

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ
Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю
Кафедра біотехнології і мікробіології

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

«__» _____ 20__ р.

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

«__» _____ 20__ р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА
зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код та назва спеціальності)
освітньо-професійної програми : біотехнології: фармацевтична,
промислова, харчова,
природоохоронна
на тему: «Біосинтез батуміну *Pseudomonas batumici*»

Виконала: здобувачка 4 курсу, групи 1
МИХАЛЬСЬКА Юлія Сергіївна
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник БУЦЕНКО Людмила Миколаївна
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

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

_____ (ім'я та прізвище) (підпис)

_____ (ім'я та прізвище) (підпис)

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

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

Здобувач _____
(підпис)

Київ – 2023 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю
Кафедра біотехнології і мікробіології
Освітній ступінь бакалавр
Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код і назва)
Освітньо-професійна програма «Біотехнології: фармацевтична
промислова, харчова, природоохоронна»
(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і
мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ
“ ” 20 23 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

МИХАЛЬСЬКОЇ Юлії Сергіївни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біосинтез батуміну *Pseudomonas batumici*
керівник роботи БУЦЕНКО Людмила Миколаївна, д.б.н., доц.,
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)
затверджені наказом закладу вищої освіти _____

2. Строк подання здобувачем роботи _____

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Pseudomonas batumici*,
цільовий продукт: антибіотик батумін, об'єм ферментера 10 м³, коефіцієнт
заповнення 0,6

розробити) РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту. РОЗДІЛ 2.
Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента. РОЗДІЛ 3.
Техніко-економічне обґрунтування. РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту.
РОЗДІЛ 5. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого
біосинтезу. РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання доферментаційних процесів та
виробничого біосинтезу. РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми
доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу. РОЗДІЛ 8. Контроль
виробництва. РОЗДІЛ 9 Аналіз перспектив впровадження системи екологізації
виробництва. РОЗДІЛ 10. Аналіз нормативно-технічної документації та науково-
технічної літератури, використаної під час проектування
виробництва.

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема виробництва батуміну– 1 аркуш формату А1.
Апаратурна схема виробництва батуміну – 1 аркуш формату А1.

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 04 квітня 2022 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика цільового продукту	04.04.2023 – 09.04.2023	
2	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	09.04.2023 – 15.04.2023	
3	Техніко-економічне обґрунтування	14.04.2023 – 22.04.2023	
4	Біосинтез цільового продукту	21.04.2023 – 28.04.2023	
5	Обґрунтування вибору технологічної схеми	27.04.2023 – 05.05.2023	
6	Специфікація обладнання доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу	04.05.2023 – 13.05.2023	
7	Опис технологічної схеми біосинтезу доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу	14.05.2023 – 21.05.2023	
8	Контроль виробництва	20.05.2023 – 24.05.2023	
9	Аналіз перспектив впровадження системи екологізації виробництва лінкоміцину	22.05.2023 – 01.06.2023	
10	Нормативно-технічна документація, використана під час проектування лінкоміцину	26.05.2023 – 01.06.2023	
11	Оформлення пояснювальної записки	28.05.2023 – 29.05.2023	
12	Виконання графічної частини проекту	29.05.2023 – 30.05.2023	

Здобувач _____
(підпис)

Керівник роботи _____
(підпис)

Юлія МИХАЛЬСЬКА
(ім'я та прізвище)

Людмила БУЦЕНКО
(ім'я та прізвище)

Реферат

Кваліфікаційна робота присвячена створенню апаратурної та технологічної схем біосинтезу батуміну *Pseudomonas batumici* IMB B-7532, характеристиці цільового продукту та техніко-економічному обґрунтуванню. Біологічний агент *P. batumici* IMB B-7532 синтезує 0,18 г/л цільового антибіотику.

При проєктуванні виробництва антибіотика батуміну лікарською формою буде мазь з цим антибіотиком.

На рік кількість циклів виробництва становить 14, а його тривалість – 45 трудоднів. Загальна потужність проєктованого виробництва батуміну складає $G_{\text{гп}} = 7,4$ кг/рік.

Для біосинтезу батуміну *P. batumici* IMB B-7532 приймаємо до встановлення один ферментер об'ємом 10 м^3 , два посівних апарати об'ємом 1000 л і 100 л і один інокулятор об'ємом 10 л.

Процес отримання посівного матеріалу для проведення виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 10 м^3 із коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити у 5 етапів.

Також в кваліфікаційній роботі представлено методи ідентифікації цільового продукту та визначення показників його біологічної активності, методи контролю виробництва. Дана лікарська форма має відповідати вимогам ДФУ стосовно мікробіологічної чистоти, повинна бути однорідною, немістити сторонніх домішок та бути нетоксичною для людини.

Кваліфікаційна робота складається зі вступу, десяти розділів, списку використаних джерел (83 найменування), технологічної (формат А1, 1 аркуш) та апаратурної (формат А1, 1 аркуш) схем. Загальний обсяг роботи – 121 сторінка, 13 рисунків, 18 таблиць.

Ключові слова: антибіотик, батумін, *Pseudomonas batumici*, техніко-економічне обґрунтування, об'єм ферментера, кількість стадій.

Зміст

Вступ	7
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ.....	10
РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУЙ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....	14
2.1. Обґрунтування виборуй біологічного агента та поживного середовищай для його культивування	14
2.2. Розрахунок складу поживного середовищай.....	17
2.3. Морфолого-кульральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента	18
2.4. Систематика.....	21
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ.....	22
3.1. Потреба у мазі Батумін	22
3.2 Розрахунок потужності виробництва.....	24
3.3. Розрахунок об'єму ферментера і кількості виробничих циклів.....	25
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....	26
Розділ 4. Біосинтез цільового продукту.	31
4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента	31
4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт	33
РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ	36
5.1. Вибір умов і способу культивування	36
5.2. Обґрунтування стадій підготовки аераційного повітря	39
5.3 Вибір мийних та дезінфікуючих засобів	40
5.4 Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища для біосинтезу <i>Pseudomonas batumici</i> IMB B-7532	46
5.4.1. Вирощування інокуляту в колбах на качалках.....	47
5.4.2. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в посівних апаратах.....	49
5.4.3. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 10 м ³	52
5.4.4. Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН	54
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ	56

РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу.....	61
РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	72
Розділ 8.1. Мікробіологічний контроль.	72
8.2. Показники росту і синтезу цільового продукту	75
8.2.1. Концентрація біомаси	75
8.2.2. Концентрація цільового продукту.....	75
8.2.3. Концентрація джерела Карбону і Нітрогену	77
Визначення концентрації вуглеводів.....	77
Визначення концентрації Нітрогену.....	79
8.3. Показники якості готового продукту	80
8.3.1 <i>Ідентифікація батуміну.....</i>	<i>80</i>
8.3.2 <i>Кількісне визначення батуміну в лікарському препараті</i>	<i>81</i>
8.3.3 <i>Визначення мікробіологічної чистоти лікарського препарату</i>	<i>83</i>
8.3.4 <i>Визначення однорідності лікарського препарату</i>	<i>84</i>
8.3.5 <i>Визначення токсичності лікарського препарату</i>	<i>85</i>
РОЗДІЛ 9. АНАЛІЗ ПЕРСПЕКТИВ ВПРОВАДЖЕННЯ СИСТЕМИ ЕКОЛОГІЗАЦІЇ ВИРОБНИЦТВА	94
9.1. Характеристика рідких відходів виробництва батуміну	94
9.1.1 <i>Типи рідких відходів.</i>	<i>94</i>
9.1.2. <i>Розрахунок об'єму відходів</i>	<i>95</i>
9.1.2. <i>Утилізація рідких відходів</i>	<i>96</i>
9.2. Характеристика газоподібних відходів виробництва батуміну	98
9.2.1. <i>Розрахунок об'ємів відходів</i>	<i>98</i>
9.2.2. <i>Утилізація газоподібних відходів.....</i>	<i>98</i>
9.3. Характеристика твердих відходів виробництва батуміну.	99
9.3.1. <i>Розрахунок об'ємів відходів.</i>	<i>99</i>
9.3.2. <i>Утилізація твердих відходів.....</i>	<i>100</i>
РОЗДІЛ 10. АНАЛІЗ НОРМАТИВНО-ТЕХНІЧНОЇ ДОКУМЕНТАЦІЇ ТА НАУКОВО-ТЕХНІЧНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	102
Список використаної літератури:.....	104
Додатки.....	113

Вступ

Досвід розвитку нових індустріальних країн Південно-Східної Азії показує, що переважна частина технологічних активів поступає до національної економіки країни, яка розвивається, саме на перших етапах її переходу до економіки знань, за умов створення сприятливих внутрішніх умов для трансферу технологій. На сьогодні ефективне залучення новітніх технологій, зокрема, біотехнології в економіку України, є завданням пріоритетного значення.

Питанню сучасного розвитку біотехнології присвячено дослідження експертів ОЕСР, зарубіжних та вітчизняних вчених, зокрема, Й. Рогова, К. Лебєдєва, П. Харченка, В. Швеця, Л. Жиганової, Н. Кузьминої, Я. Блюма, Д. Гродзинського, О. Дембновецького, О. Левчука, В. Новікова, Ю. Сидорова, О. Швед тощо. У працях зазначених авторів висвітлюються питання важливості біотехнології, яка буде визначати положення нації у ХХІ ст. на світовій арені; специфіки розвитку цієї технології у різних країнах світу; широкого використання її протягом останніх двох десятиріч у різноманітних видах діяльності, що призвело до зростання її комерційного потенціалу в промислово розвинутих країнах та до загострення проблеми розвитку та використання у країнах, що розвиваються або завершують процес трансформації до ринково-орієнтованої економіки.

У класичному розумінні біотехнологія – це наука про методи і технології виробництва різних речовин і продуктів із використанням природних біологічних об'єктів і процесів. Біотехнологія є вагомим і перспективним фактором розвитку світового виробництва, застосовується практично у всіх секторах світової економіки та демонструє значні потенційні переваги. Так, біотехнологія допомагає боротися з хворобами, розвиваючи та покращуючи медицину, забезпечуючи населення планети доступними, життєво необхідними препаратами. Значний потенціал біотехнологія має у боротьбі з голодом і може вирішити проблему браку їжі для країн, що розвиваються. Біотехнологія допомагає довкілллю, дозволяючи знизити ризик токсичного

забруднення ґрунтів і ґрунтових вод, підвищити ефективність сільського господарства. У промисловості багато технологій замінюються біотехнологіями, що використовують ферменти і мікроорганізми, зокрема, у харчовій галузі, у сфері переробки сільськогосподарських, промислових і побутових відходів, очищення і використання стічних вод, одержання біогазу і добрив.

Розвиток біотехнології у фармацевтичній галузі позитивно впливає на створення принципово нових лікарських засобів, що більш ефективно та вибірково діють на патологічні процеси. Застосування біотехнологічних препаратів можна порівняти з революцією у лікуванні при таких тяжких хронічних захворюваннях, як цукровий діабет, ревматоїдний артрит, онкологічні захворювання, анемія. Сьогодні неможливо уявити сучасну медицину без таких біотехнологічних препаратів, як рекомбінантні інсуліни та їх аналоги, еритропоетини, пегільовані інтерферони, низькомолекулярні гепарини, гранулоцитарні колонієстимулювальні фактори, моноклональні антитіла.

Майбутнє медицини буде визначатися саме біотехнологіями та створенням за їх допомогою нових лікарських препаратів — більш ефективних та безпечних, таких, що вибірково діють на патологічні процеси в організмі при цілій низці тяжких захворювань, які раніше були невиліковними.

У медицині біотехнологічні прийоми і методи грають головну роль при створенні нових біологічно активних речовин і лікарських препаратів, призначених для ранньої діагностики і лікування різноманітних захворювань.

На базі мікробіологічного синтезу з використанням генно-інженерних технологій розроблено і здійснюється виробництво інсуліну і гормону росту людини, інтерферонів та інших біологічно активних білків. Розробляються генно-інженерні технології отримання противірусних вакцин. Найважливішою

для медичної біотехнології галуззю стала клітинна інженерія, зокрема, технологія отримання моноклональних антитіл. На їх основі розроблені і використовуються нові системи імунологічного аналізу — радіоімунологічний та імуноферментний. Великі можливості біотехнології у виробництві ферментів, амінокислот, полісахаридів, вітамінів та ін. Важливою галуззю біотехнології є розробка ефективних промислових технологій для одержання у великих кількостях антибіотиків.

Антибіотики — найбільший клас фармацевтичних сполук, які одержуються мікробіологічним синтезом та здатні пригнічувати розвиток організмів або викликати їхню загибель.

Актуальність

Дослідження батуміну — антибіотика, ізольованого з роду бактерій *Pseudomonas* є актуальним. Унікальна селективність батуміну щодо представників роду *Staphylococcus* робить його препаратом вибору для боротьби з назальним носійством і експрес-діагностики цього патогену.

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Батумін є унікальним антибіотиком, який був відкритий українськими вченими Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАНУ. Антибіотик не має аналогів серед відомих груп антибіотиків і характеризується високою селективною активністю щодо всіх випробуваних штамів стафілококів, у тому числі штамів полірезистентних до антибіотиків[1]. Батумін — це лінійний полієновий антибіотик, що кодується великим гібридним опероном полікетидсинтаз і нерибосомної пептидсинтетази, що складається з 30 генів[2].

Типовим продуцентом батуміну є бактерії *Pseudomonas batumici*.

Батумін є діастереоізомером калімантацину, який має таку ж хімічну структуру. Структурна формула антибіотика наведена на рис. 1.1, а фізико-хімічна характеристика наведена в таблиці 1.1[3,4].

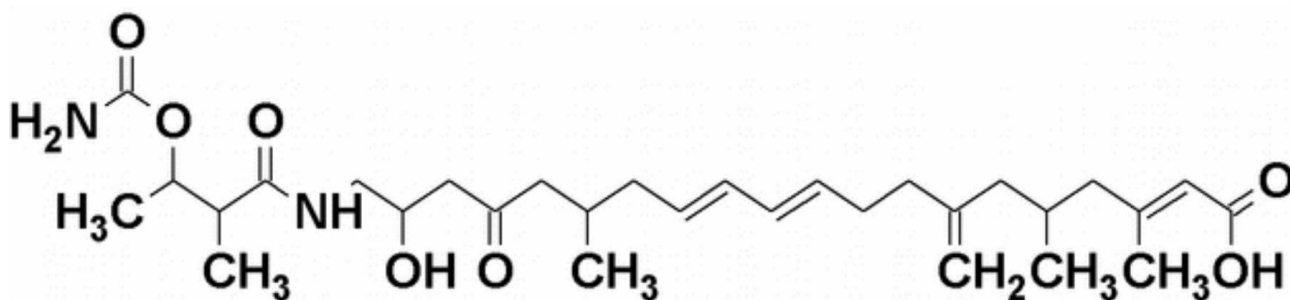


Рис. 1.1 Структурна формула батуміну

Оскільки батумін відкритий у ХХІ столітті, то він є відносно новим антибіотиком, який потребує більш детального вивчення. Хоча хімічна будова даного антибіотика добре вивчена, на даний момент у сучасній літературі не міститься повідомлень про можливість хімічного синтезу батуміну. Це може бути пов'язаним із складною структурою молекули батуміну, що свідчить про використання великої кількості реагентів та його можливу багатоетапність.

Антибіотик батумін використовується в медицині для лікування і профілактики стафілококових інфекцій.

					НУХТ БТЕК 04.02.09 КР ПЗ					
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата						
Розроб.		Михальська Ю.С.			Розділ Характеристика цільового продукту	Лім.	Арк.	Акрушів		
Перевір.		Буценко Л. М.						10	4	
Консульт.						10				
Н. Контр.						Кафедра БТМ				
Затверд.		Стабніков В. П.								

Фізико-хімічна характеристика батуміну	
Брутто-формула	$C_{30}H_{27}N_2O_7$
Молекулярна маса	548.7
Максимум УФ поглинання	225 нм
Кут обертання	$[\alpha]_d^{25} = -13,5$
Фізичний стан	Олія
Колір	Яскраво-жовтий

Відповідно до сучасної літератури знайдено інформацію про 3 лікарські препарати, які містять в своєму складі батумін, а саме: «Діастаф» (рис.1.1), «Батумінова мазь 0,1%» та «Батумін» [5].

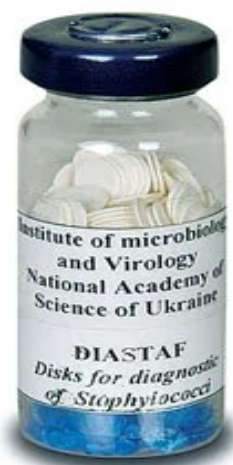


Рис. 1.1 Препарат на основі батуміну «Діастаф» [6]

При проектуванні виробництва антибіотика батуміну лікарською формою буде мазь з цим антибіотиком.

Форма випуску. Мазь назальна, яскраво-жовтого кольору.

Фармакодинаміка. Батумін виявив високу біологічну активність щодо всіх досліджуваних штамів, що належать до 10 видів роду *Staphylococcus* (мінімальна інгібуюча концентрація антибіотику – 0,25–0,5 мкг/мл); виявив помірну активність щодо ентеробактерій сальмонели, роди *Bordetella*, *Escherichia*, *Klebsiella* (МК 8–64 мкг/мл) і практично не пригнічував жодних штамів мікрококів, стрептококів та спороутворюючих

бактерій включаючи *Clostridium sporogenes* (МІК 256 мкг/мл або вище). Штами дріжджів *Candida tropicalis*, *Candida utilis*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* та *Aspergillus niger* були стійкими до батуміну. Антибіотична активність антибіотика батуміну залежала від концентрації клітин тест-культури та рН середовища і була найбільшою при рН 5 [7,8].

Показано, що унікальний антимікробний ефект батуміну залежить від наявності подвійних зв'язків, CONH_2 –, COOH – та OH -груп. Заміна або модифікація кожної з цих груп знижувала активність щодо стафілокока і якісно змінювала антимікробний спектр антибіотика.

У той же час батумін може бути націлений на більш широкий спектр аміноацил-тРНК синтетази, включаючи лейцил-тРНК синтетазу. Паралоги різноманітного лейцину-тРНК-синтетази в геномі *P. batumici* вказують на те, що цей білок може бути основною метою батуміна [8].

Було досліджено, що батумін може пригнічувати ріст *Staphylococcus aureus*, зв'язуючись з білком FabI і порушуючи біосинтез жирних кислот у бактерій [2].

Спосіб застосування та дози. Невелику кількість мазі (розміром приблизно з голівку сірника) поміщати у кожен ніздрю 2–3 рази на добу протягом 5–7 днів.

При печінковій та нирковій недостатності змінювати дозу не потрібно.

Після застосування мазі закрити ніздрі носа пальцями, натискуючи кілька разів на крильця носа з обох боків, та м'яко потерти крильця носа для кращого розподілення мазі всередині носа.

Звільнення носової порожнини від збудників зазвичай відбувається через 3–5 днів лікування.

Мазь не варто наносити на шкіру обличчя та тіла, також не встановлено безпечність використання даної мазі для дітей [9].

Показання до застосування. Мазь застосовується для місцевого лікування інфекцій носової порожнини, спричинених *Staphylococcus aureus*, включаючи штамми резистентні до антибіотиків.

Протипоказання. Підвищена чутливість до батуміну чи до будь-якого з інших компонентів препарату. Батумін у даній лікарській формі не призначений для офтальмологічного та інтраназального застосування.

Оскільки батумін відкритий у ХХІ столітті, то він є відносно новим антибіотиком, який потребує більш детального вивчення. Хоча хімічна будова даного антибіотика добре вивчена, на даний момент у сучасній літературі не міститься повідомлень про можливість хімічного синтезу батуміну. Це може бути пов'язаним із складною структурою молекули батуміну, що свідчить про використання великої кількості реагентів та його можливу багатоетапність.

РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

Антистафілококовий антибіотик батумін був виділений із представника ризосферних бактерій *P. batumici* в Інституті мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України. Комбінованим мутагенезом (УФ-опроміненням і нітрозогуанідином) було отримано 4 мутантних штами представників даного виду, кожен з яких синтезує батумін. Недоліком природного штаму-продуцента *P. batumici* 3187 був низький рівень біосинтезу антибіотика [10].

Мутантний штам *P. batumici* 17 в порівнянні з природним штамом-продуцентом має підвищену біосинтетичну активність, що становить 100-120 мг/л антибіотика. Його використовувався для напрацювання батуміну в умовах напівпромислового виробництва[11].

Згодом було отримано мутантний штам *P. batumici* ІМВ В-7532, який в порівнянні з штамом *P. batumici* 17 має високу біосинтетичну властивість (170-190мг/л антибіотика) та стабільність [12].

У штама *P. batumici* В-321 біосинтетична активність залежить від інтенсивності аерації, при збільшенні аерації збільшується біомаса та вихід антибіотика (175-180 мг/л) [4].

Узагальнені дані щодо синтезу батуміну різними штамами наведені в табл. 2.1. Так найбільшу кількість антибіотика синтезує штам *P. batumici* ІМВ В-7532 (170-190 мг/л), тоді коли штам *P. batumici* 17 та штам *P. batumici* 3187 утворюють лише 100-120 та 20-25 мг/л батуміну відповідно. Крім того мутантний штам *P. batumici* ІМВ В-7532 є відносно стабільним в порівнянні з двома іншими штамами.

					НУХТ БТЕК 04.02.09 КР ПЗ						
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата							
Розроб.		Михальська Ю.С.			Розділ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента			Літ.	Арк.	Акрушів	
Перевір.		Буценко Л. М.								14	8
Консульт.								Кафедра БТМ			
Н. Контр.											
Затверд.		Стабніков В. П.									

Для того щоб визначити який штам бактерій є найбільш економічно вигідним ми провели розрахунок вартості поживного середовища (табл. 2.2). Оскільки отримання батуміну, з різних штамів даного мікроорганізму здійснюють культивуванням на середовищі однакового складу, ми не можемо визначити який зі штамів культури *P. batumici* є найефективнішим для синтезу антибіотика.

Тому для остаточного вибору найефективнішого біологічного агента розрахуємо умовну вартість 1 г цільового продукту (табл. 2.3). Дані, наведені у табл. 2.3, засвідчують, що умовна вартість батуміну синтезованого штамом *P. batumici* IMB B-7532 є найнижчою (0,0181 грн/г), а кількість утворюваного продукту найвищою (3,45 г/год) в порівнянні з іншими штамми.

Таблиця 2.1

Порівняльна характеристика штамів-продуцентів батуміну

Продуцент	Склад поживного середовища, г/л	Концентрація батуміну, мг/л	Умови культивування	Література
<i>P. batumici</i> 3187	Глюкоза-15 Сечовина-1,3 K ₂ HPO ₄ -0,5 NaCl-0,5 MgSO ₄ -0,25 суміш мікроелементів	20-25	25 °C, 72 год	Esipov S.E., Kiprianova E.A. Batumin, a novel antibiotic produce by <i>Pseudomonas batumici</i> nov. sp. 3187 // 5 th Int. Conf. on Chemical Synthesis of Antibiotics and Related Microbial Products Hungarian Acad. Sci., Budapest, 1996. - Abstr. P. 14.
<i>P. batumici</i> 17	(мг/л): FeSO ₄ -200, ZnSO ₄ -10, MnCl ₂ -3, CoCl ₂ -20, NiCl ₂ -2, Na ₂ MoO ₄ -3	100-120	pH 7,2-7,8, 28 °C, 55 год.	Пат. №23609 UA Штам <i>Pseudomonas batumici</i> 17 – продуцент антистафілококового антибіотика батуміну/Смірнов В. В., Кіпріанова О. А. Чуркіна Л. М., Гарагуля О. Д., Муквич М. С. Опубл. 15.11 2000 Бюл. №6
<i>P. batumici</i> IMB B-7532		170-190		Пат. №107822 UA Штам <i>Pseudomonas batumici</i> 1 MB B-7532 – продуцент батуміну / Чуркіна Л. М., Кіпріанова О. А., Клочко В. В., Авдєєва Л. В. Опубл. 26.06.2016 Бюл. №12

<i>P. batumici</i> B-321		175-180	25 °C, 50-55 год, посилена аерація	Klochko V. V. Biosynthesis and properties of antibiotic batumin. <i>Biotechnologia acta</i> . 2014, 7(6): 46-50. doi:10.15407/BIOTECH7.06.046
-----------------------------	--	---------	---	---

Таблиця 2.2

Вартість поживних середовищ для культивування продуцентів антибіотику батуміну

Продуцент	Компонент поживного середовища	Концентрація у ПС г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн.) на 1 л середовища	Джерело інформації*
<i>P. batumici</i> 3187 <i>P. batumici</i> 17 <i>P. batumici</i> IMB B-7532 <i>P. batumici</i> B-321	Глюкоза	15	50	0,75	1
	Сечовина	1,3	60	0,078	1
	KH ₂ PO ₄	0,5	120	0,06	1
	NaCl	0,5	5,50	0,0275	1
	MgSO ₄ × 7H ₂ O	0,25	35	0,00875	1
	FeSO ₄ × 7H ₂ O	0,2	40	0,008	2
	ZnSO ₄ × 7H ₂ O	0,01	80	0,0008	1
	MnCl ₂	0,003	186	0,000558	1
	CoCl ₂ × 6H ₂ O	0,02	2700	0,054	1
	NiCl ₂	0,002	220	0,00044	3
	Na ₂ MoO ₄	0,003	2430	0,00729	1
	Вартість 1 л середовища – 0,99 грн				

Примітка. * – Ціни наведено станом на квітень 2022 р. 1 - <https://prom.ua/ua>, 2 - <https://klebrig.com.ua/>, 3 - <https://flagma.ua>.

Таблиця 2.3

Умовна вартість 1 г антибіотику батуміну, в результаті культивування штамів культури *P. batumici*

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація батуміну, мг/л	Тривалість культивування, год	Кількість утвореного батуміну за год, г/год	Умовна вартість 1 мг цільового продукту, грн/мг
<i>P. batumici</i> 3187	0,99	20-25	72	0,35	0,014
<i>P. batumici</i> 17		100-120	55	2,18	0,0182
<i>P. batumici</i> IMB B-7532		170-190	55	3,45	0,0181
<i>P. batumici</i> B-321		175-180	55	3,3	0,0183

2.2. Розрахунок складу поживного середовища

Тривалість культивування 55 год, концентрація батуміну 0,18 г/л, концентрація біомаси 8 г/л [13].

Розрахунок вмісту в середовищі джерела карбону.

Потреби для синтезу батуміну. Як джерело вуглецю використовується глюкоза. Розрахуємо скільки вуглецю міститься в 180 мг батуміну. Молекулярна маса батуміну ($C_{30}H_{27}N_2O_7$) становить 549. Отже, у 549 г батуміну міститься 360 г Карбону, а в 0,18 г батуміну $(360 \times 0,18) / 549 = 0,12$ г Карбону.

Далі розрахуємо у скількох грамах глюкози міститься 0,12 г Карбону.

Молекулярна маса глюкози ($C_6H_{12}O_6$) становить 180. Отже, у 180 г глюкози міститься 72 г Карбону, а 0,12 г Карбону міститься у $(0,12 \times 180) / 72 = 0,3$ г глюкози.

Враховуючи, що при вирощуванні мікроорганізмів на вуглеводах (глюкозі) близько 40 % субстрату окиснюється до CO_2 для одержання енергії, необхідної для конструктивного метаболізму, вміст глюкози у середовищі становитиме $(0,3 \times 0,4) + 0,3 = 0,42$ г/л.

Потреби для синтезу біомаси. У біомасі міститься 50 % Карбону, отже вміст Карбону у 8 г біомаси становить $8 \times 0,5 = 4$ г. Ця кількість Карбону міститься у $(4 \times 180) / 72 = 10$ г глюкози.

Враховуючи 40% втрат субстрату на «холосте окислення», для одержання 8 г/л біомаси у середовище необхідно внести $(10 \times 0,4) + 10 = 14$ г/л глюкози. Отже, загальний вміст глюкози у середовищі, необхідний для синтезу біомаси (8 г/л) та батуміну (0,18 г/л), становить $14 + 0,42 = 14,42$ г/л.

У складі середовища міститься 15 г/л глюкози, чого вистачає для синтезу біомаси та антибіотика.

Розрахунок вмісту в середовищі джерела азотного живлення.

Потреби для синтезу біомаси. Припустимо, що у біомасі міститься 10 % Нітрогену. Таким чином, у 8 г біомаси вміст азоту (за елементом N) становить 0,8 г.

Продуцент батуміну асимілює як джерела азотного живлення органічний Нітроген. Для одержання батуміну в промислових умовах використовується середовище, яке містить як джерело органічного Нітрогену сечовину ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$).

