ЗМІСТ

РЕФЕРАТ

ВСТУП

РОЗДІЛ 1. Значення антибіотиків у життєдіяльності людини

1.1 Вплив на біохімічні процеси в організмі

.2 Галузі застосування антибіотиків

РОЗДІЛ 2. Порівняльна характеристика методів одержання і промислових способів виробництва антибіотиків

.1 Промисловий спосіб одержання тобраміцину

.2 Вплив тобраміцину на біохімічні процеси в організмі

2.3 Основні галузі застосуання тобраміцину

РОЗДІЛ 3. Характеристика кінцевого продукту − антибіотика тобраміцин

.1 Характеристика тобраміцину

.2 Фармакологія

.3 Застосування тобраміцину

РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми

.1 Обґрунтування вибору біологічного агента

.2 Обґрунтування вибору складу поживного середовища

.3 Обрахунок складу поживного середовища

.4 Обґрунтування способу проведення біосинтезу

.5 Обґрунтування вибору ферментаційного обладнання

РОЗДІЛ 5. Характеристика біологічного агента

.1 Таксономічний статус біологічного агента

.2 Морфолого-культуральні ознаки

.3 Фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента

РОЗДІЛ 6. Опис технологічного процесу біосинтезу тобраміцину

.1 Підрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

.2 Опис технологічного процесу

.3 Контроль виробництва

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

ДОДАТКИ

РЕФЕРАТ

Робота присвячена вивченню процесу біосинтезу аміноглікозидного антибіотика тобраміцину, продуцентом якого є актиноміцет Streptomyces tenebrarius. Складається зі вступу, шести розділів, графічних матеріалів та списку використаної літератури.

Курсова робота викладена на 60 сторінках друкованого тексту, в тому числі 2 таблиці, 3 рисунка, 2 креслення формату А3.

У роботі дано обґрунтування та викладено технологічний процес ділянки біосинтезу виробобництва препарату, який включає блок допоміжних робіт та стадії вирощування культури

Ключові слова: Streptomyces tenebrarius, тобраміцин, аміноглікозидний антибіотик, поживні середовища, біосинтез.

ВСТУП

Можливість держави у підтриманні здоров’я нації повністю залежить від стану фармацевтичної галузі. Тому виробництво лікарських засобів є важливим і актуальним питанням.

Недостатній рівень забезпечення населення України якісними ліками за доступними цінами ставить проблему розвитку національної фармацевтичної індустрії у ряд найважливіших державних проблем. Одним із основних напрямків фармацевтичної промисловості є отримання та забезпечення населення антибіотиками [7].

Антибіотики − органічні речовини, що синтезуються мікроорганізмами в природі для захисту від інтервенції інших видів мікроорганізмів. Як правило, антибіотики виділяють з живих бактерій або грибів. Існує також велика кількість синтетичних антибіотиків, які відрізняються модифікаціями функціональних груп природніх антибіотиків. Такі модифіковані сполуки часто ефективніші, або стійкіші до нейтралізації, що виникає внаслідок набутої мікроорганізмами резистентності[7].

За хімічною структурою антибіотики об'єднують різноманітні групи сполук. Зокрема, сполуки, що блокують біосинтез білка на рибосомах; сполуки, що утворюють іоно-проникні канали у плазматичній мембрані, та ін. Характерною особливістю антибіотиків є їхня здатність порушувати певні ланки обміну речовин мікроорганізмів або дію деяких їхніх ферментів [7].

Біотехнологічним шляхом отримують такий важливий антибіотик, як тобраміцин.

Тобраміцин - це сильний, швидкодіючий бактерицидний антибіотик з групи аміноглікозидів, що протидіє як грампозитивним, так і грамнегативним мікроорганізмам. Його головна дія спрямована на бактеріальні клітини, пригнічуючи комплекс поліпептидів та синтез у рибосомах [15].

Загалом дія тобраміцину описана in vitro шляхом визначення мінімальної інгібуючої концентрації (МІК), що вимірює активність антибіотика проти кожного виду бактерій. Так як МІК тобраміцину дуже низька проти більшості очних патогенних організмів, то він вважається антибіотиком широкого спектру дії. Були визначені критичні значення МІК, що визначають чутливість або резистентність бактеріальної культури до певного антибіотику. Під час клінічних досліджень розчин тобраміцину, що застосовувався місцево, виявив ефективність проти багатьох штамів існуючих очних патогенних організмів у пацієнтів, які брали участь у дослідженнях. Вважається, що деякі з цих очних патогенних організмів є “стійкими”, базуючись на визначенні критичних значень при системному застосуванні. Не було повідомлень про будь-які серйозні офтальмологічні або системні побічні дії, пов’язані із застосуванням препарату. Єдиною побічною дією, пов’язаною з лікуванням, про яку повідомлялося, було відчуття дискомфорту в очах [15].

Актуальність теми

Вивчення продуцента антибіотика тобраміцину - Streptomyces tenebrarius є доцільним і актуальним на сьогодні. Адже вже доведено, що мікробіологічний синтез антибіотиків значно переважає за собівартістю, швидкістю і кінцевим результатом хімічне виробництво. Також S. tenebrarius - єдиний мікроорганізм, який синтезує тобраміцин у великих кількостях, використовуючи при цьому для росту дешеве поживне середовище [15].

Новизна

Для синтезу антибіотику тобраміцин використовуються штами, які раніше не мали важливого значення для біотехнологічного виробництва.

РОЗДІЛ 1. Значення антибіотиків у життєдіяльності людини

Біотехнологічна продукція використовується майже у всіх галузях народного господарства: хімічному виробництві (полісахариди, біокаталіз, біодеградабельні полімери), харчовій промисловості (дріжджі, спирт, глюкозні сиропи, ферменти, амінокислоти), сільському господарстві (кормовий білок, амінокислоти, засоби захисту рослин і тварин), медицині (антибіотики, вакцини, гормони, ферменти), енергетиці (біоетанол, біогаз, біодизель), екології (біоремедіація, збереження біорізноманіття) [4].

Одним з основних напрямів біотехнології є отримання антибіотиків. Антибіотики − спеціальні продукти життєдіяльності мікроорганізмів і їхньої модифікації, що володіють високою фізіологічною активністю стосовно визначених груп мікроорганізмів (вірусів, бактерій, грибків, водоростей) чи до злоякісних пухлин. Потрібні в дуже малих концентраціях (мають високу специфічність).

Характерними ознаками антибіотиків є наступні [4]:

. Вибірковість дії. У цьому полягає їх відмінність від загальнобіологічних отрут (спирт, перекис водню, перманганат калію, ціаніди, фенол та ін.). Кожен антибіотик активний щодо певних груп організмів і не впливає на інші форми живих істот;

2. Висока біологічна активність щодо чутливих до них організмів. Тобто антибіотики активні за дуже низьких концентрацій. Так, концентрація пеніциліну, що спричиняє бактерицидну дію, становить 10-6 г/мл [4].

1.1 Вплив на біохімічні процеси в організмі

Унікальність антибіотиків заключається в тому, що, на відмінну від багатьох інших лікарських засобів, їх мішень-рецептор знаходиться не в тканинах людини, а в клітинах мікроорганізмів [5].

Як правило, антибіотики синтизуються бактеріями або грибами. Існує також велика кількість синтетичних антибіотиків, які відрізняються модифікаціями функціональних груп природних антибіотиків. Такі модифіковані сполуки часто ефективніші, або стійкіші до нейтралізації, що виникає внаслідок набутої мікроорганізмами резистентності. За хімічною структурою антибіотики об'єднують різноманітні групи сполук. Зокрема, сполуки, що блокують біосинтез білка на рибосомах; сполуки, що утворюють іоно-проникні канали у плазматичній мембрані, та ін. Характерною особливістю антибіотиків є їхня здатність порушувати певні ланки обміну речовин мікроорганізмів або дію деяких їхніх ферментів [5].

1.2 Галузі застосування антибіотиків

Антибіотики надзвичайно різноманітно та численна група сполук, яка застосовується в багатьох галузях.

Найширше застосування антибіотиків спостерігається у медицині. Вони широко застосовуються для лікування та профілактики інфекції. Ефективність їх безперечна. Призначення антибіотиків хворим з гострою та хронічною інфекцією в більшості випадків є конче потрібним заходом. Раціональне застосування антибіотиків у лікуванні госпітальних та поза лікарняних інфекційних захворювань потребує урахування багатьох факторів, пов’язаних як з пацієнтом та збудником інфекції, так і з соціальними аспектами [7].

Також антибіотики можуть токсично впливати також на певні органи та системи. Наприклад, препарати з групи пеніцилінів токсично діють на нервову систему, зокрема головний та спинний мозок. Тому введення їх допустимо лише в дуже очищеній формі та в значному розчиненні і за абсолютних показань.

У сільському господарстві антибіотики використовуються як лікувальні препарати у тваринництві, птахівництві, бджільництві, рослинництві.

Деякі з них є стимуляторами росту тварин. Багато антибіотики, незважаючи на складність їх молекул, легко проникають в тканини рослинного організму і навіть всмоктуються кореневою системою [7].

Антибіотичні препарати прагнуть використати проти іржі пшениці, гельмінтоспоріозу злаків, борошнистої роси бобових, ряду захворювань овочевих культур, декоративних рослин і т. д. Високий ефект дають антибіотики при лікуванні деревних рослин. Так, антибіотик актіноміцетного походження агріміцін добре діє при бактеріозу фруктових дерев, що зустрічається у багатьох країнах [12].

Значне використання антибіотиків у консервній промисловості - для знешкодження клостридіальних і термофільних бактерій, стійких до стерилізації. В харчовій промисловості використовують нізин, який знищує термофільні бактерії, що дає змогу уникнути термообробки під час консервування [9].

Можливе застосування антибіотиків у діагностичних цілях. Це пов’язано з тим, що деякі з антибіотиків характеризуються виключною специфічністю, їх можна використовувати для ідентифікації мікроорганізмів.

Для наукових досліджень також можливе застосування антибіотиків. В даному випадку ці речовини використовуються як специфічні інгібітори певних етапів метаболізму для вивчення окремих етапів метаболізму [9].

РОЗДІЛ 2. Порівняльна характеристика методів одержання і промислових способів виробництва антибіотиків

Існуючі способи одержання антибіотиків можна поділити на три групи:

. Мікробіологічной синтез на основі актиноміцетів (Streptomyces) і грибів. Цим способом отримують антибіотики тетрациклінового ряду, природні пеніциліни, антибіотики глікозидної будови, макроліди та ін. [5].

Одержання антибіотиків мікробіологічним синтезом ґрунтується на біосинтезі, який здійснюється в клітині мікроорганізму. Цей метод включає такі основні етапи:

підбір високопродуктивних штамів продуцентів;

підбір поживного середовища;

процес біосинтезу (ферментації);

виділення і очистка антибіотика.

. Хімічний синтез (левоміцетин і його похідні).

