерилізацію парою і працювати під невеликим надлишковим тиском. [27]

Отже, для культивування *S. lividans* Pk102 обираємо ферментер, оснащений мішалкою, барботером, сорочкою та датчиками контролю.

5.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря

Streptomyces lividans Pk 102 є облігатними аеробами, тому процес ферментації проходить за безперервної подачі стерильного аераційного повітря через барботер. [5] Тому однією з найважливіших задач є одержання великої

кількості стерильного повітря для аерації.

В лабораторних боксах, де працюють з посівною культурою та інокулятом, для стерилізації повітря використовують ультрафіолетові лампи.

Для культивування бактерій в біореакторах окремо готують стерильне аераційне повітря. Для цього роблять забір повітря та його попереднє очищення, стиснення, охолодження та видалення вологи, нагрівання та очищення в головному та індивідуальному фільтрах.

Атмосферне повітря засмоктується турбокомпресором через забірну шахту, розташовану на два-три метри над дахом будівлі. Оскільки висота виробничої будівлі становить 7 м (висота стін 5 м, висота фундаменту 0,5 м, висота даху 1,5 м), то атмосфера відбирається на висоті 10 м.

Для видалення зайвої вологи та стабілізації термодинамічних показників повітря його пропускають через компресор, теплообмінник-нагрівач та теплообмінник-охолоджувач.

Стерилізують повітря за допомогою фільтрів. Для цього використовують фільтри грубого очищення, тонкого очищення та індивідуальні фільтри, які розташовуються безпосередньо перед посівними апаратами та ферментером. Для попереднього очищення повітря використовують головні фільтри. Вони містять в якості фільтрувального матеріалу тканину з синтетичних волокон або ж металеву сітку та затримують часточки > 10 мкм. Для тонкого очищення повітря використовують фільтри тонкої фільтрації. Вони містять в якості фільтрувального матеріалу склотканини, які конструюють складчасто для більшої поверхні фільтрування; затримують часточки > 1 мкм. Індивідуальні фільтри заповнюються надтонкими мембранами чи волокнами, вони затримують до 99,999% мікроорганізмів. [28]

5.1.3. Вибір мийних та дезинфікуючих засобів

Виробництво антибіотику пікроміцину *Streptomyces lividans* Pk 102 здійснюється протягом 63 дні і передбачає підготовку такого обладнання: ферментер об'ємом 2 м^3 , посівні апарати об'ємом 200 та 20л, збірники для підготовки та стерилізації компонентів поживного середовища, качалки, бокс та

лабораторне устаткування.

Виробництво продукту здійснюється в таких приміщеннях: цех виробничого біосинтезу та вирощування інокуляту, мікробіологічна лабораторія в якій знаходиться бокс, автоклав, термостат, холодильник, лабораторний посуд та інвентар, апаратура для проведення різноманітних видів контролю.

На *рис 5.1.* наведено приблизний план приміщення для виробництва антибіотику пікроміцину штамом *S. lividans* Pk 102. План враховує діаметри обладнання та відстань між ними (не менше 1м) і від стін (1...1,5м).

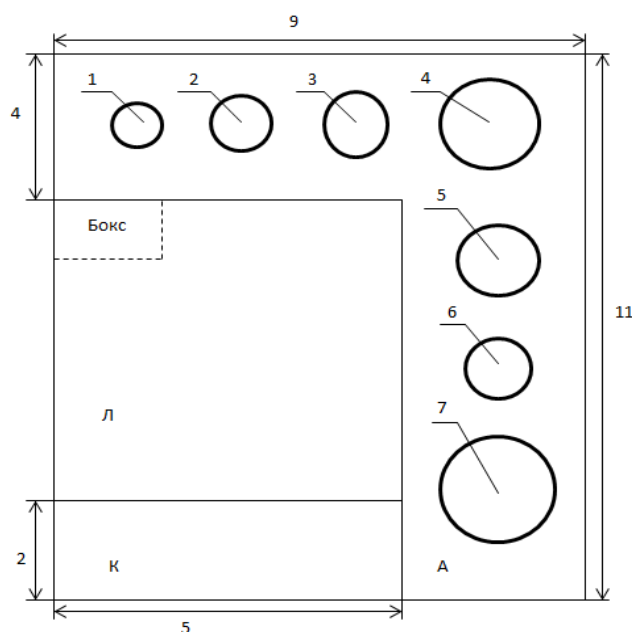


Рис 5.1. Ескіз плану виробничого приміщення для виробництва пікроміцину *S. lividans* Pk 102

А – цех виробничого біосинтезу та вирощування інокуляту (1- інокулятор об'ємом 20л; 2,4 – реактор для приготування композиції А об'ємом 120 та 1200л відповідно; 3 – інокулятор об'ємом 200л; 5 – реактор для приготування підживувального розчину сахарози об'ємом 200 л; 6 - реактор для приготування композиції Б об'ємом 100; 7- ферментер об'ємом 2м³); Л- мікробіологічна лабораторія; К – приміщення з качалками.

Габаритні розміри основного обладнання наведені у табл. 5.1

**Габаритні розміри основного обладнання для виробництва пікроміцину
S. lividans Pk 102**

Обладнання	Геометричний об'єм, л	Діаметр, м	Висота, м
Реактор-змішувач для приготування композиції А	10	0,2	0,4
Інокулятор	20	0,3	0,6
Реактор-змішувач для приготування композиції А	120	0,5	1
Збірник для приготування композиції Б	10	0,2	0,4
Інокулятор	200	0,8	1,5
Реактор-змішувач для приготування композиції А	1200	1,3	2
Реактор-змішувач для приготування 6%-го розчину NaOH	5	0,2	0,4
Реактор-змішувач для приготування 40%-го підживлювального розчину сахарози	150	0,5	1
Збірник для приготування композиції Б	100	0,5	1
Ферментер	2000	2	3
Всього	3815		

За даними наведеними в табл. 5.1, загальний об'єм реакторів-змішувачів, збірників та апаратів для вирощування посівного матеріалу і виробничого біосинтезу становить 3,815 м³.

Для забезпечення чистоти виробничих приміщень проводять щоденне та генеральне прибирання. Миття підлоги здійснюють щодня, тобто 63 рази. Один раз на місяць здійснюється обробка стін, підлоги, вікон тощо (генеральне прибирання), тобто 2 рази на 63 дні. Для розрахунку кількості мийних засобів необхідно розрахувати приблизну площу оброблення мийними та дезінфікуючими засобами, враховуючи площу підлоги виробничого приміщення та площу стін на висоту 6 м.

Площа підлоги цеху виробничого біосинтезу становить 64 м² (4 · 9 + 4 · 7), площа стін – 240 м² [(4 + 9 + 11 + 4 + 7 + 5) · 6], а загальна площа становить 64 + 240 = 304 м².

Загальну площу поверхні обробки мийними засобами наведено у табл. 5.2.

Таблиця 5.2

Розрахунок загальної площі стін та підлоги виробничих приміщень

Приміщення	Площа підлоги, м ²	Площа стін, м ²	Загальна площа, м ²
Цех виробничого біосинтезу та вирощування інокуляту	64	240	304
Мікробіологічна лабораторія	25	120	145
Приміщення з качалками	10	84	94
Загальна площа	99	444	543

Кількість виробничих циклів для синтезу антибіотика пікроміцину становить 9. Оскільки миття обладнання відбувається перед кожним циклом, кількість процесів миття за весь період виробництва складає 10 (додаткове миття після останнього циклу). Тоді загальний об'єм миття становитиме:

$$3,815 \cdot 10 = 38,15 \text{ м}^3$$

Узагальнені дані щодо розрахунку площі миття та дезінфекції за весь період виробництва наведено в табл. 5.3.

Таблиця 5.3

Розрахунок загальної площі миття та дезінфекції оброблювального об'єкту за весь період виробництва пікроміцину *S. lividans* Pk 102

Об'єкт миття та дезінфекції	Площа (об'єм) оброблюваного об'єкту, м ² (м ³)	Кількість процесів миття та дезінфекції за весь період виробництва	Загальна площа (об'єм) миття та дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м ² (м ³)
Обладнання	3,815	10	38,15
Підлога	99	63	6237
Стіни, двері, вікна	444	2	888

Дані щодо вибору мийних та дезінфікуючих засобів наведені у табл. 5.4.

Отже, спираючись на ефективність, економічність та безпечність, для миття обладнання було обрано каустичну соду, а найкращим дезінфікуючим засобом для виробничих приміщень є – Дезекон. Однак, необхідно обов'язково міняти дані засоби, оскільки в мікроорганізмів може виникнути резистентність до них, і вони будуть не ефективними.

Таблиця 5.4

Узагальнена характеристика витрат мийних та дезінфікуючих засобів для виробництва пікроміцину

Назва мийного/дезінфікуючого засобу (діюча речовина)	Об'єкт миття та дезінфекції	Концентрація робочого розчину	Загальна площа (об'єм) миття та дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м ² (м ³)	Кількість робочого розчину за весь період виробництва, л	Вартість 1 л/кг мийного/дезінфікуючого засобу, грн	Вартість 1 л робочого розчину, грн	Загальна вартість миття та дезінфекції за весь період виробництва, грн
Гембар ²⁹ (гуанінова полімерна сполука)	Обладнання	0,25	38,15	7630	516,6	1,3	9919
Дезосепт Форте ³⁰ (надоцтва кислота, перекись водню, оцтова кислота)	Обладнання	0,3	38,15	7630	396	1,2	9156
Каустична сода ³¹ (NaOH)	Обладнання	1	38,15	7630	95	0,95	7248,5
Хлорантоін ³² (хлорвмісні сполуки)	Стіни, підлога, вікна, двері	0,2	7125	712,5	610	1,2	855
Дезекон ³³ (комплекс четвертинних амонієвих сполук)	Стіни, підлога, вікна, двері	0,05	7125	712,5	300	0,15	106,9
Дезактин ³⁴ (дихлорантин)	Стіни, підлога, вікна, двері	0,2	7125	712,5	437,48	0,9	641,3

5.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Згідно даних сучасних наукових публікацій [5] при культивуванні *Streptomyces lividans* Pk 102 для одержання антибіотику пікроміцину використовується поживне середовище такого складу (г/л):

- Сахароза – 103;
- Глюкоза – 10;
- K_2SO_4 – 0,25;
- $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ – 10,12;
- KH_2PO_4 – 1;
- $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ – 1,18;
- Казамінова кислота – 0,1;
- Дріжджовий екстракт – 5;
- L-пролін – 0,16;
- TES (буфер) – 5,73;
- Розчин мікроелементів, що містить (г/л): $ZnCl_2$ – 0,04; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ – 0,2; $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ – 0,01; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ – 0,01; $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ – 0,01; $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ – 0,01.

Стерилізації підлягають всі компоненти поживного середовища, оскільки в ньому відсутні речовини (жири, крохмаль), які спричиняють протекторний вплив, тобто збільшують стійкість мікроорганізмів до високих температури і тиску. [28]

Також слід зазначити, що для вирощування *S.lividans* Pk 102 потрібна сахароза з високою концентрацією, що не може бути введена на початку. Це пояснюється тим, що при початковій високій концентрації збільшується тривалість лаг-фази, відбувається інгібування росту продуцента, а також в бактерій може виникнути осмотичний шок, який призведе до руйнування клітин. [21] Тому сахарозу ми будемо вводити дробно порціями в процесі культивування.

Концентрація сахарози в середовищі культивування продуцента пікроміцину становить 103 г/л. На початку процесу у середовище вносять 40 г/л субстрату. Отже, у процесі культивування в середовище необхідно внести:

103-40=63 г/л сахарози у вигляді підживлювального розчину.

Розрахую загальну кількість сахарози (X) для приготування підживлювального розчину. Об'єм поживного середовища для виробничого біосинтезу становить 960 л. Отже:

63 г/л сахарози міститься в 1 л середовища,

X г сахарози міститься в 960 л середовища.

$$X = (960 \cdot 63) / 1 = 60,48 \text{ кг сахарози.}$$

Далі розрахую об'єм 40%-го підживлювального розчину (V), що містить 60,48 кг сахарози:

40 кг сахарози міститься у 0,1 м³ розчину,

60,48 кг сахарози міститься у V м³ розчину.

$$V = (60,48 \cdot 0,1) / 40 = 0,15 \text{ м}^3 \text{ розчину.}$$

Підготовка і стерилізація даного підживлювального розчину (0,15 м³) здійснюється в окремому реакторі об'ємом 0,2 м³. Умови стерилізації: температура 112°C, тиск 0,05 МПа впродовж 20-30 хв.

Тепер розрахую кількість порцій підживлення і об'єм підживлювального розчину сахарози для однієї порції. Тривалість процесу біосинтезу пікроміцину становить 120 годин. Прийму, що підживлення вноситься в середовища кожні 24 год, причому остання порція – за 24 години до кінця процесу біосинтезу. Отже, кількість порцій підживлення становить (120-24)/24=4. Тому, з кожною порцією підживлення у середовище необхідно внести $0,15 / 4 = 37,5$ л 40%-го підживлювального розчину сахарози.

Для вирощування *S.lividans* Pk 102 також потрібен розчин мікроелементів. Тому необхідно визначити їх вміст, потрібний для кожної стадії технологічного процесу (табл. 5.5). Дані наведені у цій таблиці, свідчать про те, що для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках і посівному апараті на 20л необхідно готувати запасний розчин мікроелементів, який вноситиметься в розрахунку 0,1 мл на 100 мл середовища. На наступних стадіях мікроелементи можна вносити в композицію з іншими солями.

Таблиця 5.5

Розрахунок вмісту мікроелементів у різних об'ємах поживного середовища

Об'єм середовища, л	Вміст мікроелементів, (г/л)					
	ZnCl ₂	FeCl ₃ ·6H ₂ O	CuCl ₂ ·2H ₂ O	MnCl·4H ₂ O	Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O
1,2	0,048	0,24	0,012	0,012	0,012	0,012
12	0,48	2,4	0,12	0,12	0,12	0,12
120	4,8	24	1,2	1,2	1,2	1,2
1200	48	240	12	12	12	12

Для того, щоб визначити спосіб приготування композиції А (сахароза, глюкоза, казамінова кислота, дріжджовий екстракт, L-пролін, TES) і допоміжних розчинів (хлоридна кислота і натрі гідроксид) і визначитися з необхідними для цього колбами чи реакторами, розрахуємо кількість таких компонентів, необхідну для приготування середовища на кожному з чотирьох стадій виробництва (табл. 5.6; табл. 5.7).

Таблиця 5.6

Розрахунок вмісту та особливості приготування деяких компонентів поживного середовища

Об'єм середовища, л	Композиція А, г						
	Сахароза	Глюкоза	Казамінова к-та	Дріжджовий екстракт	L-пролін	TES	Особливості приготування
0,9	48	12	0,12	6	0,192	6,876	Колба на 2000 мл
6,5	480	120	1,2	60	1,92	68,76	Реактор на 10 л
73	4800	1200	12	600	19,2	687,6	Реактор на 120 л
730	48000	12000	120	6000	192	6876	Реактор на 1200 л

Таблиця 5.7

Розрахунок вмісту та особливості приготування деяких компонентів поживного середовища

Об'єм середовища, л	HCl (6%)		NaOH (6%)	
	Об'єм, мл	Особливості приготування	Об'єм, мл	Особливості приготування
1,2	-	-	-	-
12	3,2*	Колба на 50 мл	24	Колба на 50 мл

120	16*	Колба на 50 мл	240	Колба на 500 мл
1200	160*	Колба на 250 мл	2400	Реактор на 5 л

*об'єм розчину хлоридної кислоти розраховувала, виходячи з об'єму композиції солей перед стерилізацією – 1,6; 8; 80 л відповідно

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

Стерилізацію середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках будемо здійснювати в автоклаві, оскільки його об'єм не великий (1,2л). Проаналізувавши склад поживного середовища, умовно ділимо його на такі композиції (залежно від режиму стерилізації компонентів):

Композиція А: сахароза, глюкоза, дріжджовий екстракт, казамінова кислота, L-пролін, TES (режим стерилізації: температура 112°C, тиск 0,05 МПа, тривалість 30 хвилин).

Композиція Б: K_2SO_4 , $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (режим стерилізації: температура 131°C, тиск 0,15 МПа, тривалість 40 хв).