Розрахуємо кількість сечовини, необхідну для одержання 8 г/л біомаси. Молекулярна маса ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$) становить 60. Отже, у 60 г сечовини міститься 28 г Нітрогену (N), тоді 0,8 г Нітрогену буде міститись у $(60 \times 0,8) / 28 = 1,7$ г сечовини. Для одержання 8 г/л біомаси вміст сечовини в середовищі культивування повинен становити 1,7 г/л.

Потреби для синтезу батуміну. Нітроген входить до складу не тільки біомаси, а й батуміну. Розрахуємо вміст сечовини в середовищі, необхідної для одержання 0,18 г/л батуміну. Молекулярна маса батуміну становить 549. У 549 г батуміну міститься 28 г Нітрогену (N), тоді у 0,18 г батуміну вміст Нітрогену становить $(0,18 \times 28) / 549 = 0,009$ г. Далі розрахуємо, в якій кількості сечовини міститься ця кількість Нітрогену. У 60 г сечовини міститься 28 г Нітрогену (N), тоді 0,009 г Нітрогену буде міститись у $(60 \times 0,009) / 28 = 0,019$ г сечовини.

Для одержання 0,18 г/л батуміну вміст сечовини в середовищі повинен становити 0,019 г/л.

Відповідно до проведених розрахунків для синтезу 8 г/л біомаси та 0,18 г/л батуміну необхідно 1,719 г/л сечовини, тоді як у складі середовища міститься лише 1,3 г/л. Отже, необхідно збільшити концентрацію сечовини в середовищі.

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

Бактерії *P. batumici* це гармнегативні палички розміром 2,2 x 1,0 мкм. Рухомі, з кількома (найчастіше 2) полярними джгутиками, довжина джгутиків 6-8 мкм з 4-6 хвилями. (рис 2.1, 2.2)

P. batumici не утворюють спор або мікрокапсул, не утворюють жовтого кольору, зелений флуоресцентний пігмент, характерний для багатьох видів *Pseudomonas*.

Добре ростуть на звичайних поживних середовищах. Оптимальна температура росту 27°C, при 37°C спостерігається слабкий ріст, а при 40°C ріст відсутній.

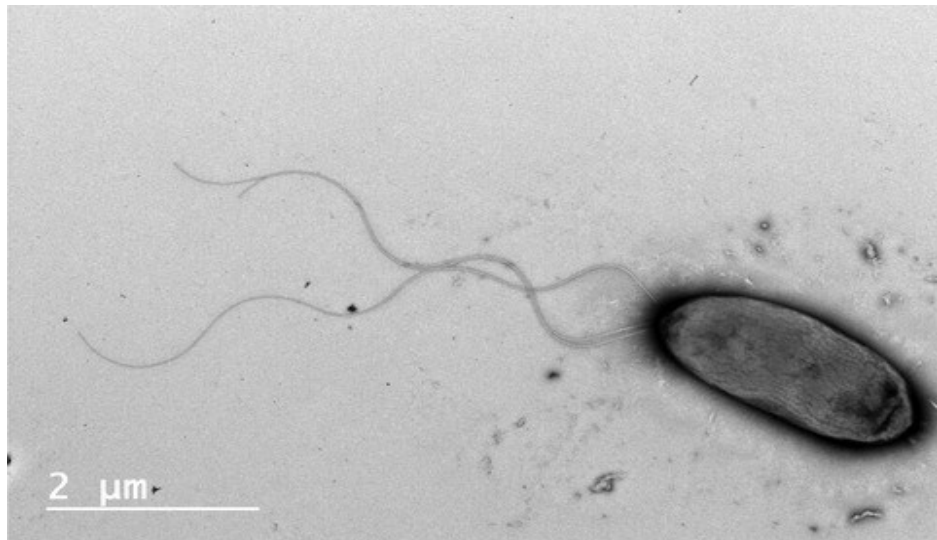


Рис. 2.1 *Pseudomonas batumici* під мікроскопом [14]



Рис. 2.2 *Pseudomonas batumici* під мікроскопом [15]

На м'ясо-пептонному агарі колонії гладкі, круглі, блискучі, пастоподібні (рис. 2.3).

У м'ясо-пептонному бульйоні утворюють рівномірну муть, та не утворюють жовто-зеленого флуоресцентного пігменту.

На середовищі з глюкозою утворюють жовто-бурий пігмент, що дифундує в середовище, та екстрагується хлороформом. Колонії забарвлені в жовто-бурий колір, часто темніший ніж середовище.

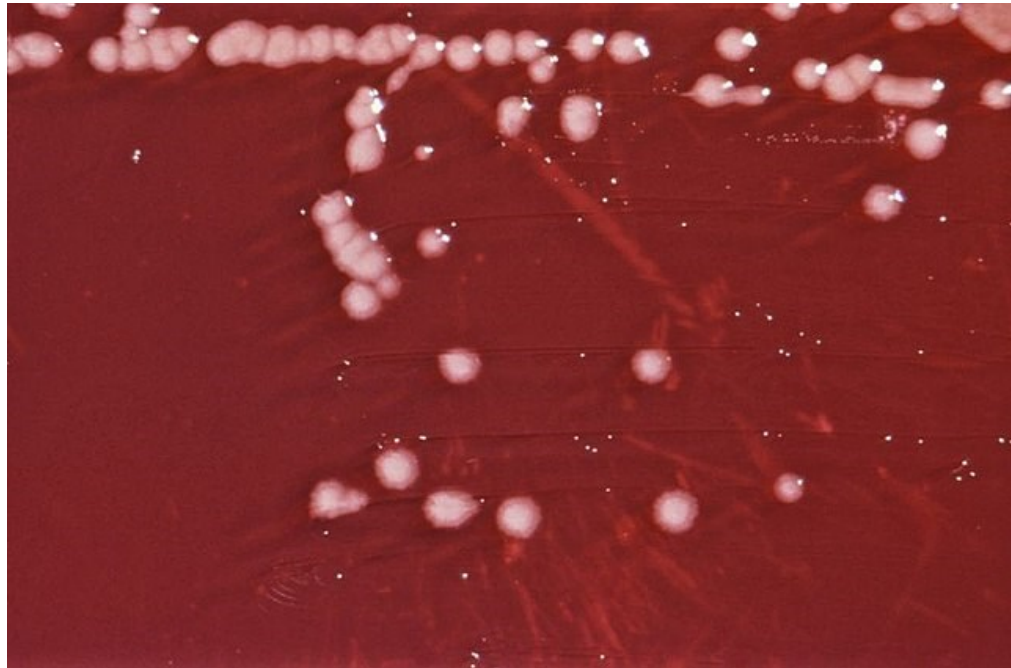


Рис. 2.3 Ріст *Pseudomonas* на м'ясо-пептонному агарі [16]

P. batumici є строгим аеробом. Використовує глюкозу тільки по окисному шляху. Оксидазопозитивний по Ковачу. Володіє аргініндегідрогеназною, леванцукрозною і лецитиназною активністю. Нітрати не відновлює. Не потребує жодних факторів росту.

Не гідролізує желатин, крохмаль та ескулін.

Не окиснює глюконат та не перетворюють хінну кислоту в протокатехову. Чутливий до нітрофурантоїну.

Утилізує мінеральні форми азоту (аміак, нітрати). В якості єдиного джерела вуглеводу використовує D-галактозу, L-арабінозу, D-манозу, фруктозу, сахарозу, трегалозу, глюконат, оцтову, малонову, бурштинову, малеїнову,

фумарову, глутарову, молочну, ізолимонну, лимонну, аконіктинову, щавлевооцтову, ітаконову, яблучну, аспаргінову, глутамінову, γ -аміномасляну та хінну кислоти, маніт, інозит, гліцерин, α -аланін, β -аланін, ізолейцин, валін, аргінін, орнітин, цитрулін, бетаїн, саркозин, Не використовує аліфатичні спирти, жирні кислоти, ароматичні сполуки.

Володіє активність у відношенні до *Staphylococcus aureus*, *Erwinia aroidea*, фітопатогенних видів *Pseudomonas*, *Xanthomonas campestris* та *Xanthomonas malvacearum*, частково пригнічує ріст *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium Michiganense*, *Agrobacterium tumefaciens*. Не проявляє антогоністичну активність по відношенню до дріжджів та грибів [17,18].

2.4. Систематика

Домен: Бактерії

Тип: Протеобактерії

Клас: Гамма-протеобактерії

Ряд: *Pseudomonadales*

Родина: *Pseudomonadaceae*

Рід: *Pseudomonas*

Вид: *Pseudomonas batumici*

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба у мазі Батумін

Високоактивний по відношенню стафілококів антибіотик батумін що продукується штамом *Pseudomonas batumici* ІМВ В-7532, має унікальну вибіркову активність до всіх досліджуваних видів стафілококів (мінімальна інгібуюча концентрація 0,25 мкг/мл) та проявляє помірну активність по відношенню до представників інших таксономічних груп. Селективність батуміну до стафілококів – його принципова відмінність від антибіотиків широкого спектру. У мікроорганізмів - представників коменсальної мікрофлори мінімізовано ризик формування резистентності до батуміну [12].

Батумін знижує утворення біоплівки стафілококами та іншими мікроорганізмами, що дозволяє розглядати його не тільки як антимікробний препарат, але і як речовину, що має антиперсистентну дію до патогенів [19].

Стафілококи належать до найбільш поширених умовно патогенних мікроорганізмів. Захворювання, які обумовлені *Staphylococcus aureus* характеризуються великим розмаїттям локалізації і клінічних проявів. Частіше за все стафілококова інфекція перебігає у вигляді хронічних процесів, рідше в загостреній формі. Найбільш небезпечними джерелами стафілококової інфекції є не хворі з гострою, клінічно вираженою формою інфекції (які зазвичай ізолюються), а носії. З епідеміологічної точки зору бактеріоносії є одним із резервуарів інфекції і основних джерел зараження. Крім того, самі носії належать до групи ризику, у них частіше виникають різні форми інфекційної патології в порівнянні з не носіями. Носійство умовно патогенних мікроорганізмів не може розцінюватися за абсолютно безпечний стан, оскільки під впливом факторів зовнішнього середовища (екологічні порушення, умови харчування, стресові стани та ін.), супутніх захворювань, еволюційних змін у популяції бактерій (активація факторів вірулентності) нерідко так зване здорове носійство

					НУХТ БТЕК 04.02.09 КР ПЗ							
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	Розділ 3. Техніко-економічне обґрунтування			Лім.	Арк.	Акрушіє		
Розроб.	Михальська Ю.С.									22	9	
Перевір.	Буценко Л. М.							Кафедра БТМ				
Консульт.												
Н. Контр.												
Затверд.	Стабніков В. П.											

трансформується в активний інфекційний процес.

У здорових носіїв збудник, як правило, виявляється на слизовій оболонці верхніх дихальних шляхів, переважно в передніх відділах носових ходів. Носійство золотистого стафілокока буває гострим, хронічним або транзиторним, що залежить від особливостей штаму, стану макроорганізму і конкуруючої мікрофлори. У хронічних носіїв один вид золотистого стафілокока може виявлятися протягом багатьох місяців і років. Тривалі спостереження свідчать про те, що приблизно 20% (12- 30%) людей відносяться до гострих і хронічних носіїв, 30% (16-70%) - до транзиторних, а в 50% (16-69%) золотистий стафілокок взагалі не виявляють [20].

Препарати на основі батуміну є високоефективними у боротьбі з назальним носійством полірезистентних до антибіотиків госпітальних штамів золотавих стафілококів.

В 1 г мазі міститься 1 мг батуміну. Мазь наноситься тонким шаром у кожную ніздрю, 2–3 рази на добу. Тривалість лікування інфекції даним препаратом становить 5-7 днів. Мазь не варто наносити на шкіру обличчя та тіла, також не встановлено безпечності використання даної мазі для дітей. Середня доза для 1 дорослої людини на 1 добу складає 1 г мазі. Опираючись на вище наведені дані, приймемо, що тривалість лікування складе 6 днів, а максимальна доза на цей період – 6 мг батуміну [8].

Таблиця 3.1

Категорія хворих	Кількість мазі на добу, г	Вміст батуміну в 1 г мазі, мг	Курс лікування, діб	Максимальна кількість батуміну на 1 особу, мг	Кількість хворих станом на 2021 рік, осіб	Загальна потреба в батуміні на всіх хворих, кг
Дорослі із назальним носійством стафілококу	1	1	6	6	8 226 086	49,36

Примітка. Для розрахунку було прийнято до уваги, що для лікування пропонується препарат Батумнінова мазь 0,1%, (15 г у тубі) зі вмістом батуміну 1 мг в 1 г такої мазі.

За статистичними даними 20% людей є хронічними носіями назального носійства стафілококу. Згідно з Державною службою статистики України,

чисельність населення нашої держави складає 41 130 432 осіб. Виходячи з даної інформації, можна вважати що в 8 226 086 осіб щорічно виявляють даний стан, який потребує вживання заходів санації стафілококу [21].

Отже, відповідно до даних табл. 1.1 загальна потреба в батуміні для санації людей з назальним носійством складає 49,36 кг.

3.2 Розрахунок потужності виробництва

За даними Державного реєстру лікарських засобів, на українському ринку відсутні антибіотичні препарати, що містять батумін, а також відсутні дані про виробництво цих препаратів в нашій країні. Але деякі препарати містять АФІ, які також виявляють антимікробну дію проти стафілококових інфекцій. До таких препаратів належать «Бактробан», «Левомеколь», «Банеоцин» тощо [22]. У таблиці 3.2 наведено дані щодо препаратів, що застосовуються для лікування стафілококових інфекцій.

Таблиця 3.2

Лікарські препарати для лікування стафілококових інфекцій, зареєстровані в Україні

Назва препарату	Лікарська форма	Виробник
Бактробан	Мазь	Глаксо Оперейшнс ЮК Лімітед, Великобританія/Glaxo Operations UK Ltd, United Kingdom.
Левомеколь	Мазь	ПрАТ Фармацевтична фабрика "Віола". Україна
Банеоцин	Мазь	Лек Фармацевтична компанія д.д., Словенія

Враховуючи те, що на ринку України офіційно не представлено препаратів батуміну та не впроваджено у виробництво подібні лікарські засоби, а також той

факт, що частина пацієнтів з назальним носійством буде використовувати препарати з іншими АФІ, які теж є бактерицидними для *Staphylococcus aureus*, планується виробництво антибіотику для задоволення потреб населення обсягом 15 %:

$$8\,226\,086 \cdot 0,15 = 1\,233\,912,9 \text{ осіб}$$

Зважаючи на те, що ефективне лікування вимагає заміни препарату, щоб уникнути підвищеної резистентності, максимальна доза батуміну на людину була встановлена як 6 мг на цикл лікування. Тому на обраний період лікування потрібно батуміну:

$$1\,233\,912,9 \cdot 0,006 = 7,4 \text{ кг/рік}$$

Тому, щоб забезпечити даним лікарським засобом фармацевтичний ринок України, потрібно одержувати 7,4 кг батуміну в рік.

3.3. Розрахунок об'єму ферментера і кількості виробничих циклів

Потужність виробництва антибіотику батуміну становить $G_{\text{гп}} = 7,4 \text{ кг/рік}$. Субстанцію антибіотика одержують у сухому вигляді із залишковою вологою $W = 5\text{--}10 \%$, в результаті чого, вміст сухих речовин у готовому продукті буде $CP = 0,9\text{--}0,95$ (частка). Батуміновий продуцент – *Pseudomonas batumici* IMB B-7532 синтезує 0,18 г батуміну на 1 л культуральної рідини [23].

З огляду на те що готовий продукт у вигляді мазі має тривалий термін зберігання (3 роки), допускаємо що культивування продуценту буде здійснюватися 2 рази на рік, тоді обрана кількість субстанції буде вироблятися за $T_{\text{рд}} = 45$ робочих трудоднів. Звідси, кількість виробничих циклів на рік складає:

$$N_{\text{цк}} = 24 \cdot T_{\text{рд}} / T_{\text{цф}} = 24 \cdot 45 / 80 = 13,5, \text{ тобто } 14 \text{ циклів,}$$

де $T_{\text{цф}}$ – робочий цикл ферментера, що включає тривалість виробничого біосинтезу (72 год), а також час підготовки ферментера до роботи (8 год):

- миття та огляд апарата (1,5 год);
- перевірка на герметичність (1 год);
- підігрів (0,5 год);
- стерилізація апарату (1 год);

- охолодження (1 год);
- завантаження середовища (1,5 год);
- засів (0,5 год);
- вивантаження культуральної рідини (1 год).

Кількість продукту за цикл складає:

$$G_{\text{цк}} = G_{\text{нт}} / N_{\text{цк}} = 7,4 / 14 = 0,529 \text{ кг/цикл.}$$

Враховуючи типові втрати цільового продукту під час сепарації (40%), об'єм культурального середовища, що вивантажується за один цикл, становить:

$$V_{\text{кр}} = K_1 \cdot G_{\text{цк}} \cdot C_{\text{гп}} / P_{\text{кр}}(1 - E_{\text{св}}) = 1,1 \cdot 0,529 \cdot 0,95 / (0,18 \cdot (1 - 0,4)) = 5,12 \text{ м}^3,$$

де K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій ($K_1 = 1,1 - 1,5$).

Проаналізувавши попередні розрахунки можна зробити висновок, що протягом виробничого циклу можна отримати $V_{\text{кр}} = 5,12 \text{ м}^3$ культуральної рідини.

При отриманні культуральної рідини необхідно враховувати її втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%.

5,12 м³ культуральної рідини ($V_{\text{кр}}$) можна отримати в інокуляторі, робочий об'єм якого має становити:

$$V_{\text{г}} = V_{\text{кр}} / (1 - E_{\text{ф}}) = 5,12 / (1 - 0,1) = 5,7 \text{ м}^3,$$

де $E_{\text{ф}}$ – втрати культуральної рідини в процесі біосинтезу.

Імовірний геометричний об'єм ферментера при $K_3 = 0,6$

$$V_{\text{мф}} = V_{\text{рф}} / K_3 = 5,7 / 0,6 = 9,5 \text{ м}^3$$

Знаходимо найближчий за геометричним об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{ф}} = 10 \text{ м}^3$.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення

$$K_{3\text{ф}} = V_{\text{кр}} / V_{\text{ф}} = 5,7 / 10 = 0,57 - \text{не перевищує заданого значення.}$$

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Кількість посівного матеріалу для інокулятора становить 10 % від об'єму поживного середовища.

Тоді кількість поживного середовища у ферментері буде складати:

$$V_{\text{пс1}} = V_{\text{роб.1}} / (1 + X_{\text{ф}}) = 5,7 / (1 + 0,1) = 5,18 \text{ м}^3,$$

де $X_{\text{ф}} = 0,1$ – доза поживного середовища для ферментера.

Кількість посівного матеріалу становить

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пс1}} = 5,7 - 5,18 = 0,52 \text{ м}^3.$$

Для отримання $0,52 \text{ м}^3$ посівного матеріалу в інокуляторі варто врахувати втрати, які утворюються в результаті краплиносу через колектор відпрацьованого повітря, що складають від 10 до 15%.

Тоді, кількість поживного середовища та інокуляту у посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{роб.2}} = V_{\text{пм1}} / (1 - E_{\text{па}}) = 0,52 / (1 - 0,1) = 578 \text{ л.}$$

Кількість посівного матеріалу складає 10 % від об'єму поживного середовища.

Тому, кількість поживного середовища в інокуляті буде складати:

$$V_{\text{пс2}} = V_{\text{роб.2}} / (1 + X_{\text{па}}) = 578 / (1 + 0,1) = 525,5 \text{ л,}$$

де $X_{\text{па}} = 0,1$ – доза посівного матеріалу для посівного апарату.

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 578 - 525,5 = 52,5 \text{ л.}$$

Кількість посівного матеріалу $V_{\text{пм2}} = 52,5 \text{ л}$ можна отримати під час культивування *Pseudomonas batumici* в ферментері з геометричним об'ємом

$$V_{\text{ін2}} = V_{\text{роб.2}} / K_{\text{зап}} = 578 / 0,6 = 963 \text{ л.}$$

Оскільки не існує інокуляторів об'ємом 963 л, приймемо найближчий за об'ємом - $V_{\text{сін}} = 1000 \text{ л}$ та уточнимо коефіцієнт заповнення.

$$K_{\text{зап2}} = V_{\text{роб.2}} / V_{\text{сін}} = 578 / 1000 = 0,57.$$

Щоб одержати 52,5 л посівного матеріалу в ферментері враховуємо втрати, що утворюються в результаті краплиносу через колектор відпрацьованого повітря (від 10 до 15%).

Тоді, кількість поживного середовища та інокуляту у посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{роб.3}} = V_{\text{пм2}} / (1 - E_{\text{ін}}) = 52,5 / (1 - 0,1) = 58,3 \text{ л.}$$

Кількість посівного матеріалу складає 10 % від об'єму поживного середовища.

Тому, кількість поживного середовища в інокуляті буде складати:

$$V_{\text{пс3}} = V_{\text{роб.3}} / (1 + X_{\text{ін}}) = 58,3 / (1 + 0,1) = 53 \text{ л,}$$

де $X_{\text{ін}} = 0,1$ – доза посівного матеріалу для посівного апарату.

Кількість посівного матеріалу для інокулятора становить

$$V_{\text{пм3}} = V_{\text{роб.3}} - V_{\text{пс3}} = 58,3 - 53 = 5,3 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту $V_{\text{пм3}} = 5,3$ л можна отримати під час культивування бактерій в ферментері з геометричним об'ємом

$$V_{\text{ін3}} = V_{\text{роб.3}} / K_{\text{зап}} = 58,3 / 0,6 = 97 \text{ л.}$$

Оскільки не існує інокуляторів об'ємом 963 л, приймемо найближчий за об'ємом - $V_{\text{сін}} = 100$ л та уточнимо коефіцієнт заповнення.

$$K_{\text{зап3}} = V_{\text{роб.3}} / V_{\text{сін}} = 58,3 / 100 = 0,58.$$

Щоб одержати 5,3 л посівного матеріалу в ферментері враховуємо втрати, що утворюються в результаті крапливиносу через колектор відпрацьованого повітря (від 10 до 15%).

Тоді, кількість поживного середовища та інокуляту у посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{роб.4}} = V_{\text{пм3}} / (1 - E_{\text{ін}}) = 5,3 / (1 - 0,1) = 5,9 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту (доза) становить 10 % від об'єму поживного середовища.

Тоді кількість поживного середовища в інокуляторі буде складати:

$$V_{\text{пс4}} = V_{\text{роб.4}} / (1 + X_{\text{ін}}) = 5,9 / (1 + 0,1) = 5,4 \text{ л,}$$

де $X_{\text{ін}} = 0,1$ – доза посівного матеріалу для посівного апарату.

Кількість посівного матеріалу для інокулятора становить

$$V_{\text{пм4}} = V_{\text{роб.4}} - V_{\text{пс4}} = 5,9 - 5,4 = 0,5 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту $V_{\text{пм4}} = 0,5$ л можна отримати під час культивування бактерій в ферментері з геометричним об'ємом

$$V_{\text{ін4}} = V_{\text{роб.4}} / K_{\text{зап}} = 5,9 / 0,6 = 9,8 \text{ л.}$$

Оскільки не існує інокуляторів об'ємом 9,8 л, приймемо найближчий за об'ємом - $V_{\text{сін}} = 10$ л та уточнимо коефіцієнт заповнення.

$$K_{\text{зап3}} = V_{\text{роб.3}} / V_{\text{сін}} = 5,9 / 10 = 0,59.$$

Кількість посівного матеріалу для засіву даного інокулятора $V_{\text{пм4}} = 0,5$ л можна отримати культивуванням продуцентів батуміну у колбах на качалці. Для цього будемо використовувати качалочні колби об'ємом $V_{\text{колб}} = 750$ мл та коефіцієнтом заповнення $K_{\text{зк}} = 0,2$.

Тоді, для отримання посівного матеріалу кількість колб становитиме:

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{пм4}} / (V_{\text{колб}} \cdot K_{\text{зк}}) = 500 / (750 \cdot 0,2) = 3,33.$$

Отже, для отримання посівного матеріалу необхідно 4 качалочні колби.

Виходячи з даних розрахунків, можна зробити висновок, що процес отримання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу батуміну у ферментері об'ємом 10 м^3 із змінним коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити у чотири етапи. Узагальнена інформація про стадії виробництва батуміну наведена у табл. 3.3.

Таблиця 3.3

Об'єми посівних апаратів для стадії підготовки посівного матеріалу та виробничого біосинтезу батуміну

№ стадії	Геометричний об'єм ферментера, $V_{\text{г}}, \text{л}$	Коефіцієнт заповнення, $K_{\text{зап}}, \text{частка}$	Робочий об'єм ферментера, $V_{\text{роб}}, \text{л}$	Об'єм поживного середовища, $V_{\text{пс}}, \text{л}$	Об'єм посівного матеріалу, $V_{\text{пм}}, \text{л}$
1	10000	0,57	5700	5120	580
2	1000	0,57	578	525,5	52,5
3	100	0,58	58,3	53	5,3
4	10	0,59	5,9	5,4	0,5
5	0,75×4 колб	0,2	—	0,5	0,15

За результатами вищенаведених розрахунків для біосинтезу батуміну *Pseudomonas batumici* IMB B-7532 приймаємо до встановлення один ферментер об'ємом 10 м^3 , один посівний апарат об'ємом 1000 л, один посівний апарат об'ємом 100 л і один інокулятор об'ємом 10 л, 4 качалочні колби об'ємом 750 мл.

Стадії культивування:

I стадія – культивування у лабораторних умовах (у колбах на качалці);

II стадія – культивування в інокуляторі об'ємом 10 л;

III стадія – культивування в посівному апараті об'ємом 100 л;

IV стадія – культивування в посівному апараті об'ємом 1000 л;

V стадія – виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 10 м³.

Розділ 4. Біосинтез цільового продукту.

4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента

Джерелом вуглецю та енергії при вирощуванні *Pseudomonas batumici* є глюкоза [12].

Оскільки у базі даних KEGG не містилося інформації про метаболічні шляхи мікроорганізму *Pseudomonas batumici*, для побудови схеми катаболізму глюкози, яка, зазвичай, є джерелом вуглецю при вирощуванні даної бактерії, було використано схему гліколізу для широкопоширеного представника роду *Pseudomonas* - *Pseudomonas putida*.

Базуючись на таких припущення та використовуючи як основу для створення катаболічного шляху глюкози гліколіз (шлях Ембдена-Меєргофа-Парнаса), що представлений у Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes для *P. putida*, наводимо схему перетворення глюкози (рис 4.1).

Глюкоза за участю системи цукрової фосфотрансферази (КФ: 2.7.1.199) перетворюється на глюкозу 6-фосфат, де остання за дії глюкозо-6-фосфат ізомерази (КФ: 5.3.1.9) перетворюється на β -D-фруктозу-6-фосфат. Фруктозо-1,6-дисфосфатаза (КФ: 3.1.3.11) та 6-фосфофруктокіназа (КФ: 2.7.1.11) активують перетворення β -D-фруктози-6-фосфат у β -D-фруктозу-1,6-дифосфат. Ферментативна дія фруктозодифосфат альдолази (КФ: 4.1.2.13) на β -D-фруктозу-1,6-дифосфат зумовлює перетворення її на гліцеральдегід 3-фосфат та гліцерин-фосфат, який під дією триозофосфат ізомерази (КФ: 5.3.1.1) перетворюється на гліцеральдегід 3-фосфат. До подальшого катаболізму глюкози залучається гліцеральдегід 3-фосфат, під дією гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (КФ: 1.2.1.12) він перетворюється на гліцерин-1,3-дифосфат, а під дією ферменту гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (КФ: 1.2.1.9) - на гліцерин-3-фосфат. Дія фосфогліцераткінази (КФ: 2.7.2.3) на гліцерин-1,3-дифосфат призводить до перетворення його на гліцерин-3-фосфат, який у свою чергу під дією 2,3-дифосфогліцерат-незалежної

					НУХТ БТЕК 04.02.09 КР ПЗ				
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	Розділ 4. Біосинтез цільового продукту	Літ.	Арк.	Акрушіє	
Розроб.		Михальська Ю.С.							
Перевір.		Буценко Л. М.					32	5 31	
Консульт.						Кафедра БТМ			
Н. Контр.									
Затверд.		Стабніков В. П.							

фосфогліцератмутази (КФ: 5.4.2.12) переходить у гліцерин-2-фосфат.

Під дією енолази (КФ 4.2.1.11) гліцерин-2-фосфат переходить у фосфоенолпіруват.

Кінцевою стадією перетворення є утворення пірувату з фосфоенолпірувату під дією піруваткінази (КФ 2.7.1.40) [24].

