

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

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

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

«__» червня 2023р.

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

«__» червня 2023р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код та назва спеціальності)

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

на тему: «Біосинтез цефалоспорины *Cephalosporium acremonium*»

Виконав: здобувач IV курсу, групи 2

МУРЕНКО Кирил Миколайович

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник ВОРОНЦОВ Олександр Олександрович

(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 Людмила РЕШЕТРЯК

(ім'я та прізвище)

(підпис)

Я, як здобувач Національного університету харчових технологій, розумію і підтримую політику університету з академічної доброчесності. Я не надавав і не одержував 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 СТАБНІКОВ

«01» березня 2023 року

ЗАВДАННЯ

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

МУРЕНКА Кирила Миколайовича

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи «Біосинтез цефалоспорину *Cephalosporium acremonium*»

керівник роботи ВОРОНЦОВ Олександр Олександрович, к.т.н., доц.

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

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

2. Строк подання здобувачем роботи 05.06.2023

3. Вихідні дані до роботи: біологічний агент: *Cephalosporium acremonium*; цільовий продукт: цефалоспорин; геометричний об'єм ферментера: 2,5 м³; коефіцієнт заповнення: 0,5

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

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема біосинтезу ергостерину - 1 аркуш формату А1

Апаратурна схема біосинтезу ергостерину - 1 аркуш формату А1

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01 березня 2023 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1.	<i>Характеристика цільового продукту</i>	<i>01.03.23-14.04.23</i>	
2.	<i>Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента</i>	<i>15.04.203-23.04.23</i>	
3.	<i>Техніко-економічне обґрунтування</i>	<i>24.04.23-29.04.23</i>	
4.	<i>Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва</i>	<i>30.04.23-07.04.23</i>	
5.	<i>Специфікація обладнання</i>	<i>08.04.23-14.04.23</i>	
6.	<i>Опис технологічної схеми</i>	<i>14.04.23-20.05.23</i>	
7.	<i>Контроль виробництва</i>	<i>20.05.23-29.05.23</i>	
8.	<i>Оформлення кваліфікаційної роботи</i>	<i>29.05.23-30.05.23</i>	
9.	<i>Оформлення графічної частини</i>	<i>30.05.23-31.05.23</i>	

Здобувач

_____ (підпис)

Кирил МУРЕНКО

_____ (ім'я та прізвище)

Керівник роботи

_____ (підпис)

Олександр ВОРОНЦОВ

_____ (ім'я та прізвище)

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	6
-РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	9
РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	14
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	14
2.2. Перевірочний розрахунок складу поживного середовища.	18
2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента	21
2.4 Таксономічний статус біологічного агента	23
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ.....	24
3.1 Потреба в цільовому продукті – цефалоспорині	24
3.2 Розрахунок потужності виробництва цефалоспорину	25
3.3 Розрахунок геометричного об'єму ферментера.....	26
3.4 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....	27
РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	30
4.1. Шлях катаболізму ростового субстрату у продуцента цефалоспорину	30
4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цефалоспорин С	31
РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	36
5.1 . Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу	36
5.1.1. Обґрунтування умов і способу культивування і типу ферментера .	36
5.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря.....	37
5.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів	39
5.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища	47
5.2 . Основні етапи післяферментаційного виділення, концентрування та очищення цільового продукту.	55
5.3 . Пропозиції щодо підбору обладнання для реалізації післяферментаційних процесів.	60
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ	61
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ.	66

РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	77
8.1. Мікробіологічний контроль	87
8.2. Показники росту і синтезу цільового продукту.....	89
8.2.1. Концентрація біомаси.....	89
8.2.2. Концентрації цільового продукту (цефалоспорину)	89
8.2.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту	90
РОЗДІЛ 9. АНАЛІЗ ПЕРСПЕКТИВ ВПРОВАДЖЕННЯ СИСТЕМИ ЕКОЛОГІЗАЦІЇ ВИРОБНИЦТВА	92
9.1. Системи знешкодження рідких відходів	92
9.2. Системи знешкодження газоподібних відходів.....	94
9.3 Системи знешкодження твердих відходів	96
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	98

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробці технологічної та апаратурної схем біосинтезу цефалоспоринолу С за допомогою *Cephalosporium acremonium*. Культивування відбувалося на середовищі з глюкозою та арахісовим борошном . На даному середовищі продуцент синтезує 11,84 г/л антибіотику. У роботі пропонується використовувати цефалоспорин для лікування гострих кишкових інфекцій. Згідно Державної служби статистики України станом на 2017 рік було зафіксовано близько 112 тисяч випадків, тому розрахована річна потужність виробництва , яка складає 336 кг/рік цефалоспоринолу (49,7 м³ культуральної рідини).

Виробництво цефалоспоринолу включає допоміжні роботи (підготовка персоналу; підготовка та миття обладнання та комунікацій; приготування 6%-го розчину соляної кислоти, приготування та стерилізація 6%-го розчину натрій гідроксиду для підтримки рН на відповідному рівні; приготування та стерилізація поживних середовищ для колб, інокуляторів та ферментера.) та технологічний процес (вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках, в інокуляторах об'ємом 20, 200 л та власне сам біосинтез у ферментері об'ємом 2,5 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,5). Розроблена технологічна та апаратурна схема доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу. Складена специфікація обладнання для проведення даних процесів, розроблена карта постадійного контролю та описані методики визначення концентрації біомаси, кінцевого продукту, глюкози та азоту.

ВСТУП

Протягом тисячоліть людей мали різного роду інфекції, які часто досягали масштабів епідемії і коштували життя мільйонам людей. Саме в цей вік людство замислилося про інфекційні хвороби та питання про їх причини. Однак через брак знань та тривалий час пошук стратегій боротьби, лікування та запобігання поширенню інфекційних захворювань було безуспішним [1]. У 1870 році доктор та бактеріолог Д. Сандерсон звернув увагу на те, що в середовищі з пліснявою (пеніциліум) не розвиваються бактерії. З подальшими дослідженнями, лише у 1929 році був відкритий новий препарат пеніцилін, який тільки у 1940 році вдалося виділити у кристалічному вигляді. З того часу розпочалась ера антибіотиків. Відкриття пеніциліну було великою перемогою в медицині. Його застосовували для лікування багатьох інфекційних захворювань у часи Другої Світової війни та застосовують по сьогоднішній день [2]. З початком двадцятого століття з багатьма хворобами, які на той час набули масштабів епідемії, наприклад, холерою, сифілісом, чумою, туберкульозом чи черевним тифом, і це лише деякі з них, можна було боротися за допомогою нових відкритих антибіотиків [1].

Цефалоспорин був виділений в 1948 р. із гриба *Cephalosporium aeromonium*. Продуцентами можуть виступати *Cephalosporium acremonium* W53.2.53, *Cephalosporium acremonium* C462, *C. aeromonium* CW19 та *A. chrysogenum* 26/8 [3, 4, 5, 6]. Найбільш оптимальним виявився штам *Cephalosporium acremonium* W53.2.53, який має найбільший вихід продукту з урахуванням затрат на поживне середовище.

					НУХТ БТЕК 04.02.34 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив		Муренко К.М.			ВСТУП	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевірив		Воронцов О.О.					7	104
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Затверд.		Стадніков В.П.						

Мета кваліфікаційної роботи – проєктування ділянки доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу (технологічна та апаратурна схеми) цефалоспорину штамом *Cephalosporium acremonium* W53.2.53.

Актуальність теми: цефалоспорины проявляють свою активність проти багатьох бактерій, включаючи збудників гострих кишкових інфекцій. Так як на сьогодні постійно відбувається їх зростання, необхідно постійно розробляти та модифікувати вже існуючі антибіотики цефалоспоринового ряду.

Новизною роботи є використання високопродуктивного штаму *Cephalosporium acremonium* W53.2.53 для біосинтезу цефалоспорину, який є високопродуктивним (синтезує 10,04 г/л цефалоспорину) та економічно вигідним (умовна вартість 1 г цефалоспорину становить 1,29 грн), порівняно з іншими продуцентами,

-РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Фізико-хімічні властивості. Цефалоспори́ни – велика група бета-лактамних антибіотиків, у яких бета-лактамне кільце з'єднане з шестичленним дигідротіазиновим кільцем. Тому в основі лежить 7-аміноцефалоспоринова кислота (7-АЦК) [7]. Вони розчинні у воді, стійкі до рН та змін температур. Молекулярна маса лежить у межах 400-450 МО [8].

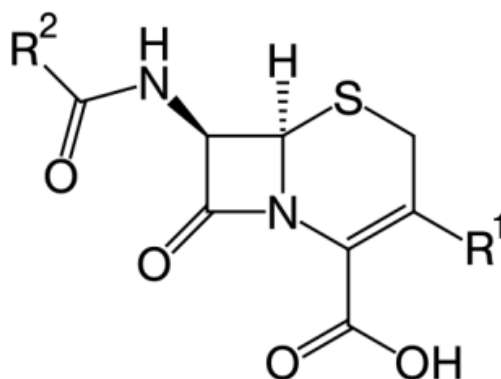


Рис.1.1. 7-аміноцефалоспоринова кислота

Ядро цефалоспори́на, за своєю природою, достатньо стійке до дії к β -лактамаз. Радикали R_1 та R_2 можуть мати різноманітну хімічну природу. Від їх структури будуть залежати кислотно-основні властивості, розчинність, хімічна стійкість та спектр антимікробної дії [9]. Модифікація R_1 замісника, який знаходиться близько до β -лактамного кільця, впливає на антибактеріальну активність. Зміни в R_2 заміснику, який прикріплений до дигідротіазинового кільця, впливають на фармакокінетичні властивості препарату.

					<i>НУХТ БТЕК 04.02.34 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розробив</i>	<i>Муренко К.М.</i>				<i>РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Перевірив</i>	<i>Воронцов О.О.</i>						9	104
<i>Н. Контр.</i>					<i>Кафедра БТМ</i>			
<i>Затверд.</i>	<i>Стадніков В.П.</i>							

На даний час є 5 поколінь цефалоспоринів:

1 покоління (цефазолін, цефалексин та ін.);

2 покоління (цефуроксим, цефокситин та ін.);

3 покоління (цефотаксим, цефтриаксон, цефтазидим та ін.);

4 покоління (цефпіром, цефепим);

5 покоління (цефтобипрол, цефтаролін, цефтолозан) [10].

Антибіотики першого покоління більш орієнтовані на грампозитивні мікроорганізми. Серед антибіотиків першого покоління слід виділити цефалозин, який на той час став антибіотиком №1. Але цефалозин не проявляв свою активність до ентерококів (*E.coli*), сальмонел (*Salmonella spp*), шигел (*Shigella spp*), *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* [11].

Цефалоспорины 2-го покоління більш ефективні до грамнегативних бактерій, але не втрачають здатність впливати на мікроорганізми, проти яких використовують цефалоспорины 1-го покоління [8]. Лідером виявився цефуроксим, який порівняно з першим поколінням більш активніший до *M. catarrhalis* та *Haemophilus spp*. Це єдиний представник цього покоління, який стійкий до бета-лактамаз, тому він ефективний до *E. coli*, *Shigella spp*, які його продукують.

Цефалоспорины 3-го покоління мають розширений спектр дії, порівняно з першими двома. Особливістю є те, що тут присутні інгібіторозахищені цефалоспорины: цефоперазон/сульбактам та цефтриаксон/сульбактам. Завдяки чому, вони здатні інгібувати велику кількість бета-лактамаз. Але зазвичай цефалоспорины не використовуються, тому що мають велику кількість побічних ефектів порівняно з другим поколінням, а ефективність майже не змінюється.

Ключовим препаратом 4-го покоління є цефепім. Головною перевагою є те, що він краще проникає через зовнішню мембрану грамнегативних бактерій [11].

Ось, наприклад, цефтріаксон ($C_{18}H_{18}N_8O_7S_3 \cdot 3 \frac{1}{2} H_2O$) – антибіотик 3-го покоління, білий або жовтуватий кристалічний порошок, гігроскопічний, добре розчиняється у воді, гірше – у метанолі, і дуже слабо – у етанолі. Молекулярна маса 554,59. Структурна формула наведена на рис. 1.2.

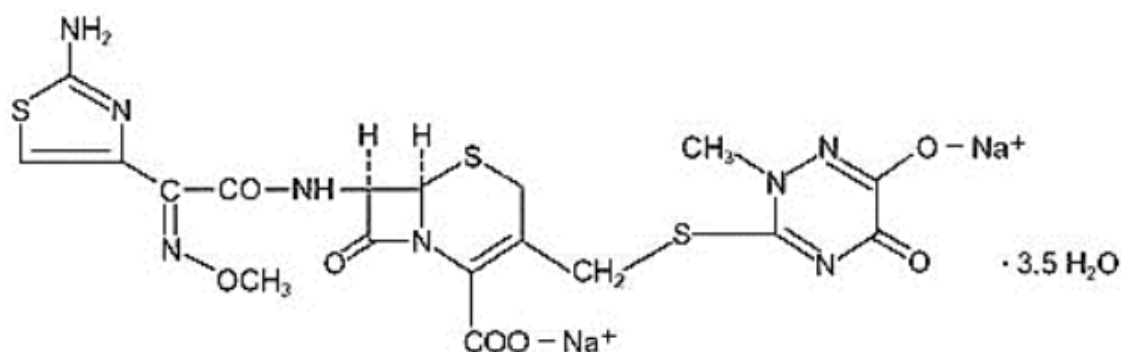


Рис.1.2 Структурна формула цефтріаксона

Лікарська форма. Порошок для розчину для ін'єкцій.

Фармакотерапевтична група. Антибактеріальні засоби для системного застосування. Інші бета-лактамі антибіотики. Цефалоспорини III покоління. Цефтріаксон. Код АТХ J01D D04.

Фармакодинаміка. Цефтріаксон має довгий період напіврозпаду, що дозволяє проводити лікування однією дозою на день. Це робить його особливо корисним для лікування ускладнених інфекцій та для профілактики післяопераційних інфекцій. Цефтріаксон є бактерицидним препаратом, який діє на бактерії, пригнічуючи синтез їх клітинної стінки. Він виявляє активність проти широкого спектру грамнегативних і грампозитивних мікроорганізмів. Цефтріаксон дуже стійкий до більшості бета-лактамаз, які продукуються грампозитивними і грамнегативними бактеріями, включаючи пеніцилінази і цефалоспоринази.

Цефтріаксон є ефективним проти багатьох мікроорганізмів, які можуть викликати клінічні інфекції.

Фармакокінетика. Після введення цефтріаксону в м'язи його повна кількість потрапляє в кров, і через 2-3 години досягає максимальної концентрації. Якщо препарат введений венозно, він швидко проникає в тканини та підтримує бактерицидні концентрації до 24 годин. Цефтріаксон зв'язується з білками крові, і це зв'язування залежить від концентрації препарату у крові. Концентрація цефтріаксону в інтерстиціальній рідині вища, ніж у крові, через менший вміст білків.

Цефтріаксон добре проникає в органи та рідини організму, включаючи мозкові оболонки при менінгіті у дітей.

Препарат виділяється нирками та жовчю, і при нирковій недостатності фармакокінетика майже не змінюється. У здорових дорослих період напіввиведення становить близько 8 годин, а у новонароджених та людей старше 75 років збільшується в 2-3 рази [12].

Механізм дії. Механізм дії цефалоспоринів, як і у пеніцилінів ґрунтується на пригніченні активності транспептидаз, які безпосередньо приймають участь у синтезі пептидоглікану. Завдяки чому, бактерія не синтезує пептидоглікан і за рахунок осмотичного градієнту між клітиною і зовнішнім середовищем вона «лопається» [13].

Застосування. Цефтріаксон застосовується для лікування інфекцій дихальних шляхів, шкіри та м'яких тканин, сечовивідних шляхів, мозку та спинного мозку, кісток та суглобів, деяких статевих інфекцій, сепсису, менінгіту і т.д.

Протипоказання. Підвищена чутливість до цефтріаксону або іншого цефалоспорину, недоношені новонароджені віком до 41 тижнів, доношені новонароджені віком до 28 днів, гіпербілірубінемія, жовтяниця, ацидоз, ниркова недостатність.

Вагітність. Вагітні жінки повинні бути особливо обережними при застосуванні цього препарату. Це пов'язано з тим, що цефтріаксон може проникати через плацентарний бар'єр та потенційно впливати на розвиток плоду.

До того ж, при застосуванні цефтріаксону під час вагітності може бути підвищений ризик розвитку діареї та грибкових інфекцій слизових оболонок. Також, є можливість сенсibiliзації на цей препарат.

У будь-якому випадку, рішення про призначення цефтріаксону вагітній жінці повинно прийматися лікарем, який повинен оцінити користь терапії для жінки та потенційний ризик для розвитку плоду. У деяких випадках, призначення цефтріаксону може бути необхідним, якщо користь перевищує можливий ризик.

Умови зберігання. В упаковці при температурі не вище 25 °С в недоступному для дітей місці

Несумісність. Цефтріаксон несумісний з іншими антибактеріальними засобами. Не дозволяється змішувати різні лікарські засоби в одному шприці або для системи внутрішньовенного введення [12].

РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

Цефалоспорин – бета-лактамі антибіотики, в основі яких лежить 7-аміноцефалоспоринова кислота [9]. Порівняно з першим відкритим антибіотиком пеніциліном, цефалоспорин більш ефективно діє на пеніцил-резистентні штами. Ще однією перевагою є те, що частота побічних ефектів для цефалоспоринів нижча ніж у інших антимікробних препаратів. Уперше, він був виділений в 1948 р. із гриба *Cephalosporium aeromonium*. За останні 40 років, цефалоспорин став найбільш розповсюджених ліків на китайському ринку [10].

У табл. 2.1 наведено продуцентів цефалоспоринової С. Як ми бачимо, штами мають різну концентрацію продукту, умови культивування та склад поживних середовищ. Але *C. aeromonium* CW19, вирощений на середовищі з глюкозою та метіоніном, синтезує досить малу кількість антибіотику (0,83 г/л), тому на наступному етапі вибору біологічного агента розраховуємо вартість поживних середовищ для *A. chrysogenum* 26/8, *Cephalosporium acremonium* W53.2.53 та *Cephalosporium acremonium* C462 (табл. 2.2).

Як видно з даних, наведених у табл. 2.2, штам *C. acremonium* C462 синтезує найменшу кількість антибіотику і є найбільш коштовним, штам W53.2.53. синтезує найбільшу кількість антибіотику (11,84 г/л) та має найбільш тривалий час культивування (150 год). А ось *Cephalosporium acremonium* C462 синтезує найменшу кількість антибіотику та має найдорожче середовище.

					НУХТ БТЕК 04.02.34 КР ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розробив</i>	<i>Муренко К.М.</i>				РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Перевірив</i>	<i>Воронцов О.О.</i>						14	104
<i>Н. Контр.</i>					Кафедра БТМ			
<i>Затверд.</i>	<i>Стадніков В.П.</i>							

Для остаточного переконання, розраховуємо умовну вартість 1 г цільового продукту (табл. 2.3). Дані, наведені у табл. 2.3 свідчать, що умовна вартість антибіотику, синтезований штамом *Cephalosporium acremonium* W53.2.53., є найнижчою (1,29 грн/г), а кількість утвореного продукту – найвищою (0,067 г/год).

Особливості одержання антибіотику на суміші ростових субстратів

Таблиця 2.1

Продуцент	Склад поживного середовища, г/л	Концентрація продукту, г/л	Тривалість Культивування, год	Особливості процесу біосинтезу	Література
1	2	3	4	5	6
<i>Cephalosporium acremonium</i> W53.2.53.	Арахісове борошно – 100; CH ₃ COONH ₄ – 6; Метилолеат – 3; DL-метіонін – 3; Моногідрат глюкози – 11; CaSO ₄ ·2H ₂ O – 2,5; CaCO ₃ – 5; MgSO ₄ ·7H ₂ O – 2,5;	11,84	150	Культивування в ферментері з мішалкою об'ємом 40 л, температура 25 °С, рН 6,5.	Weichang Zhou, Karin Holzhauer-Rieger, Michael Dors, Karl Schügerl. Influence of medium composition on the cephalosporin C production with a highly productive strain <i>Cephalosporium acremonium</i> . <i>Journal of Biotechnology</i> . 1992, 23(3):315-29. doi: 10.1016/0168-1656(92)90078-N
<i>Cephalosporium acremonium</i> C462	Арахісове борошно – 100; Метіонін – 12; CH ₃ COONH ₄ – 2; Метилолеат – 5; Глюкоза – 30; CaCO ₃ – 13;	4,1	144	Культивування в колбах качалці 250 об/хв, температура 24 °С, рН 7,2-7,4	Способ биосинтеза цефалоспоринона С с использованием нового штамма <i>acremonium chrysogenum</i> ВКМ F-4081D [Електронний ресурс]. – 2019. – Режим доступу до ресурсу: https://edrid.ru/en/rid/219.016.dedd.html?dp-1-page=1 .