Композиція В: KH_2PO_4 (режим стерилізації: температура 131°C, тиск 0,15 МПа, тривалість 40 хв).

Сахароза, глюкоза, дріжджовий екстракт, казамінова кислота, L-пролін, TES є термолабільними і потребують м'яких режимів стерилізації, тому що містять вуглеводи та білки. Композицію А готують в окремому збірнику. Сульфат калію, хлорид магнію гексагідрат та хлорид кальцію дигідрат стерилізують за звичайних для солей температурах. Калій дифосфат готують окремо для унеможливлення утворення нерозчинних фосфатів кальцію і магнію під час стерилізації. Стерилізують його за звичайних режимів для солей. Окремо готують запасний розчин мікроелементів об'ємом 100 мл (з розрахунку на використання в двох стадіях підготовки посівного матеріалу), який стерилізують в автоклаві при температурі 131°C, тиску 0,15 МПа, упродовж 40 хв.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках наведений у табл. 5.8.

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 1200 мл середовища	Композиція	Об'єм композиції, V, мл
Сахароза	40	48 г	А	900
Глюкоза	10	12г		
Казамінова кислота	0,1	0,12г		
Дріжджовий екстракт	5	6г		
L-пролін	0,16	≈0,2г		
TES	5,73	≈6,9г		
Вода	900 мл			
K ₂ SO ₄	0,25	0,3г	Б	200
MgCl ₂ ·6H ₂ O	10,12	12,1г		
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,18	1,4г		
Вода	200 мл			
KH ₂ PO ₄	1	1,2г	В	100
Вода	100 мл			
Розчин мікроелементів	-	1,2 мл	-	1,2

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

Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 20 л

Для цієї стадії необхідно 9,6 л поживного середовища, яке ділять умовно на такі композиції:

Композиція А: сахароза, глюкоза, дріжджовий екстракт, казамінова кислота, L-пролін, TES (режим стерилізації: температура 112°C, тиск 0,05 МПа, тривалість 30 хвилин).

Композиція Б: K₂SO₄, MgCl₂·6H₂O, CaCl₂·2H₂O, KH₂PO₄ (режим стерилізації: температура 131°C, тиск 0,15 Мпа, тривалість 40 хв, рН = 4,0-4,5).

Композицію Б (K₂SO₄, MgCl₂·6H₂O, CaCl₂·2H₂O) та композицію В (KH₂PO₄) тепер можна об'єднати і готувати разом, однак за попереднього підкислення до рН 4,0-4,5 хлоридною кислотою, щоб не утворився осад фосфатів. Стерилізують за

звичайних для солей режимів. Після стерилізації необхідно буде довести рН до 6,8-7,0 стерильним розчином натрію гідроксиду.

Композицію А (сахароза, глюкоза, дріжджовий екстракт, казамінова кислота, L-пролін, TES) розчинають та стерилізують в окремому реакторі за термолабільних режимів, а вже потім з'єднують з солями в посівному апараті.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 20 л наведений у табл. 5.9.

Таблиця 5.9

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 20л

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 9,6 л середовища	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Сахароза	40	384г	А	8
Глюкоза	10	96г		
Казамінова кислота	0,1	0,96 г		
Дріжджовий екстракт	5	48г		
L-пролін	0,16	≈1,5г		
TES	5,73	55г		
Вода		7,5 л		
Конденсат		0,5 л		
K ₂ SO ₄	0,25	2,4г	Б	1,6
MgCl ₂ ·6H ₂ O	10,12	≈97,2г		
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,18	≈11,3г		
KH ₂ PO ₄	1	9,6г		
Вода		1,6 л		
Розчин мікроелементів	-	9,5 мл	-	0,0095

Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 200 л

Для цієї стадії необхідно 96 л поживного середовища. Склад поживного середовища ділимо на такі композиції (залежно від режиму стерилізації компонентів):

Композиція А: сахароза, глюкоза, дріжджовий екстракт, казамінова кислота,

L-пролін, TES (режим стерилізації: температура 112°C, тиск 0,05 МПа, тривалість 30 хвилин).

Композиція Б: K_2SO_4 , $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, KH_2PO_4 , $ZnCl_2$, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$, $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ (режим стерилізації: температура 131°C, тиск 0,15 МПа, тривалість 40 хв, рН = 4,0-4,5).

Солі мікроелементів ($ZnCl_2$, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$, $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$) тепер можна стерилізувати разом з іншими солями та калієм дигідрофосфатом, але за попереднього підкислення до рН 4,0-4,5, щоб не утворився осад фосфатів. Після стерилізації необхідно буде довести рН до 6,8-7,0 стерильним розчином натрію гідроксиду. Солі розчиняють і стерилізують безпосередньо в збірниках, що встановленні перед ферментерами за стандартних для солей режимів.

Композицію А (сахароза, глюкоза, дріжджовий екстракт, казамінова кислота, L-пролін, TES) розчинають та стерилізують в окремому реакторі за термолабільних режимів.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 200 л наведено у табл. 5.10.

Таблиця 5.10

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 200 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 96 л середовища	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Сахароза	40	3,84 кг	А	88
Глюкоза	10	960 г		
Казамінова кислота	0,1	9,6 г		
Дріжджовий екстракт	5	480 г		
L-пролін	0,16	15,36 г		
TES	5,73	550 г		
Вода		80 л		
Конденсат		8 л		

K_2SO_4	0,25	24г	Б	8
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	10,12	≈971,5 г		
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1,18	≈113,2 г		
KH_2PO_4	1	96 г		
$ZnCl_2$	0,04	3,84 г		
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,2	19,2 г		
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,01	0,96г		
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,01	0,96г		
$Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$	0,01	0,96г		
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	0,01	0,96г		
Вода	8л			

Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 2 м³

Для цієї стадії необхідно 960 л поживного середовища. Склад композицій та умови їх стерилізації аналогічні попередньому (вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 200 л). Композиція А (сахароза, глюкоза, дріжджовий екстракт, казамінова кислота, L-пролін, TES) розчиняють та стерилізують в окремому реакторі за термолабільних режимів. Всі солі розчиняють і стерилізують безпосередньо в збірнику, розташованому перед ферментером за стандартних для солей режимів. Також під час виробничого біосинтезу дробно вносять по 37,5 л 40%-го підживлювального розчину сахарози чотирма порціями (розрахунок наведено вище).

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 2м³ наведено у табл. 5.11.

Таблиця 5.11

Склад композицій для стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері 2м³

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 960 л середовища	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Сахароза	40	38,4 кг		
Глюкоза	10	9,6 кг		

Казамінова кислота	0,1	96 г	А	730
Дріжджовий екстракт	5	4,8 кг		
L-пролін	0,16	153,6 г		
TES	5,73	≈5,5 кг		
Вода	660 л			
Конденсат	70 л			
K ₂ SO ₄	0,25	240г	Б	80
MgCl ₂ ·6H ₂ O	10,12	≈9,7 кг		
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,18	≈1,1 кг		
KH ₂ PO ₄	1	960 г		
ZnCl ₂	0,04	38,4 г		
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,2	192 г		
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,01	9,6 г		
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,01	9,6 г		
Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O	0,01	9,6 г		
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0,01	9,6 г		
Вода	80 л			
Підживлювальний розчин сахарози	-	150 л		

Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН та піногасника

Для регуляції рН перед початком культивування необхідно використовувати 6%-ий розчин HCl і NaOH. Додавати хлоридну кислоту перед стерилізацією необхідно, щоб унеможливити випадання осадів фосфорних солей Магнію, Кальцію, Феруму та Мангану під час нагрівання розчину солей в апараті. Оскільки оптимальним рН для культивування *S. lividans* Pk 102 є рН 7,0, то доведемо його до цього значення стерильним розчином натрій гідроксиду.

Оскільки в поживному середовищі немає субстрату який супроводжується сильним піноутворенням, то піногасників ми не використовуємо.

Отже, технологічна схема, окрім стадій підготовки посівного матеріалу, включає такі додаткові стадії:

1. Підготовка аераційного повітря та очищення відпрацьованого;
2. Приготування та стерилізація 40%-го підживлювального розчину сахарози в реакторі об'ємом 200л для виробничого біосинтезу;

3. Приготування та стерилізація запасного розчину мікроелементів (100мл) в колбі 250 мл для вирощування посівного матеріалу у колбах на качалках та інокуляторі на 20 л;

4. Приготування 6%-го розчину HCl, для підкислення середовища при стерилізації його в посівних апаратах на 20 та 200 л, а також у ферментері 2м³;

5. Приготування та стерилізація 6%-го розчину NaOH, для стабілізації рН середовища перед початком культивування в посівних апаратах на 20 та 200 л, а також у ферментері 2м³.

Окрім основних збірників для розчинення композицій солей, що встановленні перед ферментерами варто передбачити такі ємності:

❖ В цеху підготовки посівного матеріалу:

➤ Для композиції А: 10л реактор при підготовці поживного середовища для інокулятора на 20 л; 120 л – для інокулятора 200 л.

❖ В цеху виробничого біосинтезу:

➤ Реактор-змішувач об'ємом 1200 л для приготування та стерилізації композиції А;

➤ 5 л реактор для 6%-го розчину NaOH;

➤ 200 л реактор-змішувач для 40%-го підживлювального розчину сахарози.

5.2. Основні етапи післяферментаційного одержання продукту

Основними етапами виробництва цільового продукту після ферментації є його виділення, концентрування та очищення. Ці етапи ускладнюються тим, що продукт знаходиться в живильному середовищі, що містить багато різноманітних компонентів (мікробні клітини, складна суміш розчинних позаклітинних метаболітів, продукти розпаду клітин, компоненти живильного середовища). [35]

При виділенні та очищенні антибіотику необхідно підібрати стадії і етапи так, щоб зберегти активність цільового продукту. Тому підбір стадій здійснюють шляхом аналізу літературних даних [4,5]

Тож після аналізу даних можна сформулювати наступну схему виділення та

очищенні пікроміцину:

- Відділення біомаси (центрифугуванням);
- Екстракція пікроміцину (етилацетатом);
- Видалення екстракту (упарюванням);
- Сушіння

Оскільки пікроміцин – це позаклітинний антибіотик, то першим етапом його післяферментаційного одержання є відділення біомаси, щоб в подальшому працювати лише з супернатантом, в якому власне і знаходиться наш цільовий продукт.

5.2.1. Вибір способу відділення біомаси та відповідного обладнання

Біомасу можна виділяти за допомогою таких методів: фільтрування, сепарація та центрифугування, сублімація, дистиляція, осадження, екстракція, сорбція, ультрафільтрація на мембранних фільтрах. [35] Слід зазначити, що наш цільовий продукт знаходиться власне у культуральній рідині, тому біомасу потрібно виділяти фізичним методом. Також важливим є обрати метод, який не буде впливати на активність антибіотику. Не варто використовувати дорогі способи на першому етапі задля економічної вигоди. І слід зауважити, що метод для відділення біомаси повинен бути такий, який дозволить повністю зберегти культуральну рідину, адже саме у ній знаходиться наш продукт.

Отже, підсумовуючи вище сказане, обираємо метод центрифугування для відділення біомаси від культуральної рідини. Умови проведення 5000 g впродовж 15 хв. [5]

Вибираючи центрифугу, необхідно дивитися на об'єм живильного середовища, яке обробляється. Важливо також те, щоб апарат був простий у використанні, а саме щоб можна було проводити його очищення та дезінфекцію, а також контролювати параметри під час процесу центрифугування.

Виходячи з вище викладеного, рекомендую вибрати центрифугу Alfa Laval ВТРХ (рис. 5.2). Її без проблем можна підключити до резервуара СІР-мийки,

дезінфікувати та використовувати при швидкості потоку рідини до 2000 л/год :



Рис 5.2. Центрифуга Alfa Laval VTPX [36]

5.2.2. Вибір способу виділення цільового продукту із супернатанта

Виділення антибіотиків зі складної суміші (культуральної рідини) представляє великі труднощі, адже при виділенні та очищенні речовин білкової структури необхідно суворо дотримуватись певних умов для збереження їх активності. Тому відділення білкових речовин можна здійснити такими методами: екстракція, осадження та афінна хроматографія.

Афінна хроматографія це сильно дороговартісний метод, який доцільно використовувати для малих потужностей. Також він є дуже специфічним і майже не можливо його автоматизувати, тому необхідно відмовитися від нього. [37]

Екстракція є найкращим методом виділення антибіотиків, адже процес не вимагає значних енерговитрат і не заснований на підвищенні температури, що негативно вплинуло б на активність продукту. У нашому випадку антибіотик будемо виділяти шляхом екстракції за допомогою органічного розчинника. Підбір органічного розчинника важливий, оскільки правильний вибір забезпечить легше подальше очищення кінцевого продукту при збереженні його активності. [35]

Серед багатьох органічних розчинників ефективність етилацетату є найбільш помітною. Крім того, він має такі переваги: відносна дешевизна, безпека, легке випаровування та нетоксичність.

Для процесу екстракції рекомендую застосовувати рідинні екстрактори фірми ROUSSELET ROBATEL, Франція (рис. 5.3). Сильною стороною цього виробника є широкий асортимент екстракторів з різними продуктивностями, що дозволить підібрати саме ту модель, яка підійде для наших умов. [38]



Рис 5.3. Екстрактор Liquid / liquid separator Model BXP 360P Kynar [38]

Після екстракції проводять упарювання водної фази для видалення органічного розчинника. Найкращим варіантом для цього є застосування ротаційного вакуум-випарника безперервної дії, який характеризується можливістю досить швидко концентрувати розчини завдяки високій інтенсивності теплообміну та отримувати сухий продукт. Перевагою даного методу є те, що розчин перебуває в апараті у зоні нагрівання в невеликій кількості короткий час (декілька секунд), тому вона не вплине на активність антибіотика. Також завдяки вакууму випарювання рідини проводиться за низької температури (35-50°C), що не призведе до розкладання термолабільних речовин. [37]

Для проведення процесу упарювання рекомендую застосовувати ротаційний вакуум-випарник RS (рис 5.4). Його перевагами є безперервне, швидке і головне низькотемпературне концентрування рідин, які містять термолабільні компоненти. [39]



Рис 5.4. Ротаційний вакуум-випарний апарат RS [39]

5.2.3. Вибір способу сушіння та сушарки

Заключним етапом очищення антибіотику є процес сушіння. Сушіння – це видалення рідини з твердих та рідких речовин шляхом випарювання вологи. Здійснюється за допомогою сушильних установок різного типу.[27]

Так як антибіотики є термолабільними речовинами, то для їхнього сушіння потрібно застосовувати методи, що не призведуть до зміни біологічної активності. Крім звичайних методів сушіння, широкого розповсюдження набуло ліофільне висушування продукту. Ліофільне сушіння – це метод сушіння, що проводиться при низьких температурах (від -8 до -12 °C) в вакуумному середовищі із видаленням вологи з твердого стану відразу в пару, оминаючи рідку фазу. Висушування речовин з використанням розпилювальної сушарки – це прогресивний метод, під час якого розчин антибіотику пневматично розпилюється до маленьких крапель у камері зі струмом нагрітого повітря. Перевагою його є те, що процес висушування відбувається протягом декількох секунд, що дозволить запобігти розкладанню термолабільних компонентів. Також існує спосіб сушіння з використанням завислого шару (сушіння у вакуум-сушильних шафах). Однак, здебільшого його застосовують для висушування зернистих та пастоподібних препаратів. [40]

Так як кінцева форма нашого антибіотику це білий кристалічний порошок, то для зменшення кількості операції, потрібно обрати метод висушування з

використанням розпилюючої сушарки. Адже при використанні цього методу антибіотик зразу отримаємо у вигляді порошку (не треба буде стадія подрібнення), що спростить етап підготовки цільового продукту і тим самим здешевить технологію отримання пікроміцину.

