

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 ” листопада 20 22 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Сокирко Наталії Олегівні

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Одержання канаміцину культивуванням *Streptomyces kanamyceticus*

керівник роботи Сулейко Тетяна Леонідівна, асистент,

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від 31 жовтня 2022 року № 781-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 31 січня 2023 р.

3. Вихідні дані до роботи Продуцент канаміцину *Streptomyces kanamyceticus*; геометричний об'єм ферментера 3 м³; коефіцієнт заповнення 0,6;

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Характеристика цільового продукту; обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента; техніко-економічне обґрунтування; обґрунтування вибору технологічної схеми; специфікація обладнання; опис технологічної схеми; контроль виробництва.

5. Перелік графічного матеріалу

2 аркуші формату А2 та 1 аркуш формату А3 (технологічна схема) і 1 аркуш формату А1 (апаратурна схема)

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання ви- дав	завдання прийняв

7. Дата видачі завдання 01 листопада 2022 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Видача завдання на кваліфікаційну роботу	01.11.2022 -	
2	Робота над Розділом 1 «Характеристика цільового продукту»	02.11.2022- 06.11.2022	
3	Робота над Розділом 2 «Обґрунтування вибору біологічного агента та його характеристика»	08.11.2022- 17.11.2022	
4	Робота над Розділом 3 «Техніко-економічне обґрунтування»	19.11.2022- 05.12.2022	
5	Робота над Розділом 4 «Обґрунтування вибору допоміжних стадій виробництва»	09.12.2022- 13.12.2022	
6	Робота над Розділом 5 «Специфікація обладнання». Робота над гафічною частиною роботи.	15.12.2022- 23.12.2022	
7	Робота над Розділом 6 «Опис технологічної схеми»	05.01.2023- 09.01.2023	
8	Робота над Розділом 7 «Контроль виробництва»	10.01.2023- 17.01.2023	
9	Робота над Розділом 8 «Охорона довкілля»	20.01.2023- 27.01.2023	
10	Підготовка остаточного варіанту пояснювальної записки	- 31.01.2023	

Здобувач

_____ (підпис)

Наталія СОКИРКО

_____ (ім'я та прізвище)

Керівник роботи

_____ (підпис)

Тетяна СУЛЕЙКО

_____ (ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Дана кваліфікаційна робота присвячена проектуванню ділянки виробничого біосинтезу одержання аміноглікозидного антибіотику канаміцину, який синтезує актиноміцет *Streptomyces kanamyceticus*. Кваліфікаційна робота складається зі вступу, восьми розділів та списку використаної літератури із 67 найменувань. Загальний обсяг проекту – 95 сторінок, в роботі також є 7 рисунків, 13 таблиць, 2 додатки та 2 креслення: 2 аркуші формату А2 та 1 аркуш формату А3 (технологічна схема) і 1 аркуш формату А1 (апаратурна схема).

У даній кваліфікаційній роботі представлено обґрунтування та технологічний процес для синтезу біомаси *Streptomyces kamyceticus*. Сюди входять допоміжні робочі етапи, такі як: приготування поживного середовища та стерилізація. Етапи посівної підготовки та вирощування культури *Streptomyces kanamyceticus* у виробничих ферментерах для синтезу антибіотиків. Наведено дані про властивості антибіотика канаміцину, сучасні форми випуску та сфери застосування.

Обґрунтовано також вибір біологічного агента, а саме *Streptomyces kanamyceticus*, штам 1-91, який, на відміну від уже відомих раніше штамів, має більш високу продуктивність при промисловому синтезі антибіотика канаміцину. Наведено оптимальний склад поживного середовища для культивування *Streptomyces kanamyceticus*. З урахуванням складу поживного середовища запропоновано його етапи приготування та обрано оптимальний режим стерилізації. Також в роботі розраховано необхідну кількість стадій підготовки посівного матеріалу.

Для виявлення бактеріологічної та грибової контамінації розглянуті такі методи мікробіологічного контролю, як контроль чистоти культури та контроль стерильності поживних середовищ. Представлений метод визначення концентрації джерела вуглецю (з використанням методу редукуючих цукрів) і джерела азоту (з використанням методу Несслера). Описано

вимірювання концентрації цільового продукту (вимірювання кількості речовини, вимірювання активності антибіотика).

Ключові слова: актиноміцети, *Streptomyces kanamyceticus*, високопродуктивний штам, аміноглікозидні антибіотики, канаміцин, поживне середовище, біосинтез, біотрансформація ростового субстрату, культуральна рідина, інокуляція, біомаса, утилізація відходів.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	3
ВСТУП	8
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	10
РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....	15
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	15
2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента	16
2.3. Таксономічний статус <i>Streptomyces kanamyceticus</i> 1-91.....	19
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ	20
3.1. Потреба населення України в канаміцині	19
3.2. Розрахунок потужності виробництва канаміцину.....	20
3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів і геометричного об'єму ферментера для біосинтезу канаміцину.....	21
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу канаміцину <i>Streptomyces kanamyceticus</i> 1-91	22
3.5. Біосинтез цільового продукту.....	25
3.5.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента ...	25
3.5.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт	28
РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ДОПОМІЖНИХ СТАДІЙ ВИРОБНИЦТВА	32
4.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.....	32
4.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки повітря	34

НУХТ БТЕК 05.01.03 КР ПЗ				
Змн.	Арк.	№ документа	Підпис	Дата
		Сокирко Н.О.		
		Сулейко Т.Л.		
		Консульт.		
		Н. контр.		
		Зав. каф.	Стабніков В.П.	
Зміст			Літера	Арк.
			5	95
			6	
Кафедра БТМ				

4.3. Вибір мийних і дезінфекуючих засобів.....	35
4.4. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища	38
4.4.1. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках	40
4.4.2. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 30 л.....	40
4.4.3. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 300 л.....	40
4.4.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 3 м ³	40
РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	42
РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	47
РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА.....	58
7.1. Карта постадійного контролю доферментаційних процесів	57
7.2. Мікробіологічний контроль	64
7.3. Показники росту і синтезу цільового продукту	66
7.3.1. Визначення концентрації біомаси	66
7.3.2. Визначення концентрації цільового продукту.....	67
7.3.3. Визначення концентрації джерела нітрогену та карбону.....	69
РОЗДІЛ 8. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ	72
8.1. Аналіз технологічної схеми виробництва канаміцину	72
8.2. Характеристика рідких відходів виробництва канаміцину	74
8.2.1. Розрахунок об'ємів відходів	74
8.2.2. Утилізація рідких відходів.....	74
8.3. Характеристика твердих відходів виробництва канаміцину.....	74
8.3.1. Розрахунок об'ємів відходів	74
8.3.2. Утилізація твердих відходів.....	75
8.4. Характеристика газоподібних відходів виробництва канаміцину	78
8.4.1. Розрахунок об'ємів відходів	78

8.4.2. Заходи для зменшення об'ємів відходів	78
8.4.3. Утилізація газоподібних відходів	78
Список використаної літератури	80

ВСТУП

Фармацевтична біотехнологія – результат наукових відкриттів. Суттєва перевага у сучасному світі надається цьому напрямку біотехнології. Це пов'язано з тим, що використання біотехнологічних підходів у фармації дозволяє отримувати вже відомі або нові активні фармацевтичні інгредієнти за допомогою біосинтезу, які не вигідно або здебільшого неможливо здійснювати хімічним шляхом.

Так, наприклад, у медицині революційним відкриттям став винахід антибіотиків. Це речовина природного, напівсинтетичного чи синтетичного походження, що пригнічує розвиток живих клітин, найчастіше прокариотів та найпростіших.

Найбільш поширені антибіотики, отримані з актиноміцетів, включають канаміцин, стрептоміцин, біоміцин, хлорамфенікол, тетрациклін та неоміцин.

Незважаючи на лавиноподібний розвиток фармацевтичної біотехнології, лікування інфекційних захворювань потребує надзвичайно великої уваги. [1]

У даній роботі основним продуктом мікробного біосинтезу є канаміцин, аміноглікозидний антибіотик першого покоління, який показав найбільшу активність щодо деяких атипичних мікобактерій і *M. tuberculosis*, що підтверджує актуальність його застосування в лікуванні, особливо туберкульозу на даний час. [2]

В основному застосовується перорально та парентерально. Продукт життєдіяльності *Streptomyces kanamyceticus* використовують при виготовленні цього препарату. [3]

					НУХТ БТЕК 05.01.03 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ документа	Підпис	Дата				
Розробив		Сокирко Н.О.			Вступ	Літера	Арк.	Аркушів
Керівник		Сулейко Т.Л.					8	95
Н. контр.								9
Консульт.						Кафедра БТМ		
Зав. каф.		Стабніков В.П.						

Безпосередньо сам антибіотик канаміцин та група сучасних аміноглікозидних антибіотиків, має швидку бактерицидну дію, широку активність, сприятливі хімічні та фармакокінетичні властивості, що робить даний клас препаратів та канаміцин клінічно корисними.

Слід також зауважити, що канаміцин та аміноглікозиди можуть використовуватися як в поєднанні з іншими антибіотиками так і, як окремі засоби, що дозволяє застосовувати їх для дуже широкого спектру показань.

Аміноглікозидні антибіотики останнім часом все частіше стають одними із важливих для пацієнтів інфікованих мультирезистентними мікроорганізмами, стійкими до карбапенему ентеробактерій компонентами терапії. Канаміцин та аміноглікозиди є також важливими дуже компонентами комбінованої терапії деяких нетуберкульозних мікобактеріальних інфекцій та мультирезистентного туберкульозу.

Сучасні рекомендації під час інтенсивної фази лікування мультирезистентного туберкульозу включають один із таких засобів: канаміцин, стрептоміцин або капреоміцин – пептидний циклічний антибіотик, який розглядається як аміноглікозид через механізм дії.

Канаміцин та низка інших засобів має потужну бактерицидну активність проти *M. tuberculosis*. [4]

Також застосовують канаміцин при інфекційно-запальних захворюваннях органів дихання (пневмонії, абсцесі легенів), гнійно-септичних захворюваннях (сепсисі, менінгіті, перитоніті), при опіках, які є інфікованими, інфекціях нирок та сечовивідних шляхів, інфекційних ускладнень у післяопераційному періоді. [5]

Канаміцин також використовують для виробництва кровоспинного сучасного засобу, що має назву «Желпластан», завдяки вмісту в складі канаміцину даний засіб володіє місцевою антибіотичною дією. [6]

Широкий спектр застосування підтверджує **актуальність** синтезу канаміцину.

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Кінцевим продуктом виробництва в представленій роботі є аміноглікозидний антибіотик канаміцин. Канаміцин — антибіотик першого покоління природного походження з групи аміноглікозидів для перорального застосування. Виробничий біосинтез препарату канаміцину передбачає використання продуктів життєдіяльності *Streptomyces kanamyceticus* [3].

Клінічна цінність аміноглікозидних антибіотиків як і канаміцину, визначається їх високою активністю щодо більшості грамнегативних аеробів. Застосування канаміцину складно назвати стартовими емпіричними заходами, що використовуються в монотерапії, тому що багато груп препаратів з меншою кількістю побічних реакцій мають перехресну бактеріальну активність з аміноглікозидами.

Призначення препаратів із групи аміноглікозидних антибіотиків та канаміцину не рекомендують при стафілококових інфекціях та неускладнених інфекціях сечовивідних шляхів тому що вони мають досить виражену токсичність. При таких інфекціях можливе їх застосування тільки в тому випадку, якщо ці збудники чутливі до аміноглікозидів і мають стійку резистентність до інших, менш токсичних препаратів. При позалікарняній пневмонії призначення препаратів цієї групи вважається неприпустимим[7].

Також є невірним призначення цих засобів в окремих випадках кишкових інекційних захворюваннях (шигельозі, сальмонельозі), аміноглікозиди не діють на ці збудники. Досить рідко можуть призначати емпірично у вигляді монотерапії [2].

					НУХТ БТЕК 05.01.03 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ документа	Підпис	Дата				
Розробив		Сокирко Н.О.			РОЗДІЛ 1.Характеристика ці- льового продукту	Літера	Арк.	Аркушів
Керівник		Сулейко Т.Л.					10	95
Консульт.								11
Н.контр.						Кафедра БТМ		
Зав. каф.		Стабніков В.П.						

Загалом найпоширеніше призначення аміноглікозидів (за неможливості використання менш токсичних препаратів) здійснюється в комбінації з бета-лактамами, антианаеробними препаратами що залежить від локалізації процесу і збудника, при внутрішньогоспітальних інфекціях різної локалізації, зокрема, сепсисі (в першу чергу у хворих з нейтропенією), гнійних післяопераційних ускладненнях, важких форм пієлонефриту, при опіках які інфіковані, септичному артриті, спричиненому грамнегативними мікроорганізмами, у післяопераційному періоді при операціях на кістках і суглобах, а також у комплексній терапії бактеріального ендокардиту, при туберкульозі (стрептоміцин, канаміцин, амікацин).

Є проте унікальна здатність цієї групи препаратів впливати на більшість збудників особливо небезпечних зоонозних захворювань, таких як: чума, туляремія, бруцельоз та ін., залишається актуальною. Ці засоби також входять до групи протисиньогнійних засобів [2].

Канаміцин – є антибіотиком широкого спектру дії, та у медицині має одне із основних застосувань – порошок для ін'єкційних розчинів. Чинить бактерицидну дію на більшість грамнегативних та грампозитивних мікроорганізмів, а також на кислотостійкі бактерії. Є дієвим навіть на стійкі до стрептоміцину та ізоніазиду штами мікобактерій туберкульозу [8].

Канаміцин є аміноглікозидним антибіотиком, тому як і у більшості аміноглікозидів, механізм його дії, безпосередньо пов'язаний із впливом аміноглікозидів на рибосоми, що призводить до утворення неповноцінних білкових молекул (порушується порядок чергування амінокислот), які не виконують функцій бактерійних протеїнів. Аміноглікозиди характеризуються бактерицидним ефектом. Вважається, що зв'язування з мембранними структурами та проникнення препарату в клітини здійснюється з а рахунок енергії метаболізму аероба [2]. Канаміцин, зокрема, зв'язується з 30S-субодиницею рибосомної мембрани та перешкоджає синтезу білка в мікробних клітинах [8].

Лікарський засіб Канаміцин містить в своєму складі основну діючу речовину канаміцин сульфат [8], формула якого представлена на *рис. 1.1*.

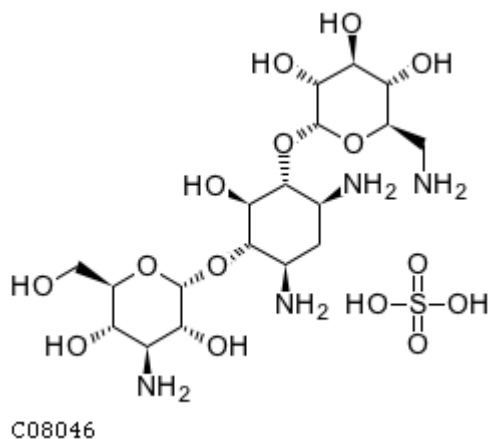


Рис. 1.1. Формула канаміцину сульфату [9].

Основні фізико-хімічні властивості канаміцину: у воді розчинний (1:8), в ацетоні, спирті та ефірі практично нерозчинний, кристалічний порошок білого кольору. ІЧ-спектр, см^{-1} : 980, 1033, 1068, 1143, 1123, 1516 (в KBr); УФ-спектр: $\lambda_{\text{max}} = 249$ нм (в 0,1 М HCl); $\text{pK}_a = 7,2$. Канаміцин зберігають у контейнері, який має бути щільно закупорений. У стерильному контейнері зберігають стерильні субстанції і контролюють перше розкриття.

Ідентифікують канаміцин в системі метанол методом ТШХ— концентрований розчин амоніаку (100:1,5); при нагріванні з розчином нінгідрину, набуває фіолетового забарвлення; з пікриновою кислотою утворюють кристали, $T_{\text{пл.}} 235$ °С із розкладанням; з спиртовим розчином орцину в присутності концентрованої HCl та FeCl_3 при кип'ятінні, набуває зеленого забарвлення; також на сульфати має характерну реакцію. Кількісно визначається мікробіологічними методами [9].

Місце канаміцину у класифікації БАР

Канаміцин є екзогенною речовиною. Екзогенними біологічно активні речовини називають тому, що вони потрапляють в організм різними шляхами [10].

Основне призначення канаміцину

Застосування в медичній галузі:

- тяжкі гнійно-септичні захворювання (менінгіт, перитоніт, септичний ендокардит, сепсис);
- туберкульозні ураження органів і туберкульоз легенів, викликані мікроорганізмами, стійкими до протитуберкульозних препаратів I та II ряду та чутливими до канаміцину;
- інфіковані опіки;
- у післяопераційний період гнійні ускладнення;
- інфекції сечовивідних шляхів і нирок;
- інфекційно-запальні захворювання органів дихання (пневмонія, абсцес легенів, емпієма плеври) [8].

Застосування у ветеринарії

У ветеринарії канаміцин використовується для лікування інфекцій стійких до інших антибіотиків або чутливих до препарату. Канаміцин використовується для лікування собак, свиней, коней і великої рогатої худоби. Для застосування у ветеринарії його випускають в ампулах по 5, 10, 20 і 100 мл у вигляді 10%-вого розчину для ін'єкцій [3].

Канаміцин входить до складу засобу для зупинки кровотечі, що включає желатин, який відрізняється тим, що містить суху плазму крові великої рогатої худоби і канаміцин у формі моносульфату при наступному співвідношенні компонентів, мг: -канаміцин у формі моносульфату 70-80; -суха плазма крові великої рогатої худоби 170-180; -желатин 2,2-2,8 [6].

РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

В представленій роботі цільовою речовиною є аміноглікозидний антибіотик канаміцин, синтезований грамположитивною бактерією з групи актиноміцетів *Streptomyces kanamyceticus* [3].

Багато мікроорганізмів синтезують антибіотики, але найбільш виражена ця властивість в актиноміцетів. Більшість антибіотиків, що використовуються в медицині (70%), виділено з актиноміцетів, включно з канаміцином, еритроміцином, мономіцином, ністатиним і гентаміцином [11].

Основними біологічно активними речовинами, виробленими актиноміцетами для використання людиною, є антибактеріальні антибіотики: канаміцин, тетрацикліни, стрептоміцин, еритроміцин, актиноміцин, гентаміцин, цефаміцин, ванкоміцин, протипухлинні препарати, тому актиноміцети широко використовуються в медичній промисловості та біотехнології завдяки здатності синтезувати ці речовини [12].

З 1940-1950 р. рід *Streptomyces* використовується у промисловому виробництві антибіотиків і є найбільшим родом, що синтезує антибіотики. Мікроорганізми роду *Streptomyces*, наразі, активно використовуються в якості хазяїна для клонування та експресії чужорідної ДНК в генній інженерії, оскільки, правильне пакування та глікозилування білків відбувається в клітинах актиноміцета, на відміну від широко використовуваної *E.coli*, а білки згодом секретуються в навколишнє середовище [13].

					НУХТ БТЕК 05.01.03 КР ПЗ		
Змн.	Арк.	№ документа	Підпис	Дата			
Розробив		Сокирко Н.О.			Літера	Арк.	Аркушів
Керівник		Свлейко Т.Л.				14	95
Консульт.					15		
Н.контр.					Кафедра БТМ		
Зав. каф.		Стабніков В.П.					

У 1957 році канаміцин було виділено з культур *Act. kanamyceticus*; відомі три види цього антибіотика: а, б і с. На практиці використовують сульфат канаміцину, який добре розчинний у воді. Біологічні властивості канаміцину аналогічні властивостям стрептоміцину і неоміцину. Ефективний проти мікобактерій туберкульозу. Проти мікроорганізмів більш виражена активність канаміцину на репродуктивних стадіях мікроорганізмів і в аеробних умовах. Він інгібує ріст мікроорганізмів, стійких до таких антибіотиків, як пеніцилін, стрептоміцин, левоміцетин і тетрациклін. Токсичність для тваринних організмів така ж, як у стрептоміцину, але нижча, ніж у неоміцину [11].

У представлений роботі обрано високопродуктивний штам продуцента канаміцину *Streptomyces kanamyceticus 1-91*, який було отримано з штама *Streptomyces kanamyceticus 33-70* за допомогою дії хімічних мутагенів і багатоступеневого відбору, продуктивність штаму *Streptomyces kanamyceticus 1-91* в порівнянні з існуючими раніше штамми наведено у Таблиці 2.1 [14].

Таблиця 2.1.

Порівняння активності штамів *Streptomyces kanamyceticus*

Штами <i>Streptomyces kanamyceticus</i>	Активність, од/мл
<i>Streptomyces kanamyceticus 1-91</i>	6500
<i>Streptomyces kanamyceticus 1747</i>	4000
<i>Streptomyces kanamyceticus 33-70</i>	4000-5000

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

Морфологічні ознаки *Streptomyces kanamyceticus*: міцелій і наземні гіфи, що виникають з міцелію є рухливі, але здебільшого основний рух відбувається за рахунок розсіювання спор. Має добре розвинені вегетативні гіфи (діаметр яких складає 0,5-2,0 мкм), що мають розгалуження, завдяки яким утворюють складний субстратний міцелій, що допомагає видаляти з субстратів органічні сполуки.