Продовження таблиці 2.1

1	2	3	4	5	6
C. <i>acremonium</i> CW19	глюкоза – 63; DL-метіонін – 3; (NH ₄) ₂ SO ₄ , - 7,5; олеїнова кислота – 1,5; FeNH ₄ SO ₄ ·6H ₂ O – 0,15; K ₂ HPO ₄ – 15,6; KH ₂ PO ₄ – 15,3; Na ₂ SO ₄ ·10H ₂ O – 1,7; MgSO ₄ ·7H ₂ O – 0,37; CaCl ₂ ·2H ₂ O – 0,075; ZnSO ₄ ·7H ₂ O – 0,03; MnSO ₄ ·H ₂ O – 0,03; CuSO ₄ ·5H ₂ O – 0,008;	0,83	140	Культивуван ня в лабораторном у ферментері, температура 25 °С, рН 7,3- 7,5.	Yves M.Kennel, Arnold L.Demain. Effect of carbon sources on β-lactam antibiotic formation by <i>Cephalosporium acremonium</i> . <i>Experimental Mycology</i> . 2005, 2(3): 234- 238. doi: 10.1016/S0147-5975(78)80016-4
A. <i>chrysogenum</i> 26/8	Кукурудзяний екстракт – 100; Декстрин – 60; Кукурудзяний крохмаль – 25; KH ₂ PO ₄ – 5; Глюкоза – 5; MgSO ₄ – 3,5; (NH ₄) ₂ SO ₄ – 14,0; Мел – 10; CuSO ₄ ·5H ₂ O – 0,018; ZnSO ₄ ·7H ₂ O – 0,15; MnSO ₄ ·7H ₂ O – 0,03; FeSO ₄ ·7H ₂ O – 0,07;	5,35	144	Культивуван ня в колбах на качалці 220-240 об/хв, температура 28-24°С	А.Я. Валиахметов, Л.В. Трилисенко, В.М. Вагабов, Ю.Э. Бартошевич, И.С. Кулаев, М.И. Новак, А.Г. Домрачева, М.А. Эльдаров, К.Г. Скрыбин. Динамика содержания неорганических полифосфатов при синтезе цефалоспорины С у <i>Acremonium</i> <i>chrysogenum</i> , <i>Институт биохимии и</i> <i>физиологии микроорганизмов им.Г.К.</i> <i>Скрябина</i> , 2010, 46(2): 198-204

Закінчення табл. 2.1

**Вартість поживних середовищ для культивування продуцентів
цефалоспоринів**

Таблиця 2.2

Продуцент	Компонент поживного середовища	Концентрація у ПС, г/л	Ціна компонент а, грн/кг	Вартість компонента(грн) на 1 л середовища	Джерело інформації(1, 2, 3)*
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>
<i>Cephalosporium acremonium</i> W53.2.53.	Арахісове борошно	100	130	13	1
	CH ₃ COONH ₄	6	95	0,57	1
	Метилолеат	3	180	0,54	1
	DL-метіонін	3	120	0,36	1
	Моногідрат глюкози	11	69	0,76	1
	CaSO ₄ ·2H ₂ O	2,5	4	0,01	1
	CaCO ₃	5	6	0,03	1
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	2,5	16	0,04	1
	Вартість 1 л середовища – 15,31 грн				
<i>Cephalosporium acremonium</i> C462	Арахісове борошно	100	130	13	4
	DL-метіонін	12	120	1,44	1
	CH ₃ COONH ₄	2	95	0,26	2
	Метилолеат	5	180	0,9	1
	глюкоза	30	100	3	1
	CaCO ₃	13	6	0,08	1
	Вартість 1 л середовища – 18,68 грн				
<i>A. chrysogenum</i> 26/8	Кукурудзяний екстракт	100	60	6	4
	Декстрин	60	40	2,4	1
	Кукурудзяний крохмаль	25	38	0,95	1
	КН ₂ РО ₄	5	120	0,6	1
	Глюкоза	5	100	0,5	1
	MgSO ₄	3,5	93	0,33	1
	(NH ₄) ₂ SO ₄	14	18	0,25	1
Мел	10	6	0,06	1	

Продовження табл 2.2

1	2	3	4	5	6
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,018	160	0,03	1
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,15	56	0,008	1
	MnSO ₄ ·7H ₂ O	0,03	39	0,001	5
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,07	27	0,002	6
Вартість 1 л середовища – 11,31 грн					

Примітка. * – Ціни наведено станом на лютий 2022 р. 1 - <https://prom.ua>, 2 - <https://russian.alibaba.com> 3 - <https://33korovy.com.ua> 4 - <https://big1.ua> 5 - <https://himfarminvest.com.ua> 6 - <https://klebrig.com.ua>

Закінчення табл. 2.2

**Умовна вартість 1 г антибіотику, синтезованого на суміші
ростових субстратів**

Таблиця 2.3

Біологічний агент	Концентрація антибіотику, г/л	Тривалість культивування, год	Кількість утвореного антибіотику за годину, г/год	Вартість 1 л середовища, грн/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г
1	2	3	4	5	6
<i>Cephalosporium acremonium</i> W53.2.53.	11,84	150	0,067	15,31	1,29
<i>Cephalosporium acremonium</i> C462	4,1	144	0,03	18,68	4,56
<i>A. chrysogenum</i> 26/8	5,35	144	0,04	11,31	2,1

2.2. Перевірочний розрахунок складу поживного середовища.

Розрахунок складу поживного середовища для вирощування штаму *Cephalosporium acremonium* W53.2.53. – продуцента цефалоспорину.

Тривалість культивування 150 год, концентрація цефалоспорину в культуральній рідині становить 11,84 г/л, а концентрація біомаси – 103,5 г/л.

Розрахунок вмісту в середовищі джерела вуглецевого живлення

Потреби для синтезу цефалоспорину. Джерелом вуглецю в середовищі є моногідрат глюкози.

Розраховуємо, скільки вуглецю міститься в 11,84 г цефалоспорину (цефтриаксон). Молекулярна маса цефтриаксону 555 г/л. У 555 г цефтриаксону міститься 216 г Карбону, а в 11,84 г – $(11,84 \cdot 216) / 555 = 4,6$ г Карбону.

Розраховуємо в скількох грамах вуглеводів міститься 4,6 г Карбону, враховуючи, що вміст Карбону в глюкозі складає 40%. У 100 г вуглеводів міститься 40 г карбону, а 4,6 г Карбону в $(4,6 \cdot 100) / 40 = 11,5$ г вуглеводів.

Враховуючи, що при вирощуванні мікроорганізмів на вуглеводах (наприклад, глюкозі) близько 50 % субстрату окиснюється до CO₂ для одержання енергії, необхідної для конструктивного метаболізму, вміст глюкози у середовищі становитиме $(11,5 \times 0,5) + 11,5 = 17,25$ г/л.

Потреби для синтезу біомаси. Біомаса містить 50% Карбону, отже вміст Карбону у 103,5 г біомаси становить $103,5 \cdot 0,5 = 51,75$ г. Ця кількість Карбону міститься у $(51,75 \cdot 100) / 40 = 129$ г вуглеводів.

Враховуючи «холосте окиснення», для одержання 103,5 г/л біомаси у середовище необхідно внести $(129 \cdot 0,5) + 129 = 193,5$ г/л глюкози.

Отже, загальний вміст глюкози у середовищі, необхідний для синтезу 103,5 г/л біомаси та 11,84 г/л цефалоспорину, складає $193,5 + 17,25 = 211$ г/л (21,1%).

Розрахунок глюкозного підживлення

Таку кількість глюкози (211 г/л) необхідно вносити окремими порціями (підживлення). Тривалість культивування становить 150 год. Припустимо, що початкова концентрація глюкози 1 г/л, а підживлення додається у середовище кожні 10 год. Тоді кількість порцій становить $(150 - 20) / 10 = 13$. Отже, з кожною порцією кількість глюкози вноситься $211 / 13 = 16,23$ г/л

Розрахунок вмісту в середовищі джерела азотного живлення

Потреби для синтезу біомаси. Так як у біомасі міститься 10% Нітрогену, то у 103,5 г/л біомаси вміст азоту складає $103,5 * 0,1 = 10,4$ г.

Джерелом амонійного Нітрогену у середовищі виступає ацетат амонію. Розраховуємо, яку його кількість необхідно для одержання 103,5 г/л біомаси. Молекулярна маса $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ становить 77 г/моль, а Нітрогену – 14 г, тоді 10,4 г Нітрогену міститься у $(77 * 10,4) / 14 = 57,2$ г ацетату амонію.

Потреби для синтезу цефалоспорину. Нітроген входить до складу цефалоспоринів. Розраховуємо необхідну кількість ацетату амонію у середовищі, для одержання 11,84 г/л цефалоспорину (цефтриаксону).

Молекулярна маса цефтриаксону становить 555 г/л. У 555 г міститься 112 г Нітрогену, тоді у 11,84 г цефтриаксону вміст Нітрогену складає $(11,84 * 112) / 555 = 2,4$ г.

Далі розраховуємо в якій кількості ацетату амонію міститься 2,4 г Нітрогену. У 77 г вміст Нітрогену складає 14 г, тоді 2,4 г міститься у $(2,4 * 77) / 14 = 13,2$ г солі.

Розрахунок вмісту органічного азоту в арахісовому борошні та метіоніні. Арахісове борошно є джерелом органічного Нітрогену, яка містить 45 % білків, а білок в свою чергу містить 16% азота. Отже, у 100 г борошна міститься 45 г білків, а азоту – $(45 * 16) / 100 = 7,2$ г.

Молекулярна маса метіоніну становить 150 г/л, а азоту в ньому 14 г. Тому в 3 г метіоніну Нітрогену буде $(3 * 14) / 150 = 0,28$ г. Сумарна кількість Нітрогену у борошні та метіоніні становить $7,2 + 0,28 = 7,5$ г

Кількість Нітрогену в середовищі необхідна для синтезу біомаси та цефалоспорину становить $9,6$ г + $1,7$ г = $11,3$ г. З урахуванням Нітрогену, який міститься в арахісовому борошні, у середовище повинно бути внесено $11,3 - 7,5 = 3,8$ г/л (у вигляді мінеральних солей).

Розрахунок вмісту у середовищі джерел мінерального Нітрогену.
Джерелом мінерального Нітрогену в середовищі виступає ацетат амонію. Для забезпечення 3,8 г Нітрогену, концентрація солі повинна бути $(77 \cdot 3,8) / 14 = 20,9$ г/л.

Інші компоненти середовища

Джерелом вітамінів, мікро- та макроелементів у середовищі виступає арахісове борошно. Воно містить вітаміни: В1 (тіамін), В2 (рибофлавін), В4 (холін), В5 (пантотенова кислота), В6 (піридоксин), В9 (фолат), Е (токоферол), РР (нікотинова кислота) та елементи: калій, фосфор, магній, натрій, кальцій, марганець, залізо, мідь, селен, цинк.

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

Гриб *Cephalosporium acremonium* W53.2.53. утворює щільний міцелій, колонії спочатку білі, потім рожеві. Конідії еліпсоподібні або яйцевидні 3-4 мкм, прямі, інколи зігнуті, зібрані у головки (діаметр до 16 мкм) [14].

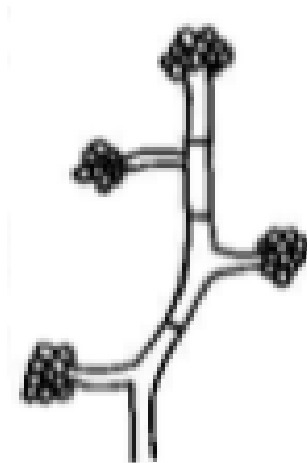


Рис. 2.1 Конідії *Cephalosporium acremonium* W53.2.53.

Культуру зазвичай вирощують на поживних середовищах із різними джерелами карбону, азоту в умовах високої аерації та перемішування. При вирощування на агаризованому середовищі, колонії набувають конусоподібної форми (діаметр 0,7мм), повітряний міцелій слабо розвинутий, колонії трохи підняті та мають рожевий колір. При додаванні метіоніну на 15 добу росту діаметр колоній складав 0,9 мм [15]. Консистенція

колоній спочатку компактна, іноді волога, плоска або складчаста, з часом обростає пухкими гіфами [16].



Рис. 2.2 Клітина *Cephalosporium acremonium* W53.2.53. під мікроскопом



Рис. 2.3 Колонія *Cephalosporium acremonium* W53.2.53.

Фізіолого-біохімічні ознаки

Оптимальна температура росту – 24-28 °С, а значення рН – 7. *Cephalosporium acremonium* W53.2.53. строгий аероб, не потребує факторів росту, тобто являється прототрофом, але при додаванні цих речовин

спостерігається пришвидшення росту культури. Розмноження безстатеве за допомогою конідій [15]. Потребують дуже вологих умов, активність води становить 0,90-9,98 [16].

2.4 Таксономічний статус біологічного агента

Домен – *Eukaryota*;

Царство – *Fungi*;

Підцарство – *Dikarya*;

Відділ – *Ascomycota*;

Підвідділ – *Pezizomycotina*;

Клас – *Sordariomycetes*;

Підклас – *Hypocreomycetidae*;

Порядок – *Hypocreales*;

Рід – *Cephalosporium*;

Вид – *Acremonium*;

Штам – *Cephalosporium acremonium* W53.2.53 [17].

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

3.1 Потреба в цільовому продукті – цефалоспорині

На сьогодні протимікробні засоби являють собою важливу групу лікарських засобів. Саме завдяки їм стало можливим лікування багатьох інфекційних захворювань. Глобальною проблемою є набуття резистентності мікроорганізмів до антибіотиків. Але цефалоспоринові антибіотики володіють стійкістю до дії відповідних ферментів, які руйнують їх структуру.

Цефтриаксон – антибіотик 3-го покоління використовують для лікування таких бактеріальних інфекцій: гонорея, менінгіт, інфекції дихальних шляхів, шкіри, сечовивідних шляхів, крові, суглобів, кісток, репродуктивних органів тощо. Зазвичай дорослим рекомендується приймати 1-2 грами цефтриаксону один або двічі на день, залежно від важкості і типу інфекції. Якщо інфекція викликана бактерією *Staphylococcus aureus*, рекомендована добова доза може бути від 2 до 4 грамів, але не більше 4 грамів на день. Зазвичай лікування цефтриаксоном повинно продовжуватись не менше 2 днів після зникнення симптомів інфекції. Загальний курс лікування зазвичай становить від 4 до 14 днів, а в деяких складних випадках може тривати довше.

Дітям для лікування інфекцій шкіри та шкірних структур, рекомендована загальна добова доза лікарського засобу становить від 50 до 75 міліграмів на кілограм маси тіла пацієнта один раз на день (або розподілити на дві однакові дози, які приймають через рівні інтервали часу). Максимальна доза на день не повинна перевищувати 2 грами.

					<i>НУХТ БТЕК 04.02.34 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО- ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розробив</i>	<i>Муренко К.М.</i>						24	104
<i>Перевірив</i>	<i>Воронцов О.О.</i>							
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>	<i>Стадніков В.П.</i>							
						<i>Кафедра БТМ</i>		

Для лікування серйозних інфекцій, рекомендована загальна добова доза становить від 50 до 75 міліграмів на кілограм маси тіла пацієнта, яку розподіляють на кілька однакових доз, які приймають кожні 12 годин. Загальна добова доза не повинна перевищувати 2 грами.

При лікуванні менінгіту, рекомендована початкова терапевтична доза становить 100 міліграмів на кілограм маси тіла пацієнта (не більше 4 грамів). Дозу можна розподілити на одну добову дозу (або розподілити на дві рівні дози, які приймають кожні 12 годин). Звичайна тривалість терапії становить від 7 до 14 днів [18].

Станом на 2017 р. [19] в Україні зареєстровані близько 112 тис. гострих кишкових інфекцій. Пропоную розрахувати необхідну кількість цефалоспорину, для їх лікування. Згідно інструкцій до використання препарату, середня тривалість лікування становить 7-14 діб, візьмемо середню кількість – 10 діб. А доза складає 1-2 г кожні 24 години. Тому, на один курс лікування необхідно близько 15 г антибіотику. Розрахуємо річну потребу антибіотику, відповідно даним, наведеним вище:

$$(112\ 000\ \text{осіб} * 15\ \text{г препарату}) / 1000\ \text{г} = 1680\ \text{кг/рік}$$

3.2 Розрахунок потужності виробництва цефалоспорину

Згідно з Державним реєстром лікарських засобів [20], більшість препарату цефтриаксон на ринку України є імпортом (Китай, Індія). Україна в свою чергу виробляє близько 20 % від загального числа.

Відповідно до розрахунків, наведених у пункті 2.1, необхідно розрахувати потужність виробництва цефтриаксону. Якщо річна потреба становить 1680 кг/рік, а Україна виробляє 20 %, то ми можемо дізнатись, яка частка припадає на власне виробництво.

$$(1680 * 20) / 100 = 336\ \text{кг/рік}$$

Далі, нам необхідно розрахувати необхідну кількість культуральної рідини, для задоволення потреб на власне виробництво. Штам *Cephalosporium acremonium* W53.2.53. за 150 годин культивування синтезує 10,04 г/л цефалоспорину. Відповідно, для отримання 336 кг цефтриаксону необхідно стільки культуральної рідини:

$$336 \text{ кг цефтриаксону} - x \text{ м}^3$$

$$0,01004 \text{ кг цефалоспорину} - 0,001 \text{ м}^3 \text{ культуральної рідини}$$

$$x = (336 * 0,001) / 0,01004 = 33,5 \text{ м}^3 \text{ культуральної рідини на 1 рік}$$

З урахуванням витрат цільового продукту при фільтруванні, центрифугуванні (40%), треба одержати:

$$33,5 * 0,4 + 33,5 = 49,7 \text{ м}^3/\text{рік}$$

3.3 Розрахунок геометричного об'єму ферментера

Згідно розрахунків, наведених у п.2.2. нам необхідно отримати 49,7 м³ культуральної рідини.

Для початку розраховуємо кількість культуральної рідини, яку ми отримаємо за добу, беручи до уваги, що кількість трудоднів становить 330.

$$V_d = V_{\text{гп}} / T_{\text{тр}} = 49,7/330 = 0,15 \text{ м}^3$$

Далі, необхідно дізнатись об'єм культуральної рідини за один цикл роботи.

$$V_{\text{цк}} = (K_1 * V_d * T_{\text{цф}}) / 24 = (1,1 * 0,15 * 158,5) / 24 = 1,09 \text{ м}^3$$

де $T_{\text{цф}}$ – цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (150 год) та час підготовки ферментера (8,5 год). K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій ($K_1 = 1,1 - 1,5$).

Підготовка ферментера складається з: миття та огляд (1,5 год), перевірка на герметичність (1 год), підігрів апарату (0,5 год), стерилізація (1 год),

охолодження (1 год), завантаження середовища (2 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (1 год).

На наступному етапі, знаючи об'єм культуральної рідини та коефіцієнт заповнення ферментера (0,5), визначаємо геометричний об'єм ферментера:

$$V_r = V_{\text{цк}} / K_3 = 1,09/0,5 = 2,18 \text{ м}^3$$

Обираємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер (2,5 м³), та уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_3 = 1,09/2,5 = 0,44 \text{ – не перевищує}$$

3.4 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

За один виробничий цикл отримують 1,09 м³ культуральної рідини (пункт 2.3.). При одержанні культуральної рідини потрібно врахувати її втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря (E_{ϕ}), які становлять від 10 - 15%.

Тому з урахуванням втрат 10 % об'єм поживного середовища та посівного матеріалу перед біосинтезом має становити:

$$V_{\text{роб.1}} = V_{\text{кр}} / (1 - E_{\phi}) = 1,09/0,9 = 1,21 \text{ м}^3 ,$$

де E_{ϕ} – втрати культуральної рідини під час біосинтезу.

Для проведення виробничого біосинтезу використовують ферментер з робочим об'ємом $V_{\text{роб.1}} = 1,21 \text{ м}^3$. З використанням коефіцієнта заповнення 0,5 можна розрахувати можливий геометричний об'єм ферментера, який дорівнює:

$$V_{\phi} = 1,2/0,5 = 2,42 \text{ м}^3$$

Приймаємо стандартний ферментер об'ємом $V_{\text{ст1}} = 2,5 \text{ м}^3$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення: $K_{31} = 1,21/2,5 = 0,48$. Геометричний об'єм ферментера обрано правильно.

Оскільки кількість посівного матеріалу для ферментера становить 10 % від об'єму поживного середовища, то поживного середовища потрібно:

$$V_{\text{пс1}} = V_{\text{роб.1}} / (1 + X_{\text{ф}}) = 1,2 / 1,1 = 1,1 \text{ м}^3,$$

де $X_{\text{ф}} = 0,1$ – доза посівного матеріалу для ферментера

Тоді об'єм посівного матеріалу в ферментері дорівнює:

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пс1}} = 1,2 - 1,1 = 0,1 \text{ м}^3,$$

Необхідно враховувати втрати (10 %) культуральної рідини під час одержання $0,1 \text{ м}^3$ інокуляту в посівному апараті, внаслідок краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря:

$$V_{\text{роб.2}} = V_{\text{пм1}} / (1 - E_{\text{ф}}) = 0,1 / 0,9 \approx 0,11 \text{ м}^3 \text{ або } 110 \text{ л}$$

Такий об'єм інокуляту з коефіцієнтом заповнення 0,5 можна отримати в посівному апараті об'ємом: $V_{\text{па2}} = 110 / 0,5 = 220 \text{ л}$. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{ст2}} = 200 \text{ л}$.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення: $K_{32} = 110 / 200 = 0,55$. Геометричний об'єм ферментера обрано правильно.