Підбір апарату, для методу розпилювального сушіння залежить від об'ємів матеріалу, що буде надходити на цей процес. Тому, я пропоную використовувати розпилювальну сушарку SD від компанії YENCHEN. В них наявна велика лінія апаратів різних об'ємів, що дозволить вибрати підходящий варіант для нас. [41]



Рис. 5.5. Розпилююча сушарка від компанії YENCHEN [41]

РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ

Таблиця 6.1

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу пікроміцину

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
ПЗ-1	Повітрязабірник	1	Вентиляційна шахта Lindab («alpix»). Матеріал корпусу: оцинкована сталь; габаритні розміри мм: 1300x400x400 [42]
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр грубої очистки TION O2 («Квант успіху»). Фільтрувальний матеріал: тканина синтетична; E=80-90%; габаритні розміри, мм: 141x70x17 [43].
К-3	Турбокомпресор	1	Компресор INVERSYS DPR 22 («Dalgakiran»). Продуктивність: 0,76 – 4,27 м ³ /хв; робочий тиск: 7,5-13 бар; габаритні розміри, мм: 1600x833x1385 [44].
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Рефрижераторний осушувач CW-1F («Crownwell»). Продуктивність: 1,5 м ³ /хв; габарити, мм: 630x450x670 [45].
Р-5	Ресивер	1	Повітряний ресивер РВ2000.1200 («ЕНТЕХ Україна»). Об'єм, л: 2000; максимальний тиск: 13 бар; габаритні розміри, мм: 4250x1200 [46].
Т-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Нагрівач повітря НКВ 100x500-2. («Вентс»). Мінімальний робочий тиск: 16 бар; габаритні розміри: 1165x540x200 [47].
Ф-7	Головний фільтр очистки повітря	1	Кишеньковий фільтр ФЯК F9 287x592x600-4 («AS Filter»). Фільтрувальний матеріал: синтетичне полотно; E>95%; габаритні розміри, мм: 287x592x600 [48].
ІФ-8	Індивідуальний фільтр	1	Повітряний фільтр SPF005-0310PM («REMEZA»). Фільтрувальний матеріал: боросилікатне мікрволокно; E=99,999%; робоча температура до 120°C; робочий тиск до 16 бар; габарити, мм: 225x116x76,1 [49]

<i>НУХТ БТЕК 04.01.24 КР ПЗ</i>				
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.		Тромпак В.Ю		
Перевір.		Красінько В.О		
Н. Контр.				
Затверд.		Стабніков В.П		
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ			Літ.	Арк.
				4
			Акрушіє	
			97	
			Кафедра БТМ	
			54	

Продовження таблиці 6.1

Р-9	Реактор-змішувач для приготування і стерилізації композиції А	1	Реактор miniPilot об'ємом 10 л («Buchglasuster»). Матеріал: боросилікатне скло; оснащений сорочку, датчиками температур та мішалкою: 0-600 об/хв; габаритні розміри, мм: 410x175x300 [50].
Д-10	Об'ємний дозатор	1	Дозатор рідини та води mBev. Об'єм дозуючої води: від 0,1 до 999,9 л; витрати води: від 0 до 10 л/хв [51].
І-11	Інокулятор	1	Інокулятор BioFlo об'ємом 20 л («AWTech»). Матеріал корпусу: нержвіюча сталь; містить сорочку, мішалку з регульованою швидкістю перемішування: 50-1000 об/хв; із датчиками вимірювання рН, рО ₂ , температури, манометром; габаритні розміри, мм: 890x754x1194 [52].
ІФ-12	Індивідуальний фільтр очистки повітря	1	Фільтр очистки повітря MS6-LFM-1/2-AUV-DA («Festo»). Фільтруючий матеріал: боросилікатне волокно; робочий тиск від 2 до 12 бар; температура до 60°C; E=99,999% [53]
Р-13	Реактор-змішувач для приготування і стерилізації композиції А	1	Реактор L1193 об'ємом 120 л («Giusti»). Матеріал: нержавіюча сталь; оснащений сорочкою, датчиком температури і тиску та мішалкою: 0-500 об/хв; габаритні розміри, мм: 510x585x1095 [54].
Д-14	Об'ємний дозатор	1	Дозатор рідини та води mBev. Об'єм дозуючої води: від 0,1 до 999,9 л; витрати води: від 0 до 10 л/хв [51].
Н-15	Насос мембранний для перекачування композиції А в інокулятор	1	Насос мембранний 60Вт («АгроТех»). Продуктивність: 5 л/хв; максимальна потужність 60 Вт; максимальний робочий тиск: 0,9 МПа [55].
З-16	Збірник для приготування композиції Б	1	Апарат SEонв 0,001 з емальованої сталі об'ємом 10 л («Сврохіммаш»). Містить сорочку та лопатеву мішалку із частотою обертів 100 об/хв; потужність двигуна: 0,75 кВт; габаритні розміри, мм: 420x350x500 [56].
Д-17	Об'ємний дозатор	1	Дозатор рідини та води mBev. Об'єм дозуючої води: від 0,1 до 999,9 л; витрати води: від 0 до 10 л/хв [51].

Продовження таблиці 6.1

I-18	Інокулятор	1	Інокулятор об'ємом 200 л BLBIO-200SJ/SC («BLBIO»). Матеріал корпусу нержавіюча сталь; обладнаний електричною мішалкою: 70-600 об/хв; сорочкою, датчиками вимірювання рН, температури; манометром; барботером; потужність: 6 кВт; габаритні розміри, мм: 1400x820x2200 [57]
ІФ-19	Індивідуальний фільтр очистки повітря	1	Повітряний фільтр SPF 010 («Коприг») Фільтруючий матеріал: боросилікатне мікрОВОлокно; продуктивність 150 м ³ /год; робочий тиск 16 бар; маскимальна робоча температура до 150°C; E=99,999%; габарити, мм: 254x125x76,1 [58]
Д-20	Ваговий дозатор для подачі компонентів композиції А	1	Ваговий дозатор ДВУ-1 («Дозавтомати») для реактора змішувача об'ємом 1,2 м ³ . Мінімальна вага дозування – 400 г, максимальна – 80 кг; напруга: 220 В; потужність: 1000 Вт; продуктивність: від 1,5 до 8 кг/хв [68].
Р-21	Реактор-змішувач для приготування і стерилізації композиції А	1	Реактор РС-1200 об'ємом 1200 л («Промвіт»). Матеріал: нержавіюча сталь; оснащений сорочкою, датчиком температури, пропелерною мішалкою: 20-300 об/хв; габаритні розміри, мм: 1400x1500x2500 [59].
Д-22	Об'ємний дозатор для подачі води	1	Дозатор-змішувач води («АгроТех»). Об'єм дозуючої води: від 0,1 до 999,9 л; витрати води: від 10 до 70 л/хв [60].
Н-23	Насос відцентровий для перекачування композиції А до ферментера	1	Насос відцентровий LEO (775316) («Sigma»). Потужність: 800 Вт; матеріал робочого колеса: технополімер; висота напору: 40 м; продуктивність: 50 л/хв; тиск: 7 бар [61].
Р-24	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації 6%-го розчину натрій гідроксиду	1	Лабораторний реактор РП-5 («Промвіт») об'ємом 5 л. Матеріал: нержавіюча сталь; оснащений датчиком температури та якірною мішалкою: від 0 до 60 об/хв; габаритні розміри, мм: 620x410x840 [62].
Д-25	Ваговий дозатор для подачі сахарози	1	Ваговий дозатор ДВУ-1 («Дозавтомати») для реактора змішувача об'ємом 300 л. Мінімальна вага дозування – 400 г, максимальна – 80 кг; напруга: 220 В; потужність: 1000 Вт; продуктивність: від 1,5 до 8 кг/хв [68].

Прожовження таблиці 6.1

P-26	Реактор-змішувач для приготування і стерилізації запасного 40%-го розчину сахарози	1	Реактор NICRO об'ємом 200 л («Regy videx»). Матеріал: нержавіюча сталь; оснащений сорочкою та двома мішалками: якірна (до 1461 об/хв з потужність 1,5 кВт), лопатевою (до 1445 об/хв з потужністю 3 кВт); габаритні розміри, мм: 650x630x1710 [63].
Д-27	Об'ємний дозатор для подачі води	1	Дозатор рідини та води mBev. Об'єм дозуючої води: від 0,1 до 999,9 л; витрати води: від 0 до 10 л/хв [51].
Н-28	Насос відцентровий для перекачування підживлюваного розчину сахарози у процесі культивування	1	Мембранний водяний насос DP-521. Максимальна потужність: до 12 Вт; продуктивність: 3,5 л/хв; максимальний робочий тиск: 0,48 МПа [64].
Д-29	Ваговий дозатор	1	Ваговий дозатор ДВУ-1 («Дозавтомати») для реактора змішувача об'ємом 100 л. Мінімальна вага дозування – 400 г, максимальна – 80 кг; напруга: 220 В; потужність: 1000 Вт; продуктивність: від 1,5 до 8 кг/хв [68].
З-30	Збірник для приготування композиції Б	1	Збірник-змішувач об'ємом 100 л («Energoprom»). Матеріал: нержавіюча сталь, оснащений мішалкою: 0-300 об/хв, сорочкою, датчиком температури; габаритні розміри мм 700x410x1100 [65].
Д-31	Об'ємний дозатор	1	Дозатор рідини та води mBev. Об'єм дозуючої води: від 0,1 до 999,9 л; витрати води: від 0 до 10 л/хв [51].
Н-32	Насос для перекачування композиції Б в ферментер	1	Насос мембранний 60Вт («АгроТех»). Продуктивність: 5 л/хв; максимальна потужність 60 Вт; максимальний робочий тиск: 0,9 МПа [55].
Ф-33	Ферментер	1	Ферментер STR 2000 L об'ємом 2 м ³ («Allegro»). Матеріал: нержавіюча сталь AISI 316; розрахунковий тиск в ємності: 0,3 МПа; частота обертів турбінної мішалки R 1313: 0-800 об/хв; з рубашкою; оснащений датчиками вимірювання рН, рО ₂ , температури; витратоміром, манометром; габаритні розміри, мм: 1855 x 1710 x 2930 [66].
Н-34	Насос відцентровий для перекачування культуральної рідини у збірник	1	Насос відцентровий LEO 3.0 (775375) («VDS center»). Максимальний тиск: до 9 бар; матеріал робочого колеса: сталь нержавіюча; продуктивність: 80 л/хв; потужність: 1,5 кВт; висота напору: 60 м [67].

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ

Технологічна схема біосинтезу антибіотика пікроміцину *S. lividans* Pk 102 включає допоміжні роботи (ДР): санітарна підготовка виробництва, підготовка аераційного повітря, приготування титруючих 6%-их розчинів HCl та NaOH, приготування та стерилізацію запасного розчину мікроелементів та 40%-го запасного розчину сахарози, а також приготування і стерилізацію поживних середовищ. Стадії основного технологічного процесу (ТС) включають: підготовка посівного матеріалу продуцента та безпосередньо виробничий біосинтез.

Технологічну та апаратурну схеми біосинтезу пікроміцину *S. lividans* Pk 102 наведено в графічній частині.

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1. Підготовка персоналу

Персонал, який зайнятий у виробництві мікробіологічних препаратів, повинен щорічно проходити медичний огляд, пройти системне навчання щодо санітарно-гігієнічних вимог та дотримуватися правил гігієни.

ДР 1.1.1. Навчання персоналу

Персонал проходить 2 види навчання: на робочому місці (виробничий інструктаж, стажування, наставництво, як асистенти) та поза робочим місцем (лекції, тренінги, конференції, дискусії, семінари, екскурсії).

ДР 1.1.2. Санітарний стан персоналу

Персонал обов'язково проходить медичний огляд; працівники не допускаються до роботи, якщо в них присутні інфекційні, шкірні захворювання та є відкриті рани. Також персонал повинен регулярно приймати душ, мити голову та ретельно стежити за чистотою рук і нігтів. Особи, які палять, мають специфічну шкіру, хронічний кашель не допускаються до виробництва стерильної продукції.

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.24 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Тромпак В.Ю</i>			РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушіє</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Красінько В.О</i>					11	97
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П</i>						
						58 <i>Кафедра БТМ</i>		

ДР 1.2. Підготовка миючих та дезінфікуючих розчинів

ДР 1.2.1. Приготування розчину каустичної соди

Для миття і дезінфекції обладнання та комунікації використовують 1% розчин каустичної соди. Для приготування 1 л розчину беруть приблизно 10 грам сухої речовини і додають 990 мл питної води. Приготовлений розчин зберігають у герметично закритому скляному посуді в прохолодному місці.

ДР 1.2.2. Приготування розчину Дезекону

Дезекон (15% концентрат) розводять питною водою до робочого розчину з концентрацією 0,05% перед використанням. Його застосовують для миття і дезінфекції підлоги, стін, дверей, вікон.

ДР 1.3. Підготовка приміщень

ДР 1.3.1. Щоденне прибирання

Щоденне прибирання проводять після кожної зміни вологим способом. Поверхні мити слід поступовими рухами поролоновою губкою добре змоченою робочим розчином Дезекону (від ДР 1.2.2.) із розрахунку 100-150 мл/м², а потім тим же розчином вимити підлогу.

ДР 1.3.2. Генеральне прибирання

Генеральне прибирання проводять один раз на тиждень. Прибирають стелю, стіни, підлогу, поверхні всього обладнання, підвіконня, повітровводи та всі виробничі меблі. Обробку здійснюють робочим розчином Дезекону від ДР 1.2.2.

ДР 1.4. Підготовка обладнання та комунікації

ДР 1.4.1. Миття

Обробку збірників, реакторів, інокуляторів, ферментера здійснюють після кожного культивування 1%-им розчином каустичної соди від ДР 1.2.1, підігрітим до температури 50-60°C. Миття проводять за допомогою СІР-мийки впродовж 1 год. Відпрацьований розчин знешкоджують. Для ополіскування апаратів, в них подається питна вода також через систему СІР, і після цього зливається на знешкодження відходів.

ДР 1.4.2. Технічний огляд

Технічний огляд проводиться з метою перевірки можливих неущільнень в

апаратах та трубопроводах. У разі їх виявлення проводять підтягування різьбових з'єднань.

ДР 1.4.3. Перевірка на герметичність

Перевірку обладнання на герметичність проводять при надлишковому тиску 0,2 МПа. Якщо впродовж 60 хв тиск на манометрі не зменшився, то обладнання є герметичним. В іншому разі, здійснюють пошук неущільнень за допомогою галогенових течієпошукачів. Для цього в апарат вносять невелику кількість легкої галогенвмісної речовини (чотирихлористий карбон), закривають його і нагрівають до температури 80 °С, збільшуючи тиск в апараті до 0,2 МПа. Операція триває 1,5 – 2 год. У випадку виявлення неущільнень обов'язково здійснюють їх ліквідацію.

ДР 1.4.4. Стерилізація

Стерилізацію обладнання здійснюють шляхом подання гострої пари в сорочку при температурі 125 – 130°C і тиску 0,15 МПа, впродовж 60 хв. Після завершення витримки в апарат подають стерильне повітря, а в сорочку холодну воду. Процес охолодження проводять до досягнення температури в апараті 30–40 °С і надлишкового тиску $P = 0,003\text{--}0,005$ МПа.

ДР 2. Підготовка аераційного повітря.

ДР 2.1. Забір атмосферного повітря.

Забір атмосферного повітря здійснюють за допомогою труби з повітрозбірником (ПЗ-1) у точці $H=10$ м.

ДР 2.2. Очищення від грубих домішок.

Попередню очистку повітря від ДР 2.1 здійснюють на паперовому фільтрі грубого очищення (Ф-2). Очистка від грубих домішок проводиться з ефективністю 80-90%, затримуються частки діаметром більше 3 мкм.

ДР 2.3. Стиснення повітря.

Очищене повітря від ДР 2.2 стискають у компресорі (К-3) та нагрівають до 120-200°C при тиску 0,35 МПа. Це робиться для того, щоб забезпечити умови аерації та подолання опорів в ферментері, а також для інших потреб виробництва.

ДР 2.4. Охолодження повітря та видалення вологи.

Стиснене повітря з ДР 2.3 охолоджують в теплообміннику-охолоджувачі (Т-

4) до температури 25-30°C для видалення зайвої вологи. Надлишкову вологу видаляють за допомогою ресивера (Р-5), де усуваються пульсації руху повітря, що негативно впливають на фільтри подальшого очищення повітря. Вологість повітря повинна бути 60-70%.

ДР 2.5. Стабілізація термодинамічних показників повітря.

Повітря від ДР 2.4 нагрівають в теплообміннику-нагрівачу (Т-6) доводячи до температури 45-50°C за допомогою пари низького тиску, при цьому вологість повітря зменшується до 50%.