Поверхневий міцелій також може бути представлений гіфами, довгими прямими нитками, що має 50 або більше спор, розташованими у витках через регулярні інтервали. Поверхня спор може бути волосистою, зморшкуватою, гладкою, колючою або бородавчастою. Кожна гілка витка утворює на вершині парасольку, що несе від двох до кількох рядів гладких або складчастих спор сферичної або овальної форми [15].

Культуральні ознаки:

Має культуральні ознаки, які повністю залежать від середовища на якому проводять культивування *Streptomyces kanamyceticus*.

На гороховому середовищі *Streptomyces kanamyceticus* має радіально-складчаті колонії, по центру мають кратер. Присутні концентруючі кола. Субстратний міцелій світло-коричневий, повітряний – світло-сірого кольору, колонії мають діаметр 7 мм.

На середовищі Гаузе І з крохмалем можна побачити круглі і пласкі колонії *Streptomyces kanamyceticus*. Повітряний міцелій здебільшого має білий колір, сіруватий колір міцелій може мати посередині колонії. Субстратний міцелій має світло-коричневий. Діаметр колоній складає 6 мм.

На середовищі Гаузе І з глюкозою колонії набувають круглої форми, що злегка припідняті по центру колонії, складчаті по краях. Повітряний міцелій має сірувате забарвлення, субстратний міцелій – світло-коричневий. Діаметр колоній становить 6 мм.

При вирощуванні на середовищі Ваксмана, колонії радіально-складчаті та пласкі. Невеликий кратер розташовується по центру колонії. Досить яскраво виражені концентруючі кола. Повітряний міцелій світло-бежевого кольору, але по краю колонії здебільшого набуває світлого кольору. Субстратний міцелій має бежевий колір. Діаметр колоній складає 6 мм.

На середовищі Гаузе ІІ здебільшого можна побачити пласкі колонії. Повітряний міцелій забарвлений в світло-бежевий колір, нерівні краї колонії. В

центрі колонії може бути присутня невелика поверхня білого кольору. Коричневий колір субстратного міцелію, колонії діаметром 12 мм.

На соєвому середовищі можна побачити моршукваті колонії, неправильної форми, майже плоскі. Повітряний міцелій світло-бежевого кольору, субстратний міцелій світло-коричневого кольору, діаметр колоній 9 мм.

На вівсяному середовищі колонії *Streptomyces kanamyceticus* круглої форми, радіально-складчаті (рис. 2.1, рис. 2.2). Повітряний міцелій світло-сірого кольору, субстратний міцелій має бежевий колір, колонії мають діаметр 7 мм.

На середовищі Чапека колонії *Streptomyces kanamyceticus* точкові [14].

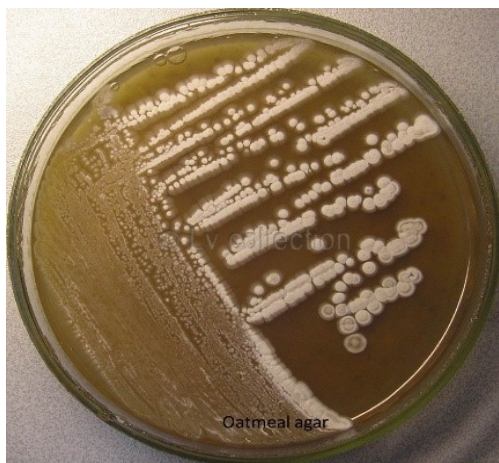


Рис. 2.1. Ріст *Streptomyces kanamyceticus* на вівсяному агарі [16]



Рис. 2.2. Ріст *Streptomyces* на вівсяному агарі [16]

Фізіолого-біохімічні ознаки

Здатен зброджувати глюкозу, маніт, мальтозу; слабо зброджує лактозу, інозит, ксиліт, сахарозу, сорбіт. Не зброджує дульцит, рамнозу.

Повністю пептонізує молоко на 10-ту добу, початок пептонізації припадає приблизно на 4-ту добу, коагуляція молока при цьому не відбувається.

Позитивна реакція на інверсію цукру, випадіння червоного осаду здебільшого припадає на 5-ту добу. Розріджує желатину повністю на 13-ту добу.

Штам *Streptomyces kanamyceticus* 1-91 накопичує до 6500 од/мл канаміцину. Оптимальна температура вирощування становить 27 ± 1 °C [14].

2.3. Таксономічний статус *Streptomyces kanamyceticus* 1-91

Наукова класифікація

Домен: *Bacteria*.

Тип: *Actinomycetota*.

Клас: *Actinomycetia*.

Порядок: *Streptomycetales*.

Родина: *Streptomycetaceae*.

Рід: *Streptomyces*.

Вид: *kanamyceticus*.

Штам: 1-91 [17].

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба населення України в канаміцині

Хвороба туберкульоз не полишає простори України вже протягом кількох десятиліть, незважаючи на розвиток галузей біотехнології, медицини, покращення виробництва ліків, суттєво захворюваність на туберкульоз не змінюється. Туберкульоз – дуже поширене інфекційне захворювання, яке передбачає тривале лікування антибіотиками до яких збудники туберкульозу є чутливі. На даний час, широко використовують і антибіотик канаміцин навіть попри все різноманіття антибіотичних препаратів. Основне значення в застосуванні канаміцину — це застосування при позаленевому туберкульозі, спричиненому мікобактеріями, що резистентні до протитуберкульозних препаратів I та II ряду та туберкульозі легень.

Канаміцин є аміноглікозидним антибіотиком, також канаміцин має ряд протипоказань, заборонено призначати канаміцин при невриті слухового нерва, підвищеній чутливості до аміноглікозидів, ботулізмі, міастенії, паркінсонізмі, кишковій непрохідності, нирковій недостатності, при вагітності та годуванні грудьми.

За доступними даними Центру медичної статистики МОЗ України, в Україні за 2021 рік кількість уперше зареєстрованих захворювань на туберкульоз, включно з рецидивами, становила 18 241, або 44,0 на 100 000 населення, що і є вихідними даними для розрахунку річної потреби в канаміцині.

Прийmemo, що один курс лікування становить 7 днів, кожен хворий проходить три таких курси лікування. Добова доза канаміцину за інструкцією становить 1 г.

					НУХТ БТЕК 05.01.03 КР ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розробив</i>		<i>Сокирко Н.О.</i>			<i>РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування</i>	<i>Літера</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Керівник</i>		<i>Сулейко Т.Л.</i>					19	95
<i>Консульт.</i>								20
<i>Н.контр.</i>						Кафедра БТМ		
<i>Зав. каф.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						

Отже, розрахуємо кількість канаміцину для одного хворого на один курс лікування:

$$1 \text{ г} \times 7 \text{ днів} = 7 \text{ г}$$

Розрахуємо кількість канаміцину для одного хворого на три курси лікування:

$$7 \text{ г} \times 3 = 21 \text{ г}$$

Для всіх хворих річна потреба в канаміцині буде становити:

$$18\,241 \times 21 \text{ г} = 383\,061 \text{ г} = 383,061 \text{ кг, будемо рахувати } 384 \text{ кг.}$$

3.2. Розрахунок потужності виробництва канаміцину

Станом на жовтень 2022 року у Державному реєстрі лікарських засобів України зареєстровано один препарат канаміцину: № РП UA/7637/01/01; термін дії з/по: необмежений з 29.11.2017 р.; назва/лікарська форма: КАНАМІЦИН порошок для розчину для ін'єкцій по 1,0 г; флакони з порошком; 10 флаконів з порошком у контурній чарунковій упаковці; по 1 контурній чарунковій упаковці в пачці; склад діючих речовин: 1 флакон містить канаміцину сульфату кислого стерильного у перерахуванні на канаміцин 1 г; виробник: ПАТ "Київмедпрепарат", Україна.

Зважаючи на те, що препарат канаміцин можуть виготовляти інші фармацевтичні компанії, візьмемо для розрахунку 25% від потреби ринку. Так для покриття потреб в канаміцині за рік потрібно виготовити:

$$G_{\text{гп}} = 384 \text{ кг} \cdot 0,25 = 96 \text{ кг канаміцину.}$$

Для одержання канаміцину в промислових масштабах використовують найбільш ефективний штам біологічного агента *Streptomyces kanamyceticus 1-91*, продуктивність якого складає 6500 од/мл за 120-144 год. У патенті який використаний у представлений роботі зазначена лише концентрація цільового продукту – антибіотика канаміцину синтезованого штамом *Streptomyces kanamyceticus 1-91*, тому для розрахунків оберемо продуктивність штаму *Streptomyces kanamyceticus 12-6*, що буде на рівні 3,5 г/л.

Маючи такі вихідні дані, ми можемо розрахувати кількість культуральної рідини, необхідної для одержання 96 кг канаміцину:

$$\begin{aligned} 3,5 \text{ г} &- 1 \text{ л} \\ 96 \text{ кг} &- X \text{ м}^3 \\ X &= 96 / 3,5 = 27,4 \text{ м}^3 \end{aligned}$$

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

$$V_{\text{кр}} = 27,4 / (1-0,4) = 45,6 \text{ м}^3 \text{ культуральної рідини.}$$

Отже, для забезпечення населення України канаміцином на 25%, потужність виробництва повинна складати 96 кг/рік, а кількість культуральної для одержання антибіотика з урахуванням втрат при екстракції і очищенні становить 45,6 м³.

3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів і геометричного об'єму ферментера для біосинтезу канаміцину

Для лікування туберкульозу у дорослого населення України препаратом канаміцин необхідно одержати 45,6 м³ культуральної рідини.

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

Кількість робочих днів ($T_{\text{тд}}$) становитиме 140 днів (20 тижнів). Таким чином, кількість цільового продукту на добу складатиме:

$$V_{\text{д}} = V_{\text{гп}} / T_{\text{тд}} = 45,6 \text{ м}^3 / 140 \text{ дні} = 0,32 \text{ м}^3/\text{добу.}$$

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

$$V_{\text{цк}} = (K_1 \cdot V_{\text{д}} \cdot T_{\text{цф}}) / 24 = (1,2 \cdot 0,32 \cdot 90,5) / 24 = 1,448 \text{ м}^3.$$

Цикл роботи ферментера ($T_{\text{цф}}$) включає тривалість ферментації і тривалість підготовчих робіт. Тривалість біосинтезу – 140 год. Підготовчі роботи для ферментера включають (6,5 год): миття та огляд апарату – 1,5 год, перевірка на герметичність – 0,5 год, підігрів апарату – 0,5 год, стерилізація апарату – 1 год, охолодження апарату – 0,5 год, завантаження середовища – 1,5 год, засів – 0,5 год, вивантаження – 0,5 год. Приймаємо коефіцієнт запасу

для врахування можливості нестерильних операцій (K_1) за 1,2. Так, цикл роботи ферментера становить – 90,5 год.

Розрахуємо геометричний об'єм ферментера (V_r) для одержання необхідної кількості культуральної рідини:

$$V_r = V_{\text{цк}} / K_{\text{зп}} = 1,448 / 0,6 = 2,4 \text{ м}^3.$$

Так, оптимальним ферментером для одержання 1,448 м³ культуральної рідини за цикл є ферментер з геометричним об'ємом $V_{\text{ф}} = 3 \text{ м}^3$.

Перевіримо, чи підійде обраний коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зп}} = V_{\text{цк}} / V_{\text{ф}} = 1,448 / 3 = 0,48$$

Отримане значення не перевищує задане значення 0,6.

3.4 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу канаміцину *Streptomyces kanamyceticus 1-91*

За один виробничий цикл можливо отримати $V_{\text{цк}} = 1,448 \text{ м}^3$ культуральної рідини. Необхідно врахувати, що при одержанні культуральної рідини втрати ($E_{\text{ф}}$) в результаті краплевиносу через колектор становить 10-15%. Так, кількість поживного середовища та інокуляту перед виробничим біосинтезом складатиме:

$V_{\text{роб.1}} = V_{\text{цк}} / (1 - E_{\text{ф}}) = 1,448 / (1 - 0,1) = 1,608 \text{ м}^3$, що становить робочий об'єм ферментера.

Розрахуємо можливий геометричний об'єм ферментера для заданого об'єму культуральної рідини за коефіцієнта заповнення ($K_{\text{н}}$) – 0,6:

$$V_{\text{ф}} = V_{\text{роб.1}} / K_{\text{зп}} = 1,608 / 0,6 = 2,68 \text{ м}^3.$$

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

$$K_{\text{зп1}} = V_{\text{роб.1}} / V_{\text{сф}} = 1,608 / 3 = 0,536.$$

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

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

$$V_{\text{пс1}} = V_{\text{роб.1}} / (1 + X_{\phi}) = 1,608 / (1 + 0,1) = 1,46 \text{ м}^3.$$

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

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пс1}} = 1,608 - 1,46 = 0,148 \text{ м}^3.$$

Для одержання $0,148 \text{ м}^3$ посівного матеріалу в інокуляторі необхідно врахувати втрати у результаті краплиносу через колектор відпрацьованого повітря (E_{ϕ}), що становить 10-15%. Так, кількість поживного середовища ($V_{\text{пс2}}$) і посівного матеріалу ($V_{\text{пм2}}$) складатиме:

$$V_{\text{роб.2}} = V_{\text{цк}} / (1 - E_{\phi}) = 0,148 / (1 - 0,1) = 0,164 \text{ м}^3$$

$$V_{\text{пс2}} = V_{\text{роб.2}} / (1 + X_{\phi}) = 0,164 / (1 + 0,1) = 0,149 \text{ м}^3$$

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 0,164 - 0,149 = 0,015 \text{ м}^3$$

Об'єм інокуляту $V_{\text{роб.2}} = 0,164 \text{ м}^3$ можна одержати під час культивування штаму-продуцента у посівному апараті з геометричним об'ємом:

$$V_{\phi 2} = V_{\text{роб.2}} / K_{\text{зап2}} = 0,164 / 0,6 = 0,27 \text{ м}^3.$$

Приймаємо стандартний посівний апарат з геометричним об'ємом $V_{\text{сф2}} = 0,3 \text{ м}^3$. Уточнюємо прийнятий коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап2}} = V_{\text{роб.2}} / V_{\text{сф2}} = 0,164 / 0,3 = 0,54.$$

Для одержання $0,015 \text{ м}^3$ (15 л) посівного матеріалу в інокуляторі необхідно врахувати втрати у результаті краплиносу через колектор відпрацьованого повітря (E_{ϕ}), що становить 10-15%. Так, кількість поживного середовища ($V_{\text{пс3}}$) і посівного матеріалу ($V_{\text{пм3}}$) складатиме:

$$V_{\text{роб.3}} = V_{\text{цк}} / (1 - E_{\phi}) = 15 / (1 - 0,1) = 16,6 \text{ л}$$

$$V_{\text{пс3}} = V_{\text{роб.3}} / (1 + X_{\phi}) = 16,6 / (1 + 0,1) = 15,09 \text{ л}$$

$$V_{\text{пм3}} = V_{\text{роб.3}} - V_{\text{пс3}} = 16,6 - 15,09 = 0,7 \text{ л}.$$

Об'єм посівного матеріалу $V_{\text{пм3}} = 0,7 \text{ л}$ (700 мл) можна отримати шляхом культивування штаму-продуцента в колбах на качалці. Для цього вико-

ристовуюють колби Ерленмеєра з $V_{\text{колб}} = 750$ мл з коефіцієнтом заповнення $K_{\text{зп}} = 0,2$.

Кількість колб для отримання посівного матеріалу становитиме:

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{пм4}} / (V_{\text{колб}} \cdot K_{\text{з}}) = 700 / (750 \cdot 0,2) = 4,6 = 5 \text{ колб.}$$

Таким чином, для одержання інокуляту необхідно 5 качалочних колб.

Для зручності результати розрахунку представимо у таблиці 3.1

Таблиця 3.1

№ стадії	Геометричний об'єм ферментера, $V_{\text{ф}}$, м^3	Коефіцієнт заповнення, $K_{\text{зп}}$, частка	Робочий об'єм ферментера, $V_{\text{роб}}$, м^3	Об'єм поживного середовища, $V_{\text{пс}}$, м^3	Об'єм посівного матеріалу, $V_{\text{пм}}$, м^3
1	2,68	0,536	1,608	1,46	0,148
2	0,27	0,54	0,164	0,149	0,015
3	0,750×5колб	0,2	0,0166	0,01509	0,0007

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу канаміцину у ферментері об'ємом 3 м^3 з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити у три етапи. Так, за результатами розрахунків для біосинтезу канаміцину *Streptomyces kanamyceticus* 1-91 необхідно встановити наступні апарати: один ферментер об'ємом 3 м^3 , один інокулятор об'ємом $0,3 \text{ м}^3$.

3.5. Біосинтез цільового продукту

3.5.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента

Для біосинтезу канаміцину за допомогою *Streptomyces kanamyceticus* 1-91 ростовими субстратами є кукурудзяне та соєве борошно [14]. Слід зазначити, що основним компонентом даного субстрату є клітковина, яка складається із целюлози, тобто катаболізм буде розпочинатися саме з цієї сполуки.

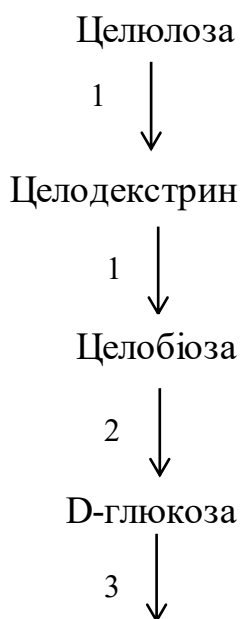
Згідно з даними Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) катаболізм целюлози у *S. kanamyceticus* [18] здійснюється шляхом перетворення даного полісахариду із залученням ендоглюканази (КФ 3.2.1.4) у целодекстрин, який потім трансформується у целобіозу за допомогою того ж самого

ферменту (КФ 3.2.1.4). Після чого целобіоза за рахунок ферменту β -глюкозидази (КФ 3.2.1.21) перетворюється у D-глюкозу.

Згідно з даними KEGG подальший метаболізм у *S. kanamyceticus* [19] проходить із залученням D-глюкози до гліколізу і перетворенням даного моносахариду на α -D-глюкозо-6-фосфат за рахунок дії глюкозофосфотрансферази (КФ 2.7.1.199), який, у свою чергу, перетворюється за допомогою глюкозо-6-фосфат-ізомерази (КФ 5.3.1.9) на β -D-фруктозо-6-фосфат. Така сполука далі піддається дії 6-фосфотруктокінази (КФ 2.7.1.11) з утворенням β -D-фруктозо-1,6-дифосфату. З однієї такої сполуки утворюються діоксиацетонфосфат і гліцеральдегід-3-фосфат (фермент – фруктозо-дифосфат альдолаза КФ 4.1.2.13). Згодом, останній за дії гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (КФ 1.2.1.12) перетворюється на 1,3-дифосфогліцерат, з якого далі утворюється 3-фосфогліцерат за допомогою ферменту фосфогліцераткінази (КФ 2.7.2.3).

3-фосфогліцерат катаболізується за допомогою фосфогліцеромутази (КФ 5.4.2.11) у 2-фосфогліцерат, з якого далі утворюється фосфоенолпіруат (ФЕП) за дії енолази (КФ 4.2.1.11). ФЕП перетворюється за допомогою піруваткінази (КФ 2.7.1.40) на піруват, який згодом під дією ферредоксиноксидоредуктази (КФ 1.2.7.11) перетворюється на ацетил-КоА.

Схему катаболізму целюлози наведено на *Рис. 3.1* [18, 19].