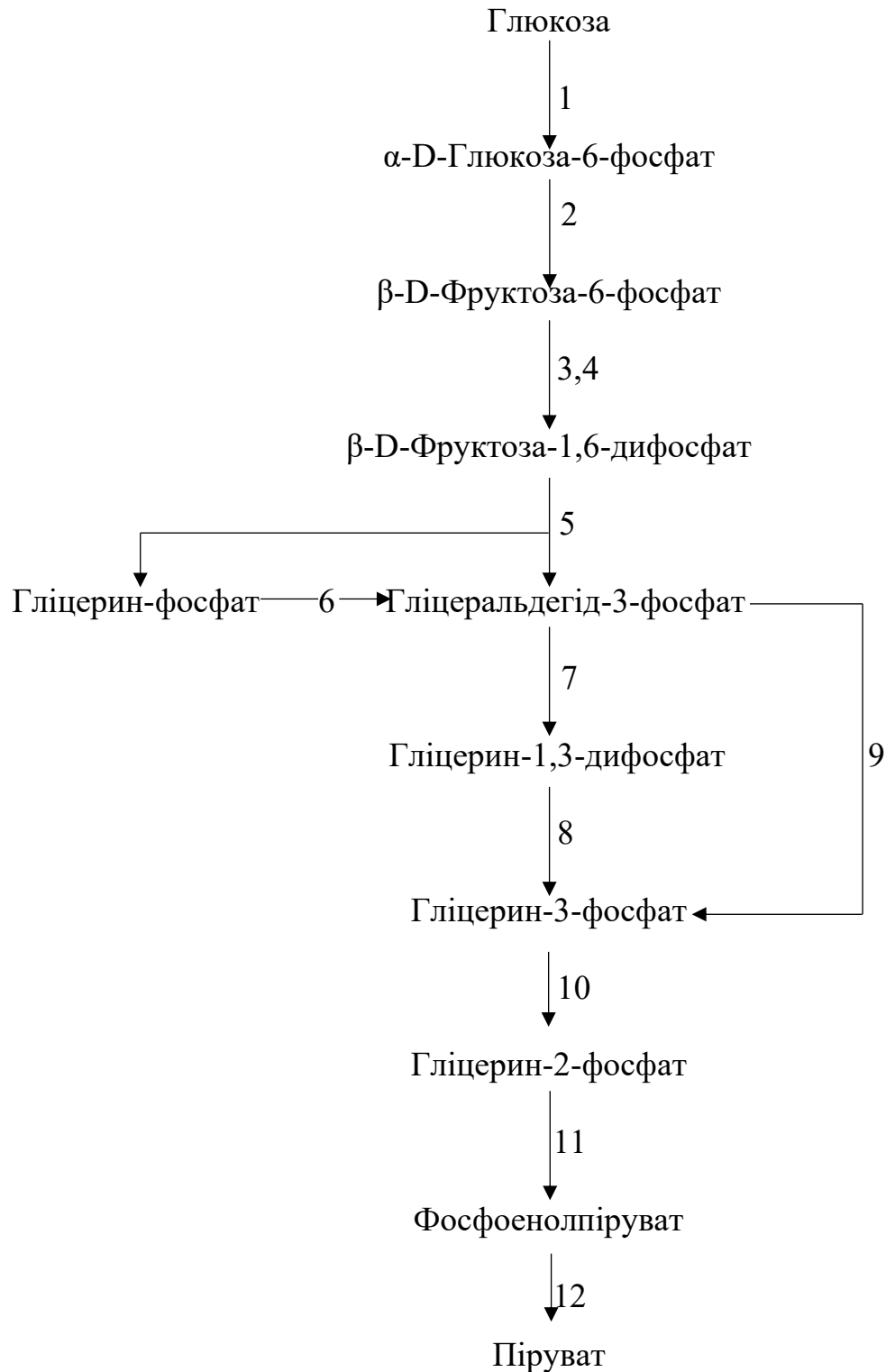


Рис. 4.1 Схема катаболізму глюкози

Ферменти: 1 - система цукрової фосфотрансферази (КФ: 2.7.1.199); 2 - глюкозо-6-фосфат ізомераза (КФ: 5.3.1.9); 3 - фруктозо-1,6-дифосфатаза (КФ: 3.1.3.11); 4 - 6-фосфотриозофруктокіназа (КФ: 2.7.1.11); 5 - фруктозо-дифосфат альдолаза (КФ: 4.1.2.13); 6 - триозофосфат ізомераза (КФ: 5.3.1.1); 7 - гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ: 1.2.1.12); 8 - фосфогліцераткіназа (КФ: 2.7.2.3); 9 - гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ: 1.2.1.9); 10 - 2,3-дифосфогліцерат-незалежна фосфогліцератмутаза (КФ: 5.4.2.12); 11 - енолаза (КФ: 4.2.1.11); 12 - піруваткіназа (КФ: 2.7.1.40) [24].

4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

Джерелом вуглецю під час вирощування продуцента *Pseudomonas batumici* є глюкоза, що у свою чергу залучається до гліколізу, кінцевим інтермедіатом якого є піруват, який залучається до метаболізму за участі компонента піруватдегідрогенази E1 (КФ 1.2.4.1) або компонента піруватдегідрогенази E2 (КФ: 2.3.1.12) [24]. Ацетил-КоА залучається до циклу трикарбонових кислот (ЦТК).

Анаплеротична реакція, яка функціонує у даного продуцента при рості на глюкозі є реакції карбоксилювання пірувату під дією піруваткарбоксилази (КФ) [25].

Попередниками біосинтезу батуміну є піруват та ізолейцин [26].

Піруват утворюється в результаті функціонування гліколізу.

Ацетил-КоА та піруват конденсуються та під дією фермента (R)-цитрамалатсинтази (КФ: 2.3.3.21) перетворюються на 2-метилмалат. Велика субодиниця 3-ізопропілмалатдегідратаза (КФ: 4.2.1.35) перетворює отриману сполуку на D-еритрозо-3-метилмалат.

Фермент 3-ізопропілмалатдегідратаза (КФ: 1.1.1.85) перетворює D-еритрозо-3-метилмалат на 2-оксобутаноат, який під дією фермента ацетолактатсинтази (КФ: 2.2.1.6) перетворюється на 2-ацето-2-гідроксибутаноат.

Утворена сполука під дією фермента кетол-кислотної редуктоізомерази (КФ: 1.1.1.86) перетворюється на 3-гідрокси-3-метил-2-оксипентаноат, з якого в

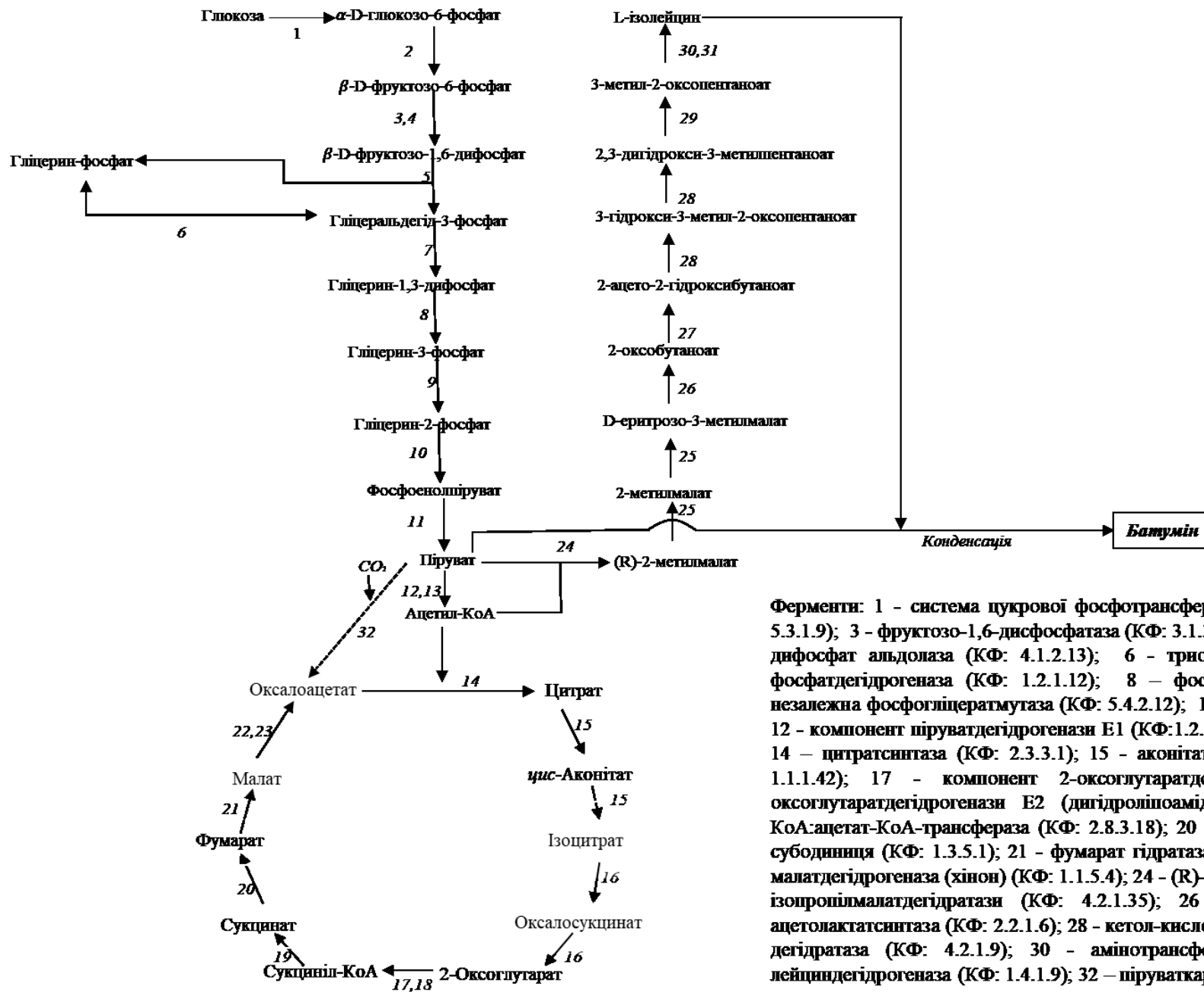
результаті дії того ж самого фермента утворюється 2,3-дигідрокси-3-метилпентаноат.

Ферментативна дія дигідроксикислотної дегідратази (КФ: 4.2.1.9) на 2,3-дигідрокси-3-метилпентаноат зумовлює його перетворення на 3-метил-2-оксопентаноат.

Амінотрансфераза з розгалуженим ланцюгом (КФ: 2.6.1.42); та лейциндегідрогеназа (КФ: 1.4.1.9) активують перетворення 3-метил-2-оксопентаноата на L-ізолейцин [27].

Батумін утворюється в результаті багаторазової конденсації ізолейцину та пірувату [28].

**Схема біотрансформації ростового субстрату
у кінцевий продукт**



Ферменти: 1 - система цукрової фосфотрансферази (КФ: 2.7.1.199); 2 - глюкозо-6-фосфат ізомераза (КФ: 5.3.1.9); 3 - фруктозо-1,6-дифосфатаза (КФ: 3.1.3.11); 4 - 6-фосфофруктокіназа (КФ: 2.7.1.11); 5 - фруктозо-дифосфат альдолаза (КФ: 4.1.2.13); 6 - триозофосфат ізомераза (КФ: 5.3.1.1); 7 - гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ: 1.2.1.12); 8 - фосфогліцераткіназа (КФ: 2.7.2.3); 9 - 2,3-дифосфогліцерат-незалежна фосфогліцератмутаза (КФ: 5.4.2.12); 10 - енoлаза (КФ: 4.2.1.11); 11 - піруваткіназа (КФ: 2.7.1.40); 12 - компонент піруватдегідрогенази Е1 (КФ: 1.2.4.1); 13 - компонент піруватдегідрогенази Е2 (КФ: 2.3.1.12); 14 - цитратсинтаза (КФ: 2.3.3.1); 15 - аконітат гідратаза (КФ: 4.2.1.3); 16 - ізоцитратдегідрогеназа (КФ: 1.1.1.42); 17 - компонент 2-оксоглутаратдегідрогенази Е1 (КФ: 1.2.4.2); 18 - компонент 2-оксоглутаратдегідрогенази Е2 (дигідроліпоамід сукцинілтрансфераза) (КФ: 2.3.1.61); 19 - сукциніл-КоА:ацетат-КоА-трансфераза (КФ: 2.8.3.18); 20 - сукцинатдегідрогеназа / фумаратредуктаза, залізо-сірчана субодиниця (КФ: 1.3.5.1); 21 - фумарат гідратаза (КФ: 4.2.1.2); 22 - малатдегідрогеназа (КФ: 1.1.1.37); 23 - малатдегідрогеназа (хінон) (КФ: 1.1.5.4); 24 - (R)-цитрамалатсинтаза (КФ: 2.3.3.21); 25 - велика субодиниця 3-ізопронілмалатдегідратази (КФ: 4.2.1.35); 26 - 3-ізопронілмалатдегідрогеназа (КФ: 1.1.1.85); 27 - ацетолактатсинтаза (КФ: 2.2.1.6); 28 - кетол-кислотна редуктоізомераза (КФ: 1.1.1.86); 29 - дигідроксикислота дегідратаза (КФ: 4.2.1.9); 30 - амінотрансфераза з розгалуженим ланцюгом (КФ: 2.6.1.42); 31 - лейциндегідрогеназа (КФ: 1.4.1.9); 32 - піруваткарбоксилаза (КФ: 6.4.1.1).

РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ

5.1. Вибір умов і способу культивування

Обґрунтування умов і способу культивування *Pseudomonas batumici* IMB B-7532– продуцента батуміну.

Умови і методи культивування безпосередньо залежать від фізіолого-біохімічних особливостей біологічного агента.

1. Культивування продуцента може здійснюватися лише глибинним способом, оскільки у літературі відсутня інформація про поверхневий спосіб культивування [17].

2. Виробництво батуміну необхідно здійснювати періодичним способом. Під час періодичного процесу можна досягти більш повного споживання субстрату мікроорганізмами, за рахунок того, що субстрат вноситься лише один раз і споживається продуцентом протягом усього періоду культивування. Оскільки антибіотик батумін є вторинним метаболітом, його концентрація досягає максимуму під час стаціонарної фази росту, що можливо тільки в періодичному культивуванні.

3. Виробниче культивування і вирощування посівного матеріалу відбувається за температури 28°C і рН 7,4. Оскільки за таких умов розвивається переважна більшість мікроорганізмів, то постає питання про забезпечення асептичних умов під час отримання батуміну. Для запобігання контамінації проводиться стерилізація обладнання (інокулятори, збірники, реактори, ферментери), комунікацій, поживних середовищ для культивування, розчину титрувального агента.

4. Оскільки *P. batumici* IMB B-7532 є строгим аеробом, то під час

					НУХТ БТЕК 04.02.09 КР ПЗ				
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	Розділ 5. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу	Лім.	Арк.	Акрушів	
Розроб.		Михальська Ю.С.							
Перевір.		Буценко Л. М.					36	20	
Консульт.						Кафедра БТМ ³⁶			
Н. Контр.									
Затверд.		Стабніков В. П.							

культивування його у ферментері необхідна подача стерильного повітря. Для кращої аерації необхідна наявність перемішувального пристрою [29].

5. В середовищі для культивування продуцента батуміну немає піноутворюючих речовин, тому немає потреби у піногасінні.

Отже, культивування продуцента батуміну здійснюється періодично глибинним способом в аеробних умовах із забезпеченням асептики проведення процесу.

Обґрунтування типу ферментера для культивування Pseudomonas batumici IMB B-7532– продуцента батуміну.

Залежно від умов культивування біологічного агента конструкція і оснащення ферментера може відрізнятися. Визначившись зі способом культивування та фізіолого-біохімічними особливостями продуцента, обираємо необхідне оснащення для ферментера (рис.5.1), яке б забезпечило створення даних умов.

1. У процесі культивування продуцента батуміну аеробні умови створюються в результаті подачі стерильного повітря в ферментер, тому ферментер повинен бути обаднаний повітряним фільтром на вході та фільтром на виході повітря з точністю очищення 99,999%.

2. Для інтенсифікації масообмінних процесів та кращої гомогенізації культуральної рідини використовується перемішувач, а саме лопатева мішалка.

3. Для забезпечення сталої температури культивування ферментер оснащується датчиком температури і електричним нагрівачем для контролю температури всередині посудини, а також циркуляційним насосом.

5. Для контролю рівня рН культуральної рідини ферментер оснащується датчиком рН.

У ферментерах даного типу передбачена автоматична система стерилізації, встановлення датчиків контролю рівня піни, тиску, рН, температури, оптичної густини, передбачається подача газів до ферментеру і наявність перемішуючого пристрою. Для контролю процесів, які протікають в ферментері, він оснащується відповідними датчиками, під'єднаними до автоматизованої системи управління процесом [30].



Рис. 5.1 Ферментер

5.2. Обґрунтування стадій підготовки аераційного повітря

Оскільки *P. batumici* IMB B-7532 є строгим аеробом, то під час культивування його у ферментері необхідна безперервна подача стерильного повітря через барботер[31].

Підготовку посівного матеріалу та інокуляту здійснюють в приміщенні лабораторії та мікробіологічному боксі, тож повітря у цих приміщеннях стерилізують застосовуючи ультрафіолетове опромінення (УФ-лампи).

Підготовка аераційного повітря, для культивування *P. batumici* IMB B-7532 у ферментері, складається з таких стадій:

- Враховуючи те, що із збільшенням висоти над поверхнею концентрація мікроорганізмів у повітрі зменшується атмосферне повітря забирають турбокомпресором через забірну шахту, на висоті 2- 3 м від найвищої точки будівлі. Забір повітря для проєктованого виробництва здійснюється на висоті 20 м;
- Оскільки в атмосферному повітрі міститься велика кількість контамінантів та грубого аерозолі – пилу, його очищають за допомогою фільтрів попереднього очищення;
- Для досягнення підвищеного тиску з метою подолання опору фільтрувальних матеріалів на наступних стадіях фільтрування, а також подолання гідравлічного опору під час диспергування повітря у об'ємі культуральної рідини, повітря далі піддають стисненню у турбокомпресорі до 0,35–0,5 МПа (стиснення повітря в компресорі приводить до підвищення його температури до 120–250°C і збільшенню вологовмісту на одиницю об'єму);
- У краплєвловлювачі відбувається видалення вологи та охолодження нагрітого під час стиснення повітря за допомогою водяного теплообмінного апарату;
- Для остаточного видалення конденсованої вологи та вирівнювання тиску повітря подають у ресивер;
- Для очищення повітря, що подається до усіх ферментерів цеху і видалення до 98% мікроорганізмів очищення проводять на головних фільтрах,

які заповнюються набивним волокном і встановлюються в цеху ферментації на головному повітряному колекторі стиснутого аераційного повітря;

- Очищення повітря на індивідуальних фільтрах, повітря надходить через колектори від головних фільтрів (встановлені безпосередньо на кожному ферментері, затримують 99,999% мікроорганізмів);

- Технологічно й економічно виправданим у промисловості є спосіб очищення повітря за допомогою волокнистих і пористих матеріалів, тому що вдається одержати повітря зі ступенем чистоти 99,9999%. Зважені в повітрі частки затримуються волокнистим матеріалом завдяки інерційному і дифузійному механізмам осадження. При експлуатації фільтрів необхідна їхня стерилізація. Найбільш ефективним методом є нагрівання вологою парою і витримка протягом визначеного часу при температурі 125–130°C. Після стерилізації фільтруючий матеріал висушують гарячим повітрям [32].

5.3 Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Санітарна підготовка виробництва передбачає собою ряд певних операцій, які зможуть забезпечити відповідну якість продукції, що виготовляється, асептичні умови виробництва, а також забезпечує безпеку праці та охорону здоров'я.

Санітарній обробці підлягають:

- Виробничі приміщення: приміщення для підготовки сировини, приміщення для фасування і упаковки, приміщення підготовки персоналу та зберігання технологічного одягу, приміщення для зберігання допоміжних речовин, пакувальних матеріалів та пральні;
- Обладнання;
- Інвентар;

Санітарна обробка складає собою комплекс заходів, які складаються з вологого прибирання, дезінфекції й УФ-опромінення, спрямовані на досягнення відповідного класу чистоти.

Санітарний режим слідує за дотриманням правил особистої гігієни працівниками підприємства; дотриманням послідовності та правилами технологічної обробки, а також іншими видами виробничих процесів. Він включає в себе комплекс заходів з прибирання, миття, знезаражування та дотримування особистої гігієни персоналу. Важливу роль у забезпеченні дієвого санітарного режиму виробництва відіграє правильність вибору миючих та дезінфікуючих засобів.

Згідно з постановою Кабінету Міністрів України, в Україні мийним засобом є будь-яка речовина або препарат, що містить мило та/або інші поверхнево-активні речовини, призначені для прання або очищення [33]. Дані засоби можуть бути у формі порошку, рідини, пасти, бруска, плитки, таблетки тощо.

До складу миючих засобів входять різні хімічно-активні речовини, які мають очищувальну та мийну здатність. Крім цього миючі засоби містять у своєму складі лужні і нейтральні солі, відбілюючі і дезінфікуючі речовини, піноутворювачі та піногасники, ароматизовані речовини і ін.

Миючий засіб "Прогрес" - універсальний миючий засіб, який випускається у вигляді однорідної гелеподібної рідини без кольору, іноді жовтуватого відтінку. Використовується для миття посуду, підлог, плитки, сантехніки, пластикових поверхонь, столів, побутових приладів. Може застосовуватися в гарячій і холодній воді. Основними перевагами даного засобу є:

- Висока ефективність миття;
- Майже не утворює піни, що дозволяє використовувати даний засіб для миття машин та обладнання;
- Продукція вважається безпечною для здоров'я, що підтверджено санітарно-епідеміологічними установами;
- Не містить токсичних та отруйних речовин.

Миючий засіб підходить для миття:

1. посуду з будь-яких матеріалів – скла, кераміки;

2. підлог, виготовлених з різних покриттів;
3. машинного та ручного прання;
4. Чищення і видалення жирових забруднень з побутових приладів, сантехнічного обладнання, кахлю;
5. Миття стінових поверхонь, в тому числі оброблених шпалерами, що миються [34].

Робочий розчин (0,5-3,0 %) підходить для води будь-якого ступеня жорсткості та видалення загальних забруднень.

Мийний засіб «ЕКОХІМ 54» - кислотний миючий засіб призначений для видалення органічних і неорганічних забруднень із зовнішніх поверхонь обладнання на підприємствах.

Перевагами даного засобу є:

- Висока ефективність видалення залишків органічних та неорганічних забруднень;
- Екологічно безпечний (не містить фосфатів, біорозкладний);
- Швидко справляється із забрудненнями різної складності.

Концентрація приготованого розчину від 0,2% до 3%. Температура 20-60 °С. Рідина прозора або з жовтуватим чи з коричнеуватим відтінком. рН розчину 3,5 [35]. Засіб підходить для миття технологічного обладнання.

Заходи з миття забезпечують та очищення поверхонь лише від органічних та неорганічних сполук, але не забезпечують їх мікробіологічну чистоту. Бактерії, віруси та патогени, які слугують контамінантами продукції, не знищуються миючими засобами, тому після миття необхідно використовувати дезінфікуючі засоби, які зможуть забезпечити стерильність виробництва.

Дезінфекція – це процес, який забезпечує видалення з поверхні обладнання патогенних мікроорганізмів.

При виборі дезінфікуючих засобів варто враховувати наступні критерії:

- спектр дії на різні мікроорганізми;
- залежність від жорсткості води та якості води в цілому;
- тривалість та стійкість бактерицидних властивостей;

- спосіб приготування та використання;
- термін придатності;
- вплив на поверхню обладнання;
- експозиція;
- контроль ефективності;
- економічний показник (вартість).

При проведенні дезінфекції користуються двома основними методами: фізичним і хімічним. Можна ще виділити третій – комбінований, при якому фізичні та хімічні методи знезаражування застосовуються одночасно (наприклад, прання технологічного одягу в гарячій воді з милом). Фізичні методи дезінфекції проводяться за допомогою механічних, термічних та променевих засобів[36].

Механічні засоби забезпечують видалення, але не знищення мікроорганізмів. Це чищення, протирання, миття, прання, витрушування, підмітання, провітрювання. При використанні пилотягів видаляється до 98% мікроорганізмів. Вентиляція достатньо ефективна, коли її тривалість не менша, ніж 30-60 хв.

Термічні засоби ґрунтуються на застосуванні високих та низьких температур, а саме: гаряче повітря, водяна пара, кип'ятіння, пастеризація, спалювання, пропалювання, заморожування, висушування. Прасування технологічного одягу є дезінфікуючим засобом, але він діє в основному поверхнево. Замороження не викликає загибелі мікроорганізмів, але призводить з часом до зменшення їх кількості. Висушування протягом тривалого часу призводить до загибелі великої кількості мікробів.

Променеві засоби знезаражування – це застосування сонячного світла, ультрафіолетових променів, радіоактивного випромінювання. Прямі сонячні промені згубно діють на багатьох збудників інфекційних захворювань. Проте цей метод залежить від пори року, погоди, і тому використовується як

допоміжний. Ультрафіолетове опромінювання використовують для знезараження повітря в приміщеннях. Для цього застосовують бактерицидні лампи. Радіоактивне опромінювання має згубну дію на всі види мікроорганізмів та їх спори. В окремих випадках для дезінфекції використовують ультразвук.

Хімічні методи дезінфекції знайшли широке застосування на практиці. В їх основі лежить використання різних хімічних речовин, які вбивають мікроорганізми.

Хімічні речовини мають різну дію на мікроорганізми:

- бактерицидну – здатність вбивати бактерії;
- бактріостатичну – пригнічують їх життєдіяльність;
- віруліцидну – здатність вбивати віруси;
- фунгіцидну – здатність вбивати грибки.

Серед хімічних дезінфікуючих засобів виділяють засоби м'якої дезінфекції, які використовують для дезінфекції шкіри рук, одягу і сильної – для знезараження забруднених матеріалів (обладнання, приміщення).

До хімічних дезінфікуючих засобів належать:

- хлор і його сполуки (р-ни хлорного вапна, хлорамін);
- галогени (йод, йодонат, р-ни Люголя);
- окисники (перекис водню, перманганат калію);
- феноли (фенол, лізол);
- спирти (етилловий, метиловий);
- альдегіди (формалін, формальдегід);
- кислоти, луги, барвники, солі важких металів та інші[37].

Дезінфекційний засіб «САН-МАГ». Основною діючою речовиною є пероксид водню у межах 2,5–7,5%. Засіб і його робочі розчини (0,01 – 0,5%) призначений для дезінфекції поверхонь в приміщеннях (підлога, стіни, двері та ін.); прибирального матеріалу, санітарного транспорту; передстерилізаційне

очищення; знезараження ємностей для зберігання води, знезараження води, поверхонь підсобних приміщень, санітарно-технічного обладнання, прибирального інвентарю[38].

Засіб дезінфікуючий «АМІНОРМ ПЛЮС». Основними діючими речовинами є 1,3-Пропандіамін, N-(3-амінопропіл)-N-додецил — 8,0% – 10,0%, алкіл(C12–C16) диметилбензиламонійхлорид — 18,0% – 20,0%, 2-пропанол — 3,0% – 5,0%. Засіб призначений для видалення механічних, білкових, жирових забруднень, залишків лікарських засобів із зовнішньої поверхні, внутрішніх каналів та порожнин виробів. В основному використовується для поточної та заключної дезінфекції приміщень та з метою знищення та попередження виникнення плісняви.

Робочі розчини (0,025 – 3%) «Амінорм плюс» виявляють бактерицидні властивості по відношенню до грампозитивних та грамнегативних бактерій у т. ч. щодо бактерій групи кишкової палички, інших ентеробактерій, в т.ч. стійких до гентаміцину і/або до цефалоспоринових, стафілококів, *Streptococcus pneumoniae*, ентерококів, неферментуючих бактерій із стійкістю до цефалоспоринових антибіотиків, *Pseudomonas aeruginosa*, *H. influenzae*, *Helicobacter pylori*, *Acetobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Enterobacter agglomerans*, *Klebsiella pneumoniae*, сальмонел, легіонел, лістерій, інших збудників небезпечних та особливо- небезпечних інфекцій, має туберкулоцидні і спороцидні властивості, віруліцидні властивості, фунгіцидні властивості та овоцидні і ларвіцидні властивості[39].

Засіб дезінфекційний "АНІОСРАБ 85 НПК (ANIOSRUB 85 NPC)". Концентрація антисептичного засобу повинна бути 66,5 - 73,5 %. Основною метою застосування засоби є гігієнічна дезінфекція шкіри рук персоналу, дезінфекційна обробка дрібних ушкоджень шкірних покривів персоналу, швидкої дезінфекції поверхонь та виробів лабораторного призначення у т. ч. рукавичок.