ДР 2.6. Очищення повітря в головному фільтрі.

Нагріте повітря від ДР 2.5 проходить крізь головний фільтр очистки (Ф-7). При цьому затримуються часточки розміром 2-10 мкм з ефективністю 95%.

ДР 2.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі.

Повітря від ДР 2.6 подається через індивідуальні фільтри (ІФ-8, ІФ-12, ІФ-19), які розташовані безпосередньо перед біореакторами. Вони задержують часточки 0,3-0,4 мкм з ступенем очистки повітря 99,999%.

ДР 3. Приготування титруючих розчинів.

*ДР 3.1. Приготування 6%-ого розчину соляної кислоти для підкислення середовища для вирощування *S.lividans* Pk 102 у посівному апараті об'ємом 20 та 200 л, а також у виробничому ферментері об'ємом 2 м³.*

Для приготування 180 мл 6%-го розчину HCl у колбу об'ємом 250 мл вносять за допомогою мірного циліндра на 250 мл 145 мл питної води і вносять за допомогою мірного циліндра на 50 мл при інтенсивному перемішуванні 35 мл 31%-го розчину HCl. Розчин готують саме в такому порядку за для уникнення сильної екзотермічної реакції!

ДР 3.2. Приготування і стерилізація 6%-го натрій гідроксиду.

*ДР 3.2.1. Приготування і стерилізація 6%-го розчину натрій гідроксиду для підлучення поживного середовища для вирощування *S.lividans* Pk 102 у посівному апараті об'ємом 20 та 200 л.*

Для приготування 264 мл 6%-го розчину NaOH на технічних вагах зважують 15,8 г кристалічного їдкого натру і поміщають у колбу на 500 мл. Далі

за допомогою мірного циліндра на 250 мл наливають 248 мл питної води, перемішуючи до повного розчинення, і закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізацію даного розчину проводять в автоклаві при температурі 131°C, тиску 0,15 МПа протягом 40 хвилин.

ДР 3.2.2. Приготування і стерилізація 6%-го розчину натрій гідроксиду для підлужнення середовища для вирощування S.lividans Pk 102 у виробничому ферментері об'ємом 2 м³.

Для приготування 2,4 л 6%-го розчину NaOH на технічних вагах зважують 144 г кристалічного їдкого натру. Наважку поміщають у реактор-змішувач на 5 л (Р-24) і за допомогою мірного циліндра додають 2,25 л питної води, вмикають перемішувальний пристрій. Стерилізацію проводять за допомогою гострої пари при температурі 131°C, тиску 0,15 МПа протягом 40 хвилин.

ДР 4. Приготування і стерилізація запасного розчину мікроелементів.

ДР 4.1. Приготування і стерилізація запасного розчину мікроелементів для вирощування посівного матеріалу S.lividans Pk 102 у колбах на качалках та інокуляторі об'ємом 20 м³.

На аналітичних терезах зважують 0,04 г ZnCl₂; 0,2 г FeCl₃·6H₂O; 0,01 г CuCl₂·4H₂O; 0,01 г MnCl₂·4H₂O; 0,01 г Na₂B₄O₇·10H₂O; 0,01 г (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O. Наважки поміщають у колбу об'ємом 250 мл і додають 100 мл питної води, постійно перемішуючи. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C, тиску 0,15 МПа протягом 40 хвилин.

ДР 5. Приготування і стерилізація запасного 40%-го розчину сахарози.

Запасний 40%-ий розчин сахарози вносять безпосередньо під час виробничого біосинтезу.

ДР 5.1. Приготування і стерилізація запасного 40 %-го розчину сахарози для вирощування S.lividans Pk 102 у виробничому ферментері об'ємом 2 м³.

За допомогою вагового дозатора (Д-25) зважують 60 кг сахарози і поміщають у реактор змішувач на 300 л (Р-26). Далі через об'ємний дозатор (Д-27) подають 90 л питної води та включають перемішувальний пристрій.

Стерилізацію проводять за допомогою гострої пари при температурі 112°C, тиску 0,05 МПа впродовж 30 хвилин.

ДР 6. Приготування та стерилізація поживних середовищ.

ДР 6.1. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту S.lividans Pk 102 в колбах на качалках.

ДР 6.1.1. Приготування і стерилізація композиції А.

На технічних терезах зважують 48 г сахарози; 12 г глюкози; 0,12 г казамінової кислоти; 6 г дріжджового екстракту; 0,2 г L-проліну та 6,9 г TES. Наважки поміщають у колбу на 2 л і додають за допомогою мірного циліндра об'ємом 1 л 900 мл питної води. Добре перемішують, закривають ватно-марлевым корком колбу і стерилізують у автоклаві при температурі 112°C, тиску 0,05 МПа впродовж 30 хвилин.

ДР 6.1.2. Приготування і стерилізація композиції Б.

На технічних терезах зважують 0,3 г K_2SO_4 ; 12,1 г $MgCl_2 \cdot 6H_2O$; 1,4 г $CaCl_2 \cdot 2H_2O$. Наважки поміщають у колбу об'ємом 500 мл і додають за допомогою мірного циліндра на 250 мл 200 мл питної води, добре перемішують і закривають ватно-марлевым корком. Стерилізацію проводять в автоклаві при температурі 131°C, тиску 0,15 МПа протягом 40 хвилин.

ДР 6.1.3. Приготування і стерилізація композиції В.

На технічних терезах зважують 1,2 г KH_2PO_4 і поміщають у колбу на 250 мл. Далі за допомогою мірного циліндра на 100 мл додають 100 мл питної води, добре перемішують і закривають ватно-марлевым корком. Стерилізацію проводять в автоклаві при температурі 131°C, тиску 0,15 МПа протягом 40 хвилин.

ДР 6.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту S.lividans Pk 102 в посівному апараті об'ємом 20 л.

ДР 6.2.1. Приготування і стерилізація композиції А.

На технічних терезах зважують 384 г сахарози; 96 г глюкози; 0,96 г казамінової кислоти; 48 г дріжджового екстракту; 1,5 г L-проліну та 55 г TES. Наважки поміщають в реактор змішувач (Р-9) об'ємом 10 л і додають через об'ємний дозатор (Д-10) 7,5 л питної води, вмикають перемішувальний пристрій.

Стерилізацію проводять гострою парою за температури 112°C, тиску 0,05 МПа впродовж 30 хвилин.

ДР 6.2.2. Приготування і стерилізація композиції Б.

На технічних терезах зважують 2,4 г K_2SO_4 ; 97,2 г $MgCl_2 \cdot 6H_2O$; 11,3 г $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; 9,6 г KH_2PO_4 . Наважки поміщають у колбу на 2 л і додають за допомогою мірного циліндра на 2 л 1,6 л питної води, інтенсивно перемішують до повного розчинення. Отриманий розчин переливають в інокулятор (І-11) об'ємом 20 л і подають 6%-ий розчин HCl від ДР 3.1 до досягнення рН 4,0-4,5 та стерилізують гострою парою при температурі 131°C, тиску 0,15 МПа протягом 40 хвилин.

ДР 6.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту S.lividans Рік 102 в посівному апараті об'ємом 200 л.

ДР 6.3.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних терезах зважують 3,84 кг сахарози; 960 г глюкози; 9,6 г казамінової кислоти; 480 г дріжджового екстракту; 15,36 г L-проліну та 550 г TES. Наважки поміщають у реактор-змішувач (Р-13) об'ємом 120 л і додають через об'ємний дозатор (Д-14) 80 л питної води, вмикають перемішувальний пристрій. Стерилізацію проводять гострою парою за температури 112°C, тиску 0,05 МПа впродовж 30 хвилин.

ДР 6.3.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних терезах зважують 24 г K_2SO_4 ; 971,5 г $MgCl_2 \cdot 6H_2O$; 113,2 г $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; 96 г KH_2PO_4 ; 3,84 г $ZnCl_2$; 19,2 г $FeCl_3 \cdot 6H_2O$; 0,96 г $CuCl_2 \cdot 2H_2O$; 0,96 г $MnCl_2 \cdot 4H_2O$; 0,96 г $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$; 0,96 г $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$. Наважки поміщають в збірник (З-16) на 10 л та через об'ємний лічильник (Д-17) додають 8 л питної води, вмикають перемішувальний пристрій. Отриманий розчин подають самоплином у попередньо простерилізований інокулятор (І-18) об'ємом 200 л і подають 6%-ий розчин HCl від ДР 3.1 до досягнення рН 4,0-4,5. Стерилізацію проводять гострою парою при температурі 131°C, тиску 0,15 МПа протягом 40 хвилин.

ДР 6.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту S.lividans Pk 102 у виробничому ферментері об'ємом 200 л.

ДР 6.4.1. Приготування і стерилізація композиції А.

За допомогою вагового дозатора (Д-20) насипають 38,4 кг сахарози; 9,6 кг глюкози; 96 г казамінової кислоти; 4,8 кг дріжджового екстракту; 153,6 г L-проліну та 5,5 кг TES у реактор-змішувач (Р-21) об'ємом 1200 л. Далі за допомогою об'ємного дозатора (Д-22) подають 660 л питної води, вмикають перемішувальний пристрій. Стерилізацію проводять гострою парою за температури 112°C, тиску 0,05 МПа впродовж 30 хвилин.

ДР 6.4.1. Приготування і стерилізація композиції Б.

За допомогою вагового дозатора (Д-29) подають 9,71 кг $MgCl_2 \cdot 6H_2O$; 1,1 кг $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ у збірник (З-30). На технічних терезах зважують 960 г KH_2PO_4 ; 38,4г $ZnCl_2$; 192 г $FeCl_3 \cdot 6H_2O$; 9,6 г $CuCl_2 \cdot 2H_2O$; 9,6 г $MnCl_2 \cdot 4H_2O$; 9,6 г $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$; 9,6 г $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ і також подають в цей реактор. Далі за допомогою об'ємного дозатора (Д-31) подають 80 л питної води, вмикають перемішувальний пристрій. Отриманий розчин перекачують наносом (Н-32) у попередньо простерилізований ферментер (Ф-33) об'ємом 2 м³ і подають 6%-ий розчин HCl від ДР 3.1 до досягнення рН 4,0-4,5. Стерилізацію проводять гострою парою при температурі 131°C, тиску 0,15 МПа протягом 40 хвилин.

ТП 7. Підготовка посівного матеріалу S.lividans Pk 102.

ТП 7.1. Підтримування колекційної культури S.lividans Pk 102 на м'ясо-пептонному агарі.

Колекційну культуру *S.lividans Pk 102* зберігають у пробірці на м'ясо-пептонному агарі. Пересіви на нове поживне середовища роблять кожні 3-4 місяці. Роботи з колекційною культурою проводять кваліфіковані люди з досвідом роботи із дотриманням правил асептики!

ТП 7.2. Одержання робочої культури S.lividans Pk 102.

Методом виснаженого штриха культуру бактерій пересівають на чашку Петрі з м'ясо-пептонним агаром для одержання ізольованих колоній.

Культивування проводять в термостаті при температурі $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ протягом 72-96 год.

ТП 7.3. Вирощування S.lividans Pk 102 у пробірках на агаризованих середовищах.

У пробірки із простерилізованим скошеним МПА пересівають ізольовані колонії *S.lividans* Pk 102 від ТП 7.2 із дотриманням правил асептики. Проводять культивування в термостаті при температурі $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ протягом 72 годин. Після закінчення культивування відбирають проби для проведення мікробіологічного аналізу.

ТП 7.4. Вирощування S.lividans Pk 102 в колбах на качалках.

В асептичних умовах у колбу на 2 л з композицією А від ДР 6.1.1 вносять композицію Б від ДР 6.1.2 та композицію В від ДР 6.1.3. Далі туди ж піпеткою на 2 мл вносять 1,2 мл розчину мікроелементів від ДР 4.1, перемішують і розливають по 100 мл у стерильні качалочні колби об'ємом 750 мл.

У пробірки з культурою від ТП 7.3 вносять стерильною піпеткою 5 мл фізіологічного розчину, суспендують, відбирають піпеткою бактерії та вносять їх у качалочні колби з готовим поживним середовищем.

Культивування на качалках проводять за температури $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ протягом 48 год при 180 об/хв. Після культивування здійснюють мікробіологічний контроль і культуральну рідину зливають у засівну колбу об'ємом 2 л.

ТП 7.5. Вирощування S.lividans Pk 102 в посівному апараті об'ємом 20 л.

У посівний апарат (І-11) із композицією Б від ДР 6.2.2 самоплином подають композицію А від ДР 6.2.1 із реактора-змішувача (Р-9) та додають 10 мл розчину мікроелементів від ДР 4.1. Вмикають перемішувальний пристрій і додають 6%-ий розчин NaOH від ДР 3.2.1 доки рН середовища за показниками датчика рН не буде 6,8-7,0. Через засівну колбу вносять посівний матеріал *S.lividans* Pk 102 від ДР 7.4.

Культивування проводять при температурі $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ протягом 36 години з інтенсивністю аерації $0,5 - 0,8 \text{ м}^3$ кисню $\cdot 1 \text{ м}^3$ середовища / год. Підтримання рівня аерації на відповідному рівні здійснюється за допомогою перемішування та

наявності барботера. У процесі культивування кожні 4 години з інокулятора відбирають проби культуральної рідини для проведення мікробіологічного аналізу.

*ТП 7.6. Вирощування *S.lividans* Рік 102 в посівному апараті об'ємом 200 л.*

У посівний апарат (І-18) із композицією Б від ДР 6.3.2 через насос (Н-15) подають композицію А від ДР 6.3.1 із реактора-змішувача (Р-13). Вмикають перемішувальний пристрій і додають 6%-ий розчин NaOH від ДР 3.2.1 доки рН середовища за показниками датчика рН не буде 6,8-7,0. Через трубу перетискування подають з інокулятора посівний матеріал продуцента від ТП 7.5.

Культивування проводять при температурі $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ протягом 36 години з інтенсивністю аерації $0,5 - 0,8 \text{ м}^3 \text{ кисню} \cdot 1 \text{ м}^3 \text{ середовища} / \text{год}$. Підтримання рівня аерації на відповідному рівні здійснюється за допомогою перемішування та наявності барботера. У процесі культивування кожні 4 години з інокулятора відбирають проби культуральної рідини для проведення мікробіологічного аналізу та визначення концентрації біомаси, яка повинна становити 2,5 г/л.

ТП 8 Виробничий біосинтез

ТП 8.1. Виробничий біосинтез (отримання культуральної рідини).

У виробничий ферментер (Ф-33) об'ємом 2 м^3 з композицією Б від ДР 6.4.2 із реактора (Р-21) подають за допомогою насоса (Н-23) композицію А від ДР 6.4.1. Вмикають перемішувальний пристрій і з реактора (Р-24) самоплином подають 6%-ий розчин NaOH від ДР 3.2.2 доки рН середовища за показниками датчика рН буде 6,8-7,0. Через трубу перетискування подають з інокулятора посівний матеріал продуцента від ТП 7.6 .

Культивування проводять при температурі $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ протягом 120 години з інтенсивністю аерації $0,5 - 0,8 \text{ м}^3 \text{ кисню} \cdot 1 \text{ м}^3 \text{ середовища} / \text{год}$. Підтримання рівня аерації на відповідному рівні здійснюється за допомогою перемішування та наявності барботера. У процесі культивування кожні 24 год із реактора-змішувача (Р-26) подають за допомогою насоса (Н-38) по 37,5 л 40% запасного розчину сахарози від ДР 5.3 чотирьма порціями. Також кожні 4 години з інокулятора відбирають проби культуральної рідини для проведення мікробіологічного

аналізу, а також для визначення концентрації пікроміцину, з кінцевим значенням 0,3337 г/л.

Після закінчення процесу виробничого біосинтезу отриману культуральну рідину за допомогою насосу (Н-34) перекачують у збірник для культуральної рідини.

РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

Упродовж процесу культивування періодично кожні 4 год відбирають проби об'ємом 100-200 мл посівного матеріалу з інокуляторів та культуральної рідини з ферментера під час виробничого біосинтезу. Частину проби використовують для проведення мікробіологічного контролю, а іншу – для визначення концентрації біомаси, цільового продукту, концентрації джерел вуглецю та азоту.

8.1. Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль чистоти культури проводять двома способами: прямим висівом на агаризовані поживні середовища та мікроскопіюванням.