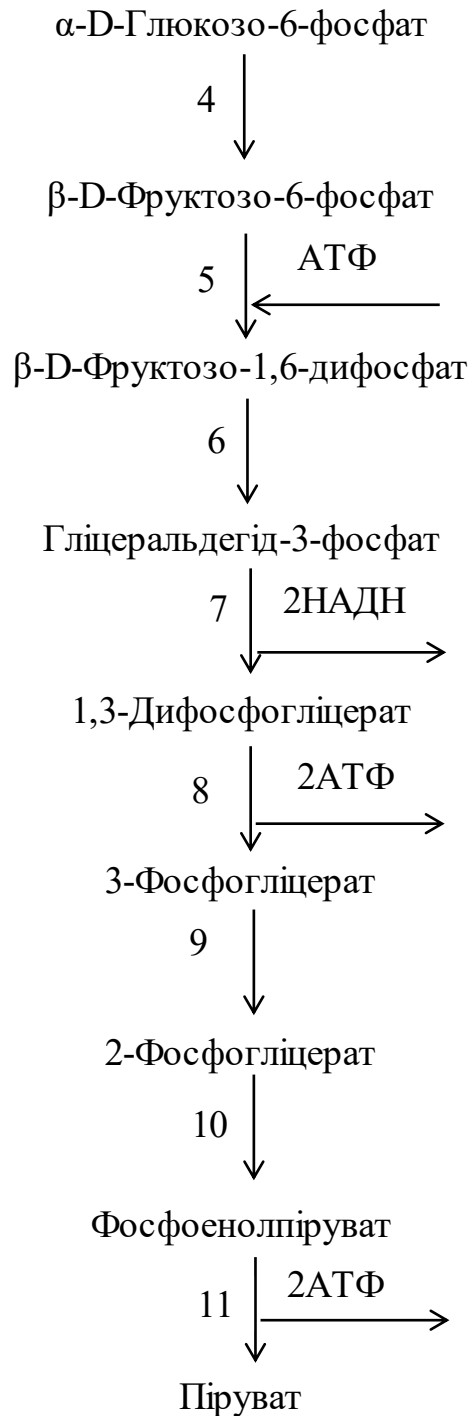


Рис. 3.1. Катаболізм гліцерину у *S. kanamyceticus* згідно з KEGG [18, 19].
 Ферменти: 1 – ендоглюканаза (КФ 3.2.1.4); 2 – β -глюкозидаза (КФ 3.2.1.21); 3 – глюкозофосфотрансфераза (КФ 2.7.1.199); 4 – глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ.5.3.1.9); 5 – 6-фосфофруктокіназа (КФ.2.7.1.11); 6 – фруктозо-дифосфат альдолаза (КФ.4.1.2.13); 7 – гліцераальдегід-3-фосфатдегідрогеназа

(КФ.1.2.1.12); 8 – фосфогліцераткіназа (КФ.2.7.2.3); 9 – фосфогліцеромутаза (КФ.5.4.2.11); 10 – енолаза (КФ.4.2.1.11); 11 – піруваткіназа (КФ.2.7.1.40).

3.5.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

Під час росту *S. kanamyceticus 1-91* з використанням кукурудзяного та соєвого борошна, внаслідок катаболізму целюлози, утворюється піруват, який згодом під дією ферредоксиноксидоредуктази (КФ 1.2.7.11) перетворюється на ацетил-КоА. Потім ацетил-КоА залучається до циклу трикарбонових кислот (ЦТК). [20]

Анаплеротичними реакціями, які забезпечують поповнення інтермедіату ЦТК – оксалоацетату при рості на целюлозі є такі реакції:

- 1) карбоксилювання фосфоенолпірувату (фермент – фосфоенолпіруваткарбоксилаза КФ 4.1.1.31);
- 2) карбоксилювання пірувату (фермент – піруваткарбоксилаза КФ 6.4.1.1).

Початковою сполукою для синтезу канаміцину *S. kanamyceticus 1-91* у даному випадку є попередньо синтезований α -D-глюкозо-6-фосфат [21]. Під дією 2-дезоксисцилоінозосинтетази (КФ 4.2.3.124) ця сполука перетворюється на 2-дезоксисцилоінозу, що піддається подальшому перетворенню під дією L-глутамін: 2-дезоксисциллоінозозин (КФ 2.6.1.100) у 2-дезоксисциллоінозамін, з якого, під дією 2-дезоксисциллоінозаміндегідрогеназа (КФ 1.1.99.38) утворюється 3-аміно-2,3-дезоксисциллоінозола, з якої потім синтезується ключова сполука – 2-дезоксистрептомін (фермент – 3-аміно-2,3-дидезокси-циллоінозамінотрансфераза КФ 2.6.1.101).

2-Дезоксистрептомін під дією фермента 2-дезоксистрептамін глюкозилтрансферази (КФ 2.4.1.284) перетворюється на 2-діаміно-2-гідроксипаромамін, який далі, зв'язуючись із УДФ-канозаміном перетворюється за допомогою 2'-деаміно-2'-гідроксинамін 1- α -D-канозамінілтрансферази (КФ 2.4.1.301) на канаміцин X. Одержана сполука

під дією 2'-деаміно-2'-гідроксипаромамін 6'-оксидази (КФ 1.1.3.-) окиснюється у 6-оксоканаміцин, з якого утворюється канаміцин А (фермент – 2'-деаміно-2'-гідроксинамінтрансаміназа КФ 2.6.1.94).

Канаміцин А також утворюється із 2-діаміно-2-гідроксинеаміну, що синтезовано із 2-діаміно-2-гідроксипаромамін, та УДФ-канозаміну під дією 2'-деаміно-2'-гідроксинамін 1- α -D-канозамінілтрансферази (КФ 2.4.1.301). Із 2-діаміно-2-гідроксинеаміну також синтезується канаміцин D за допомогою 2'-деаміно-2'-гідроксинамін 1- α -D-канозамінілтрансферази (КФ 2.4.1.301).

2-Дезоксистрептомін під дією іншого фермента 2-дезоксистрептамін N-ацетил-D-глюкозамінілтрансферази (КФ 2.4.1.283), зв'язуючись із УДФ-N-ацетил- α -D-глюкозаміном, перетворюється на 2-N-ацетилпаромамін, з якого далі під дією 2'-N-ацетилпаромаміндеацетилази (КФ 3.5.1.112) утворюється паромамін. Дана сполука за допомогою паромамін 6'-оксидази (КФ 1.1.3.43) окиснюється у 6-оксопаромамін, який згодом перетворюється на неамін під дією неамінтрансамінази (КФ 2.6.1.93), який, зв'язуючись із УДФ-канозаміном за допомогою 2'-деаміно-2'-гідроксинамін 1- α -D-канозамінілтрансферази (КФ 2.4.1.301) перетворюється на канаміцин В. Канаміцин С синтезується зв'язуванням паромаміну із УДФ-канозаміном під дією ферменту 2'-деаміно-2'-гідроксинамін 1- α -D-канозамінілтрансферази (КФ 2.4.1.301).

Одержаний канаміцин С здатен окиснюватися під дією 2'-деаміно-2'-гідроксипаромамін 6'-оксидази (КФ 1.1.3.-) у 6-оксо-канаміцин С, з якого утворюється канаміцин В (фермент – 2'-деаміно-2'-гідроксинамінтрансаміназа КФ 2.6.1.94). Канаміцин В, у свою чергу, окиснюється під дією канаміцин В-діоксигенази (КФ 1.14.11.37) в 2-оксо-канаміцин В, з якого за допомогою 2'-дегідроканаміцинредуктази (КФ 1.1.1.355) синтезується канаміцин А.

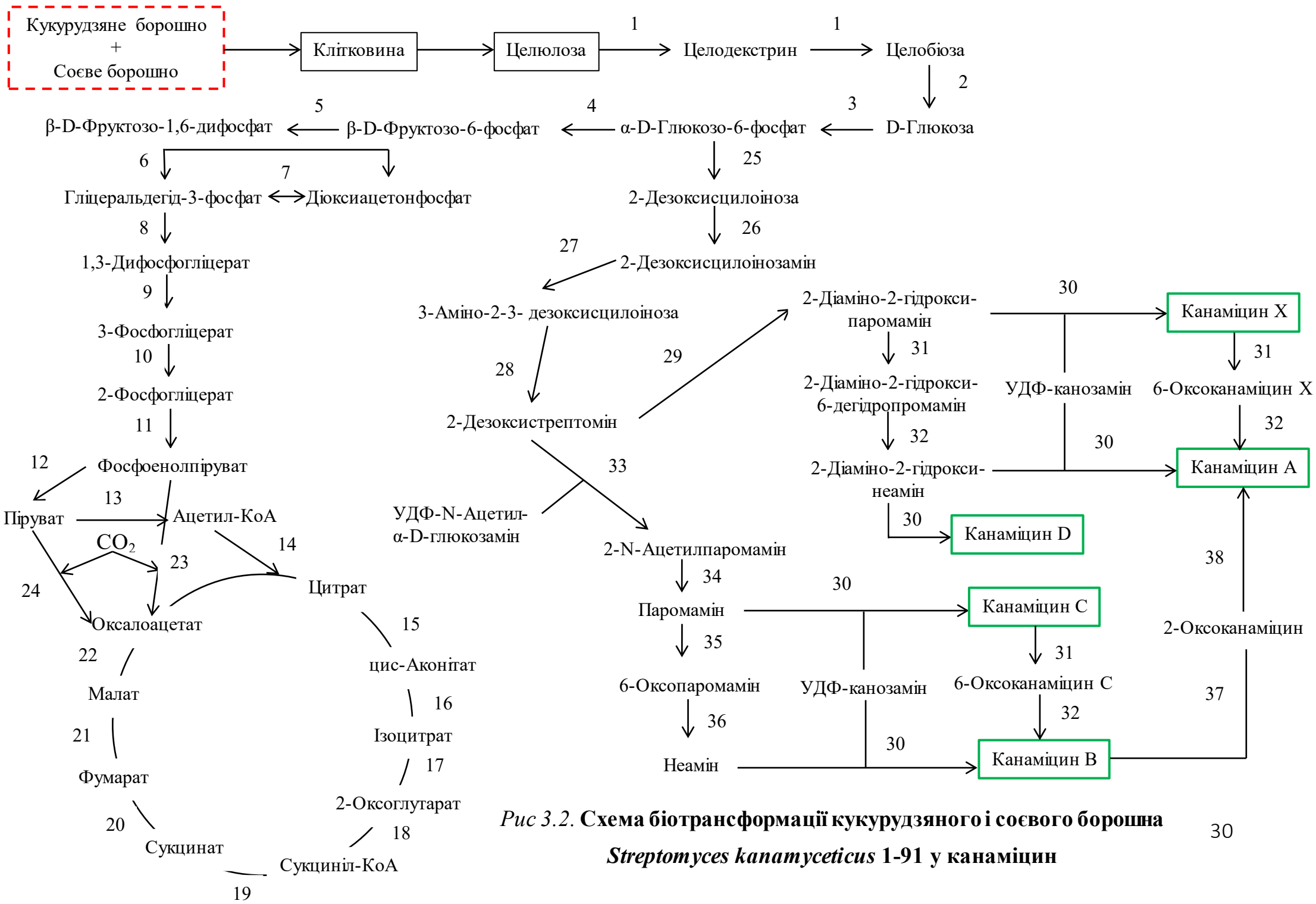


Рис 3.2. Схема біотрансформації кукурудзяного і соєвого борошна *Streptomyces kanamyceticus* 1-91 у канаміцин

Ферменти:

1. КФ 3.2.1.4 Ендоглюканаза
2. КФ 3.2.1.21 β -глюкозидаза
3. КФ 2.7.1.199 Глюкозофосфотрансфераза
4. КФ 5.3.1.9 Глюкозо-6-фосфат-ізомераза
5. КФ 2.7.1.11 6-фосфофруктокіназа
6. КФ 4.1.2.13 Фруктозо-дифосфат альдолаза
7. КФ 1.2.1.12 Гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа
8. КФ 2.7.2.3 Фосфогліцераткіназа
9. КФ 5.4.2.11 Фосфогліцеромутаза
10. КФ 4.2.1.11 Енолаза
11. КФ 2.7.1.40 Піруваткіназа
12. КФ 1.2.7.11 Ферредоксиноксидоредуктаза
13. КФ 2.3.3.1 Цитратсинтетаза
14. КФ 2.3.3.1 Цитратсинтетаза
15. КФ 4.2.1.3 Аконітатгідратаза
16. КФ 4.2.1.3 Аконітатгідратаза
17. КФ 1.1.1.42 Ізоцитратдегідрогеназа
18. КФ 2.3.1.61 2-Оксоглутаратдегідрогеназа
19. КФ 6.2.1.5 Сукциніл-КоА-синтетаза
20. КФ 1.3.5.1 Сукцинатдегідрогеназа
21. КФ 4.2.1.2 Фумаратгідратаза
22. КФ 1.1.1.37 Малатдегідрогеназа
23. КФ 4.1.1.31 Фосфоенолпіруваткарбоксилаза
24. КФ 6.4.1. 1 Піруваткарбоксилаза
25. КФ 4.2.3.124 2-дезоксисцило-інозосинтетаза
26. КФ 2.6.1.100 L-глутамін: 2-дезоксисцилло-інозоза
27. КФ 1.1.99.38 2-дезоксисцило-інозаміндегідрогеназа
28. КФ 2.6.1.101 3-аміно-2,3-дидезокси-сцило-інозозамінотрансфераза

29. КФ 2.4.1.284 2-дезоксистрептамін глюкозилтрансфераза
30. КФ 2.4.1.301 2'-деаміно-2'-гідроксинамін 1- α -D-канозамінілтрансфераза
31. КФ 1.1.3.- 2'-деаміно-2'-гідроксипаромамін 6'-оксидаза
32. КФ 2.6.1.94 2'-деаміно-2'-гідроксинамінтрансаміназа
33. КФ 2.4.1.283 2-дезоксистрептамін N-ацетил-D-глюкозамінілтрансфераза
34. КФ 3.5.1.112 2'-N-ацетилпаромаміндеацетилази
35. КФ 1.1.3.43 Паромамін 6'-оксидаза
36. КФ 2.6.1.93 Неамінтрансаміназа
37. КФ 1.14.11.37 Канаміцин В-діоксигеназа
38. КФ 1.1.1.355 2'-дегідроканаміцинредуктаза

РОЗДІЛ 4. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ДОПОМІЖНИХ СТАДІЙ ВИРОБНИЦТВА

4.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

У представленій роботі штам аеробних мікроорганізмів *Streptomyces kanamyceticus* 1-91 є продуцентом антибіотика канаміцину. Оскільки оптимальною температурою для культивування аеробного штаму *Streptomyces kanamyceticus* є 27 ± 1 °C [14], то завжди існує ризик контамінації сторонніми мікроорганізмами. Тому необхідно під час біосинтезу підтримувати стерильні умови, які не можуть бути досягнуті при поверхневому культивуванні *Streptomyces kanamyceticus*. Стерилізація обладнання, комунікацій, поживних середовищ та аераційного повітря, яке необхідне для забезпечення росту аеробного мікроорганізму сприяє створенню асептичних умов.

Подача стерильного аераційного повітря для створення надлишкового тиску використовується для запобігання контамінації, безпосередньо, у самому ферментері. У зв'язку з вищевикладеною інформацією, вирішено проводити культивування *Streptomyces kanamyceticus* для біосинтезу канаміцину глибинним методом.

Незважаючи на значні переваги безперервного культивування порівняно з періодичним, біосинтез канаміцину, як і багатьох інших антибіотиків, що є вторинними метаболітами, розпочинається під час стаціонарної фази росту мікроорганізму.

Тому підтримання штаму-продуцента в експоненціальній фазі росту є недоцільним, оскільки в цьому випадку знижується концентрація антибіотика в культуральній рідині [22].

					НУХТ БТЕК 05.01.03 КР ПЗ		
Змн.	Арк.	№ документа	Підпис	Дата			
Розробив		Сокирко Н.О.			Літера	Арк.	Аркушів
Керівник		Сулейко Т.Л.				32	95
Консульт.							33
Н.контр.					Кафедра БТМ		
Зав. каф.		Стабніков В.П.					
РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору допоміжних стадій виробництва							

Залежно від умов культивування біологічного агента конструкція обладнання та ферментера можуть варіюватися. Обирати обладнання для ферментера слід після визначення фізіологічних та біохімічних характеристик продуцента, та методу культивування, щоб створити необхідні умови для одержання канаміцину.

1. Для культивування продуцента канаміцину *Streptomyces kanamyceticus*, необхідні аеробні умови, тому для забезпечення подачі необхідної кількості кисню ферментер має бути обладнаний барботером, а також має бути присутній та ввімкнений газоаналізатор для контролю концентрації CO₂.

2. Ферментер має бути оснащений датчиком для контролю значення рН, так як ферментація має відбуватися за нейтрального значення рН (7,0).

3. Для контролю за постійною температурою за якої має проходити ферментація (27°C), ферментер має бути оснащений датчиком для індикації значення температури і сорочкою [14].

4.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки повітря

Streptomyces kanamyceticus I-91, продуцент канаміцину, є аеробною бактерією [14], тому безперервна подача стерильного повітря через барботер під час біосинтезу є необхідною умовою.

підготовка посівної культури для вирощування інокуляту у колбах на качалках проходить у боксах та мікробіологічних лабораторіях, в яких повітря стерилізують за допомогою УФ-ламп, шляхом впливу на нього ультрафіолетового випромінювання.

Етапи підготовки стерильного аераційного повітря проходять наступним чином:

1. За допомогою турбокомпресора через забірну шахту, на висоті 2-3 м від найвищої точки будівлі, тобто на висоті ~ 10 м (висота поверху – 6 м, кі-

лькість поверхів – 1, косий дах будівлі (~1,5 м)) відбувається забір атмосферного повітря.

2. повітря надходить у фільтри попереднього очищення, щоб значно зменшити кількість контамінантів, де воно звільняється від пилу.

3. У турбокомпресорі відбувається стиснення повітря до 0,35 – 0,5 МПа, що викликає його нагрівання до 120 – 250 °С і вміст вологи на одиницю об'єму збільшується.

4. За допомогою теплообмінника забезпечується відвід вологи в краплевловлювачі шляхом охолодження повітря, що дозволяє уникнути злипання волокон або утворення каналів в подальшому.

5. Конденсована волога, що потрапила із компресора, видаляється у ресивері.

6. Підігрів повітря відбувається у теплообмінниках.

7. Повітря очищається на головних фільтрах.

8. Очищення повітря на індивідуальних фільтрах. Повітря проходить від головних фільтрів колектором в фільтри третього рівня – індивідуальні, які на кожному ферментері присутні (затримують 99,999% мікроорганізмів).

Від типу використовуваного фільтрувального матеріалу залежить конструкція індивідуальних фільтрів. Під час роботи фільтри також необхідно стерилізувати. Нагрівання їх вологою парою та витримання за температури 125-130°С протягом певного часу є найефективнішим методом [23].

4.3. Вибір мийних і дезінфекуючих засобів

В промисловості дезінфекція та очищення – етапи дуже важливі, у виробничому процесі. В разі неправильного виконання цих етапів, можуть бути катастрофічні наслідки. Щоб провести очищення та дезінфекцію ретельно та ефективно, необхідно знати тип залишків або забруднень, які необхідно видалити або усунути, вони бувають неорганічними або органічними .

Слід зазначити, дезінфекція та очищення – це процеси різні. Ефективне очищення – це повне видалення забруднень і залишків з поверхонь, після

чого вони є чистими візуально. Наступний етап за очищенням – дезінфекція. Поверхні можуть бути візуально очищені, але без дезінфекції, мікроорганізми будуть залишатися на поверхні [24].

Дезінфекція або стерилізація – це послідовність методів часткового, повного або вибіркового знищення потенційно патогенних мікроорганізмів для людини, задля розриву шляхів або припинення поширення інфекційних захворювань на об'єктах зовнішнього середовища. Запобігання або усунення процесів накопичення, розмноження та поширення інфекційних агентів у навколишнє середовище є основною метою дезінфекції. Проводять дезінфекцію із використанням механічних, фізичних, хімічних, біологічних і комбінованих методів [25].

Так як, ці засоби використовуються у фармацевтичній і харчовій промисловості, тому з метою запобігання небажаним наслідкам для людини та охорони безпеки життя людей і тварин до дезінфекційних засобів висувається низка вимог, зокрема такі:

- ✓ Мають широкий спектр антимікробної дії;
- ✓ Здатні до відбілювання та очищення;
- ✓ Мають мінімальну корозійну активність та агресивність;
- ✓ Відсутній різкий запах;
- ✓ Безпечні для людей і тварин;
- ✓ Мають стійкість при зберіганні, використанні, придатні до транспортування;
- ✓ Легкорозчинні у воді;
- ✓ Мають відносно низьку ціну та доступні;
- ✓ Високоактивні [26].

Мийні засоби – це здебільшого суміші поверхнево-активних речовин або поверхнево-активні речовини, які володіють " в розведених розчинах мийними властивостями ".

Згідно з постановою Кабінету Міністрів України, в Україні мийним засобом вважають речовину або препарат, що містить в своєму складі поверхнево-активні речовини та мило, і які призначені для чищення та прання. Мийні засоби можуть бути у вигляді порошку, рідини, брусків, пасти, таблеток або плиток [27].

Каустична сода (NaOH) собою являє кристалічну білу речовину, у воді розчинну, добре розчинну в етиловому спирті та метиловому, але в етоксіетані нерозчинну. Каустична сода у твердому стані дуже гігроскопічна і при контакті з повітрям може швидко перетворюватися на висококонцентрований розчин. Розчини каустичної соди гарячі (2-3%) гідролізують білки, розчиняють вуглеводи і омилюють жири,. Такі розчини каустичної соди за температури 60-70 °С мають бактерицидну дію [28, 29].