. Сполучення мікробіологічного і хімічного синтезу. Для одержання напівсинтетичних антибіотиків на основі трансформації молекул природних антибіотиків (напівсинтетичні тетрацикліни, пеніциліни, цефалоспорини та ін.).

При аналізі антибіотиків на їх біологічну активність використовують біологічні, хімічні, фізичні фізико-хімічні методи [5].

Біологічні методи кількісного аналізу антибіотиків грунтуються на порівняльній оцінці їх здатності пригнічувати розвиток тест-культури мікроорганізмів. Активність встановлюють дифузним або турбідиметричним методами.

2.1 Промисловий спосіб одержання тобраміцину

В літературних джерелах відсутня інформація про хімічний чи комбінований спосіб синтезу даного антибіотика. Тобраміцин, як і більшість антибіотиків аміноглікозидної будови одержується мікробним синтезом з використанням актиноміцетів Streptomyces tenebrarius [15]. Іншими продуцентами тобраміцину можуть бути актиноміцети Streptoalloteichus cremeus [8]. Проте в промисловому виробництві антибіотика здебільшого використовується S. tenebrarius, це пояснюється його підвищеною біосинтетичною здатністю [15].tenebrarius − в промисловому відношенні важливий мікроорганізм, що продукує комплекс антибіотиків, які, головним чином, складаються із аміноглікозидів [1].

Аміноглікозидні антибіотики - це великий клас препаратів, що утворюється мікроорганізмами родів Streptomyces, Micromonospora і Bacillus. Характерною особливістю їх будови є наявність в молекулі циклічного аміноспирту. Аміноглікозидні антибіотики, взаємодіючи з рибосомами, необоротно пригнічують синтез білка і, таким чином, володіють бактерицидною дією [10].. tenebrarius продукує аміноглікозидний комплекс антибіотика небраміцину, який складається з тобраміцину, канаміцину та апраміцину. Тобраміцин і канаміцин можуть бути гідролізовані в активні форми. Якщо S. tenebrarius використовується для вироблення тобраміцину, синтез інших компонентів небраміцину зменшує вихід тобраміцину і спричиняє проблеми в його обробці. Зокрема, канаміцин важко відділити від тобраміцину через їх хімічну подібність [15].

Технологічно сучасний процес мікробного синтезу тобраміцину складається з ряду послідовних етапів (операцій). Головні з них: підготовка необхідної культури мікроорганізму-продуцента; підготовка живильного середовища; вирощування посівного матеріалу; культивування продуцента в заданих умовах, в ході якого і здійснюється мікробний синтез, часто званий ферментацією; фільтрація і відділення біомаси; виділення і очищення необхідного продукту, сушка. Процеси виділення і очищення що часто займають важливе місце серед ін. технологічних операцій, визначаються хімічною природою отримуваної речовини і можуть включати екстракційні і хроматографічні методи, кристалізацію, осадження і ін.

При мікробному синтезі тобраміцину, необхідно враховувати та дотримуватися певних факторів та параметрів. В першу чергу, необхідно звертати увагу на значення рН середовища. Оптимальним значенням рН для утворення тобраміцину є 6,8. При меншому значенні буде утворюватися апраміцин. Значення температури є другим важливим параметром, який враховують при при біосинтезі. Оптимальною температурою для утворення цільового продукту є 37 °С. При недотриманні цього значення буде утворюватися менша кількість тобраміцину [13]

Таким чином, при культивування S. tenebrarius, з метою отримання максимальної кількості антибіотика тобраміцину, необхідно дотримуватися всіх необхідних умов, які були визначенні експериментально.

2.2 Вплив тобраміцину на біохімічні процеси в організмі

Особливістю антибіотика тобраміцину є те, що він активно проникає крізь бактеріальну клітинну мембрану. Необоротно зв’язується з одним або більше специфічним рецепторним протеїном із 30S субодиницею бактеріальної рибосоми і взаємодіє з початковим комплексом між переносником РНК і 30S субодиницею. ДНК не може бути прочитана, тому виробляючи нефункціональні протеїни, полірибосоми розщеплюються і втрачають здатність синтезувати протеїн [15].

2.3 Основні галузі застосуання тобраміцину

. Використання в сільському господарстві

Антибіотики групи аміноглікозидів, в тому числі і антибіотики небраміцинового комплексу, характеризуються широким спектр дії проти бактерій, виявляючи при цьому бактерицидний ефект. Ці антибіотики застосовують для лікування респіраторних захворювань у великої рогатої худоби і свиней [7].

Найбільший збиток серед шлунково-кишкових захворювань завдає колібактеріоз. Загибель телят відбувається внаслідок несвоєчасного проведення необхідних заходів. У комплексі заходів щодо профілактики і лікування шлунково-кишкових захворювань у телят велику роль відіграють антибіотики аміноглікозидні групи. Серед них найбільш ефективні неоміцин, канаміцин і тобраміцин. У порівнянні з іншими препаратами, тобраміцин при пероральному введенні не всмоктується в травному тракті і не робить токсичної дії на організм тварини. Даний антибіотик широко використовують у США з 80-рр. для профілактики і лікування інфекцій у тварин та свійської птиці, викликаних стафілококами і стрептококами, а також поширених хвороб грушевих дерев, яблунь, декоративних айстр [9].

Протягом ряду років антибіотики небраміцинового комплексу використовувалися також як стимулятори росту, особливо у свинарстві та птахівництві. З метою підвищення ефективності відгодівлі практикується введення в корми дані антибіотики у відносно малих дозах протягом тривалого періоду часу. Застосовувані в годівлі тварин антибіотики надають стимулюючу дію на їх ріст, продуктивність та відтворення, що призводить в середньому до 4-5% збільшення приросту живої маси тварин в порівнянні з контрольними групами, витрати корму на одиницю приросту знижується на 5-8%, активізується резистентність організму, скорочується період відгодівлі тварин. Антибіотики підвищують біологічну повноцінність білків і здатні знижувати потребу в білках тваринного походження. Значною мірою на цьому засноване використання замінників незбираного молока при вирощуванні молодняку тварин. Препарати що містять антибіотики небраміцинового комплексу, введені до раціону птиці, надають стимулюючу дію на її зростання, яйценосність, інкубаційні якості яєць, ефективне використання корму, зниження витрати протеїну [9].

. Використання в медицині

Тобраміцин застосовується при інфекційних захворюваннях, викликаних чутливою мікрофлорою - інфекції жовчовивідних шляхів, кісток і суглобів (остеомієліт), ЦНС (в т. ч. менінгіт), інфекції черевної порожнини (у т. ч. перитоніт), органів дихання (в т . ч. пневмонія, емпієма плеври, абсцес легенів), інфекції шкіри і м'яких тканин (у т. ч. інфіковані опіки), сечовивідних шляхів (у т. ч. пієлонефрит, пієліт, цистит), сепсис, післяопераційні інфекції [7].

В офтальмології даний антибіотик застосовується при бактеріальних нфекціях ока та його придатків. Ці інфекції можуть бути спричинені чутливою мікрофлорою, в т. ч. блефарит, кон'юнктивіт, кератокон'юнктивіт, блефарокон'юнктивіт, кератит, іридоцикліт [7].

Протипоказано застосовувати тобраміцин при гіперчутливості, у т. ч. до інших аміноглікозидів, також при важкій хронічній нирковій недостатність, порушенні функції VIII пари черепних нервів, невриті слухового нерва [ 7].

РОЗДІЛ 3. Характеристика кінцевого продукту − антибіотика тобраміцин

.1 Характеристика тобраміцину

. tenebrarius продукує аміноглікозидний комплекс антибіотика небраміцину, який складається з тобраміцину, канаміцину та апраміцину. Тобраміцин і канаміцин можуть бути гідролізовані в активні форми [15].

Хімічна назва даного антибіотика має такий вигляд: 0-3-Аміно-3-дезокси-альфа-D-глюкопіранозил-(1,6)-0-[2,6-диаміно-2,3,6-тридезокси альфа-D-рибо-гексопіранозил-(1,4)]-2-дезокси-D-стрептамін (у вигляді сульфату). Хімічна фоула - C18H37N5O9 , будову тобраміцину забражено на рис 3.1.



Рис. 3.1. Хімічна будова тобраміцину.

Тобраміцин належить до антибіотиків групи аміноглікозидів. Його особливістю є те, що він легко розчиняється в воді (1:1,5), але слабо розчинний в етанолі (1:2000). Даний антибіотик практично нерозчинний в хлороформі та ефірі [13].

3.2 Фармакологія

Фармакологічна дія - антибактеріальна широкого спектру, бактерицидна. Тобраміцин активно проникає крізь бактеріальну клітинну мембрану. Необоротно зв’язується з одним або більше специфічним рецепторним протеїном із 30S субодиницею бактеріальної рибосоми і взаємодіє з початковим комплексом між переносником РНК і 30S субодиницею. ДНК не може бути прочитана, тому виробляючи нефункціональні протеїни, полірибосоми розщеплюються і втрачають здатність синтезувати протеїн [13].

Це виявляється в прискореному транспортуванні аміноглікозидів, підвищуючи кількість розривів у бактеріальних цитоплазматичних мембранах, що приводить до загибелі клітини. Пригнічує ріст і розвиток грамнегативних і грампозитивних мікроорганізмів. Найбільш активний в відношенні Staphylococcus spp., включаючи Staphylococcus aureus і Staphylococcus epidermidis (коагулаза-негативні і коагулаза-позитивні). Тести на бактеріальну чутливість показують, що в деяких випадках мікроорганізми, резистентні до гентаміцину, залишаються чутливими до тобраміцину.

Порівняно з іншими антибіотиками, дія тобраміцину більше виражена при інфекціях, викликаних Pseudomonas aeruginosa або Enterococcus faecalis. Але даний антибіотик не ефективний по відношенню до більшості штамів стрептококів групи D [13].

3.3 Застосування тобраміцину

Тобраміцин застосовується для внутрішньом’язового і внутрішньовенного застосування при інфекційних захворюваннях, викликаних чутливою мікрофлорою, а саме − інфекціях жовчовивідних шляхів, кісток і суглобів (остеомієліт), ЦНС (в т. ч. менінгіт), інфекціях черевної порожнини (у т. ч. перитоніт), органів дихання (в т.ч. пневмонія, емпієма плеври, абсцес легенів), інфекціях шкіри і м'яких тканин (у т. ч. інфіковані опіки), сечовивідних шляхів (у т. ч. пієлонефрит, пієліт, цистит ), сепсис, післяопераційні інфекції [7].

Також можливе застосування тобраміцину для інгаляційного застосування. В данному випадку антибіотик використовується проти інфекцій дихальних шляхів, викликаних Pseudomonas aeruginosa (синьогнійною паличкою) у пацієнтів з муковісцидозом у віці від 6 років і старше.

В офтальмології можливе застосування тобраміцину проти бактеріальних інфекцій ока та його придатків. Дані інфекції можуть бути спричинені чутливою мікрофлорою, в т. ч. блефарит, кон'юнктивіт, кератокон'юнктивіт, блефарокон'юнктивіт, кератит, іридоцикліт [13].

РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми

.1 Обґрунтування вибору біологічного агента

Різноманітні антибіотики синтезуються великою кількістю мікроорганізмів. Близько 80 % відомих антибіотиків синтезуються актиноміцетами, до того ж які відносяться до одного роду цього порядку - Streptomyces. Дуже рідко утворюють антибіотики представники еубактерій, виняток становлять лише деякі спорогенні бацили, які продукують поліпептидні антибіотики певного класу. Антибіотики синтезуються багатьма грибами, але їх структура менш різноманітна, ніж структура антибіотиків, які продукуються актиноміцетами [2].

Здатність до синтезу антибіотиків не є строго видоспецифічною ознакою. Один і той же антибіотик може продукуватися організмами, що відносяться до різних видів, родів і навіть порядків. І навпаки: штами одного виду можуть синтезувати різні антибіотики. Проте, чим далі стоять один від одного мікроорганізми в таксономічному ряді, тим менша ймовірність, що вони утворюють один і той же антибіотик [5].tenebrarius − в промисловому відношенні важливий мікроорганізм, що продукує комплекс антибіотиків, які, головним чином, складаються із аміноглікозидів. Аміноглікозидні антибіотики - це великий клас препаратів, що утворюється мікроорганізмами родів Streptomyces, Micromonospora і Bacillus. Характерною особливістю їх будови є наявність в молекулі циклічного аміноспирту. Аміноглікозидні антибіотики, взаємодіючи з рибосомами, необоротно пригнічують синтез білка і, таким чином, володіють бактерицидною дією [15].. tenebrarius продукує аміноглікозидний комплекс антибіотика небраміцину, який складається з тобраміцину, канаміцину та апраміцину. Тобраміцин і канаміцин можуть бути гідролізовані в активні форми. Якщо S. tenebrarius використовується для вироблення тобраміцину, синтез інших компонентів небраміцину зменшує вихід тобраміцину і спричиняє проблеми в його обробці. Зокрема, канаміцин важко відділити від тобраміцину через їх хімічну подібність [13].

Якщо S. tenebrarius використовується для промислового виробництва тобраміцину, то канаміцин є небажаним побічним продуктом. Ці два антибіотики відрізняються гідроксильною групою, яка наявна в канаміцину і зменшується у тобраміцину в результаті біосинтезу.. tenebrarius TD 507 - єдиний із актиноміцетів, який має метилазу 16S рРНК, що діє на сайти G1405 і А1408. Для нього характерна наявність трьох ферментів, які модифікують антиген (АГ). Таким чином, він немає собі рівних за широтою спектра стійкості до АГ [15].

Іншим продуцентом тобраміцину є штам Streptoalloteichus cremeus subsp. tobramycini ВКПМ Ас-1083 і штам Streptoalloteichus cremeus subsp. tobramicini var. nov. 2242 [8].

Відомий штам Streptoalloteichus cremeus subsp. tobramicini var. nov. 2242. − продуцент аміноглікозидних антибіотиків небраміцінового комплексу. Недоліком даного штаму є низький рівень вмісту тобраміцину в культуральної рідини (не більше 1 г/л), оскільки в результаті біосинтезу в більшій кількості утворюється апраміцин [8].

Штам Streptoalloteichus cremeus subsp. tobramycini ВКПМ Ас-1083 також є продуцентом тобраміцину, але здебільшого використовується як продуцент канаміцину, що утворюється в більшій кількості, ніж тобраміцин [8].

Для визначення продуктивної здатності Streptoalloteichus cremeus subsp. tobramycini ВКПМ Ас-1083 було проведено дослід з виділенням тобраміцину з культуральної рідини з використанням колонкової хроматографії на карбоксильних катіонітах при ступінчастій елюції розчинами аміаку, гідролізом при 100 °С в (0,1−0,3) Н. розчині їдкого натру, з повторним хроматографічним очищенням, концентрацією у вакуумі, при підкисленні розчином сірчаної кислоти до pH 4,5 і осадженням метанолом у формі сульфату. Результати показав, що даний штам здатний продукувати тобраміцин в кількості − 1,5 г/л [8].

Найважливішим продуцентом тобраміцину який володіє підвищеною продуктивною здатністю до синтезу даного антибіотика, є S. tenebrarius TD 507. Даний штам було отримано зі штаму S. tenebrarius ATCC 17920 дією на нього ультрафіолетового випромінення. Також, штам S. tenebrarius TD 507 можна отримати дією N-метил-N-нітро-нітрозогуанідину. Даний штам здатний синтезувати 1,75 − 2 г/л даного антибіотика [15].

Для промислового виробництва антибіотиків необхідним є наявність штаму, який володіє підвищеною синтетичною активністю, крім того продуцент повинен утворювати максимум продукту при рості на дешевій сировині при її мінімальному використанні. Для одержання антибіотика тобраміцину таким пробуцентом є штам S. tenebrarius TD 507, який, порівняно з іншими відомими продуцентами, утворює значну кількість антибіотика (1,7 - 2 г/л).

4.2 Обґрунтування вибору складу поживного середовища

Для росту і розвитку продуцента в поживних середовищах необхідна наявність в потрібній кількості і в засвоюваній формі поживних речовин. Для культивування можуть бути використані поживні середовища такого складу:

Середовище № 1 г/л [15]:

Глюкоза - 8;

(NH4)2SO4 - 2;- 2;

КН2РО4 - 0,08;×7H2O - 0,5; ×7H2O - 10 мг/л;×7H2O - 10 мг/л;×H2O - 0,2 мг/л;×5H2O - 0,02 мг/л;×6H2O - 0,02 мг/л;

Також як джерело вуглецю може використовуватися суміш глюкози (4 г/л) і гліцерину (4 г/л). Проте в даному випадку в 3 рази збільшується утворення канаміцину, який входе до складу комплексу синтезованих антибіотиків, і, відповідно, зменшується кількість тобраміцину [15].

Поживне середовище доводять демінералізованою водою до кінцевого об’му, pH = 6,8, температура підтримується на рівні 37 °С протягом всього процесу культивування [15].

Середовище № 2 г/л [14]:

Гліцерин − 2;

Кукурудзяний екстракт - 2;

Тваринний жир - 0,75;Cl - 0,2;- 0,3;

Крейда - 0,5;

Поживне середовище доводять водопровідною водою до кінцевого об’му, pH = 6,8 - 7,0, температура підтримується на рівні 35 - 37 °С. Процес культивування триває 72 - 120 год.

Проте дослідження показали що при культивування S.tenebrarius на поживному середовищі даного складу, кількість тобраміцину значно зменшується, оскільки відбувається збільшення синтезу апраміцину, який входить у комплекс синтезованих антибіотиків [14].

Даний біологічний агент не потребує факторів росту, проте на комплексних середовищах з природними субстратами, де зазвичай присутні ці речовини, росте швидше і активніше синтезує білки [15].

Отже, оскільки S.tenebrarius є продуцентом комплексу аміноглікозидних антибіотиків (тобраміцин, апраміцин, канаміцин), то для одержання надсинтезу тобраміцину, необхідно підібрати необхідні умови культивування та поживне середовище складу № 1 ,в якому джерелом вуглецю є глюкоза.

4.3 Обрахунок складу поживного середовища

Скласти базове поживне середовище для вирощування штаму Streptomyces tenebrarius TD 507 - продуцента тобраміцину, якщо за 72 години культивування концентрація тобраміцину в культуральній рідині становить 1,75 г/л, а концентрація біомаси 2,5 г/л.

Розрахунок вмісту в середовищі джерела вуглецевого живлення

Потреби для синтезу тобраміцину. Як джерело вуглецю для одержання тобраміцину використовують глюкозу. Розрахуємо вміст глюкози у середовищі, необхідний для одержання 1,75 г/л тобраміцину.

Молекулярна маса тобраміцину становить 467. У 467 г тобраміцину міститься 216 г вуглецю, тоді у 1,75 г тобраміцину вміст вуглецю становить (1,75 × 216) / 467 = 0,8 г.

Далі розрахуємо, в якій кількості глюкози міститься ця кількість вуглецю. У 180 г глюкози міститься 72 г вуглецю, тоді 0,8 г вуглецю буде міститися в (180 × 0,8) / 72 = 2 г глюкози. Враховуючи, що при вирощуванні мікроорганізмів на глюкозі, близько 40 % субстрату окислюється до СО2 для одержання енергії, необхідної для конструктивного метаболізму, вміст глюкози в середовищі становитиме (2 × 0,4) + 2 = 2,8 г/л.

Потреби для синтезу біомаси. Припустимо, що у біомасі міститься 50 % вуглецю. Таким чином, у 2,5 г біомаси вміст вуглецю становить 1,25 г.

Розрахуємо кількість глюкози, необхідного для одержання 2,5 г/л біомаси. Молекулярна маса глюкози становить 180. Отже, у 180 г глюкози міститься 72 г вуглецю, тоді 1,25 г вуглецю буде міститися в (180 × 1,25) / 72 = 3,75 г глюкози. Враховуючи 40 % втрат субстрату на «холосте окиснення», для одержання 2,5 г/л біомаси, необхідно внести (3,75 × 0,4) + 3,75 = 5,25 г/л

Отже, загальний вміст глюкози в середовищі, необхідний для синтезу біомаси (2,5 г/л) і тобраміцину (1,75 г/л), становить 2,8 + 5,25 = 8,05 г/л.

Розрахунок вмісту в середовищі джерела азотного живлення

Потреби для синтезу біомаси. Припустимо, що в біомасі міститься 10 % азоту. Таким чином, у 2,5 г біомаси вміст азоту становить 0,25 г.

Для отримання тобраміцину в промислових умовах використовують середовище, яке містить як джерело мінерального азоту сульфат амонію (NH4)2SO4.

Розрахуємо кількість сульфату амонію, необхідного для одержання 2,5 г/л біомаси. Молекулярна маса (NH4)2SO4 становить 132. Отже, у 132 г сульфату амонію міститься 28 г азоту, тоді 0,25 г азоту буде міститися у (132 × 0,25) / 28 = 1,18 г солі.

Для одержання 2,5 г/л біомаси вміст (NH4)2SO4 у середовищі культивування повинен становити 1,18 г/л.

Потреби для синтезу тобраміцину. Азот входить до складу не тільки біомаси, але й тобраміцину. Розрахуємо вміст (NH4)2SO4 у середовищі, необхідний для одержання 1,75 г/л тобраміцину.

Молекулярна маса тобраміцину становить 467. У 467 г тобраміцину міститься 70 г азоту, тоді у 1,75 г тобраміцину вміст азоту становить (1,75 × 70) / 467 = 0,26 г.

Далі розрахуємо, в якій кількості сульфату амонію міститься ця кількість азоту. У 132 г сульфату амонію міститься 28 г, тоді 0,26 г азоту буде міститися в (132 × 0,26) / 28 = 1,2 г солі.

Тому, для одержання 1,75 г/л тобраміцину вміст сульфату амонію в середовищі буде становити 1,2 г/л.