Прямий висів на агаризоване поживне середовище здійснюють посівом культуральної рідини на чашку Петрі з м'ясо-пептонним агаром до виростання на ньому ізольованих колоній *Streptomyces lividans*. Дані бактерії на МПА здатні утворювати круглі пухнасті колонії білого кольору з бежевим відтінком по центру.



Рис. 8.1. Колонії *S. lividans* на МПА [16]

Мікроскопіювання проводять із застосуванням оптичного мікроскопу з іммерсійною системою і виготовленням препарату «роздавлена» крапля. Для цього на чисте прозоре скло ставлять краплю води. Далі простерилізованою петлею беруть потрібний матеріал і в асептичних умовах розподілити його

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.24 КР ПЗ</i>			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Тромпак В.Ю			РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Красінко В.О					12	97
Н. Контр.						<i>Кафедра БТМ</i>		
Затверд.		Стабніков В.П				69		

по краплі води. Зверху накрити покривним скельцем, а якщо є надлишок рідини, то забирають її фільтрувальним папером. Досліджують препарат під мікроскопом при збільшенні об'єктива x40. [69]

При відсутності у досліджуваному зразку сторонніх мікроорганізмів, під час мікроскопіювання можна побачити клітини *Streptomyces lividans*. Дані бактерії утворюють вегетативні гіфи, розміром в діаметрі 0,5-2,0 мкм і розгалуджений міцелій, що може розпадатися на фрагменти. В зрілому віці міцелій несе ланцюжки з трьох чи більше спор. Спори розташовані на спорангіях та є нерухомими, овальними. Дані бактерії є грампозитивними, тобто здатні зберігати фарбник кристал-віолет та під мікроскопом проявлятися темно-фіолетовим кольором. [12]

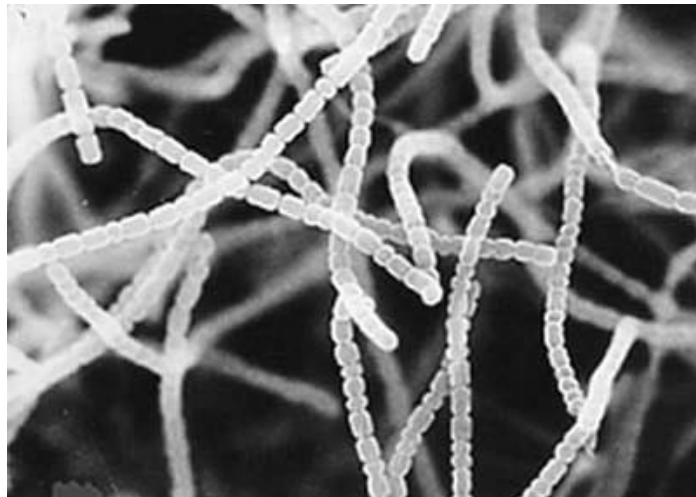


Рис 8.2. Клітини S. lividans під мікроскопом

Мікробіологічний контроль стерильності поживних середовищ. Цей контроль проводять шляхом розсіювання проби простерилізованого середовища на чашки Петрі з відповідним агаризованим поживним середовищем. Для виявлення грибів його розсівають на сусло агар (СА) або глюкозо-картопляний агар (ГКА), а для бактерій – на м'ясо-пептонний агар (МПА).

Посіви проводять стерильною піпеткою, відбираючи 0,1 мл проби ретельно перемішаного простерилізованого середовища та наносять на поверхню агаризованої пластинки у чашку Петрі. Цей об'єм розподіляють рівномірно шпателем Дригальського по поверхні середовища. Після інкубації візуально визначають відсутність ознак росту будь-яких мікроорганізмів. [69]

8.2. Показники росту і синтезу цільового продукту

8.2.1. Концентрація біомаси

Для визначення концентрації біомаси *Streptomyces lividans* Pk 102 можна використати ваговий метод. Суть методу полягає у переведенні біомаси в осад, його відділенні від розчину і зважування.

Відділення мікроорганізмів з культуральної рідини проводять за допомогою центрифугування. Для цього в центрифужну пробірку наливають точно відміряний об'єм 10 мл перемішаної культуральної рідини і центрифугують впродовж 15-20 хв при 5-10 тис. обертів за хвилину. Після цього рідину обережно зливають, а осад промивають підкисленою дистильованою водою (1 мл концентрованої HCl на 1 л води) і знов проводять центрифугування за тих же умов. Супернатант зливають відразу після зупинки центрифуги, адже в іншому випадку частина осаду може бути втрачена.

Далі центрифужну пробірку з осадом клітин ставлять в сушильну шафу і висушують впродовж 1—2 год. за температури 90—100°C. Після цього їх переносять в ексикатор з безводним хлористим кальцієм (CaCl₂) чи концентрованою кислотою сірчаною. Ексикатор кладуть біля аналітичних вагів, на яких будуть проводити зважування. За годину пробірки зважують з точністю до 0,0001 г. Висушування і зважування повторюють в тій самій послідовності допоки маса осаду не буде постійного значення, тобто коливання не перевищать ± 0,0001 г. [70]

8.2.2. Концентрація цільового продукту

Визначення концентрації даного антибіотика здійснюється методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ).

Для цього супернатант, який злили під час визначення концентрації біомаси двічі екстрагували етилацетатом і концентрували за допомогою роторного випарника, після чого кінцевий екстракт розчиняли в 1,5 мл метанолу. Далі 15 мл цього екстракту аналізували методом ВЕРХ з використанням колонки Agilent C18 з оберненою фазою із 80% ацетонітрилу розчиненому в 5 мМ амоно ацетатному буфері, що містить 0,05% оцтової кислоти та доведений до рН 8 з використанням

NH₄OH при швидкості потоку 1 мл/хв. Детектування проводили при 220 нм. [5]

8.2.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту

Визначення концентрації джерела Карбону

У поживному середовищі для вирощування мікроорганізмів наявні два джерела вуглецю: сахароза та глюкоза. Тому можна припустити, що у даному випадку спостерігається явище диауксії (використання мікроорганізмом двох джерел вуглецю по чергову). Спочатку споживається легкоспоживчий субстрат (глюкоза), а потім спостерігається споживання сахарози. Як для визначення концентрації глюкози так і для визначення концентрації сахарози можна використати метод високоефективної рідинної хроматографії.

Для визначення концентрації сахарози використовували систему ВЕРХ Dionex Ultimate 3000 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, США). Стаціонарна фаза: колонка HALO Penta-HILIC (AMT, Wilmington, DE, США) 4,6 × 150 мм, частинки 2,7 мкм. Рухома фаза: 35 мМ форміат амонію з ацетонітрилом. Швидкість потоку 2,0 мл/хв, температура термостата 10 °С, об'єм ін'єкції 4 мкл. Детектор був ELSD (Varian, Palo Alto, CA, США), з такими параметрами: коефіцієнт посилення 2, ширина гладкості 10, температура випарника 40 °С, температура небулайзера 40 °С, швидкість потоку рідини 1 л/хв. [71]

Для визначення концентрації глюкози використовували ВЕРХ систему HP 1100 (Hewlett Packard, США) за допомогою рефрактометричного детектора та колонки (300 × 6,5 мм) наповненої сополімером сульфованого полістиролу і дивінілбензолу в іонній формі кальцію з розміром частинок 30 мкм. Умови аналізу: температура колонки 80°C; швидкість потоку елюентів (деіонізованої води) - 0,5 см³ /хв.

Проба до аналізу являє собою супернатант культуральної рідини, тому попередньо пробу піддають мембранній фільтрації з використанням фільтру з діаметром пор 0,22 мкм [72].

Визначення концентрації джерела Азоту

У поживному середовищі для вирощування мікроорганізмів в якості

джерела азоту виступає дріжджовий екстракт. Його використовує біологічний агент у амінній формі, тобто споживає азот амінокислот. Тому для визначення концентрації джерела азотного живлення використовуємо методику визначення амінного азоту у культуральній рідині.

Для визначення амінного азоту можна використаний мідний метод, який заснований на здатності амінокислот і пептидів утворювати з міддю розчинні комплексні сполуки. Потім надлишок доданої міді титрують і він є еквівалентний амінному азоту.

У мірну колбу об'ємом 100 см^3 вливають 10 см^3 супернатанту і додають 3-4 краплі тимолфталейну та 1 н розчин гідроксиду натрію до утворення блідо-блакитного забарвлення. Далі, інтенсивно перемішуючи, додають 30 см^3 суспензії мідної фосфорної кислоти та доводять до мітки дистильованою водою. Після цього отриману суміш фільтрують через паперовий фільтр. Потім 10 см^3 прозорого фільтрату підкислюють $0,5\text{ см}^3$ 80% оцтової кислоти і всипають до нього 1 г йодистого калію. Після цього суміш перемішують і виділений йод титрують 0,01 н розчином тіосульфату натрію, попередньо додаючи 1-2 краплі розчину крохмалю. Титрування закінчують після того, як розчин змінить колір на білий після додавання останньої краплі тіосульфату натрію. В результаті, титрована кількість тіосульфату натрію, помножена на 0,28, дорівнює вмісту амінного азоту в 10 см^2 фільтрату. Відповідно цей результат відповідає 2 см^3 супернатанту з урахуванням розведення, виходячи з того, що 1 см^3 0,01 н розчину тіосульфату відповідає 0,28 г азоту. З отриманих результатів розраховують кількість амінного азоту у 100 см^3 культуральної рідини. [73]

8.3. Показники якості готового продукту

8.3.1. Ідентифікація пікроміцину

Найлегше пікроміцин можна ідентифікувати за точкою плавлення. Вона дорівнює $169,5^\circ\text{C}$. [74]

Антибіотик пікроміцин також можна ідентифікувати за допомогою оптичного обертання (це здатність речовини відхиляти площину поляризації при проходженні крізь нього прямолінійного поляризованого світла). Кут обертання

$[\alpha]_{D24} + 8,2^\circ$ ($c = 3,5$ в етанолі); $[\alpha]_{D20} -33,5^\circ$ ($c = 2,07$ у хлороформі); $[\alpha]_{D24} -50,2^\circ$ ($c = 6,3$ у хлороформі). [75]

Пікроміцин можна ідентифікувати також за допомогою УФ-спектрофотометрії. Максимум поглинання: УФ-макс (етанол): 225 нм ($\log \epsilon 3,97$). [75]

Також антибіотик пікроміцин можна ідентифікувати за допомогою ІЧ-спектрометрії. Для цього 10 мг порошку пікроміцину розчиняли у 10 мл бензолу і залишали при кімнатній температурі на 10 хв. Після розкладання надлишку реагенту розчинник випарювали при зниженому тиску. Залишок розчиняли в ефірі і промивали розчином NaHCO_3 та водою. Далі проводили сушіння при 60°C і тиску 670 Па протягом 3 годин і записували спектри. [76]

ІЧ-спектрофотометрію проводили на спектрофотометрі Shimadzu IRG-1 (KBr). При визначенні пікроміцину межі виявлення спектрів мають бути 1642 cm^{-1} до 1678 cm^{-1} . [77]

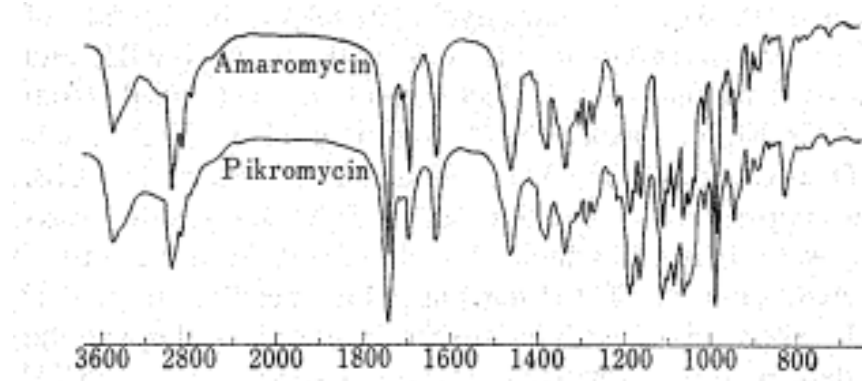


Рис. 8.3. ІЧ – спектр пікроміцину (KBr) [77]

8.3.2. Біологічна дія пікроміцину

Антибіотик пікроміцин виявляє бактеріостатичну дію, яка зумовлюється зв'язуванням з каталітичним пептидилтрансферазним центром 50S-субодиниці рибосоми і відповідно перешкоджається доступ комплексу тРНК-амінокислоти до комплексу іРНК-рибосоми та порушується процес утворення та нарощування пептидного ланцюга. В результаті цього гальмується синтезу білків у бактерій. Також слід зазначити, що на деякі грампозитивні мікроорганізми у підвищеній концентрації пікроміцин впливає бактерицидно. [78]

Пікроміцин є досить високо активним *in vitro* проти *Staphylococcus aureus*, *Basillus subtilis* і інших грампозитивних бактерій і мікрококів. Але, наприклад, *Staphylococcus aureus* стає стійким до нього вже після одного пересіву. Тому, в цьому відношенні пікроміцин різниться від інших антибіотиків з родини макролідів, стійкість до яких здобувається мікроорганізмами лише після багаторазового пересіву. Також слід зауважити, що пікроміцин не діє вже на мишей, заражених *Diplococcus pneumonia*, *Staphylococcus aureus* *Streptococcus pyogenes*. [8]

Для визначення біологічної дії пікроміцину застосовують метод з використанням лунок у агарі. Для цього планшетки з агаризованим середовищем Мюллера-Хінтона (МНА) готують з використанням 20 мл його і залишають на ніч при кімнатній температурі за для перевірки на наявності будь-яких забруднень/контамінацій в планшетах. Тест-культури (*Staphylococcus aureus* та *Micrococcus luteus*, оскільки вони є чутливими до пікроміцину) попередньо вирощують в поживному бульйоні і розбавляють (OD 620 нм = 0,1) для отримання суспензії бактерій 1×10^8 КУО / мл перед внесенням на чашку з агаром. Агарові лунки діаметром 5 мм роблять з використанням стерилізованого сталевого гелевого перфоратора, та в кожен вносять по 200 мкл екстрактів з культурами, а також додають 78-100 мкл пікроміцину. Планшети інкубують впродовж 24 годин при температурі 37°C. Після інкубації досліджують зону затримки росту (в мм). [37]

8.4. Карта постадійного контролю доферментаційних процесів

Таблиця 8.1

Карта постадійного контролю біосинезу пікроміцину

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
1	2	3	4	5
<i>Кт 1.1.1. Навчання персоналу</i>	Персонал Знання	Усне спілкування	Після проходження навчання	Перевірка знань

Продовження таблиці 8.1

<i>Кх 1.2.1. Приготування розчину каустичної соди</i>	Розчин каустичної соди концентрація	Мірний циліндр	На етапі приготування розчину	C=1%
<i>Кх 1.2.2. Приготування розчину Дезикону</i>	Розчин Дезикону Концентрація	Мірний циліндр	На етапі приготування розчину	C=0,15%
<i>Км 1.3.1. Щоденне прибирання</i>	Приміщення Кількість мікроорганізмів	Чашки Петрі з МПА Термостат Сидиментаційний метод	Після прибирання приміщення	КУО<800 см ²
<i>Км 1.3.2. Генеральне прибирання</i>	Приміщення Кількість мікроорганізмів	Чашки Петрі з МПА Термостат Сидиментаційний метод	Після прибирання приміщення	КУО<300 см ²
<i>Кт 1.4.1. Миття</i>	Обладнання та комунікація Температура мийного розчину	Термометр технічний	Під час проведення обробки	T = 50 - 60°
<i>Кт 1.4.2. Технічний огляд</i>	Обладнання та комунікація		Після миття	Візуально
<i>Кт 1.4.3. Перевірка на герметичність</i>	Герметичність обладнання Тиск, час	Манометр, годинник	Тиск визначається під час перевірки на герметичність	P = 0,2 Мпа t = 1 год
<i>Кт, Км 1.4.4. Стерилізація</i>	Обладнання Температура, час, тиск, стерильність	Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначаються безпосередньо під час стерилізації, а мікробіологічний контроль – після стерилізації	T=131°C, P=0,15МПа, t=40 хв, відсутність мікробіоти
<i>Кт 2.2. Очищення від грубих домішок повітря</i>	Очищення повітря Ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення повітря згідно паспорту фільтра	Після проходження повітря у фільтрі грубого очищення	E=80-90%
<i>Кт 2.3. Стиснення повітря</i>	Стиснене повітря Температура, тиск	Манометр, термометр	Після компресування повітря	T=120-150°C, P=0,35 МПа
<i>Кт 2.4. Охолодження повітря та видалення вологи</i>	Охолоджене повітря Температура, вологість	Термометра, психрометр	Після охолодження і видалення вологи з повітря	T=25-30°C, W=60-70%