Кількість посівного матеріалу для посівного апарату становить 10 % від об'єму поживного середовища, отже, кількість поживного середовища становить:

$$V_{\text{пс2}} = V_{\text{роб.2}} / (1 + X_{\text{ф}}) = 0,11 / 1,1 = 0,1 \text{ м}^3,$$

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

Об'єм посівного матеріалу дорівнює:

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 110 - 100 = 10 \text{ л}$$

Необхідно враховувати втрати (10 %) культуральної рідини під час одержання 10 л інокуляту в посівному апараті, внаслідок краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря:

$$V_{\text{роб.3}} = V_{\text{пм2}} / (1 - E_{\text{ф}}) = 10 / 0,9 \approx 11 \text{ л}$$

Такий об'єм інокуляту з коефіцієнтом заповнення 0,5 можна отримати в посівному апараті об'ємом: $V_{\text{па3}} = 11 / 0,5 = 22 \text{ л}$. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{ст3}} = 20 \text{ л}$.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення: $K_{33} = 11 / 20 = 0,55$. Геометричний об'єм ферментера обрано правильно.

Кількість посівного матеріалу для посівного апарату становить 10 % від об'єму поживного середовища, отже, кількість поживного середовища становить:

$$V_{\text{пс3}} = V_{\text{роб.3}} / (1 + X_{\text{ф}}) = 11 / 1,1 = 10 \text{ л},$$

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

Об'єм посівного матеріалу дорівнює:

$$V_{\text{пм3}} = V_{\text{роб.3}} - V_{\text{пс3}} = 11 - 10 = 1 \text{ л}$$

Одержання посівного матеріалу $V_{\text{пм3}} = 1 \text{ л}$ для засіву інокулятора здійснюють в колбах на качалках ($V_{\text{колб}} = 750 \text{ мл}$, $K_3 = 0,2$)
Розраховуємо кількість колб:

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{пм3}} / (V_{\text{колб}} * K_{3к}) = 1000 / (750 * 0,2) = 6,6 \text{ колб} = 7 \text{ колб}$$

Отже, згідно розрахунків, для виробничого біосинтезу антибіотику цефалоспорину необхідно встановити ферментер для виробничого біосинтезу об'ємом $2,5 \text{ м}^3$, інокулятори об'ємами 200 л, 20 л, та 7 качалочних колб.

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

4.1. Шлях катаболізму ростового субстрату у продуцента цефалоспорину

Головним джерелом вуглецю для *Cephalosporium acremonium* W53.2.53. слугує глюкоза. У базі даних KEGG не наведена схема метаболізму глюкози для родової назви продуцента. Тому, взявши філогенетично-споріднений *Rhaeoacremonium minimum*, складаємо схему катаболізму глюкози [21].

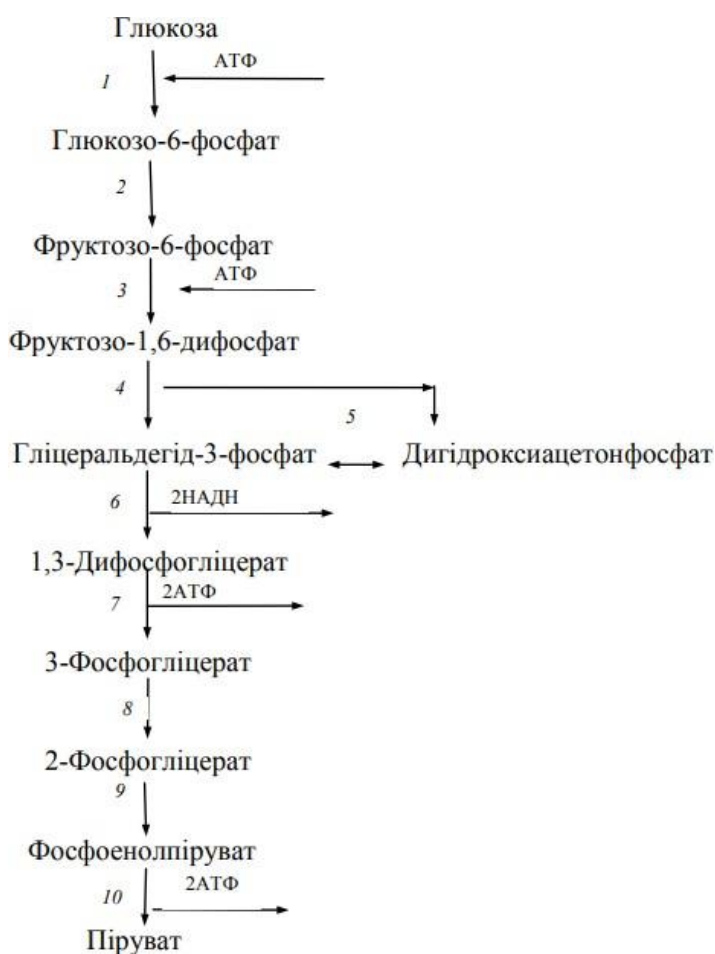


Рис. 4.1. Шлях катаболізму глюкози у *Rhaeoacremonium minimum*

					<i>НУХТ БТЕК 04.02.34 КР ПЗ</i>			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив	Муренко К.М.				<i>РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ</i>	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевірив	Воронцов О.О.						30	104
Н. Контр.					<i>Кафедра БТМ</i>			
Затверд.	Стадніков В.П.							

Ферменти: 1 – гексокіназа (КФ.2.7.1.1); 2 – глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ.5.3.1.9); 3 – фосфофруктокіназа (КФ.2.7.1.11); 4 – фруктозодифосфатальдоза (КФ.4.1.2.13); 5 – триозофосфатізомераза (КФ.5.3.1.1); 6 – гліцеральдегідфосфатдегідрогеназа (КФ.1.2.1.12); 7 – фосфогліцераткіназа (КФ.2.7.2.3); 8 – фосфогліцератфосфомутаза (КФ.5.4.2.12); 9 – енолаза (КФ.4.2.1.11); 10 – піруваткіназа (КФ.2.7.1.40).

Глюкоза може бути розщеплена шляхами гліколізу та трикарбонового циклу для отримання енергії та інших біомолекул, таких як амінокислоти та ліпіди. Спочатку глюкоза фосфорилується до глюкозо-6-фосфату за допомогою гексокінази (КФ.2.7.1.1) з використанням однієї молекули АТФ, далі під дією глюкозо-6-фосфатізомерази (КФ.5.3.1.9) із глюкози-6-фосфат утворюється фруктозо-6-фосфат, який перетворюється на фруктозо-1,6-дифосфат за участі фосфофруктокінази (КФ.2.7.1.11). Потім фермент фруктозодифосфатальдоза (КФ.4.1.2.13) каталізує розщеплення фруктозо-1,6-дифосфату на гліцеральдегід-3-фосфат та дигідроксиацетонфосфат, який за допомогою триозофосфатізомерази (КФ.5.3.1.1) перетворюється на гліцеральдегід-3-фосфат. Гліцеральдегід-3-фосфат окислюється до 1,3-Дифосфогліцерату за участі гліцеральдегідфосфатдегідрогенази (КФ.1.2.1.12) з вивільненням 2 молекули НАДН. 1,3-Дифосфогліцерат перетворюється під дією ферменту фосфогліцераткінази (КФ.2.7.2.3) на 3-Фосфогліцерат з утворенням 2 молекул АТФ. В подальшому 3-Фосфогліцерат перетворюється на 2-Фосфогліцерат за допомогою фосфогліцератфосфомутази (КФ.5.4.2.12). Енолаза (КФ.4.2.1.11) перетворює дану сполуку на фосфоенолпіруват, який під дією піруваткінази (КФ.2.7.1.40) утворює піруват, а він вже метаболізується в циклі трикарбонових кислот.

4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цефалоспорин С

В циклі трикарбонових кислот утворюється інтермедіат 2-оксоглутарат, з якого починається синтез цефалоспорину. За допомогою фермента

гомоцитратсинтаза (КФ. 2.3.3.14) з 2-оксоглутарата утворюється гомоцитрат, який в подальшому перетворюється на цис-гомоаконіт за участі гомоаконітази (КФ. 4.2.1.-). Далі фермент гомоаконітатгідратаза (КФ. 4.2.1.36) каталізує перетворення цис-гомоаконіту на гомоізоцитрат, а з нього утворюється 2-оксоадипат за допомогою гомоізоцитратдегідрогенази (КФ. 1.1.1.87). Потім фермент 2-аміноадипаттрансаміназа (КФ. 2.6.1.39) перетворює оксоадипат на L-2-аміноадипат, який, в свою чергу, при додаванні L-цистеїну, L-валіну та фермента N-(5-аміно-5-карбоксіпентаноїл)-L-цистеїніл-D-валін синтаза (КФ. 6.5.2.26) перетворюється на дельта-(L-2-аміноадипіл)-L-цистеїніл-D-валін. З цієї сполуки утворюється ізопеніцилін N за участі ізопеніцилін-N-синтаза (КФ. 1.21.3.1), який в подальшому перетворюється на пеніцилін N за допомогою ізопеніцилін-N-епімераза (КФ. 5.1.1.17). пеніцилін N метаболізується у деацетоксицефалоспорин C ферментом деацетоксицефалоспорин-C синтаза (КФ. 1.14.20.1), і далі деацетоксицефалоспорин-C гідроксилаза (КФ. 1.14.11.26) перетворює деацетоксицефалоспорин C на деацетилцефалоспорин C, з якого у кінцевому етапі утворюється цефалоспорин C за участі деацетилцефалоспорин-C ацетилтрансфераза (КФ. 2.3.1.175). Схема синтезу цефалоспорину C представлена на рис. 4.2

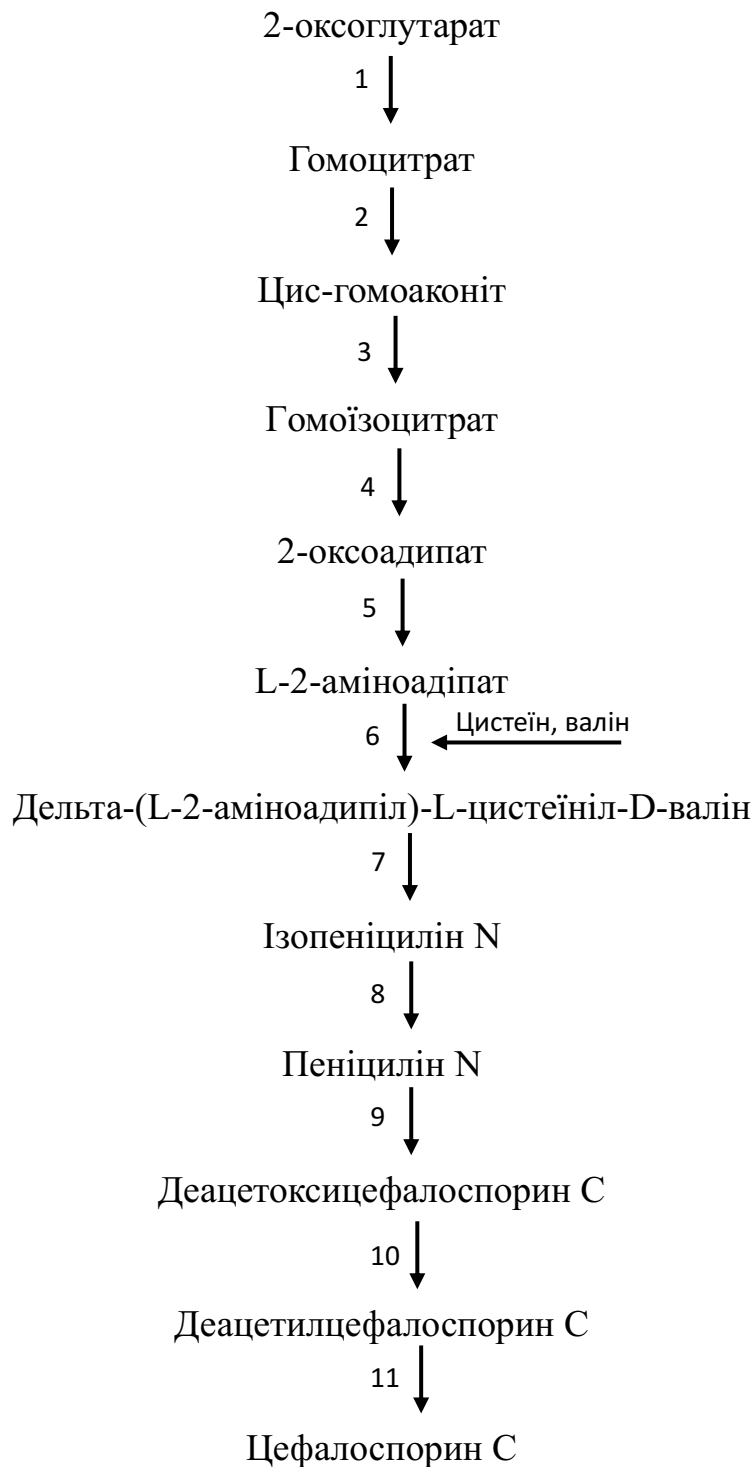


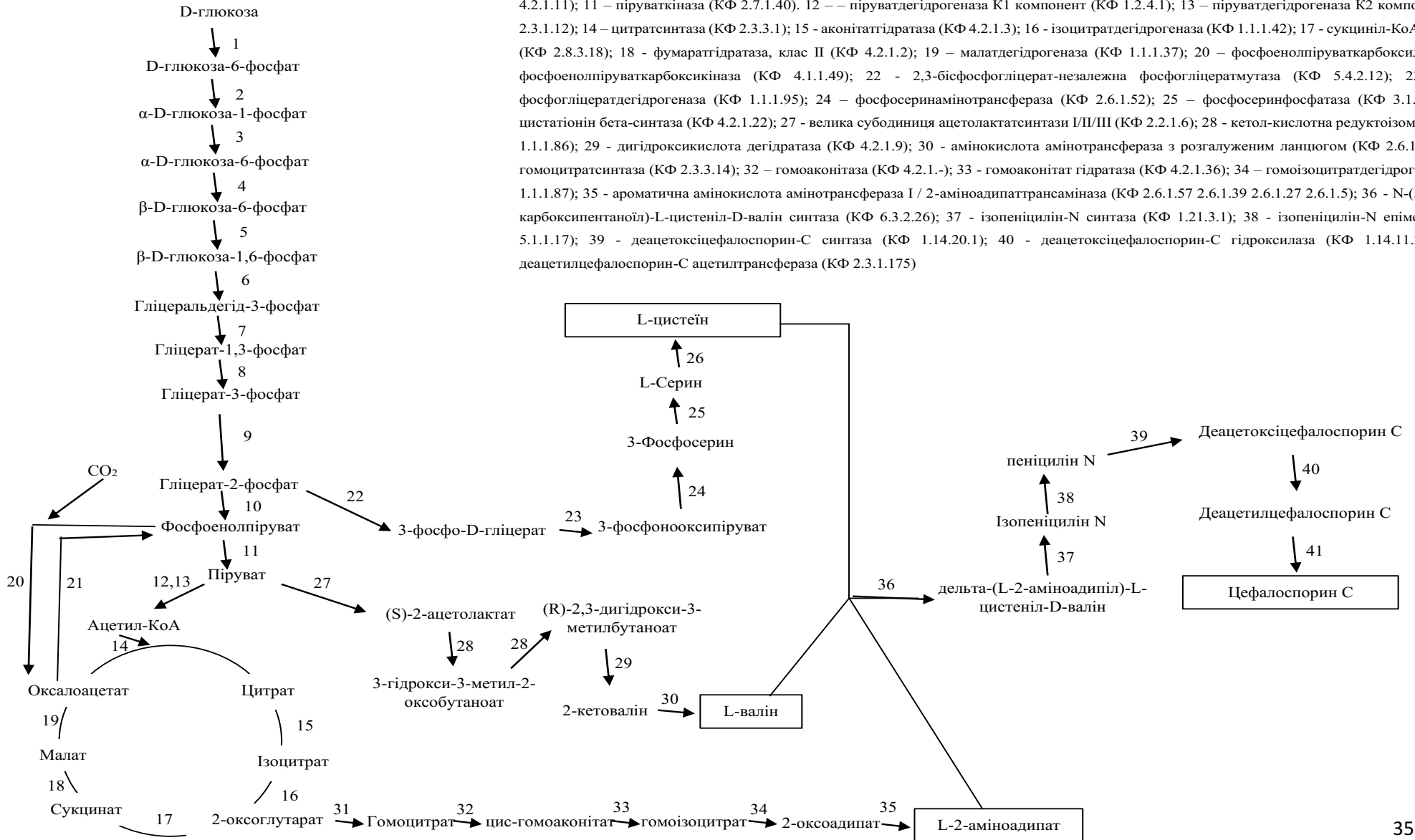
Рис. 4.2 Схемі біосинтезу цефалоспорину С з 2-оксоглутарату

Ферменти: 1 – гомоцитратсинтаза (КФ. 2.3.3.14); 2 – гомоаконітази (КФ. 4.2.1.-); 3 – гомоаконітатгідратаза (КФ. 4.2.1.36); 4 – гомоїзоцитратдегідрогенази (КФ. 1.1.1.87); 5 – 2-аміноадіпаттрансaminaза

(КФ. 2.6.1.39); 6 – N-(5-аміно-5-карбоксіпентаноїл)-L-цистеїніл-D-валін синтаза (КФ. 6.5.2.26); 7 – ізопеніцилін-N-синтаза (КФ. 1.21.3.1); 8 – ізопеніцилін-N-епімераза (КФ. 5.1.1.17) ; 9 – деацетоксицефалоспорин-С синтаза (КФ. 1.14.20.1); 10 – деацетоксицефалоспорин-С гідроксилаза (КФ. 1.14.11.26); 11 – деацетилцефалоспорин-С ацетилтрансфераза (КФ. 2.3.1.175

Схема біотрансформації ростового субстрату у кінцевий продукт

Ферменти: 1 – гексокіназа (КФ 2.7.1.1); 2 – фосфоглюкомутаза (КФ 5.4.2.2); 3 – фосфоглюкомутаза (КФ 5.4.2.2); 4 – глюкозо-6-фосфат ізомераза (КФ 5.3.1.9); 5 – 6-фосфофруктокіназа 1 (КФ 2.7.1.11); 6 – фруктозо-бісфосфат альдолаза (КФ 4.1.2.13); 7 – гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12); 8 – фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3); 9 – 2,3-бісфосфогліцерат-незалежна фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.12); 10 – енолаза (КФ 4.2.1.11); 11 – піруваткіназа (КФ 2.7.1.40). 12 – піруватдегідрогеназа K1 компонент (КФ 1.2.4.1); 13 – піруватдегідрогеназа K2 компонент (КФ 2.3.1.12); 14 – цитратсинтаза (КФ 2.3.3.1); 15 – аконітатгідратаза (КФ 4.2.1.3); 16 – ізоцитратдегідрогеназа (КФ 1.1.1.42); 17 – сукциніл-КоАгідролаза (КФ 2.8.3.18); 18 – фумаратгідратаза, клас II (КФ 4.2.1.2); 19 – малатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.37); 20 – фосфоенолпіруваткарбоксилаза; 21 – фосфоенолпіруваткарбоксикіназа (КФ 4.1.1.49); 22 – 2,3-бісфосфогліцерат-незалежна фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.12); 23 – D-3-фосфогліцератдегідрогеназа (КФ 1.1.1.95); 24 – фосфосеринамінотрансфераза (КФ 2.6.1.52); 25 – фосфосеринфосфатаза (КФ 3.1.3.3); 26 – цистатіонін бета-синтаза (КФ 4.2.1.22); 27 – велика субодиниця ацетолактатсинтази I/II/III (КФ 2.2.1.6); 28 – кетол-кислотна редуктоізомераза (КФ 1.1.1.86); 29 – дигідроксикислота дегідратаза (КФ 4.2.1.9); 30 – амінокислота амінотрансфераза з розгалуженим ланцюгом (КФ 2.6.1.42); 31 – гомоцитратсинтаза (КФ 2.3.3.14); 32 – гомоаконітаза (КФ 4.2.1.-); 33 – гомоаконітат гідратаза (КФ 4.2.1.36); 34 – гомоізоцитратдегідрогеназа (КФ 1.1.1.87); 35 – ароматична амінокислота амінотрансфераза I / 2-аміноадипаттрансаміназа (КФ 2.6.1.57 2.6.1.39 2.6.1.27 2.6.1.5); 36 – N-(5-аміно-5-карбоксипентаноїл)-L-цистеніл-D-валін синтаза (КФ 6.3.2.26); 37 – ізопеніцилін-N синтаза (КФ 1.21.3.1); 38 – ізопеніцилін-N епімераза (КФ 5.1.1.17); 39 – деацетоксіцефалоспорин-С синтаза (КФ 1.14.20.1); 40 – деацетоксіцефалоспорин-С гідроксилаза (КФ 1.14.11.26); 41 – деацетилцефалоспорин-С ацетилтрансфераза (КФ 2.3.1.175)



РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

5.1 . Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

5.1.1. Обґрунтування умов і способу культивування і типу ферментера

Продуцент *S. acremonium* строгий аероб, оптимальна температура росту становить 24-28 °С, а значення рН – 7. Оскільки, даний температурний режим та рН є сприятливий для розвитку мезофільних та нейтрофільних мікроорганізмів, то процес біосинтезу потрібно проводити виключно в асептичних умовах, для усунення ризику контамінації. Асептичні умови включають в себе: стерилізація парю ферментера, поживного середовища, аераційного повітря. Культивування мікроорганізмів буває поверхневе та глибинне. Обираємо глибинний спосіб, тому що він має суттєві переваги на поверхневим, а саме: не потребує громіздкого обладнання, простота його обслуговування, можливість автоматизації та механізації процесу. Так як, продуцент аероб, необхідна постійна подача стерильного аераційного повітря та наявність мішалки у ферментері. Існує два режими глибинного культивування: безперервне та періодичне. Оскільки, синтез антибіотику починається у стаціонарній фазі росту, обираємо періодичне культивування, також при періодичному способі культивування легше дотримуватись асептичних умов.