Отже, загальний вміст сульфату амонію в середовищі, необхідний для синтезу біомаси (2,5 г/л) і тобраміцину (1,75 г/л), становить 1,18 + 1,2 = 2,28 г/л.

Розрахунок вмісту джерела фосфору в середовищі

У біомасі міститься близько 3 % фосфору. Отже, для синтезу 2,5 г/л біомаси вміст фосфору у середовищі повинен становити 2,5 × 0,03 = 0,075 г/л. Джерелом фосфору у промисловому виробництві тобраміцину є дигідрофосфат калію КН2РО4.

Розрахуємо кількість КН2РО4, необхідного для одержання 2,5 г/л біомаси. Молекулярна маса КН2РО4 становить 136. Отже, у 136 г дигідрофосфат калію міститься 31 г фосфору, тоді 0,075 г фосфору буде міститися у (136 × 0,075) / 31 = 0,3 г солі.

Для одержання 2,5 г/л біомаси вміст КН2РО4 у середовищі культивування повинен становити 0,3 г/л.

Склад поживного середовища для культивування продуцента тобраміцину

Наведені вище розрахунки щодо складу поживного середовища можна подати у вигляді таблиці.

Таблиця 1.1.

|  |  |
| --- | --- |
| Компоненти | Вміст г/л |
| Глюкоза | 8,05 |
| (NH4)2SO4 | 2,28 |
| КН2РО4 | 0,3 |

4.4 Обґрунтування способу проведення біосинтезу

Вибір способу проведення біосинтезу відіграє важливу роль в процесі росту мікроорганізмів. Наявні різні види культивування: глибинне, поверхневе, періодичне, безперервне [4].

До промислових способів культивування мікроорганізмів належать періодичне, безперервне культивування та культивування іммобілізованих клітин.

Найбільш поширений спосіб періодичного культивування. При даному способі інокулят вносять у поживне середовище, яке містить задану кількість всіх необхідних поживних речовин. При цьому ні один з істотних компонентів поживного середовища не надходить у систему у процесі культивування, тобто це закрита система [4].

Періодичне культивування застосовується як для поверхневих культур (на поверхні твердого поживного середовища), так і глибинних культур (в рідкому поживному середовищі). Зростання мікроорганізмів у поживному середовищі припиняється тоді, коли зміст якого-небудь з необхідних компонентів середовища досягає мінімуму або у середовищі накопичуються продукти метаболізму, що інгібують ріст мікроорганізмів.

Існує також напівбезперервне культивування, коли частина обсягу з біореактора час від часу вилучається при додаванні еквівалентного обсягу середовища. Це призводить до регулярного омолодження культури і до затримки її переходу до фази відмирання. Такий режим культивування в значній мірі уподібнюється безперервному процесу, тому називається також напівбезперервним культивуванням [4].

У безперервних процесах біооб'єкти постійно підтримуються в експоненційній фазі росту. Забезпечується безперервний приплив свіжого поживного середовища в біореактор і відтік з нього культуральної рідини, що містить клітини та продукти їх життєдіяльності. Фундаментальним принципом безперервних процесів служить рівновага між приростом біомаси за рахунок поділу клітин і їх зменшенням у результаті розведення свіжим середовищем.

Глибинне культивування мікроорганізмів має ряд очевидних переваг перед поверхневим, оскільки дозволяє значно скоротити виробничі площі, виключити важку непродуктивну ручну працю, покращити гігієну праці, спрощує механізацію та автоматизацію виробництва, робить можливим перехід на безперервний спосіб культивування. При глибинному способі культивування раціональніше використовуються поживні речовини середовищ, що дають можливість значно скоротити відходи виробництва у вигляді нерозчинних осадів твердого поживного середовища, отримувати препарати з меншим вмістом домішок і більшою питомою активністю. Глибинне культивування проводять у вертикальних герметичних ємностях різного розміру, що називаються ферментаторами [4].

При поверхневому культивуванні механізація процесу вирощування можлива шляхом створення безперервно діючих установок. В цьому випадку мікроорганізми вирощують на поверхні щільного середовища або в тонкому шарі рідкого середовища, і кисень надходить до них безпосередньо з повітря.

При поверхневому культивуванні важливо збільшити площу зіткнення середовища з повітрям. Для цього середовища наливають тонким шаром у посуд з широким дном - чашки Петрі, колби Виноградського, матраци. У рідких середовищах аеробні мікроорганізми часто ростуть, утворюючи на поверхні плівку. Факультативні анаероби розвиваються не тільки на поверхні, але і в товщі рідкого середовища, викликаючи більш-менш рівномірне її помутніння. Поверхневе культивування мікроорганізмів застосовується як в лабораторних умовах, так і в промисловості.

Недолік поверхневого способу - необхідність встановлення безлічі кювет, роботу з якими важко механізувати [4].

Отже, враховуючи всі ці дані, культивування S. tenebtarius проводимо глибинним методом. Тому, що цей мікрорганізм росте на рідкому поживному середовищі, потребує постійної аерації, частого технологічного контролю, також за глибинного методу культивування економляться виробничі площі.

4.5 Обгрунтування вибору ферментаційного обладнання

Промислове виробництво біопрепаратів являє собою складний комплекс взаємопов'язаних фізичних, хімічних, біофізичних, біохімічних, фізико-хімічних процесів і передбачає використання великої кількості різнотипного обладнання, яке пов'язане між собою матеріальними, енергетичними потоками і утворюють технологічні лінії. Основним апаратурним елементом біотехнологічного процесу є біореактор - ферментер. Біореактори призначені для культивування мікроорганізмів, накопичення біомаси, синтезу цільового продукту. Вони виготовляються з високолігірованних марок сталі, іноді з титану. Внутрішня поверхня біореактора повинна бути відполірована [3].

Всі форми та види ферментаційних систем створюються, маючи за основну мету забезпечення однакових умов для всіх компонентів що містяться в реакторі.

Вимоги щодо конструкції біореактора:

. Біореактор повинен бути сконструйований так, щоб виключити можливість попадання сторонніх мікроорганізмів, а також забезпечити збереження потрібної мікрофлори;

. Об’єм культивуємої суміші повинен залишатися постійним;

. Рівень розчинного кисню повинен підтримуватися вище критичних рівнів керування культури аеробних організмів;

. Параметри зовнішнього середовища, такі як температура, рН та інші повинні постійно контролюватися;

. Культура при вирощування має добре перемішуватися [3].

Типи ферментерів

. Апарати, які мають дифузор з турбіною

Установки цієї групи мають в центрі концентрично розташований дифузор з відкритою або закритою турбіною, що обертається. Вона може бути розміщена в різних місцях по висоті. Швейцарська фірма «Процес інженірінг» (фірма «Хемап») розробила універсальні мішалки з дифузорами [3]:

. лопатева мішалка - апарат без дифузору з відбійником;

. пропелерна мішалка дифузор з завуженням донизу, де і встановлений пропелер;

. розлихлююча мішалка для подрібнення міцелію − без дифузора з відбійником;

. емульгаційна мішалка − дифузор з отворами;

. циркуляційна мішалка − дифузор з теплообмінником та отворами;

. багатоступеневий реактор з великою кількістю двосторонніх колес − дифузор з отворами;

. багатоступеневий реактор з двосторонніми турбінами та циркуляційним пристроєм − два дифузора, внутрішній з отворами, зовнішній має теплообмінник.

У більшості випадків повітря подається під мішалку. Для збільшення контакту фаз газ-рідина під дифузором встановлюють кільцевий повітряний колектор. Апарати також можуть мати зовнішнє охолодження з установкою холодильника в циркуляційній лінії [3].

. Самовсмоктувальні апарати з дифузором

Самовсмоктувальна турбіна створює розрідження завдяки якому через полий вал з верхньої частини апарату та ззовні засмоктується повітря. Апарати даної системи знаходять застосування в установках невеликої потужності [3].

«Хемап», «Фогельбуш» [16].

Апарати з обертаючими аераторами

Згідно основного рівняння масопередачі газ-рідина: сумарна кількість переданої маси пропорційна загальній поверхні фазового контакту, яка в свою чергу обернено пропорційна діаметру пухирців. При обертанні барботера виникає додаткова сила, що збільшує силу відриву, яка виникає завдяки різниці відносних швидкостей поверхні барботера з отворами в рідині. Тобто зменшується поверхня пухирця і збільшується поверхня контакту фаз газ-рідина [3]. «Фогельбуш» [16].

. Ферментери з механічною мішалкою для стерильних процесів

Більшість продуктів мікробного синтезу отримують в герметичних ферментерах, які мають корпус та вал з мішалкою, барботер та відбійники, які працюють в умовах строгої стерильності.

Можливе як безперервне так і періодичне культивування. Для безперервного культивування апарати оснащуються приладами автоматичного безперервного аналізу та реєстрації параметрів, а також приладами автоматичного управління процесами культивування. Безперервне культивування може здійснюватися в хемостатному та турбідостатному режимі [3].«Хемап», «Біотек», «Джованола», та інші [16].

. Ферментери з циркуляційною системою аерації

Застосування ежекторів забезпечує розвинену поверхню фазового контакту повітря-рідина і тим самим сприятливі умови для росту мікроорганізмів. Ефективні для середовищ, яким властива мала здатність до утворення піни. Апарат складається з ферментеру та циркуляційного контуру, в який включені насос і один чи кілька ежекторів. На кінці нагнітального трубопроводу встановлено сопло. Рідина циркулює за допомогою насоса [3]. «Фогельбуш» [16].

. Апарати з введенням енергії керуючим газом (барботажні апарати)

Розвинену поверхню газ-рідина забезпечують керамічні аератори. Але в неї є головний недолік - дуже швидко забиваються пори. Розроблені апарати у вигляді резервуару з розташованими на його днищі повітророзподільними коробками прямокутного січення з перфорованими кришками та отворами 0,3 - 0,5 мм [3].

. Апарати з дифузором (газліфтні)

Найбільш широкого застосування набули апарати системи Лефрасуа-Марійє, які мають циліндричну форму з кільцевим щілинним аератором. Прилад для циркуляції рідини представляє собою систему труб, рівномірно розподілених по довжині окружності ємності. Повітророзподілячі встановлені під кожною трубкою. Газліфтні апарати слугують для отримання білку [3].

. Апарати з зовнішнім циркуляційним контуром

В цю групу включені апарати з зовнішнім циркуляційним контуром, окрім тих, в яких циркуляцію забезпечує насос. Їх можна розділити на дві груми:

апарати з циркуляцією, що забезпечується піноутворюючими властивостями ферментаційного середовища за схемою рідина-піна-рідина;

апарати з виносним аераційним приладом.

Апарати ефективні за умови досить високої циркуляції ферментаційної рідини [3].

. Колонні ферментери

Застосовані в хімічній промисловості колонні апарати застосовуються і в мікробіологічній промисловості. Це досить добрі масообмінні апарати, однак мають дуже складну внутрішню конструкцію, а середовище та мікроорганізми здатні утворювати плівки, що важко змиваються .Існує два основних напрямки розробки та застосування колон в мікробіології:

. організація багатоступеневого процесу за окремими тарілками;

. використання в якості апаратів повного перемішування [3].