Продовження таблиці 8.1

<i>Кт 2.5. Стабілізація термодинамічних показників повітря</i>	Нагріте повітря Температура, вологість	Термометр, психрометр	Після нагрівання	T=45-50°C, W=50%
<i>Кт 2.6. Очищення повітря в головному фільтрі</i>	Очищене повітря Ступінь очищення	Перевірка ступення очищення повітря згідно паспорту фільтра	Після проходження повітря в головному фільтрі	E=95%
<i>Кт, Км 2.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі</i>	Очищене повітря Ступінь очищення, стерильність	Перевірка ступення очищення повітря згідно паспорту фільтра, мікробіологічний контроль	Після проходження повітря в індивідуальному фільтрі	E=99,999%, відсутність мікробіоти
<i>Кх 3.1. Приготування розчину соляної кислоти</i>	Розчин соляної кислоти Концентрація	Мірний циліндр	На етапі приготування розчину	C=6%
<i>Кт, Кх, Км 3.2.1, 3.2.2. Приготування і розчину натрій гідроксиду</i>	Розчин натрій гідроксиду Температура, тиск, час, концентрація, стерильність	Манометр, термометр, годинник, технічні ваги, мірний циліндр, мікробіологічний контроль	Концентрація контролюється на етапі приготування розчину; тиск і температура – безпосередньо під час стерилізації; мікробіологічний контроль – після стерилізації	T=131°C, P=0,15МПа, t=40 хв, C=6%, відсутність мікробіоти
<i>Кт, Км 4.1. Приготування і стерилізація запасного розчину мікроелементів</i>	Розчин мікроелементів температура, тиск, час, стерильність	Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначаються безпосередньо під час стерилізації, а мікробіологічний контроль – після стерилізації	T=131°C, P=0,15МПа, t=40 хв, відсутність мікробіоти

Продовження таблиці 8.1

<p><i>Кт, Кх, Км 5.1, 5.2, 5.3.</i> Приготування і стерилізація запасного 40%-го розчину сахарози</p>	<p>40%-ий розчин сахарози Температура, тиск, час, концентрація, стерильність</p>	<p>Термометр, манометр, годинник, технічні ваги, мірний циліндр, мікробіологічний контроль</p>	<p>Концентрація контролюється на етапі приготування розчину; тиск і температура – безпосередньо під час стерилізації; мікробіологічний контроль – після стерилізації</p>	<p>T=112°C, P=0,05МПа, t=30 хв, C=40%, відсутність мікробіоти</p>
<p><i>Кт, Км 6.1.1.</i> Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування <i>S. lividans</i> Pk 102 у колбах на качалках</p>	<p>Композиція А Температура, тиск, час, стерильність</p>	<p>Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура та тиск визначаються безпосередньо під час стерилізації, а мікробіологічний контроль – після стерилізації</p>	<p>T=112°C, P=0,05МПа, t=30 хв, відсутність мікробіоти</p>
<p><i>Кт, Км 6.1.2.</i> Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування <i>S. lividans</i> Pk 102 у колбах на качалках</p>	<p>Композиція Б Температура, тиск, час, стерильність</p>	<p>Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура та тиск визначаються безпосередньо під час стерилізації, а мікробіологічний контроль – після стерилізації</p>	<p>T=131°C, P=0,15МПа, t=40 хв, відсутність мікробіоти</p>
<p><i>Кт, Км 6.1.3.</i> Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування <i>S. lividans</i> Pk 102 у колбах на качалках</p>	<p>Композиція В Температура, тиск, час, стерильність</p>	<p>Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура та тиск визначаються безпосередньо під час стерилізації, а мікробіологічний контроль – після стерилізації</p>	<p>T=131°C, P=0,15МПа, t=40 хв, відсутність мікробіоти</p>
<p><i>Кт, Км 6.2.1, 6.3.1, 6.4.1.</i> Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування <i>S. lividans</i> Pk 102 у посівних апаратах та у ферментері</p>	<p>Композиція А Температура, тиск, час, стерильність</p>	<p>Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура та тиск визначаються безпосередньо під час стерилізації, а мікробіологічний контроль – після стерилізації</p>	<p>T=112°C, P=0,05МПа, t=30 хв, відсутність мікробіоти</p>

Продовження таблиці 8.1

<i>Kт, Км, Кх 6.2.2, 6.3.2, 6.4.2.</i> <i>Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування S. lividans Pk 102 у посівних апаратах та у ферментері</i>	Композиція Б Температура, тиск, час, рН, стерильність	Термометр, манометр, годинник, датчик рН, мікробіологічний контроль	Температура, тиск та рН визначаються безпосередньо під час стерилізації, а мікробіологічний контроль – після стерилізації	T=131°C, P=0,15МПа, t=40 хв, рН=4,0-4,5, відсутність мікробіоти
<i>Kт, Км 7.1.</i> <i>Підтримання колекційної культури S. lividans Pk 102</i>	Колекційна культура S. lividans Pk 102 Температура, частота пересіву, мікробіологічна чистота	Датчик температури в холодильнику, графік частоти пересіву, мікробіологічний контроль	Температура – при зберіганні, мікробіологічний контроль і пересів – кожні 3-4 місяці	T = 2 – 4°C, t = 3 – 4 місяці, відсутність сторонньої мікробіоти
<i>Kт, Км 7.2.</i> <i>Одержання робочої культури S. lividans Pk 102</i>	Робоча культура S. lividans Pk 102 на чашці Петрі Температура, час, мікробіологічна чистота	Датчик температури у термостаті, годинник, мікробіологічний контроль	Температура та час визначаються безпосередньо під час вирощування, а мікробіологічний контроль – після вирощування	T = 30±2°C, t = 24-48 год, відсутність сторонньої мікробіоти
<i>Kт, Км 7.3.</i> <i>Вирощування S. lividans Pk 102 у пробірках на агаризованих середовищах</i>	Робоча культура S. lividans Pk 102 у пробірках Температура, час, мікробіологічна чистота	Датчик температури у термостаті, годинник, мікробіологічний контроль	Температура та час визначаються безпосередньо під час вирощування, а мікробіологічний контроль – після вирощування	T = 30±2°C, t = 24 год, відсутність сторонньої мікробіоти
<i>Kт, Км 7.4.</i> <i>Вирощування культури S. lividans Pk 102 у колбах на качалках</i>	Посівний матеріал S. lividans Pk 102 Температура, час, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота	Термометр, годинник, тахометр, мікробіологічний контроль	Температура, час і частота обертів перемішуючого пристрою контролюються автоматично під час вирощування, а мікробіологічний контроль проводять після вирощування	T = 30±2°C, t = 48 год, W = 180 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти

Продовження таблиці 8.1

<p><i>Кт, Кх, Км 7.5, 7.6.</i> <i>Вирощування культури S. lividans Pk 102 у посівних апаратах об'ємом 20 та 200 л</i></p>	<p>Посівний матеріал S. lividans Pk 102 Температура, час, рН, концентрація розчиненого кисню, частота перемішуючого пристрою, концентрація біомаси, мікробіологічна чистота</p>	<p>Датчик температури і рН, годинник, датчик рО₂, перемішувальний пристрій, ФЕК, калібрувальний графік, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура, рН, час і концентрація розчиненого кисню контролюються під час вирощування; концентрація біомаси і мікробіологічний контроль проводиться кожні 4 год і після культивування</p>	<p>T = 30±2°C, t = 36 год, аерація: 0,5–0,8 м³ кисню · 1 м³ середовища/год. W = 220 об/хв, рН = 6,8-7,0, Сб = 2,5 г/л, відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p><i>Кт, Кх, Км 8.1.</i> <i>Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 2м³</i></p>	<p>Культуральна рідина Температура, час, рН, концентрація розчиненого кисню, концентрація антибіотика, мікробіологічна чистота</p>	<p>Датчик температури і рН, годинник, датчик рО₂, мікробіологічний контроль, хроматограф «Dionex Ultimate 3000» (США), з хроматографічною колонкою Agilent C18</p>	<p>Температура, рН, час і концентрація розчиненого кисню контролюються під час вирощування; визначення концентрації антибіотику та мікробіологічний контроль проводиться кожні 4 год і після культивування</p>	<p>T = 30±2°C, t = 120 год, аерація: 0,5–0,8 м³ кисню · 1 м³ середовища/год. рН = 6,8-7,0, С_{ант} = 0,3337 г/л, відсутність сторонньої мікробіоти</p>

РОЗДІЛ 9. АНАЛІЗ ПЕРСПЕКТИВ ВПРОВАДЖЕННЯ СИСТЕМИ ЕКОЛОГІЗАЦІЇ ВИРОБНИЦТВА

Відходи біотехнологічної продукції – це всі відходи, що утворюються упродовж усього циклу виробництва продукції. Відходи виробництва можуть становити небезпеку для суспільства, тварин та загалом навколишнього середовища, тому обов’язковим є їхня утилізація. Основними відходами на виробництві є рідкі відходи (стічні води), газоподібні (великі викиди вуглекислого газу, відпрацьованого повітря із аерозолями бактеріальних або грибних спор) та тверді (карток, скло, папір, біомаса біологічного агента). [79]

9.1. Система знешкодження рідких відходів

У біотехнологічному виробництві рідкими відходами є стічні води. Вони поділяються на виробничі, побутові й атмосферні. Тому перш за все потрібно розрахувати яка загальна кількість стічних вод утворюється при виробництві антибіотику пікроміцину.

Розрахуємо середні витрати виробничих стічних вод. Так як ми знаємо об’єми апаратів в яких відбувається утворення антибіотику, то можемо порахувати скільки приблизно потрібно води для їх миття [79].

При вирощуванні інокуляту в посівних апаратах використовують реактор об’ємом 10 л, який миють в ручну; інокулятор об’ємом 20 л, який миють за допомогою СІР-мийки; реактор об’ємом 120 л, який миють СІР-мийкою; збірник об’ємом 10 літрів, який миють вручну; інокулятор об’ємом 200 л, який миють СІР-мийкою. Для виробничого біосинтезу використовують такі апарати: реактор об’ємом 1200 л, реактор об’ємом 200 л, збірник об’ємом 100 л та ферментер об’ємом 2000 л. Всі ці апарати миють за допомогою СІР-мийки. Також ще використовують реактор об’ємом 5 л, який миють вручну. Слід зазначити, що при митті обладнання в ручну 50% води від об’єму обладнання йде в стічні води, а при митті СІР-мийкою – 20%.

<i>НУХТ БТЕК 04.01.24 КР ПЗ</i>				
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>
<i>Розроб.</i>		<i>Тромпак В.Ю</i>		
<i>Перевір.</i>		<i>Красінько В.О</i>		
<i>Н. Контр.</i>				
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П</i>		
РОЗДІЛ 9. АНАЛІЗ ПЕРСПЕКТИВ ВПРОВАДЖЕННЯ СИСТЕМИ ЕКОЛОГІЗАЦІЇ ВИРОБНИЦТВА				
		<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушіє</i>
			6	97
				81
<i>Кафедра БТМ</i>				

Отже, проводимо розрахунок:

$$Q_v = 5 + 4 + 24 + 5 + 40 + 240 + 40 + 20 + 400 + 2,5 = 780,5 \text{ л / цикл.}$$

Далі розрахуємо середні витрати побутових стічних вод.

Приймаємо, що норма відведення побутових стічних вод на одного робітника становить 250 л за день. Припустимо, що на підприємстві працює 8 людей (це як мінімум), тому кількість побутових стічних вод дорівнює:

$$Q_{п} = 250 \cdot 8 = 2000 \text{ л / добу.}$$

Однак, так як наш цикл проходить 7 днів (2 дні вирощування посівного матеріалу, а 5 днів виробничий біосинтез), то кількість побутових стічних вод за цикл буде дорівнювати:

$$Q_{п} = 2000 \cdot 7 = 14000 \text{ л / цикл.}$$

Далі розрахуємо середні витрати атмосферних стічних вод.

Оскільки орієнтовно можна прийняти, що кількість атмосферних стічних вод у 5-30 разів менша за кількість побутових, то приймаємо, що кількість атмосферних стічних вод дорівнює:

$$Q_a = 14000 / 30 = 466,6 \text{ л / цикл.}$$

Отже, загальна кількість витрат стічних вод, що утворюється на підприємстві, буде дорівнювати:

$$Q = 780,5 + 14000 + 466,6 = 15247,1 \text{ л / цикл.}$$

Для знешкодження $\approx 15 \text{ м}^3$ стічних вод пропонуємо використати установку BIOTAL (рис. 9.1) [80]

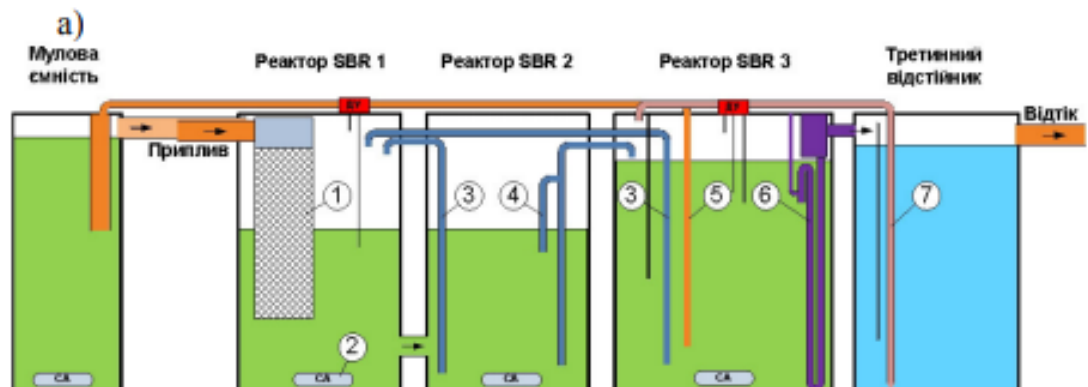


Рис. 9.1. Технологічна схема установки BIOTAL від 1 до 10 м³ / добу [80]

Стічні води зливають у приймальну сітку (1), під якою розташований аератор (2). Він проводить аерацію реактора SBR-1, а також приймальної сітки, розбиваючи в ній великі нечистоти, за для запобігання її забиванню. Далі, позбавлена грубих домішок, вода стікає в реактор SBR-1, куди згодом подається зворотній активний мул із реакторів SBR-2, SBR-3 за допомогою ерліфтів (3). У SBR-1 води частково очищуються біологічно, піддаючись багаторазовим процесам аерації, які циклічно повторюються. Також тут при перемішуванні за відсутності повітря, вода проходить процес денітрифікації, для усунення нітритів та нітратів, що потрапили сюди із зворотнім активним мулом з SBR-2, SBR-3 та легкоокислюючої органіки, яка надходить з свіжими стічними водами

Стічні води, які пройшли обробку в реакторі SBR-1 подаються самоплином в SBR-2, куди віддувається піна, за допомогою ресиверних ерліфтів (4) при переливанні мулової суміші у SBR-3. Ця піна захищає реактор SBR-3 від поганої дії сапонатів. У SBR-2 мулова суміш циклічно піддається багаторазовим процесам перемішування і аерації так як і в реакторі SBR-1 попередньо.

Далі частково очищені рідкі відходи в SBR-2 переводяться за допомогою ресиверних ерліфтів (4) у SBR-3, створюючи акумулюючий об'єм для прийому залпових скидів у реактори SBR-1 та SBR-2. У SBR-3 проводиться окиснення важкоокислюваної органіки та нітрифікація. Тут мулова суміш проходить процес аерації із наступним відстоюванням.

Далі проводиться відкачування надлишкового мулу із SBR-3 у муловий колодязь та відкачування осаду із третинного відстійника у SBR-3. Згодом, мулова вода повертається із колодязя в реактор SBR-1.