Каустична сода токсична, їдка і має виражену корозійну дію (відноситься до другого класу небезпеки за ГОСТ 12.1.007). При контакті зі шкірою і слизовими оболонками може призвести до хімічних опіків, так як має сильну подразнювальну дію. Найбільший негативний вплив при ковтанні чинить слизові оболонки, а в разі потрапляння в очі речовини, сітківка ока уражається і зір може погіршитися. Під час роботи з цією речовиною не можна нехтувати запобіжними заходами з міркувань безпеки [29].

«ПЗ-топакс 990» – засіб для миття та дезінфекції («P3-topax 990») (діюча речовина N-(3-амінопропіл)-N-додецилпропан-1,3-діамін – 2.0% - 5.0%), здебільшого підходить для дезінфекції всіх механізмів і зовнішніх поверхонь, а при використанні у вигляді 1 - 2% робочого розчину для пінної обробки також для дезінфекції підлоги і стін на підприємствах. Строк придатності: 36 місяців за умови зберігання при температурі 0-30°C і невідкритої упаковки.

Має антимікробну активність щодо таких бактерій, як золотистий стафілокок, кишкова паличка і сальмонела, також дріжджів і дріжджоподібних грибів, які є специфічною мікрофлорою для харчової промисловості. Щодо гострої токсичності при потраплянні в шлунок, цей дезінфекційний засіб від-

носиться до категорії помірному ризику 3 за ГОСТ 12.1.007-76. При вдиханні в насичених концентраціях злегка небезпечний. Робочий розчин може подразнювати слизові оболонки очей і дихальну систему після одноразового використання, якщо застосовувати шляхом зрошення.

Призначення даного засобу – для дезінфекції санітарно-технічного обладнання, поверхонь у промислових приміщеннях, технологічного обладнання, тари, інвентарю [30].

Фамідез Саноксіл 100 – концентрат на основі срібла та перекису водню для швидкої та ефективної дезінфекції водостійких поверхонь. Не містить фенолів, поверхнево-активних речовин, альдегідів і спиртів. У Державному реєстрі дезінфекційних засобів зареєстрований під номером №75. Шляхом протирання, зрошення або обприскування робочим розчином цього засобу проводиться дезінфекція поверхонь. Склад: перекис водню 50%, фосфорна кислота, нітрат срібла 0,08% [31].

Фамідез Саноксіл 100 – препарат високоефективний проти бактерій (включно з туберкульозом), вірусів (збудників вірусних гепатитів і СНІДу), спор, та грибків (грибів роду *Candida*). Потрапляння в очі та на шкіру слід уникати. Засіб є сильним окислювачем. Від органічних речовин (наприклад, вати, олії, мастила та жиру) тримайте подалі. З цим засобом слід працювати лише в захисних рукавичках [32].

4.4. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища

Розробляється оптимально підібране поживне середовище для кожного продуцента антибіотику, яке повинне відповідати таким вимогам:

- мати гарну фільтруючу здатність;
- складатися з відносно дешевих компонентів;
- сприяти максимальному утворенню антибіотику;
- забезпечити використання найбільш економічних методів виділення й очищення.

Асептичні умови культивування продуцента антибіотика обов'язкові.

Поживні середовища стерилізуються за використання:

- безперервної стерилізації – здебільшого для великих обсягів поживного середовища;
- періодичної стерилізації – для невеликих обсягів;
- роздільної стерилізації – для компонентів різних груп, зважаючи на їх характеристику та стан [33].

Підготовка посівного матеріалу – один із найважливіших етапів. Біосинтез антибіотика як і розвиток культури у ферментері, залежать від якості та кількості інокуляту. Багатоступеневий процес культивування продуцентів антибіотиків зазвичай проходить у багатих поживних середовищах[34].

Посівне середовище засівають культурою штаму *Streptomyces kanamyceticus 1-91*, до складу якого входить: крохмаль 2,0, кукурудзяний екстракт (технічна маса) 0,5, сірчано-кислий амоній 0,3, хлористий натрій 0,25, крейда 0,3, соєве борошно 2,0.

При температурі 27 ± 1 °C вирощують на круговій качалці протягом 48 годин. Посівним матеріалом який отримано у кількості 10% засівають поживне середовище, склад якого представлено в Таблиці 4.1 [14].

Таблиці 4.1.

Склад поживного середовища г/л для ферментації *Streptomyces kanamyceticus 1-91*

Компонент поживного середовища	Кількість, г/л
кукурудзяне борошно	8,5
кукурудзяний екстракт(технічна маса)	0,3
сірчаноокислий амоній	0,9
крейда	0,8
соєве борошно	2,0
сірчаноокислий цинк	0,009
сірчаноокисле залізо	0,005
жир	1,17

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

Щоб одержати необхідну кількість посівного матеріалу потрібно приготувати 0,63 л поживного середовища (ПС) у 5 качалочних колбах об'ємом по 750 мл. В автоклаві простерелізувати дану кількість ПС. Після аналізу складу ПС для вирощування бактеріального штаму *Streptomyces kanamyceticus 1-91*, ділимо умовно його на такі композиції (залежно від режиму стерилізації компонентів):

Композиція А: кукурудзяне борошно, соєве борошно (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв).

Композиція Б: кукурудзяний екстракт (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв).

Композиція В: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, CaCO_3 (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

Композиція Г: жир (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв).

Окремо готують запасний розчин сульфатів цинку і заліза, що стерилізують в автоклаві при 131 °С упродовж 40 хв.

4.4.2. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 30 л

Для одержання посівного матеріалу необхідно 13,58 л середовища, тому стерилізація композиції В буде здійснюватися безпосередньо в інокуляторі:

Композиція А: кукурудзяне борошно, соєве борошно (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв).

Композиція Б: кукурудзяний екстракт (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв).

Композиція В: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, CaCO_3 , ZnSO_4 , FeSO_4 (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

Композиція Г: жир (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв).

4.4.3. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 300 л

Для отримання посівного матеріалу необхідно 134 л середовища, тому стерилізація композиції В буде здійснюватися в інокуляторі:

Композиція А: кукурудзяне борошно, соєве борошно (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв).

Композиція Б: кукурудзяний екстракт (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв).

Композиція В: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, CaCO_3 , ZnSO_4 , FeSO_4 (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

Композиція Г: жир (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв).

4.4.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 3 м³

На даній стадії для одержання посівного матеріалу необхідно 1,214 м³ середовища, тому стерилізація композиції В буде здійснюватися в самому ферментері, що потребує перескладання композицій поживного середовища:

Композиція А: кукурудзяне борошно, соєве борошно (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв).

Композиція Б: кукурудзяний екстракт (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв).

Композиція В: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, CaCO_3 , ZnSO_4 , FeSO_4 (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

Композиція Г: жир (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв).

Отже, технологічна схема, окрім стадій підготовки поживного середовища, включає такі стадії допоміжних робіт:

- підготовка стерильного аераційного повітря та очистка відпрацьованого;
- приготування і стерилізація запасного розчину сульфатів цинку і заліза для вирощування посівного матеріалу у колбах на качалці.

Окрім основних реакторів для розчинення композицій солей, також необхідно передбачити такі реактори:

- ✓ У цеху підготовки посівного матеріалу:
 - для приготування і стерилізації композиції А: 5 і 63 л;
 - для приготування і стерилізації композиції Б: 5 і 63 л;
 - для приготування композиції В: 5 і 40 л;
 - для приготування і стерилізації композиції Г: 5 і 25 л.
- ✓ У цеху виробничого біосинтезу:
 - для приготування і стерилізації композиції А: 630 л;
 - для приготування і стерилізації композиції Б: 630 л;
 - для приготування композиції В: 400 л;
 - для приготування і стерилізації композиції Г: 250 л.

Проводять ферментацію у ферментері об'ємом 3 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,6, при температурі 27 ±1 °С протягом 120-144 годин. В кінці процесу визначають концентрацію канаміцину, яка має складати 6500 од/мл [14].

РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання, зображеного на апаратурній схемі (див. графічна частина), наведена в табл. 5.1.

Таблиця 5.1

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біо-синтезу канаміцину

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
ПЗ-1	Повітрозабірник	1	Повітрозбірник 50 л («Компресормаш-Сервіс»). Температура повітря до 100 °С; тиск до 12 бар; матеріал: сталь [35].
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Повітряний фільтр ФВКАС-6 («Єврофільтр»). Фільтрувальний матеріал: пенополіуретан; продуктивність: 3400 м ³ /год; Е=90%; габаритні розміри, мм: 592x592x48 [36].
К-3	Компресор	1	Компресор ВК50Р-7,5 з прямим приводом. Виробник: «Remeza». Максимальний робочий тиск 8 бар; потужність, кВт: 30-90 [37].
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Осушувач ДК 130, продуктивність 18,33 м ³ /хв, робочий тиск 7 бар, 948*728*1370 мм, потужність приводу – 1,81 кВт [38].
Р-5	Ресивер	1	Ресивер 500 л («ПневмоТехніка»). Об'єм, л: 500; максимальний тиск: 11,5 бар; габаритні розміри, мм: 2110x600 [39].
Т-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Теплообмінник типу «труба в трубі». Виробник: «Єврохіммаш». Максимальний робочий тиск 0,6 МПа (6 бар), робоча температура 150 °С [40]

НУХТ БТЕК 05.01.03 КР ПЗ				
Змн.	Арк.	№ документа	Підпис	Дата
Розробив		Сокирко Н.О.		
Керівник		Сулейко Т.Л.		
Консульт.				
Н.контр.				
Зав. каф.		Стабніков		
РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання				
		Літера	Арк.	Аркушів
			42	95
		43 Кафедра БТМ		

Продовження таблиці 5.1

Ф-7	Головний фільтр очистки	1	Фільтр тонкої очистки повітря НЕРА («Вент-Фільтр»). Площа фільтроматеріалу: 21 м ² . Продуктивність: 2400 м ³ /год. Фільтрувальний матеріал: мікроскловолокно; E>95% [41].
ІФ-8, ІФ-23, ІФ-40	Індивідуальний фільтр	3	Фільтр повітряний <i>SPF-005</i> . Фільтруючий матеріал – боросилікатне волокно, діапазон температур 1,5-150 °С, потужність 75 Нм ³ /год, ступінь очищення повітря фільтром становить 99,999 % [42].
РЗ-9	Реактор-змішувач для приготування і стерилізації кукурудзяного і соєвого борошна	1	Реактор A2000 series об'ємом 5 л «Amar Equipments» (Індія). Оснащений сорочкою, турбінною мішалкою: 100-1450 об/хв; макс. температура – 300 °С; габаритні розміри, мм (із контрольною панеллю): 410 x 1100 [43].
РЗ-10	Реактор-змішувач для приготування і стерилізації кукурудзяного екстракту	1	Реактор A2000 series об'ємом 5 л «Amar Equipments» (Індія). Оснащений сорочкою, турбінною мішалкою: 100-1450 об/хв; макс. температура – 300 °С; габаритні розміри, мм (із контрольною панеллю): 410 x 1100 [43].
РЗ-11	Реактор-змішувач для приготування композиції В	1	Реактор A2000 series об'ємом 5 л «Amar Equipments» (Індія). Оснащений сорочкою, турбінною мішалкою: 100-1450 об/хв; макс. температура – 300 °С; габаритні розміри, мм (із контрольною панеллю): 410 x 1100 [43].
РЗ-12	Реактор-змішувач для приготування і стерилізації композиції Г	1	Реактор A2000 series об'ємом 5 л «Amar Equipments» (Індія). Оснащений сорочкою, турбінною мішалкою: 100-1450 об/хв; макс. температура – 300 °С; габаритні розміри, мм (із контрольною панеллю): 410 x 1100 [43].
І-13	Інокулятор	1	Інокулятор Biostat® Cplus об'ємом 30 л. Виробник: «Sartorius». Матеріал: нержавіюча сталь AISI 304; оснащений барботером, сорочкою, датчиком рН, рО ₂ , температури; пробовідбірником, манометром; турбінною мішалкою: 200 об/хв; максимальний допустимий тиск: 6 бар; габаритні розміри, мм: 750 x 1000 x 1900 [44].
Д-14, Д-25, Д-32, Д-36	Ваговий дозатор	4	Дозатор ваговий HUALIAN NPF-3000 (Китай). Межі дозування: 10 – 3000 г. Похибка дозування: ±2 %. Потужність: 200 Вт. Матеріал корпусу: нержавіюча сталь 201 [45].

Продовження таблиці 5.1

Д-15, Д-17, Д-19, Д-21, Д-26, Д-29, Д-33, Д-37,	Об'ємний дозатор для води	8	Дозатор води та рідин. Об'єм дозуючої води: 0,01 – 9999л; робочий тиск: 0,5 атм – 10 атм; робоча напруга: 220 В [46].
РЗ-16	Реактор-змішувач для приготування і стерилізації кукурудзяного і соєвого борошна	1	Реактор-змішувач об'ємом СЕон 63 л. Виробник «Єврохіммаш». Оснащений сорочкою, лопатевою мішалкою: 100 об/хв; потужність двигуна, кВт: 0,75; макс. температура: 250 °С; габаритні розміри, мм: 1000 x 930 x 2800 [47].
РЗ-18	Реактор-змішувач для приготування і стерилізації кукурудзяного екстракту	1	Реактор-змішувач об'ємом СЕон 63 л (виробник «Єврохіммаш»). Оснащений сорочкою, лопатевою мішалкою: 100 об/хв; потужність двигуна, кВт: 0,75; макс. температура: 250 °С; габаритні розміри, мм: 1000 x 930 x 2800 [47].
РЗ-20	Реактор-змішувач для приготування композиції В	1	Реактор-змішувач об'ємом СЕон 40 л. Виробник «Єврохіммаш». Оснащений сорочкою, лопатевою мішалкою: 100 об/хв; потужність двигуна, кВт: 0,75; макс. температура: 250 °С; габаритні розміри, мм: 600 x 500 x 680 [47].
РЗ-22	Реактор-змішувач для приготування і стерилізації композиції Г	1	Реактор-змішувач об'ємом СЕон 25 л. Виробник «Єврохіммаш». Оснащений сорочкою, лопатевою мішалкою: 100 об/хв; потужність двигуна, кВт: 0,75; макс. температура: 250 °С; габаритні розміри, мм: 520 x 450 x 600 [47].
І-24	Інокулятор	1	Інокулятор об'ємом 300 л («НуPerforma»). Матеріал: нержавіюча сталь 304; оснащений барботером, сорочкою, датчиком рН, рО ₂ , температури; пробовідбірником, манометром; турбінною мішалкою: 35-375 об/хв; напруга: 240В; габаритні розміри, мм: 1608 x 1367 x 2810 [48].
РЗ-27	Реактор-змішувач для приготування і стерилізації кукурудзяного і соєвого борошна	1	Реактор-змішувач об'ємом СЕон 630 л. Виробник «Єврохіммаш». Оснащений сорочкою, лопатевою мішалкою: 100 об/хв; потужність двигуна, кВт: 1,5; макс. температура: 250 °С; габаритні розміри, мм: 1380 x 1380 x 2770 [47].

Закінчення таблиці 5.1

Н-28	Насос перистальтичний для перекачування композиції А від РЗ-27 до ФР-41	1	Насос перистальтичний 203КА/ZL («PR Pump China»). Продуктивність: 900 мл/хв – 54 л/год. Напруга: 24 В [49].
РЗ-30	Реактор-змішувач для приготування і стерилізації кукурудзяного екстракту	1	Реактор-змішувач об'ємом СЕон 630 л (виробник «Єврохіммаш»). Оснащений сорочкою, лопатевою мішалкою: 100 об/хв; потужність двигуна, кВт: 1,5; макс. температура: 250 °С; габаритні розміри, мм: 1380 x 1380 x 2770 [47].
Н-31	Насос перистальтичний для перекачування композиції Б від РЗ-30 до ФР-41	1	Насос перистальтичний 203КА/ZL («PR Pump China»). Продуктивність: 900 мл/хв – 54 л/год. Напруга: 24 В [49].
РЗ-34	Реактор-змішувач для приготування композиції В	1	Реактор-змішувач об'ємом СЕон 400 л. Виробник «Єврохіммаш». Оснащений сорочкою, лопатевою мішалкою: 100 об/хв; потужність двигуна, кВт: 0,75; макс. температура: 250 °С; габаритні розміри, мм: 1380 x 1380 x 2530 [47].
Н-35	Насос відцентровий для перекачування композиції В від РЗ-34 до ФР-41	1	Насос відцентровий Wetron (Китай). Продуктивність: до 200 л/хв. Потужність: 0,75 кВт. Матеріал корпусу: чавун [50].
РЗ-38	Реактор-змішувач для приготування і стерилізації композиції Г	1	Реактор-змішувач об'ємом СЕон 250 л. Виробник «Єврохіммаш». Оснащений сорочкою, лопатевою мішалкою: 100 об/хв; потужність двигуна, кВт: 0,75; макс. температура: 250 °С; габаритні розміри, мм: 1140 x 1030 x 3000 [47].
Н-39	Насос перистальтичний для перекачування композиції Г від РЗ-38 до ФР-41	1	Насос перистальтичний 203КА/ZL («PR Pump China»). Продуктивність: 900 мл/хв – 54 л/год. Напруга: 24 В [49].
ФР-41	Ферментер	1	Ферментер Ruian Global Machinery Co. об'ємом 3 м ³ . Виробник: Китай. Матеріал: нержавіюча сталь 316L; оснащений барботером, сорочкою, датчиком рН, рО ₂ , температури; пробовідбірником, манометром; турбінною мішалкою: 160 об/хв; внутрішній тиск: 0,2 МПа; тиск сорочки: 0,3 МПа; габаритні розміри, мм: 1300 x 4300[51].
Н-42	Насос відцентровий для перекачування культуральної рідини від ФР-41 у збірник	1	Насос відцентровий Wetron (Китай). Продуктивність: до 200 л/хв. Потужність: 0,75 кВт. Матеріал корпусу: чавун [50].

РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

До технологічної схеми біосинтезу канаміцину *S. kanamyceticus* 1-91 входять допоміжні робіоти та основний технологічний процес. До етапів допоміжних робіт (ДР) відносять: підготовка і стерилізація поживних середовищ, підготовка стерильного аераційного повітря, приготування і стерилізації запасного розчину сульфатів. До стадій основного технологічного процесу (ТП) відносять: сам виробничий біосинтез та підготовку посівного матеріалу.

Технологічну та апаратурну схеми біосинтезу канаміцину наведено у графічній частині проекту.

ДР 1. Підготовка аераційного повітря

ДР 1.1 Забір атмосферного повітря

Атмосферне повітря забирають через повітрозабірник у найвищій точці де розміщується обладнання для стиснення та очищення повітря – на висоті 10 м (висота поверху – 6 м, кількість поверхів – 1, косий дах будівлі (~1,5 м), + 2-3 метри),.

ДР 1.2. Груба очистка повітря

Обов'язкову операцію з очищення повітря від пилу та механічних часток здійснюють у фільтрі, з затримуючою здатністю 80%.

ДР 1.3. Компресування повітря

До тиску близько 0,4 МПа повітря стискають в компресорі. На цьому етапі передбачається підвищенням температури повітря, тому надалі ми маємо його охолодити.

					НУХТ БТЕК 05.01.03 КР ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розробив</i>		<i>Сокирко Н.О.</i>			<i>РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми</i>	<i>Літера</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Керівник</i>		<i>Сулейко Т.Л.</i>					46	95 47
<i>Консульт.</i>						Кафедра БТМ		
<i>Н. контр.</i>								
<i>Зав. каф.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						

ДР 1.4. Охолодження повітря та зменшення надлишкової вологості.

Повітря різко охолоджують до 19 °С у теплообміннику для мінімізації контамінації. Після чого одержана волога в ресивері зріджується, після чого кінцева вологість становить близько 60 %.

ДР 1.5. Нагрівання повітря

На волокнах головного та індивідуальних фільтрів, охолоджене повітря у теплообміннику нагрівають до температури 30 °С з метою запобігання утворення конденсату пари.

ДР 1.6. Очищення повітря в головному фільтрі

Ступінь очищення повітря збільшується до $E = 95$ %, коли нагріте повітря пропускають через головний фільтр.

ДР 1.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Ступінь очищення індивідуальних фільтрів (ІФ-8, ІФ-23, ІФ-40) які встановлюють перед посівними апаратами та ферментером, становить $E = 99,99998$ %.

ДР 2. Приготування і стерилізація запасного розчину сульфатів цинку та заліза для вирощування посівного матеріалу у колбах на качалках

ДР 2.1 Приготування і стерилізація запасного розчину сульфатів цинку та заліза для вирощування посівного матеріалу у колбах на качалках.

Зважують на технічних терезах 0,9 г $ZnSO_4$ і 0,5 г $FeSO_4$. Поміщають наважки у колбу об'ємом 250 мл, додають відміряну мірним циліндром дистильовану воду – 100 мл, перемішують, закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 3. Приготування і стерилізація поживних середовищ

ДР 3.1. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках.