					<i>НУХТ БТЕК 04.02.34 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розробив</i>	<i>Муренко К.М.</i>						<i>36</i>	<i>104</i>
<i>Перевірив</i>	<i>Воронцов О.О.</i>							
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>	<i>Стабніков В.П.</i>							
						<i>Кафедра БТМ³⁶</i>		

Отже, культивування продуцента цефалоспориноу здійснюється періодично глибинним способом із забезпеченням постійної подачі аераційного повітря та дотриманням асептичних умов.

Залежно від фізіолого-біохімічних особливостей продуцента, слід обрати оптимальне обладнання для процесу біосинтезу.

1. Для забезпечення сталої температури ($\sim 27\text{ }^{\circ}\text{C}$) ферментер повинен мати датчики температурного контролю. При низьких температурах підтримка здійснюється за допомогою електро- або паропідігріву, при високих – охолодження через теплообмінник.

2. Для підтримання достатньої концентрації кисню, ферментер обладнують барботерами з можливістю контролю рівня pO_2 та лопатевими мішалками

3. Для запобігання утворення піни, використовуємо стерильний розчин піногасника, який подається у апарат за малої швидкості, коли рівень піни досягає відповідного рівня.

4. Для підтримання оптимального рН культуральної рідини, ферментер оснащують датчиком рН та корегують даний параметр за допомогою 6% розчину NaOH та 6% розчину HCl .

5.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря

Так як *S. acremonium* строгий аероб, в процесі біосинтезу необхідно забезпечити безперервну подачу стерильного аераційного повітря. Також стерильне повітря потрібно для перетискання рідин та культур мікроорганізмів з одного реактора в інший.

Повітря під час підготовки посівного матеріалу та інокуляту здійснюють у боксах, тому повітря там стерилізують за допомогою УФ-випромінювання.

Опромінення викликає зміну ділянок ДНК у геномі мікроорганізмів, що призводить до їх загибелі.

Підготовка повітря для інокуляторів та ферментерів здійснюють наступним чином:

- Забір атмосферного повітря у найвищій точці будівлі, оскільки концентрація мікроорганізмів з висотою зменшується;
- Очищення повітря від пилу та механічних часток за допомогою фільтрів попереднього очищення;
- Стиснення повітря у компресорі для досягнення необхідного тиску, при цьому підвищується вологість та температура повітря.
- Охолодження повітря за допомогою теплообмінника та видалення зайвої вологи за допомогою ресивера;
- Очищення повітря на головних фільтрах (E=95%)
- Очищення повітря на індивідуальних фільтрах, встановлених біля кожного ферментера, де повітря повністю звільняється від сторонньої мікрофлори (E=99,99%)

Для попереднього очищення повітря доцільно застосовувати фільтри касетного типу, які заповнені металевими стружками або іншими схожими матеріалами. Ступінь очищення складає приблизно 60%. Головні фільтри складаються з активованого вугілля та шарів скляної вати. Для остаточного позбавлення мікробіоти застосовують індивідуальних фільтр, який

встановлюється безпосередньо перед кожним ферментером. Матеріалом для фільтрування слугує тонка скловата, різні типи волокон з маленьким діаметром. Зазвичай стерилізують волокна водяною парою при температурі 120-130 °С і далі висушують [7].

5.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Підготовка поверхонь

Перша стадія санітарної підготовки виробництва цефалоспорину є надзвичайно важливою, оскільки вона визначає основні умови для доброякісного виробництва продукту. Ця стадія полягає у забезпеченні чистоти та гігієни приміщень виробництва.

Вологе прибирання поверхонь та обладнання є найпростішим та найефективнішим засобом забезпечення чистоти виробничих приміщень. Це дозволяє позбутися від забруднень та зменшити кількість мікроорганізмів на поверхнях. Для вологого прибирання можна використовувати звичайні мийні засоби для підлог, стін та інших поверхонь.

Для миття підлоги, стін можна використовувати миючий засіб «UNI-2». Згідно з інформацією від виробника, «UNI-2» призначений для миття стін, підлог, та інших поверхонь в різних виробничих приміщеннях, таких як заводи, склади, майстерні та інші. Він містить спеціальні поверхнево-активні речовини, які забезпечують його властивості очищення та дезінфекції.

Цей миючий засіб має нейтральний рівень рН, що робить його безпечним для використання на різних поверхнях, включаючи метал, пластик, кераміку та скло. UNI-2 добре видаляє органічні забруднення, такі як жир, білки та інші органічні речовини.

Перед використанням миючого засобу необхідно його добре збовтати. Потім розчинити його в воді відповідно до рекомендацій виробника та

рівномірно нанести на всю поверхню, яку потрібно очистити. Для нанесення розчину можна використовувати аерозольний розпил, щітки, губки або ганчірки.

Після нанесення миючого засобу на поверхню, його необхідно залишити на ній на певний час, щоб він міг відпрацювати. Час витримки залежить від типу забруднення та вказаний в інструкції виробника.

Після закінчення часу витримки необхідно ретельно ополоснути поверхню чистою водою, щоб забезпечити повну видалення миючого засобу та уникнути його накопичення на поверхні.

Для миття підлоги зазвичай використовують 10-50 мл миючого засобу на відро води, залежно від ступеня забруднення [23].

Однак, мийні засоби не забезпечують достатньої дезінфекції поверхонь, тому для забезпечення максимальної гігієни необхідно проводити щоденне дезінфікування поверхонь. Для дезінфікування можна використовувати розчини на основі хлораміну, перекис водню, амонію хлорид і т.д. Важливо дотримуватись інструкцій з використання засобів дезінфекції та забезпечити належне провітрювання приміщення після їх використання. Також необхідно кожні 3 місяці чергувати дезінфікувальні розчини, щоб унеможливити розвиток бактеріальної резистентності до відповідних речовин.

Як дезінфікувальний засіб у біотехнологічній промисловості може застосовуватись «Поліцид-НАТА». Він може бути використаний для дезінфекції поверхонь, обладнання, інструментів, підлоги, стін та інших елементів приміщень.

Для санітарної обробки приміщень рекомендується використовувати розчин «Поліцид-НАТА» у концентрації від 0,5% до 2%, залежно від рівня забруднення та вимог санітарних норм. Розчин може бути нанесений на поверхні

за допомогою розпилювача, мікрофібрової серветки або іншого зручного засобу. «Поліцид-НАТА» має широкий спектр дії та відносно безпечний для здоров'я людини, але перед застосуванням слід ознайомитись з інструкцією виробника та дотримуватись правил безпеки [24].

«Лізоформін плюс» - це дезінфікуючий розчин, який містить глютарову кислоту та кватернірні амонієві сполуки. Він відноситься до низькотоксичних дезінфікуючих засобів та дозволений для використання в біосинтезі цефалоспорину. Розчин Лізоформін плюс має широкий спектр дії проти грам-позитивних та грам-негативних бактерій, вірусів, грибків і протистів. Він може бути використаний для дезінфекції різних поверхонь, в тому числі для інструментів та обладнання, що використовуються в процесі біосинтезу цефалоспорину. Розчин Лізоформін плюс має високу ефективність при низьких концентраціях і не залишає залишків на поверхнях після висихання. Використовують його зазвичай після очищення поверхонь від бруду та органічних речовин.

Для максимальної ефективності рекомендується застосовувати засіб при температурі від +10°C до +25°C і при відносній вологості повітря не більше 80%. При використанні розчину потрібно дотримуватися заходів безпеки, таких як застосування рукавичок і окулярів. Також необхідно уникати контакту з очима та випадкового проковтування розчину [25].

Підготовка обладнання та інвентарю

Перед початком санітарної підготовки обладнання та інвентарю необхідно переконатися, що вони порожні та позбавлені від залишків продукту. Далі, обладнання та інвентар повинні бути ретельно вимиті теплою водою з миючим розчином, використовуючи спеціальні щітки для чищення.

Panpro 152 є ефективним миттєвим засобом, спеціально розробленим для використання під час біосинтезу цефалоспорину. Він має високу видалення забруднень, таких як залишки бактерій, білків, жирів, цукрів та інших органічних речовин, які можуть залишатися на обладнанні після процесу виробництва. PANPRO 152 також дезінфікує обладнання, знижуючи ризик забруднення виробленого цефалоспорину бактеріями або іншими мікроорганізмами. Концентрація робочого розчину становить 1,5-5 %. Можна використовувати як для ручного, так і для автоматичного миття.

Після миття необхідно ретельно змити обладнання та інвентар чистою водою, а потім піддати їх додатковій обробці дезінфікуючим засобом «Стериокс». Цей засіб призначений для дезінфекції технологічного обладнання, трубопроводів, резервуарів, інвентарю та інших поверхонь у приміщеннях. Також може бути використаний для обробки поверхонь з різних матеріалів, включаючи нержавіючу сталь, алюміній, скло та полімерні матеріали, такі як тефлон, полістирол, поліетилен, полікарбонат та поліуретан. Для дезінфекції можуть використовуватися різні методи, такі як протирання, зрошення, замочування, занурення, заповнення, циркуляційний (CIP-мийка) та аерозольний способи. Для проведення дезінфекції рекомендується використовувати розчини кімнатної або підвищеної температури з початковою температурою 50 ± 2 °C. Дотримання інструкції з використання засобу гарантує ефективність дезінфекції.

Після дезінфекції обладнання та інвентарю повинні бути промиті чистою водою та просушені. При цьому необхідно пам'ятати про забезпечення повної сухості обладнання та інвентарю, оскільки залишки вологи можуть сприяти розвитку бактерій та грибків [26].

Виробництво цефалоспорину здійснюється протягом 330 днів. Необхідно розрахувати кількість миючих та дезінфікувальних засобів для підготовки

приміщень та обладнання. У виробничих приміщеннях встановлене таке обладнання: ферментер об'ємом 2,5 м³, інокулятори об'ємом 200, 20 л, реактори-змішувачі для підготовки та стерилізації поживного середовища. Прийmemo, що загальний об'єм обладнання для підготовки посівного матеріалу та виробничого біосинтезу становить близько 5,3 м³.

Кількість виробничих циклів для біосинтезу антибіотика цефалоспорину складає 46. Миття обладнання відбувається після кожного виробничого циклу, тому кількість циклів миття дорівнює 47, включаючи останнє миття. Відповідно, загальний об'єм для миття становитиме:

$$5,3 \text{ м}^3 * 47 = 249 \text{ м}^3$$

Миття обладнання будемо традиційним ручним методом. Для цього необхідно витратити близько 50 % миючого засобу від об'єму апарату. Якщо загальний об'єм становить 249 м³, то 50 % це 125 м³. Тому треба витратити 125 000 л мийно-дезінфікуючого розчину.

Для забезпечення чистоти виробничих зон підлога та виробничі поверхні миються та дезінфікуються раз на день перед початком. Тому за 330 днів роботи поточне прибирання проводиться 330 разів. Генеральне прибирання (миття стін, дверей, вікон) проводимо після кожного виробничого циклу, тобто 47 разів, включаючи заключне. Загальна площа приміщень для виробничого біосинтезу та підготовки посівного матеріалу становить приблизно 12*6= 72 м². Висоту стін беремо 6 м, але враховуємо, що миття стін проводять на висоті 2 м від підлоги. Тому для загальна площа стін для миття становить:

$$((12*2)+(6*2))*2 = 72 \text{ м}^2$$

Візьmemo до уваги, що витрати миючих та дезінфікуючих робочих розчинів становлять близько 100 мл на 1 м² поверхні. Для миття та дезінфекції підлоги (72

м²) знадобиться $72 \text{ м}^2 * 100 \text{ мл} = 7,2 \text{ л}$ засобу на одне прибирання. Тому для 330 разів необхідно $330 * 7,2 = 2376 \text{ л}$

Аналогічно розраховуємо витрати розчинів для генерального прибирання.

На одне генеральне прибирання необхідно $72 \text{ м}^2 * 100 \text{ мл} = 7,2 \text{ л}$ розчину.
На весь період виробництва потрібно $7,2 * 47 = 338 \text{ л}$.

Узагальнена дані щодо розрахунку площі для миття та/або дезінфекції за весь період виробництва цефалоспорину наведені в табл. 5.1

**Узагальнена характеристика витрат мийних та дезінфікувальних засобів для виробництва
цефалоспорину**

Таблиця 5.1

Назва мийного/дезінфікуючого засобу (діюча речовина)	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Концентрація робочого розчину, %	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м ² (м ³)	Кількість робочого розчину за весь період виробництва, л	Вартість 1 л/кг мийного або дезінфікувального розчину, грн	Вартість 1 л робочого розчину, грн	Загальна вартість миття та/або дезінфекції за весь період виробництва, грн
UNI-2 ¹ (неіоногенні ПАВ)	Стіни, підлога, вікна, двері	0,5	23760	2714	73,7	0,37	1004,2
Поліцид-НАТА ² (Полігексаметиленгуанідину гідрохлорид)	Стіни, підлога, вікна, двері	1	23760	2714	414	4,14	11235,9
Лізоформін плюс ³ (комплекс гуанідинів+ЧАС)	Стіни, підлога, вікна, двері	2	23760	2714	300	6	16284
Rappro 152 ⁴ (ПАВ)	Обладнання та інвентар	3	249	125000	44,8	1,34	167500
Стериокс ⁵ (надоцтова кислота)	Обладнання та інвентар	0,01	249	125000	125	0,012	1562

Примітка: ціни станом на 5.05.2023р:

1- <https://primaterra.ua/ua/p344505423-nejtralnoe-pennoe-moyuschee.html>

2- <https://medshop.com.ua/sterilizaciya-dezinfekciya/sredstva-dlya-dezinfektsii/nesoderzhaschie-hlora-i-aldegidov/poli%D1%81ide-nata-1-litr.html>

- 3- <https://prom.ua/ua/p1293315882-lizoformin-plyus-pena.html>
- 4- <https://stbz.prom.ua/ua/p420326182-miyuchij-zasib-dlya.html>
- 5- <https://interdez.com.ua/product/sterioks-baltiachemi-kiev>

5.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища Розрахунок підживлюваного розчину глюкози.

Сумарна концентрація глюкози у середовищі для культивування продуцента цефалоспорину складає 211 г/л. На початку вносять 11 г/л, тому в процесі культивування необхідно внести глюкозу у вигляді підживлюваного розчину $211 - 11 = 200$ г/л.

Розраховуємо загальну кількість глюкози (X) для приготування підживлюваного розчину. Об'єм поживного середовища для біосинтезу становить $1,1 \text{ м}^3$. Отже:

200 г глюкози міститься в 1 л середовища

X г глюкози міститься в 1100 л середовища

$$X = (200 \cdot 1100) / 1 = 220\,000 \text{ г} = 220 \text{ кг глюкози.}$$

Рахуємо об'єм 40 %-го підживлюваного розчину (V), що містить 220 кг глюкози:

40 кг глюкози міститься в $0,1 \text{ м}^3$ розчину

220 кг глюкози міститься в V м^3 розчину

$$V = (220 \cdot 0,1) / 40 = 0,55 \text{ м}^3 (550 \text{ л}) \text{ розчину.}$$

Підготовка та стерилізація здійснюється в окремому реакторі дробними порціями за температури $112 \text{ }^\circ\text{C}$, 30 хв.

Розраховуємо кількість порцій підживлення та об'єм глюкози для однієї порції. Тривалість культивування 150 год. Припустимо, що підживлення вноситься кожні 10 год. Отже, кількість порцій складає $(150-20)/10=13$. Тому, з кожною порцією підживлення необхідно внести $550/13= 42,3$ л 40 %-го

підживлюваного розчину глюкози. Стерильність розчину зберігається протягом 24 годин, тому можемо стерилізувати добову дозу підживлення, тобто 84,6 л

Біосинтез антибіотика цефалоспорину здійснюється в ферментері об'ємом 2,5 м³, що містить 1,1 м³ поживного середовища. Підготовка інокуляту відбувається в три етапи: у колбах на качалці, в інокуляторах об'ємом 20 л та 200 л

Для біосинтезу *C. acremonium* W53.2.53 використовується середовище наступного складу (г/л):

- Арахісове борошно – 100;
- CH₃COONH₄ – 6;
- Метилолеат – 3;
- DL-метіонін – 3;
- Моногідрат глюкози – 11;
- CaSO₄·2H₂O – 2,5;
- CaCO₃ – 5;
- MgSO₄·7H₂O – 2,5;

Стерилізують усі компоненти поживного середовища. Також необхідно приготувати розчини для корегування рН (6 %-й розчин соляної кислоти та 6 %-й розчин гідроксиду натрію). Корегувальні розчини готують окремо в реакторах-змішувачах та стерилізують гострою парою при 131 °С протягом 40 хвилин.

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

Стерилізацію середовища будемо проводити в автоклаві, поділивши склад на такі композиції:

Композиція А: моногідрат глюкози 40%-й розчин (режим стерилізації 112 °С, 30 хв)

Композиція Б: арахісове борошно, метилолеат, метіонін, $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, (режим стерилізації 112 °С, 25 хв)

Композиція В: CaSO_4 , MgSO_4 (режим стерилізації 131, °С 40 хв)

Композиція Г: CaCO_3 (режим стерилізації 131, °С 40 хв)

Глюкоза, борошно, метилолеат, метіонін та ацетат амонію стерилізують при м'яких умовах, оскільки вони є термолабільними. Арахісове борошно спочатку заварюють на водяній бані при 70 °С, 20 хв потім стерилізують. Солі потребують біль жорстких умов стерилізації, а саме 131 °С протягом 40 хв.

Розрахунок компонентів для приготування середовища у колбах на качалках представлений у табл. 5.2:

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці

Таблиця 5.2

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 1 л середовища	Композиція	Об'єм композиції, V, мл
Глюкоза	11	11 г	А	86
Вода		75 мл		
Арахісове борошно	100	100 г	Б	840
Метилолеат	3	3 г		
Метіонін	3	3 г		
CH ₃ COONH ₄	6	6 г		
Вода		728 мл		
CaSO ₄	2,5	2,5 г	В	37
MgSO ₄	2,5	2,5 г		
Вода		32 мл		
CaCO ₃	5	5 г	Г	37
Вода		32 мл		
РАЗОМ				1000 мл

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

Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 20 л

Для цього необхідно 10 л поживного середовища, склад композиції та умови стерилізації аналогічні, як і в попередньому випадку. Композицію А стерилізують в автоклаві. Композицію Б стерилізують в інокуляторі, але для початку борошно заварюють в окремому реакторі-змішувачі. Композицію В та Г також готують та стерилізують в автоклаві та додають до посівного апарата.

Розрахунок компонентів для приготування середовища в інокуляторі об'ємом 20 л представлений у табл. 5.3:

Таблиця 5.3

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 10 л середовища	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	11	110 г	А	0,86
Вода		750 мл		
Конденсат		-		
Арахісове борошно	100	1000 г	Б	8,4
Метилолеат	3	30 г		
Метіонін	3	30 г		
CH ₃ COONH ₄	6	60 г		
Вода		6440 мл		
Конденсат		840 мл		
CaSO ₄	2,5	25 г	В	0,37
MgSO ₄	2,5	25 г		
Вода		320 мл		
Конденсат		-		

CaCO ₃	5	50 г	Г	0,37
Вода		320 мл		
Конденсат		-		
РАЗОМ				10

Закінчення табл. 5.3

Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 200 л

Для цього необхідно 100 л поживного середовища, склад композиції та умови стерилізації аналогічні, як і в попередньому випадку. Композицію А стерилізують в реакторі-змішувачі. Композицію Б стерилізують в інокуляторі, але для початку борошно заварюють в окремому реакторі-змішувачі. Композицію В та Г також готують та стерилізують в реакторі-змішувачі та додають до посівного апарата.

Розрахунок компонентів для приготування середовища в інокуляторі об'ємом 200 л представлений у табл. 5.4:

Таблиця 5.4

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 100 л середовища	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	11	1,1 кг	А	8,6
Вода		6,64 л		
Конденсат		0,86 л		
Арахісове борошно	100	10 кг	Б	84
Метилолеат	3	0,3 кг		

Метіонін	3	0,3 кг		
CH ₃ COONH ₄	6	0,6 кг		
Вода		64,4		
Конденсат		8,4		
CaSO ₄	2,5	0,25 кг	В	4,4
MgSO ₄	2,5	0,25 кг		
Вода		3,46 л		
Конденсат		0,44 л		
CaCO ₃	5	0,5 кг	Г	4,4
Вода		3,46 л		
Конденсат		0,44 л		
РАЗОМ				100

Закінчення табл. 5.4

Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 2,5 м³

Для цієї стадії необхідно 1,1 м³ поживного середовища. Композицію А стерилізують в реакторі-змішувачі. Композицію Б стерилізують в ферментері, але для початку борошно заварюють в окремому реакторі-змішувачі. Композицію В та Г також готують та стерилізують в реакторі-змішувачі та додають до ферментера.