Система перемішування є важливим класифікуючим принципом біореакторів різного типу.

За способом перемішування біореактори бувають [6]:

. Апарати з механічним перемішуванням

Ці реактори мають механічну мішалку з центральним валом та лопатями, число яких може бути рівне 6 , рідше 8. Лопаті можуть бути прямими чи вигнутими, часто їх розміщують в кілька ярусів, що забезпечує більш ефективне перемішування великих об’ємів рідини. В систему також входять перегородки − вузькі металічні пластинки, що закріпленні на внутрішній частині біореактора. Вони запобігають утворенню водоворотів та забезпечують віхровий рух рідини, що рівномірно розподіляються по всьому об’єму. Не можуть застосовуватися - при культивуванні міцеліальних грибів. В деяких ферментерах використовують полі-мішалки, в яких повітря потрапляє в середовище культивування через отвори у нижній частині валів [6].

. Апарати з пневматичним перемішуванням.

В такого виду реакторів мішалка відсутня і перемішування рідини здійснюється бульбашками газу. Однак, швидкість масообміну їх набагато нижчав ніж у біореакторів з мішалкою. Ці апарати ваблять простотою конструкції та малими енергозатрат ними показниками. Їх ще розділяють на еірліфтні та бульбашкового типу. Недолік - слабке перемішування [6].

. Апарати з циркуляційним перемішуванням.

Ці апарати мають насоси та ежектори, які створюють направлений тік рідини по замкнутому контуру. Ці ферментери часто оздоблюють «насадками», які забезпечують краще перемішування [6].

Механічне перемішування сумішей здійснюється лопатевими, пропелерними, турбінними та спеціальними мішалками. Класифікацію перемішуючих пристроїв для біогазових реакторів наведено на рис. 4.5.1 [6].

Турбінні мішалки оснащено лопатями, і вони мають чітко окреслений ротор. Залежно від способу кріплення лопатей і їх конфігурації в анаеробній біоконверсії зустрічаються різні типи турбінних мішалок. Найбільш простою та одночасно високоефективною є мішалка з прямими радіально розміщеними лопатями. Плоскі лопаті можуть бути нахилені під певним кутом відносно площини обертання мішалки для кращого перемішування субстрату. Пропелерні мішалки вважаються найбільш ефективними в тих випадках, коли необхідно створити значну циркуляцію субстрату в біогазовій установці при мінімальній витраті механічної енергії. Вони виконують цю задачу краще, ніж мішалки іншого типу, наприклад, турбінні. Пропелерні мішалки створюють осьову циркуляцію органічних відходів всередині реактора за рахунок насосного ефекту, тому вони легко піднімають тверді частинки з його дна [6].



Рис. 4.5.1. Класифікація перемішуючих пристроїв.

Лопатеві мішалки почали першими використовуватись в системах біоконверсії та в хімічній промисловості взагалі. На сьогодні вони використовуються у тих випадках, коли немає необхідності в інтенсивній радіально - осьовій циркуляції органічної суміші в біогазовій установці. Основною перевагою лопатевих мішалок є їх простота та низька вартість.

Якірні та рамні мішалки вирізняються виключно низьким числом обертів. Діаметр таких мішалок наближається до діаметра біогазового реактора, а зазор між лопаттю та стінкою реактора є незначним. Таким чином, у випадку застосування цих мішалок можна уникнути місцевого перегріву субстрату чи виникнення осаду на дні реактора [6].

Шнекові мішалки працюють за тим принципом, що і пропелерні, але при менших числах обертів. Вони застосовуються для перемішування сумішей значної в’язкості, зокрема для органічного субстрату всередині біогазової установки. В цьому випадку вони затрачають менше енергії, ніж пропелерні мішалки для створення однакової циркуляції субстрату в біореакторі. Використання дискових та скребкових мішалок в процесах біоконверсії є неефективним, тому майже не застосовується.

Отже, проаналізувавши всі види ферментерів, можна зробити висновок, що для культивування S. tenebrarius найефективнішим являється ферментер з механічним перемішуванням барботажного типу. Основною перевагою механічного перемішування є те, що можна легко змінювати технологічні умови та ефективно доставляти до зростаючих клітин повітря, що визначає характер розвитку мікроорганізмів і їх біосинтетичну активність. Для перемішування оберемо турбінну мішалку, оскільки турбінні мішалки забезпечують інтенсивне перемішування у всьому обсязі апарата. Потужність, споживана турбінними мішалками, що працюють в апаратах з відбивними перегородками, при турбулентному режимі перемішування практично не залежить від в'язкості середовища. Тому мішалки цього типу можуть застосовуватися для сумішей, в'язкість яких під час перемішування змінюється [6].

Проведення культивування S. tenebrarius передбачає забезпечення інтенсивного перемішування та аерації середовища. В обраному ферментері достатній рівень масообміну досягається встановленням відкритих та закритих турбінних мішалок та повітря, яке подається через барботер. Застосування відкритої турбінної мішалки розташованої над барботером також забезпечує високий рівень диспергування повітря, сприяючи збільшенню поверхні контакту фаз та коефіцієнту масопередачі. Крім того, продуцент утворює міцелій, який досить важливим для біосинтезу антибіотика, використання турбінної мішалки дозволяє уникнути значного пошкодження міцелію.

Запропонований апарат має високі масообмінні характеристики по кисню, в ньому легко можна варіювати режими перемішування та масообміну, забезпечується рівномірний розподіл мікроорганізмів та компонентів поживного середовища. Для забезпечення стерильності передбачено використання торцевих ущільнень валу перемішуючого пристрою з паровим захистом. Так вдається практично повністю запобігти потраплянню атмосферного повітря в апарат, що є дуже важливим для забезпечення асептичних умов культивування. Для створення в ферментері умов «повного відображення», для запобігання утворення обертального контура, котрий різко знижує інтенсивність перемішування, в апараті встановлюють перегородки (відбійники).

РОЗДІЛ 5. Характеристика біологічного агента

.1 Таксономічний статус біологічного агента

Мікроорганізми роду Streptomyces є найпоширенішими в природі актиноміцетами. Вони відомі як продуценти багатьох біологічно активних речовин, а саме антибіотиків, ферментів, вітамінів, лектинів, імуномодуляторів тощо. Легко змінюючись і пристосовуючись до різних умов мешкання, маючи великий набір ферментів, вони є активними деструкторами органічних речовин, відіграють велику ролі, у кругообігу речовин у природі, накопиченні та збереженні родючості ґрунтів [11].

Проблема систематики та ідентифікації мікроорганізмів завжди була однією з найважливіших для мікробіологів. Проте, незважаючи на більш ніж сторічний період відкриття і вивчення актиноміцетів та накопичений великий фактичний матеріал, досі не вдалося розробити єдину природну класифікацію цих мікроорганізмів. Це пояснюється, з одного боку, ототожнюванням видів з так званими типовими штамами стрептоміцетів, з іншого - описом нових видів без урахування внутрішньовидової мінливості. Дослідження показали, що завдяки мінливості в межах виду зустрічаються численні різновиди, які в дійсності є природними або штучними мутантами із властивостями, тією чи іншою мірою відмінними від материнського штаму. Ігнорування цього факту, а також певні труднощі у встановленні внутрішньопопуляційних зв'язків призвели до того, що виявилося значно простіше описати "новий" вид, ніж якомога точніше визначити походження нового штаму. Це й спричинило своєрідний феномен роду Streptomyces − згідно з різними джерелами літератури, цей рід на сьогодні нараховує від однієї до трьох тисяч і більше видів стрептоміцетів, в основному продуцентів антибіотиків. Опис більшості з них базується лише на типовому штамові [14].

На сьогодні маємо такий таксономічний статус S. tenebrarius згідно з II виданням Керівництва Бергі (табл. 5.1.1.) [17].

Таблиця 5.1.1.

Таксономічне положення актиноміцета згідно з II виданням Керівництва Бергі з систематики бактерій

|  |  |
| --- | --- |
| Відділ | Actinobacteria |
| Клас | Actinobacteria |
| Підклас | Actіnobacteridae |
| Порядок | Actinomycetales |
| Підпорядок | Streptomycineae |
| Родина | Streptomycetaceae |
| Рід | Streptomyces |
| Вид | Streptomyces tenebrarius |

5.2 Морфолого-культуральні ознаки

антибіотик тобраміцин біологічний промисловий

Актиноміцети − прокаріотна група одноклітинних мікроорганізмів, що утворюють гіфи або формують розвинений міцелій. Не дивлячись на морфологічні відмінності, актиноміцети віднесені до бактерій, так як для них характерні відсутність ядерної мембрани, малий діаметр клітин, ідентична хімічна природа клітинних стінок, бактеріальний тип джгутиків у рухливих бактерій [1].

Форма. Утворюють добре розвинений міцелій. Гіфи мають багато нуклеоїдів.

Розміри. Діаметр гіфів коливається в межах 0,5 - 1,5 мкм. Довжина ниток досягає декількох міліметрів.

Розмноження. Міцелій може бути стабільним або розпадатися на паличкоподібні та кокоподібні елементи. Якщо міцелій зберігається, то утворюються спори, за допомогою яких відбувається розмноження. Спори можуть утворюватися по одній, парами або ланцюжком з різної кількості клітин на повітряних чи субстратних гіфах (спороносцях), рідше - в спорангіях. Спороносці відрізняються довжиною (короткі, довгі), формою (прямі, зігнуті, спіральні), кількістю завитків, діаметром спіралей, розміщенням (рис.2.1).



Рис.5.2.1. Форми спороносців:

а - пряма, б - звивиста, в - пучковидна, г - первинні спіралі, д - відкриті спіралі, е - закриті спіралі, ж - міцелій актиноміцета [1].

Характерні морфологічні ознаки S. tenebrarius виявляють, продивляючись його при малому збільшенні безпосередньо на щільному середовищі в чашках Петрі. При цьому можна знайти субстратний міцелій, що розвивається в товщі агаризованого середовища, і повітряний, що розростається над поверхнею.

Для фіксації і фарбування міцелію використовують метод Грама. Здатність мікроорганізмів зафарбовуватись по методу Грама є важливою таксономічною ознакою, за якою всі бактерії ділять на дві групи: грампозитивні і грам негативні. S. tenebrarius належить до грампозитивних бактерій.

На агаризованих середовищах S. tenebrarius утворює щільні, компактні колонії різної структури і внутрішньої будови - гладкі, оксамитові, бугруваті, складчасті, плоскі, зморшкуваті. Колонії міцно вростають в середовище за допомогою субстратного міцелію. Колонії і особливо їх зрілий повітряний міцелій можуть бути не зафарбовані або пігментовані (сині, фіолетові, рожеві, помаранчеві, жовті), іноді з характерним землистим запахом [1].

5.3 Фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента

.tenebrarius по відношенню до кисню облігатний аероб, характерний окислювальний тип метаболізму. Катаболізм глюкози, що міститься в поживному середовищі, здійснюється за гліколітичним шляхом. Ключовими ферментами в даному процесі є фосфофруктокіназа та піруваткіназа.