Засіб має бактерицидні властивості у т. ч. по відношенню до *Staphylococcus aureus*, включаючи MRSA, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Enterococcus hirae*, *Pseudomonas aeruginosa*, та ін.; туберкулоцидні властивості; фунгіцидні властивості щодо грибів роду *Candida albicans* т *Aspergillus fumigatus* та ін.; віруліцидні властивості у т. ч. по відношенню до збудників інфекції з паренте-ральним механізмом передачі - вірусів гепатитів В та С, ВІЛ, а також вірусів герпесу типу 1, поліо-, адено-, рота-, коро-, SARS-асоційованих коронавірусів, збудників різних видів грипу, включаючи вірус «свинячого грипу» H1N1, вірус «пташиного грипу» H5N1 тощо. Пролонговану дія засобу 3 години[40].

Для того, щоб не допустити резистентності у мікроорганізмів до вибраних розчинів, рекомендується чергувати обрані дезінфікуючі засоби. Найбільш доцільний спосіб – чергування препаратів враховуючи результати мікробіологічного вивчення стійкості патогенних мікроорганізмів до застосовуваних дезінфікуючих засобів.

5.4 Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища для біосинтезу *Pseudomonas batumici* IMB B-7532

Для виробничого біосинтезу батуміну *P. batumici* IMB B-7532 використовується середовище такого складу (г/л):

- Глюкоза-15;
- Сечовина-1,3;
- K_2HPO_4 -0,5;
- NaCl-0,5;
- $MgSO_4$ -0,25;
- Суміш мікроелементів (мг/л): $FeSO_4$ -200; $ZnSO_4$ -10; $MnCl_2$ -3; $CoCl_2$ -20; $NiCl_2$ -2; Na_2MoO_4 -3.
- рН середовища 7,2-7,8[12].

Виробничий біосинтез здійснюється у ферментері об'ємом 10 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,6. Підготовка посівного матеріалу відбувається в 5

стадій (на скошеному агарі та в колбах на качалці, у посівних апаратах об'ємом 1, 0,1 та 0,01 м³).

Для того, щоб визначити спосіб приготування деяких компонентів середовища (глюкоза, мікроелементи) і допоміжних розчинів (соляної кислоти і лугу) і визначитися з необхідними для цього колбами чи реакторами, розрахуємо кількість таких компонентів, необхідну для приготування середовища на кожен з чотирьох стадій виробництва (табл. 5.1 і 5.2). Дані, наведені у табл. 5.1, свідчать про те, що розчини титрувальних агентів для виробничого біосинтезу необхідно готувати у реакторах об'ємом 20 л, для внесення глюкози у виробничий ферментер необхідно передбачити реактор об'ємом 500 л. Дані, наведені у табл. 5.2, свідчать, що для перших двох стадій (вирощування інокуляту в колбах) необхідно готувати запасний розчин мікроелементів, для решти – мікроелементи можна вносити у композиції з іншими солями. Нижче наведено особливості приготування і стерилізації середовища для вирощування інокуляту і виробничого біосинтезу.

5.4.1. Вирощування інокуляту в колбах на качалках

Стерилізацію середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках будемо здійснювати в автоклаві, оскільки його об'єм невеликий (0,6 л).

Проаналізувавши склад поживного середовища для вирощування *P. batumici* IMB B-7532, умовно ділимо його на такі композиції (залежно від режиму стерилізації компонентів):

Композиція А: глюкоза, сечовина (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв).

Композиція Б: MgSO₄ (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

Композиція В: K₂HPO₄, NaCl (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

Композиція Г: FeSO₄; ZnSO₄; MnCl₂; CoCl₂; NiCl₂; Na₂MoO₄ (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

Оскільки концентрація солей у складі композиції Г є дуже низькою, можливість утворення нерозчинних осадів неврахована.

Глюкоза та сечовина (композиція А) є термолабільними і потребують м'якого режиму стерилізації. Солі композиції Б стерилізують при стандартній для солей температурі. Фосфати (композиція В) стерилізують окремо, щоб запобігти утворенню нерозчинних фосфатів магнію та цинку. Стерилізацію композицій А, Б, В і Г здійснюють в колбах.

Таблиця 5.1

Розрахунок вмісту та особливості приготування деяких компонентів поживного середовища та титрувальних агентів

Об'єм середовища, л	Глюкоза		HCl (6%)		NaOH (6%)	
	Вміст, г	Особливість приготування	Об'єм, мл	Особливість приготування	Об'єм, мл	Особливість приготування
0,6	9	В колбі на 50 мл	-	-	-	-
6	90	В колбі на 500 мл	12	В колбі на 50 мл	12	В колбі на 50 мл
60	900	В реакторі на 5 л	120	В колбі на 250 мл	120	В колбі на 250 мл
600	9000	В реакторі на 50 л	1200	В колбі на 2 л	1200	В колбі на 2 л
6000	90000	В реакторі 500 л	12000	В реакторі на 20 л	12000	В реакторі на 20 л

Таблиця 5.2

Розрахунок вмісту мікроелементів в різних об'ємах поживного середовища

Об'єм середовища, л	Вміст мікроелементів, мг					
	FeSO ₄	ZnSO ₄	MnCl ₂	CoCl ₂	NiCl ₂	Na ₂ MoO ₄
0,6	120	6	1,8	12	1,2	1,8
6	1200	60	18	120	12	18
60	12000	600	180	1200	120	180
600	120000	6000	1800	12000	1200	1800
6000	1200000	60000	18000	120000	12000	18000

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках наведений у табл. 5.3:

Таблиця 5.3

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 600 мл середовища

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 600 мл середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, V, мл
Глюкоза	15	9	А	400
Сечовина	1,3	0,78		
Вода	400 мл			
MgSO ₄	0,25	0,15	Б	50
Вода	50 мл			
NaCl	0,5	0,3	В	100
K ₂ HPO ₄	0,5	0,3		
Вода	100 мл			
FeSO ₄ ×7H ₂ O	0,2	0,12	Г	50
ZnSO ₄ ×7H ₂ O	0,01	0,006		
MnCl ₂	0,003	0,0018		
CoCl ₂ ×6H ₂ O	0,02	0,012		
NiCl ₂	0,002	0,0012		
Na ₂ MoO ₄	0,003	0,0018		
Вода	50 мл			

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

Вирощування інокуляту в ферментерах об'ємом 10, 100, 1000 л.

Стерилізація 6, 60 та 600 л поживного середовища, необхідних для цих стадій, здійснюється у відповідних посівних апаратах, що потребує перескладання композицій поживного середовища:

Композиція А: глюкоза, сечовина (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв).

Композиція Б: MgSO₄, FeSO₄, ZnSO₄, K₂HPO₄, NaCl, FeSO₄; ZnSO₄; MnCl₂; CoCl₂; NiCl₂; Na₂MoO₄ (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв, рН 4,0–4,5).

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 10, 100, 1000 л наведений у таблицях 5.4; 5.5 та 5.6 відповідно:

Таблиця 5.4

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 6 л середовища

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 6 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	15	90	А	1,5
Сечовина	1,3	7,8		
Вода	1,35 л			
Конденсат	0,15 л			
MgSO ₄	0,25	1,5	Б	4,5
NaCl	0,5	3		
K ₂ HPO ₄	0,5	3		
FeSO ₄ ×7H ₂ O	0,2	1,2		
ZnSO ₄ ×7H ₂ O	0,01	0,06		
MnCl ₂	0,003	0,018		
CoCl ₂ ×6H ₂ O	0,02	0,12		
NiCl ₂	0,002	0,012		
Na ₂ MoO ₄	0,003	0,018		
Вода	4,05 л			

Конденсат	0,45 л		
-----------	--------	--	--

Стерилізація композиції Б відбувається в посівному апараті, тому що умови її стерилізації є жорсткішими, ніж композиції А. Солі розчиняють в окремому реакторі, з якого потім вони будуть подані в посівний апарат, де проводиться стерилізація.

Таблиця 5.5

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 60 л середовища

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 60 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	15	900	А	15
Сечовина	1,3	78		
Вода	13,5 л			
Конденсат	1,5 л			
MgSO ₄	0,25	15	Б	45
NaCl	0,5	30		
K ₂ HPO ₄	0,5	30		
FeSO ₄ ×7H ₂ O	0,2	12		
ZnSO ₄ ×7H ₂ O	0,01	0,6		
MnCl ₂	0,003	0,18		
CoCl ₂ ×6H ₂ O	0,02	1,2		
NiCl ₂	0,002	0,12		
Na ₂ MoO ₄	0,003	0,18		
Вода	40,5 л			
Конденсат	4,5 л			

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 600 л середовища

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 600 л середовища, кг	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	15	9	А	150
Сечовина	1,3	0,78		
Вода	135 л			
Конденсат	15 л			
MgSO ₄	0,25	0,15	Б	450
NaCl	0,5	0,3		
K ₂ HPO ₄	0,5	0,3		
FeSO ₄ ×7H ₂ O	0,2	0,12		
ZnSO ₄ ×7H ₂ O	0,01	0,006		
MnCl ₂	0,003	0,0018		
CoCl ₂ ×6H ₂ O	0,02	0,012		
NiCl ₂	0,002	0,0012		
Na ₂ MoO ₄	0,003	0,0018		
Вода	405 л			
Конденсат	45 л			

5.4.3. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 10 м³

Для цієї стадії необхідно 6 м³ (6000 л) поживного середовища. Такий об'єм поживного середовища економічно доцільніше стерилізувати в установці безперервної стерилізації. Це дозволить зменшити витрати води, пари та скоротити час обробки поживного середовища. Обираємо УБС-10 з продуктивністю 10 м³ /год (конструктивно аналогічну УБС-5) (час стерилізації становитиме 0,85 год). Температура стерилізації – 130 °С.

Розчин усіх компонентів поживного середовища готується в одному реакторі-змішувачі. Спочатку у цьому реакторі-змішувачі готується глюкоза та сечовина, після чого в нього ж подаються всі інші компоненти.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 10 м³ наведений у табл. 5.7:

Таблиця 5.7

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 6 м³ середовища

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 6 м³ середовища, кг	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	15	90	А	1500
Сечовина	1,3	7,8		
Вода	1350 л			
Конденсат	15 л			
MgSO ₄	0,25	1,5	Б	4500
NaCl	0,5	3		
K ₂ HPO ₄	0,5	3		
FeSO ₄ ×7H ₂ O	0,2	1,2		
ZnSO ₄ ×7H ₂ O	0,01	0,06		
MnCl ₂	0,003	0,018		
CoCl ₂ ×6H ₂ O	0,02	0,12		
NiCl ₂	0,002	0,012		
Na ₂ MoO ₄	0,003	0,018		
Вода	4050 л			
Конденсат	450 л			

5.4.4. Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН

Для регуляції рН перед початком культивування необхідно використовувати 6%-і розчини HCl і NaOH. Додавати хлоридну кислоту перед стерилізацією необхідно, щоб унеможливити випадіння осадів фосфорних солей Магнію, Феруму та Мангану під час нагрівання розчину солей в апараті. Оскільки оптимальним рН для культури біологічного агента є 7.4, то доведемо його до цього значення розчином NaOH. Також є необхідним підтримання рН на рівні 7.4 під час виробничого біосинтезу, оскільки відхилення рН від нейтрального негативно впливає на біосинтетичну активність бактерій *Pseudomonas batumici*.

Орієнтовні витрати розчинів соляної кислоти та натрію гідроксиду складають 2 мл на 1 л поживного середовища [41]. Тоді для 6 л поживного середовища необхідно 12 мл 6-% розчину соляної кислоти. Соляну кислоту концентрацією 6% готують із соляної кислоти концентрацією 37%. У 12 мл розчину соляної кислоти буде міститися

$$X = 12 \cdot 6 / 100 = 0,72 \text{ мл HCl}$$

Для приготування 225 мл 6% соляної кислоти необхідно:

$$Y = 0,72 \cdot 100 / 37 = 1,95 \text{ мл 37\% HCl}$$

Отже, для приготування 12 мл соляної кислоти для 6 л середовища потрібно взяти 1,95 мл 37% розчину соляної кислоти та 10,1 мл стерильної води.

Аналогічно для 60 л середовища необхідно взяти 19,5 мл 37% соляної кислоти та 100,5 мл стерильної води.

Аналогічно для 600 л середовища необхідно взяти 195 мл 37% соляної кислоти та 1005 мл стерильної води.

Аналогічно для 6 м³ середовища необхідно взяти 1,95 л 37% соляної кислоти та 10,05 л стерильної води.

Розрахунок витрат розчину NaOH. Для 6 л поживного середовища використовують 12 мл 6 % розчину гідроксиду натрію.

Для приготування 12 мл 6% розчину необхідно 0,72 г солі розчинити у 11,3 мл стерильної води.

Аналогічно для 60 л середовища потрібно 120 мл 6% розчину. Необхідно 7,2 г лугу розчинити у 112,8 мл стерильної води. Для 600 л поживного середовища потрібно 1,2 л 6% розчину. Необхідно 72 г лугу розчинити у 1,128 л стерильної води.

Для 6 м³ поживного середовища потрібно 12 л 6% розчину. Необхідно 720 г лугу розчинити у 11,28 л стерильної води.

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

- приготування 6% розчину HCl для підкислення середовища при стерилізації його в посівному апараті об'ємом 10, 100, 1000 л та ферментері 10 м³;

- приготування та стерилізація 6% розчину NaOH для стабілізації pH середовища перед початком культивування в посівному апараті об'ємом 10, 100, 1000 л та ферментері 10 м³ ;

Крім того необхідно передбачити такі реактори:

- для приготування 6% HCl (20 л);

- для приготування та стерилізації 6% NaOH (20 л);

РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ

Специфікація обладнання, яке зображене на апаратурній схемі, наведена в табл. 6.1.

Таблиця 6.1.

Специфікація обладнання

Позиція	Найменування обладнання	Кількість одиниць	Технічна характеристика
ПЗ-1	Повітрозабірник	1	Циліндрична ємність з сіткою для видалення механічних забруднень. Температура повітря до 180°C, тиск до 1,54 МПа [42].
Ф-2	Фільтр грубого очищення повітря	1	Сталева оцинкована рамка з об'ємним фільтруючим матеріалом. Габарити 592x287x292 мм. Кінцевий перепад тиску 250 Па, матеріал – голкопбивне нетканинне волокно. E = 80 %[43].
К-3	Компресор	1	Продуктивність 1,3 м³/хв, кінцевий тиск становить 0,4-1,2 МПа, робоча температура від +5 до +40°C, габарити 800x600мм[44].
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Осушувач Airpol холодильного типу ОР30, габарити 350x497x450 мм, продуктивність 110 м³/год, потужність 0,29 кВт [45].
Р-5	Ресивер	1	Ресивер повітряний вертикальний об'ємом 2,7 м³ та робочим тиском 1,0 МПа[46].

					НУХТ БТЕК 04.02.09 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Михальська Ю.С.			Розділ 6. Специфікація обладнання доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу	Літ.	Арк.	Акрушіє
Перевір.		Буценко Л. М.					56	5
Консульт.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В. П.						

T-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Теплообмінник VS150 із нержавіючої сталі 316 з товщиною стінки 0,37 мм [47].
Ф-7	Фільтр тонкої очистки	1	Габарити – 210x75 мм. Пропускна здатність 65 м³/год, тиск 0,7 МПа, ефективність E=95 %. [48]
Д-8 Д-11 Д-13 Д-15 Д-17 Д-19 Д-22	Дозатор об'ємно-ваговий	7	Дозатор ваговий мультиголовковий W-10R. Габарити – 1620x1100x1110 мм. Дозатор складається з 10-канальної вібраційної системи зважування, працює за принципом підсумовування ваги продукції та видачі максимально точної, встановленої на блоці керування, дози продукції в приймальну тару або упаковку [49].
P-9	Реактор-змішувач для приготування розчину каустичної соди	1	Реактор робочим об'ємом 100 літрів, пересувний, герметичний з теплообмінною та ізотермічною сорочками, та якірною мішалкою. Швидкість обертання мішалки 0-360 об/хв [50].

М-10	Апарат високого тиску для струйного миття обладнання	1	Трьохфазний апарат високого тиску, створює тиск 500 бар. Продуктивність: 15 л/хв Споживана потужність 15 кВт Оснащений насосом, шлангом, пістолетом, подовжувачем трубки та соплом [51].
Р-12 Р-14	Реактор-змішувач для приготування титрувальних розчинів	2	Реактор робочим об'ємом 15 літрів, обладнаний мішалкою з нержавіючої сталі. Максимальний тиск 0,4 МПа [52].
Р-16	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації композиції А для інокулятора	1	Реактор-змішувач об'ємом 20 л, виготовлений із сталі AISI 316L. Робочий тиск 1-6 бар. Оснащений сорочкою та мішалкою. В нижній частині розміщено нижній спуск [53].
Р-18 Р-20	Реактор-змішувач для приготування композиції А та Б для інокулятора для виробничого біосинтезу відповідно	2	Реактор робочим об'ємом 250 л, обладнаний водяною сорочкою та мішалкою з нержавіючої сталі [54].

УБС-21	Установка безперервної стерилізації	1	Матеріал – нержавіюча сталь; потужність – 5 м ³ /год; температура стерилізації - 131°C. Обладана реактором змішувачем об'ємом 5 м ³ (Р-23), 5 теплообмінниками (Т- 25, Т-26, Т-27, Т-29, Т-30) та колонкою для нагріву (К-28) Виготовлена на замовлення.
Н-24 Н-42	Відцентровий насос	2	DM 06 з продуктивністю 8,3 л/хв, у магнітній муфті Виробник Debem Італія[55]
Ф-31 Ф-33 Ф-36 Ф-39	Індивідуальні фільтри	4	Фільтр із фільтрувальним елементом фторопластовою мембраною. Пропускна здатність 14 м ³ /год, ефективність E=99,995 % [56].
Г-34 Г-37 Г-40	Гребінка	3	Виготовлена з нержавіючої сталі [57].
ФР-32	Посівний апарат	1	Інокулятор робочим об'ємом 10 л. Виготовлений з нержавіючої сталі. Обладнаний мішалкою та паровою рубашкою. Виконаний на замовлення [58].

ФР-35	Посівний апарат	1	Інокулятор робочим об'ємом 100 л. Виготовлений з нержавіючої сталі. Обладнаний мішалкою та паровою рубашкою. Максимальний тиск 0,2 МПа. [59].
ФР-38	Посівний апарат	1	Інокулятор робочим об'ємом 1 м ³ . Виготовлений з нержавіючої сталі. Обладнаний мішалкою та паровою рубашкою, датчиками рН та температури. Швидкість обертання мішалки 50-400 об/хв. [60].
ФР-41	Ферментер	1	Ферментер робочим об'ємом 10 м ³ . Обладнаний автоматичною системою стерилізації, датчиками контролю рівня піни, тиску, рН, температури, оптичної густини, перемішуючим пристроєм. передбачається подача газів до ферментеру. Оснащений відповідними датчиками, під'єднаними до автоматизованої системи управління процесом для контролю процесів культивування[61].

РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу.

Технологічна схема біосинтезу батуміну *Pseudomonas batumici* IMB B-7532 складається із допоміжних робіт, основного технологічного процесу та стадії зешкодження відходів. До етапів допоміжних робіт (ДР) відносять: підготовку персоналу, приготування миючих та дезинфікуючих засобів, підготовку приміщень, підготовку обладнання, підготовку стерильного аераційного повітря, приготування титрувальних розчинів HCl та NaOH, приготування, підготовку і стерилізацію поживних середовищ. До стадій основного технологічного процесу (ТП) відносять: підготовку посівного матеріалу та виробничий біосинтез.

Технологічну та апаратурну схеми біосинтезу батуміну наведено у графічній частині проєкту.

ДР 1. Підготовка персоналу.

ДР 1.1. Навчання персоналу

Ознайомлення персоналу з посадовими обов'язками, правилами техніки безпеки.

ДР 2. Підготовка миючих розчинів.

ДР 2.1. Підготовка 2-% розчину каустичної соди.

Каустична сода подається в реактор (П-9) через об'ємно-ваговий дозатор Д-8. Подають питну воду. Речовини перемішують до повного розчинення солі та нагрівають до 40°C глухою парою. Готовий розчин використовують для очищення ферментаційного обладнання.

ДР 3. Підготовка приміщень.

ДР 3.1. Щоденне прибирання приміщень.

Щоденне прибирання здійснюють за допомогою води, лише для підлоги, так як тривалість виробничого біосинтезу становить 55 годин.

					НУХТ БТЕК 04.02.09 КР ПЗ				
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата					
Розроб.		Михальська Ю.С.			Розділ 7. Опис технологічної схеми доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу.	Літ.	Арк.	Акрушіє	
Перевір.		Буценко Л. М.					61	11	
Консульт.						Кафедра БТМ			
Н. Контр.									
Затверд.		Стабніков В. П.							

ДР 3.2. Генеральне прибирання приміщень.

Генеральне прибирання виробничих приміщень відбувається 1 раз на тиждень. Під час генерального прибирання відбувається миття стін, вікон та дверей.

ДР 4. Підготовка обладнання.

ДР 4.1. Технічний огляд обладнання.

Проводиться технічний огляд обладнання з метою виявлення можливих герметичних недоліків, протікань в обладнанні, пошкоджень комунікацій або руйнувань запірної арматури. Якщо відхилення виявляють, проводиться підтягування різьбових з'єднань або заміна прокладок.

ДР 4.2. Миття обладнання.

Поверхню обладнання обробляють заздалегідь приготованим миючим розчином для видалення органічних залишків. Час обробки – 20 хвилин. Після обробки миючим розчином внутрішні поверхні обладнання промивають питною водою з температурою - 20 °С. Час ополіскування – 3 хв.

ДР 4.3. Перевірка на герметичність.

Запірну арматуру закривають, подають аераційне повітря до встановлення надлишкового тиску $P = 0,1 - 0,2$ МПа. Вентилі подачі повітря закривають і автоматично фіксуються показання манометра на кришці апарату в робочому журналі, час витримки (30–60 хв). Якщо зміна тиску відбувається не більше ніж на 0,01 МПа, апарат вважається герметичним. При зміні тиску вище зазначеної величини девайс перевіряється на герметичність всередині пристрою, а також у місцях з'єднання клапан і комунікацій.

ДР 4.4. Стерилізація обладнання.

Обладнання стерилізують гострою парою при тиску 0,2 МПа, температурі 130 °С впродовж 1,5 год. Після закінчення процесу стерилізації конденсат, що утворився збирається в конденсатовідвідник та відводиться.

ДР 1.4.5. Охолодження обладнання

Усі клапани подачі пари в апарат закриваються. У сорочку подається холодна вода. Для компенсації втрати тиску(утворення вакууму при конденсації

пари в апараті), в апарат подається стерильне повітря. Процес охолодження проводять до моменту досягнення температури 30–40 °С і надлишкового тиску $P = 0,003\text{--}0,005$ МПа, тривалість 1 год.

ДР 5. Підготовка аераційного повітря.

ДР 5.1. Забір атмосферного повітря

Атмосферне повітря забирається за допомогою повітрозабірника (ПЗ-1) у найвищій точці будівлі – на висоті 20 м, де розміщене обладнання для стиснення та очищення повітря.

ДР 5.2. Грубе очищення повітря

Повітря попередньо очищується фільтром (Ф-2), який затримує частинки діаметром 50 мкм і забезпечує ступінь очищення до 90%.

ДР 5.3. Компресія повітря

Повітря стискається у компресорі (К-3), для забезпечення аерацію та подолання гідравлічного тиску стовпа рідини у ферментері. При цьому повітря розігрівається до температури від 210 до 270°C, а тиск становить 0,35 МПа,

ДР 5.4. Охолодження повітря і видалення зайвої вологи

Повітря охолоджують до температури 25-30°C, у теплообміннику-охолоджувачі (Т-4). Надлишок вологи видаляють за допомогою ресивера (Р-5), що усуває пульсаційний рух повітря. На цьому етапі показник вологості досягає до 60-70%.

ДР 5.5. Нагрівання повітря

В теплообміннику-нагрівачі (Т-6), повітря нагрівається до температури 45-50°C. На даному етапі показник вологості становить близько 50%.

ДР 5.6. Тонке очищення повітря

Нагріте повітря потрапляє в головний фільтр очистки (Ф-7), в якому відбувається затримка часточок. На цьому етапі ступінь очищення становить 95%.

ДР 5.7. Очищення повітря на індивідуальних фільтрах

Перед тим, як подати повітря у біореактори, воно має пройти через фільтри індивідуального очищення. В результаті ступінь кінцевої очистки повітря складає 99,999% та КУО – 0.

ДР 6. Підготовка і стерилізація титрувальних розчинів.

Оскільки кількість титрувальних розчинів є досить великою, доцільніше готувати титрувальні розчини разом для усіх стадій.

ДР 6.1. Приготування розчину хлоридної кислоти

Для того, щоб приготувати 13,33 л 6%-го розчину HCl у реактор-змішувач (Р-12) подається за допомогою об'ємного дозатора (Д-11) 11,14 л стерильної дистильованої води і вноситься за допомогою мірного циліндра при постійному перемішуванні 2,19 л 37%-ого розчину HCl. Щоб уникнути сильних екзотермічних реакцій, рідини необхідно змішувати саме в такому порядку, а не навпаки.

ДР 6.2. Приготування і стерилізація 6%-го розчину натрій гідроксиду

Для того щоб приготувати 13,33 л 6%-го розчину NaOH, потрібно на технічних вагах зважити 799,9 г кристалічного їдкого натрію. Наважку переносять у реактор-змішувач (Р-14) і при постійному перемішуванні додають за допомогою об'ємного дозатора (Д-13) 12,53 л водопровідної води. Стерилізують у реакторі при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 7. Приготування і стерилізація поживних середовищ

ДР 7.1. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках.

Для вирощування інокуляту потрібно 600 мл поживного середовища. Враховуючи, що 10 % від об'єму поживного середовища є посівним матеріалом (60 мл), то кількість води, яка необхідна для приготування поживного середовища становитиме 540 мл.

Розрахунки кількостей компонентів необхідних для приготування середовища з метою вирощування посівного матеріалу у колбах на качалках наведено у табл. 5.3 (розділ 5). Дані розрахунків заокруглен для практичної зручності.

ДР 7.1.1. Приготування і стерилізація композиції А

Використовуючи технічні терези відважують 0,78 г сечовини, 9 г глюкози. Наважки зважених речовин поміщають у колбу об'ємом 1 л, наливають дистильовану воду (0,4 л), розчиняють шляхом перемішування, для закриття колби використовують ватно-марлевий корок. Стерилізація відбувається в автоклаві при 112 °С (0,05 МПа) протягом 30 хв.

ДР 7.1.2. Приготування і стерилізація композиції Б

Використовуючи технічні терези відважують 0,15 г MgSO_4 . Наважку відваженої речовини поміщають у колбу об'ємом 0,1 л, наливають дистильовану воду (0,05 л), розчиняють шляхом перемішування, для закриття колби використовують ватно-марлевий корок. Стерилізація відбувається в автоклаві при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 7.1.3. Приготування і стерилізація композиції В

Використовуючи технічні терези відважують 0,3 г NaCl та 0,3 г K_2HPO_4 . Наважку відваженої речовини поміщають у колбу 0,25 л, наливають дистильовану воду (0,1 л), розчиняють шляхом перемішування. Стерилізація відбувається в автоклаві при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 7.1.4. Приготування і стерилізація композиції Г

Використовуючи технічні терези відважують 0,12 г FeSO_4 , 0,006 г ZnSO_4 , 0,0018 г MnCl_2 , 0,012 г CoCl_2 , 0,0012 г NiCl_2 , 0,0018 г Na_2MoO_4 . Наважки відважених речовин поміщають у колбу об'ємом 0,1 л, наливають дистильовану воду (0,05 л), розчиняють шляхом перемішування, для закриття колби використовують ватно-марлевий корок. Стерилізація відбувається в автоклаві при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 7.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту у посівному апараті об'ємом 10 л.

Для вирощування інокуляту потрібно 6000 мл поживного середовища. Враховуючи, що 10 % від об'єму поживного середовища є посівним матеріалом (600 мл), а також те, що 10% складе конденсат, що утвориться під час стерилізації

поживного середовища в інокуляторі, то кількість води, яка необхідна для приготування поживного середовища становитиме 5400 мл.

Розрахунки кількостей компонентів необхідних для приготування середовища з метою вирощування посівного матеріалу у колбах на качалках наведено у табл. 5.4 (розділ 5). Дані розрахунків заокруглен для практичної зручності.