Повний об'єм поживного середовища становить 1,1 м³. З нього початковий об'єм ПС складає 0,55 м³, а 0,55 м³ – підживлюваний розчин глюкози. Підживлюваний розчин готують та стерилізують окремому реакторі дробними порціями. Стерилізація проводиться гострою парою при температурі 112 °С протягом 25 хв. Потім кожні 10 годин вносять у встановлений мірник біля ферментера, у кількості 42,3 л, з подальшим перекачуванням у ферментер.

Підживлювальний розчин глюкози:

У процесі біосинтезу є необхідність внесення 0,55 м³ підживлюваного розчину глюкози 13-ма порціями у кількості 42,3 л кожні 10 годин. Так як, глюкоза зберігає свою стерильність протягом 24 годин, доцільно готувати та стерилізувати одразу дві порції та по чергово вносити у виробничий ферментер.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 2,5 м³ наведений у табл. 5.5:

Таблиця 5.5

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 1,1 м³ середовища	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	11	12,1 кг	А	94,6
Вода		73 л		
Конденсат		9,46 л		
Арахісове борошно	100	110 кг	Б	924
Метилолеат	3	3,3 кг		
Метіонін	3	3,3 кг		
CH ₃ COONH ₄	6	6,6 кг		
Вода		708,4 л		
Конденсат		92,4		
CaSO ₄	2,5	2,75 кг	В	40,7
MgSO ₄	2,5	2,75 кг		

Вода		31,1 л		
Конденсат		4,07 л		
CaCO ₃	5	5,5 кг		
Вода		31,1 л	Г	40,7
Конденсат		4,07 л		
РАЗОМ				1100

Закінчення табл. 5.5

Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН та піногасника

Так як процес біосинтезу супроводжується піноутворенням, оскільки процес аеробний та містяться піноутворювальні речовини (арахісове борошно), з'являється необхідність у використанні піногасників. Будемо використовувати механічний спосіб піногасіння, оскільки у складі поживного середовища ми маємо лише один піноутворювальний компонент, тому даний спосіб є доцільним та ефективним. Механічний піногасник включає в себе робочий орган, який встановлюється на обладнанні та руйнує пухирці повітря при контакті з ним.

Також є необхідність підтримання рН на рівні 7.0, оскільки наш продуцент є нейтрофілом. Використовуємо 6 %-й розчин гідроксиду натрію та 6 %-й розчин соляної кислоти.

5.2 . Основні етапи післяферментаційного виділення, концентрування та очищення цільового продукту.

Після успішного біосинтезу цефалоспорину в поживному середовищі, наступним кроком в процесі його виробництва є виділення, концентрування та очищення. Ці етапи є важливими для отримання чистого, стабільного та високоякісного продукту цефалоспорину, який може використовуватись в фармацевтичній промисловості.

Так як, цефалоспорин це вторинний метаболіт, отже він утворюється поза клітиною, тому для початку нам необхідно відокремити міцелій від супернатанту. Існують декілька можливих способів, таких як: фільтрація, центрифугування, флоатація. Зазвичай флоатацію використовують для виділення біомаси кормових дріжджів, шляхом спінювання. Тому будемо обирати серед метод фільтрації або центрифугування. Обидва методи - фільтрація та центрифугування - мають свої переваги та обмеження, важливо враховувати різні фактори. Такі як: тип культури, її щільність, компоненти поживного середовища та його об'єм.

Центрифугування – це швидкий метод відокремлення біомаси від супернатанту, але потребує використання спеціального обладнання, яке може бути більш вартісним, порівняно з методом фільтрації. Серед переваг методу центрифугування, можна виділити можливість обробки великого обсягу культуральної рідини та продуктивність.

Фільтрація є широко використовуваним методом для відокремлення біомаси від супернатанту. Вона може бути ефективною для видалення клітин та інших твердих частинок з рідини. Фільтрація зазвичай використовується, коли потрібно відокремити більші фракції біомаси, такі як клітини чи клаптики. Використання відповідних фільтрів дозволяє контролювати розмір пор, що допомагає утримувати біомасу та пропускати супернатант. Але варто враховувати, що у складі поживного середовища для біосинтезу цефалоспорину міститься арахісове борошно, яке значно сповільнює процес фільтрації та потребує постійного очищення фільтрів або їх заміни. Тому для інтенсифікації процесу фільтрації можна попередньо обробити рідину коагулянтами. Після закінчення ферментації, культуральну рідину перекачують за допомогою стисненого повітря у коагулятор, де її обробляють насиченим водним розчином

алюмокальцієвих квасцов та перемішують протягом години. Після даного етапу культуральну рідину подають на фільтрування.

Для відокремлення міцелію від супернатанту можна використати барабанний-вакуум фільтр, що забезпечує безперервне фільтрування зовнішньої поверхні. Ці фільтри мають високу автоматизацію і дозволяють проводити фільтрацію різних суспензій з постійною швидкістю. Вони складаються з барабана, який занурений у резервуар, де постійно надходить культуральна рідина. Поверхня барабана має перфорації і покрита фільтруючою тканиною [27].

Наступним етапом є очищення супернатанту, що допомагає зменшити обсяг розчину та збільшити концентрацію цефалоспорину. Після відділення міцелію в супернатанті залишається розчин з 3-6% сухих речовин, де 30-40% складають мінеральні речовини і 15-30% - цефалоспорин. Крім того, розчин містить 50-200 мг білка на 100 г розчину, а іноді навіть до 700 мг білка. Це ускладнює процес виділення цефалоспорину, оскільки потрібно видалити білкові домішки. Для виділення та хімічного очищення цефалоспорину можна використовувати різні методи: екстракції, осадження, іонообмінний метод [28].

Іонообмінний метод виділення та очищення антибіотиків, включаючи цефалоспорини, набув широкого застосування в біосинтезі через його численні переваги. Особливо в останні роки, цей метод став популярним при отриманні різних лікарських препаратів.

Основна перевага іонообмінного методу полягає в тому, що він уникає використання токсичних і вибухонебезпечних розчинників. Цей метод також є економічно вигідним, оскільки його технологія проста і не потребує дорогого устаткування та сировини.

У процесі іонообмінного методу антибіотики екстрагують з нативного розчину за допомогою іонообмінних колон, які містять спеціальні іоніти.

Антибіотики сорбуються на іонітах, після чого проводиться їх десорбція за допомогою аміачно-боратного буферного розчину.

Цей метод має кілька переваг з точки зору гігієни. Він уникне необхідності ручної роботи з осадами, що знижує контакт працівників з концентрованими розчинами та осадами антибіотиків. Крім того, використання токсичних органічних розчинників не потрібне при застосуванні цього методу.

Отже, іонообмінний метод є ефективним і безпечним способом виділення та очищення антибіотиків, включаючи цефалоспорини, від біомаси та інших домішок, що з'являються після процесу біосинтезу [29].

Після виділення та очищення цефалоспорину він піддається концентруванню та висушуванню. Для концентрування використовують такі методи: випарювання, рідинна екстракція, діаліз або ультрафільтрація та зворотній осмос.

Якщо взяти до уваги метод екстракції, то тут можна виділити значні недоліки: дорога вартість екстрагентів та обладнання для проведення цього процесу. Так як, цефалоспорин термолабільна речовина, метод випарювання використовувати не зовсім доцільно, оскільки спочатку необхідно експериментальним шляхом підібрати температурний режим для випарювання, а потім постійно підтримувати температурні межі на заданому рівні.

Ультрафільтрація має ряд переваг порівняно з вищеописаними методами: простота апаратурного обладнання, відсутність температурного, хімічного та механічного впливу на продукт, низькі енергетичні затрати.

Після концентрування цефалоспорину його необхідно висушити, тобто виділити вільну і зв'язану воду. Цей процес є важливим етапом, оскільки саме від нього залежить якість кінцевого продукту. Цефалоспорини є термолабільними

речовинами, тому в умовах підвищених температур вони розкладаються та втрачають свою біологічну активність. Для попередження цього, доцільно використовувати сублімаційну сушку. При даному методі випаровування води відбувається при низькому тиску, коли лід переходить з твердого стану безпосередньо в газоподібний, минаючи рідкий. Під впливом низького тиску та додаткової нагрівання лід випаровується безпосередньо з твердого стану, залишаючи сухий залишок цефалоспорину [27].

Для отримання більш однорідної та меленої форми висушений цефалоспорин подрібнюють та просіюють. Як приклад, можна використати молотковий млин для подрібнення, в якому сировина завантажується через жолоб та потрапляє між ротором та спеціальними молотками. При обертанні ротору, молотки ударяються об матеріал, тим самим, подрібнюючи його. Подрібнений цефалоспорин проходить через сито, яке розташовується на виході з млина, а більш великі часточки повторно подрібнюються [30].

Після подрібнення цефалоспорину його необхідно просіяти для отримання часточок однакового розміру. Для цього використовують просівальні машини або сита. Вібраційна просівальна машина розділяє твердий матеріал за розмірами часточок за допомогою вібрації. Коливання від вібрації передаються на сито та під їх дією цефалоспорин починає рухатись. Більш дрібні частинки проходять через сито і потрапляють в нижню частину та надходять на стадію пакування та маркування [31].

5.3 . Пропозиції щодо підбору обладнання для реалізації післяферментаційних процесів.

Таблиця 5.6

№	Найменування	Технічна характеристика
1	Барабанний-вакуум фільтр	Фільтруюча поверхня: 2,5 м ² . Продуктивність: 5000 л/год. Потужність насоса: 1,5 кВт. Потужність барабану: 0,5 кВт. Розміри: 1630x1670x1650 мм [32].
2	Іонообмінна смола	Назва: Amberlite XAD-4. Опис: порошок білого кольору. Властивості: має високу поверхневу активність та поглинаючу здатність, який застосовується для очистки розчинів від органічних речовин [33].
3	Ультрафільтраційна установка	Alfa Laval Membrane-UF 2. Час роботи: 12-20 год/день. Кількість модулів: 6. Робочий тиск: 2-4 бар. Розміри: 4,5x4,5x2,5 м. Фільтрувальна мембрана: поліамід [34].
4	Сублімаційна сушарка	Сублімаційна сушарка. Модель СС-1.2. Площа полиць: 1,2 м ² . Температура: -40 °С. Тривалість циклу: 24-48 год. Потужність: 9 кВт/год [35].
5	Молотковий млин	Молоткових млин CFSJ-8. Продуктивність: 10-100 кг/год. Потужність двигуна: 3 кВт. Регульована швидкість: 2350-4360 об/хв. Розміри: 1050x600x1600 мм [36].
6	Вібраційна просівальна машина	Вібраційна просівальна машина Retsch AS 200. Розмір сит: 20 мкм – 25 мм. Макс ємність партії: 3 кг. Діаметр сита: 100/200 мм. Розміри: 417x212x384 мм [37].

РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ

Таблиця 6.1

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
ПЗ-1	Повітрозабірник	1	Даховий повітрозабірник круглий z1-400 zs (Україна). Продуктивність: 2600 м ³ /год. Матеріал: оцинкована сталь [38].
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр повітряний волокнистий. Виробник: «ВЕНТ-ФІЛЬТР». Фільтрувальний матеріал: поліестер; продуктивність: 2262 м ³ /год; E=90%; розміри, мм: 630x500x48 [39].
К-3	Компресор	1	Маслозаповнений гвинтовий компресор «Crownwell CWD315A» (Україна). Продуктивність: 3060 м ³ /год; робочий тиск: 7-13 бар; розміри, мм: 3150x1980x2150 [40].
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Водяний охолоджувач повітря ВЕНТС ОКВ 800x500-3. Робочий тиск: 1,6 МПа; розміри, мм: 800x500 [41].
Р-5	Ресивер	1	Ресивер («Ремеза», Білорусь). Об'єм 500 л; максимальний тиск: 1,6 МПа; розміри, мм: 650 x 650x1750 [42].
Т-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Водяний нагрівач повітря ВЕНТС НКВ 400x200-2. Робочий тиск: 1,6 МПа; Температура води 100 °С; розміри, мм: 400x200x200 [43].

НУХТ БТЕК 04.02.34 КР ПЗ

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
Розробив				
Перевірив				
Н. Контр.				
Затверд.				

Розробив	Муценка К.М.			
Перевірив	Воронцов О.О.			
Н. Контр.				
Затверд.	Стабніков В.П.			

РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ
ОБЛАДНАННЯ
ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ
ТА ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ

Літ.	Арк.	Аркушів
	60	104

Кафедра БТМ⁶¹

1	2	3	4
Ф-7	Головний фільтр очистки	1	Панельний повітряний фільтр «Alter Air», Україна. Фільтрувальний матеріал: скловолокно, E>95%. Розміри, мм: 287x287 мм [44].
Д-8	Дозатор об'ємний	1	Дозатор об'ємний GCG-A напівавтоматичний. Матеріал: нержавіюча сталь. Діапазон дозування: 100-1000 мл. Продуктивність, доз/год: 600-1500. Розміри: 990x250x650 мм [45].
Р-9 Р-11	Реактор-змішувач (6% HCl) Реактор-змішувач (6% NaOH)	2	Об'єм апарату: 10 л. Виробник: «Стройторгсервис» (Україна). Матеріал: сталь AISI 316L. Робочий тиск: -0,7-3 бар. Обладнаний лопатевою мішалкою, містить датчик ваги, температури та тиску [46].
Д-10 Д-12 Д-17 Д-21 Д-23	Дозатор ваговий	5	Дозатор ваговий FOYER FL-500. Матеріал: нержавіюча сталь. Діапазон дозування: 1-500 г. Продуктивність, доз/год: 30-1500. Розміри: 430x420x580 мм [47].
Р-13 Р-18	Реактор-змішувач об'ємом 15 л	2	Реактор-змішувач РС-15. Об'єм: 15 л. Матеріал: сталь AISI 316L. Робочий тиск: -0,7-3 бар. Обладнаний лопатевою мішалкою [48].

1	2	3	4
I-16	Інокулятор об'ємом 20 л	1	Об'єм апарату: 20 л. Матеріал: сталь AISI 316L. Обладнаний датчиком рН, рО, температури, рівень піни, тиску. Містить мішалку з регульованою швидкістю обертання 150-300 об/хв та барботер. Використовується мембранний фільтрувальний картридж для очистки аераційного повітря (0,2 мкм) [49].
Д-19 Д-27 Д-29	Дозатор ваговий	3	Дозатор ваговий FOYER FZ-999. Матеріал: нержавіюча сталь. Діапазон дозування: 100-2500 г. Продуктивність, доз/год: 60-600. Розміри: 400x300x9600 [50].
P-20	Реактор-змішувач об'ємом 100 л	1	Реактор-змішувач ROMM-100WJ EH. Об'єм: 100 л. Матеріал: сталь AISI 316L. Робоча температура: -20-300 °С. Робочий тиск: атмосферний. Розміри: 820x850x1860 мм [51].
P-22 P-24	Реактор-змішувач об'ємом 5л	2	Об'єм апарату: 5 л. Виробник: «Стройторгсервис» (Україна). Матеріал: сталь AISI 316L. Робочий тиск: -0,7-3 бар. Обладнаний лопатевою мішалкою, містить датчик ваги, температури та тиску [46].

1	2	3	4
I-26	Інокулятор об'ємом 200 л	1	Інокулятор SiDoLim SDS об'ємом 200 л. Матеріал корпусу: нержавіюча сталь; містить мішалку з регульованою швидкістю перемішування 50-1000 об/хв, датчик рН, O ₂ , температури, манометр, барботер, застосовується картриджний абсолютний фільтр складчастого типу 0,2 мкм. Розміри, мм: висота 1055, діаметр 500 [52].
P-28 P-30	Реактор-змішувач об'ємом 50 л	2	Об'єм апарату: 50 л. Виробник: «Стройторгсервис» (Україна). Матеріал: сталь AISI 316L. Робочий тиск: -0,7-3 бар. Обладнаний лопатевою мішалкою, містить датчик ваги, температури та тиску [46].
Д-31 Д-34 Д-38	Дозатор ваговий	3	Дозатор ваговий FOYER FL-5000-II. Матеріал: нержавіюча сталь. Діапазон дозування: 10-10000 г. Продуктивність, доз/год: 600-1200. Розміри: 640x650x1570 мм [53].
P-32	Реактор-змішувач об'ємом 2 м ³	1	Об'єм апарату: 2 м ³ . Виробник: «Стройторгсервис» (Україна). Матеріал: сталь AISI 316L. Робочий тиск: -0,7-3 бар. Обладнаний лопатевою мішалкою, містить датчик ваги, температури та тиску. [46]

1	2	3	4
Н-33 Н-40	Насос відцентровий	2	Насос відцентровий М-70 РЛ. Продуктивність: 2,4 м ³ /год. Потужність: 0,55 кВт [54].
Р-35	Реактор-змішувач об'ємом 150 л	1	Об'єм апарату: 150 л. Виробник: «Стройторгсервис» (Україна). Матеріал: сталь AISI 316L. Робочий тиск: -0,7-3 бар. Обладнаний лопатевою мішалкою, містить датчик ваги, температури та тиску. [46].
ФР-37	Ферментер для виробничого біосинтезу об'ємом 2,5 м ³	1	Об'єм апарату: 2,5 м ³ . Матеріал: сталь AISI 316L. Обладнаний датчиком рН, рО, температури, рівень піни, тиску. Містить мішалку з регульованою швидкістю обертання 150-300 об/хв та баоботер. Використовується мембранний фільтрувальний картридж для очистки аераційного повітря (0,2 мкм). [49].
Р-39	Реактор змішувач об'ємом 100 л	1	Об'єм апарату: 100 л. Виробник: «Стройторгсервис» (Україна). Матеріал: сталь AISI 316L. Робочий тиск: -0,7-3 бар. Обладнаний лопатевою мішалкою, містить датчик ваги, температури та тиску. [46].

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ.

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1. Підготовка персоналу

ДР 1.1.1. Навчання персоналу

Дотримання правил особистої гігієни та правил поведінки під час технологічного процесу. Набуття практичних та теоретичних навичок.

ДР 1.1.2. Контроль знань

Проведення контролю знань для персоналу у формі усного опитування або тестування.

ДР 1.2. Приготування миючих та дезінфікуючих засобів.

ДР 1.2.1. Приготування розчину «Поліцид-НАТА».

Готують робочий розчин «Поліцид-НАТА» концентрації 1 %.

ДР 1.2.2. Приготування розчину «Стериокс».

Готують розчин «Стериокс» концентрації 0,01%.

ДР 1.2.3. Підготовка миючого розчину «UNI-2».

ДР 1.3. Підготовка приміщень.

ДР 1.3.1. Щоденне прибирання.

Під час щоденного прибирання підлоги та виробничих поверхонь використовують робочий миючий розчин «UNI-2» та дезінфікуючий розчин

					<i>НУХТ БТЕК 04.02.34 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розробив</i>		<i>Муренко К.М.</i>			<i>РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Перевірів</i>		<i>Воронцов О.О.</i>					66	104
<i>Н. Контр.</i>					<i>Кафедра БТМ</i> ⁶⁶			
<i>Затверд.</i>		<i>Стадніков В.П.</i>						

«Поліцид-НАТА». Після завершення прибирання роблять змиви з поверхонь для мікробіологічного аналізу. Загальна кількість не повинна перевищувати 800 КУО/см².

ДР 1.3.2. Генеральне прибирання.

Під час щоденного прибирання підлоги, стін, дверей, вікон та виробничих поверхонь використовують робочий миючий розчин «UNI-2» та дезінфікуючий розчин «Поліцид-НАТА». Після завершення прибирання роблять змиви з поверхонь для мікробіологічного аналізу. Загальна кількість не повинна перевищувати 300 КУО/см².

ДР 1.4. Підготовка обладнання.

Проводиться для досягнення необхідного рівня чистоти виробничого процесу.

ДР 1.4.1. Миття

Спочатку обладнання промивають простою водою, для видалення залишків, які залишилися на обладнанні після процесу. Далі на внутрішні стінки обладнання та всі комункації наносять розчин «UNI-2» за допомогою спрею та залишають на певний час. У подальшому кілька разів проводять промивання дистильованою водою.

ДР 1.4.2. Ополіскування.

Обладнання ополіскують дистильованою водою протягом 15 хв.

ДР 1.4.3. Технологічний огляд.

Візуально оглядають обладнання.

ДР 1.4.4. Перевірка на герметичність.

На цьому етапі проводять перевірку обладнання на герметичність за допомогою накачування стисненого повітря всередину апарата до $P=0,2$ МПа. Через годину перевіряють тиск, якщо апарат не герметичний – тиск зменшиться. Для того, щоб знайти розгерметизацію використовують мильний розчин.

ДР 1.4.5. Стерилізація.

Стерилізують апарати гострою парою при $P= 0,15$ МПа, $T= 131$ С, $t= 1$ год. Перевіряють відсутність мікробіоти.

ДР 2. Підготовка стерильного повітря.

ДР 2.1. Забір атмосферного повітря.

Забір повітря здійснюється у найвищій точці будівлі ($H= 6$ м) повітрезабірником (ПЗ-1).

ДР 2.2. Очищення від пилу та механічних часток.

Попереднє очищення повітря від грубих домішок у фільтрі грубого очищення (Ф-2) ($E=90$ %). Очищене повітря надходить до компресора (К-3).

ДР 2.3. Стиснення повітря.

Повітря стискають у компресорі (К-3) при цьому повітря нагрівається до $120-250$ °С, тиск становить $0,3$ МПа.

ДР 2.4. Охолодження повітря та видалення вологи.