На даній стадії для вирощування інокуляту необхідно підготувати 630 мл поживного середовища (70 мл разом з інокулятом, що становить 10 % від загального об'єму). Вміст та кількість компонентів вказано в табл. 6.1.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 630 мл середовища

Компонент ПС	Концентрація, г/л	Вміст компоненту в 630 мл ПС, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
Кукурудзяне борошно	8,5	5,35	А	300
Соеве борошно	2	1,26		
Вода		300 мл		
Кукурудзяний екстракт	0,3	0,19	Б	100
Вода		100 мл		
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,9	0,57	В	100
CaCO ₃	0,8	0,5		
Вода		100 мл		
Жир	1,17	0,74	Г	130
Вода		130 мл		

ДР 3.1.1. Приготування композиції А

Зважують на технічних вагах 5,35 г кукурудзяного і 1,26 г соєвого борошна. Наважки переносять в колбу об'ємом 500 мл, додають 300 мл питної холодної води, перемішують. Далі шляхом витримування суміші на водяній бані за 70-90 °С протягом 30 хв здійснюють заварювання.

ДР 3.1.2. Стерилізація композиції А

Вміст (від ДР 3.1.1) охолоджують, потім закривають колбу марлевым корком і стерилізують в автоклаві за температури 112 °С (30 хв).

ДР 3.1.3. Приготування і стерилізація композиції Б

Зважують на технічних терезах 0,875 г кукурудзяного екстракту. Поміщають наважку у колбу об'ємом 250 мл, доливають дистильовану воду (100 мл), перемішують, закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при 112 °С (0,05 МПа) протягом 30 хв.

ДР 3.1.4. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних терезах зважують 0,57 г (NH₄)₂SO₄, 0,5 г CaCO₃. Поміщають наважки у колбу об'ємом 250 мл, додають дистильовану воду (0,1 л), пе-

ремішують, закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 3.1.5. Приготування і стерилізація композиції Г

Зважують на технічних терезах 0,74 г жиру. Поміщають наважку у колбу об'ємом 250 мл, доливають дистильовану воду (130 мл), перемішують, закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при 112 °С (0,05 МПа) протягом 30 хв.

ДР 3.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту у посівному апараті об'ємом 30 л.

На даній стадії для вирощування інокуляту необхідно підготувати 13,58 л поживного середовища (1,509 л разом з інокулятом, що становить 10 % від загального об'єму). Вміст та кількість компонентів вказано в табл. 6.2.

Таблиця 6.2

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 13,58 л середовища

Компонент ПС	Концентрація, г/л	Вміст компоненту в 13,58 л ПС, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
Кукурудзяне борошно	8,5	115,43	А	4000
Соєве борошно	2	27,2		
Вода		3620 мл		
Конденсат		380 мл		
Кукурудзяний екстракт	0,3	4,074	Б	4000
Вода		3620 мл		
Конденсат		380 мл		
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,9	12,2	В	3000
CaCO ₃	0,8	10,86		
ZnSO ₄	0,009	0,12		
FeSO ₄	0,005	0,068		
Вода		2715 мл		
Конденсат		285 мл		
Жир	1,17	15,88	Г	2580
Вода		2335 мл		
Конденсат		245мл		

ДР 3.2.1. Приготування композиції А

Зважують на технічних вагах 115,43 г кукурудзяного і 27,2 г соєвого борошна. У реактор-змішувач переносять наважки об'ємом 5 л (РЗ-9), додають 3620 мл питної холодної води, перемішують. Далі шляхом витримування суміші на водяній бані за 70-90 °С протягом 30 хв здійснюють заварювання. Отриману суспензію стерилізують гострою парою за температури 112 °С (30 хв).

ДР 3.2.2. Приготування і стерилізація композиції Б

Зважують на технічних терезах 4,074 г кукурудзяного екстракту. Поміщають у реактор-змішувач наважку об'ємом 5 л (РЗ-10), доливають питну воду (3620 мл) і стерилізують при 112 °С (0,05 МПа) протягом 30 хв.

ДР 3.2.3. Приготування і стерилізація композиції В

Зважують на технічних терезах 12,2 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10,86 г CaCO_3 , 0,12 г ZnSO_4 , 0,068 г FeSO_4 . Поміщають наважки у реактор-змішувач об'ємом 5 л (РЗ-11), доливають питну воду (2715 мл). У сорочку реактора подають пару, щоб досягти температури у реакторі на рівні 40°C для кращого розчинення компонентів. Розчин який отримано подають самоплином в інокулятор (І-13) об'ємом 30 л, попередньо простерилізований і стерилізують при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 3.2.4. Приготування і стерилізація композиції Г

Зважують на технічних терезах 15,88 г жиру. Поміщають наважку у реактор-змішувач об'ємом 5 л (РЗ-12), доливають питну воду (2335 мл) і стерилізують при 112 °С (0,05 МПа) протягом 30 хв.

ДР 3.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту у посівному апараті об'ємом 300 л.

На даній стадії необхідно для вирощування інокуляту підготувати 134 л поживного середовища (15 л разом з інокулятом, що становить 10 % від загального об'єму). Вміст та кількість компонентів вказано в табл. 6.3.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 134 л середовища

Компонент ПС	Концентрація, г/л	Вміст компоненту в 134 л ПС, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Кукурудзяне борошно	8,5	1139	А	40
Соеве борошно	2	268		
Вода		36,2 л		
Конденсат		3,8 л		
Кукурудзяний екстракт	0,3	40,2	Б	40
Вода		36,2 л		
Конденсат		3,8 л		
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,9	120,6	В	30
CaCO ₃	0,8	107,2		
ZnSO ₄	0,009	1,21		
FeSO ₄	0,005	0,67		
Вода		27,15 л		
Конденсат		2,85 л		
Жир	1,17	156,8		
Вода		21,72 л	Г	24
Конденсат		2,28 л		

ДР 3.3.1. Приготування композиції А

Зважують на ваговому дозаторі (Д-14) 1,139 кг кукурудзяного і 268 г соєвого борошна. Наважки переносять у реактор-змішувач об'ємом 63 л (РЗ-16), через об'ємний дозатор (Д-15) додають 36,2 л питної холодної води, перемішують. Далі шляхом витримування суміші на водяній бані за 70-90 °С протягом 30 хв здійснюють заварювання. Отриману суспензію стерилізують гострою парою за температури 112 °С (30 хв).

ДР 3.3.2. Приготування і стерилізація композиції Б

Зважують на технічних терезах 40,2 г кукурудзяного екстракту. Поміщають наважку у реактор-змішувач об'ємом 63 л (РЗ-18), додають через об'ємний дозатор (Д-17) питну воду (36,2 л) і стерилізують при 112 °С (0,05 МПа) протягом 30 хв.

ДР 3.3.3. Приготування і стерилізація композиції В

Зважують на технічних терезах 120,6 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 107,2 г CaCO_3 , 1,21 г ZnSO_4 , 0,67 г FeSO_4 . Поміщають наважки у реактор-змішувач об'ємом 40 л (РЗ-20), через об'ємний дозатор (Д-19) додають питну воду (27,15 л). У сорочку реактора подають пару для кращого розчинення компонентів, щоб досягти температури у реакторі на рівні 40°C. Подають отриманий розчин самоплином в інокулятор (І-24) об'ємом 300 л і стерилізують при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 3.3.4. Приготування і стерилізація композиції Г

Зважують на технічних терезах 156,8 г жиру. Поміщають наважку у реактор-змішувач об'ємом 25 л (РЗ-22), додають через об'ємний дозатор (Д-21) питну воду (21,72 л) і стерилізують при 112 °С (0,05 МПа) протягом 30 хв.

ДР 3.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 3 м³.

На даній стадії необхідно для вирощування інокуляту підготувати 1,314 м³ поживного середовища (146 л разом з інокулятом, що становить 10 % від загального об'єму). Вміст та кількість компонентів вказано в табл. 6.4.

Таблиця 6.4

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 1,314 м³ середовища

Компонент ПС	Концентрація, г/л	Вміст компоненту в 1,34 м ³ ПС, кг	Композиція	Об'єм композиції, л
Кукурудзяне борошно	8,5	11,39	А	400
Соєве борошно	2	2,68		
Вода		362 л		
Конденсат		38 л		
Кукурудзяний екстракт	0,3	0,402	Б	400
Вода		362 л		
Конденсат		38 л		
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,9	1,206	В	300
CaCO_3	0,8	1,072		
ZnSO_4	0,009	0,121		

FeSO ₄	0,005	0,0067		
Вода		271,5 л		
Конденсат		28,5 л		
Жир	1,17	1,57	Г	214
Вода		194 л		
Конденсат		20 л		

ДР 3.4.1. Приготування композиції А

Зважують на ваговому дозаторі (Д-25) 11,39 кг кукурудзяного і 2,68 кг соєвого борошна. Наважки переносять у реактор-змішувач об'ємом 630 л (РЗ-27), додають через об'ємний дозатор (Д-26) 362 л питної холодної води, перемішують. Далі шляхом витримування суміші на водяній бані за 70-90 °С протягом 30 хв здійснюють заварювання. Отриману суспензію стерилізують гострою парою за температури 112 °С (30 хв).

ДР 3.4.2. Приготування і стерилізація композиції Б

Зважують на технічних терезах 402 г кукурудзяного екстракту. Поміщають наважку у реактор-змішувач об'ємом 630 л (РЗ-30), додають через об'ємний дозатор (Д-29) питну воду (362 л) і стерилізують при 112 °С (0,05 МПа) протягом 30 хв.

ДР 3.4.3. Приготування і стерилізація композиції В

Зважують на ваговому дозаторі (Д-32) 1,206 кг (NH₄)₂SO₄, 1,072 кг CaCO₃, а на технічних терезах 121 г ZnSO₄, 6,7 г FeSO₄. Поміщають наважки у реактор-змішувач об'ємом 400 л (РЗ-34), додають через об'ємний дозатор (Д-33) питну воду (271,5 л). У сорочку реактора подають пару для кращого розчинення компонентів, щоб досягти температури у реакторі на рівні 40°С. Подають отриманий розчин у ферментер (ФР-41) об'ємом 3000 л за допомогою відцентрового насоса (Н-35) і стерилізують при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 3.4.4. Приготування і стерилізація композиції Г

Зважують на ваговому дозаторі (Д-36) 1,57 кг жиру. Поміщають наважку у реактор-змішувач об'ємом 250 л (РЗ-38), додають через об'ємний доза-

тор (Д-37) питну воду (194 л) і стерилізують при 112 °С (0,05 МПа) протягом 30 хв.

ТП 4. Підготовка посівного матеріалу

ТП 4.1. Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру *Streptomyces kanamyceticus 1-91* яку було отримано зберігають у пробірці на скошеному щільному агаризованому середовищі (вівсяний агар). Проводять 1 – 2 рази на місяць пересіви на свіже поживне середовище. Усі роботи із колекційною культурою проводять із дотриманням правил асептики.

ТП 4.2. Одержання робочої культури

Для одержання ізольованих колоній колекційну культуру *Streptomyces kanamyceticus 1-91* розсівають на чашки Петрі із вівсяним агаром. При температурі 28 °С у термостаті вирощують 24 год.

ТП 4.3. Вирощування інокуляту у пробірках на агаризованих середовищах

Із чашок Петрі отримані ізольовані колонії *Streptomyces kanamyceticus 1- 91* (від ТП 4.2) у пробірки зі скошеним вівсяним агаром (одна ізольована колонія використовується для засіву однієї пробірки) пересівають петлею. У пробірки пересівають ізольовані колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см. Вирощування триває 24 години за температура 28 °С. Для проведення мікробіологічного контролю кожні 4 год із пробірок відбирають проби.

ТП 4.4. Вирощування інокуляту в колбах на качалках

У колбу об'ємом 1 л в асептичних умовах вносять стерильну композицію А (від ДР 3.1.2) вносять композицію Б простерилізовану (від ДР 3.1.3), вносять композицію В стерильну (від ДР 3.1.4), вносять композицію Г простерилізовану (від ДР 3.1.5) додають запасний розчин 1 мл (від ДР 2.1), перемішують і розливають 140 мл у 5 стерильних качалочних колб об'ємом 750 мл.

З робочою культурою *Streptomyces kanamyceticus* 1-91 (від ТП 4.3) у пробірку вносять 5 мл фізіологічного розчину, клітини суспендують, відбирають отриману суспензію бактерій стерильною піпеткою і вносять у качалочні колби із поживним середовищем. Бактеріальну суспензію, одержану з 1 пробірки використовують для засіву 1 колби.

Культивують на качалках (220 об/хв) при температурі 28°C та рН 6,8 – 7,0 упродовж 48 год, після чого визначають концентрацію біомаси, яка повинна становити 1,8 – 2,0 г/л, і здійснюють мікробіологічний контроль. Після проведення мікробіологічного контролю культуральну рідину зливають у засівну колбу об'ємом 1 л.

ТП.4.5. Вирощування інокуляту у посівному апараті об'ємом 30 л

У посівний апарат (І-13) із простерилізованою композицією В (від ДР 3.2.3) від РЗ-9 подають самоплином композицію А стерильну (від ДР 3.2.1), від РЗ-10 стерильну композицію Б (від ДР 3.2.2), від РЗ-12 простерилізовану композицію Г (від ДР 3.2.4) і вмикають перемішувач. Посівний матеріал (від ТП 4.4) вносять через засівну колбу. Культивують при температурі 28°C та концентрації розчиненого кисню ($pO_2 = 20 - 30\%$ від насичення повітря) і рН 6,8 – 7,0 і упродовж 24 год. Регулюванням швидкості перемішування і рівня аерації (витрати стерильного аераційного повітря) здійснюють підтримання pO_2 на заданому рівні.

З інокулятора кожні 4 год відбирають проби культуральної рідини для визначення концентрації біомаси, яка повинна становити 1,8 – 2,0 г/л та проведення мікробіологічного контролю.

ТП.4.6. Вирощування інокуляту у посівному апараті об'ємом 300 л

У посівний апарат (І-24) із простерилізованою композицією В (від ДР 3.3.3) від РЗ-16 подають самоплином композицію А стерильну (від ДР 3.3.1), від РЗ-18 стерильну композицію Б (від ДР 3.3.2), від РЗ-22 простерилізовану композицію Г (від ДР 3.3.4) і вмикають перемішувач. Вносять посівний матеріал (від ТП 4.5) через засівну колбу. Культивують при темпера-

турі 28°C та концентрації розчиненого кисню ($pO_2 = 20 - 30 \%$ від насичення повітря) і рН 6,8 – 7,0 упродовж 24 год. Регулюванням швидкості перемішування і рівня аерації (витрати стерильного аераційного повітря) здійснюють на заданому рівні підтримання pO_2 .

З інокулятора кожні 4 год відбирають проби культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси, яка повинна становити 1,8 – 2,0 г/л.

ТП 5. Виробничий біосинтез

ТП 5.1. Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 3 м³

У ферментер (ФР-41) із простерилізованою композицією В (від ДР 3.4.3) від РЗ-27 перистальтичним насосом (Н-28) перекачують стерильну композицію А (від ДР 3.4.1), від РЗ-30 перистальтичним насосом (Н-31) перекачують стерильну композицію Б (від ДР 3.4.2), від РЗ-38 перистальтичним насосом (Н-39) перекачують простерилізовану композицію Г (від ДР 3.4.4) і вмикають перемішувач. Вносять посівний матеріал (від ТП 4.6) через засівну колбу. Культивують при температурі 28°C та концентрації розчиненого кисню ($pO_2 = 20 - 30 \%$ від насичення повітря) і рН 6,8 – 7,0 упродовж 48 год. Регулюванням швидкості перемішування і рівня аерації (витрати стерильного аераційного повітря) здійснюють підтримання pO_2 на заданому рівні.

Із ферментера кожні 4 год відбирають проби культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю, визначення концентрації біомаси (3,6 – 4,0 г/л) та активності канаміцину (6500 Од/мл).

Культуральну рідину перекачують відцентровим насосом (Н-42) у цех виділення цільового продукту після закінчення процесу біосинтезу.

РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

7.1. Карта постадійного контролю доферментаційних процесів

Таблиця 7.1

Карта постадійного контролю біосинтезу канаміцину

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та відбору проб	Нормативні значення показника
1	2	3	4	5
Кт 1.1 Забір атмосферного повітря	Повітрозабірник Висота забору повітря	-	Під час купівлі та при встановленні	H = 10 м
Кт 1.2 Очистка від грубих домішок	Очищене повітря Ступінь очистки, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно з паспортом фільтра	Після проходження через фільтр грубої очистки	E = 90%
Кт 1.3 Стиснення повітря	Стиснене повітря Тиск, температура	Манометр, термометр	Після компресування	P = 0,35-0,5 МПа, t = 120-250°C
Кт 1.4 Охолодження і видалення зайвої вологи	Охолоджене повітря Температура, вологовміст	Термометр, психрометр	Після охолодження і видалення вологи	t = 25-35°C, W = 60%
Кт 1.4 Охолодження і видалення зайвої вологи	Охолоджене повітря Температура, вологовміст	Термометр, психрометр	Після охолодження і видалення вологи	t = 25-35°C, W = 60%
Кт 1.5 Нагрівання повітря	Нагріте повітря Температура, вологовміст	Термометр, психрометр	Після нагрівання	t = 40-50°C, W = 50%
Кт 1.6 Очищення у головному фільтрі	Очищене повітря Ступінь очистки, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно з паспортом фільтра	Після проходження через головний фільтр	E = 95%

					НУХТ БТЕК 05.01.03 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ документа	Підпис	Дата				
Розробив	Сокирко Н.О.				РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва	Літера	Арк.	Аркушів
Керівник	Сулейко Т.Л.						57	95
Консульт.								58
Н. контр.						Кафедра БТМ		
Зав. каф.	Стабніков В.П.							

Продовження таблиці 7.1

Кт, Км 1.7 <i>Очищення в індивідуальному фільтрі</i>	Очищене повітря Ступінь очищення, мікробіологічна чистота	Перевірка ступеня очищення згідно з паспортом фільтра, мікробіологічний контроль	Після проходження через індивідуальний фільтр	$E = 99,999\%$, $KUO \leq 1$
Кт, Км 2.1 <i>Приготування і стерилізація запасного розчину сульфатів цинку та заліза</i>	Розчин сульфатів цинку та заліза Тиск, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тривалість і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P = 0,15$ МПа, $\tau = 40$ хв, відсутність мікробіоти
Кт 3.1.1 <i>Приготування і стерилізація поживного середовища для вирошування інокуляту у колбах на качалках</i> <i>Приготування композиції А</i>	Композиція А Температура, час	Термометр, годинник	Температура і час визначаються безперервно під час приготування	$t = 70-90$ °С, $\tau = 30$ хв
Кт, Км 3.1.2 <i>Стерилізація композиції А</i>	Композиція А Тиск, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тривалість, тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P = 0,05$ МПа, $\tau = 30$ хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.1.3 <i>Приготування і стерилізація композиції Б</i>	Композиція Б Тиск, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тривалість, тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P = 0,05$ МПа, $\tau = 30$ хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.1.4 <i>Приготування і стерилізація композиції В</i>	Композиція В Тиск, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тривалість і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P = 0,15$ МПа, $\tau = 40$ хв, відсутність мікробіоти

Продовження таблиці 7.1

<p>Кт, Км 3.1.5 <i>Приготування і стерилізація композиції Г</i></p>	<p>Композиція Г Тиск, час, стерильність</p>	<p>Манометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тривалість, тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>P = 0,05 МПа, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км, Кх 3.2.1, 3.3.1 <i>Приготування і стерилізація поживних середовищ для вирощування інкуляту у посівних апаратах об'ємами 30 і 300 л</i></p> <p><i>Приготування і стерилізація композиції А</i></p>	<p>Композиція А Тиск, температура, час, стерильність</p>	<p>Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тривалість, тиск, температура визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>P = 0,05 МПа, t = 112 °С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км, Кх 3.2.2, 3.3.2 <i>Приготування і стерилізація поживних середовищ для вирощування інкуляту у посівних апаратах об'ємами 30 і 300 л</i></p> <p><i>Приготування і стерилізація композиції Б</i></p>	<p>Композиція Б Тиск, температура, час, стерильність</p>	<p>Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тривалість, тиск, температура визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>P = 0,05 МПа, t = 112 °С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти</p>

Продовження таблиці 7.1

<p>Кт, Км, Кх 3.2.3, 3.3.3 <i>Приготування і стерилізація поживних середовищ для вирощування інокуляту у посівних апаратах об'ємами 30 і 300 л</i></p> <p><i>Приготування і стерилізація композиції В</i></p>	<p>Композиція В Тиск, температура, час, стерильність</p>	<p>Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тривалість, тиск, температура визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>P = 0,15 МПа, t = 131 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км, Кх 3.2.4, 3.3.4 <i>Приготування і стерилізація поживних середовищ для вирощування інокуляту у посівних апаратах об'ємами 30 і 300 л</i></p> <p><i>Приготування і стерилізація композиції Г</i></p>	<p>Композиція Г Тиск, температура, час, стерильність</p>	<p>Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тривалість, тиск, температура визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>P = 0,05 МПа, t = 112 °С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км, Кх 3.4.1 <i>Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту для виробничого біосинтезу у ферментері 3 м³</i></p> <p><i>Приготування і стерилізація композиції А</i></p>	<p>Композиція А Тиск, температура, час, стерильність</p>	<p>Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тривалість, тиск, температура визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>P = 0,05 МПа, t = 112 °С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти</p>