ДР 7.2.1. Приготування і стерилізація композиції А

Використовуючи технічні терези відважують 7,8 г сечовини, 90 г глюкози. Наважки зважених речовин поміщають у колби об'ємом 3 л, наливають питну воду (1,5 л), розчиняють шляхом перемішування, для закриття колби використовують ватно-марлевий корок. Стерилізація відбувається в автоклаві при 112 °C (0,05 МПа) протягом 40 хв. Після стерилізації в асептичних умовах композицію додають в ферментер Ф-32 до простерилізованої композиції Б

ДР 7.2.2. Приготування і стерилізація композиції Б

Використовуючи технічні терези відважують 1,5 г $MgSO_4$, 3 г $NaCl$ та 3 г K_2HPO_4 , 1,2 г $FeSO_4$, 0,06 г $ZnSO_4$, 0,018 г $MnCl_2$, 0,12 г $CoCl_2$, 0,012 г $NiCl_2$, 0,018 г Na_2MoO_4 . Наважки відважених речовин поміщають у посівний апарат (Ф-32) об'ємом 10 л, подають через лічильник питну воду (4,5 л) і стерилізують при 131 °C (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 7.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту у посівному апараті об'ємом 100 л.

Для вирощування інокуляту потрібно 60 л поживного середовища. Враховуючи, що 10 % від об'єму поживного середовища є посівним матеріалом (6 л), а також те, що 10% складе конденсат, що утвориться під час стерилізації поживного середовища в інокуляторі, то кількість води, яка необхідна для приготування поживного середовища становитиме 54 л.

Розрахунки кількостей компонентів необхідних для приготування середовища з метою вирощування посівного матеріалу у колбах на качалках наведено у табл. 5.5 (розділ 5). Дані розрахунків заокруглено для практичної зручності.

ДР 7.3.1. Приготування і стерилізація композиції А

Використовуючи технічні терези відважують 78 г сечовини, 900 г глюкози. Наважки зважених речовин поміщають у реактор-змішувач (Р-16), додають 15 л води питної, вмикають перемішувач і стерилізують при 112 °С (0,05 МПа) протягом 30 хв. Простерилізований розчин, який отримали, подають самоплином у попередньо простерилізований інокулятор (Ф-36) об'ємом 100 л.

ДР 7.3.2. Приготування і стерилізація композиції Б

Використовуючи технічні терези відважують 15 г MgSO_4 , 30 г NaCl та 30 г K_2HPO_4 , 12 г FeSO_4 , 0,6 г ZnSO_4 , 0,18 г MnCl_2 , 1,2 г CoCl_2 , 0,12 г NiCl_2 , 0,18 г Na_2MoO_4 . Наважки зважених речовин поміщають у посівний апарат (Ф-36) об'ємом 100 л, через лічильник додають питну воду (45 л) і стерилізують при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 7.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для ферментера об'ємом 1 м³.

Для вирощування інокуляту потрібно 600 л поживного середовища. Враховуючи, що 10 % від об'єму поживного середовища є посівним матеріалом (60 л), а також те, що 10% складе конденсат, що утвориться під час стерилізації поживного середовища в інокуляторі, то кількість води, яка необхідна для приготування поживного середовища становитиме 540 л.

Розрахунки кількостей компонентів необхідних для приготування середовища з метою вирощування посівного матеріалу у колбах на качалках наведено у табл. 5.6 (розділ 5). Дані розрахунків заокруглено для практичної зручності.

ДР 7.4.1. Приготування і стерилізація композиції А

Використовуючи ваговий дозатор (Д-17) подають, 0,78 кг сечовини, 9 кг глюкози у реактор-змішувач (Р-18), за допомогою лічильника подають 150 л води питної, вмикають перемішувач і стерилізують при 112 °С (0,05 МПа) протягом 30 хв. Простерилізований розчин, який отримали, самоплином у попередньо простерилізований інокулятор (Ф-40) об'ємом 1 м³.

ДР 7.4.2. Приготування і стерилізація композиції Б

Використовуючи технічні терези відважують 0,15 кг MgSO_4 , 0,3 кг NaCl та 0,3 кг K_2HPO_4 , 0,12 кг FeSO_4 , 0,006 кг ZnSO_4 , 0,0018 кг MnCl_2 , 0,012 кг CoCl_2 , 0,0012 кг NiCl_2 , 0,0018 кг Na_2MoO_4 . Наважки зважених речовин поміщають у ферментер (Ф-40) об'ємом 1 м^3 , через лічильник додають питну воду (450 л) і стерилізують при 131°C (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 7.5. Приготування і стерилізація поживного середовища для ферментера об'ємом 10 м^3 .

Для вирощування інокуляту потрібно 6 м^3 поживного середовища. Враховуючи, що 10 % від об'єму поживного середовища є посівним матеріалом (600 л), а також те, що 10% складе конденсат, що утвориться під час стерилізації поживного середовища в інокуляторі, то кількість води, яка необхідна для приготування поживного середовища становитиме 5400 л.

Розрахунки кількостей компонентів необхідних для приготування середовища з метою вирощування посівного матеріалу у колбах на качалках наведено у табл. 5.7 (розділ 5). Дані розрахунків заокруглено для практичної зручності.

На даній стадії стерилізація поживного середовища буде відбуватися в установці безперервної стерилізації (УБС-5).

Спочатку у реактор (Р-20), застосовуючи об'ємно-ваговий дозатор (Д-19) подають 1,5 кг MgSO_4 , 3 кг NaCl та 3 кг K_2HPO_4 , 1,2 кг FeSO_4 , 0,06 кг ZnSO_4 , 0,018 кг MnCl_2 , 0,12 кг CoCl_2 , 0,012 кг NiCl_2 , 0,018 кг Na_2MoO_4 , через лічильник додають питну воду (150л) і перемішують до повного розчинення солей.

За допомогою вагового дозатора (Д-22) а реактор (Р-23) подають 7,8 кг сечовини, 90 кг глюкози, 5250 л води питної та розчин солей від Р-20.

Мішалкою, якою оснащений реактор, перемішують до повного розчинення компонентів, рН доводять до 7,2 – 7,8. Нестерильне поживне середовище перекачують з допомогою відцентрового насоса (Н-24) у колонку для нагрівання (К-28). Сюди ж, під тиском 0,3 – 0,6 МПа, подають гостру пару. Середовище швидко нагрівається до 131°C . У теплообмінники-витримувачі (Т-25,26,27)

середовище подається із нагрівника. Далі середовище надходить у перший пластинчастий теплообмінник-рекуператор (Т-29), в якому відбувається рекуперація тепла (обмін тепла між гарячим та холодним середовищем, яке рухається назустріч), а також та на другий теплообмінник-охолоджувач (Т-30), (подається холодна вода), в якому відбувається його охолодження до 90 °С. Стерильне поживне середовище поступає, із теплообмінника-охолоджувача (Т-30), у ферментер (ФР-44) об'ємом 10 м³. Середовище охолоджується до температури культивування – 28 °С за допомогою подачі холодної води у рубашку ферментера.

ТП 8. Підготовка посівного матеріалу

ТП 8.1. Зберігання колекційної культури *Pseudomonas batumici*

У пробірці на скошеному щільному агаризованому середовищі зберігають колекційну культуру *Pseudomonas batumici* ІМВ В-7532. На свіже поживне середовище проводять пересіви кожних 3-4 місяці. Усі роботи, які пов'язані із колекційною культурою проводять із дотриманням правил асептики.

ТП 8.2. Одержання робочої культури на агаризованих середовищах

Колекційну культуру *P. batumici* ІМВ В-7532 розсівають на чашки Петрі із м'ясо-пептонним агаром, щоб одержати ізольовані колонії. Вирощування проводять у термостаті при температурі 28 °С (24 год).

ТП 8.3. Вирощування інокуляту в колбах на качалках

Дотримуючись асептичних умов у колбу об'ємом 1 л зі стерильною композицією А (від ДР 7.1.1) вносять простерилізовану композицію Б (від ДР 7.1.2), вносять простерилізовану композицію В (від ДР 7.1.3), вносять простерилізовану композицію Г (від ДР 7.1.4), перемішують і розливають по 150 мл у 6 стерильних качалочних колб об'ємом 750 мл.

5 мл стерильної води вносять у пробірку з робочою культурою *P. batumici* ІМВ В-7532 (від ТП 8.2), суспендують клітини, з допомогою стерильної піпетки відбирають отриману суспензію бактерій і переносять у качалочні колби із живильним середовищем. Для засіву 1 колби використовують бактеріальну суспензію, одержану з 1 пробірки.

Культивують на качалках (200 об/хв) при температурі 25°C упродовж 55 год, рН 7,2-7,8, після чого відбувається визначення концентрації біомаси, яка повинна становити 8,0 г/л, і проводять мікробіологічний контроль, після якого культуральну рідину зливають у засівну колбу об'ємом 1 л.

ТП 8.4. Вирощування в інокуляторі об'ємом 10 л

Композицію А приготовану в колбі (від ДР 7.2.1), подають у посівний апарат (Ф-32) із композицією Б (від ДР 7.2.2), вмикають перемішуючий пристрій, подають 6 %-ий розчин HCl (від ДР 6.1) і 6%-ий розчин NaOH (від ДР 6.2) рН середовища за показником датчика рН доводять до 7,2-7,8.

Використовуючи засівну колбу вносять посівний матеріал (від ТП 8.3). Культивують при температурі 25°C упродовж 48 год.

Кожних 6 годин з інокулятора проводять відбір проб культуральної рідини, щоб здійснити мікробіологічний контроль та визначити концентрацію біомаси, яка повинна становити 6,8-7,0 г/л.

ТП 8.5. Вирощування в інокуляторі об'ємом 100 л

Від реактора-змішувача (Р-16) (від ДР 7.3.1), самоплином подають композицію А у посівний апарат (Ф-36) із композицією Б (від ДР 7.3.2), вмикають перемішуючий пристрій, подають самоплином 6 %-ий розчин HCl (від ДР 6.1) і 6%-ий розчин NaOH (від ДР 6.2) рН середовища за показником датчика рН доводять до 7,2-7,8. Далі в інокулятор (Ф-36) з допомогою засівного пристрою подають посівний матеріал в стерильних умовах. Вирощують при температурі 25°C і концентрації розчиненого упродовж 48 год.

Кожних 6 годин з інокулятора проводять відбір проб культуральної рідини, щоб здійснити мікробіологічний контроль та визначити концентрацію біомаси, яка повинна становити 6,8-7,0 г/л.

ТП 8.6. Вирощування в інокуляторі об'ємом 1 м³

Від реактора-змішувача (Р-18), самоплином подають композицію А (від ДР 7.4.1) у посівний апарат (Ф-40) із композицією Б (від ДР 7.4.2), вмикають перемішуючий пристрій, подають самоплином 6 %-ий розчин HCl (від ДР 6.1) і 6%-ий розчин NaOH (від ДР 6.2) рН середовища за показником датчика рН

доводять до 7,2-7,8. Далі в інокулятор (Ф-36) з допомогою засівного пристрою подають посівний матеріал в стерильних умовах. Вирощують при температурі 25°C і концентрації розчиненого упродовж 48 год.

Кожних 6 годин з інокулятора проводять відбір проб культуральної рідини, щоб здійснити мікробіологічний контроль та визначити концентрацію біомаси, яка повинна становити 6,8-7,0 г/л.

ТП 9. Виробничий біосинтез

ТП 9.1. Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 10 м³

Від УБС-25 у виробничий ферментер (Ф-44) об'ємом 10 м³, перекачують поживне середовище (від ДР 7.5) й посівний матеріал від посівного апарата Ф-40. Вмикають перемішуючий пристрій, подають 6 %-ий розчин HCl (від ДР 6.1) і резервний 6%-ий розчин NaOH (від ДР 6.2) рН середовища за показником датчика рН доводять до 7,2-7,8.

Вирощування проводять упродовж 72 год, при температурі 25°C (для цього у рубашку ферментера подається насичена пара і по датчику контролюється температура) та обертанні мішалки 180 об/хв. У ферментері підтримують надлишковий тиск на рівні 0,03 – 0,04 МПа

Кожні 6 год із ферментера відбирають проби культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю, визначення концентрації біомаси (8,0 г/л).

Після закінчення процесу біосинтезу культуральну рідину перекачують відцентровим насосом (Н-32) у цех виділення цільового продукту.

РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

Розділ 8.1. Мікробіологічний контроль.

Мікробіологічний контроль чистоти культури

Оскільки культивування бактерій *Pseudomonas batumici* IMB B-7532 для виробництва батуміну здійснюється в асептичних умовах, на всіх етапах необхідно проводити мікробіологічний контроль, щоб переконатись у відсутності забруднень.

Кожні 6 год з інокуляторів і ферментера відбирають зразки культуральної рідини для аналізу.

Мікробіологічний контроль виконується за допомогою двох методів: прямого висіву на агаризовані поживні середовища та мікроскопію.

Прямий висів здійснюється шляхом посіву культуральної рідини на чашки Петрі, що містять м'ясо-пептонний агар (МПА) для виявлення бактерій, а також глюкозо-картопляний агар (ГКА) або сусло-агар (СА) для виявлення грибів та дріжджів.

На м'ясо-пептонному агарі колонії гладкі, круглі, блискучі, пастоподібні (рис. 8.1)[17].

Мікроскопіювання здійснюється з використанням світлового мікроскопа з імерсійною системою. Для підготовки препарату, в асептичних умовах, на чисте знежирене предметне скло наноситься невелика краплина культуральної рідини за допомогою стерильної петлі. Краплю, що містить мікроорганізми, розподіляють по склу за допомогою бактеріальної петлі (діаметр мазка приблизно 1 см). Мазок повітряною шляхом висушується при кімнатній температурі до повного випаровування вологи. Потім на повністю сухий препарат наносять 1–2 краплини імерсійного масла за допомогою скляної

					НУХТ БТЕК 04.02.09 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Михальська Ю.С.			Розділ 8. Контроль виробництва	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Буценко Л. М.					72	21 72
Консульт.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В. П.						

палички. Після завершення роботи залишки масла з імерсійного об'єктива видаляють, протираючи його ватою, змоченою етиловим спиртом. [62].

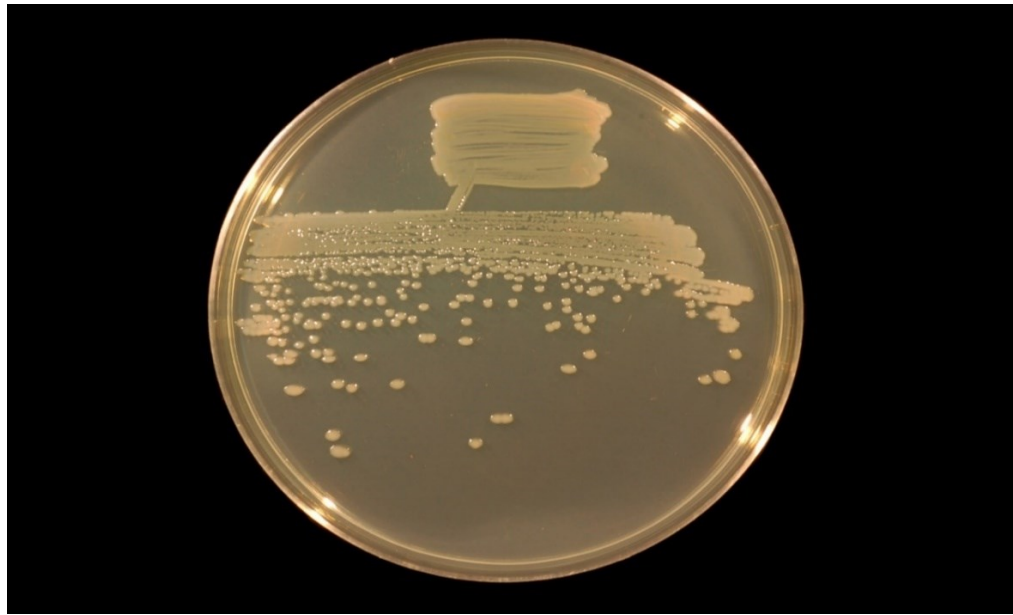


Рис. 8.1 *Pseudomonas* на МПА [17].

За відсутності у зразку сторонньої мікробіоти під час мікроскопіювання можна побачити клітини *P. batumici* IMB B-7532. Палички розміром 2,2 x 1,0 мкм. Рухомі, з кількома (найчастіше 2) полярними джгутиками, довжина джгутиків 6-8 мкм з 4-6 хвилями. (рис 8.2)

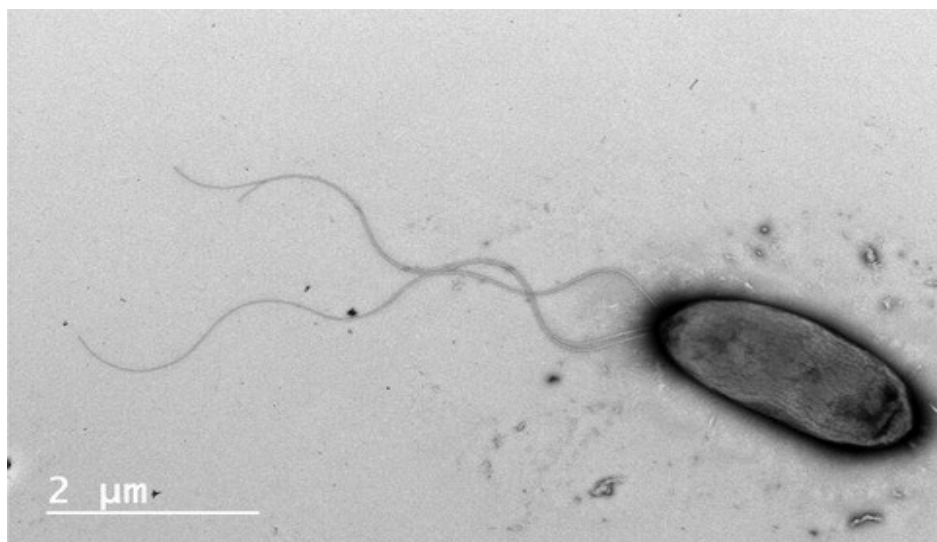


Рис. 8.2 *Pseudomonas batumici* під мікроскопом [63]

Мікробіологічний контроль стерильності поживних середовищ

З біореактора беруть зразки поживного середовища, які потім інкубують у термостаті протягом 48 годин при відповідній температурі. Після закінчення інкубаційного періоду має відсутність росту мікроорганізмів на зразках. Якщо спостерігається ріст мікроорганізмів, то вважають, що середовище не придатне для подальшого використання. [64].

Мікробіологічний контроль стерильності аераційного повітря

В кожній точці контролю беруть зразки, які розміщують у дві або більше чашки Петрі з поживним середовищем для бактерій і грибів. Ці зразки залишаються відкритими протягом 4 годин. Потім чашки Петрі зберігаються в термостаті та інкубуються не менше 5 діб. Чашки Петрі з поживним середовищем для бактерій інкубуються при температурі $32,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$, а для грибів - при температурі $22,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$. Після закінчення інкубації підраховують кількість утворених колоній мікроорганізмів на поживному середовищі в кожній чашці Петрі, обчислюють середнє значення і визначають кількість бактерій і грибів в 1 м^3 повітря. [65].

Ефективність роботи системи очищення повітря оцінюють коефіцієнтом проскоку K_p , %

$$K_p = X \cdot 100 / X_0$$

де X , X_0 – концентрація мікроорганізмів у повітрі відповідно після і до системи очищення повітря, кл/м³ .

Для асептичних процесів біосинтезу K_p повинен становити $10^{-8} \dots 10^{-11} \%$, для промислових систем – $10^{-4} \dots 10^{-6}$ [66].

Мікробіологічний контроль стерильності титрувальних розчинів

Випробування титрувальних розчинів на стерильність проводять аналогічно мікробіологічному контролю стерильності поживних середовищ.

8.2. Показники росту і синтезу цільового продукту

8.2.1. Концентрація біомаси

Концентрацію біомаси визначають шляхом вимірювання оптичної густини клітинної суспензії та перерахунку на абсолютну суху масу клітин з використанням калібрувального графіка. Оптичну густину вимірюють на ФЭК-56М спектрофотометрі у кюветі з оптичним шляхом завдовжки 3 мм при довжині хвилі 540 нм.

Спочатку в одну кювету спектрофотометра додають поживне середовище як контрольний зразок для автоматичного обнулення. Після обнулення спектрофотометра, в іншу кювету додають зразок культуральної рідини, який був відібраний з ферментера, і проводять вимір оптичної густини. За допомогою калібрувального графіка оптичну густину зразка переводять у г/л біомаси бактерій.

Калібрувальний графік будується самостійно при використанні стандартних концентрацій біомаси *P. batumici*. Вимір проводять в декілька повторів, щоб упевнитись у відсутності похибок[67].

8.2.2. Концентрація цільового продукту

Для визначення концентрації цільового продукту (батуміну) використовували біологічний та фізико-хімічний методи.

Біологічний метод – метод дифузії в агар. Метод полягає в порівнянні ступеня пригнічення росту тест-культури за допомогою різних концентрацій антибіотика, що містяться в досліджуваному матеріалі, з пригніченням його зростання відомими концентраціями стандартного антибіотика. Загальне пригнічення росту тест-культури досягається завдяки дифузії антибіотика з досліджуваного матеріалу до щільного середовища [68].

Методом біологічної дифузії на агаризованій чашці здійснювали аналіз культуральної рідини, використовуючи *Staphylococcus aureus* 6539P як тест-культуру. Зразки культуральної рідини наносили в пробурені лунки чашок з агаризованим середовищем, які були попередньо засіяні тест-культурою в стандартних умовах аналізу. Чашки зберігали при температурі 30 °С. Після 24

годин вимірювали діаметри зон пригнічення. Крива біологічного стандарту була побудована як логарифмічна залежність між різними концентраціями стандартного батуміну і діаметром зони пригнічення [69].

Фізико-хімічний метод - спектрофотометрією спиртового розчину батуміну. Культуральне середовище було екстраговано за допомогою хлороформу. Отриманий екстракт був упарований у вакуум-випарювачі при температурі 40-45°C, а потім піддавався очищенню за допомогою тонкошарової хроматографії. Сорбент, що містив батумін, був знятий з хроматографічної пластини та елюйований спиртом. Вміст батуміну у отриманому розчині визначали спектрофотометрично та розраховували за допомогою відповідної формули:

$$C = \frac{D \times P \times 10^4}{E^{1\%}},$$

Де С – концентрація батуміну, мг/л; D - оптична густина досліджуваного розчину батуміну при $\lambda=225$ нм; P - загальне розведення проби; $E^{1\%}$ - коефіцієнт екстинкції 1%-го розчину батуміну (рівний 584); 10^4 - коефіцієнт перерахунку концентрації на 1 л культуральної рідини [70,71].

Біологічний (метод дифузії в агар) та фізико-хімічний (спектрофотометричний) методи визначення батуміну давали однакові результати при встановленні його концентрації в розчинах очищеного препарату, але в 1,5-2 рази відрізнялися при дослідженні вмісту батуміну в культуральній рідині продуцента. В останньому випадку надійні результати давав фізико-хімічний метод визначення батуміну.

Обладнання для проведення аналізу: Спектрофотометр КФК-3-01-«ЗОМЗ» (фотометр фотоелектричний) дозволяє швидко та точно провести спектрофотометричний аналіз розчину, а також дає можливість пропустити через досліджуваний зразок світловий потік будь-якої необхідної довжини хвилі, проводити фотометричні вимірювання, скануючи (переглядаючи) весь

діапазон довжин хвиль не тільки видимого (VIS) світла – від 380 до 750 нм, але й ближнього ультрафіолету (UV) – від 200 до 380 нм.



Рис. 8.3 Спектрофотометр

8.2.3. Концентрація джерела Карбону і Нітрогену

Визначення концентрації вуглеводів

Моніторинг та контроль концентрації глюкози є важливими аспектами в процесах ферментації, оскільки глюкоза є основним джерелом вуглецю та енергії. Це особливо важливо в промисловій ферментації, де вона використовується для оптимізації виробництва біомаси та метаболітів, таких як амінокислоти, спирти, пептиди та білки. Для контролю концентрації глюкози були використані біосенсиори.

Платформа біосенсора представлена на рис. 8.4 і складається з біосенсорного чіпа B.LV5 (датчик розширеного діапазону, робочий рН – діапазон 5-9, рис. 8.4 (A)), потенціостата з налаштованим підключенням для встановлення біосенсора (передавач SIX, рис. 8.4 (B)) , а також програмне забезпечення bioMON, яке використовується для роботи платформи біосенсорів. Усі компоненти налаштовані та надані Jobst Technologies GmbH – компанією IST AG (Фрайбург, Німеччина). Біосенсорний чіп сконструйований

як проточна комірка об'ємом 1 мкл з трубкою (0,5 мм внутрішній діаметр) для вхідного та вихідного отворів, що закінчуються фітингами Люера. Отже, його можна легко інтегрувати в установку для культивування.

Електрохімічна комірка складається з двох Pt-робочих і одного Pt-контр-електродів і внутрішнього Ag/AgCl-електрода псевдоеталонного електрода. Крім того, в комплекті є два холості (без ферментного покриття) Pt-робочі електроди, по одному на кожен робочий електрод. Завдяки багатомашинній конструкції датчика кожен зразок автоматично вимірюється в двох примірниках (два робочих електрода для визначення глюкози). Хроноамперометричні вимірювання в присутності різних середовищ та концентрації глюкози проводили при напрузі +450 мВ проти Ag/AgCl. Віднімання відповідного порожнього струму (отриманого від відповідного холостого електрода) зі стійкої реакції біосенсора (струму, отриманого з відповідного робочого електрода, покритого ферментом) призвело до значення струму, яке корелює з наявною концентрацією глюкози. Усі вимірювання біосенсорів підлягали стандартному відхиленню максимум 5%.

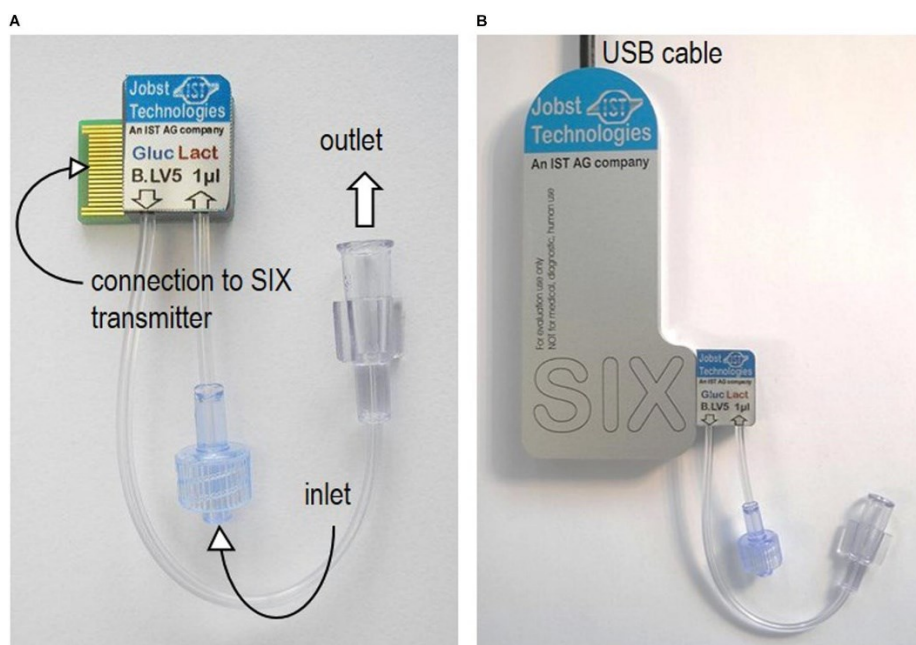
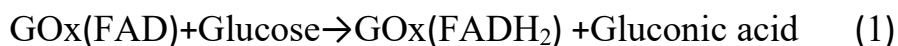


Рис. 8.4 Платформа біосенсора. (А) Біосенсорний чіп B.LV5, розроблений як проточна комірка з підключенням до передавача SIX і фітингів

Люера як з'єднання для входу та виходу. (В) Біосенсор, підключений до передавача SIX

Біосенсор як такий складається з тонкого ферментативного шару (на основі GOx) разом із пов'язаним з ферментом кофактором FAD/FADH₂, захопленим гідрогелевою мембраною, яка розміщена поверх чутливого до H₂O₂ Pt-робочого електрода. Принцип роботи біосенсора заснований на ферментативному окисленні глюкози до глюконової кислоти (1), з подальшим повторним окисненням флавінових груп (FAD/FADH₂) у присутності кисню (регенерація кофактора), що призводить до H₂O₂ генерації (2), а також шляхом анодного окислення утвореної H₂O₂ (3) на поверхні робочого електрода.



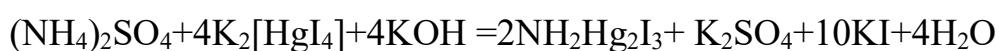
Кількість H₂O₂, що утворюється або, відповідно, кількість H₂O₂, окисленої на робочому електроді, пропорційна концентрації глюкози в зразку.

Будуються калібрувальні графіки при тестуванні зразків із відомими концентраціями глюкози [72].

Визначення концентрації Нітрогену.

Визначення сечовини в культуральній рідині проводиться фотометричним методом.