Стиснене повітря охолоджують у теплообміннику-охолоджувачі (Т-4) до температури $25-30$ °С та видаляють зайву вологу у ресивері (Р-5). Вологість має становити $60-70\%$.

ДР 2.5. Стабілізація термодинамічних показників.

Осушене повітря підігрівається у теплообміннику до температури 35 °С з вмістом вологи 40%.

ДР 2.6. Очищення повітря в головному фільтрі.

Очищення повітря в головному фільтрі (Ф-7) E=90-95%.

ДР 2.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі.

Перед кожним посівним апаратом або ферментером встановлюється індивідуальний фільтр зі ступенем очистки повітря E=99,999%.

ДР 3. Приготування титруючих розчинів.

ДР 3.1. Приготування о розчину хлоридної кислоти.

На цьому етапі для приготування розчину хлоридної кислоти достатньо її концентрований розчин розбавити стерильною водою. Концентрація повинна бути C=6%.

ДР 3.2. Приготування стерильного розчину гідроксиду натрію.

Розчин гідроксиду натрію готують шляхом змішування сухого гідроксиду натрію з водою та подальшою стерилізацією гострою парою при P=0,15 МПа, T=131 С, t= 40 хв. Концентрація повинна бути C=6%.

ДР 4. Приготування та стерилізація поживних середовищ.

ДР 4.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках.

На даному етапі необхідно приготувати 1 л поживного середовища. Розрахунок необхідної кількості компонентів наведено у табл. 5.2. Стерилізацію всіх композицій проводимо в автоклаві.

ДР 4.1.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважуємо 11 г глюкози та додаємо у колбу з 75 мл питної води. Далі композицію перемішують та стерилізують у автоклаві при $P=0,05$ МПа, 112 °С, 30 хвилин.

ДР 4.1.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважуємо 100 г арахісового борошна та додаємо у колбу з 500 мл питної води. Далі заварюють суміш з поступовим нагріванням до 70 °С протягом 30 хв. Далі зважуємо 3 г метіоніну та метилолеату, 6 г амоній ацетату та додаємо у колбу з 228 мл питної води. Отримані суспензії з'єднують в одну колбу та стерилізують в автоклаві при температурі 112 °С, 30 хв.

ДР 4.1.3. Приготування та стерилізація композиції В

Зважуємо по 2,5 г кальцій сульфат, магній сульфат та додаємо у колбу з 32 мл питної води. Розчин перемішують та стерилізують у автоклаві при температурі 131 °С протягом 40 хв.

ДР 4.1.4. Приготування та стерилізація композиції Г

Зважуємо 5 г кальцій карбонат та додаємо у колбу з 32 мл питної води. Розчин перемішують та стерилізують у автоклаві при температурі 131 °С протягом 40 хв.

ДР 4.1.5. Змішування композицій А, Б, В, Г.

Простерилізовані композиції змішують у колбі.

ДР 4.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 20 л.

ДР 4.2.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважуємо 110 г глюкози та додаємо у колбу з 750 мл питної води. Далі композицію перемішують та стерилізують у автоклаві при $P=0,05$ МПа, 112 °С, 30 хвилин.

ДР 4.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б

Зважуємо 1 кг арахісового борошна та додаємо у реактор-змішувач (Р-13) з 5 л питної води. Далі заварюють суміш з поступовим нагріванням до 70 °С протягом 30 хв. Після запарювання у цей же реактор додають по 30 г метилолеату та метіоніну, 60 г амоній ацетату та 1440 мл питної води. Отриманий розчин стерилізують при температурі 112 °С протягом 30 хв. Далі простерилізовану композицію самоплином подають у інокулятор (І-16).

ДР 4.2.3. Приготування та стерилізація композиції В

Зважуємо по 25 г кальцій сульфат, магній сульфат та додаємо у колбу з 320 мл питної води. Розчин перемішують та стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С протягом 40 хв. Простерилізований розчин подають у інокулятор (І-16).

ДР 4.2.4. Приготування та стерилізація композиції Г

Зважуємо 50 г кальцій карбонат та додаємо у колбу з 320 мл питної води. Розчин перемішують та стерилізують у автоклаві при температурі 131 °С протягом 40 хв. Простерилізований розчин подають у інокулятор (І-16).

ДР 4.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 200 л.

ДР 4.3.1. Приготування та стерилізація композиції А

У реактор-змішувач (Р-18) додаємо 1,1 кг глюкози та 6,64 л питної води. Далі композицію перемішують та стерилізують при $P=0,05$ МПа, 112 °С, 30

хвилин. Далі простерилізовану композицію самоплином подають у інокулятор (І-26).

ДР 4.3.2. Приготування та стерилізація композиції Б

Окремо в реактор (Р-20) подають 10 кг арахісового борошна та 50 л питної. Суміш перемішують та заварюють при температурі 70 °С протягом 30 хв. Після заварювання у цей же реактор додають по 0,3 кг метилолеату та метіоніну, 0,6 кг амоній ацетату та 14,4 л питної води. Отриманий розчин стерилізують при температурі 112 °С протягом 30 хв. Далі простерилізовану композицію самоплином подають у інокулятор (І-26).

ДР 4.3.3. Приготування та стерилізація композиції В

В реактор-змішувач (Р-22) завантажують по 0,25 кг кальцій сульфат, магній сульфат та 3,46 л питної води. Розчин перемішують та стерилізують при температурі 131 °С протягом 40 хв. Простерилізований розчин самоплином подають у інокулятор (І-26).

ДР 4.3.4. Приготування та стерилізація композиції Г

В реактор-змішувач (Р-24) завантажують 0,5 кг кальцій карбонат та додають 3,46 л питної води. Розчин перемішують та стерилізують при температурі 131 °С протягом 40 хв. Простерилізований розчин самоплином подають у інокулятор (І-26).

ДР 4.4. Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу в ферментері об'ємом 2,5 м³.

ДР 4.4.1. Приготування та стерилізація композиції А

У реактор-змішувач (Р-35) за допомогою вагового дозатора (Д-34) завантажують 12,1 кг глюкози та 73 л питної води. Далі композицію перемішують

та стерилізують при $P = 0,05$ МПа, 112 °С, 30 хвилин. Потім самоплином подають у ферментер (ФР-37).

ДР 4.4.2. Приготування та стерилізація композиції Б

Окремо в реактор-змішувач (Р-32) за допомогою вагового дозатора (Д-31) завантажують 110 кг арахісового борошна та 550 л питної води. Суміш перемішують та заварюють при температурі 70 °С протягом 30 хв. Після заварювання у цей же реактор додають по 3,3 кг метилолеату та метіоніну, 6,6 кг амоній ацетату та 158,4 л питної води. Отриманий розчин стерилізують при температурі 112 °С протягом 30 хв. Далі простерилізовану композицію за допомогою відцентрового насоса подають у ферментер (ФР-37).

ДР 4.4.3. Приготування та стерилізація композиції В

У реактор-змішувач (Р-28) за допомогою вагового дозатора (Д-27) завантажують по 2,75 кг кальцій сульфат, магній сульфат та 31,1л питної води. Розчин перемішують та стерилізують при температурі 131 °С протягом 40 хв. Простерилізований розчин подають самоплином у ферментер (ФР-36).

ДР 4.4.4. Приготування та стерилізація композиції Г

У реактор-змішувач (Р-30) за допомогою вагового дозатора (Д-29) завантажують 5,5 кг кальцій карбонат та 31,1л питної води. Розчин перемішують та стерилізують при температурі 131 °С протягом 40 хв. Простерилізований розчин подають самоплином у ферментер (ФР-37).

ДР 5. Приготування підживлювального розчину глюкози.

На даному етапі необхідно приготувати 550 л підживлювального розчину глюкози. Тривалість культивування 150 год. Порцію підживлення вносимо кожні 10 год. Тому, з кожною порцією підживлення необхідно внести $550/16 = 34,38$ л 40 %-го підживлюваного розчину глюкози. Стерильність розчину зберігається

протягом 24 годин, тому можемо стерилізувати добову дозу підживлення, тобто 68,8 л в реакторі-змішувачі (Р-39).

ДР 5.1 Приготування та стерилізація підживлюваного розчину глюкози в реакторі об'ємом 100 л.

Кожні 20 годин у реактор-змішувач (Р-39) вносять 27,52 кг глюкози та 41,28 л питної води. Розчин перемішують та стерилізують при $P=0,05$ МПа, 112 °С, 30 хвилин. Далі самоплином подають дозами по 34,38 л кожні 10 годин у ферментер (ФР-37).

ТП 6. Підготовка посівного матеріалу

ТП 6.1. Зберігання музейної культури в рідкому азоті.

Культуру *Cephalosporium acremonium* W53.2.53. зберігають у замороженому стані в рідкому азоті при температурі -196 °С. Заморожують культуру в запаяних ампулах у 10%-му розчині гліцерину та зберігається до 5 років.

ТП 6.2. Одержання робочої культури.

Спочатку культуру *Cephalosporium acremonium* W53.2.53. розморожують у холодильнику декілька діб. Далі її засівають на чашки з СА та інкубують у термостаті при температурі 26-28 °С протягом 3-4 діб. По завершенню проводять мікробіологічний контроль на відсутність сторонньої мікробіоти.

ТП 6.3. Вирощування на скошеному агарі.

З попередньої стадії культуру *Cephalosporium acremonium* W53.2.53. засівають у пробірки зі скошеним СА та інкубують у термостаті при температурі 26-28 °С протягом 3-4 діб. По завершенню проводять мікробіологічний контроль на відсутність сторонньої мікробіоти.

ТП 6.4. Вирощування інокуляту в колбах на качалках.

Від ТП 6.3 роблять змив стерильною водою. Поживне середовище від ДР 4.1.5 наливають у колбу та додають посівний матеріал. Культуру вирощують в колбах на качалках при температурі 26-28 °С протягом 3-4 діб. Далі проводять мікробіологічний контроль на відсутність сторонньої мікробіоти.

ТП 6.5. Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 20 л.

У інокулятор об'ємом 20 л (І-16) подають попередньо приготовлені та простерилізовані композиції, як зазначено на стадії ДР 4.2. Також інокулят, вирощений в колбах на качалках (ТП 6.4), передають у інокулятор за допомогою засівного пристрою, який встановлюється над ним. Культуру вирощують при температурі 26-28 °С протягом 3-4 діб. Регулярно проводять відбір проб з інокулятора, для того, щоб впевнитись в правильності протікання технологічного процесу. Процес аерації здійснюють за рахунок аераційного стерильного повітря (від ДР 2.5), який подається барботером. Контролюють рівень рН за допомогою датчиків, встановлених у інокуляторі. Якщо необхідно – використовують корегувальні розчини (ДР 3), які подаються самоплином. По закінченню, проводять мікробіологічний аналіз на відсутність сторонньої мікрофлори.

ТП 6.6. Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 200 л.

У інокулятор об'ємом 200 л (І-26) подають попередньо приготовлені та простерилізовані композиції, як зазначено на стадії ДР 4.3. Культуральну рідину переміщують від І-16 до І-26 за допомогою труби перетискання, шляхом подачі стисненого стерильного повітря. Культуру вирощують при температурі 26-28 °С протягом 3-4 діб. Регулярно проводять відбір проб з інокулятора, для того, щоб впевнитись в правильності протікання технологічного процесу. Процес аерації здійснюють за рахунок аераційного стерильного повітря (від ДР 2.5), який подається барботером. Контролюють рівень рН за допомогою датчиків,

встановлених у інокуляторі. Якщо необхідно – використовують корегувальні розчини (ДР 3), які подають самоплином. По закінченню, проводять мікробіологічний аналіз на відсутність сторонньої мікрофлори.

ТП 7. Виробничий біосинтез.

ТП 7.1. Виробниче культивування у ферментері об'ємом 2,5 м³.

Попередньо приготовані та простерилізовані композиції поживного середовища від ДР 4.4 подаються самоплином до ферментера (ФР-37) об'ємом 2,5 м³, окрім композиція Б, яка подається за допомогою відцентрового насоса (Н-33). Інокулят переміщують від І-26 до ФР-37 за допомогою труби перетискання, шляхом подачі стисненого стерильного повітря. Культуру вирощують при температурі 26-28 °С протягом 150 год. Регулярно проводять відбір проб з інокулятора, для того, щоб впевнитись в правильності протікання технологічного процесу. Процес аерації здійснюють за рахунок аераційного стерильного повітря (від ДР 2.5), який подається барботером. Контролюють рівень рН за допомогою датчиків, встановлених на інокуляторі. Якщо необхідно – використовують корегувальні розчини (ДР 3), які подають самоплином. По закінченню, проводять мікробіологічний аналіз на відсутність сторонньої мікрофлори.

По закінченню виробничого біосинтезу, культуральна рідина відправляється на виділення та очищення.

РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

Карта постадійного контролю

Таблиця 8.1.

Номер контрольної точки та назва її стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
1	2	3	4	5
Кп 1.1.2 Приготування розчину перекису водню	Персонал	Усне опитування	До початку роботи	Задовільний результат
Кх 1.2.1 Приготування розчину «Поліцид-НАТА»	Розчин «Поліцид-НАТА»	Хімічний метод для перевірки концентрації	Під час приготування	C = 1 %
Кх 1.2.2 Приготування розчину «Стериокс»	Розчин «Стериокс»	Хімічний метод для перевірки концентрації	Під час приготування	C = 0,01 %
Кх 1.2.3 Приготування розчину «UNI-2»	Розчин «UNI-2»	Хімічний метод для перевірки концентрації	Під час приготування	C = 0,5 %

					<i>НУХТ БТЕК 04.02.34 КР ПЗ</i>		
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>			
<i>Розробив</i>	<i>Муренко К.М.</i>				<i>Лім.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Перевірив</i>	<i>Воронцов О.О.</i>					77	104
<i>Н. Контр.</i>					<i>Кафедра БТМ⁷⁷</i>		
<i>Затверд.</i>	<i>Стадніков В.П.</i>						
РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА							

Продовження табл. 8.1.

1	2	3	4	5
Км 1.3.1 Щотижнєве прибирання	Підлога, робочі поверхні, чистота	Мікробіологіч ний контроль	Після прибирання	КУО <800/см ²
Км 1.3.2 Генеральне прибирання	Стіни, двері, вікна, чистота	Мікробіологіч ний контроль	Після прибирання	КУО <300/см ²
Кт 1.4.1 Миття	Обладнання та комунікації, чистота	Термометр, годинник	Під час процесу миття	t = 40 °C T = 1,5 год
КТ 1.4.2 Технологічни й огляд	Обладнання та комунікації, чистота	Візуально	Після миття	Задовільний результат
Кт 1.4.4 Перевірка на герметичність	Герметичніст ь обладнання та комунікацій, тиск, час	Манометр, годинник	Після миття	P = 0,2 МПа T = 1 год Відсутність розгерметиза ції
Кт, Км 1.4.5 Стерилізація	Обладнання та комунікації, тиск, температура, час, відсутність мікробіоти	Манометр, годинник, термометр, мікробіологіч ний контроль	Тиск та температура контролюють ся під час стерилізація, мікробіологіч ний контроль - після	P = 0,15 МПа t = 131 °C T = 1 год Відсутність мікробіоти
Кт 2.1 Забір повітря	Висота забору повітря	Висотомір	Один раз	H=6 м

1	2	3	4	5
Кт 2.2 Очищення від пилу та механічних часток	Повітря на виході з фільтра, перепад тисків, ступінь очищення	Манометр, перевірка ступеня очищення	Після очищення повітря у фільтрі грубого очищення	E = 80 % Перепад тисків згідно документації
Кт 2.3 Стиснення повітря	Стиснене повітря, тиск, температура	Манометр, термометр	Після компресуванн я повітря	P = 0,3 МПа t = 120-250 °C
Кт 2.4 Охолодження та видалення вологи	Стиснене повітря, температура, вологість	Термометр	Після охолодження та видалення вологи з повітря	t = 25-30 °C W = 60-70%
Кт 2.5 Стабілізація термодинаміч них показників	Стиснене повітря, температура, вологість	Термометр	Після стабілізації показників	t = 35 °C W = 40%
Кт 2.6 Очищення в головному фільтрі	Повітря на виході з головного фільтра, перепад тисків, ступінь очищення	Манометр, перевірка ступеня очищення	Після очищення повітря у головному фільтрі	E = 90-95 % Перепад тисків згідно документації

1	2	3	4	5
Кт, Км 2.7 Очищення в індивідуальному фільтрі	Повітря на виході з індивідуального фільтра, ступінь очищення, відсутність мікробіоти	Ступінь очищення, мікробіологічний контроль	Після очищення повітря в індивідуальному фільтрі	E = 90-95 % Відсутність мікробіоти
Кх 3.1.2 Приготування розчину хлоридної кислоти	Розчин хлоридної кислоти, концентрація	Хімічний метод для перевірки концентрації	Після процесу приготування	C = 6%
Кх, Кт, Км 3.2.1 Приготування стерильного розчину гідроксиду натрію для інокулятора об'ємом 20 л	Розчин гідроксиду натрію, концентрація, тиск, температура, час, відсутність мікробіоти	Манометр, термометр, годинник, хімічний метод для перевірки концентрації мікробіологічний контроль	Після процесу приготування	C = 6% P = 0,15 МПа t = 131 °C T = 40 хв Відсутність мікробіоти
Кх, Кт, Км 3.2.2 Приготування стерильного розчину гідроксиду натрію для інокулятора об'ємом 200 л	Розчин гідроксиду натрію, концентрація, тиск, температура, час, відсутність мікробіоти	Манометр, термометр, годинник, хімічний метод для перевірки концентрації мікробіологічний контроль	Після процесу приготування	C = 6% P = 0,15 МПа t = 131 °C T = 40 хв Відсутність мікробіоти

1	2	3	4	5
Кх, Кт, Км 3.2.3 Приготування стерильного розчину гідроксиду натрію для ферментера об'ємом 2,5 м ³	Розчин гідроксиду натрію, концентрація, тиск, температура, час, відсутність мікробіоти	Манометр, термометр, годинник, хімічний метод для перевірки концентрації мікробіологіч ний контроль	Після процесу приготування	С = 6% Р = 0,15 МПа t = 131 °С Т = 40 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, тиск, температура, час, відсутність мікробіоти	Манометр, термометр, годинник, мікробіологіч ний контроль	Тиск та температура під час стерилізації, мікробіологіч ний контроль - після	Р = 0,05 МПа t = 112 °С Т = 30 хв Відсутність мікробіоти
Кт 4.1.2.1 Заварювання арахісового борошна	Арахісове борошно, температура, час	Термометр, годинник	Під час процесу заварювання	t = 70 °С Т = 20 хв
Кт, Км 4.1.2.2 Змішування та стерилізація	Композиція Б, тиск, температура, час, відсутність мікробіоти	Манометр, термометр, годинник, мікробіологіч ний контроль	Тиск та температура під час стерилізації, мікробіологіч ний контроль - після	Р = 0,05 МПа t = 112 °С Т = 30 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1.3 Приготування та стерилізація композиції В	Композиція В, тиск, температура, час, відсутність мікробіоти	Манометр, термометр, годинник, мікробіологіч ний контроль	Тиск та температура під час стерилізації, мікробіологіч ний контроль - після	Р = 0,15 МПа t = 131 °С Т = 40 хв Відсутність мікробіоти

1	2	3	4	5
Кт, Км 4.1.4 Приготування та стерилізація композиції Г	Композиція Г, тиск, температура, час, відсутність мікробіоти	Манометр, термометр, годинник, мікробіологіч ний контроль	Тиск та температура під час стерилізації, мікробіологіч ний контроль - після	P = 0,15 МПа t = 131 °C T = 40 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.2.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, тиск, температура, час, відсутність мікробіоти	Манометр, термометр, годинник, мікробіологіч ний контроль	Тиск та температура під час стерилізації, мікробіологіч ний контроль - після	P = 0,05 МПа t = 112 °C T = 30 хв Відсутність мікробіоти
Кт 4.2.2.1 Заварювання арахісового борошна	Арахісове борошно, температура, час	Термометр, годинник	Під час процесу заварювання	t = 70 °C T = 20 хв
Кт, Км 4.2.2.2 Змішування та стерилізація	Композиція Б, тиск, температура, час, відсутність мікробіоти	Манометр, термометр, годинник, мікробіологіч ний контроль	Тиск та температура під час стерилізації, мікробіологіч ний контроль - після	P = 0,05 МПа t = 112 °C T = 30 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.2.3 Приготування та стерилізація композиції В	Композиція В, тиск, температура, час, відсутність мікробіоти	Манометр, термометр, годинник, мікробіологіч ний контроль	Тиск та температура під час стерилізації, мікробіологіч ний контроль - після	P = 0,15 МПа t = 131 °C T = 40 хв Відсутність мікробіоти

1	2	3	4	5
Кт, Км 4.2.4 Приготування та стерилізація композиції Г	Композиція Г, тиск, температура, час, відсутність мікробіоти	Манометр, термометр, годинник, мікробіологіч ний контроль	Тиск та температура під час стерилізації, мікробіологіч ний контроль - після	P = 0,15 МПа t = 131 °C T = 40 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.3.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, тиск, температура, час, відсутність мікробіоти	Манометр, термометр, годинник, мікробіологіч ний контроль	Тиск та температура під час стерилізації, мікробіологіч ний контроль - після	P = 0,05 МПа t = 112 °C T = 30 хв Відсутність мікробіоти
Кт 4.3.2.1 Заварювання арахісового борошна	Арахісове борошно, температура, час	Термометр, годинник	Під час процесу заварювання	t = 70 °C T = 20 хв
Кт, Км 4.3.2.2 Змішування та стерилізація	Композиція Б, тиск, температура, час, відсутність мікробіоти	Манометр, термометр, годинник, мікробіологіч ний контроль	Тиск та температура під час стерилізації, мікробіологіч ний контроль - після	P = 0,05 МПа t = 112 °C T = 30 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.3.3 Приготування та стерилізація композиції В	Композиція В, тиск, температура, час, відсутність мікробіоти	Манометр, термометр, годинник, мікробіологіч ний контроль	Тиск та температура під час стерилізації, мікробіологіч ний контроль - після	P = 0,15 МПа t = 131 °C T = 40 хв Відсутність мікробіоти