<p>Кт, Км, Кх 3.4.2 <i>Приготування і стерилізація поживного середовища для вирошування інокуляту для виробничого біосинтезу у ферментері 3 м³</i></p> <p><i>Приготування і стерилізація композиції Б</i></p>	<p>Композиція Б Тиск, температура, час, стерильність</p>	<p>Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тривалість, тиск, температура визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>P = 0,05 МПа, t = 112 °С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км, Кх 3.4.3 <i>Приготування і стерилізація поживного середовища для вирошування інокуляту для виробничого біосинтезу у ферментері 3 м³</i></p> <p><i>Приготування і стерилізація композиції В</i></p>	<p>Композиція В Тиск, температура, час, стерильність</p>	<p>Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тривалість, тиск, температура визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>P = 0,15 МПа, t = 131 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км, Кх 3.4.4 <i>Приготування і стерилізація поживного середовища для вирошування інокуляту для виробничого біосинтезу у ферментері 3 м³</i></p> <p><i>Приготування і стерилізація композиції Г</i></p>	<p>Композиція Г Тиск, температура, час, стерильність</p>	<p>Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тривалість, тиск, температура визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>P = 0,05 МПа, t = 112 °С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти</p>

Кт, Км 4.1 <i>Підтримання колекційної культури</i>	Колекційна культура <i>Streptomyces kanamyceticus</i> 1-91 температура, мікробіологічна чистота	Холодильник, мікробіологічний контроль	Температура – безперервно при зберіганні, мікробіологічний контроль – кожні 3-4 місяці	t = 2 – 4 °С, τ = 3 – 4 місяці, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 4.2 <i>Одержання робочої культури</i>	Робоча культура <i>Streptomyces kanamyceticus</i> 1-91 на чашках Петрі температура, мікробіологічна чистота	Термостат, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час вирощування, мікробіологічний контроль проводять після вирощування	t = 28 °С, τ = 48 год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 4.3 <i>Вирощування культури на щільному середовищі</i>	Робоча культура <i>Streptomyces kanamyceticus</i> 1-91 у пробірках температура, мікробіологічна чистота	Термостат, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час вирощування, мікробіологічний контроль проводять після вирощування	t = 25 °С, τ = 48 год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 4.4 <i>Вирощування культури у колбах на качалках</i>	Посівний матеріал температура, час, рН, швидкість перемішування, концентрація біомаси, мікробіологічна чистота	Термометр, годинник, тахометр, центрифуга, електронні ваги, мікробіологічний контроль	Температура, рН і частота обертів мішалки контролюються автоматично під час вирощування, визначення концентрації біомаси і мікробіологічний контроль проводять після вирощування	t = 28 °С, τ = 48 год, w = 220 об/хв, рН = 6,8-7,0 Сб = 1,8 – 2,0 г/л, відсутність сторонньої мікробіоти

<p>Кт, Км, Кх 4.5, 4.6</p> <p><i>Вирощування культури в інокуляторах об'ємом 30 л і 300 л</i></p>	<p>Посівний матеріал</p> <p>Температура, час, рН, концентрація розчиненого кисню, концентрація біомаси, мікробіологічна чистота</p>	<p>Датчик температури і рН, годинник, тахометр, датчик рО₂, ротаметр, центрифуга, електронні ваги, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура, рН, частота обертів мішалки і концентрація розчиненого кисню контролюються автоматично під час вирощування, визначення концентрації біомаси і мікробіологічний контроль – кожні 4 год і після культивування</p>	<p>t = 28 °С, τ = 24 год, рН = 6,8 – 7,0, рО₂ = 20 – 30%, w = 200 об/хв Сб = 1,8 – 2,0 г/л, відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p>Кт, Км, Кх 5.1</p> <p><i>Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 3 м³</i></p>	<p>Культуральна рідина</p> <p>Температура, час, рН, концентрація розчиненого кисню, концентрація біомаси, активність канаміцину, мікробіологічна чистота,</p>	<p>Датчик температури, годинник, тахометр, датчик рО₂, ротаметр, центрифуга, електронні ваги, спектрофотометр мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура, рН, частота обертів мішалки і концентрація розчиненого кисню контролюються автоматично під час вирощування, визначення концентрації біомаси, активності канаміцину і мікробіологічний контроль – кожні 4 год і після культивування</p>	<p>t = 28 °С, τ = 48 год, рН = 6,8 – 7,0, рО₂ = 20 – 30%, w = 200 об/хв Сб = 3,6 – 4,0 г/л, Ап = 6500 Од/мл, відсутність сторонньої мікробіоти</p>

7.2. Мікробіологічний контроль

Контроль чистоти культури

Культивування бактерій *Streptomyces kanamyceticus 1-91* з метою одержання антибіотику канаміцину проводиться в асептичних умовах, зважаючи на це – для того щоб впевнитись у відсутності контамінації необхідно проводити мікробіологічний контроль на усіх етапах. З інокуляторів і ферментера кожні 8 год відбирають зразки культуральної рідини для аналізу.

Здійснюється мікробіологічний контроль двома шляхами: прямий висів на агаризовані поживні середовища і мікроскопіювання.

Прямий висів здійснюється посівом культуральної рідини до ізолюваних колоній на чашки Петрі з м'ясо–пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій, та глюкозо–картопляним агаром (ГКА) або сусло–агаром (СА) – грибів та дріжджів.

Проводять мікроскопіювання на 1-2 добовій культурі у світловому мікроскопі з імерсійною системою. На чисте знежирене предметне скло, в асептичних умовах, за допомогою стерильної петлі наносять невелику краплину культуральної рідини для приготування препарату. Краплю, яка містить мікроорганізми, за допомогою бактеріальної петлі розподіляють по склу (діаметр мазка близько 1 см). При кімнатній температурі, без нагрівання мазок висушують, до випаровування вологи повністю. Після чого на абсолютно сухий препарат наносять 1–2 краплини імерсійного масла за допомогою скляної палички. Ватою, змоченою етиловим спиртом, знімають залишки масла з імерсійного об'єкта після роботи.

Клітини *Streptomyces kanamyceticus 1-91* під час мікроскопіювання можна побачити за відсутності у зразку сторонньої мікробіоти [52].

Утворюють розгалужений сильно міцелій, поперечних перегородок не має, він частково вростає в поживне середовище, утворює щільний субстратний міцелій, що важко відокремлюється бактеріологічною петлею. Повітряний міцелій утворюється над поверхнею субстрату. Є спорофори – особливі повітряні гіфи, від яких відшнуровуються спори, що слугує для поширення виду. Будова цих спорофор (прямі, спіральні, хвилясті, мутовчасті, зібрані в пучки тощо). у сухому стані спори можуть тривалий час зберігати життєздатність, чутливі до нагрівання [53].

Контроль стерильності поживного середовища

Для виявлення бактерій використовують МПА середовище. Для виявлення грибів як середовище використовують сусло-агар.

Випробування на стерильність поживних середовищ. При відповідних температурах, з відповідністю до мікроорганізмів зазначені

у Таблиці 7.2, 7.3, декілька контейнерів з поживним середовищем інкубують, рекомендовані мікроорганізми для тестування поживних середовищ на стерильність наведені в Таблиці 7.2, 7,3. Ріст мікроорганізмів Після закінчення періоду інкубації не має спостерігатися [54].

Таблиця 7.2

Рекомендовані мікроорганізми для тестування поживних середовищ на виявлення бактерій

Рекомендовані штами тест-мікроорганізмів	Умови інкубації (температура, °C; максимальна тривалість)
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538, CIP 4.83, NCTC 10788, NCIMB9518)	32.5+-2.5; три доби
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633, CIP 52.62. NCIMB8054)	32.5+-2.5; три доби
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 9027, CIP 82.118, NCIMB 8626)	32.5+-2.5; три доби
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	32.5+-2.5; три доби
<i>Clostridium sporogenes</i> (ATCC 19404, N 272, CIP 79.3)	32.5+-2.5; три доби

Таблиця 7.3

Рекомендовані мікроорганізми для тестування поживних середовищ на виявлення грибів

Рекомендовані штами тест-мікроорганізмів	Умови інкубації (температура, °C; максимальна тривалість)
<i>Candida albicans</i> (IP 48.72, ATCC 10231, ATCC 2091, IP 1180.79, NCTC 885-653)	22.5 +- 2.5; п'ять діб
<i>Aspergillus niger</i> (ATCC 16404)	22.5 +- 2.5; п'ять діб [29]

7.3. Показники росту і синтезу цільового продукту

7.3.1. Визначення концентрації біомаси

Оцінювали гравіметрично клітинну біомасу шляхом центрифугування культуральної рідини (3000×g, 10 хв), промивали двічі осад дистильованою водою та при 105 °C висушували до постійної ваги. Представляється показник біомаси як грам сухої клітинної маси (DCW) на літр бульйону (g DCW · L⁻¹) [55].

7.3.2. Визначення концентрації цільового продукту

Метод визначення кількості антибіотика

Шляхом аналізу розчину методом дифузії розраховується кількість антибіотика. За допомогою стандартної кривої розраховується біологічна активність антибіотика. Використовуються п'ять концентрацій стандартних препаратів для побудови стандартної кривої. Концентрація за якою вносять поправки до всіх інших концентрацій є контрольною.

Не повинні відрізнятися від контрольної концентрації більш ніж на 40% або 50%, ті концентрації, що використовуються для побудови кривої. Для кожної концентрації використовуються три чашки, крім контрольної. у три циліндри або лунки в кожній чашці додають розчин контрольної концентрації, а у три, що залишилися – розчин стандартної концентрації. Після вимірювання зони затримки росту для кожної концентрації визначається середня величина з трьох чашок, потім середня величина контрольної концентрації з усіх чашок (36 зон).

Для визначення поправки до розміру зони даної концентрації використовується різниця між середнім розміром зони контрольної концентрації, отриманої з усіх чашок, і середнім розміром зони контрольної концентрації, отриманої з трьох чашок з індивідуальними концентраціями. Якщо середній розмір даної зони концентрації позитивний знайденої поправки додаються, якщо він негативний – віднімаються [56].

Визначення антибіотичної активності

Значення біологічної активності антибіотика (наприклад, антибактеріальної, протигрибкової) зазвичай виражається в умовних одиницях, що містяться в 1 мл розчину (од/мл) або в 1 мг препарату (од/мг). Найменша кількість антибіотика, здатна пригнічувати розвиток або ріст певної кількості клітин стандартного штаму тест-мікроорганізму в одиниці об'єму поживного середовища – це одиниця антибіотичної активності [57]. Більш надійним і

точним методом кількісної оцінки активності антибіотиків є метод серійних розведень антибіотиків у поживному середовищі в стандартних умовах.

Культивування мікроорганізмів у присутності різних концентрацій антибіотиків і фіксації їх видимого росту є суттю цього методу. За допомогою даного методу можна визначити мінімальну пригнічуючу концентрацію (МПК), яка є основним кількісним показником, що характеризує мікробіологічну активність антибіотика; МПК виражається в мкг/мл або ум.од/мл; що нижча МПК, то активніший антибіотик. Мінімальну концентрацію антибіотика, яка пригнічує ріст інфекційних агентів (бактеріостатична дія) або вбиває їх (бактерицидна дія) також можна визначити цим методом. Серійні розведення можуть бути зроблені з агаром або бульйоном, залежно від характеру використовуваного поживного середовища. Як розчинник для визначення антибіотичної активності канаміцину використовується 0,1 М фосфатний буфер рН 8,0 (мл на мг антибіотика) [67].

Таблиця 7.4

Відповідність одиниці біологічної активності масі, для деяких антибіотиків

Бензилпеніциліну натрієва сіль	0,5988 мкг
Оксацилін (кислота)	1,0 мкг
Стрептоміцин (основа)	1,0 мкг
Стрептоміцин (сульфат)	1,25 мкг
Хлортетрациклін (гідрохлорид)	1,0 мкг
Поліміксин В	0,1 мкг
Тетрациклін (гідрохлорид)	1,0 мкг
Новобіоцин	1,0 мкг
Еритроміцин (основа)	1,0 мкг
Олеандоміцин (основа)	1,0 мкг
Неоміцин (основа)	1,0 мкг
Канаміцин (основа)	1,0 мкг
Циклосерин	1,0 мкг

Характеристика антибіотичної продуктивності організму є важливим критерієм оцінки активності під час вивчення умов виробництва антибіотиків і впливу різних чинників на біосинтез антибіотиків. Кількість, у мкг або одиницях, антибіотика, що утворюється в 1 мг висушених клітин (або міцелію)

досліджуваного організму за певний період часу (одна година) – антибіотична продуктивність організму. Антибіотична продуктивність організму (виражається в мкгДмггод) або в од.Дмг-год) [57].

7.3.3. Визначення концентрації джерела нітрогену та карбону

Визначення концентрації джерела карбону

В даній кваліфікаційній роботі використовується поживне середовище джерелом вуглецю в якому є кукурудзяне і соєве борошно. Концентрація джерела вуглецю визначається методом редукуючих цукрів, який вимагає попередньої пробопідготовки борошна.

Пробопідготовка – серія раціональних операцій, що виконуються над аналітом з метою перетворення зразка у форму, придатну для подальшого аналізу. Пробопідготовка необхідна для поліпшення метрологічних властивостей аналізу, є важливим етапом аналітичного циклу, її виконують з метою підвищення точності та відтворюваності вимірювань, надійності, прискорення тестування і зниження помилок у результатах аналізу, розширення діапазону досліджуваних величин.

Оскільки соєве та кукурудзяне борошно є органічними речовинами, тому, для підготовки зразків можуть використовуватися такі процедури, як: концентрація, екстракція, очищення. Одну із зазначених процедур, проводять одним із методів, на вибір: високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ), газова хроматографія (ГХ), рідинна хроматографія-мас-спектрометрія (РХ/МС), газова хроматографія-мас-спектрометрія (ГХ/МС), [58].

Визначення редукуючих цукрів

Для даного дослідження класичним є метод Бертрана, але він є дуже трудомістким, за рахунок використання багатьох реагентів, та потребує проведення великої кількості лабораторних операцій [59].

Прийнято як прототип метод Бертрана (Стандартний метод визначення цукрів ГОСТ 8756.13-87). У цьому методі відновлювальні цукри окислюють-

ся лужним розчином сульфату міді, осад оксиду міді розчиняють у розчині сульфату заліза, а утворені іони заліза потім титрують розчином перманганату калію.

Недоліки даного методу:

- використання перманганату калію та сірчаної кислоти, як прекурсорів;
- висока чутливість до умов (рН, температура тощо);
- складність виявлення закінчення титрування, яка визначається нестабільністю кольору,;
- через візуальну суб'єктивну оцінку кольору має низьку точність вимірювань.

Завдання створення методу визначення редукуючих цукрів у рослинній масі, що дає змогу відмовитися від використання прекурсорів і титрування лежить в основі корисної моделі. Насичений розчин хлориду амонію розв'язує цю проблему, він взаємодіє з осадом міді з утворенням забарвленої комплексної сполуки. Для цього з осажденного білка з вмістом редукуючого цукру 0,1-1 мг/мл беруть 10 мл цукрової витяжки, додають мідно-лужний реагент (розчин Фелтінга) 10 мл і кип'ятять протягом 3 хвилин.

Утворений осад оксиду мід в результаті реакції відфільтровують через скляний фільтр № 3 або 4 (40 або 16 отворів). Дистильованою водою до зникнення кольору промивної води промивають осад. Промивні води і мідно-лужний реагент зливають, і ретельно очищають колбу фільтра. Після, осад обробляють на фільтрі насиченим розчином хлориду амонію (розчинність 35-37,2 г/100 мл), нагрітим до 35-40°C. Зменшують до 10 мл об'єм отриманого комплексного розчину солей міді і в спектрофотометрі за довжини хвилі 590 нм вимірюють оптичну густину [60].

Визначення джерела нітрогену (Метод Неслера)

Принцип цього методу полягає у властивості реактиву Неслера вступати в кольорову реакцію з утвореними після мінералізації азотовмісних органічних речовин іонами амонію.

Реактиви для проведення методики визначення: пероксид водню (29-35%), концентрована сірчана кислота, реактив Неслера [61] (лужний розчин дигідрату тетраїодомеркуроату калію, що дає блідо-жовтий колір (інші кольори неприпустимі). Складається з йодиду ртуті та йодиду калію +вода) [62], розчин сульфату амонію, що містить 0,05 мг/мл азоту [61].

Культуральну рідину 1 мл (два паралельні зразки) поміщають у пробірку зі скляною кришкою на піщану баню і мінералізують з 0,1 мл сірчаної кислоти концентрованої. Мінералізують контрольний зразок 0,1 мл концентрованої сірчаної кислоти паралельно. В охолоджені тестові та контрольні зразки періодично додають 1-2 краплі пероксид водню (29-35%) для прискорення мінералізації. Доки вміст пробірки не знебарвиться спалювання продовжують.

Додають 8,9 мл дистильованої води до мінералізату, який отримали, промивають ковпачок і ретельно розчин перемішують. До 1 мл мінералізованого розчину, додайте 8,5 мл дистильованої води, перемішайте і додайте 0,5 мл реактиву Неслера для колориметричного визначення. Змішати зразки і виміряти колориметрично у фотоелектричному колориметрі з синім світло-фільтром (довжина хвилі 400 нм), прикріпленим до кювети з товщиною шару 10 мм. Розчин, приготований таким самим чином, як і зразок є еталонним розчином.

Загальний вміст азоту (X) у препараті (%) розраховується за такою формулою:

$$X = (B \times 10 \times 100 \times 100) / 1,0 \times 1,0 \times 1000000 = B/10, \quad (7.1)$$

де B – кількість азоту, знайдена за калібрувальним графіком, мкг;

10 – розведення мінералізату;

100 – ступінь розведення рідкого гідролізату;

100 – коефіцієнт перерахунку, %;

1,0 – кількість препарату взятого для колориметрування, мл;

1,0 – кількість досліджуваного зразка взятого для мінералізації, мл;

1000000 – коефіцієнт перерахунку, г.

Концентрація азоту має знизитися до внесення індуктора біосинтезу гібридного білка і збільшиться після такого внесення індуктора [61].

РОЗДІЛ 8. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ

8.1. Аналіз технологічної схеми виробництва канаміцину

В технологічній схемі біосинтезу канаміцину *Streptomyces kanamyceticus 1-91* є ряд допоміжних робіт, та основних технологічних процесів. Допоміжні роботи включають в себе етапи підготовки стерильного повітря, приготування та стерилізацію запасних розчинів сульфату цинку та заліза, і приготування та стерилізацію поживних середовищ. Головними етапами технологічного процесу є підготовка посівного матеріалу та безпосередній біосинтез антибіотику.

1. Приготування і стерилізація запасного розчину сульфатів цинку та заліза

В окремій колбі розчин сульфату готується і стерилізується, потім подається в розрахованих попередньо кількостях на етапі підготовки інокуляту.

На цьому етапі утворюється невелика кількість стоків (надлишковий розчин сульфату цинку та заліза), які потребують подальшої утилізації.

2. Приготування та стерилізація поживного середовища для отримання посівного матеріалу та виробничого біосинтезу

Сировину перед приготуванням середовища перевіряють відповідно до АНД, і відбраковують в разі невідповідності. Пакувальні матеріали для сировини на цьому етапі є твердими відходами.

Також на цьому етапі відбувається емісія твердих відходів.

3. Підготовка посівного матеріалу

Інокулят вирощується в посівних апаратах, при цьому не утворюється жодних відходів, оскільки інокулят передається на подальший етап виробництва інокуляту та біосинтезу антибіотику.

					НУХТ БТЕК 05.01.03 КР ПЗ		
Змн.	Арк.	№ документа	Підпис	Дата			
Розробив		Сокирко Н.О.			Літера	Арк.	Аркушів
Крієвник		Сулейко Т.Л.				72	95
Консульт.					73		
Н. контр.					Кафедра БТМ		
Зав. каф.		Стабніков В.П.					

Продуцент канаміцину *Streptomyces kanamyceticus*, є аеробним мікроорганізмом, тому під час культивування є потреба в розчиненому кисню концентрація якого $pO_2 = 20-30\%$ від насичення повітря.

Тому викид газоподібних відходів відбувається саме на цьому етапі.

4. Виробничий біосинтез канаміцину

Під час цього технологічного процесу для отримання канаміцину проводять культивування продуцента. По закінченню процесу у збірник направляють отриману культуру, тому рідкі відходи не утворюються.

На цьому етапі відділена біомаса стає твердими відходами.