І наостанок, після всіх процесів описаних вище, здійснюється відкачка очищених стічних вод із SBR-3 у третинний відстійник за допомогою сифонного ерліфта (6), а чиста вода із нього зливається у каналізаційну мережу. [80]

9.2. Система знешкодження газоподібних відходів

На біотехнологічному виробництві газоподібними відходами можуть бути великі викиди вуглекислого газу і відпрацьоване повітря із аерозоллю бактеріальних спор. Тому розрахуємо приблизний об'єм газоподібних відходів.

Об'єм газоподібних відходів приблизно дорівнює об'єму аераційного повітря, яке подається у інокулятори та ферментер. В посівний апарат об'ємом 20 л подається 0,2 л повітря / хв (стільки, скільки об'єм поживного середовища). Оскільки вирощування інокуляту здійснюється 36 години, то всього подається 432 л повітря. В посівний апарат об'ємом 200 л подається 2 л повітря / хв. Оскільки вирощування інокуляту здійснюється 36 год, то всього подається 4320 л повітря. В ферментер об'ємом 2000 л подається 20 л повітря / хв. Оскільки виробничий біосинтез здійснюється 120 год, то всього подається 144000 л повітря.

Отже, об'єм газоподібних відходів приблизно буде дорівнювати:

$$V_{г.в.} = 432 + 4320 + 144000 = 148,752 \text{ м}^3 / \text{цикл.}$$

Для знешкодження $\approx 150 \text{ м}^3$ газоподібних відходів пропоную встановити двоступеневе очищення повітря, а саме циклон марки ЦН-15 та рукавний фільтр. Цей комплекс апаратів здатний до вловлювання часточок різних розмірів, як дрібнодисперсних, так і крупнодисперсних. Також він забезпечує очищення повітря від газоподібних відходів до 99%.

Циклон робить за рахунок відцентрових сил таким чином (рис.9.2.): газопиловий потік проходить по вхідному патрубку в верхню частину. Далі у апараті розпочинає утворюватися потік газу, який направляє донизу, у конічну частину апарату. Завдяки силам інерції часточки що знаходяться у повітрі виносяться із потоку та концентруються коло зовнішньої стінки і лишаються в бункері забрудненого повітря із пилом. На кінець, очищене повітря проходить знизу догори і виходить із устаткування за допомогою вихідного патрубку.

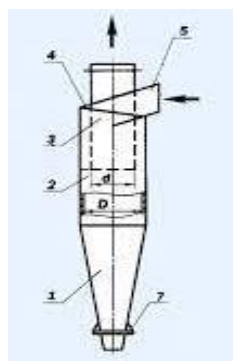


Рис. 9.2. Циклон

Наступний (другий) етап очищення газопилового потоку розпочинається із фільтр-елементів, а саме рукавних фільтрів, що виготовляють з різних матеріалів.

Рукавний фільтр – це високоефективне обладнання, використання якого забезпечує зменшення викидів газових відходів, при нижчих цифрах гранично прийнятої концентрації. Фільтрувальним матеріалом може бути, як папір, так і тканини із різними поверхнями.

На рис. 9.3. зображено будову рукавного фільтру. Він утворений із корпусу 1, де проходить забруднене повітря та направляється далі за допомогою відбійного щита. Після цього переходить через аеродинамічні ґратки 16 та поступає в камеру для забрудненого повітря 9. Коли часточки відокремляться при повороті потоку, вони потрапляють в бункер 18 завдяки щілинам між щитом та стінкою бункера. Забруднене повітря, пройшовши рукави із лавсану 11, проходить процес затримки маленьких часточок і спрямовується в камеру очищеного повітря 8.

В процесі накопичення часточок на зовнішніх стінках рукавів збільшується гідравлічний опір, який зчитується приладом керування регенерацією 15, а після отримання вірної величини, автоматично виключається регенерація рукавного фільтра – стиснене повітря із накопичувача 3 за участі швидкодіючого клапана 4 і колектору з соплами 6, імпульсно потрапляє у рукава та очищає від залишків часток на поверхні. Уловлені частки направляються в систему пиловідведення за участі щільного бункера 18 у вузли вивантаження часток. [81]

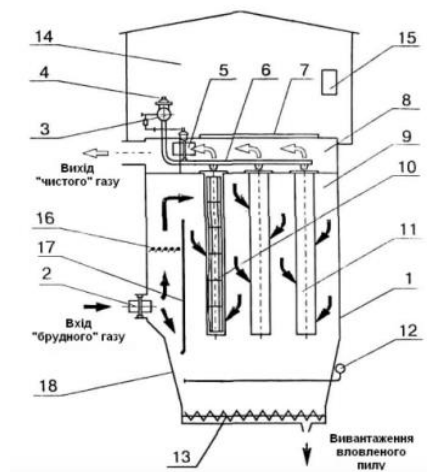


Рис. 9.3. Рукавний фільтр

9.3. Система знешкодження твердих відходів

Твердими відходами при біотехнологічному виробництві є пакувальні тари для миючих і дезінфікуючих засобів та компонентів поживного середовища. Вони можуть бути представлені як скляні банки, картонні коробки, паперові пакети, пластмасові і залізні ємності та інше, тому на виробництві слід проводити сортування цих відходів, з подальшим транспортуванням їх до пункту переробки вторинної сировини. [82]

Також твердими відходами є біомаса використовуваних мікроорганізмів. Так як вона може нести потенційну небезпеку, то необхідно передбачити її інактивацію. Інактивацію можна здійснити за допомогою стерилізації. Для цього відпрацьовану біомасу поміщають в реактор і стерилізують за таких режимів: нагрівання від 100 до 125 °С на протязі 25 хв, далі витримка протягом 5 хв із наступним охолодженням від 125 до 100 °С протягом 25 хв. За цих режимів бактерії повністю інактивуються, тим самим ці відходи втрачуть небезпеку для навколишнього середовища. [83]

**РОЗДІЛ 10. НОРМАТИВНО-ТЕХНІЧНА ДОКУМЕНТАЦІЯ,
ВИКОРИСТАНА ПІД ЧАС ПРОЕКТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА**
ДСТУ 3803-98 Біотехнологія. Терміни і визначення.

ДСТУ EN 12689:2019 Біотехнологія. Настанови щодо оцінювання чистоти, біологічної активності та тривкості продуктів на основі мікроорганізмів (EN 12689:1998, IDT).

Проведення лабораторних робіт відносно виробничих робіт описані в:

Закон України «Про метрологію та метрологічну діяльність» (Відомості Верховної Ради (ВВР), 1998, №30-31, ст.194).

Чисті приміщення і пов'язані з ними контрольовані середовища. Частина 1. Класифікація чистоти повітря: ДСТУ ГОСТ ІСО 14644-1:2004 [Чинний від 2005-01-01], К.-: Держспоживстандарт України, 2005 - 24 с.

Принцип, загальні вимоги та рекомендації до дій з матеріалами, продукцією та обладнанням вказані в:

Настанова СТ-Н МОЗУ 42-4.0:2008 «Лікарські засоби. Належна виробнича практика», 2009 р. - 243 с.

Умови «оснащеного» стану та «функціонуючого» стану чистого приміщення і функціонування обладнання наведені в:

Наказ МОЗ України 14.12.2001 № 502 «Методичні рекомендації щодо класифікації виробничих приміщень нестерильних лікарських засобів за допустимим вмістом мікроорганізмів та часток у повітрі».

Рекомендації, вимоги та методики щодо використання поживного середовища, центрифугування, змішування та заходи уникнення ризику повторної контамінації наведені в:

Наказ МОЗ України від 16.02.2009 р. № 95 «Лікарські засоби. Належна виробнича практика» СТ-Н МОЗУ 42-4.0:2008.

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.24 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Тромпак В.Ю</i>			РОЗДІЛ 10. НОРМАТИВНО-ТЕХНІЧНА ДОКУМЕНТАЦІЯ, ВИКОРИСТАНА ПІД ЧАС ПРОЕКТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушіє</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Красінько В.О</i>					2	97
<i>Н. Контр.</i>					87			
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П</i>			<i>Кафедра БТМ</i>			

ДСТУ EN 12322:2015 Медичні вироби для діагностики in vitro. Поживні середовища для мікробіології. Вимоги до поживних середовищ (EN 12322:1999; A1:2001, IDT).

Вимоги до контролю виробництва на проміжних стадіях технологічного процесу регламентуються в:

ГНД 09-001-98 «Продукція медичної та мікробіологічної промисловості. Регламенти виробництва лікарських засобів. Зміст, порядок розробки, узгодження та затвердження»

Вибір та визначення концентрації дезінфікуючих та мийних засобів здійснюється відповідно до:

ДСТУ EN 1040:2004 Засоби хімічні дезінфікувальні і антисептичні. Основна бактеріцидна активність. Метод випробування та вимоги (стадія 1) (EN 1040:1997, IDT).

ДСТУ 2665:2012 Засоби мийні синтетичні. Метод визначання мийної здатності.

Складання специфікації обладнання та карти поетапного контролю з наведенням контрольних точок виробництва здійснюється відповідно до:

ДСТУ Б А.2.4-10:2009. Правила виконання специфікації обладнання, виробів і матеріалів.

ДСТУ-Н 7917:2015 Система технологічної документації. Настанови щодо оформлення технологічного паспорта, карти вимірів і журналу контролю технологічного процесу.

Безпечність виробничого процесу забезпечується відповідно загальним вимогам, що наведені в:

ДСТУ ГОСТ 12.0.230:2008 Система стандартів безпеки праці. Системи управління охороною праці. Загальні вимоги (ГОСТ 12.0.230-2007, IDT).

Закон України «Про охорону праці» (Відомості Верховної Ради України (ВВР), 1992, №49, ст.668).

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Біотехнологія – новий напрямок у фармацевтичній технології. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://ua-referat.com/%D0%91%D1%96%D0>
2. DoctorThinking. Макроліди. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://doctorthinking.org/2020/12/macrolids/>
3. Пирог Т.П., Пенчук Ю.М. Біохімічні основи мікробного синтезу: підручник – К.: Видавництво Ліра-К, 2019. – 304 с.
4. Abdel-Fattah Y. Application of Factorial Design for the Development of Production Media for the Pikromycin Macrolide Family by *Streptomyces venezuelae*. Academic Journals Inc., 2007, 2(6): 472-482. doi: 10.3923/taer.2007.472.482.
5. Pyeon H., Nah H., Kang S., Choi S., Kim E. Heterologous expression of pikromycin biosynthetic gene cluster using *Streptomyces* artificial chromosome system. Pyeon et al. Microb Cell Fact., 2017, 16(96): 1-9. Doi: 10.1186/s12934-017-0708-7.
6. National Library of Medicine. PubChem. Pikromycin. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Pikromycin>
7. Abcam. Пікроміцин, інгібітор PREP. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.abcam.com/pikromycin-prep-inhibitor-ab144328.html?productWallTab=ShowAll>
8. Бергельсон Л.Д., Шемякин М.М., Хохлов А.С. Антибіотики-макроліди. Справочник химика 21. Глава VIII. – 610 с. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.chem21.info/page/214117218141036197198100033198089217186092110086/>
9. Jeffrey D. Kittendorf, David H. Sharman. The Methymycin/Pikromycin Biosynthetic Pathway: A Model for Metabolic Diversity in Natural Product Biosynthesis. *Bioorg Med Chem*. 2009, 17(6): 2137-2146. doi: 10.1016/g.bms.2008.10.082.
10. Yi J., Kim M., Kim S., Kim B. Effects of Sucrose, Phosphate, and Calcium Carbonate on the Production of Pikromycin from *Streptomyces venezuelae* J. Microbiol. Biotechnol., 2015, 25(4): 496-502. doi: 10.4014/jmb.1409.09009.

11. Yi J., Kim M., Kim S., Kim B. Production of pikromycin using branched chain amino acid catabolism in *Streptomyces venezuelae* ATCC 15439. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology.*, 2018, 45: 293-303. doi:10.1007/s10295-018-2024-6.
12. Скобелева С. Технологія виробництва іммобілізованого ензубіотика косметичного призначення. Дільниця підготовки посівного матеріалу: дип. роб. студ. КПІ ім. Сікорського. Київ, 2020р. 13с.
13. MicrobeWiki. *Streptomyces lividans*. [Електронний ресурс] Режим доступу: https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Streptomyces_lividans
14. *Weihua Chen and Zhongjun Qin*. Development of a gene cloning system in a fast-growing and moderately thermophilic *Streptomyces* species and heterologous expression of *Streptomyces* antibiotic biosynthetic gene clusters. *Chen and Qin BMC Microbiology*. 2011, 11(243): 1-10.
15. SciencePhotoLibrary. СЕМ ґрунтових бактерій. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.sciencephoto.com/media/13147/view>
16. Колекція мікробних культур продуктів антибіотиків. Lv 62 - *Streptomyces lividans*. [Електронний ресурс] Режим доступу: http://lv-microcollect.lviv.ua/en/strain_card/id/26/
17. Хоулт Дж., Криг Н., Смит П., Стейли Дж., Уилльямс С. Определитель бактерий Берджи в 2 томах – М: Мир, 1997. – 746 с.
18. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. [Електронний ресурс] Режим доступу: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?slv00052
19. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. [Електронний ресурс] Режим доступу: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?slv00010
20. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. [Електронний ресурс] Режим доступу: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?slv00051
21. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія: Підруч. – 2-е вид., доп. і перероб. – К.: НУХТ, 2010. – 632с.
22. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. [Електронний ресурс] Режим доступу: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?slv00061

23. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. [Електронний ресурс]
Режим доступу: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?slv00280
24. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. [Електронний ресурс]
Режим доступу: <https://www.genome.jp/pathway/map00523+C11911>
25. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. [Електронний ресурс]
Режим доступу: <https://www.genome.jp/pathway/ko00522+K16006>
26. Пирог Т.П., Ігнатова О.А. Загальна біотехнологія: Підручник. – К.: НУХТ, 2009. – 336 с.
27. Методичні вказівки до практичних занять з дисципліни «Основи проектування» для здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»/ Укладач: Гуляєв В.М. - Кам'янське: ДДТУ, 2019 р. – 71 с.
28. Карлаш Ю.В., Омельчук Є.О. Основи проектування біотехнологічних виробництв. [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнологія» денної та заочної форм навчання /Ю.В. Карлаш, Є.О.Омельчук - К: НУХТ, 2019. Ст.44
29. Група компанії «Біоцид». Гембар. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://biocide.com.ua/ua/g4269182-dezinfitsiruyuschee-sredstvo-gembar>
30. Biovet.ua. Дезінфікуючий засіб «Дезосепт Форте». [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://biovet.ua/ua/dezinfitsiruushchee-sredstvo-dezosept-forte/>
31. Система оптимуму. Товари для лабораторії та виробництва. Каустична сода для дезінфекції. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.systopt.com.ua/article-kausticheskaya-soda-dlya-dezynfekcyu>
32. Науково-виробниче товариство фармакос. Хлорантоін – дезінфікаційний засіб. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://farmakos.ua/ua/hlor.html>

33. Інструкція до застосування засобу «Дезекон» з метою дизенфекції та достерилізаційного очищення. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://staleks.com/wp-content/uploads/instrukczyia_nanosteril_dezekon.pdf

34. Дезцентр плюс. Дезактін методичні вказівки (інструкція по застосуванню). [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://dezmed.com.ua/instruktsiia/item/dezaktin-metodicheskie-rekomendatsii-instruktsiya-po-primeneniyu/>

35. Етапи біотехнологічного процесу. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://moodle.znu.edu.ua/pluginfile.php/236896/mod_resource/content/1/3.pdf

36. ALRA AVAL. ВТРХ. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.alfalaval.com/products/separation/centrifugal-separators/separators/btpx/>

37. Кваліфікаційна робота на здобуття освітнього ступеня бакалавра зі спеціальності «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна» на тему: «Біосинтез бацитрацину *Bacillus licheniformis*» / Укладач: Олексюк Ю.М. – Київ: НУХТ, 2021. – 102 с.

38. ROUSSELET ROBATEL. Liquid / liquid Separation/Extraction. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.rousselet-robatel.com/en/sector-of-activities/liquid-liquid-separation-extraction.html>

39. C&G IBERIKA. RS Vacuum Evaporators. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.cgiberica.com/rs-vacuum-evaporators-p-2-en>

40. Конспект лекцій з дисципліни «Технологія антибіотиків та лікарських препаратів» освітньо-професійної програми першого (бакалаврського) рівня вищої освіти зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» усіх форм навчання / Укладач: Головей О.П. – Кам'янське: ДДТУ, 2017. – 121 с.