1	2	3	4	5
Кт, Км 4.3.4 Приготування та стерилізація композиції Г	Композиція Г, тиск, температура, час, відсутність мікробіоти	Манометр, термометр, годинник, мікробіологіч ний контроль	Тиск та температура під час стерилізації, мікробіологіч ний контроль - після	P = 0,15 МПа t = 131 °С Т = 40 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.4.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, тиск, температура, час, відсутність мікробіоти	Манометр, термометр, годинник, мікробіологіч ний контроль	Тиск та температура під час стерилізації, мікробіологіч ний контроль - після	P = 0,05 МПа t = 112 °С Т = 30 хв Відсутність мікробіоти
Кт 4.4.2.1 Заварювання арахісового борошна	Арахісове борошно, температура, час	Термометр, годинник	Під час процесу заварювання	t = 70 °С Т = 20 хв
Кт, Км 4.4.2.2 Змішування та стерилізація	Композиція Б, тиск, температура, час, відсутність мікробіоти	Манометр, термометр, годинник, мікробіологіч ний контроль	Тиск та температура під час стерилізації, мікробіологіч ний контроль - після	P = 0,05 МПа t = 112 °С Т = 30 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.4.3 Приготування та стерилізація композиції В	Композиція В, тиск, температура, час, відсутність мікробіоти	Манометр, термометр, годинник, мікробіологіч ний контроль	Тиск та температура під час стерилізації, мікробіологіч ний контроль - після	P = 0,15 МПа t = 131 °С Т = 40 хв Відсутність мікробіоти

1	2	3	4	5
Кт, Км 4.4.4 Приготування та стерилізація композиції Г	Композиція Г, тиск, температура, час, відсутність мікробіоти	Манометр, термометр, годинник, мікробіологіч ний контроль	Тиск та температура під час стерилізації, мікробіологіч ний контроль - після	P = 0,15 МПа t = 131 °С T = 40 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 5.1 Приготування та стерилізація підживлюван ого розчину глюкози в реакторі об'ємом 100 л	Підживлювал ьний розчин глюкози, тиск, температура, час, відсутність мікробіоти	Манометр, термометр, годинник, мікробіологіч ний контроль	Тиск та температура під час стерилізації, мікробіологіч ний контроль - після	P = 0,05 МПа t = 112 °С T = 30 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 6.1 Зберігання музейної культури в рідкому азоті	Музейна культура <i>Cephalosporiu m acremonium</i> W53.2.53, температура, мікробіологіч на чистота	Датчик температури, мікробіологіч ний контроль	Температура контролюєтьс я під час зберігання культури, мікробіологіч ний контроль проводять кожні 2 місяці	t = -196 °С Відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 6.2 Одержання робочої культури	Культура <i>Cephalosporiu m acremonium</i> W53.2.53, температура, час, відсутність сторонньої мікробіоти	Термометр, годинник, мікробіологіч ний контроль	Температура визначається під час вирощування культури у термостаті	t = 26-28 °С T = 3-4 доби Відсутність сторонньої мікробіоти

1	2	3	4	5
Кт, Км 6.3 Вирощування на скошеному агарі	Культура <i>Cephalosporiu m acremonium</i> W53.2.53, температура, час, відсутність сторонньої мікробіоти	Термометр, годинник, мікробіологіч ний контроль	Температура визначається під час вирощування культури у термостаті	t = 26-28 °C T= 3-4 доби Відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 6.4 Вирощування в колбах на качалках	Посівний матеріал, температура, час, частота обертів качалки, рН, відсутність сторонньої мікробіоти	Термометр, годинник, тахометр, рН- метр, мікробіологіч ний контроль	Температура, рН, частота обертів качалки визначається під час вирощування культури у термостаті, мікробіологіч ний контроль - після	t = 26-28 °C T= 3-4 доби N = 300 об/хв рН= 7 Відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 6.5 Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 20 л	Посівний матеріал, температура, час, частота обертів качалки, рН, відсутність сторонньої мікробіоти	Термометр, годинник, тахометр, датчик рН, мікробіологіч ний контроль	Всі параметри контролюють під час культивуванн я, мікробіологіч ний контроль - після	t = 26-28 °C T= 3-4 доби N = 300 об/хв рН= 7 Відсутність сторонньої мікробіоти

Продовження табл. 8.1.

1	2	3	4	5
Кт, Км 6.6 Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 200 л	Посівний матеріал, температура, час, частота обертів качалки, рН, відсутність сторонньої мікробіоти	Термометр, годинник, тахометр, датчик рН, мікробіологічний контроль	Всі параметри контролюють під час культивування, мікробіологічний контроль - після	t = 26-28 °C T= 3-4 доби N = 300 об/хв рН= 7 Відсутність сторонньої мікробіоти
Кх, Кт, Км 7.1 Виробниче культивування у ферментері об'ємом 15 м ³	Культуральна рідина, температура, час, частота обертів качалки, рН, концентрація цефалоспоринової біомаси, відсутність сторонньої мікробіоти	Термометр, годинник, тахометр, датчик рН, ВЕРХ, висушування до постійної маси мікробіологічний контроль	Всі параметри контролюють під час культивування, контроль біомаси проводять кожні 10 год, мікробіологічний контроль - після	t = 26-28 °C T = 150 год N = 300 об/хв C (біомаса) = 103,5 г/л C = (цефалоспорин) = 11,8 г/л Відсутність сторонньої мікробіоти

Закінчення табл. 8.1.

8.1. Мікробіологічний контроль

Для того, щоб упевнитись, що культивування *Cephalosporium acremonium* W53.2.53 здійснюється в асептичних умовах, необхідно регулярно проводити мікробіологічний контроль. У процесі контролю перевіряють чистоту культури, оскільки присутність інших мікроорганізмів є недопустимо.

Мікробіологічний контроль стерильності поживного середовища здійснюють шляхом посіву простерилізованого середовища на відповідний агар

(СА – для виявлення грибів, МПА – для виявлення бактерій). Пробу 0,1 мл простерилізованого середовища, наносять на агаризоване середовище за допомогою стерильної піпетки та рівномірно розподіляють шпателем Дригальського. Інкують у термостаті при 30 °С 6-8 годин. Переконаються у відсутності колоній.

Мікробіологічний контроль посівного матеріалу здійснюють двома способами: висів на агаризовані поживні середовища та мікроскопіювання.

Прямий висів посівного матеріалу на чашки Петрі до ізольованих колоній з відповідним агаризованим поживним середовищем з подальшим інкубуванням. Для виявлення грибів і дріжджів використовують СА, а для бактерій – МПА. За допомогою петлі беруть пробу посівного матеріалу та культуральної рідини і висівають на чашки Петрі методом «виснажувального штриха». Інкують у термостаті за температури 30 °С. Далі візуально визначають колонії за культуральними ознаками [55]. Гриб *Acremonium chrysogenum* (*cephalosporium acremonium*) утворює щільний міцелій, колонії спочатку білі, потім рожеві [14].

Метод мікроскопіювання являє собою перевірку колоній за допомогою світлового мікроскопа. Для цього необхідно підготувати мазок препарату. Дотримуючись правил асептики, на знежирене предметне скло наносять 0,01 мл зразка за допомогою стерильної піпетки або петлі, далі розподіляють на площу ~1 см² і залишають висихати. Після повного висушування на мазок наносять краплину імерсійного масла та мікроскопіюють за допомогою імерсійного об'єктива [55].

Переконаємось у відсутності контамінації за допомогою оцінки морфологічних ознак. Конідії еліпсовані або яйцевидні 3-4 мкм, прямі, інколи зігнуті, зібрані у головки (діаметр до 16 мкм) [14].

8.2. Показники росту і синтезу цільового продукту

8.2.1. Концентрація біомаси

Для визначення біомаси можна використати метод висушування до постійної маси. Для початку беруть пробу культуральної рідини 10 мл та центрифугують при 2500-3000 об/хв. Міцелій висушують у сушильній шафі при температурі 105 °С до постійної маси [56].

8.2.2. Концентрації цільового продукту (цефалоспорину)

Для виділення цефалоспорину, який накопичується в культуральному середовищі, спочатку треба відділити її від міцелію гриба. Для цього можна застосувати метод центрифугування при 3000 об/хв. Завдяки дії відцентрованих сил, міцелій накопичується на стінках пробірки, а культуральна рідина – на поверхні. Майже вся частина антибіотика міститься саме у культуральній рідині (~99%), тому для аналізу відбирають пробу 50 мл та визначають концентрацію цільового продукту [57].

На сьогодні існує багато методів визначення цефалоспоринів: метод ВЕРХ, потенціометрія, спектрофотометрія. У статті використовувався саме метод спектрофотометрії з використанням фотометричного реагенту Фоліна-Чокалкеу (ФЧ). Він являє собою розчин фосфорновольфрамкової та фосфорномолібденової кислот у соляній кислоті з додаванням Li_2SO_4 .

Методика. У мірних колбах на 50 мл готували серії розчинів, що містять різні кількості цефалоспорину, додавали реактив ФЧ і доводили до мітки. Маса антибіотика становила від 0,5 до 4,5 мг. Аналогічно, але без антибіотика готували розчин порівняння. Витримували 30 хв на водяній бані при $t = 90$ °С. При цьому жовта фарбування розчину змінювалося на синю. Після чого колби витягували з бані, охолоджували, при необхідності розчин доводили водою до мітки і перемішували. Потім записували спектри розчинів на спектрофотометр СФ-2000

(ОКБ «Спектр», Санкт-Петербург області 500–900 нм у кюветах 1 см щодо розчину порівняння [58].

8.2.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту

Визначення концентрації глюкози

Розрахунок концентрації глюкози в культуральній рідині виконували за допомогою автоматичного аналізатору «ЕКСАН-ГМ». Робота аналізатора заснована на розщепленні глюкози ферментом глюкооксидаза та виділення водню. При окисненні водню з'являється електричний струм, який вимірюється аналого-цифровим перетворювачем. Концентрація водню пропорційна вмісту глюкози.

Методика. Спочатку прилад калібрують розчином глюкози з відомою концентрацією 10 ммоль/дм³. Діапазон концентрації культуральної рідини може складати 2-30 ммоль/дм³. При більших концентраціях роблять 20-ти кратне розведення. Пробу 50 мкл набирають дозатором та вводять у аналізатор. Результат автоматично виводиться на дисплей в ммоль/дм³. Для переведення в г/дм³ використовують формулу:

$$C = C_m * 180 * n / 1000 \quad (8.1)$$

де n – розведення, C_m – результат, ммоль/дм³ ; 180 – молярна маса глюкози [59].

Визначення концентрації ацетату амонію

Фотометричний метод визначення масової концентрації іонів амонію заснований на взаємодії іонів з реактивом Несслера з утворенням жовто-коричневої, нерозчинної у воді солі.

Для визначення концентрації амонійного азоту супернатант розводили 100 разів. До 10 мл розчину додали краплю 33 %-го КОН та 0,5 мл реактиву Несслера. За контроль брали дистильовану воду.

Світлопоглинання розчину вимірюють при 425 нм в кюветах з довжиною поглинаючого шару 10 або 50 мм. Інтенсивність забарвлення прямо пропорційна концентрації іонів амонію у розчині проби [60].

РОЗДІЛ 9. АНАЛІЗ ПЕРСПЕКТИВ ВПРОВАДЖЕННЯ СИСТЕМИ ЕКОЛОГІЗАЦІЇ ВИРОБНИЦТВА

Однією з головних переваг впровадження системи екологізації виробництва цефалоспоринів є зменшення викидів шкідливих речовин в атмосферу та зменшення кількості відходів, що потрапляють в середовище. Це може позитивно позначитися на стані довкілля та здоров'ї людей.

9.1. Системи знешкодження рідких відходів

Виробництво цефалоспоринів вимагає використання великої кількості води для забезпечення необхідних умов для мікробіологічного синтезу. При цьому утворюється значний обсяг стічних вод, які містять різні хімічні сполуки та бактерії, що можуть бути шкідливі для довкілля, якщо не вжити відповідних заходів щодо їх очищення.

Система очищення стічних вод для виробництва цефалоспору може включати різні етапи, зокрема:

1. Механічне очищення: на цьому етапі проводяться механічні операції для видалення великих твердих частинок, що можуть забруднити наступні етапи очищення.
2. Біологічне очищення: цей етап включає використання біологічних процесів для очищення стічних вод від біороздільних органічних сполук.

					<i>НУХТ БТЕК 04.02.34 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>РОЗДІЛ 9. АНАЛІЗ ПЕРСПЕКТИВ ВПРОВАДЖЕННЯ СИСТЕМИ ЕКОЛОГІЗАЦІЇ ВИРОБНИЦТВА</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розробив</i>	<i>Муренко К.М.</i>						<i>91</i>	<i>104</i>
<i>Перевірив</i>	<i>Воронцов О.О.</i>							
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>	<i>Стабніков В.П.</i>							
						<i>Кафедра БТМ</i>		

На цьому етапі використовують спеціальні бактерії, які розкладають органічні забруднення.

3. Остаточне знезараження

Для механічного очищення стічної води доцільно використовувати багаторазові фільтри, в яких стічна вода проходить через багато шарів фільтрувального матеріалу, такого як пісок, антрацит або вугілля. Кожен шар може мати різний розмір та підходити для різних типів часток. Після певного часу ефективність фільтрувального матеріалу знижується, і фільтр потребує очищення або заміни матеріалу.

Після передочищення стічні води мають бути далі піддані біологічному та хімічному очищенню, щоб видалити забруднення, що не можуть бути видалені на першому етапі.

Важливо зазначити, що передочищення має велике значення для ефективності наступних етапів очищення стічних вод. Якщо на цьому етапі не будуть видалені великі тверді частинки зі стічних вод, це може призвести до ушкодження наступного обладнання і зменшення ефективності очищення в цілому [61].

Далі після механічного очищення вода подається в експлуатації блочні установки глибокої біологічної очистки стічних вод (СПБО) з продуктивністю від 1,5 до 100 м³ на добу. Установки глибокої біологічної очистки стічних вод (СПБО) є сучасними технологіями очищення стічних вод від забруднень, що використовують мікроорганізми для перетворення органічних речовин в безшкідні речовини. СПБО є більш ефективними та екологічно чистими у порівнянні з іншими методами очищення стічних вод, такими як механічна та хімічна очистка.

Установки СПБО включають в себе комплекс технічних засобів, які забезпечують оптимальні умови для розвитку бактерій та інших мікроорганізмів, що розкладають органічні забруднення. У процесі очищення стічних вод за допомогою СПБО, забруднені стічні води проходять крізь різні стадії очищення, де вони піддаються біохімічним реакціям, що дозволяють знизити рівень забруднення до безпечних для викиду в навколишнє середовище.

Після біологічної очистки воду хлорують або озонують. Хлорування та озонування - це дві з найпоширеніших методів дезінфекції води, які дозволяють вбити шкідливі мікроорганізми та знизити рівень забруднення води. Хлорування полягає у введенні хлору в воду, що дозволяє знищувати бактерії та інші мікроорганізми. Озонування - це метод, при якому воду обробляють озоном, що також дозволяє знищувати бактерії та інші мікроорганізми, а також знижує рівень забруднення води [62].

9.2. Системи знешкодження газоподібних відходів

У випадку з біосинтезом цефалоспорину, газоподібні відходи, які виникають під час процесу, можуть містити різні хімічні речовини та інші забруднюючі речовини. Ці відходи можуть бути шкідливими для здоров'я людей та навколишнього середовища.

Система знешкодження газоподібних відходів біосинтезу цефалоспорину за допомогою скрубера полягає в тому, що вихідні газоподібні відходи збираються в спеціальний резервуар, після чого вони проходять через скрублер. Скрублер - це пристрій, який використовується для очищення газів від різних забруднень, таких як токсичні хімічні речовини, пил, дим, вуглекислий газ та інші. У скрублері відбувається хімічна реакція, внаслідок якої забруднюючі речовини відокремлюються від газового потоку і затримуються на поверхні

скрубера. Ці забруднення потім можуть бути безпечно видалені або оброблені додатково, щоб знизити їхню токсичність.

Після очищення у скрубери, гази виходять з системи знешкодження відходів, знижуючи рівень забруднення повітря та поліпшуючи якість навколишнього середовища.

Застосування скрубера у системі знешкодження газоподібних відходів під час біосинтезу цефалоспорину дозволяє зменшити кількість викидів забруднюючих речовин у повітря, що може бути корисним для збереження навколишнього середовища та здоров'я людей, які проживають поруч з підприємствами, що займаються виробництвом цефалоспорину.

Система знешкодження газоподібних відходів біосинтезу цефалоспорину за допомогою скрубера має декілька переваг. Наприклад:

1. Ефективність очищення: Скрубери забезпечують високу ефективність очищення газів від різних забруднень, що дозволяє зменшити кількість викидів забруднюючих речовин у повітря.
2. Надійність: Скрубери є досить надійними пристроями і мають довгий термін служби.
3. Гнучкість: Система знешкодження газоподібних відходів біосинтезу цефалоспорину за допомогою скрубера може бути досить гнучкою і легко налаштовуватися під різні типи відходів.
4. Економічність: В порівнянні з іншими методами знешкодження відходів, скрубери можуть бути досить економічними в плані експлуатації та обслуговування [63].

9.3 Системи знешкодження твердих відходів

Система сортування та утилізація твердих відходів є важливою частиною будь-якого виробництва, в тому числі і фармацевтичного.

Основним завданням сортування є розділення відходів на різні категорії, щоб вони можна було відправити на подальшу переробку або утилізацію. На фармацевтичному виробництві, тверді відходи можуть бути розділені на такі категорії:

- Відходи від упаковки лікарських засобів (папір, картон, пластик, метал)
- Відходи від виробництва лікарських засобів (наприклад, залишки активних інгредієнтів, що не використовуються)
- Інші відходи (наприклад, залишки їжі, яка використовується в їдальні для працівників фармацевтичної компанії)

Для ефективної сортування відходів на фармацевтичному виробництві, можна використовувати різні методи, такі як:

- Ручне сортування: працівники займаються ручним сортуванням відходів на різні категорії.
- Автоматичне сортування: використовуються спеціальні машини, які автоматично розділяють відходи на різні категорії за певними критеріями, наприклад, за розміром або матеріалом.
- Механічне сортування: використовуються механічні методи, наприклад, сепаратори, щоб розділити відходи на різні категорії.

Після сортування, відходи можуть бути відправлені на подальшу переробку або утилізацію. Наприклад, пластикову упаковку можна переробити на гранули, які можуть бути використані для виробництва нових виробів, а

залишки активних інгредієнтів можуть бути перероблені в інші лікарські засоби або утилізовані відповідно до вимог законодавства.

Окрім сортування та переробки відходів, важливо також враховувати екологічні аспекти при їх утилізації. Наприклад, використання сжигання відходів може мати негативний вплив на довкілля через викиди шкідливих речовин у повітря. Тому, виробництва можуть використовувати більш екологічно безпечні методи утилізації, такі як компостування, рециклінг, або повторне використання відходів в інших процесах виробництва.

У кінцевому підсумку, система сортування та утилізації твердих відходів є важливим елементом сталого розвитку в будь-якому виробництві, включаючи фармацевтичне. Використання ефективної системи сортування та утилізації відходів може зменшити негативний вплив виробництва на довкілля та покращити загальну екологічну стійкість.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. History of Antibiotics Research [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: https://link.springer.com/chapter/10.1007/82_2016_499
2. Основы учения об антибиотиках: Учебник. 6-е изд., перераб. и доп. / Н.С. Егоров. – М.: Изд-во МГУ ; Наука, 2004. – 528 с. – (Классический университетский учебник).
3. Weichang Zhou, Karin Holzhauser-Rieger, Michael Dors, Karl Schiigerl. Influence of medium composition on the cephalosporin C production with a highly productive strain *Cephalosporium acremonium*. *Journal of Biotechnology*. 1992, 23(3):315-29. doi: 10.1016/0168-1656(92)90078-N
4. Способ биосинтеза цефалоспоринона С с использованием нового штамма *acremonium chrysogenum* ВКМ F-4081D [Електронний ресурс]. – 2019. – Режим доступу до ресурсу: <https://edrid.ru/en/rid/219.016.dedd.html?dp-1-page=1>.
5. [Yves M.Kennel](#), Arnold L.Demain. Effect of carbon sources on β -lactam antibiotic formation by *Cephalosporium acremonium*. *Experimental Mycology*. 2005, 2(3): 234-238. doi: 10.1016/S0147-5975(78)80016-4.
6. А.Я. Валиахметов, Л.В. Трилисенко, В.М. Вагабов, Ю.Э. Бартошевич, И.С. Кулаев, М.И. Новак, А.Г. Домрачева, М.А. Эльдаров, К.Г. Скрябин. Динамика содержания неорганических полифосфатов при синтезе цефалоспоринона С у *Аcremonium chrysogenum*, *Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им.Г.К. Скрябина*, 2010, 46(2): 198-204
7. Виробництво β -лактамічних антибіотиків [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: https://lifelib.info/microbiology/biotechnology_1/78.html.
8. Цефалоспорини [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/109/cefalosporini#list>.