Принцип методу. Метод базується на кількісному визначенні нітрогену у вигляді солей NH₄⁺. Для цього часто використовують кольорову реакцію з реактивом Неслера:



Реактив Неслера з йонами NH₄⁺ утворює важкорозчинну червоно-оранжеву комплексну сполуку.

Реактиви: Розчин реактиву Неслера. ($K_2[HgI_4]$ в 40 % KOH). Стандартний розчин $(NH_4)_2SO_4$. Наважку 0,3120 г амоній сульфату розчиняють у дистильованій воді і розчин доводять до мітки у мірній колбі на 500 см^3 ($T_1 = 250\text{ мкг}NH_4/\text{см}^3$). Розчин з $T_2 = 25\text{ мкг}/\text{см}^3$ готують розведенням вихідного.

Обладнання. Мірні колби на 100 см^3 (10 шт.), піпетка на 1 см^3 (3 шт.), піпетка на 5 см^3 , піпетка на 10 см^3 , стакан термостійкий на $250\text{-}400\text{ см}^3$. Фотоелектроколориметр (КФК-2) чи спектрофотометр, кювети з $l = 5\text{ см}$.

Методика аналізу. Зразок культуральної рідини, переносять у мірну колбу на 250 см^3 , доводять до мітки і перемішують. 10 см^3 одержаного розчину переносять у мірну колбу на 100 см^3 , доводять до мітки дистильованою водою і перемішують. З останнього розчину відбирають аліквоту ($5\text{-}10\text{ см}^3$) у мірну колбу на 100 см^3 додають близько 80 см^3 дистильованої води, $1,0\text{ см}^3$ реактиву Неслера і доводять об'єм розчину до мітки. Через 10 хвилин вимірюють оптичну густину розчину на фотоелектроколориметрі при довжині хвилі 400 нм і товщині шару 1 см .

Побудова градуювального графіку. Для побудови градуювального графіку у мірних колбах об'ємом 100 см^3 готують серію розчинів, для чого відбирають $0; 1; 2; 3; 4; 5; 6\text{ см}^3$ стандартного розчину T_2 , що відповідає $0; 25; 50; 75; 100; 125$ та 150 мкг амонійного азоту. Додають близько 80 см^3 дистильованої води, $1,0\text{ см}^3$ реактиву Неслера і доводять загальний об'єм розчинів водою до мітки. Через 10 хвилин вимірюють оптичну густину розчинів при довжині хвилі 400 нм і товщині шару 1 см відносно «холостого» досліді. У випадку побудови градуювального графіку в межах $5\text{-}60\text{ мкг}$, використовують кювету з товщиною світло поглинаючого шару 5 см .

Концентрацію NH_4^+ визначають за градуювальним графіком [73].

8.3. Показники якості готового продукту

8.3.1 Ідентифікація батуміну

Інфрачервона спектроскопія - це один з методів абсорбційної спектроскопії, який ґрунтується на здатності молекул поглинати інфрачервоне випромінювання. Цей метод використовується для вивчення змін у коливальній і обертальній енергії ковалентних зв'язків у молекулах.

Інфрачервона (ІЧ) ділянка спектра охоплює діапазон довжин хвиль від 0,8 до 200 мкм або хвильові числа від 12 000 до 50,00 см^{-1}). Цей діапазон може бути поділений на кілька підінтервалів відповідно до різних типів коливань, які спостерігаються, а також в залежності від доступної апаратури для їхнього вимірювання.

Діапазон від 0,7 до 2,5 мкм відповідає валентним коливанням між атомами гідрогену та іншими атомами. Фундаментальні коливання спостерігаються в діапазоні від 2,5 до 50 мкм. Спектри поглинання в цьому діапазоні є характерними для окремих хімічних сполук, особливо відзначаються інтенсивні піки поглинання у діапазоні 2,5–15 мкм, де присутні багато піків поглинання функціональних груп. Смуги поглинання в діапазоні 15–50 мкм відповідають деформаційним коливанням важких атомів та груп атомів. Поглинання в дальньому ІЧ-діапазоні відповідає низькочастотним коливанням і обертанням, аналітично цей діапазон менш застосовується.

Інфрачервоні (ІЧ) спектри можуть бути представлені двома способами: відображення пропускання відносно вихідного світла у відсотках на осі ординат, тоді як ось абсцис може бути позначена у мікрометрах (довжинах хвиль) або в хвильових числах (см^{-1}), залежно від вибору приладу для реєстрації спектрів. ІЧ-спектри є цінним джерелом інформації про структуру молекулярних сполук і широко використовуються для ідентифікації органічних речовин[74].

8.3.2 Кількісне визначення батуміну в лікарському препараті

Високоєфективна рідинна хроматографія (ВЕРХ) є аналітичним методом, який застосовується для розділення, ідентифікації та кількісного визначення кожного компонента в суміші. Для розділення суміші використовується принцип

колонкової хроматографії, а потім компоненти ідентифікуються та визначаються кількісно за допомогою спектроскопії.

Для дослідження було використано препарат, що містить батумін у вмісті 1 мг/г. Основний розчин зразку з концентрацією 1 мг/мл був приготовлений шляхом розчинення препарату в метанолі.

Дослідження проводили на хроматографі Dionex Ultimate 3000 (рис. 8.6), оснащеному насосом LPG-3400SD, автосемплером ACC-3000 та детектором флуоресценції FLD-3100. Зразки розділяли на хроматографічній колонці Acclaim C18 150×4,6, 5 μm . Рухомою фазою слугувала суміш ацетонітрил : вода у співвідношенні 95:5. Об'єм інжекції складав 0,005 мл, швидкість потоку рухомої фази – 1,0 мл/хв, температура колонки становила 30 $^{\circ}\text{C}$, час одного розділення – 10 хвилин. Довжини хвиль: λ_{ex} – 254 нм, λ_{em} – 303 нм. Обчислення результатів проводили за допомогою програмного забезпечення Chromeleon 7.2. Статистичний аналіз проводили за допомогою програмного забезпечення Microsoft Excel 2010. Валідацію методики проводили за показниками вибірковості, лінійності та параметрів придатності хроматографічної системи [75].



Рис 8.6 Хроматограф Dionex Ultimate 3000 [76]

8.3.3 Визначення мікробіологічної чистоти лікарського препарату

Вказані показники визначаються відповідно до ДФУ (Державної Фармакопейної України), Доповнення 1, розділ 2.6.12, сторінка 37, розділ 2.6.13, N, сторінка 42.

Рекомендовані вимоги до препарату "Батумінова мазь 0,1%" такі:

- 1) Загальна кількість аеробних бактерій - не більше ніж 10² КУО/г або КУО/мл.
- 2) Загальна кількість дріжджових і пліснявих грибів - не більше ніж 10¹ КУО/г або КУО/мл.
- 3) Відсутність *Pseudomonas aeruginosa* в 1 г.
- 4) Відсутність *Staphylococcus aureus* в 1 г.

Приготовані зразки лікарської форми під номерами 1-4 були збережені в умовах холодильника при температурі (5 ± 3) °С.

Мікробіологічну чистоту препарату визначали негайно після приготування, а також через 10, 20, 30 днів і 5 місяців зберігання. Всі дослідження проводилися в асептичних умовах з використанням ламінарного боксу (кабінет біологічної безпеки AC2-4E1 "Esco", Індонезія).

Згідно з рекомендаціями ДФУ, під час випробувань використовували такі тверді і рідкі живильні середовища: соєво-казеїновий агар (для визначення загальної кількості життєздатних аеробних мікроорганізмів), Сабуро-декстрозний агар (для визначення загальної кількості дріжджових і плісневих грибів), соєво-казеїновий бульйон (для попереднього інкубування з метою виявлення певних видів мікроорганізмів), манітносольовий агар (для ідентифікації *Staphylococcus aureus*), цетримідний агар (для ідентифікації *Pseudomonas aeruginosa*). Всі живильні середовища відповідали вимогам щодо ростових, інгібіторних та індикативних властивостей і пройшли випробування на стерильність згідно з вимогами ДФУ 2.0.

Для перевірки придатності методів визначення загальної кількості життєздатних аеробних мікроорганізмів і грибів в якості тестових штамів

використовували такі мікроорганізми з американської колекції культур: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404. Підготовку тестових мікроорганізмів проводили відповідно до вимог ДФУ.

Для отримання тестових штамів бактерій та грибів, кожен з них вирощувався окремо на відповідних живильних середовищах, і потім проводився підрахунок колоній. *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* вирощувались на соєво-казеїновому бульйоні при температурі 30-35 °C протягом 18-24 годин, а тест-штами грибів вирощувались на поверхні Сабуро-декстрозного агару при температурі 20-25 °C (культура *C. albicans* вирощувалась протягом 48 годин, *A. brasiliensis* - протягом 5 днів).

Якщо загальна кількість життєздатних аеробних мікроорганізмів менше 10 КУО/г, загальна кількість життєздатних дріжджових і плісневих грибів також менше 10 КУО/г, а при культивуванні тест-штамів *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* на соєво-казеїновому бульйоні спостерігається відсутність росту, це свідчить про те, що досліджувані зразки препарату відповідають вимогам ДФУ. Таким чином, досліджувані зразки МЛФ відповідають вимогам ДФУ за показником "мікробіологічна чистота". [77].

8.3.4 Визначення однорідності лікарського препарату

Мазі повинні бути однорідними, без грудок, м'якими на дотик, розріджуватися при температурі тіла, не мати запаху прогірклого жиру та ознак плісені.

Мазі повинні володіти визначеними консистентними властивостями, що характеризуються реологічними показниками: пластичністю, в'язкістю, періодом релаксації, від яких значною мірою залежить ступінь фармакодинаміки мазей. Реологічні показники служать критерієм оцінки якості мазей як при виробництві, так і в процесі їх зберігання.

Мазі повинні мати оптимальну дисперсність лікарських речовин і їх рівномірний розподіл, що гарантує максимальний терапевтичний ефект і незмінність сполуки при зберіганні. Одночасно вони повинні бути стабільні, без сторонніх домішок і з точною концентрацією лікарських речовин.

Для визначення однорідності мазі брали чотири проби кожного зразка по 20–30 мг кожна, розміщували по дві проби на предметне скло, накривали другим предметним склом і міцно притискали до утворення плям діаметром близько 2 см.

Отримані проби розглядали неозброєним оком (на відстані близько 30 см від очей). Зразок вважали однорідним, якщо в усіх чотирьох пробах не було виявлено видимих частинок, сторонніх включень і ознак фізичної нестабільності: агрегації і коалесценції частинок, коагуляції.

Якщо одна з проб не витримувала випробування, визначення проводили додатково ще на восьми пробах, при цьому всі вісім проб повинні були витримувати тест. Визначення однорідності проводили за методикою, наведеною в ДФУ 2.0 [78].

8.3.5 Визначення токсичності лікарського препарату

Експерименти проводять на тваринах, вирощених у віварії ЦНДЛ НФаУ, що знаходилися відповідно вимогам санітарно-гігієнічних норм на стандартному раціоні, та отримували їжу і воду *ad libitum*. Усі експерименти проводять відповідно до методик і вимог ДФЦ МОЗ України та комісії з біоетики. Тварин утримують у стандартних санітарних умовах. Під час експерименту тварини знаходяться у кімнаті для проведення випробувань при $t^{\circ}=20-25^{\circ}\text{C}$, вологості не більше 55%, природному світловому режимі “день-ніч”, у стандартних клітках, на харчовому раціоні з гранульованих кормів. З тваринами слід поводитись згідно з правилами «Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, яких використовують для експериментальних та наукових цілей» (Страсбург, 1986 р). Статистичну обробку отриманих результатів здійснюють методами варіаційної

статистики за допомогою стандартних пакетів програм Excel на персональному комп'ютері.

Однією з токсикологічних характеристик фармакологічного засобу є показник LD50, який визначається при вивченні гострої токсичності. При вивченні гострої токсичності препаратів їх застосовують у дозах, рекомендованих ДФЦ МОЗ України [79]. Перед введенням дослідних препаратів щури голодують протягом 12 годин. Доступ тварин до води має бути вільним, до їжі їх допускають лише через 6 годин після нанесення мазі (першого введення). Для виявлення можливих токсичних ефектів мазі проводять порівняння з показниками групи інтактних тварин, які перебувають в аналогічних умовах спостереження (інтактний контроль).

Гостру токсичність мазі вивчають на білих нелінійних щурах масою 180–200 г. Всі експериментальні групи складаються з 12 тварин – по 6 кожної статі. Спостереження за тваринами проводять протягом 14 діб. Для вивчення гострої токсичності при нашко́рному нанесенні мазі наносять на підготовлену (вистрижену за 24 години до нанесення препарату) ділянку шкіри спини і боків щурів розміром 8 х 6 см, що складає понад 15% від загальної площі шкірного покриву тварин. Досліджувана доза мазей становить 85 мг/см². Зважаючи на неможливість одноразового застосування мазі у вказаній дозі нанесення проводять тричі з інтервалом у 1 годину рівними дозами – 28 мг/см² на одне нанесення (доза розрахована виходячи з середньої маси тіла тварини та площі нанесення препарату). Також проводять дослідження гострої токсичності мазі при пероральному введенні (із розрахунку 5 г/кг) та ректальному введенні.

При ректальному введенні експериментальні тварини отримують мазі в дозі 3000 мг/кг одноразово. Введення проводять вранці натщесерце після рефлекторного випорожнення кишечника. Тест-зразок вводять у пряму кишку дуже повільно (60-90 с) за допомогою спеціального аплікатора. Після цього задній отвір щурів затуляють на 30 хв. за допомогою спеціального заще́пу.

Статистичну обробку отриманих результатів здійснюють методами варіаційної статистики за допомогою стандартних пакетів програм Excel на персональному комп'ютері Pentium III. При порівнянні результатів між двома групами використовують модифікований параметричний t- критерій Ст'юдента для виборок з нерівними дисперсіями [80].

Для того щоб краще розуміти показники контролю під час виробництва антибіотика батуміну наведено таблицю 8.1.

Карта постадійного контролю біосинтезу батуміну

<i>Номер контрольної точки та назва стадії</i>	<i>Об'єкт контролю та показник, що визначається</i>	<i>Засоби та методи контролю</i>	<i>Періодичність перевірки та порядок відбору проб</i>	<i>Нормативні значення показника</i>
Кт, Кх 2.1 Приготування 2 % розчину каустичної соди	Концентрація розчину, температура	Термометр технічний, хімічний метод	Після приготування розчину	C=2%, t= 40 °C
Кт, 3.1, 3.2 Підготовка виробничих приміщень	Підлога, стіни, обладнання, чистота	Візуальний огляд	Після прибирання	Чисте приміщення, відсутність пилу та бруду
Кт 4.2 Миття обладнання	Мийний розчин, температура мийного розчину, чистота обладнання	Термометр технічний, годинник	Під час проведення операції	t= 20-40°C, τ= 20-30 хв
Кт 4.3 Перевірка на герметичність	Герметичність обладнання, час роботи, тиск	Монометр технічний, годинник	Тиск визначається безперервно під час перевірки на герметичність	P=0,2 МПа, τ= 0,5-1 год
Кт, Км 4.4 Стерилізація обладнання	Обладнання, температура, тиск, час стерилізації, стерильність	Монометр технічний, термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,15 МПа, t= 130-135 °C, τ= 1 год, відсутність мікробіоти
Кт 4.5 Охолодження обладнання	Обладнання, температура, тиск, час	Монометр технічний, термометр технічний, годинник	Тиск визначається безперервно під час охолодження	P=0,003-0,005 МПа, t= 30 °C, τ= 1 год
Кт 5.2 Грубе очищення повітря	Повітря на виході з фільтра, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту обладнання	Після очищення повітря у фільтрі грубої очистки	E=80-90%

Кт 5.3 Компресія повітря	Стиснене повітря, температура, тиск	Манометр технічний, термометр	Після компресування повітря	$t = 210-270$ °C $P = 0,35$ МПа
Кт 5.4 Регуляція термодинамічних показників	Охолоджене повітря, температура,	Термометр технічний	Після охолодження повітря	$t = 25$ °C, $W = 60-70$ %
Кт 5.5 Нагрівання повітря	Нагріте повітря, температура,	Термометр технічний	Після нагрівання повітря	$t = 45-50$ °C, $W = 50$ %
Кт 5.6 Тонке очищення повітря	Повітря на виході з фільтра, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту обладнання	Після очищення повітря у фільтрі тонкої очистки	$E = 95-99$ %
Кт 5.7 Очищення на індивідуальних фільтрах	Повітря на виході з фільтра, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту обладнання	Після очищення повітря у фільтрі індивідуальної очистки	$E = 99,9999$ %
Км, Кх 6.1 Приготування 6-% р-ну хлоридної кислоти	Розчин хлоридної кислоти, концентрація, відсутність мікробіоти	мікробіологічний контроль	мікробіологічний контроль після приготування	$C = 6$ %, відсутність мікробіоти
Кт, Кх, Км 4.2 Приготування і стерилізація 6-% р-ну натрію гідроксиду	Розчин гідроксиду натрію Температура, час, концентрація, відсутність мікробіоти	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 131$ °C, $\tau = 40$ хв, $C = 6$ %, відсутність мікробіоти
Кт, Км 7.1.1 Приготування і стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 112$ °C, $\tau = 30$ хв, відсутність мікробіоти

Кт, Км 7.1.2 Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t= 131 °C, τ= 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 7.1.3 Приготування і стерилізація композиції В	Композиція В, температура, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t= 131 °C, τ= 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 7.1.4 Приготування і стерилізація композиції Г	Композиція Г, температура, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t= 131 °C, τ= 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 7.2.1 Приготування і стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t= 112 °C, τ= 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 7.2.2 Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, рН, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t= 131 °C, τ= 40 хв, рН=4,0-4,5 відсутність мікробіоти
Кт, Км 7.3.1 Приготування і стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t= 112 °C, τ= 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 7.3.2 Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, рН, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t= 131 °C, τ= 40 хв, рН=4,0-4,5 відсутність мікробіоти

Кт, Км 7.4.1 Приготування і стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t= 112 °С, τ= 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 7.4.2 Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, рН, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t= 131 °С, τ= 40 хв, рН=4,0-4,5 відсутність мікробіоти
Кт, Км 7.5.1 Приготування і стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t= 112 °С, τ= 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 7.5.2 Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, рН, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t= 131 °С, τ= 40 хв, рН=4,0-4,5 відсутність мікробіоти
Кт, Км 8.1 Зберігання музейної культури <i>Pseudomonas batumici</i>	Колекційна культура <i>P. batumici</i> , морфологічна однорідність, температура, відсутність сторонньої мікробіоти	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час вирощування, мікробіологічний контроль під час пересівів раз на 3 місяці	t= 4 °С, колонії гладкі, круглі, блискучі, пастоподіб ні, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 8.2 Одержання робочої культури на агаризованому середовищі	Культура <i>P. batumici</i> , відсутність сторонньої мікробіоти, відсутність неконтрольовани х мутацій	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час вирощування, мікробіологічний контроль проводять кожні 8 годин	t= 25 °С, τ= 3 доби, колонії гладкі, круглі, блискучі, пастоподіб ні, відсутність сторонньої мікробіоти

Кт, Км 8.3 Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, частота обертів качалки, мікробіологічна чистота культури	Годинник, термометр технічний, датчик рН, технічний тахометр, мікробіологічний контроль	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікроскопіювання після культивування.	$t = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 3$ доби, $\text{pH} = 7,2-7,8$, $\omega = 200$ об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 8.4 Вирощування в інокуляторі об'ємом 10 л	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, частота обертів мішалки, рН, концентрація розчиненого кисню, мікробіологічна чистота культури, концентрація біомаси, глюкози та мінерального азоту	Годинник, термометр технічний, технічний тахометр, датчик повітря, мікроскоп, метод оптичної густини, біосенсор, метод Конвея	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікроскопіювання, визначення концентрацій біомаси, джерел карбону та азоту – кожні 6 годин	$t = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 3$ доби, $\omega = 150$ об/хв, $\text{pH} = 7,2-7,8$, $c(\text{X}) = 6,8-7,0$ г/л, $c(\text{C})$, $c(\text{N})$, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 8.5 Вирощування в інокуляторі об'ємом 100 л	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, частота обертів мішалки, рН, концентрація розчиненого кисню, мікробіологічна чистота культури, концентрація біомаси, глюкози та мінерального азоту	Датчик рН годинник, термометр технічний, тахометр, манометр, датчик повітря, мікроскоп, концентрація біомаси, біосенсор, метод Конвея.	рН; температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування; мікроскопіювання, визначення концентрацій біомаси, джерел карбону та азоту – кожні 6 годин.	$t = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 3$ доби, $\omega = 150$ об/хв, $\text{pH} = 7,2-7,8$, $c(\text{X}) = 6,8-7,0$ г/л, $c(\text{C})$, $c(\text{N})$, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 8.5 Вирощування в інокуляторі об'ємом 1 м ³	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, частота обертів мішалки, рН, концентрація розчиненого кисню,	Датчик рН годинник, термометр технічний, тахометр, манометр, датчик повітря, мікроскоп, концентрація біомаси,	рН; температура і швидкість обертання контролюються, підтримуються автоматично весь час вирощування; мікроскопіювання, визначення концентрацій.	$t = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 3$ доби, $\omega = 150$ об/хв, $\text{pH} = 7,2-7,8$, $c(\text{X}) = 6,8-8,0$ г/л, $c(\text{C})$, $c(\text{N})$, відсутність

	мікробіологічна чистота культури, концентрація біомаси, глюкози та мінерального азоту	біосенсор, метод Конвея.	біомаси, джерел карбону та азоту – кожні 6 годин.	сторонньої мікробіоти
Кт, Кх, Км 7.1 <i>Виробниче культивування у ферментері об'ємом 10 м³</i>	Посівний матеріал, тривалість культивування, температура, частота обертів мішалки, рН, концентрація розчиненого кисню, мікробіологічна чистота культури, концентрація біомаси, концентрація джерел карбону та мінерального азоту	Датчик рН годинник, термометр технічний, тахометр, манометр, датчик повітря, мікроскоп, концентрація біомаси, біосенсор, метод Конвея.	рН; температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час культивування; мікроскопіювання , визначення концентрацій біомаси, джерел карбону та азоту – кожні 8 годин	t= 25 °C, τ= 3 доби, ω = 150 об/хв, рН=7,2-7,8, с(X)=8,0г/л, с(C), с(N), відсутність сторонньої мікробіоти

РОЗДІЛ 9. АНАЛІЗ ПЕРСПЕКТИВ ВПРОВАДЖЕННЯ СИСТЕМИ ЕКОЛОГІЗАЦІЇ ВИРОБНИЦТВА

9.1. Характеристика рідких відходів виробництва батуміну

9.1.1 Типи рідких відходів.

Фармацевтичне виробництво може генерувати різні типи рідких відходів. Нижче перераховано деякі з них:

1 Відходи від очищення і промивання. Це відходи, що виникають під час процесу очищення та промивання обладнання, резервуарів, трубопроводів та інших систем. Вони можуть містити різні речовини, такі як залишки лікарських речовин, розчинники, очисні речовини тощо.

2 Відходи від фармацевтичного синтезу. Під час процесу синтезу лікарських речовин можуть утворюватися різні хімічні реакційні речовини та побічні продукти, які потім стають відходами. Ці відходи можуть бути небезпечними і вимагати спеціального управління та обробки.

3 Фармацевтичні відходи. Це включає непридатні або стерильні лікарські препарати, які не були використані або збережені з вимкненими термінами придатності. Ці відходи можуть містити активні фармацевтичні речовини, які можуть бути небезпечними для навколишнього середовища.

4 Відходи від аналітичних лабораторій. Фармацевтичні компанії використовують аналітичні лабораторії для контролю якості своїх продуктів. Відходи від цих лабораторій можуть включати використані реактиви, розчини, пробірки та інші матеріали, що містять залишки лікарських речовин або хімічних сполук.

5 Відходи від очищення стічних вод. Фармацевтична промисловість може генерувати стічні води, які містять залишки лікарських речовин, розчинників, реагентів та інших хімічних сполук. Ці відходи потребують спеціального

					НУХТ БТЕК 04.02.09 КР ПЗ						
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	Розділ 9. Аналіз перспектив впровадження системи екологізації виробництва			Літ.	Арк.	Акрушів	
Розроб.		Михальська Ю.С.									
Перевір.		Буценко Л. М.								93	8 94
Консульт.								Кафедра БТМ			
Н. Контр.											
Затверд.		Стабніков В. П.									

оброблення для забезпечення відповідності нормам та стандартам щодо викидів.

Важливо зазначити, що кожна фармацевтична компанія може мати власні процедури та вимоги щодо управління рідкими відходами, які вони генерують. Відповідно до законодавства та регуляторних норм, такі відходи повинні бути правильно збирані, оброблятися та утилізуватися для запобігання негативному впливу на довкілля та здоров'я людей.

9.1.2. Розрахунок об'єму відходів

Допустимо, що проектоване біотехнологічне виробництво батуміну необхідно здійснювати протягом 72 діб. На виробництві, для дотримання загальної чистоти промислових приміщень, здійснюють щоденне прибирання, яке проводять 72 рази. Також, виходячи з інформації наведеної в попередньому розділі, один раз на місяць здійснюють генеральне прибирання, під час проведення якого обробляють підлогу, стіни та вікна. Генеральне прибирання під час біотехнологічного виробництва батуміну здійснюють 3 рази.

Узагальнена характеристика рідких відходів виробництва антибіотику наведена у *табл. 9.1*

Таблиця 9.1

Характеристика рідких відходів виробництва лінкоміцину

Назва рідких відходів	Компоненти рідких відходів	Приблизний об'єм утворюваних відходів за 1 цикл виробництва, л	Клас небезпеки
1	2	3	4
Миючий розчин «Прогрес»	Вода, сумішаніонних та неіоногенних ПАВ, хлористий натрій, диетиноламід жирних кислот	80	III
Миючий розчин «ЕКОХІМ»	Комплекс ПАВ, комплекс органічних та неорганічних кислот, інгібітор корозії, пом'якшувач води	80	
Дезінфікуючий розчин «САН-МАГ»	Перекис водню 4-%, вода	944	IV

1	2	3	4
Дезінфікуючий розчин «АМІНОРМ ПЛЮС»	1,3-Пропандіамін, N-(3-амінопропіл)-N-додецил, алкіл(C12–C16) диметилбензиламонійхлорид, 2-пропанол, антикорозійний комплекс, рН регулятор, вода, миючі компоненти	944	III
Дезінфікуючий розчин «АНІОСРАБ 85 НПК (ANIOSRUB 85 NPC)»	Етанол – 66,5-73,5-%, зволожуючі та пом'якшуючі речовини для шкіри, вода.	860	IV
Загальний об'єм:		2908	

Під час попередньої підготовки обладнання та приміщень, тобто миття, використовують такі засоби як «ЕКОХІМ 54» та "Прогрес", об'єми яких за повний період виробництва антибіотика складають по 80 л кожен. Для проведення дезінфекційних заходів щодо загальної обробки підприємства застосовують робочі розчини деззасобів, які описані в попередньому розділі. А саме «САН-МАГ», «АМІНОРМ ПЛЮС» та "АНІОСРАБ 85 НПК (ANIOSRUB 85 NPC)". Об'єми цих розчинів для виробництва батуміну складають 944, 944, та 860 л відповідно.

9.1.2. Утилізація рідких відходів

Стічні води, утворені в процесі виготовлення батуміну, знешкоджуються за рахунок біологічної очистки.

Найефективнішим способом знешкодження відходів є використання аеротенку. Перед утилізацією дезінфікуючих та миючих розчинів, їх необхідно розбавити до менших концентрацій у співвідношенні 1:10, де 1 частина рідких відходів становиться на 10 частин води.

Стічну воду направляють у відстійник, де можна використовувати частину надлишкового мулу, щоб поліпшити осадження важких часток. Потім прояснена вода подається в преаератор-усереднювач, куди також направляється мул з вторинного відстійника. Тут стічні води попередньо насичуються повітрям протягом 5-20 хвилин. В разі потреби в преаератор можуть додавати нейтралізуючі добавки та живильних речовини. З усереднювача стічну воду

направляють в аеротенк, через який циркулює активний мул. Біохімічні процеси в аеротенку можна розділити на два етапи:

- Адсорбція органічних речовин поверхнею активного мулу та мінералізація легко окислюваних речовин за активного споживання кисню.
- Доокислення повільно окислюваних органічних речовин та регенерація активного мулу.