Актиноміцет який продукує канаміцин, є аеробним організмом і потребує концентрації розчиненого кисню $pO_2 = 20-30\%$ від насичення повітря під час процесу культивування.

Тому на цьому етапі також відбувається викид газоподібних відходів.

8.2. Характеристика рідких відходів виробництва канаміцину

8.2.1. Розрахунок об'ємів відходів

Невелика кількість відходів у вигляді залишків приготованого сульфатного розчину утворюється на цьому етапі.

Кількість відходів за виробничий цикл приблизно становить: $100-1 = 99$ мл. Хоч і кількість цього розчину дуже мала, але утилізація необхідна також.

8.2.2. Утилізація рідких відходів

Оскільки в розчині міститься дві солі, можна утилізувати такий розчин деіонізацією, технічну воду, після чого, використовувати за потреби.

8.3. Характеристика твердих відходів виробництва канаміцину

8.3.1. Розрахунок об'ємів відходів

Компоненти поживного середовища в мішках із ПВХ надходять на виробництво, тому для такого пакувального матеріалу теж необхідно забезпечити спеціальні умови знешкодження.

Приймаємо, що продуцент канаміцину синтезує 25 г/л біомаси [63], по закінченню культивування отримують 1800 л культуральної рідини. Отже, за 48 год отримують $25 \times 1800 = 45\ 000\ \text{г} = 45\ \text{кг}$ біомаси.

Таблиця 8.1

Характеристика твердих відходів при виробництві канаміцину

Тверді відходи	Складові відходів	Приблизні обсяги відходів на 1 цикл виробництва, кг	Клас небезпеки
Пакувальний матеріал компонентів поживного середовища	Полівінілхлорид	3	IV
Біомаса	Біомаса продуцента канаміцину <i>Streptomyces kanamyceticus</i> 1-91	45	IV
Разом		48	

8.3.2. Утилізація твердих відходів

Відділені пакувальні матеріали від компонентів навколишнього середовища відправляють на переробку. Виробництво полімерно-піщаних сумішей для виготовлення будівельних матеріалів широкого спектру застосування, включно з житловим будівництвом, промисловим будівництвом, зведенням будівель різного призначення та благоустроєм міських і сільських територій є одним із методів переробки полімерних матеріалів [64].

Для переробки полімерних відходів устаткування включає: екструдер, який складається з циліндрового корпусу, на поверхні якого для розігріву полімерних відходів до температури, за якої відбувається утворення "коржа" з полімерної маси є нагрівач, шнек розташований всередині, який переміщує, подрібнену спочатку, а потім полімерну масу сплавлену, до вихідного кінця корпусу екструдера, та резервуар, згідно з корисною моделлю, на вихідному кінці корпусу встановлена нерухома решітка відносно корпусу екструдера, яка має отвори, що відповідають розмірам заданої фракції полімерного компонента полімерно-піщаної суміші, та за допомогою накидної гайки закріплену. На кінці шнека, що проходить через решітки, із зовнішнього боку від

неї, встановлений радіальний ніж, із лезами для поділу полімерної маси, що виходить з отворів у решітці, на окремі частинки нерухомо, відносно шнека.

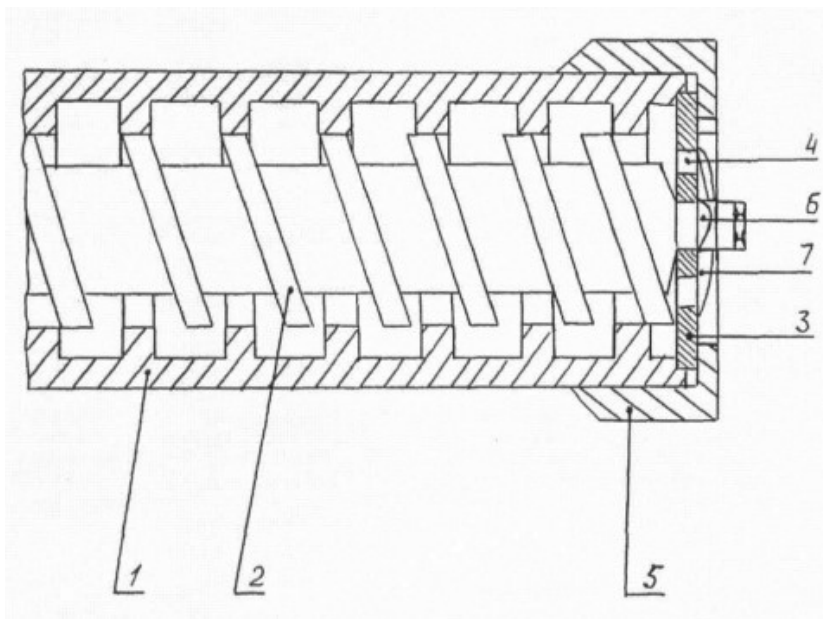


Рис. 8.1. Установка для переробки полімерних відходів [64].

Решітка розділяє безперервний потік полімерної маси на окремі стрічки діаметрами, відповідним до діаметру отворів у решітці на виході з екструдера, а поділяють суцільні стрічки полімерного матеріалу на окремі частинки радіальні ножі.

Таким чином, використовуючи цей підхід, усього за одну операцію можна отримати полімерні компонент для подальшої суміші одразу ж заданої фракції й переробити відходи [64].

Шляхом компостування, тобто біотермічної ферментації може бути утилізована біомаса продуцента [65].

Біотермічна ферментація – це процес біоокиснення, який є екзотермічним, під час якого аеробному біорозкладанню змішаною популяцією мікроорганізмів за умов високої температури та вологості піддаються органічні субстрати. Органічний субстрат у процесі біодеградації піддається фізичним і біохімічним перетворенням з утворенням гуміфікованих стабільних кінцевих продуктів [65].

Отримувати цінні органічні добрива, що використовують в подальшому, як засіб поліпшення структури ґрунту і як елемент сільського господарства, що підтримує кругообіг поживних речовин і баланс в екологічній агроєкосистемі можна за допомогою біотермічної ферментації.

Суть процесу біоферментації полягає в тому, що відсмоктується з компостної камери та подається в камеру зберігання компостного матеріалу забруднене повітря, де через шар компосту воно фільтрується для видалення парникових газів і домішок, проходячи у технологічні отвори далі до шахти відведення очищеного повітря за одночасного насичення компосту вуглецем та аміаком, підвищуючи його біологічну цінність, також відводить тепло із забрудненого повітря до чистого вхідного рекуператор, підвищуючи ефективність установки та заощаджуючи теплову енергію.

Метод ферментації органічної маси здійснюється за допомогою обладнання для подачі органічної маси через вхідний люк у камеру компостування, де біомасу рівномірно подають по площі підлоги, що має повітряні канали і вмонтований теплообмінник для подачі свіжого повітря. Підлога виготовлена з матеріалу який має високу теплопровідність.

Ферментація триває 5-7 днів, після чого на шарнірах підлога повертається, і в камеру для зберігання компосту органічна маса скочується. Під час компостування органічної маси виділяються різні токсичні сполуки в камері, такі як NH_3 і CO_2 [65].

Останніми роками стали пріоритетними «рециркуляційні» способи поводження з відходами, і ця біотермічна ферментація дає змогу отримувати низькопотенційне тепло [65].

8.4. Характеристика газоподібних відходів виробництва канаміцину

8.4.1. Розрахунок об'ємів відходів

В даному випадку газоподібні відходи утворюються на стадіях вирощування посівного матеріалу та при біосинтезі антибіотика.

Період підготовки посівного матеріалу в інокуляторах становить загально 48 год, і біосинтез – 48 год. Приймаємо, що аерація відбувається в режимі 1 л/лКР/хв. Для приготування інокуляту використовуються інокулятори з робочим об'ємом 18 і 180 л, а для виробничого біосинтезу – ферментер з робочим об'ємом 1800 л. Приблизна кількість викидів за один цикл ферментації становитиме:

$$(18 \cdot 24) + (180 \cdot 24) + (1800 \cdot 48) = 91\,152 \text{ л} = 91,15 \text{ м}^3$$

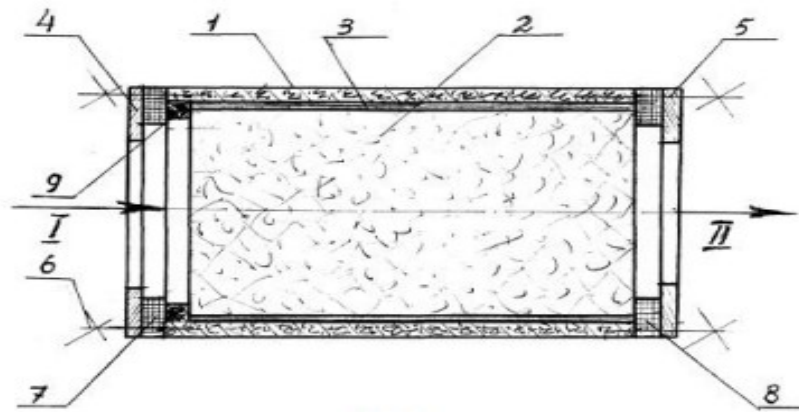
8.4.2. Заходи для зменшення об'ємів відходів

Відпрацьоване аераційне повітря після фільтрації можна використовувати як теплоагент, оскільки воно містить тільки мікробні аерозолі і вуглекислий газ.

8.4.3. Утилізація газоподібних відходів

Шляхом очищення повітря за допомогою повітряного фільтра відбувається знешкодження газоподібних відходів [66].

Пристрої для очищення повітря від аерозольних сумішей мають встановлені в корпусі фільтрувальні елементи, виконаному у вигляді паралелепіпеда з порожниною, суміщеного для подачі забрудненого і відведення чистого повітря з повітропроводом. Встановлюється корпус між опорним і затискним фланцем, який можна зняти. Виконаний фільтрувальний елемент у вигляді змінної обойми, який пружно прикріплений до корпусу і має фільтрувальний матеріал, що надає можливість його зняти.



Фіг. 1

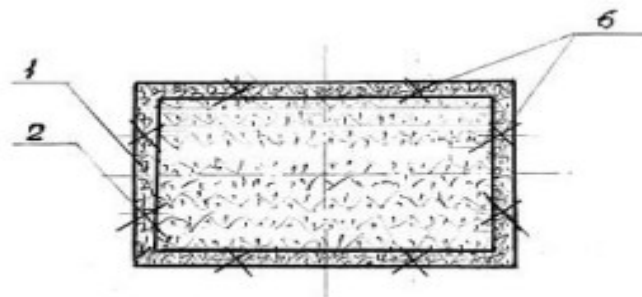


Рис. 8.2. Фільтр для очищення повітря [66].

Винахід відноситься до пристроїв для очищення повітря від аерозолів, який може бути використаний для оснащення повітропроводів у системах примусової вентиляції в різних галузях промисловості, зокрема в хімічній і фармацевтичній.

Пристрій складається з корпусу 1, всередині якого розміщений фільтрувальний елемент 2, що має фільтрувальний матеріал, який встановлений в змінній обоймі 3. Корпус 1 має вигляд пустотілого кожуха паралелепіпеда, що поєднаний з повітроводом I - підводу забрудненого повітря і повітроводом II - відводу очищеного повітря. Стрілками показано напрямок повітря. Корпус 1 вміщує, фільтрувальний елемент 2, встановлений між опорним фланцем 4 і притискним фланцем 5, які кріпляться до корпусу 1 з можливістю розкручування гвинтами-саморізами 6 по периметру, як показано на фіг. 2. Між опорним фланцем 4 і корпусом 1 розміщена прокладка з гуми 7, а між корпусом 1 та притискним фланцем 5 встановлена профільна гумова

прокладка 8. А поміж прокладкою 7 опорного фланцю 4 і обоймою 3 встановлено пружну профільну гумову прокладку 9, з пористої гуми.

Забруднене повітря після проходження з зони I за стрілкою через фільтрувальний елемент 2 з фільтрувальним матеріалом, що розміщений в обоймі 3 корпусу 1 очищується і поступає в зону II вже чистим. Завдяки конструктивним особливостям, що окреслені в формулі корисної моделі, яка розміщена нижче, перевага запропонованого рішення в тому, що воно виконане роз'ємним, тобто замінені можуть бути тільки обойма 3 з фільтрувальним елементом 2, що відпрацьовані згідно з технічними вимогами. Тобто, обойма 3 з фільтрувальним елементом 2 видаляються, а на їх місце встановлюють нові елементи. Всі ж інші елементи можуть бути використані неодноразово. Для цього за допомогою гвинтів-саморізів 6 притискний фланець 5 відділяється від корпусу 1, знімається прокладка 8. При цьому вивільняється фільтрувальний елемент 2, який пружно розташований на гумовій прокладці 9 і виймається з корпусу 1. Його замінюють на новий. Він розміщується на місце відпрацьованого у зворотному порядку виконання дій.

Таким чином, конструкція запропонованого пристрою загалом має закінчений і досконалий вигляд, а перебіг операції з його збирання та розбирання дуже простий [66].

Список використаної літератури

1. Біотехнологія [Електронний ресурс]: Фармацевтична енциклопедія. – Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/1933/biotexnologiya>.
2. Крайдашенко О. В., Стець Р. В., Рябокони О. В. та ін. [Електронний ресурс]: «Протиінфекційні лікарські засоби». Навчальний посібник для студентів медичних факультетів, інтернів, лікарів, провізорів. – Вінниця, 2015. – 388 с. – Режим доступу: http://dspace.zsmu.edu.ua/bitstream/123456789/6635/1/Kraidashenko_%20_Protuinfekcii_LZ_%D0%9A%D0%9E%D0%A0_2051-08-26%281%29.pdf
3. Канаміцин. [Електронний ресурс]: Матеріал з Вікіпедії. – Режим доступу: <https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%9A%D0%B0%D0%BD%D0%B0%D0%BC%D1%96%D1%86%D0%B8%D0%BD>.
4. Аміноглікозиди. [Електронний ресурс]: Doctor Thinking. – Режим доступу: <https://doctorthinking.org/2021/05/aminoglycosides/>.
5. Канаміцину моносультат. [Електронний ресурс]: Фармацевтична енциклопедія. – Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/3430/kanamicinu-monosulfat>.
6. Пат. №: **73620**. Засіб для зупинки кровотечі «Жепластан». *Решетов Александр Леонідовіч*. Опубл.: 25.09.2012. – Режим доступу: <https://uapatents.com/4-73620-zasib-dlya-zupinki-krovotechi-zhelplastan.html>.
7. Канаміцину моносультат. [Електронний ресурс]: Фармацевтична енциклопедія. – Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/3430/kanamicinu-monosulfat>.
8. КАНАМІЦИН (KANAMYCIN). [Електронний ресурс]: Інструкція для медичного застосування лікарського засобу. – Режим доступу: [https://likicontrol.com.ua/%D1%96%D0%BD%D1%81%D1%82%D1%80%D1%83%D0%BA%D1%86%D1%96%D1%8F/?\[25992](https://likicontrol.com.ua/%D1%96%D0%BD%D1%81%D1%82%D1%80%D1%83%D0%BA%D1%86%D1%96%D1%8F/?[25992).
9. Формула канаміцину сульфату. [Електронний ресурс]: KEEG COMPOUND. – Режим доступу: <https://www.genome.jp/entry/C08046>.

10. Біологічно активні речовини. [Електронний ресурс]: Матеріал з Вікіпедії. – Режим доступу: https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%91%D1%96%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B3%D1%96%D1%87%D0%BD%D0%BE_%D0%B0%D0%BA%D1%82%D0%B8%D0%B2%D0%BD%D1%96_%D1%80%D0%B5%D1%87%D0%BE%D0%B2%D0%B8%D0%BD%D0%B8.
11. Кривцова М. В., Ніколайчук М. В. [Електронний ресурс]: «ЕКОЛОГІЯ МІКРООРГАНІЗМІВ». – Ужгород 2011 – 184 с. – Режим доступу: https://www.researchgate.net/profile/Kryvtsova_Maryna/publication/285592690_Ekologia_mikroorganizmiv_Navcalnij_posibnik/links/587fb58908ae9a860ff7e2f4/Ekologia-mikroorganizmiv-Navcalnij-posibnik
12. Актиноміцети (*Actinomycetes*). [Електронний ресурс]: Велика Українська Енциклопедія. – Режим доступу: [https://vue.gov.ua/%D0%90%D0%BA%D1%82%D0%B8%D0%BD%D0%BE%D0%BC%D1%96%D1%86%D0%B5%D1%82%D0%B8_\(Actinomycetales\)](https://vue.gov.ua/%D0%90%D0%BA%D1%82%D0%B8%D0%BD%D0%BE%D0%BC%D1%96%D1%86%D0%B5%D1%82%D0%B8_(Actinomycetales)).
13. *Streptomyces*. [Електронний ресурс]: Академик. Словари и энциклопедии. – Режим доступу: <https://dic.academic.ru/dic.nsf/ruwiki/609966>.
14. Штам *STREPTOMYCES KANAMYCETICUS*, ИСПОЛЬЗУЕМЫЙ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ КАНАМИЦИНА. [Електронний ресурс]: Авторское свидетельство СССР N 167969, кл. С 12D 1/14, 1973. Широносова Л.А., Грузина В.Д., Чумакова Л.К., Иванова Т.В. Оpubл.:10.04.1995. – Режим доступу: https://rusneb.ru/catalog/000224_000128_0001306134_19950410_A1_SU/.
15. *Streptomyces*. [Електронний ресурс]: Матеріал з Вікіпедії. – Режим доступу: <https://en.wikipedia.org/wiki/Streptomyces>.
16. *Streptomyces kanamyceticus*. [Електронний ресурс]: КОЛЕКЦІЯ КУЛЬТУР МІКРООРГАНІЗМІВ ПРОДУЦЕНТІВ АНТИБІОТИКІВ. Lv 54 – Режим доступу: http://lv-microbcollect.lviv.ua/strain_card/id/134/.
17. *Streptomyces kanamyceticus*. [Електронний ресурс]: Матеріал з Вікіпедії. – Режим доступу: https://en.wikipedia.org/wiki/Streptomyces_kanamyceticus.

18. Starch and sucrose metabolism - *Streptomyces kanamyceticus*. [Електронний ресурс]: KEEG PATHWAY – Режим доступу: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?ska00500.
19. Glycolysis / Gluconeogenesis - *Streptomyces kanamyceticus*. [Електронний ресурс]: KEEG PATHWAY – Режим доступу: <https://www.genome.jp/pathway/ska00010>.
20. Citrate cycle (TCA cycle) - *Streptomyces kanamyceticus*. [Електронний ресурс]: KEEG PATHWAY – Режим доступу: <https://www.genome.jp/pathway/ska00020>.
21. Neomycin, kanamycin and gentamicin biosynthesis - *Streptomyces kanamyceticus*. [Електронний ресурс]: KEEG PATHWAY – Режим доступу: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?ska00524.
22. Т.П. Пирог, В.О. Красінько, С.М. Тетеріна. [Електронний ресурс]: ТЕХНОЛОГІЇ МІКРОБНОГО СИНТЕЗУ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ. Методичні рекомендації до виконання курсової роботи. – К. : НУХТ, 2020. – 55 с. – Режим доступу: <http://library.nuft.edu.ua/ebook/file/69.147.pdf>
23. Пирог Т.П., Ігнатова О. А. Загальна біотехнологія: підручник / К. :НУХТ, 2009. – 336 с.
24. Очищення і дезінфекція в харчовій промисловості. [Електронний ресурс]: Betta service. – Режим доступу: <https://www.bettaservice.com.ua/novynny-kompanii/item/1172-ochistki-i-dezinfektsiya-v-pishchevoy-promyshlennosti.html>.
25. Т. О. Чумаченко М. В. Райлян Ю. І. Поливянна В. І. Макарова та ін. [Електронний ресурс]: Дезінфекція. Методичні вказівки для самостійної роботи студентів 5-го курсу медичного факультету з дисципліни «Епідеміологія». – режим доступу: <http://repo.knmu.edu.ua/bitstream/123456789/28042/1/%D0%A7%D1%83%D0%BC%D0%B0%D1%87%D0%B5%D0%BD%D0%BA%D0%BE%20%D0%94%D0%B5%D0%B7%D1%96%D0%BD%D1%84%D0%B5%D0%BA%D1%86%D1%96%D1%8F%20%E2%84%9620-347073.pdf>.