Росте на середовищі з концентрацією солей солей 5 % і може рости в діапазоні рН = 5,5 - 8,0, з оптимумом рН = 7,0. Типом живлення, характерний для даного актиноміцета − хемоорганотрофія [15].

При вивченні даних ознак досліджують: ферментативну активність (розрідження желатини, казеїну, наявність целюлози, каталази, інвертази, реакцію побуріння, відновлення нітратів), асиміляцію джерел живлення (цукри, спирти, органічні кислоти), ріст на синтетичних середовищах з нітратами як єдиним джерелом азоту, потреба амонійного азоту, характер продуктів метаболізму і утворення антибіотичних речовин.

Йому властива природна множинна стійкість до антибіотиків. У більшості випадків детермінанти стійкості актиноміцетів до власного антибіотика та гени його біосинтезу зчеплені та координовано регулюються. Ідентифікація та клонування генів резистентності до власного антибіотика є, зазвичай, першим кроком у дослідженні генів біосинтезу антибіотиків. Одним із головних чинників, що лімітують біосинтез цих речовин, є ступінь резистентності штаму як до власного токсичного продукту, так і до інших антибіотиків. Встановлення закономірностей генетичного контролю стійкості актиноміцетів до антибіотиків та його ролі у біосинтезі має важливе значення для глибшого розуміння механізмів цих явищ, а також для розробки методів конструювання і селекції промислових продуцентів антибіотиків [1].

Однією з особливостей S. tenebrarius є його висока спонтанна мінливість. Гени стійкості до антибіотиків стали зручною моделлю для вивчення механізмів нестабільності генома актиноміцетів. Їх дослідження допомагає краще зрозуміти закономірності організації генома актиноміцетів та його мінливості. Воно має також важливе практичне значення, оскільки найчастіше нестабільними є ознаки, за якими проводиться селекція актиноміцетів [1].

Найважливішим продуцентом тобраміцину який володіє підвищеною продуктивною здатністю до синтезу даного антибіотика, є S. tenebrarius TD 507. Даний штам було отримано зі штаму S. tenebrarius ATCC 17920 дією на нього ультрафіолетового випромінення. Також, штам S. tenebrarius TD 507 можна отримати дією N-метил-N-нітро-нітрозогуанідину. Даний штам здатний синтезувати 1,75 − 2 г/л даного антибіотика [15].

РОЗДІЛ 6. Опис технологічного процесу біосинтезу тобраміцину

.1 Підрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Загальний об’єм ферментера, в якому здійснюється культивування продуцента антибіотика тобраміцину - Streptomyces tenebrarius, 20 м3 Коефіцієнт заповнення Кзап. = 0,7. Звідси слідує, що робочий об’єм ферментера:

роб. = Vзаг. × Кзап = 20 × 0,7 = 14 м3 = 14000 л.

Визначаємо кількість стадій підготовки посівного матеріалу, для приготування 14000 л культуральної рідини. Кількість посівного матеріалу становить близько 10 % від загального об’єму поживного середовища.

Для приготування 14000 л культуральної рідини, потрібно: 14000 × 0,1 = 1400 л посівного. Таку кількість посівного можна приготувати у ферментері об’ємом 2 м3.

Щоб приготувати 1400 л культуральної рідини, потрібно мати: 1400 × 0,1 = 140 л посівного матеріалу. Таку кількість посівного можна приготувати у ферментері об’ємом 250 л.

140 л культуральної рідини можна приготувати, засіявши поживне середовище 140 × 0,1 = 14 л посівного матеріалу (приготування здійснюють у ферментері об’ємом 30 л).

Щоб приготувати 14 л культуральної рідини, потрібно мати: 14 × 0,1 = 1,4 л посівного матеріалу. Таку кількість посівного можна приготувати на качалочних колбах.

Тобто, процес підготування поживного середовища проходитиме в 4 етапи, п’ятим етапом буде сам процес біосинтезу.

6.2 Опис технологічного процесу

ДР-1.1. Підготовка персоналу до роботи

Персонал одягнений в технологічний одяг. Переміщення і ходіння персоналу обмежене. У виробничих приміщеннях забороняється прийом їжі.

Не рідше 1 разу на квартал персонал проходить технологічний інструктаж за вимогами, які висуваються до нього при роботі на даному виробництві з відповідним записом у журналі.

Особисті речі (пальто, плащі, головні убори, вуличне взуття) обслуговуючий персонал знімає в гардеробній, одягає перехідний одяг (халат, тапочки) й прямує до умивальної.

В умивальнії кімнаті миють руки під краном теплою водою до двох хвилин, використовуючи мило туалетне або дитяче, при необхідності використовують щітки для обробки білянігтевого простору. Для видалення мила руки ополоскують теплою водою і висушують електрорушником або стерильною серветкою і обробляють 76% етиловим спиртом.

Після обробки рук персонал одягає технологічний одяг.

ДР-1.2. Підготовка технологічного одягу

Перед пранням використаного одягу, необхідно провести його ретельний огляд. Це проводиться для того щоб запобігти нещасним випадкам.

Прання одягу проводиться після його огляду. Умови прання такі: температура 90 °С протягом 30 хв.

ДР-1.3. Підготовка миючих та дезінфікуючих розчинів

ДР-1.3.1. Підготовка перекису водню

Для обробки приміщень, повітроводів, обладнання використовують 0,5-6% розчин перекису водню з додаванням 0,5% миючого засобу.

ДР-1.3.2. Приготування хлораміну Б

Для знезараження підлоги застосовують також 1 або 2% розчин хлораміну Б. Для приготування 1 л робочого розчину хлораміну Б наливають відповідно 990 або 980 мл очищеної теплої води і розчиняють в ній відповідно 10 або 20 г хлораміну Б. Розчин готують для разового застосування.

ДР-1.3.3. Приготування розчину каустичної соди

Для миття та дезінфекції обладнання використовується 2% розчин каустичної соди. Для прикотування 1 л розчину беруть приблизно 20г сухої каустичної соди і додають близько 980мл води. Приготований розчин зберігають у герметично закритому скляному посуді в прохолодному місці.

ДР-1.4. Підготовка виробничих приміщень

ДР-1.4.1. Щоденне прибирання

Щодня проводять прибирання підлоги із застосуванням 3% розчину водню перекису і 0,5% миючого засобу з розрахунку 150-170 мл розчину на 1 м2. Для знезараження підлоги, поряд з розчином перекису водню і миючого засобу, використовують 1 або 2% розчин хлораміну Б.

Панелі, стіни, двері виробничих приміщень щодня протирають вологою хлопчасто-паперовою тканиною, змоченою в 3% розчині перекису водню з 0,5% миючого засобу. Особливо ретельно протирати ручки і нижні частини дверей.

Внутрішню скляну поверхню рам промивають і протирають у міру забруднення.

Для знезараження поверхні стін, підлоги, стелі, обладнання, а також повітря мікробіологічної лабораторії використовують бактерицидні лампи. Після проведення дезинфікуючою обробки приміщення звільняють від персоналу і включають настельні бактерицидні лампи не менше ніж на 2 години. Вимикачі для відкритих бактерицидних ламп розміщені поза опромінюваним приміщенням з сигнальним написом "Увімкнені бактерицидні лампи". Через кожні 2-3 години роботи ламп їх вимикають на 1,0-1,5 години. Встановлена потужність відкритих ламп не перевищує 2,0-2,5 Вт потужності на 1 м3 приміщення.

ДР-1.4.2. Генеральне прибирання

Генеральне прибирання виробничих приміщень проводять не рідше 1 разу на тиждень. Прибирають підлоги, стіни, стелі, повітроводи, підвіконня, поверхні всього обладнання, комунікації, всі виробничі меблі. В якості дезінфікуючих розчинів використовують 5% розчин водню перекису з додавання 0,5% миючого засобу, 1 або 2% розчин хлораміну Б (для обробки підлоги), нагрітий до температури 40-50 ° С.

Допоміжні приміщення (відділення водопідготовки і підготовки повітря, побутові приміщення) піддають обробці аналогічно виробничим приміщенням з періодичністю не рідше 1 разу на місяць.

Проводять обробку приміщень у гумових рукавичках, окулярах, респіраторі, гумових чоботях і фартуху.

Мікробіологічний контроль проводить мікробіолог за допомогою змивів стерильними тампонами не рідше 1 разу на тиждень під час виробничого процесу і за 1,5 год до початку роботи.

У змивах з 100 см2 поверхні допускається не більше 10 колоній неспороутворюючих мікроорганізмів на 2-х чашках Петрі.

У разі виявлення в повітрі і змивах приміщень грибів або спороутворюючої мікрофлори концентрацію водню перекису слід збільшити до 5%. Також необхідно чергувати дезінфікуючі засоби з метою уникнення утворення стійких форм мікроорганізмів.

ДР-1.5. Підготовка обладнання та комунікацій

ДР1.5.1. Зняття з’ємних частин обладнання та їх миття

З'ємні частини (вузли) обладнання, що безпосередньо стикаються з лікарськими речовинами або засобами, слід зняти, розібрати і ретельно вимити в розчині миючого засобу.

ДР1.5.2.Миття і дезінфікування обладнання

Через технологічне обладнання та комунікації пропускають миючий засіб. З'ємні частини (вузли) обладнання вимиваються в розчині миючого засобу при температурі 70-80 °С.

Один раз на місяць проводять обробку ферментеру 2% розчином каустичної соди. Для цього в ферментер по завантажувальній лінії з відділення приготування поживного середовища подають розчин каустичної соди за температури 20 °С, після чого ферментер заповнюють водою до необхідного рівня. Розчин каустичної соди в ферментері перемішують за допомогою мішалки чи подачею повітря через барботер упродовж 15 хв. Після дезинфекції обладнання ретельно промивають питною водою. В усіх цехах виробництва повинні бути розроблені графіки періодичного очищення та миття всього технологічного обладнання.

ДР1.5.3. Перевірка на герметичність

Перевірку обладнання на герметичність проводять після проведення всіх ремонтних та перевірочних робіт. Ємкісне обладнання на герметичність перевіряють при повітряному тиску 0,5-0,6 МПа. Якщо упродовж 30 хв тиск (за манометром) не знижується, обладнання вважають герметичним. Фланцеві з’єднання та зварні шви перевіряють на герметичність за допомогою мильної води при повітряному тиску від 0,5 до 0,6 МПа.

Герметичність парових вентилів перевіряють на дотик. Обов’язково раз на тиждень на герметичність перевіряють посівну лінію з усуненням усіх можливих пропусків. Під паровим тиском перевіряють всі матеріальні, посівні і конденсатні вентилі та трубопроводи.

ДР1.5.4.Стерилізація.

Після перевірки обладнання та комунікацій на герметичність, подають гостру пару Т=125-130°С, Р=0,2МПа.

По закінченні стерилізації зупиняють подачу гострої пари, ставлять всі вузли під паровий захист та знижують тиск. При зниженні тиску проводять охолодження до температури 90 ºС.