41. YENCHEN. Spray Dryer. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.yenchen.com.tw/en/product/Spray-Dryer/spray_dryer-331.html

42. Alpix. Круглі вентиляційні шахти SP. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://alpix.com.ua/catalog/lindab/vozdukhoraspredelenie-i-regulirovanie-vozdukha/ventilyatsionnye-shakhty/kruglye-ventilyatsionnye-shakhty-sp/>
43. Квант успіху. Фільтр грубої очистки повітря для TION O2. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://kvantum.com.ua/ua/catalog/filtr-gruboy-ochistki-vozdukha-f7-dlya-tion-o2.html>
44. Dalgakiran. Компресори серії Inversys DPR з частотним приводом (0,76-62,3 м³/хв). [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://dalgakiran.ua/uk/products/kompresory-seriyi-inversys-dpr-z-chastotnym-pryvodom/>
45. Crownwell. Підготовка повітря. Рефрижераторний осушувач. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.crownwell-compressor.com.ua/main-pidhotovka-povitrya.html>
46. ТОВ «ЕНТЕХ УКРАЇНА». Повітрозбірник, ресивер для стисненого повітря 2000 л, 2,0 м³ (PB2000, PB2000.1200). [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://entech-ukraine.dp.ua/ua/p1192183045-vozduhosbornik-resiver-dlya.html>
47. ВЕНКОН. Нагрівач повітря Вентс НКВ 1000х500-2. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://vencon.ua/ua/products/vents-nkv-1000x500-2>
48. AS Filter База фільтрів. Кишеньковий фільтр ФЯК F9 287х592х600-4. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://asfilter.com.ua/catalog/karmannyye-filtry/karmannyu-filtr-287kh592kh600-4-f9/>
49. Компресорне обладнання REMEZA. Стерильні фільтри в нержавіючому корпусі SPF серії. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://a-remeza.ru/sterilnyye-filtry-v-nerzh-korpuse-spf-serii>
50. DonauLab Ukraine. Реактор miniPilot. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://dlu.com.ua/%D0%A0%D0%B5%D0%B0%D0%BA%D1%82%D0%BE%D1%80-miniPilot-1>

51. mBev. Дозатор рідини, води, молока, пива та інших напоїв за обсягом. Точний порційний розлив і дозування. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://magnum-beer.com.ua/ua/p1493971053-dozator-zhidkosti-vody.html>
52. BioFlo 4500 Fermentor/Bioreactor. Benchtop 20 & 30 Liter System For Process Development through Small-Scale Production. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://www.knbs.co.kr/pdf/BF4500.pdf>
53. Festo. Фільтр тонкої очистки MS6-LFM-1/2AUV-DA. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.festo.com/ua/uk/a/536883/?q=~:sortByCoreRangeAndSp2020>
54. Perry Videx. Реактор із нержавіючої сталі об'ємом 120 літрів. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://perryvidex.eu/product/120-ltr-1-fv-bar-int-3-bar-jkt-1-1kw-agit-11193>
55. АгроТех. Мембранний насос 60 Вт, 5 л/хв. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://agro-teh.com.ua/ua/p413482776-membrannyj-nasos-lmin.html>
56. ООО «ГК Еврохиммаш К.О.». Апарати сталі емальовані з механічним змішувачем. [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://euromash.kiev.ua/ua/aparati_etal_mehaniceskim_perem_ustroystvom_ua.php
57. Medical EXPO by vitrualexpro group. Біореактор для лабораторій BLBIO-200SJ/SC. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.medicalexpo.ru/prod/knik-co-ltd/product-298447-986429.html>
58. Обладнання для отримання та підготовки зжатого повітря. Магістральні фільтри очищення зжатого повітря модель SPF. [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://www.koprigh.com.ua/koprigh/vozduh/filter_SPF.html
59. Промвіт. Реактор для сиропів, розчинів і суспензій РС-1200. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://promvit.com.ua/reaktor-1200-l-dlya-rastvorov-supsenzij-siropov/>
60. АгроТех. Дозатор-змішувач води. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://agro-teh.com.ua/ua/p370240337-dozator-smesitel-vody.html>
61. Sigma Ukraine. Насос відцентровий самовсмоктуючий 0,8 кВт Nmax 40 м Qmax 50 л/хв (нерж) LEO (775316). [Електронний ресурс]. Режим доступу:

<https://sigma.ua/buy/nasos-tsentrobezhnyy-samovsasyvayushchiy-leo-0-8kvt-hmax-40m-qmax-60l-min-nerzh-775316/>

62. Промвіт. Лабораторний реактор РП-5 для МЛФ (креми, мазі, гелі) 5л. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://promvit.com.ua/laboratoryj-reaktor-rp-5-dlya-mlf-kremy-mazi-geli-5-l/>

63. RERRY VIDEX. Вертикальний нержавіючий реактор NICRO об'ємом 200 л з 2 мішалками. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://perryvidex.eu/product/100-ltr-4-bar-int-6-5-bar-jkt-0-18kw-agit-L1442-01>

64. Joom. Високоякісний пластиковий міні мембранний водяний насос 12V 0,48 МПа 3,5 л/хв. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.joom.com/uk/products/5d70c9d936b54d01011dcfae>

65. ТОВ ВК ЕНЕРГОПРОМ. Змішувач об'єднання об'ємом 100 л. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://energoprom.in.ua/ua/p1151904722-zmishuvach-obyemom-100.html>

66. Biotech. Allegro STR Single-Use Stirred Tank Bioreactors. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <file:///C:/Users/Xj-Powko/Downloads/usd3117-allegro-str-single-use-stirred-tank-bioreactors-ds-en.pdf>

67. VDS center. Насос відцентровий самовсмоктуючий 1,5 кВт Нmax 60м Qmax 80 л/хв LEO 3.0 (775375). [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://skvagina.com.ua/ua/poverhnostniy-nasos/775375.html>

68. Дозавтомати. Дозатори вагові для для хлібзаводів для тістомісильних машин безперервної дії. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.dozator.com.ua/products/dozatory-vesovye-dlya-hlebzavodov>

69. Красінько В.О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобув. освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» освіт.-проф. програми «Біотехнологія» ден. і заоч. форм навч. / В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2019. – 134-145 с.

70. Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт з дисципліни "Промислова та екологічна біотехнологія" для студентів очної форми навчання та

після дипломної освіти зі спеціальності: 162 Біотехнології та біоінженерія першого (бакалаврського) рівня /Укладач: Корнієнко І. М. – Кам'янське: ДДТУ, 2017. – 27-28 с. Укладач: Корнієнко І. М.

71. Tomas Crha, Jiri Pazourek. Rapid HPLC Method for Determination of Isomaltulose in the Presence of Glucose, Sucrose, and Maltodextrins in Dietary Supplements. *Foods*. 2020, 9(1164): 1-20. Doi: [10.3390/foods9091164](https://doi.org/10.3390/foods9091164).

72. Латуніна Л.С., Каманин С.С., Арляпов В.А. Ферментные биосенсоры для определения глюкозы, молочной кислоты и крахмала на основе модифицированных печатных электродов. *Химические науки*. 2017, 1: 67-77.

73. Smotraeva I.V., Balanov P.E., Ivanchenko O.B., Fedorov A.V. The Study of Amine Nitrogen in Malt Sprouts Used as a Food Supplement. *Advances in Health Sciences Research*. 2020, 28: 58-63.

74. CAS. Common Chemistry. Pikromycin. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://commonchemistry.cas.org/detail?cas_rn=19721-56-3

75. Structural Formula Vector Image. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.drugfuture.com/chemdata/Picromycin.html>

76. EUROPEAN PHARMACOPOEIA 7.0. 01/2009:0308 corrected 6.8. *Erythromycin*. Page 1937-1938.

77. Haruo Ogura, Kimio Furuhashi. Stereochemistry of macrolides – IV Conformational studies on 14-membered Macrolide – «Diamond Lattice» Conformations models. *Tetrahedron*. 1981, 37(1): 165-173. doi: 0040-4020/81/suppl. 1-0165-09 \$02.00/0.

78. Посохова К.А., Вікторов О.П. Антибіотики (властивості, застосування, взаємодія). Тернопіль ТДМУ «Укрмедкнига». 2005. – 64 с.

79. Програма переддипломної практики для здобувачів освітнього ступення «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна» денної форми навчання [Електронний ресурс] / уклад.: В. О. Красінько, Ю. М. Резніченко, - К.: НУХТ, 2022. – 22 с.

80. Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт «Ознайомлення

з технологією очищення господарсько-побутових стічних вод на прикладі роботи установки «BIOTAL – T (Стандарт)» для студентів спеціальності 192 «Будівництво та цивільна інженерія» всіх форм навчання. Уклад. О.І. Тетеря, С.Ю. Мартинов, С.М. Назаров. – Рівне: НУВГП, 2017 – 21 с.

81. Кваліфікаційна робота на здобуття освітнього ступеня бакалавра зі спеціальності 101 «Екологія» освітньо-професійної програми «Екологія, охорона навколишнього середовища та збалансоване природокористування» на тему: «Очищення газопилових викидів ПАТ НВЦ «Борщагівський ХФЗ»» / уклад.: Т.О. Пономаренко, - К.: НУХТ, 2020. С. 45 – 48.

82. Метод. рекомендації до викон. кваліфік. роботи для здобуття освіт. ступ. «бакалавр» [Електронний ресурс]: для здобуття вищої освіти спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» осв.-проф. прогр. «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна» ден. та заоч. форм навч./ уклад. Т.П. Пирог, В.О. Красінько, Ю.В. Карлаш. – К.: НУХТ, 2022.- 61 с.

83. Навчальний посібник «Біотехнологія та біоінженерія. Частина 1. Основи біотехнології: рекомендації до виконання практичних робіт». Укладачі: В. В. Мотроненко, Т. М. Луценко, Л. М. Дронько – Київ: КПІ ім. Сікорського, 2022. – 96с.

Ключові моменти культивування *Streptomyces lividans* Pik102

tured along with wild-type *S. venezuelae* ATCC 15459. Although pikromycin was not detected from wild-type or heterologous hosts, highly noticeable peaks showing identical retention times and spectra were detected in all three cultures (Fig. 3a, data not shown for *S. coelicolor* Pik201). The collected fraction of the peak was analyzed with high resolution LC/MS and confirmed to be 10-deoxymethynolide, a major pikromycin derivative released from module 5 in pikromycin biosynthetic gene cluster. The results of LC/MS also confirmed expression of the pikromycin biosynthetic gene cluster and that the yields of 10-deoxymethynolide in *S. lividans* Pik101 and *S. coelicolor* Pik201 were 346.8 and 396.2 mg/L, respectively. When the production yield of the heterologous hosts was compared with the wild-type, *S. lividans* Pik101 and *S. coelicolor* Pik201 exhibited 1.6-fold and 1.8-fold increases, respectively (Fig. 2), revealing that the pSBAC-driven heterologous expression of an entire pikromycin biosynthetic gene cluster resulted in enhanced production in both *S. lividans* and *S. coelicolor*.

Heterologous tandem integration of entire pikromycin cluster

To further stimulate pikromycin productivity, an additional copy of the pikromycin cluster was introduced into *S. lividans* Pik101 containing a single-copy of pikromycin. To introduce the second copy of the pikromycin gene cluster, the apramycin resistance gene in pPik001 was substituted with a hygromycin resistance gene and named pPik003. Next, pPik003 was introduced into *S. lividans* Pik101 through conjugation, after which the

exconjugant was selected using both hygromycin and apramycin. Four exconjugants were randomly chosen to confirm the tandem integration by PCR amplification of attP-int primer sets. In all four selected colonies, the pPik003 was integrated into adjacent region of the pPik001 by homologous recombination. The resulting strain was named *S. lividans* Pik102. Although pikromycin was not detected in both *S. venezuelae* and *S. lividans* Pik101 as stated above, pikromycin production was observed in *S. lividans* Pik102 with the pikromycin yield of 333.7 mg/L (Fig. 3a). Moreover, the total production of pikromycin and 10-deoxymethynolide in *S. lividans* Pik102 (604.7 mg/L) showed a 2.1-fold increase compared to the production of only 10-deoxymethynolide in the parental wild-type strain (280 mg/L) (Fig. 3b). Additionally, the yield of *S. lividans* Pik102 was 1.2-fold higher than that of *S. lividans* Pik101. Production of the compounds in *S. lividans* Pik102 remained high until day 6 of culture, whereas production in *S. lividans* Pik101 gradually decreased from day 4 of culture (Fig. 3c). Comparative qRT-PCR results also confirmed that transcription of four biosynthetic genes (*pikA1*, *pikC*, *desIII* and *desVI*), as well as the pathway-specific regulatory gene *pikD*, was significantly stimulated in *S. lividans* Pik102 (Fig. 4). These findings imply that the presence of an additional copy of the entire pikromycin biosynthetic gene cluster was responsible for the increased transcription of pikromycin biosynthetic genes.

was also confirmed through real-time RT-PCR at the transcriptional level. As expected, the level of transcripts of pikromycin biosynthetic genes in *S. lividans* Pik102 was higher than that in *S. lividans* Pik101 on both day 3 and 5. Although a significant gap in expression levels between *S. lividans* Pik101 and *S. lividans* Pik102 was shown, the compound yield in *S. lividans* Pik102 did not differ significantly from that of *S. lividans* Pik101. These findings suggest that the pikromycin gene cluster was amply transcribed, but that another bottleneck may exist in pikromycin production, such as a shortage of building blocks. In conclusion, the *Streptomyces* pSBAC-driven precise cloning and tandem integration approach described here can be applied to the versatile overexpression of large secondary metabolite gene clusters in actinomycetes, including novel cryptic clusters identified by genome mining.

Conclusions

Although actinomycetes have provided abundant sources for the development of new pharmaceuticals, their widespread application for this purpose is hindered by low productivity and difficult cultivation. Because many cryptic pathways have been found through genome mining, heterologous expression was suggested as a useful method for production of new pharmaceuticals. Development of

Luria–Bertani (LB) broth or on Luria–Bertani agar supplemented with appropriate antibiotics at 37 °C. For production of pikromycin and its derivatives, the original host, *S. venezuelae*, was grown in SGGP media for 1 day, then cultured for 3 days in SCM media at 30 °C [15]. Additionally, the model strains *S. lividans* and *S. coelicolor* were grown in TSB media for 2 days, then cultured for 5 days in R5 media at 30 °C [18]. Conjugation was carried out on modified ISP4 medium.

Insertion of unique *HindIII* recognition sequence into a flanking region of the pikromycin biosynthetic gene cluster

To isolate the pikromycin biosynthetic gene cluster, a unique *HindIII* recognition sequence was inserted into a flanking region of the pikromycin biosynthetic gene cluster using a PCR-targeted gene disruption system [17].

Table 1 Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain/plasmid	Relevant characteristics	Source/references
Plasmid		
pSBAC	<i>aacIII(V)</i> , <i>oriT</i> , <i>attP-int_{qet1}</i> , backbone of pCC1BAC	[11]
pSAPDK	Modified pSBAC with deleted <i>attP</i>	This work

R5

Підготовка

Складіть наступне рішення:

- 103 г сахарози
- 0,25 г K_2SO_4
- 10,12 г $MgCl_2 \cdot 6H_2O$
- 10 г глюкози
- 0,1 г казамінокислот Difco
- 2 мл розчину мікроелементів
- 5 г екстракту дріжджів Difco
- 5,73 г TES буфера
- До 1000 мл dH_2O

Налійте 100 мл розчину в 250 мл колби Ерленмейера, кожна з яких містить 2,2 г агару Difco Vasto. Стерилізують автоклавуванням. Під час використання переплавить середовище і додайте до кожної колби наступні автоклавовані розчини в зазначеному порядку:

- 1 мл KH_2PO_4 (0,5%)
- 0,4 мл $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (5M, 3,68%)
- 1,5 мл L-проліну (20%)
- 0,7 мл NaOH (1 н.) (нестерилізований - це нормально)
- 0,75 мл Необхідні фактори росту для ауксотрофів