На цьому етапі кисень споживається значно повільніше. Зазвичай, аеротенк розділяється на дві частини: регенератор (25% від загального обсягу) і основний аеротенк, де відбувається основний процес очищення. Наявність регенератора дозволяє очищати більш концентровані стічні води і підвищує продуктивність системи. Перед входом до аеротенку, стічна рідина повинна містити не більше 150 мг/л зважених часток. Температура очищуваної води повинна знаходитись у діапазоні від 6 °С до 30 °С, а рН повинен бути в межах 6,5...9. Після контакту з мулом, стічна вода направляється у вторинний відстійник, де відбувається відокремлення мулу від води. Більшу частину мулу повертають у аеротенк, а надлишок направляють у преаератор. Таким чином, в аеротенку постійно знаходиться стала кількість мулу, оскільки надлишок мулу заважає процесу очищення. Активний мул піддається захороненню в ґрунті. Його можна також знешкодити та використати як органічне добриво або піддати спаленню.

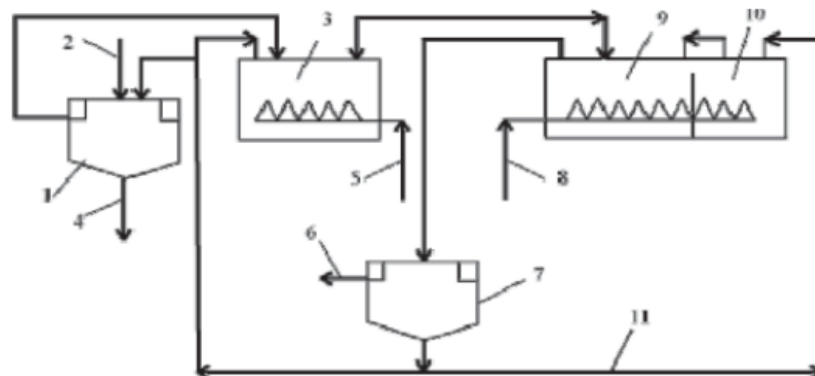


Рис 9.1. 1 – Схема установки для біологічного очищення стічних вод: 1- первинний відстійник; 2 - входні стічні води на очищення; 3 -преаератор; 4 -

осад; 5, 8 - повітря; 6 - очищені стічні води; 7 - вторинний відстійник; 9 - аеротенк; 10 - регенератор; 11 – активний мул [81].

Аеротенк - це відкритий басейн, оснащений пристроями для активного аерації. Вони можуть мати різну конфігурацію, включаючи двокоридорні, трьохкоридорні і чотирьохкоридорні варіанти. Глибина аеротенків зазвичай коливається від 2 до 5 метрів.

9.2. Характеристика газоподібних відходів виробництва батуміну

9.2.1. Розрахунок об'ємів відходів

Основною вимогою для успішного проведення біотехнологічного виробництва батуміну є постійне та безперервне постачання стерильного аераційного повітря. Це означає, що під час підготовки посівного матеріалу в інокуляторах та процесу біосинтезу батуміну у ферментері будуть утворюватися газові відходи. Загальний час підготовки посівного матеріалу становить 144 години, а процес біосинтезу антибіотику триває 72 години. Постійне подання кисню до апаратів здійснюється з розрахунковою швидкістю 1 літр на літр культивованої рідини на годину. На планованому підприємстві будуть встановлені 3 інокулятори та 1 ферментер. Отже, приблизний об'єм відпрацьованого повітря за виробничий цикл складає: $10 * 48 + 100 * 48 + 1000 * 48 + 10000 * 72 = 533280$ літрів (або 533,28 м³) на цикл.

9.2.2. Утилізація газоподібних відходів

До газових відходів виробництва батуміну *Pseudomonas batumici* належать тільки викиди відпрацьованого повітря. Повітря, що використовують для того щоб перевірити герметичність обладнання, не містить шкідливих речовин.

Обсяги загальних викидів складають 533,28 м³ за один виробничий цикл, так як за рік здійснюється 14 циклів виробництва антибіотику, то газові викиди за весь рік становитимуть 7465,92 м³.

Враховуючи те, що відпрацьоване повітря має малий рівень забруднення, буде недоцільно використовувати високовартісні способи очищення. Тому для того щоб очистити таке повітря доцільно використовувати індивідуальні фільтри, які очищують повітря до ступеню очищення 99,999 %, в результаті такої

очистки повітря може використовуватися повторно. Після завершення циклу роботи даний фільтр необхідно простерилізувати щоб не допустити потрапляння біологічного агента в навколишнє середовище [82].

9.3. Характеристика твердих відходів виробництва батуміну.

9.3.1. Розрахунок об'ємів відходів.

Під час виробництва антибіотику батуміну можуть утворюватися тверді відходи. Ці відходи можуть включати компоненти поживних середовищ, титрувальні агенти (наприклад, соляну кислоту та натрій гідроксид), пакувальні матеріали, а також тари для дезінфікуючих і миючих засобів. Для упаковки компонентів поживних середовищ в основному використовуються контейнери або коробки з полівінілхлориду або поліпропілену. Дезінфікуючі та миючі засоби також фасуються у пластикову тару.

Узагальнена характеристика твердих відходів виробництва антибіотику батуміну наведена у *табл. 9.2*

Таблиця 9.2

Характеристика твердих відходів виробництва батуміну

Назва твердих відходів	Компоненти твердих відходів	Приблизний обсяг утворюваних відходів за 1 цикл виробництва, кг	Клас небезпеки
Упаковки для компонентів поживних середовищ	Полівінілхлорид, поліетилен, поліпропілен	0,3	IV
Упаковки для титрувальних агентів		0,1	
Тара для мийних і дезінфікуючих засобів	Поліетилен, поліпропілен, полістирол	0,6	
	Загальний обсяг:	1	

9.3.2. Утилізація твердих відходів

Способи обробки пластмасових відходів залежать від типу полімеру та їх походження. Технологічні відходи є найпростішими для переробки. Їх можна повторно використовувати після подрібнення та гранулювання. Процес переробки та експлуатації пластмасових відходів призводить до незворотних змін їх 44 хімічних та фізико-механічних властивостей, що важливо враховувати під час подальшої переробки. Вибір методу передпереробки залежить від джерела відходів та ступеня їх забрудненості. Однорідні відходи виробництва і переробки зазвичай переробляють на місці їх утворення, після незначної попередньої обробки, такої як подрібнення та грануляція.

Відходи використаних продуктів вимагають попередньої обробки перед переробкою. Цей процес включає кілька етапів, таких як сортування і ідентифікація (для змішаних відходів), подрібнення, розділення змішаних відходів, мийка і сушка. Після цього матеріал піддається гранулюванню. На схемі, показаній на рис. 3.3.1, видно послідовність переробки сировини до отримання грануляту.

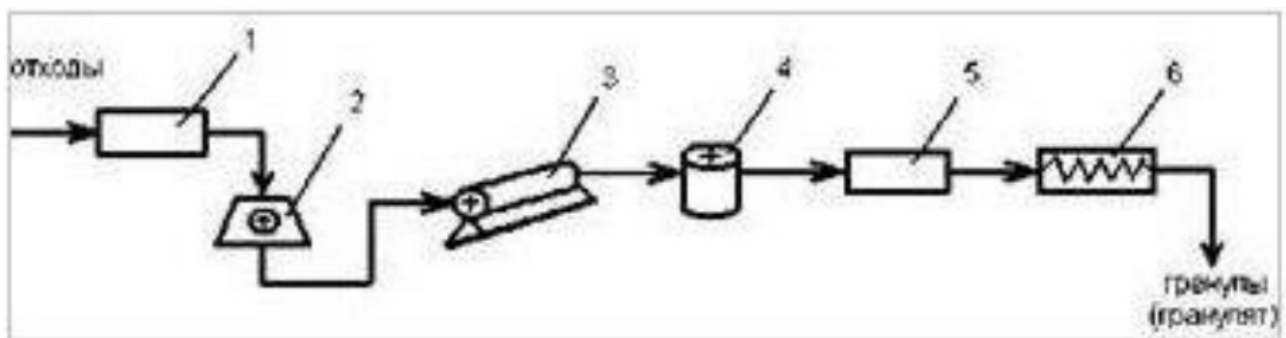


Рис. 9.3 Схема вторинної переробки поліолефінів в гранули

Пластмасові відходи, які вийшли з ужитку (з вмістом сторонніх домішок не більше 5%), поступають на вузол сортування відходів 1, де вони піддаються очищенню від випадкових сторонніх домішок і сильно забруднених шматків. Після сортування, відходи подрібнюються в ножових дробарках 2, застосовуючи мокре або сухе подрібнення, щоб отримати пухку масу з частинками розміром від 2 до 9 мм. Наступним кроком є відмивання подрібнених відходів у мийній

машині 3. Для цього використовуються спеціальні миючі розчини у кілька етапів. Після відмивання, маса стискається у центрифугі 4, щоб зменшити вологість до 10-15%, і потім піддається остаточному зневодненню в сушильній установці 5 до залишкового вмісту води 0,2%. Після цього відсушену масу передають до гранулятора 6. Грануляція є останнім етапом підготовки вторинної сировини для подальшої переробки в виробі. В процесі гранулювання матеріал ущільнюється, що полегшує його подальшу переробку, а також усереднюються характеристики вторинної сировини, що дозволяє отримати матеріал, який можна переробляти на стандартному обладнанні [83].

РОЗДІЛ 10. АНАЛІЗ НОРМАТИВНО-ТЕХНІЧНОЇ ДОКУМЕНТАЦІЇ ТА НАУКОВО-ТЕХНІЧНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.

В процесі виготовлення батуміну запроваджено європейські стандарти в сфері якості (GMP, ISO 9001), дистрибуції (GDP), екологічного менеджменту (ISO 14001), охорони здоров'я та безпеки праці (OHSAS 18001), соціальної відповідальності (SA 8000).

Пат. №107822 UA Штам *Pseudomonas batumici* 1 MB B-7532 – продуцент батуміну / Чуркіна Л. М., Кіпріанова О. А., Ключко В. В., Авдеева Л. В. Опубл. 26.06.2016 Бюл. №12. Даний патент в якості нормативного документу виступає як одне з основних джерел в проектуванні виробництва батуміну. Інформація з наведеного науково-технічного джерела використовується для підбору оптимальних параметрів вирощування продуцента та біосинтезу антибіотику.

Ключко В. В. Штам-продуцент антистафілококового антибіотику батуміну і його біосинтетична активність : дис... канд. біол. наук: 03.00.07 / Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України. — К., 2007. — 140арк. : рис., табл. — Бібліогр.: арк. 122-140. Дана наукова стаття, як тип нормативно-технічної документації, визначає порядок та показники здійснення контролю виробництва (визначення концентрації батуміну у культуральній рідині).

Pontius K, Semenova D, Silina YE, Gernaey KV and Junicke H (2020) Automated Electrochemical Glucose Biosensor Platform as an Efficient Tool Toward On-line Fermentation Monitoring: Nove Application Approaches and Insights. *Спереду. Bioeng. Біотехнологія*. 8:436. DOI:10.3389/fbioe.2020.00436. Наведений документ регламентує здійснення визначення концентрації джерела вуглецю (глюкози) в культуральній рідині. Застосовується на етапі проведення біотехнологічного контролю виробництва.

					НУХТ БТЕК 04.02.09 КР ПЗ				
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата					
Розроб.		Михальська Ю.С.			Розділ 10. Аналіз нормативно-технічної документації та науково- технічної літератури	Літ.	Арк.	Акрушіє	
Перевір.		Буценко Л. М.					101	2	
Консульт.						Кафедра БТМ 102			
Н. Контр.									
Затверд.		Стабніков В. П.							

ДСТУ ISO 9000 Системи управління якістю – Основні положення та словник.

ДСТУ ISO 9001 Системи управління якістю – Вимоги.

ДСТУ ISO 9004 Системи управління якістю – Рекомендації з покращення якості.

СТ-Н МОЗУ 42-4.3:2011 Лікарські засоби. Фармацевтична система якості (ICH Q10). Дані стандарти регламентують порядок виконання дій в процесі перевірки якості готового цільового продукту, обладнання, сировини та перевірку точності проведення допоміжних робіт та загального технологічного процесу.

Настанова 42-3.5:2004 Настанови з якості. Лікарські засоби. Валідація процесів, затверджена наказом Міністерства охорони здоров'я України від 31 грудня 2003 р. № 637.

СТ-Н МОЗУ 42-1.0:2005 Фармацевтична продукція. Система стандартизації. Основні положення.

Наказ МОЗ України від 14 вересня 2005 р. № 471 «Про затвердження документів з питань стандартизації фармацевтичної продукції». У даних документах наведено методичні рекомендації стосовно розробки, побудови, оформлення, викладання, процеси, позначення технічних умов на продукцію, послуги, а також стосовно надання їм чинності, перегляду, перевірки, внесення змін та скасування.

Список використаної літератури:

1. Антибіотик батумін. [Електронний ресурс]. Режим доступу : <https://sites.google.com/site/inventionsofukrainians/antibiotik-batumin>
2. Soldatkina M. A, Klochko V. V, Zagorodnya S. D, Rademan S., Visagie M. H, Lebelo M. T. et. al. Promising anticancer activity of batumin: a natural polyene antibiotic produced by *Pseudomonas batumici*. *Future medicinal chemistry.*, 2018, DOI: [10.4155/fmc-2018-0062](https://doi.org/10.4155/fmc-2018-0062)
3. Чуркіна Л.М., Ключко В.В., Авдєєва Л.В. Батумін – антибіотик для лікування та діагностики стафілококових інфекцій. [Електронний ресурс]. Режим доступу : <https://scp.knu.ua/ua/pryrodneychi-nauky/343-batumin-aantybiotyky-dlia-likuvannia-ta-diahnostyky-stafilokokovykh-infektsii>
4. Klochko V. V. Biosynthesis and properties of antibiotic batumin. *Biotechnologia acta*. 2014, 7 (6): 46-50. doi 10.15407/BIOTECH7.06.046.
5. Високоактивний антибіотик для лікування стафілокової інфекції - "Батумін" і діагностичний препарат "Діастаф" на основі батуміну. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://www.uintei.kiev.ua/transfer/offer.php?slang=ua&offid=2590>
6. Діастаф. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://imv.org.ua/rozrobky/dlya-medycyny/>
7. Klochko VV, Kiprianova EA, Churkina LN, Avdeeva LV. [Antimicrobial spectrum of antibiotic batumin] *Mikrobiologichnyi Zhurnal* (Kiev, Ukraine : 1993). 2008 Sep-Oct; 70 (5): 41-46. PMID: 19140420. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://europepmc.org/article/med/19140420>
8. Klochko V.V. Ecology, Systematics and antibiotic activity of *pseudomonas batumici* and *alteromonas macleodii* in connection with analysis of their genome structure. SSN 0201-8462. *Мікробіол. журн.*, 2016, 78 (6): 50-59
9. Чуркіна Л. Н., Кіпріанова О. А., Бідненко С. І., Марченко К. П., Артісюк Є. В.. Антибіотик батумін для діагностики стафілококів та лікування

назального носійства *Staphylococcus aureus* /На допомогу практичному лікарєві, 2008: 61-67

10. Esipov S.E., Kiprianova E.A. Batumin, a novel antibiotic produce by *Pseudomonas batumici* nov. sp. 3187 // 5 th Int. Conf. on Chemical Synthesis of Antibiotics and Related Microbial Products Hungarian Acad. Sci., Budapest, 1996. - Abstr. P. 14

11. Пат. №23609 UA Штам *Pseudomonas batumici* 17 – продуцент антистафілококового антибіотика батуміну/Смірнов В. В., Кіпріанова О. А. Чуркіна Л. М., Гарагуля О. Д., Муквич М. С. Опубл. 15.11 2000 Бюл. №6

12. Пат. №107822 UA Штам *Pseudomonas batumici* 1 MB B-7532 – продуцент батуміну / Чуркіна Л. М., Кіпріанова О. А., Клочко В. В., Авдєєва Л. В. Опубл. 26.06.2016 Бюл. №12

13. Klochko V.V. Antistaphylococcal antibiotic batumin producing strain and its biosynthetic activity. – Manuscript / Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2007.

14. *Pseudomonas batumici* під мікроскопом. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/mbo3.1101>

15. *Pseudomonas batumici* під мікроскопом. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://normoflorin.ru/pseudomonas-rod-bakterij/>

16. Ріст *Pseudomonas* на м'ясо-пептонному агарі. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://uk.wikipedia.org/wiki/Pseudomonas>

17. Патент СССР на изобретение №598368. Штамм *pseudomonas batumici* nov. Sp. 3187 - продуцент антибиотика, обладающего противостафилококковой активностью / Киприанова Е. А., Бойко О. И., Есипов С. Е., Гарагуля А. Д., Рабинович А. С., Баскунов Б. П. Опубл.10.10.1998

18. Kiprianova E.A., Klochko V.V., Zelena L.B., Churkina L.N., Avdeeva L.V. *Pseudomonas batumici* sp. nov., the antibiotic-producing bacteria isolated from soil of the Caucasus Black Sea coast. Мікробіол. журн., 2011, Т. 73(5): 3-6

19. Батумін. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://scp.knu.ua/ua/pryrodnychi-nauky/338-batumin-i-diastaf-preparaty-medychnoho-pryznachennia>
20. Zamazyi T.M., Malanova O.M., Kuchma M.V., Rudenko L.M., Bolshakova G.M. The persistence of staphylococcus aureus among the students of the medical college *Annals of Mechnikov Institute, N 1, 2010*: 30-33
21. Державна служба статистики [Електронний ресурс]. Режим доступу : <https://ukrstat.gov.ua/>
22. Державний реєстр лікарських засобів України. [Електронний ресурс] — режим доступу: <http://www.drlz.com.ua/ibp/ddsite.nsf/all/shlist?opendocument&sklad=%EE%EA%F1%E8%F2%E5%F2%F0%E0%F6%E8%EA%EB%B3%ED>.
23. Klochko V.V. Antistaphylococcal antibiotic batumin producing strain and its biosynthetic activity. – Manuscript / Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2007.
24. Glycolysis / Gluconeogenesis - *Pseudomonas putida* [Електронний ресурс]. — Режим доступу: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?ppu00010
25. Citrate cycle (TCA cycle) - *Pseudomonas putida* [Електронний ресурс]. — Режим доступу: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?ppu00020
26. Ключко В. В. Штам-продуцент антистафілококового антибіотика батуміну і його біосинтетична активність : дис... канд. біол. наук: 03.00.07 / Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України. — К., 2007. — 140арк. : рис., табл. — Бібліогр.: арк. 122-140.
27. Valine, leucine and isoleucine biosynthesis - *Pseudomonas putida* [Електронний ресурс]. — Режим доступу: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?ppu00290

28. Осташ Б. О., Федоренко В. О. Створення продуцентів нових полікетидних антибіотиків методами генетичної інженерії / *Біополімери і клітина*. 2002, 18(6): 467-477
29. Kiprianova E.A., Klochko V.V., Zelena L.B., Churkina L.N., Avdeeva L.V. *Pseudomonas batumici* sp. nov., the antibiotic-producing bacteria isolated from soil of the Caucasus Black Sea coast. *Мікробіол. журн.*, 2011, Т. 73(5): 3-6
30. Ферментер. [Електронний ресурс]. Режим доступу : https://www.alibaba.com/product-detail/2000L-10000L-multiple-stages-industrial-stainless_60633395051.html?spm=a2700.7724857.normal_offer.d_title.707457e6OiLyGU
31. Kiprianova E.A., Klochko V.V., Zelena L.B., Churkina L.N., Avdeeva L.V. *Pseudomonas batumici* sp. nov., the antibiotic-producing bacteria isolated from soil of the Caucasus Black Sea coast. *Мікробіол. журн.*, 2011, Т. 73(5): 3-6
32. Карлаш Ю.В. Основи проектування біотехнологічних виробництв: Конспект лекцій для студентів напрямку 6.051401 «Біотехнологія» денної та заочної форм навчання Київ НУХТ, 2013. – 143 с.
33. Постанова Кабінету Міністрів України № 717 від 20 серпня 2008 року «Про затвердження Технічного регламенту мийних засобів». [Електронний ресурс] – режим доступу: https://ips.ligazakon.net/document/view/kp080717?an=172&ed=2014_03_18.
34. Універсальний миючий засіб «Прогрес» [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://kirpi4ik.com.ua/dzherela-chistoti-formula-3-opis-i-instrukciya-po-zastosuvannyu/>
35. Миючий засіб «ЕКОХИМ 54» для очищення від неорганічних і органічних забруднень. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://ekohimiya.com.ua/ua/p57077993-ekohim-dlya-ochistki.html>
36. Hrehirchak N. M., Slobodyan O. P., Shulga M. O. Justification for the choice of sanitary preparation of premises for production tryphophane amino acids. *SWorldJournal*. 2022, 35-40 DOI: 10.30888/2663-5712.2022-11-01-054

37. Дезінфекція. [Електронний ресурс] – режим доступу: <http://tc-2.pto.org.ua/index.php/item/93-dezynfektsiia>
38. ТОВ «Гігієна-Мед Стерил». Каталог засобів для дезінфекції поверхонь. [Електронний ресурс] – режим доступу: <http://gigienamedsteril.com.ua/dezinfektsiya-instrumentariya/>
39. Інструкція щодо застосування дезінфікуючого засобу «Амінорм Плюс» з метою ДВР, передстерилізаційного очищення та хімічної стерилізації. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://danamedikal.com/gallery/%D0%86%D0%BD%D1%81%D1%82%D1%80%D1%83%D0%BA%D1%86%D1%96%D1%8F%20%D0%90%D0%BC%D1%96%D0%BD%D0%BE%D1%80%D0%BC%20%D0%9F%D0%BB%D1%8E%D1%81.pdf>
40. Методичні вказівки щодо застосування засобу "АНІОСРАБ 85 НПК (ANIOSRUB 85 NPC)". [Електронний ресурс] – режим доступу: <file:///C:/Users/HP/Downloads/aniosgel.pdf>
41. Т.П. Пирог, Ю.В. Карлаш, В.О. Красінько. Основи проектування біотехнологічних виробництв: метод. рекомендації до викон. курс. проекту для здобувачів вищої освіти освіт. ступ. «бакалавр» спец.162 ««Біотехнології та біоінженерія» осв.-проф. прогр. «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна» ден. форми навч./ уклад. – К.: НУХТ, 2022. – 29 с.
42. Повітрозабірник. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://innovagroup.com.ua/uk/povitrozbirniki/>
43. Фільтр грубого очищення. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://ventfilter.kiev.ua/goods/filtr-gruboy-ochistki-vozduha-panelniy/>
44. Гвинтовий компресор. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://tusk.ua/ua/product/vintovoj-kompressor-lider-vk-10-psma>
45. Компресори EnviroAire T / TVS з технологією oil-free [Електронний ресурс]. – Режим доступу: https://www.compressors.ua/kompresory-z-technologieu-oil-free-oil-less/EnviroAire_T_TVS

46. Ресивер вертикальний. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://xkz.com.ua/ua/p1075044647-resiver-vertikalnij-2700.html>
47. Теплообменники VTS [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://servicevts.ru/category/vts-zapchasti/teploobmenniki-vts/>
48. Фильтры для очистки сжатого воздуха CLEARPOINT [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://dneprstan.com.ua/%D1%84%D0%B8%D0%BB%D1%8C%D1%82%D1%80%D1%8B-%D0%B4%D0%BB%D1%8F-%D0%BE%D1%87%D0%B8%D1%81%D1%82%D0%BA%D0%B8-%D1%81%D0%B6%D0%B0%D1%82%D0%BE%D0%B3%D0%BE-%D0%B2%D0%BE%D0%B7%D0%B4%D1%83%D1%85%D0%B0-clearpoin/>
49. Дозатор ваговий мультиголовковий W-10R. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://packhouse.com.ua/ua/p1237429137-dozator-vesovoj-multigolovochnyj.html>
50. Реактор - смеситель РС 100. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://www.kft2.com.ua/real100.html>
51. Апарат високого тиску для струйного миття обладнання. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://www.kaercher.com/ua-uk/professional/woma-karcher.html>
52. Лабораторный реактор 15 л. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://khimmix.ua/himicheskie-reaktory/laboratornyj-reaktor-15-l>
53. Реактор рабочим объемом 20 л [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://promvit.com.ua/reaktor-rabochim-obemom-20-l-rasschitannyj-na-rabochee-davlenie-1-6-bar-farmaceuticheskoe-oborudovanie-po-trebovaniyam-gmp/>
54. Реактор 250 літрів герметичний з водяною сорочкою та мішалкою. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p1719804126-reaktor-250-litrov.html?&primelead=MC43ODAwMDAwMw>
55. Герметичний насос з магнітною муфтою DM 06 [Електронний ресурс]. – Режим доступу: https://www.debem.com.ua/ukr/nasos/nasosy_s_magnitnoj_muftoj/dm06/

56. Фільтрувальні елементи ЕПМ.Ф [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://ukr.technofilter.kiev.ua/services/produktsiya/patronni-filtruvalni-elementi/--filtruvalni-elementi-epm.f>
57. Розподільчий колектор HKV-D 06 (Edelstahl) з нержавіючої сталі. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://akvalend.ua/ua/catalog/zapornaya-i-reg-armatura/raspredeliteli-kollektory-shkafy/rozpodilchiy-kollektor-hkv-d-06-edelstahl-z-nerzhaviyuchoi-stali.html>
58. Sartorius пропонує біореактори робочим об'ємом від 10 мл до 2000 л. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: https://www.sartorius.com/en/products/fermentation-bioreactors?gclid=Cj0KCQiAvqGcBhCJARIsAFQ5ke7dIfMAvsyqzOlUW_gkNOjgz_Wwn7W_rnsiEqw2Ya3VDALj3QRUWfoaAgaZEALw_wcB#id-10198
59. ЦКТ 100 литров. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: https://termopab.com/ckt-100-litrov?gclid=Cj0KCQiAvqGcBhCJARIsAFQ5ke7jdA6F1VqHsqUV6n9HhKP7tReTiglpH7dcOG2xOicaCi59l76dUgIaAiK_EALw_wcB
60. 1000 л Промисловий мікробіологічний ферментер. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: https://www.alibaba.com/product-detail/1000L-Industrial-Microbiology-Fermenter-Bioreactor-Prices_60633391805.html?spm=a2700.details.0.0.2503e16ck15ty7
61. Ферментер. [Електронний ресурс]. Режим доступу : https://www.alibaba.com/product-detail/2000L-10000L-multiple-stages-industrial-stainless_60633395051.html?spm=a2700.7724857.normal_offer.d_title.707457e6OiLyGU
62. Гудзь С. П., Гнатуш С. О., Білінська І.С. / Мікробіологія. – Львів: Видавничий центр ЛНУ ім. І. Франка, 2009. – 360 с
63. *Pseudomonas batumici* під мікроскопом. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/mbo3.1101>
64. Про затвердження Методичних вказівок. Держслужба лікарських засобів, МОЗ України; Наказ, Вказівки від 07.12.2004. №322/1. Електронне

джерело. [Режим доступу]: https://zakon.rada.gov.ua/rada/show/v22_1539-04/conv#Text

65. Про затвердження методичних рекомендацій щодо виконання санітарно-гігієнічних вимог та проведення мікробіологічного контролю у виробництві нестерильних лікарських засобів. МОЗ України; Наказ, Рекомендації від 14.12.2001 № 502 Електронне джерело. [Режим доступу]: <https://zakon.rada.gov.ua/rada/show/v0502282-01#Text>

66. Карлаш Ю.В. Основи проектування біотехнологічних виробництв. [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнологія» денної та заочної форм навчання /Ю.В. Карлаш, Є.О. Омельчук - К: НУХТ, 2019. – 44 с.

67. Метод визначення концентрації біомаси за оптичною густиною. Електронне джерело. [Режим доступу]: https://nupp.edu.ua/uploads/files/0/events/other/2020/02/ii-tur-ekologia/roboti/39_%D0%9A%D0%9E%D0%9B%D0%86%D0%91%D0%A0%D0%86.doc

68. Метод дифузії в агар. Електронне джерело. [Режим доступу]: <http://um.co.ua/3/3-3/3-33188.html>

69. Державна Фармакопея України – 2-ге видання, 2001

70. Чуркина Л. Н., Кравец А. Н., Ключко В. В. Вплив індукуючих та селективних агентів на біосинтез нового антистафілококового антибіотика батуміну *Biopolym. Cell.* 2007; 23(2):108-114 doi.org/10.7124/bc.00075C

71. Ключко В. В. Штам-продуцент антистафілококового антибіотика батуміну і його біосинтетична активність : дис... канд. біол. наук: 03.00.07 / Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України. — К., 2007. — 140арк. : рис., табл. — Бібліогр.: арк. 122-140.

72. Pontius K, Semenova D, Silina YE, Gernaey KV and Junicke H (2020) Automated Electrochemical Glucose Biosensor Platform as an Efficient Tool Toward

On-line Fermentation Monitoring: Nove Application Approaches and Insights. *Спереду. Bioeng. Біотехнологія*. 8:436. DOI:10.3389/fbioe.2020.00436

73. Аналіз технічних об'єктів: Навчально-методичний посібник. – Ужгород, 2016. – с 30-33.