ДР-2 Підготовка стерильного повітря

ДР-2.1. Забір атмосферного повітря

Атмосферне повітря забирають через забірну шахту на висоті 30 м.

ДР-2.2. Очищення на фільтрі грубої очистки

Попередню очистку повітря здійснюють у чарунковому фільтрі. При проходженні повітря через фільтр грубого очищення, пил та механічні частки з повітря осідають, а очищене повітря надходить у компресор. Ступінь очищення становить Е = 80 %.

ДР-2.3. Стабілізація термодинамічних показників повітря

При стисканні повітря у компресорі його температура підвищується з 15-25 ºС на вході в повітродувку до 90 ºС на виході з неї. Перед подачею в головний фільтр повітря охолоджують.

Після компресора повітря має наступні характеристики : Р = 0,35-0,5 МПа, t = 60 0С, W = 60 %.

ДР-2.4. Очищення повітря в фільтрі тонкої очистки

Попереднє очищення повітря від пилу та мікроорганізмів здійснюється в головному фільтрі. Головний фільтр представляє собою циліндричну ємність з сферичним дном та кришкою. В середині фільтру знаходяться дві решітки, між якими розміщають фільтруючий матеріал. Заміна фільтрувального матеріалу проводять 2 рази на рік. У разі забруднення, зволоження, інфікування фільтруючого матеріалу проводять позачергову його заміну.

Охолоджене повітря, проходячи крізь шар базальтового волокна, очищається від пилу та мікроорганізмів. Ступінь очищення становить Е = 99,5%.

ДР-2.5. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Заключна стадія очищення повітря від контамінантів здійснюється в індивідуальному фільтрі.

Як фільтруючий матеріал використовують фторопластові втулки, товщиною 4 мм. Фільтр являє собою металевий циліндр з кришкою та конічним дном. Ступінь очищення становить Е = 99,99%.

ДР-3. Підготовка допоміжних речовин

ДР-3.1. Приготування розчину соляної кислоти

Для запобігання випаданню фосфорних солей в осад, при їх сумісній стерилізації із солями Mg i Ca, використовується 6 % розчин HCl.

ДР-3.2. Приготування розчину гідроксиду натрію

% розчин NaOH готується для подальшої стабілізації рН середовища.

ДР-3.2.1. Стерилізація розчину гідроксиду натрію

Стерилізацію здійснюють в автоклаві при температурі 131 °С протягом 40 хв.

ДР-4. Приготування компонентів поживного середовища

Перед приготуванням середовища усі компоненти стерилізуються. Режим стерилізації залежить від природи речовини.

ДР-4.1. Приготування компонентів поживного середовища для качалочних колб

Враховуючи склад поживного середовища, потрібно обрахувати кількість всіх компонентів для приготування 1,4 л.

Склад поживного середовища г/л:

Глюкоза - 8; розчин 1

(NH4)2SO4 - 2; розчин 2

КН2РО4 - 0,08;×7H2O - 0,5; розчин 3- 2; ×7H2O - 10 мг/л;×7H2O - 10 мг/л;×H2O - 0,2 мг/л; розчин 4×5H2O - 0,02 мг/л;×6H2O - 0,02 мг/л;

ДР-4.1.1. Приготування і стерилізація розчину 1

Приготування розчину 1:

Глюкоза: 2 г - 1000л

х г - 1400мл; х = 11,2 г.

Готуємо 40 % розчин глюкози: 0,4 = 11,2 г/ х мл; х = 28 мл ≈ 30 мл.

Таким чином, 11,2 г глюкози розчиняємо в 30 мл дистильованої води. Стерилізуємо розчин в автоклаві при таких параметрах: Т = 112 °С, р = 0,5 атм, t = 30 хв.

ДР-4.1.2. Приготування і стерилізація розчину 2

Приготування розчину 2.

(NH4)2SO4: 2 г - 1000 мл

х г - 1400 мл; х = 2,8 г.

КН2РО4: 0,08 г - 1000 мл

х г - 1400 мл; х = 0,112 г

Розчин 2 готуємо в 600 мл дистильованої води. Стерилізацію проводимо при температурі 131 °С, р = 1,5 атм, протягом 40 хв.

ДР-4.1.3. Приготування і стерилізація розчину 3

Приготування розчину 3:×7H2O: 0,5 г - 1000 мл

х г - 1400 мл; х = 0,7 г: 2 г - 1000 мл

х - 1400 мл; х = 2,8 г.

Наважки солей зважуємо і розчиняємо в 750 мл водопровідної води. Стерилізацію розчину солей проводимо в автоклаві при таких параметрах: Т = 131 °С, р = 1,5 атм, t = 40 хв.

ДР-4.1.4. Приготування і стерилізація розчину 4

Приготування розчину 4:

Розчин 4 у своєму складі містить мікроелементи. На 100 мл поживного середовища вноситься приблизно 1 мл мікроелементів. Тобто, на 1400 мл поживного середовища потрібно внести близько 14 мл розчину 4. Для приготування потрібно: ×7H2O: 10мг - 1000 мл

х мг - 1400 мл; х = 14 мг.×7H2O: 10мг - 1000 мл

х мг - 1400 мл; х = 14 мг.×H2O: 0,2 мг - 1000 мл

х мг - 1400 мл; х = 0,28 мг.×5H2O: 0,02 мг - 1000 мл

х мг - 1400 мл; х = 0,028 мг.×6H2O: 0,02 мг - 1000 мл

х мг - 1400 мл; х = 0,028 мг.

Розчин готуємо у 20 мл дистильваної води. Стерилізацію розчину 4 проводимо в автоклаві при таких параметрах: Т = 131 °С, р = 1,5 атм, t = 40 хв .

ДР-4.2. Приготування компонентів поживного середовища для ферментера об’ємом 30 л.

Наступним етапом є приготування 14 л посівного матеріалу, для цього необхідно приготувати поживного середовища:

л - 1,4 л = 12,6 л, де 1,4 л - кількість посівного матеріалу із попереднього етапу.

Для приготування такої кількості поживного середовища потрібно:

Розчин 1: 1,4 л - 30 мл

,6 л - х; х = 270 мл;

Розчин 2: 1,4 л - 600 мл

,6 л - х ; х = 5400 мл = 5,4 л;

Розчин 3: 1,4 л - 750 мл

,6 л - х ; х = 6750 мл = 6,75 л;

Розчин 4: 1,4 л - 20 мл

,6 л - х; х = 180 мл;

ДР-4.2.1. Приготування і стерилізація розчину 1

Для приготування розчину 1 потрібна така кількість глюкози, аби отримати 40 % розчин: 30 мл - 11,2 г

мл - х; х = 100,8 г;

Тому, 100,8 г глюкози розчиняємо у 270 мл дистильованої води. Розчин стерилізуємо при Т = 112 °С, р = 0,5 атм, t = 30 хв.

ДР-4.2.2. Приготування і стерилізація розчину 2

Для приготування розчину 2, потрібно:

(NH4)2SO4: 1 л - 2 г

,6 л - х; х = 25,2 г.

КН2РО4: 1 л - 0,08 г

,6 л - х; х = 1 г;

Солі розчиняємо у дистильованій воді і стерилізуємо в автоклаві при таких умовах: Т = 131 °С, р = 1,5 атм, t = 40 хв.

ДР-4.2.3. Приготування і стерилізація розчину 3

Для приготування розчину 3 потрібно:×7H2O: 1 л - 0,5 г

,6 л - х; х = 6,3 г;: 1 л - 2 г

,6 л - х; х = 25,2 г;

Розчин готуємо на водопровідній воді. Стерилізацію проводимо в автоклаві: Т = 131 °С, р = 1,5 атм, t = 40 хв.

ДР-4.2.4. Приготування і стерилізація розчину 4

Для приготування розчину 4 потрібно: ×7H2O: 1 л - 10 мг

,6 л - х; х = 126 мг;×7H2O: 1 л - 10 мг

,6 л - х; х = 126 мг;×H2O: 1 л - 0,2 мг

,6 л - х; х = 2,52 мг;×5H2O: 1 л - 0,02 мг

,6 л - х; х = 0,252 мг;×6H2O 1 л - 0,02 мг

,6 л - х; х = 0,252 мг;

Стерилізацію розчину 4 проводимо в автоклаві при таких параметрах: Т = 131 °С, р = 1,5 атм, t = 40 хв.

ДР-4.3. Приготування компонентів поживного середовища для ферментера об’ємом 250 л

Далі потрібно приготувати 140 л посівного матеріалу, для цього потрібно поживного середовища: 140 л - 14 л = 126 л, де 14 л - кількість посівного матеріалу із попереднього етапу.

ДР-4.3.1. Приготування і стерилізація розчину глюкози

Розчин глюкози: 12,6 л - 270 мл

л - х; х = 2,7 л ≈ 3 л;

г глюкози розчиняємо у 3 л дистильованої води. Стерилізацію проводимо у автоклаві при Т = 112 °С, р = 0,5 атм, t = 30 хв.

ДР-4.3.2. Приготування і стерилізація солей поживного середовища

Для приготування 126 л поживного середовища, потрібна така кількість солей:

(NH4)2SO4 − 252 г;

КН2РО4 − 10 г;×7H2O - 63 г;− 252 г; ×7H2O - 1,26 г;×7H2O − 1,26 г;×H2O − 25,2 мг;×5H2O - 2,5 мг;×6H2O - 2,5 мг;

Наважки солей завантажуються у ферментер місткістю 250л і заливаються 123 л водопровідної води. Для запобігання випадання фосфорних солей в осад, рН середовища доводиться до значення 4,5 - 5 за допомогою 6 % HCl. Параметри стерилізації такі: Т = 131 °С, р = 1,5 атм, t = 40 хв . Після стерилізації розчин охолоджується і його рН доводиться до значення 7,0 за допомогою стерильного 10 % розчину NaOH.

ДР-4.4. Приготування компонентів поживного середовища для ферментера об’ємом 2000 л

Далі потрібно приготувати 1400 л посівного матеріалу. Для цього потрібно поживного середовища: 1400 л - 140 л = 1260 л.

ДР-4.4.1. Приготування і стерилізація розчину глюкози

Для приготування такої кількості поживного середовища потрібна така кількість глюкози:

л - 2,7 л

л - х; х = 27 л;

кг глюкози розчиняємо у 27 л дистильованої води. Стерилізацію проводимо при Т = 112 °С, р = 0,5 атм, t = 30 хв. у окремому збірнику об’ємом 50 л, який має рубашку, для регулювання температури.

ДР-4.4.2. Приготування і стерилізація солей поживного середовища

Для приготування 1260 л поживного середовища, потрібна така кількість солей:

(NH4)2SO4 − 2,5 кг;

КН2РО4 − 100 г;

MgSO4×7H2O - 630 г;− 2,5 кг.