9. Физико-химические свойства цефалоспоринов [Электронный ресурс] – Режим доступа до ресурсу: https://studwood.ru/1548257/matematika_himiya_fizika/obzor_literatury.

10. Безъязычная А.А. Разработка методик анализа некоторых цефалоспоринов в традиционных и иммобилизованных формах и биологических объектах: Автореф. дис. канд. фарм. наук. Курск, 2019. 196 с.

11. Мостовой Ю.М. Цефалоспорины: разочарования и оптимизм. *Винницький національний медичинський університет ім. Н.І. Пирогова*. 2011, 19 (391): <https://elibrary.ru/item.asp?id=21182784>.

12. Цефтриаксон пор. д/ін. 1000 мг.. [Электронный ресурс] – Режим доступа до ресурсу: <https://helsi.me/like/kyiv/ceftriaxon/33004/instruction>.

13. Цефалоспорины [Электронный ресурс] – Режим доступа до ресурсу: <https://pidru4niki.com/75776/meditsina/tsefalosporini>.

14. Морочковський С.Ф., Зерова М.Я. та ін. Визначник грибів України. Том 3. У 5-ти тт. Том 3 - Незавершені гриби. — Київ: Наукова думка, 1971. — 696 с.

15. Патент Российской Федерации № 242693. Способ биосинтеза Цефалоспорина С с использованием нового штамма *Acetomonium chrysogenum* ВКМ F-4081D / Бартошевич Ю.Э., Новак М., Домрачева А., Скрыбин К. Опубл. 20.08.2011, Бюл. № 23.

16. *Acetomonium* spp. [Электронный ресурс] – Режим доступа до ресурсу: <https://www.inspq.qc.ca/en/moulds/fact-sheets/acetomonium-spp>.

17. MYCOBANK Database [Электронный ресурс] – Режим доступа до ресурсу: <https://www.mycobank.org/Simple%20names%20search>.

18. Цефтриаксон (Ceftriaxone sodium salt) [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <https://compendium.com.ua/info/7380/tseftriakson/>

19. Державна служба статистики [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: https://ukrstat.gov.ua/druk/publicat/kat_u/2018/zb/06/zb_zoz_17.pdf

20. Державний реєстр лікарських засобів України [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <http://www.drlz.com.ua/ibp/ddsite.nsf/all/shlist?opendocument&query=%F6%E5%F4%F2%F0%E8%E0%EA%F1%EE%ED>

21. Glycolysis / Gluconeogenesis - Phaeoacremonium minimum [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?tmn00010.

22. Карлаш Ю.В., Красінько В.О. Основи проектування біотехнологічних виробництв [Електронний ресурс]: Навч. Посібник. -К.:НУХТ, 2022. – 373 с.

23. Нейтральний пінний миючий засіб, концентрат uni-2, 10кг [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <https://primaterra.ua/ua/p344505423-nejtralnoe-pennoe-moyuschee.html>.

24. Засіб дезінфікуючий "Поліцид-НАТА (Policide –NATA)" [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <https://natagroup.com.ua/policid-nata>.

25. Лізоформін Плюс 1000 мл Blanidas деззасіб для поверхонь Україна [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <https://ua.medsolve.com.ua/meditsinskim-uchrezhdeniyam/dezinfektsiya/lizoformin-plyus-1000-ml-s-01-0065.html>.

26. ІНСТРУКЦІЯ із застосування засобу «Стериокс» (“Sterioks”) на промислових підприємствах з метою дезінфекції [Електронний ресурс] – Режим

доступу до ресурсу: https://uk.interdez.com.ua/wp-content/uploads/2016/09/MV_Sterioks_2013.pdf.

27. Карлаш Ю.В., Красінько В.О. Основи проектування біотехнологічних виробництв Електронний ресурс : Навч. посібник. –К.:НУХТ, 2022. –373 с.

28. Виробництво антибіотиків. Способи одержання [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: https://allreferat.com.ua/uk/organizaciya_vurobnuctva/kurovaya/4970/page/8.

29. Основна технологічна схема виділення та очищення антибіотиків. [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <http://medbib.in.ua/sushilkachistyiy-antibiotik-osnovnaya.html>.

30. Молоткові дробарки і млини [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <https://studfile.net/preview/9170821/page:3/>.

31. Допоміжне обладнання для виробництва таблеток --- Вібраційна просівальна машина [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <https://ua.pharma-packing-machine.com/news/supporting-equipment-for-pill-production-vi->

32. Барабанный вакуумный фильтр 2,5 м² [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <https://www.inprominox.com/barabannyj-vakuumnyj-filtr-2-5>

33. Полимерный сорбент AMBERLITE XAD 4 [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <https://bizorg.su/materialy-sorbtsionno-filtruyuschier/p13013526-polimernyy-sorbent-amberlite-xad-4>.

34. The Alfa Laval Membrane-UF system [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <https://www.alfalaval.ru/products/separation/membranes/membrane-filtration-systems/al-mem/>.

35. Обладнання для сублимації [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <https://cryovit.com/>.

36. Молотковий млин [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <http://ua.wandacrush.com/grinding-machine/fine-grinding-machine/hammer-mill.html>.

37. Сито вібраційне AS 200 BASIC [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <https://www.retsch.com/products/sieving/sieve-shakers/as-200-basic/>.

38. Даховий повітрязабірник круглий Z1-400 Zs [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <https://ccktm.prom.ua/ua/p550110095-kryshnyj-vozduhozabornik-kruglyj.html>.

39. Фільтр повітряний волокнистий (ФПВ) [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <https://ventfilter.kiev.ua/goods/filtr-vozdushniy-voloknistiy-fvv/>.

40. Маслозаповнений гвинтовий повітряний компресор [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <https://www.crownwell-compressor.com.ua/maslozapovneni-kompresory-uk.html>.

41. ВЕНТС ОКВ 800х500-3 [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <https://vents.ua/product/okw-800x5003#characteristic>.

42. Повітрязборник (ресивер), 500л [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <https://tech-market.com.ua/ua/p37370054-vozduhosbornik-resiver-500l.html>.

43. ВЕНТС НКВ 400х200-2 [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <https://vents.ua/product/nkv-400h2002#description>.

44. Панельные воздушные фильтры для тонкой очистки воздуха [Электронный ресурс] – Режим доступа до ресурсу: <https://shop.alterair.ua/ru/product/panelnyye-vozdushnyye-filtry-dlya-tonkoj-ochistki-vozdukha-%28f7-f9%29/>.

45. Дозатор об'ємний GCG-A напівавтоматичний, рідкі та пастоподібні продукти [Электронный ресурс] – Режим доступа до ресурсу: <https://kozakplus.ua/products/granule-packaging-machines/gcg-a-100-1000>.

46. Хімічний реактор з мішалкою і рубашкою [Электронный ресурс] – Режим доступа до ресурсу: <https://stprom.com.ua/ua/p1016445830-himicheskij-reaktor-meshalkoj.html>.

47. Дозатор ваговий FOYER FL-500 вібрлотковий роторної дії [Электронный ресурс] – Режим доступа до ресурсу: <https://kozakplus.ua/products/granule-packaging-machines/fl-500>.

48. Реактор – смеситель РС-15 [Электронный ресурс] – Режим доступа до ресурсу: <http://www.kft2.com.ua/reaktor15.html>.

49. Pilot scale bioreactors [Электронный ресурс] – Режим доступа до ресурсу: <https://www.bioreactors.net/pilot-scale-bioreactor>.

50. Дозатор ваговий FOYER FZ-999 прямої дії [Электронный ресурс] – Режим доступа до ресурсу: <https://kozakplus.ua/products/granule-packaging-machines/product/view/73/1800>.

51. Высокотемпературный реактор РОММ-ЕН [Электронный ресурс] – Режим доступа до ресурсу: https://tirit.org/reactor_him/romm_eh.php.

52. Pilot Scale Fermentor [Электронный ресурс] – Режим доступа до ресурсу: <https://www.sidolim.com/Pilot%20Scale%20Fermentor%20200L.html>.

53. Дозатор ваговий FOYER FZ-5000-II вібрлотковий прямої дії [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <https://kozakplus.ua/products/granule-packaging-machines/fz-5000-2>.

54. Насос відцентровий М-70 PL 0,55 кВт SAER [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <https://vodonet.com.ua/nasos-vidtcentrovii-m-70-pl-0-55-kvt-saer-2-4-m3-god-52-m>.

55. Красінько В.О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобув. освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» освіт. -проф. програми «Біотехнологія» ден. і заоч. форм навч. / В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2019. – 252 с.

56. Методы экспериментальной микологии: Справочник / – М.: Книга по Требованию, 2014. – 552 с.

57. Основы учения об антибиотиках: Учебник. 6-е изд., перераб. и доп. / Н.С. Егоров. – М.: Изд-во МГУ ; Наука, 2004. – 528 с. – (Классический университетский учебник).

58. Алексеев В.Г. Использование реактива Фолина-Чиокальтеу для количественного определения цефалоспоринов. *Тверской государственный университет*. 2019, 4 (38): 184-191. doi: 10.26456/vtchem2019.4.14

59. Аналізатор глюкози ЕКСАН-ГМ [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <https://labtime.ua/uk/analizator-glyukozy-eksan-gm-p27435>

60. Біла Т.А., Ляшенко Є.В., Охріменко О.В. Фотокolorиметричний метод визначення сполук амонію у природних водах. *Херсонський державний аграрно-економічний університет*. 2020, 125-131. doi: 10.32851/wba.2020.2.16

61. Ковальчук В.А. Очистка стічних вод. - Рівне: ВАТ «Рівненська друкарня», - 2002. - 622

62. ISSN 0321-4095, Voprosy khimii i khimicheskoi tekhnologii, 2021, No. 3, pp. 4-31

63. Красінько В.О. Природоохоронні біотехнології [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобув. освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» осв. – проф. прогр. «Біотехнологія» ден. і заоч. форм навч. / В.О. Красінько. - К: НУХТ, 2020. – 218 с.

ДОДАТОК 1

Journal of Biotechnology, 23 (1992) 315–329

315

© 1992 Elsevier Science Publishers B.V. All rights reserved 0168-1656/92/\$05.00

BIOTEC 00740

Influence of medium composition on the cephalosporin C production with a highly productive strain *Cephalosporium acremonium*

Weichang Zhou², Karin Holzhauer-Rieger¹, Michael Dors¹
and Karl Schügerl¹

¹ Institut für Technische Chemie, Universität Hannover, Hannover, F.R.G.; ² Institut für Biotechnologie,
ETH-Hönggerberg, Zürich, Switzerland

(Received 18 October 1991; revision accepted 25 November 1991)

Summary

Cephalosporin production by a highly productive *Cephalosporium acremonium* strain was carried out and optimized by fed-batch operation in a 40 l stirred tank reactor using a complex medium containing 30–120 g l⁻¹ peanut flour. The concentrations of cephalosporin C (CPC) and its precursors: penicillin N (PEN N), deacetoxy cephalosporin C (DAOC), and deacetyl cephalosporin C (DAC) were monitored with an on-line HPLC. The concentrations of amino acids valine (VAL), cysteine (CYS), α -amino adipic acid (α -AAA), the dipeptide α -amino-adipyl-cysteine (AC), and the tripeptide α -amino-adipyl-cysteinyl-valine (ACV), were determined off-line by HPLC. The RNA content and dry weight of the sediment as well

Correspondence to: K. Schügerl, Institut für Technische Chemie, Universität Hannover, Callinstr. 3, D-3000 Hannover, F.R.G.

Nomenclature: α -AAA, α -amino adipic acid; AC, α -amino adipyl-cysteine; ACV, α -amino adipyl-cysteinyl-valine; CPC, cephalosporin C; CPR, CO₂ production rate; CYS, cysteine; DAC, deacetyl cephalosporin C; DAOC, deacetoxy cephalosporin C; DOC, dissolved oxygen concentration; dCPC/dt, production rate of CPC; dPEN N/dt, production rate of PEN N; GLU, glucose; IPEN N, isopenicillin N; $k_{L,a}$, volumetric oxygen transfer coefficient; MET, methionine; OTR, oxygen transfer rate; PF, peanut flour in the original nutrient medium; PEN N, penicillin N; pO₂, dissolved oxygen concentration referring to its saturation value; RQ, respiratory quotient; VAL, valine; X, cell mass concentration; $Y_{CPC/GLU}$, yield coefficient of CPC formation referred to glucose consumption; $Y_{CPC/PF}$, yield coefficient of CPC formation relating to peanut flour in the original nutrient medium; $Y_{X/GLU}$, yield coefficient of cell mass relating to glucose consumption; $Y_{CPC/X}$, CPC produced referring to cell mass formed; $Y_{PEN N/X}$, PEN N produced referring to cell mass formed; $Y_{X/PF}$, yield coefficient of cell mass referring to peanut flour in the original nutrient medium.

ДОДАТОК 2

316

as the oxygen transfer rate (OTR) and the CO₂ production rate (CPR) were used to calculate the cell mass concentration (X). The influences of peanut flour (PF) and the on-line monitored and controlled medium components: glucose (GLU), phosphate, methionine (MET) as well as the dissolved oxygen (DOC) on the cell growth, the product formation, and the pathway of cephalosporin C biosynthesis were investigated and evaluated. When the glucose fed-batch cycle was optimized and oxygen transfer limitation was avoided (DOC > 20% of the saturation value), high process performance (103.5 g l⁻¹ X , 11.84 g l⁻¹ CPC, a maximum CPC productivity of 118 mg l⁻¹ h⁻¹, and the whole concentration of the β -lactam antibiotics CPC, DAC, DAOC, PEN N 17.34 g l⁻¹) was achieved by using 100 g l⁻¹ PF in the medium with the optimum concentration of phosphate (260–270 mg l⁻¹) and a low glucose concentration (< 0.5 g l⁻¹). The cultivations with different medium concentrations demonstrated that the product formation was directly proportional to the cell mass concentration. On the average, the cell mass-based yield coefficient of CPC: $Y_{CPC/X}$ amounted to 0.115 g CPC per g cell mass.

Cephalosporium acremonium; Cephalosporin C; Deacetylcephalosporin C; Deacetoxycephalosporin C; Penicillin N; Peanut flour

TABLE 1
 β -Lactam Antibiotic Production
 from Different Carbon Sources

Carbon source	Maximum β -lactam antibiotic production ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Maximum dry cell weight (mg/ml)	Specific β -lactam antibiotic production ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
Glucose	830	22.5	36.9
Maltose	1130	21.8	51.9
Fructose	1250	21.5	58.1
Galactose	1650	19.1	86.4
Sucrose	1040	11.9	87.4

supersensitive to β -lactam antibiotics, was used as an assay organism. The two antibiotics produced by *C. acremonium* CW19, cephalosporin C and penicillin N, are equally active against *E. coli* ESS. Bioassay plates were prepared with nutrient agar and seeded with *E. coli* ESS [0.2% of a culture grown overnight in nutrient broth (Difco)]. These plates were used for determination of total β -lactam antibiotics by the disk-agar diffusion assay. For the determination of cephalosporin C, 500 U/ml penicillinase (Difco) was added prior to pouring the bioassay plates. In both assays, cephalosporin C was used as the standard. Filter paper disks (6.35 mm diameter) were used to apply the broth supernatant fluids and standards to the assay plates. The antibiotic concentration in micrograms per milliliter of culture is referred to as the "volumetric potency." The "specific potency" is the micrograms of antibiotic produced per milligram of dry cell weight (DCW).²

Determination of dry cell weight. The whole broth was filtered on a Büchner funnel and washed, and the cake was

(Worthington Biochemicals, Freehold, N.J.).

RESULTS

Effect of Different Carbon Sources

Glucose and maltose supported the highest growth rates followed by, in decreasing order, fructose, galactose, and sucrose. The volumetric potencies of cephalosporin C achieved on the two most rapidly utilized sugars (glucose and maltose) were about 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, whereas those on the three more slowly utilized sugars were 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ or more (Fig. 1, left side). Even more interesting, growth on glucose and maltose yielded specific cephalosporin C potencies near 5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ DCW; fructose- and galactose-supported production of about 12 $\mu\text{g}/\text{mg}$, and the sugar supporting the slowest growth, sucrose, yielded a potency of 20 μg of cephalosporin C/mg of DCW (Fig. 1, right side). The data on total β -lactam antibiotic production (Table 1) reveal the same general trend. Specific β -lactam antibiotic production was highest with sucrose followed by, in decreasing order, galactose, fructose, maltose, and glucose. Thus, there is a roughly inverse correlation between growth rate and antibiotic formation.

Fermentation Experiments with Different Concentrations of Glucose

When growth, antibiotic production, pH, and residual glucose were followed for different concentrations (63, 42, and 21 g/liter) of glucose as the major carbon source, growth stopped when glucose was exhausted (Fig. 2). Interestingly, the β -lactam antibiotic production rate was low during growth, and markedly accelerated only when glucose was depleted. at least

ДОДАТОК 4

200

ВАЛИАХМЕТОВ и др.

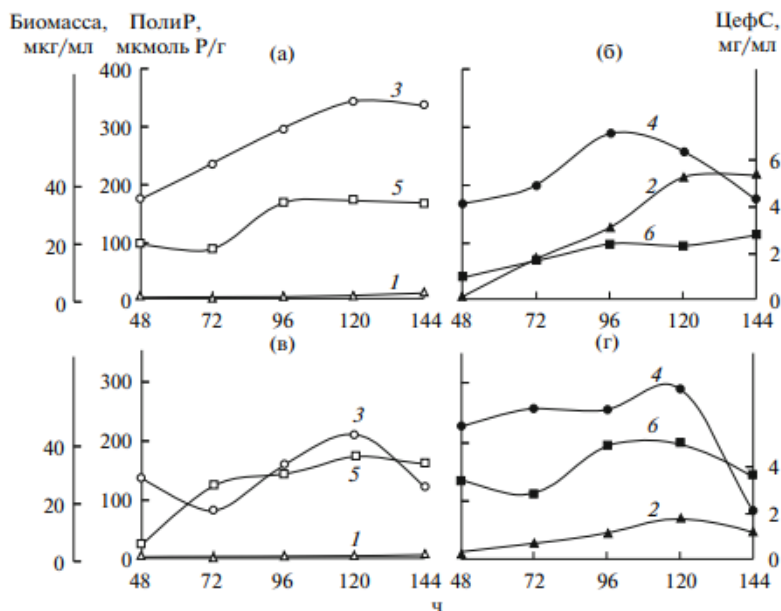


Рис. 1. Динамика накопления цефС (мг/мл) в среде (1, 2) и сумма полиР (мкмоль Р/г сухой биомассы) в клетках (3, 4) низкоактивного штамма *A. chrysogenum* ATCC 11550 (а, в) и высокоактивного 26/8 (б, г) в процессе роста (5, б) на крахмале (а, б) и глюкозе (в, г). Рост указан в мкг сухой биомассы на мл среды.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Динамика роста и синтеза цефС у высокопродуктивного штамма *A. chrysogenum* 26/8 и низкоактивного штамма ATCC 11550 представлена на рис. 1. При выращивании штамма 26/8 на комплексной среде с низким уровнем глюкозы (5 г/л) и крахма-

лом концентрация цефС в среде увеличивалась в 26.8 раза (с 0.20 до 5.35 мг/мл) по сравнению с низкоактивным штаммом (рис. 1а, 1б). В неблагоприятных для синтеза антибиотика условиях (рис. 1г) на среде с глюкозой (15 г/л) максимальное содержание цефС (до 1.7 мг/мл) достигалось к 120 ч ферментации. Синтез цефС штаммом ATCC 11550 в этих же условиях практически не изменялся (рис. 1в). Известно, что процесс синтеза цефС, так же как и многих других антибиотиков, требует затрат большого количества энергии. Для синтеза 1 моля трипептида L- α -аминодепил-L-цистеинил-D-валина – первого этапа синтеза цефС – требуется от 3 до 20 молей АТФ [4]. Основными легко мобилизуемыми макроэнергетическими соединениями у живых организмов наряду с АТФ, являются богатые энергией неорганические полифосфаты (полиР) [9, 10]. Как у прокариотов, так и у низших эукариотов полиР могут быть использованы в качестве источников энергии и фосфата при образовании антибиотиков [24].

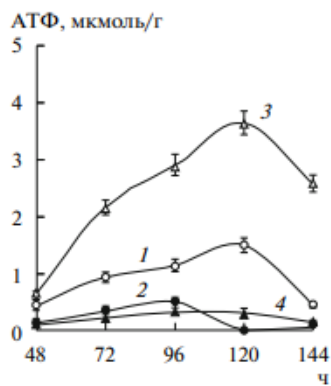


Рис. 2. Изменение содержания АТФ (мкмоль/г сухой биомассы) в клетках низкоактивного штамма ATCC 11550 (открытые маркеры) и высокоактивного проду-

Как видно из рис. 2 содержание АТФ у высокоактивного штамма 26/8 в 10 раз меньше по сравнению со штаммом ATCC 11550, независимо от того, на какой среде проводилось культивирование. В то же время при культивировании даже на глюкозе штамм 26/8 синтезировал в 17 раз больше цефС, чем низкоактивный штамм ATCC 11550. На комплекс-