26. Грегірчак Н.М. [Електронний ресурс]: Мікробіологія, санітарія і гігієна виробництв з основами НАССР конспект лекцій для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнологія» денної та заочної форм навчання / Н.М.Грегірчак – К.: НУХТ, 2020. – 177 с.
27. Постанова Про затвердження Технічного регламенту мийних засобів (Технічний регламент, п.2). [Електронний ресурс]: Кабінет Міністрів України. – Режим доступу: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/717-2008-%D0%BF#Text>.
28. Натр едкий техніческий. Технические условия. [Електронний ресурс]: Межгосударственный стандарт ГОСТ 2263-79. – Режим доступу: <https://docs.cntd.ru/document/1200018988>.
29. Гидроксид натрия (каустическая сода, едкий натр, каустик). [Електронний ресурс]: Система оптиум. – Режим доступу: <https://www.systopt.com.ua/ru/item-natrij-gidroksyd>.
30. Инструкция по применению дезинфицирующего средства «РЗ-Топакс 990» для дезинфекции на предприятиях пищевой промышленности. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: http://niid.ru/s/210/files/instrukcii_dezsredstva/dezinfekciya_i_sterilizaciya/128154_606.pdf.
31. Засіб дезінфекційний на основі перекису водню "Фамідез Саноксил 100", 1000 мл. [Електронний ресурс]: clean-ua. – Режим доступу: <https://clean-ua.com/famidez-sanoksil-100-1000ml/>.
32. Фамідез® Саноксил 100. [Електронний ресурс]: Famidez. – Режим доступу: <https://famidez.ua/index.php/produktsiya/dezinfektsiya/spetsialnizasoby/sanoksil-100>.
33. Л.М.Буценко. «Технології мікробного синтезу лікарських засобів». Конспект лекцій. – К. : НУХТ, 2008. – 131 с.
34. Головей О.П. «Технологія антибіотиків та лікарських препаратів». Кон-

спект лекцій.– Кам'янське: ДДТУ, 2017. – 121 с.

35. Повітрозбірник 50 л. [Електронний ресурс]: ТОВ "Компресормаш-Сервіс. – Режим доступу: <https://kms-market.com.ua/ua/p65367829-vozduhosbornik-resiver.html>.

36. Повітряний касетний фільтр ФВКАС-6. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://eurofilter.ru/catalogue/17/96/>.

37. Компресори з потужністю 30,0-90,0 кВт. [Електронний ресурс]: ТОВ «ІНТЕГРА-2016». – Режим доступу: https://compressory.org.ua/catalog_2/vintovyie-kompressory-maslozapolnennyie/s-pryamym-privodom/s-moshchnostyu-30-0-90-0-kvt/.

38. Осушувачі. [Електронний ресурс]: ТОВ «Далгакиран компресор Україна». – Режим доступу: <https://dalgakiran.ua/uk/products/refryzheratorni-osushuvachi-stysnenogo-povitrya-dalgakiran-dryair-seriyi-dk>.

39. Ресивер 500 л 10 бар вертикальний повітряний. [Електронний ресурс]: Пневмотехніка. – Режим доступу: https://compressors.in.ua/ua/p85319536-resiver-500-bar.html?source=merchant_center&gclid=Cj0KCQiA1ZGcBhCoARIsAGQ0kkq7FdTAIIYZ_Yh0BoCS0MpJ0tzGEJwVC7W9vhLUQ1ZFTkAnMrnJ_gaAohmEALw_wcB.

40. Теплообмінники типу "труба в трубі". [Електронний ресурс]: ТОВ «ГК ЕВРОХИММАШ К.О.». – Режим доступу: http://euromash.kiev.ua/ua/teploobmennik_truba_v_trube_ua.php.

41. Фільтри тонкої очистки повітря. [Електронний ресурс]: ВЕНТ-ФІЛЬТР. – Режим доступу: <https://ventfilter.kiev.ua/goods/filtr-tonkoj-ochistki-vozduha-ftov-hera-hera/>.

42. Стерильні фільтри у нержавіючому корпусі. SPF серія. [Електронний ресурс]: ЗАО «РЕМЕЗА». – Режим доступу: https://www.remeza.com/catalog/system_compressed/air_filters/spf_series/.

43. Standard models for 5 ltr autoclave. [Електронний ресурс]. – Режим доступу:
<https://amarequip.com/docs/500ml-5ltr%20Stirred%20Pressure%20Reactor%20Catalog.pdf>.
44. Biostat® Cplus. The Stainless Steel Fermenter|Bioreactor for Your Laboratory. [Електронний ресурс]: Sartorius stedim biotech. – Режим доступу:
<https://www.sartorius.com/download/9612/broch-biostat-cplus-sbil505-e-data.pdf>.
45. Дозатор ваговий HUALIAN NPF-3000, ст. 201. [Електронний ресурс]: CENTUR. – Режим доступу: <https://centur.com.ua/torgove/fasuvavno-pakuvalnetorhove-obladnannya/fasuvavno-obladnannya/dozatory-dlya-sypuchykh-rechovyn/dozator-vagoviy-hualian-npf-3000-st-201>.
46. Дозатор води і рідин. [Електронний ресурс]: АгроТех. – Режим доступу:
https://agro-teh.com.ua/p370228267-dozator-vody-zhidkostej.html?source=merchant_center&gclid=CjwKCAjwwL6aBhBIEiwADycBIIzTn8EH4CTPrPs_jtdhVoqwqfeTI4Ln7cNCF5ZKvJFNJhu9Kpn99xoCC64QAvD_BwE.
47. Апарати сталіні емальовані з механічним змішуючим пристроєм. [Електронний ресурс]: ТОВ «ГК ЕВРОХИММАШ К.О.». – Режим доступу:
http://euromash.kiev.ua/ua/aparati_emal_mehanicheskim_perem_ustroystvom_ua.php.
48. Ферментні системи NuPerforma. [Електронний ресурс]: ThermoFisher. – Режим доступу:
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/SUF0300.9002>.
49. Насос перистальтичний 203KA/ZL. [Електронний ресурс]: Технолог Плюс. – Режим доступу: <https://tplus.com.ua/ua/nasos-peristaltichnij-203ka>.
50. Насос відцентровий Wetron. [Електронний ресурс]: ROZETKA. – Режим доступу: https://rozetka.com.ua/ua/wetron_775024/p247432045/characteristics/.
51. Лабораторний ферментер із нержавіючої сталі. [Електронний ресурс]: RUIAN GLOBAL MACHINERY CO., LTD. – Режим доступу:
https://chinapharmamachine.com/product/stainless_steel_lab_fermenter.

52. *Пирог Т. П., Красінько В. О., Тетеріна С. М.* ТЕХНОЛОГІЇ МІКРОБНОГО СИНТЕЗУ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ. Методичні рекомендації до виконання курсової роботи. – К. : НУХТ, 2020. – 55 с.
53. *Красінько В.О., Волошина І.М.* «Біологія клітин». Лабораторний практикум. – К. : НУХТ, 2014. – 147 с.
54. МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ" Контроль стерильності виробів медичного призначення". МВ-1-2004. П.5. Поживні середовища. [Електронний ресурс]: Н А К А З. 07.12.2004 N 322/1.Про затвердження Методичних вказівок. – Режим доступу: https://zakononline.com.ua/documents/show/416537___416602.
55. Costa-Gutierrez S. B., Aparicio J. D., Delgado O. D., Benimeli C. S., Polti M. A. Use of glycerol for the production of actinobacteria with well-known bioremediation abilities. *3 Biotech*. 2021, 11 (2): 57. doi: 10.1007/s13205-020-02588-5. [Електронний ресурс]: Europe PMC. – Режим доступу: <https://europepmc.org/article/pmc/pmc7801532>
56. *Буценко Л. М., Красінько В. О.* «Технології мікробного синтезу лікарських засобів». Лабораторний практикум. – К. : НУХТ, 2011. – 76 с.
57. *Буценко Л. М., Пенчук Ю. М., Пирог Т. П.* «Технології мікробного синтезу лікарських засобів». – К. : НУХТ, 2010. – 323 с.
58. Пробопідготовка. [Електронний ресурс]: Фармацевтична енциклопедія. – Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/5871/probopidgotovka>.
59. Сравнение методов определения редуцирующих веществ: метод Бертрана, эбулиостатический и фотометрический методы. [Електронний ресурс]: Химия растительного сырья. – 2008. – №4. Вешняков В. А., Хабаров Ю. Г., Камакина Н. Д.–с.47-50 – Режим доступу: <https://cyberleninka.ru/article/n/sravnienie-metodov-opredeleniya-redutsiruyuschih-veschestv-metod-bertrana-ebuliostaticheskij-i-fotometrisheskiy-metody/viewer>.
60. Спосіб визначення вмісту редукуючих цукрів у рослинному матеріалі / Ніщенко Лариса Вікторівна, Приседський Юрій Григорійович. – опублікова-

но: 11.12.2017. [Електронний ресурс]: Пат. № 121789. – Режим доступу: <https://uapatents.com/5-121789-sposib-viznachennya-vmistu-redukuyuchikh-cukriv-u-roslinnomu-materiali.html>.

61. Визначення концентрації органічного азоту методом Несслера. [Електронний ресурс]: Stud Files. – Режим доступу: <https://studfile.net/preview/12538458/page:5/>.

62. Реактив Несслера. Застосування та властивості. [Електронний ресурс]: Система оптиум. – Режим доступу: <https://www.systopt.com.ua/article-reaktyv-nesslerera-prymenenye-y-svojstva>.

63. Gao W., Wu Z., Sun J., Ni X., Xia H. Modulation of kanamycin B and kanamycin A biosynthesis in *Streptomyces kanamyceticus* via metabolic engineering. PloS one. 2017, 12(7): e0181971. [Електронний ресурс]: PLOS ONE. – Режим доступу: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181971>

64. Патент України на корисну модель № 120740. Установка для переробки полімерних відходів/ Зелінський М. З. Опубл. 10.11.2017, Бюл. № 21. [Електронний ресурс]: Спеціальна інформаційна система. Система УКНОІВІ. – Режим доступу: <https://sis.ukrpatent.org/uk/search/detail/750243/>.

65. Сербій В., Рудик Л. Спосіб біотермічної ферментації органічної маси та пристрій для його здійснення. УкрНДІПВТ ім. Л. Погорілого. [Електронний ресурс]: Стаття. – Режим доступу: <http://ndipvt.com.ua/oldsite/konf7/1/serbiy.htm>

66. Патент України на корисну модель № 117993. Пристрій для очищення повітря/ Лейн В.Ф., Кокорін С.В. Опубл. 10.07.2017, Бюл. № 13. [Електронний ресурс]: Спеціальна інформаційна система. Система УКНОІВІ. – Режим доступу: <https://sis.ukrpatent.org/uk/search/detail/797504/>

67. Л. Б. Орябінська, Л. П. Дзигун, В. Ю. Поліщук. Біотехнологія антибіотиків: лабораторний практикум. – Київ : КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2020. – 40 с.



ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ ПО
ДЕЛАМ ИЗОБРЕТЕНИЙ И ОТКРЫТИЙ

(19) **SU⁽¹¹⁾ 1 306 134⁽¹³⁾ A1**

(51) МПК⁶ **C 12 P 1/06//C 12 P 1/06, C
12 R 1:465)**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ СССР

(21), (22) Заявка: 3942997/14, 25.06.1985

(46) Опубликовано: 10.04.1995

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: Авторское свидетельство СССР N
167989, кл. C 12N 1/20, 1948. Авторское
свидетельство СССР N 460746, кл. C 12D 1/14,
1973.

(71) Заявитель(и):

Курганский комбинат медицинских препаратов
и изделий "Синтез"

(72) Автор(ы):

Широконова Л.А.,
Грузина В.Д.,
Чумакова Л.К.,
Иванова Т.В.

**(54) ШТАММ STREPTOMYCES KANAMYCETICUS, ИСПОЛЬЗУЕМЫЙ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ
КАНАМИЦИНА**

(57) Реферат:

Изобретение относится к микробиологической
промышленности и касается получения
антибиотика канамицина. Штамм *Streptomyces*
salamutsebsis получают с помощью химических

мутагенов и многоступенчатого отбора. Культурой
штамма засевают посеянную среду и выращивают в
течение 48 ч. Затем производят ферментацию и
определяют содержание канамицина
микробиологическим методом.

S U 1 3 0 6 1 3 4 A 1

S U 1 3 0 6 1 3 4 A 1



STATE COMMITTEE
FOR INVENTIONS AND DISCOVERIES

(19) **SU**⁽¹¹⁾ **1 306 134**⁽¹³⁾ **A1**
(51) Int. Cl.⁶ **C 12 P 1/06** //(C 12 P 1/06, C
12 R 1:465)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 3942997/14, 25.06.1985

(46) Date of publication: 10.04.1995

(71) Applicant(s):
Kurganskiy kombinat meditsinskikh preparatov
i izdelij "Sintez"

(72) Inventor(s):
Shironosova L.A.,
Gruzina V.D.,
Chumakova L.K.,
Ivanova T.V.

(54) **STRAIN STREPTOMYCES KANAMYCETICUS USED FOR KANAMYCIN PREPARING**

(57) Abstract:

FIELD: microbiological industry. SUBSTANCE:
strain *Streptomyces kanamyceticus* is prepared by
using chemical mutagens and multistep selection.
Sowing medium is sown with strain culture and

grown for 48 h. Then fermentation is carried out,
and kanamycin content is determined by
microbiological method. EFFECT: improved method
of kanamycin preparing.

S U 1 3 0 6 1 3 4 A 1

S U 1 3 0 6 1 3 4 A 1

Изобретение относится к микробиологической промышленности.

Целью изобретения является создание нового, более продуктивного штампа продуцента канамицина.

Штамм *Streptomyces sanamyceticus* 1-91 получен из штамма *Streptomyces sanamyceticus* 33-70 с помощью химических мутагенов и многоступенчатого отбора. Хранится в Коллекции культур микроорганизмов ВНИИантибиотиков под N 1747 и характеризуется следующими признаками.

Морфологические признаки.

Спороносцы неспиральные, длинные, волнистые, монопоциальные. Спор на спороносце много, споры образуются на воздушном мицелии. Фрагментация мицелия не наблюдается. Культуральные признаки.

На среде Гаузе I с крахмалом колонии круглые, плоские. Воздушный мицелий белого цвета, в середине колонии сероватый. Субстратный мицелий светло-коричневый. Диаметр колонии 6 мм.

На среде Гаузе I с глюкозой колонии круглые, по центру колонии слегка приподнятые, по краям сильно складчатые. Воздушный мицелий сероватого цвета, субстратный светло-коричневый. Диаметр колонии 6 мм.

На среде Гаузе II колонии морщинистые, плоские. Воздушный мицелий светло-бежевого цвета, края колонии неровные. В центре колонии небольшая аутовка белого цвета.

Субстратный мицелий коричневый. Диаметр колонии 12 мм.

На гороховой среде колонии радиально-складчатые с кратером по центру. Имеются концентрические круги. Воздушный мицелий светло-серого цвета. Субстратный светло-коричневый. Диаметр колонии 7 мм.

На среде Ваксмана колонии радиально-складчатые, плоские. По центру колонии небольшой кратер. Ярко выраженные концентрические круги. Воздушный мицелий светло-бежевого цвета, по краю колонии светлый. Субстратный мицелий бежевый. Диаметр колонии 6 мм.

На овсяной среде колонии круглые, радиально-складчатые. Воздушный мицелий светло-серого цвета, субстратный бежевого. Диаметр колонии 7 мм.

На соевой среде колонии морщинистые, неправильной формы, почти плоские. Воздушный мицелий светло-бежевый, субстратный светло-коричневый. Диаметр колонии 9 мм.

На среде Чапека колонии точечные.

Физиолого-биохимические признаки.

Сбраживает глюкозу, мальтозу, маннит; слабо сбраживает лактозу, сахарозу, инозит, ксилит, сорбит. Не сбраживает рамнозу, дульцит.

Реакция на инверсию сахара положительная, красный осадок выпадает на 7 сутки.

Полностью разжижает желатину на 13 сутки.

Полностью пептонизирует молоко на 10 сутки, начало пептонизации на 4 сутки, коагуляция молока не происходит.

Штамм накапливают до 6500 ед/мл канамицина. Оптимальная температура выращивания $27 \pm 1^\circ\text{C}$.

Пример. Культурой штамма 1-91 *Str. sanamyceticus* засевают посевную среду следующего состава, Крахмал 2,0 Кукурузный экстракт (техн. масса) 0,5 Сернистый аммоний 0,3 Хлористый натрий 0,25 Мел 0,3 Соевая мука 2,0

Выращивают при $27 \pm 1^\circ\text{C}$ на круговой качалке в течение 48 ч. Полученным посевным материалом в количестве 5% засевают ферментационную среду следующего состава, Кукурузная мука 8,5 Кукурузный экстракт (техн. масса) 0,3 Сернистый аммоний 0,9 Мел 0,8 Соевая мука 2,0 Сернистый цинк 0,009 Сернистое железо 0,005 Жир 1,17

Ферментацию проводят на круговой качалке при $27 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 120-144 ч. В конце процесса определяют содержание канамицина микробиологическим методом. Содержание канамицина составляет 6500 ед/мл.

Штамм 1747 образует канамицин в количестве 4700-6500 ед/мл, известный штамм 33-70

SU 1 306 134 A1

4000-5000 ед/мл.

Формула изобретения

Штамм STREPTOMYCES KANAMYCETICUS N 1747 (Коллекция культур
5 микроорганизмов Всесоюзного научно-исследовательского института антибиотиков),
используемый для получения канамицина.

10

15

20

25

30

35

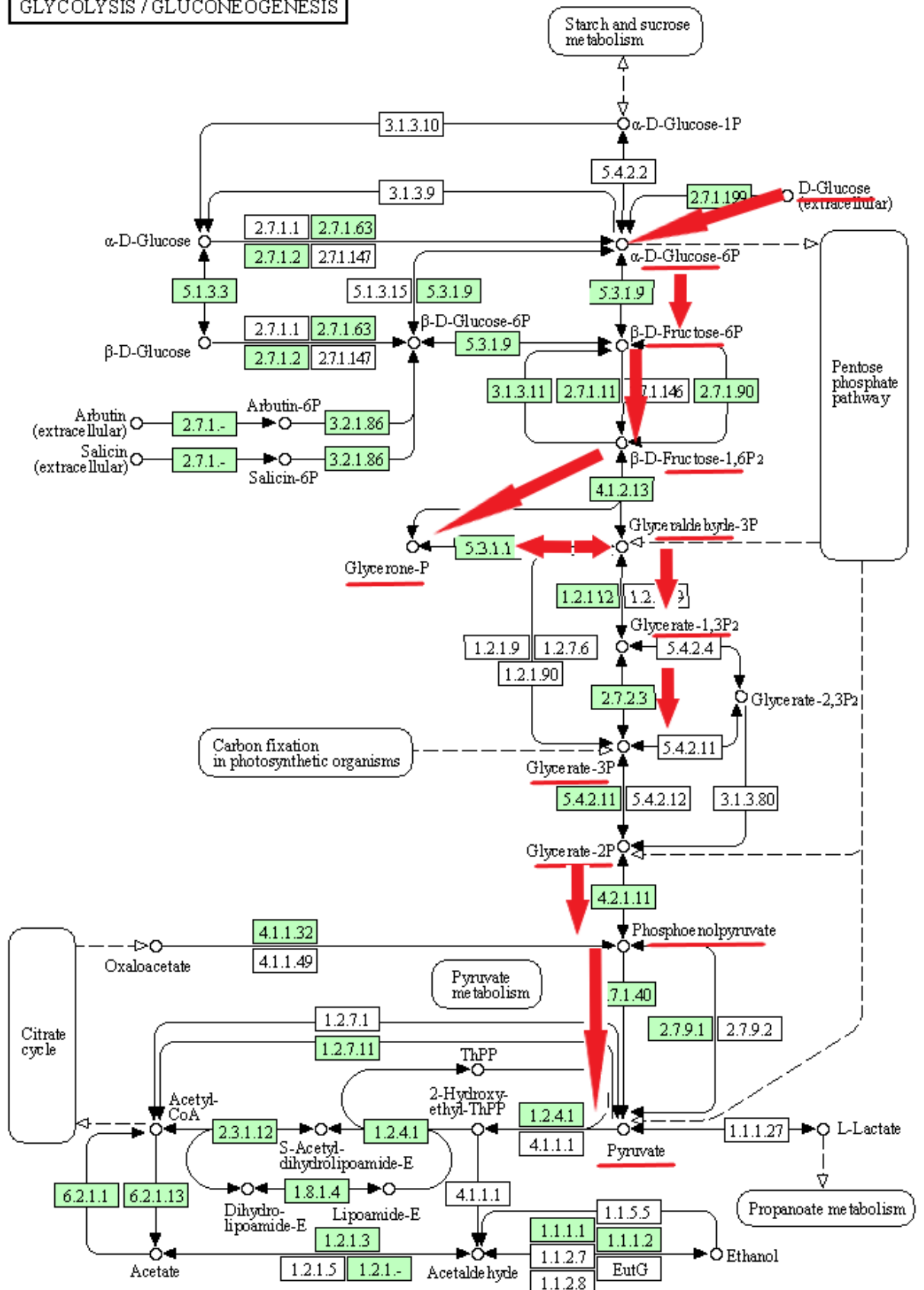
40

45

50

Страница 4

GLYCOLYSIS / GLUCONEOGENESIS



00010 5/7/20
(c) Kanehisa Laboratories

CITRATE CYCLE (TCA CYCLE)