74. Інфрачервона спектроскопія. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/3367/infrachervona-spektroskopiya>

75. Ракс В. А., Єсауленко А. М.. Сучасна Хроматографія на Гребені Хвилі Прогресу Навчальний посібник. - К. : Аванпост, 2014. – с. 41-68

76. Хроматограф в жидкой фазе со сверхвысокой производительностью UltiMate™ 3000 BioRS [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.directindustry.com.ru/prod/thermo-fisher-scientific-industrial-applied/product-28284-1516699.html>

77. Державна фармакопея України. Доповнення 1. — Х., 2004.

78. Державна фармакопея України. Доповнення 2. — Х., 2018.

79. Експериментальне вивчення токсичної дії потенційних лікарських засобів / В.М. Коваленко, О.В. Стефанов, Ю.М. Максимов, І.М. Трахтенберг // Доклінічні дослідження лікарських засобів: методичні рекомендації / За ред. чл.-кор. АМН України О.В.Стефанова. – Київ, 2001. - С. 74-97.

80. Трахтенберг І.М., Сова Р.В., Шефтель В.О. Проблема нормы в токсикологии - М.: Медицина, 1991. - 204 с

81. Біологічне очищення стічних вод. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://conf.ztu.edu.ua/wp-content/uploads/2021/05/56-1.pdf>

82. Абсорбційне очищення атмосферного повітря від шкідливих газів. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://pidru4niki.com/1334020341649/ekologiya/absorbtsiynе_ochischennya_atmosf_ernogo_povitrya_vid_shkidlivih_gaziv

83. Утилізація упакувань: Навчальний посібник з навчальної дисципліни. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://ela.kpi.ua/bitstream/123456789/25143/1/Posibnyk_Utylizatsiia_upakuvan.pdf

Додатки

Додаток 1



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **107822** (13) **U**
(51) МПК
C12Q 1/04 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2015 12218**
(22) Дата подання заявки: **10.12.2015**
(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **24.06.2016**
(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **24.06.2016, Бюл.№ 12**

(72) Винахідник(и):
**Чуркіна Лариса Микитівна (UA),
Кіпріанова Олена Андріївна (UA),
Клочко Віталій Вікторович (UA),
Авдеева Лілія Василівна (UA)**
(73) Власник(и):
**ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ І ВІРУСОЛОГІЇ
ІМ. Д.К. ЗАБОЛОТНОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ
АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ,
вул. Заболотного, 154, м. Київ, 03143 (UA)**

(54) ШТАМ PSEUDOMONAS BATUMICІ IMB B-7532 - ПРОДУЦЕНТ АНТИБІОТИКА БАТУМІНУ

(57) Реферат:

Штам *Pseudomonas batumici*, депонований в колекції мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України під № IMB B-7532, - продуцент антибіотика батуміну.

UA 107822 U

Корисна модель належить до галузі біотехнології, а саме до отримання нових антибіотиків шляхом мікробіологічного синтезу бактеріями роду *Pseudomonas*.

До теперішнього часу серед бактерій роду *Pseudomonas* описано понад 50 продуцентів антибіотичних речовин своєрідних за структурою і спектром біологічної дії, ефективних щодо

5 антибіотикорезистентних збудників захворювань. В 1976 р. Сікіура [1] виділив з культуральної рідини штаму *P. sorbistini* комплекс антибіотиків-аміноглікозидів широкого спектра дії. Ці антибіотики були названі сорбістінами. На *S. aureus* сорбістин діяв в концентрації 12,5 мкг/мл.

Мупіроцин (псевдомонова кислота) - антибіотик, виділений з штаму *P. fluorescens* NCIB 11586, є високоактивним проти збудників стафілококових інфекцій, стійких до різних

10 антибіотиків [2]. Лікарська форма, створена на основі мупіроцину, має назву Бактробан та використовується для місцевого застосування в клініці.

Поряд з цим, з псевдомонад продовжують виділяти антибіотики, що належать до нових класів і характеризуються унікальним спектром дії. До таких антибіотиків належить батумін [3].

Штам-продуцент антибіотика батуміну за даними філогенетичного аналізу нуклеотидної послідовності гена 16S рРНК (задепонований у Genbank-JF306842) належить до γ-протеобактерій, формуючих окрему гілку в групі представників роду *Pseudomonas* (Г+Ц вміст ДНК був 64,0 мол. %) і є представником нового виду *Pseudomonas batumici* [4] Продуцент синтезує антибіотик з високою і селективною активністю щодо стафілококів [5].

Найбільш близьким до корисної моделі, який заявляється, є штам (прототип) *P. batumici* 17, одержаний комбінованим мутагенезом (нітрозогуанідин та УФ-випромінювання) і являє собою

20 гетерогенну з антибіотичною активністю культуру. Мутантний штам-продуцент *P. batumici* 17 синтезує від 70 до 100 мг батуміну на 1 л культуральної рідини. Однак такий вихід антибіотика при одержанні його в промислових умовах недостатній.

До недоліків відомого штаму слід віднести: недостатню біосинтетичну активність,

25 гетерогенність популяції.

Задачею даної корисної моделі є одержання високопродуктивного штаму-продуценту батуміну.

Отриманий мутант *P. batumici*, задепонований в Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології НАН України 21.10.2015 під реєстраційним номером *Pseudomonas batumici* 1MB B-7532, має наступні культурально-морфологічні та фізіолого-біохімічні характеристики.

30 Культурально-морфологічні ознаки
Досліджуваний штам на м'ясопептонному агарі (МПА) утворює круглі, прозорі колонії; клітини - грамнегативна паличка (2,2×1,0 мкм), рухома за допомогою декількох (частіше двох) полярних джгутиків.

35 Фізіолого-біохімічні властивості

Строгий аероб, використовує глюкозу лише по окислювальному шляху. Оксидазопозитивний по Ковачу, оптимальна для росту температура 25-28 °С; при 42 °С не росте; при 37 °С - практично не росте. Анаеробно розщеплює аргінін, має активну левансахарозу, желатин не гідролізує, на середовищі Кінг пігмент не утворює. Джерела вуглецю.

40 Штам *P. batumici* 1MB B-7532 як єдине джерело вуглецю використовує органічні сполуки різної хімічної будови, у тому числі вуглеводи: d-глюкозу, l-арабінозу, d-манозу, d-галактозу, d-фруктозу, органічні кислоти, серед них метаболіти циклу Кребса (янтарну, малонову, кетоглютарову, аконітову, яблучну), поліспирти і гліколи (маніт, інозит, гліцерин), амінокислоти (аланін, ізолейцин, валін, орнітин, цитрулін, пролін, гістидин), азотисті сполуки (сарказин). На відміну від дикого штаму *P. batumici* B-303 мутантний штам *P. batumici* 1MB B-7532 в процесі тривалого зберігання в ліофілізованому стані, а також під шаром вазелінової оливи втратив здатність засвоювати фумарат, нікотинову кислоту, бензоат Na, капрат як єдині джерела вуглецю.

50 Штам *P. batumici* 1MB B-7532 зберігали як під шаром вазелінової оливи, так і у ліофілізованому стані. Обидва способи довготривалого зберігання (протягом 60 місяців) забезпечували високий рівень антибіотичної активності штаму-продуцента *P. batumici* 1MB B-7532, при цьому спосіб зберігання в ліофілізованому стані забезпечував більш високий рівень виживання клітин в популяції. Метод ліофілізації культури є сучасним, надійним і може бути рекомендований для гарантованого зберігання штаму-продуцента при виробництві батуміну. До того ж, ліофілізація продуцента дозволить створити банк активних культур - культур з високою біосинтетичною активністю, які можуть протягом довгого часу забезпечувати виробництво гарантованим посівним матеріалом.

55 З вихідної культури роблять посів на скошений МПА. Культуру вирощують при температурі 28 °С протягом 24 годин. Середовище в колбах засівають суспензією клітин (початкова концентрація 1×10^7 КУО/мл). Живильне середовище було отримано поетапною оптимізацією і

мало наступний склад (г/л дистильованої води): глюкоза -15; сечовина - 1,3; K_2HPO_4 -0,5; NaCl-0,5; $MgSO_4$ -0,25; суміш мікроелементів (мг/л): $FeSO_4$ -200, $ZnSO_4$ -10, $MnCl_2$ -3, $CoCl_2$ -20, $NiCl_2$ -2, Na_2MoO_4 -3, яке забезпечувало не тільки збільшення біосинтезу батуміну, але й мінімальну кількість баластних речовин.

- 5 Процес ферментації проводили глибинним методом на ферментерах "Biostat M": об'єм живильного середовища - 1,5 л; ступінь аерації - 1,0; доза інокулюму - 1 %; температура - 25 °C; час культивування - 55 годин. Частоту обертів мішалки ферментера змінювали від 250 до 700 об/хв., залежно від споживання кисню культурою.

- 10 З культуральної рідини батумін виділяється методами препаративної хроматографії. Двоступенева колонкова хроматографія (стаціонарна фаза - силікагель, елюент - система ацетон:бензол (1:1) забезпечувала 85-90 % очистку препарату. Останній характеризувався типовими для батуміну фізико-хімічними показниками (λ_{max} в УФ-спектрі - 225 нм, оптичним кутом обертання $[\alpha]_D^{25} = -13,5^\circ$; хімічним зсувом протонів при ЯМР-аналізі - 0,8-1,4; 1,8-2,6; 3,2-3,4; 4,0-4,2; 4,7-4,9; 5,5-6,4; 7,2-7,4 м.д) та спектром біологічної дії. Статистично оброблені результати представлені в таблиці.

- 15 Порівняльні результати при перевірці біосинтетичної активності відомого та одержаного штамів-продуцентів батуміну

Оцінка результатів	Мутантний штам P. batumici 17	Мутантний штам P. batumici IMB B-7532
Число проведених ферментацій	8	10
Середнє арифметичне	87,0-100 мг/мл	170,0-190 мг/мл
Середнє квадратичне відхилення	$\pm 1,2$	$\pm 1,5$
Похибка середнього арифметичного	$\pm 5,5$	$\pm 5,1$
Довірчий інтервал для середнього арифметичного	79,2<87,0<95,1	162,3<170,0<178,7

- 20 Штам P. batumici IMB B-7532 має наступні переваги у порівнянні з штамом P. batumici 17: 1, висока біосинтетична активність 170,0-190,0 мкг/мл та стабільність.

Список використаних джерел:

1. Casewell M. W., Hill R. L. R. In-vitro activity of mupirocin ('pseudomonic acid') against clinical isolates of *Staphylococcus aureus* J Antimicrob Chemother 1985; 15: 523-531.
- 25 2. Tomita K., Hoshino Y., Uenoyama Y. et al. Sorbistin, a new aminoglycoside antibiotic complex of bacterial origin. Isolation and taxonomy of sorbistin producing organism J. Antibiot. 1976; 29:1147-1151.
3. Esipov S.E., Kiprianova E.A. Batumin, a novel antibiotic produce by *Pseudomonas batumici* nov. sp. 3187 // 5th Int. Conf. on Chemical Synthesis of Antibiotics and Related Microbial Products- Hungarian Acad. Sci., Budapest, 1996. - Abstr. P. 14.
- 30 4. Kiprianova E.A., Klochko V.V., Churkina L.N. et al. *Pseudomonas batumici* sp. nov., the antibiotic-producing bacteria isolated from soil of the Caucasus Black Sea coast Mikrobiol. журнал - 2011. - т. 73, № 5, стр. 3-8.
5. Клочко В.В., Киприанова Е.А., Чуркина Л.Н. и др. Антимикробный спектр антибиотика батумина Микробиол. Журн. - 2008. - Т. 20, № 5. - с. 41-46.
- 35

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 40 Штам *Pseudomonas batumici*, депонований в колекції мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України під № IMB B-7532, - продуцент антибіотика батуміну.

Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ - 42, 01601

Експериментальні праці

УДК 579.68.8

E.A. Kiprianova, V.V. Klochko, L.B. Zelena, L.N. Churkina, L.V. Avdeeva

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine,
154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, 03680, Ukraine

PSEUDOMONAS BATUMICI SP. NOV., THE ANTIBIOTIC-PRODUCING BACTERIA ISOLATED FROM SOIL OF THE CAUCASUS BLACK SEA COAST

Four novel strains of saprophytic bacteria were isolated from the soil samples collected in the moist subtropics region (the Black Sea coast of the Caucasus) and studied using methods of polyphasic taxonomic analysis. Microorganisms were Gram-negative, oxidase positive, aerobic, rod-shaped motile bacteria that produced antibiotic named batumin with high and selective activity against staphylococci; its total formula was $C_{20}H_{34}N_2O_2$. Phylogenetic analysis of 16S rRNA gene sequences (1376 bp, accession number in Genbank – JF306642) indicated that the isolates belonged to the γ -Proteobacteria, formed a separate branch within the genus *Pseudomonas* and had 98% 16S rRNA gene sequence similarity with *Pseudomonas gingeri*. The latter essentially differed from the studied strains in its phenotypic characteristics.

The predominant cellular fatty acids of isolates were similar and included C16:0, C16:1, C18:1, and up to 22.9 % of Δ C17:0; their DNA G+C content was 64.0 mol%. An analysis of taxonomic data indicated that the studied isolates represented a novel species, for which the name *Pseudomonas batumici* sp. nov. is proposed with the type strain UCM B-321 (Ukrainian Collection of Microorganisms).

Key words: polyphasic taxonomic analysis, new species *Pseudomonas batumici*

To date the authentic genus *Pseudomonas* consists of more than 120 validly described species which are assigned to several large intrageneric clusters [9]. The list of species isolated from various sources is permanently enlarged which is caused with remarkable adaptability of pseudomonads to different conditions of the environment.

During investigation of diversity and antibiotic activity of pseudomonads from the different natural habitats we isolated four heterotrophic, oxidase positive, Gram-negative rods, motile by few polar flagellae from the soil samples collected in the Black Sea coast of the Caucasus (moist subtropics region). It has been shown that the isolates belonged to the *Pseudomonas* genus and produced a new antibiotic with high and selective activity against staphylococci. According to the region of Batumi where the strains have been isolated the antibiotic was named batumin and the antibiotic-producing isolates were designated as *Pseudomonas batumici*. During many years of intensive study attention was fixed upon antibiotic, its biosynthesis, chemical structure, perspectives of medical use [1, 3, 4] while the taxonomic status of batumin-producing strain remained unclear. This study was aimed at clarifying the taxonomic affiliation of *Pseudomonas batumici*.

Materials and Methods

Strains of *Pseudomonas batumici* UCM B-303, B-311, B-321 and B-362 were isolated by direct plating of soil suspensions on peptone-meat-infusion agar. Stock cultures were preserved lyophilized at 4 °C. The strains were routinely grown at peptone-meat-infusion agar at 26 °C. Cell morphology was examined by using a light microscope and a transmission electron microscope (Hitachi H-800). Growth was tested at various temperatures in the range of 5-40 °C. The ability of bacteria to produce pigments was tested on King A and B medium. Examined physiological and biochemical properties of the isolated bacteria included their glucose metabolism, oxidase activity, ability to denitrify and liquefy gelatin, arginine dihydrolase, lysine and ornithine decarboxylase activities, the ability to secrete extracellular hydrolytic enzymes (proteases, lecithinases, lipases, amylases) and to produce levan from sucrose. Assimilation of 106 carbon compounds was determined in Koser agar medium containing 0.1% of appropriate C-source. All physiological and biochemical tests were carried out according to the methods described by Stanier et al. [12]. Susceptibility to antibiotics was tested by the routine diffusion plate method, employing peptone-meat-infusion agar and disks impregnated

© E.A. Kiprianova, V.V. Klochko, L.B. Zelena, L.N. Churkina, L.V. Avdeeva, 2011

with penicillin, streptomycin, oleandomycin, lincomycin, erythromycin, tetracycline, cefazolin, rifampicin, chloramphenicol, ciprofloxacin, imipenem.

Cell morphology analyses were carried out by mounting cells onto 400 mesh copper grids, counterstaining with 1% uranyl acetate and examining in transmission electron microscopy (TEM) JEM-1400 (Jeol Ltd., Japan) at 80 kV [14].

In order to study the fatty acid profiles bacteria were cultivated during 24 hours in peptone-meat-infusion agar at 26 °C; cellular fatty acids were extracted and methylated by standard procedure.

Fatty acid methyl esters (FAMES) were extracted from aliquots of cell suspensions by acid methanolysis and quantified by GC/MS with an Agilent 6890 gas chromatograph and 6890N Mass Selective Detector (Palo Alto, CA, USA). Helium was used as carrier gas; the gas-chromatography capillary column was a HP-5MS (J&W Scientific, USA). Mass spectra were recorded in electron impact ionization at 70 eV in SCAN mode. Data were processed with Workstation software (Agilent Technologies) and compounds were identified by relative retention time with standards of bacterial FAMES (Supelco, № 4708-U, USA) and from the comparison of mass spectra in NIST02 MS library [2].

DNA isolation, amplification and 16S rRNA sequencing. Genomic DNA from bacterial cultures was extracted using DNA isolation kit ("AmpliSens", Russia). The G+C content of the DNA was determined by the thermal denaturation method of Marmur and Doty [8].

The universal primers 27f and 1492r targeting bacterial 16S rRNA genes were used to obtain a PCR product of approximately 1.5 kb by using the protocol [6]. The purified PCR product was sequenced by the dideoxynucleotide chain termination method using a model ABI 310 (Applied Biosystems). The primers used for sequencing were the same as those used for PCR amplification.

Analysis of sequence data. The resulting 16S rRNA gene sequence was compared with sequences obtained from public databases to find the most closely related species. All sequences were identified using the NCBI BLASTN tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). The sequence of 16S rRNA gene of new isolate has been deposited in Genbank and assigned accession number JF306642. Phylogenetic analysis was performed using the software packages MEGA 4 [13] after multiple alignments of sequence data by CLUSTAL W. The evolutionary instances (corrected by Kimura's 2-parameter model) were calculated and clustering was performed with the neighbor-joining method. Bootstrap analysis was performed using 1000 replications.

Results and Discussion

The isolates exhibited the phenotypic characteristics of *Pseudomonas* sensu stricto; their characteristics are shown in the species description and Table 1. With few not essential exceptions all of them were identical in their properties.

They were Gram-negative rods ($2.2 \times 1.0 \mu\text{m}$) motile with few (more than 2) polar flagellae. The length of flagella was 6–8 μm , with 4–6 waves (Fig. 1).

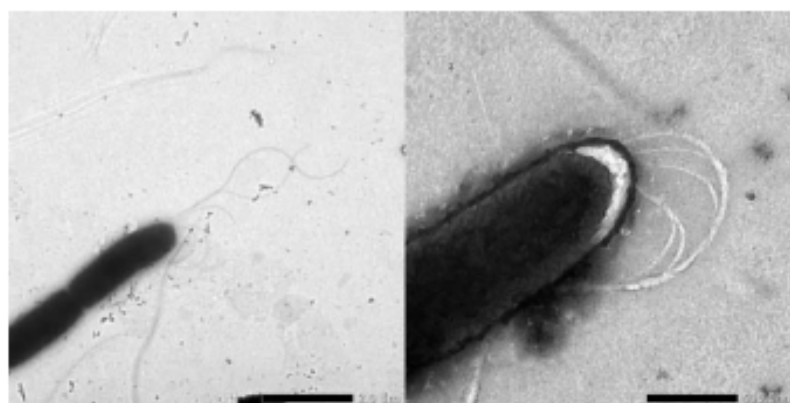


Fig.1. Electron micrograph of cells of strain *P. batumici* UCM B-321.

The isolates did not accumulate poly- β -hydroxybutyrate, did not form spores or microcysts. They grew well in common media, did not require any growth factors. Mineral nitrogen forms (ammonia, nitrates) were utilized.

The temperature optimal for their growth was 27 °C, growth was poor at 37 °C, bacteria did not grow at all at 40 °C.

Oxidase, arginine dihydrolase, levan sucrase and lecithinase were positive, ornithine and lysine decarboxylase were negative. They could not denitrify, did not hydrolyse gelatin, starch and aesculin, did not oxidize gluconate, did not produce the yellow-green fluorescent pigment typical of many species of *Pseudomonas*.

In some glucose-containing media bacteria secreted into the medium the phenazine-1-carboxylic acid – antibiotically active phenazine derivate produced by few *Pseudomonas* species (*P. fluorescens*, *P. chlororaphis* etc). Simultaneously the complex of chemically similar colourless antibiotics among which batumin was the most abundant and active have been produced. This new antibiotic had extremely high and selective activity against staphylococci. The following studies have shown that batumin formula proved to be $C_{36}H_{48}N_2O_7$, and that it was (2E, 10Z, 12E)-20-(3-aminocarboxy-2-methyl-1-oxobutyl) amino-7-methylen-17-oxo-19-oxy-3, 5, 15-trimethyl-eicosa-2,10,12-trienic acid [3, 4]. Batumin is the stereo isomer of kalimantacins isolated in 1995 from *Alcaligenes* sp. [5]. In 2010 antibiotic of similar structure named Kalbat (kalimantacin-batumin) was isolated from the strain of *Pseudomonas fluorescens* [7], but properties of antibiotic-producing strain and the evidence of its identification have not been presented.

Batumin-producing strains utilized more than 40 substances (on the whole carbohydrates, organic acids, amino acids) as single sources of carbon and energy (see the species description).

In their sensitivity to antibiotics the studied bacteria were similar to most of *Pseudomonas* species: all of them were sensitive to streptomycin, chloramphenicol, ciprofloxacin, tetracycline, imipenem; weakly sensitive to cefazoline, resistant to penicillin, erythromycin, lincomycin, oleandomycin, furadonin.

The fatty-acid profiles of isolates were as a whole typical of *Pseudomonas* genus representatives with predominance of C 16:0 and C 16:1 acids (Table 1). Yet they contained less of C 18:1 than other *Pseudomonas* species and unusually large amounts of cyclopropanic Δ 17 acid (the only exception was strain B-362).

According to data of 16S rRNA gene sequence analysis (1376 bp) the new isolate constituted an independent cluster from the other *Pseudomonas* species on the phylogenetic tree shown in Fig. 2. Its nearest phylogenetic neighbour *Pseudomonas gingeri* has shown 98.0% of 16S rRNA gene sequence similarity. It is suggested that bacterial strains with less than 98.7 % of 16S rRNA sequence identity are members of different species [11]. The sequence similarity between strain UCM B-321 and strains of other *Pseudomonas* species (*P. fluorescens*, *P. chlororaphis* etc) was 97 % and lower.

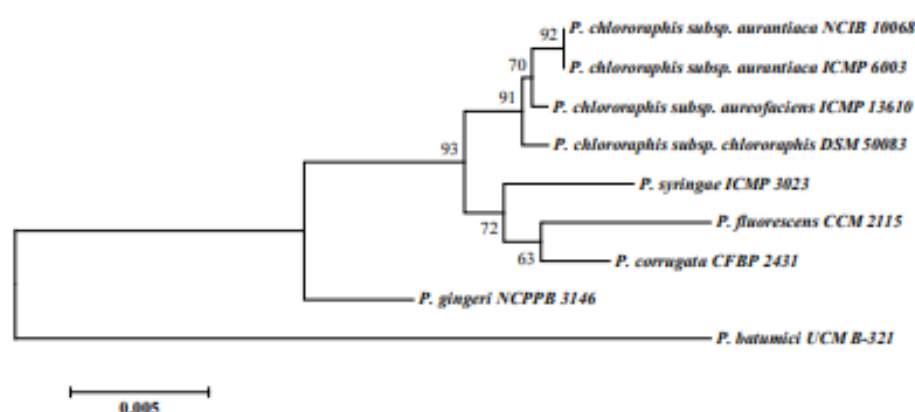


Fig. 2. Phylogenetic position of *Pseudomonas batumici* UCM B-321 within the genus *Pseudomonas* based on 16S rRNA gene sequences. The tree constructed using the neighbor-joining method. Bootstrap analyses were performed with 1000 repetitions.

Bar, 0.005 substitutions per nucleotide position.

Table 1

Cellular fatty acid composition of novel strains

Fatty acids	Content of fatty acids, % in strains			
	B-311	B-362	B-303	B-321
C12:0	0.15	0.25	0	0.25
2OH C12:0	0.58	0.58	0	0.96
C14:0	0.50	0.31	1.2	0.69
C16:0	49.63	59.69	40.00	46.10
C16:1	18.00	30.30	24.00	27.50
C17:0	0.25	0.12	0.10	0.19
ΔC17:0 (cis9,10 C17:0)	22.59	3.52	22.90	14.90
C18:0	4.30	3.05	1.40	4.69
TransC18:1	4.02	2.28	9.50	4.91

P.gingeri is the causative agent of cultivated mushrooms disease called ginger blotch disease. Its description was published in 1982 [15], but the information about its properties was rather brief. Some data (which we use in this paper) were added later during study of other *Pseudomonas* species causing the mushrooms diseases [10]. The smooth forms of *P.gingeri* are mucoid and non-fluorescent; they produce toxin and are pathogenic to mushrooms, whereas rough forms are fluorescent and non-pathogenic. In their phenotypic properties, particularly pigments, antibiotics, toxin production and nutritional spectra *P.gingeri* strains essentially differ from Batumi isolates (see Table 2).

Table 2

Characteristics that differentiate *Pseudomonas batumici* strains from *P. gingeri*

Characteristic	<i>Pseudomonas batumici</i>	<i>Pseudomonas gingeri</i>
Green fluorescent pigment	-	+
Yellow pigment phenazine-1-carboxylic acid	+	-
Batumin production	+	-
Assimilation of		
d-xylose	-	+
l-arabinose	+	-
Propionate	-	+
Valerate	-	+
Acetate	-	+
Tartrate	-	+
Sorbitol	-	+
o-hydroxybenzoate	-	+
Sarcosine	+	-
l-serine	-	+
l-leucine	-	+
l-lysine	-	+

In summary, all of the presented results, based on phylogenetic, phenotypic and genotypic data illustrate that the *P. batumici* strains represent a new species within the genus *Pseudomonas*.

Description of *Pseudomonas batumici* sp. nov.

Pseudomonas batumici (ba.'tu.mi.ci ; refers to Batumi, the town in the Black Sea coast of the Caucasus, where bacteria have been isolated).

Cells are Gram-negative straight rods (2.2×1.0 μm) motile with few (most often 2) polar flagellae. The length of flagella 6-8 μm, with 4-6 waves. Oxidase positive, strict aerobes. They do not accumulate poly-β-hydroxybutyrate, do not form spores or microcysts, do not produce the yellow-green fluorescent pigment typical of many species of *Pseudomonas*.

They grow well in common media, do not require any growth factors. Mineral nitrogen forms (ammonia, nitrates) are utilized. The temperature optimal for their growth is 27 °C, growth is poor at 37 °C, they do not grow at 40 °C.

Arginine dihydrolase, levan sucrase and lecithinase are positive, ornithine and lysine decarboxylase are negative. They cannot denitrify, do not hydrolyse gelatin, starch and aesculin, do not oxidize gluconate.

Bacteria produce the phenazine-1-carboxylic acid – antibiotically active phenazine derivate produced by few other *Pseudomonas* species. Simultaneously antibiotic batumin with extremely high and selective activity against staphylococci is produced.

Batumin producing strains utilize a wide spectrum of organic compounds as single sources of carbon and energy: d-glucose, saccharose, trehalose, d-fructose, l-arabinose, d-galactose, acetate, succinate, fumarate, glutarate, lactate, citrate, pyruvate, α -ketoglutarate, itaconate, mannitol, inositol, glycerol, chinate, α -alanine, β -alanine, isoleucine, l-aspartate, l-glutamate, arginine, ornithine, citrulline, γ -aminobutyrate, l-hystidine, l-proline, l-tyrosine, l-phenylalanine, betaine, sarcosine.

Xylose, d-arabinose, d-fucose, l-rhamnose, maltose, cellobiose, lactose, starch, inulin, salicin, propionate, butyrate, valerate, caproate, malate, tartrate, hydroxybutyrate, glycollate, dulcitol, sorbitol, adonitol, ethylene- and butylene glycol, methanol, ethanol, propanol, n-butanol, mandelic, benzoic, o-, m- and p-hydroxybenzoic acid, phtalate, phenol, naphthalene, glycine, serine, threonine, lysine, tryptophane, anthranilate, creatine, hippurate, acetamide, nicotinic acid are not utilized.

The cellular fatty-acid profiles are typical of *Pseudomonas* genus representatives with predominance of C16:0 and C16:1 acids. Yet bacteria contain less of C18:1 than other *Pseudomonas* species and unusually large amounts (up to 22.9 %) of cyclopropanic Δ 17 acid .

The DNA G+C content of strain UCM B-321 is 64.0 mol%.

Isolated from soil samples collected in the moist subtropics region (the Black Sea coast of the Caucasus).

The type strain is *Pseudomonas batumici* UCM B-321 (Ukrainian Collection of Microorganisms, Kyiv, Ukraine).