ZnSO4 ×7H2O - 12,6 г;×7H2O − 12,6 г;×H2O − 252 мг;×5H2O - 25 мг;×6H2O - 25 мг;

Наважки солей завантажуються у ферментер місткістю 2000 л і заливаються 1233 л водопровідної води. Для запобігання випадання фосфорних солей в осад, рН середовища доводиться до значення 4,5 - 5 за допомогою 6 % HCl. Параметри стерилізації такі: Т = 131 °С, р = 1,5 атм, t = 40 хв . Після стерилізації розчин охолоджується і його рН доводиться до значення 7,0 за допомогою стерильного 10 % розчину NaOH.

ДР-4.5. Приготування компонентів поживного середовища для ферментера об’ємом 20000 л

Для процесу біосинтезу потрібна така кількість поживного середовища: 14000 л - 1400 л = 12600 л.

ДР-4.5.1. Приготування і стерилізація розчину глюкози

Потрібно приготувати глюкози:

л - 27 л

л - х; х = 270 л;

кг глюкози розчиняємо у 270 л дистильованої води. Стерилізацію проводимо при Т = 112 °С, р = 0,5 атм, t = 30 хв. у окремому збірнику об’ємом 500 л , який має рубашку, для регулювання температури.

ДР-4.5.2. Приготування і стерилізація солей поживного середовища

Для приготування 12600 л поживного середовища, потрібна така кількість солей:

(NH4)2SO4 − 25 кг;

КН2РО4 − 1 кг;

MgSO4×7H2O - 6,3 кг;− 25 кг;

ZnSO4 ×7H2O - 126 г;×7H2O − 126 г;×H2O − 2,52 г;×5H2O - 250 мг;×6H2O - 250 мг;

Наважки солей завантажуються у ферментер місткістю 20000 л і заливаються 1233 л водопровідної води. Для запобігання випадання фосфорних солей в осад, рН середовища доводиться до значення 4,5 - 5 за допомогою 6 % HCl. Параметри стерилізації такі: Т = 131 °С, р = 1,5 атм, t = 40 хв . Після стерилізації розчин охолоджується і його рН доводиться до значення 7,0 за допомогою стерильного 10 % розчину NaOH.

ДР-5. Підготовка і стерилізація піногасника

ДР-5.1. Приготування піногасника

В якості піногасника використовується полімер плюронік. Завантажується необхідна кількість для стерилізації.

ДР-5.2. Стерилізація піногасника

Стерилізацію проводять при 120 ºС протягом 30 хвилин, Р = 0,075 МПа.

ТП-6. Підготовка посівного матеріалу

Для засівання готують посівний матеріал глибинним способом.

ТП-6.1. Приготування 1,4 л інокуляту Streptomyces tenebrarius

В колбу місткістю 2 л зливаємо стерильні розчини 1, 2, 3, 4 від ДР-4.1.1., ДР-4.1.2., ДР-4.1.3., ДР-4.1.4.. Розливаємо дане поживне середовище по 100 мл в попередньо простерилізовані качалочні колби місткістю 750 мл. В стерильних умовах в кожну качалочку колбу вносимо посівну культуру зі скошеного агаризованого середовища в пробірках (14 пробірок з культурою). Колби ставимо на качалки з частотою обертання 120 об/хв. При температурі 37 °С протягом 2 діб. Значення рН = 6,8.

ТП-6.2. Приготування 14 л інокуляту

Стерильні розчини 1, 2, 3, 4 від ДР-4.2.1., ДР-4.2.2., ДР-4.2.3., ДР-4.2.4. зливаємо у попередньо простерилізований ферментер місткістю 30 л в стерильних умовах (зливаємо у зливний бачок при палаючому факелі). Потім вносимо 1,4 л посівного матеріалу, приготовленого на попередньому етапі. Культивування проводиться протягом 2 діб при Т = 37 °С, рН = 6,8 при постійному перемішуванні і аерація.

ТП-6.3. Приготування 140 л інокуляту

Даний етап проводять у ферментері об’ємом 250 л. Після змішування всіх компонентів середовища, додається посівний матеріал зі стадії ТП 6.2. Приготування посівного проводиться при Т = 37 ºС, t = 48 год, рН = 6,8.

ТП-6.4. Приготування 1400 л інокуляту

Для приготування даної кількості посівного матеріалу, до простерилізованого розчину солей додається стерильний розчин глюкози, що стерилізувався в окремому збірнику, ферментер, об’єм якого 20000 л , далі дадається інокулят у кількості 140 л з попередньої стадії. Посівний готується при Т = 37 ºС, t = 48 год, рН = 6,8.

ТП-7. Виробниче культивування

ТП-7.1. Виробниче культивування

До загального об’єму стерильного розчину солей подаємо розчин глюкози і засіваємо середовище приготовленим на попередньому етапі інокулятом (1400 л).

Культивування проводиться протягом 5 діб при Т = 37 °С, рН = 6,8 при постійному перемішуванні і подачі очищеного повітря.

6.3 Контроль виробництва

Згідно науково-технічної документації на підприємстві забезпечується контроль процесу виробництва антибіотика та контроль готової продукції. Це здійснюється для забезпечення відповідності готової продукції вимогам.

Упродовж всього процесу виробництва продукту, неюхідно проводити контроль санітарного стану цехів та робочих місць, відповідність сировини, допоміжних матеріалів, та ін.

Таблиця 6.3.1.

Карта постадійного контролю

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Номер контрольної точки та назва стадії | Об’єкт контролю і показник, що визначається | Методи контролю | Періодичністьперевірки та порядок відбору проб | Нормативна характеристика показника, щовизначається |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| К1.1. Технологічний контроль приготування розчину перекису водню | Концентрація розчину перекису водню | Фізичні методи визначення концентрації | Після приготування розчинів | С = 3 % для щоденного прибирання та для генерального прибирання приміщень |
| К 1.2. Технологічний контроль приготування розчину хлораміну Б | Концентрація розчину хлораміну Б | Фізичні методи визначення концентрації | Після приготування розчинів | С = 2 % |
| К1.3. Технологічний контроль приготування розчину каустичної соди | Концентрація розчину | Фізичні методи визначення концентрації. | Після приготування розчинів. | С = 2 % |
| К 1.4., К 1.4.1. Мікробіологічний контроль виробничих приміщень | Мікробіологічна чистота поверхонь виробничихприміщень (стіни, підлога, двері), | Змиви тампонами або метод відбитків | Щоденне прибирання. 1 раз на тиждень. | В змивах з площею 10 х 10 см допускається ріст не більше 50 мікроорганізмів (бактерій і грибів сумарно); |
| К1.5. Технологічний контроль миття обладнань та комунікацій | Температура та час | Термометр технічний, годинник | Під час проведення миття | Т= 70 oC t = 10 хв |
| К1.6. Технологічний контроль герметичності обладнання | Тиск | датчик | Після миття та ополіскування обладнання | Р=0,5 - 0,6 МПа, t = 30 хв |
| К1.6. Мікробіологічний та технологічний контроль стерилізації обладнання та комунікацій | Режим стерилізації вузлів обладнання. Тиск. Температура. Мікробна контамінація. | Манометр технічний Термометр Мікробіологічний метод, висіви на чашки Петрі | Температура та тиск визначаються безперервнопід час виробничогопроцесу. | p = 0,2 МПа t = 130oC  |
| К2.1. Технологічний контроль після фільтру грубої очистки | Ступінь чистоти | Часточки бруду; манометр | Пезперервно при подачі повітря | Е = 80 % |
| К2.2.Технологічний контроль при стабілізації термодинамічних показників повітря | Температура | Темометр | Беспосере дньо під час нагрівання | T = 70 - 90 ˚С |
| К2.3. Технологічний та мікробіологічний контроль стерильності повітря після тонкого очищення | Повітря, вміст мікроорганізмів та часток | Мікробна контамінаці; метод визначення (проба повітря КУО/м3) Седиментаційний (седиментація на пластинку КУО/м3) | Під час кожної зміни, під час виробничого біосинтезу | Не повинно бути життєздатних мікроорганізмів, та максимально допустиме число часток в 1м3 повітря 200. Е = 99,5% |
| К2.4. Технологічний контроль повітря після очищення в індивідуальному фільтрі | Ступінь чистоти | Часточки бруду; манометр  | Пезперервно при подачі повітря | Е = 99,999 % |
| К3.1. Технологічний контроль при приготуванні соляної кислоти | Концентрація соляної кислоти | Фізико-хімічний метод | Після приготування розчину | С = 6 %  |
| К3.2. Технологічний контроль приготування розчину гідроксиду натрію | Концентрація гідроксиду натрію | Фізико-хімічний метод | Після приготування емульсії | С = 10 % |
| К3.3.Мікробіологічний та технологічний контроль стерилізації розчину гідроксиду натрію | Режим стерилізації розчину. Температура. Час Мікробна контамінація. | Технічний термометр годинник чашки Петрі | Температура визначаються безперервно під час стерилізації. Автоматичний регулятор температури Мікробіологічний метод, розведення та висів на МПА | Т = 131˚С, t = 30 хв Після стерилізації присутність м.о. не допускається. |

К4.1.Мікробіологічний та технологічний контроль приготування та стерилізації розчину 1 Режим стерилізації розчину глюкози Температура Час Мікробна контамінація Технічний термометр годинник чашки Петрі Температура визначається безперервно під час стерилізації. Автоматичний регулятор температури Мікробіологічний метод, розведення та висів на МПА С = 40 % T = 112˚С, t = 30 хв

|  |
| --- |
| Після стерилізації присутність м.о. не допускається. |

К4.2.Мікробіологічний та технологічний контроль приготування та стерилізації розчину 2 Режим стерилізації розчину глюкози Температура Час Мікробна контамінація Технічний термометр годинник чашки Петрі Температура визначається безперервно під час стерилізації. Автоматичний регулятор температури Мікробіологічний метод, розведення та висів на МПА T = 131˚С, t = 40 хв

|  |
| --- |
| Після стерилізації присутність м.о. не допускається. |

К4.3.Мікробіологічний та технологічний контроль приготування та стерилізації розчину 3 Режим стерилізації розчину глюкози Температура Час Мікробна контамінація Технічний термометр годинник чашки Петрі Температура визначається безперервно під час стерилізації. Автоматичний регулятор температури Мікробіологічний метод, розведення та висів на МПА T = 131˚С, t = 40 хв

|  |
| --- |
| Після стерилізації присутність м.о. не допускається. |

К4.4.Мікробіологічний та технологічний контроль приготування та стерилізації розчину 4 Режим стерилізації розчину глюкози Температура Час Мікробна контамінація Технічний термометр годинник чашки Петрі Температура визначається безперервно під час стерилізації. Автоматичний регулятор температури Мікробіологічний метод, розведення та висів на МПА T = 131˚С, t = 40 хв

|  |
| --- |
| Після стерилізації присутність м.о. не допускається. |
| К6.1. Технологічний та мікробіологічний контроль вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці | Температура Час рН Кількість обертів | Термометр технічний рН-метр Годинник  | Під час вирощування посівного матеріалу в колбах | T = 37 °С pH = 6,8 t = 48 год n = 120 об/хв  |

К6.2. Технологічний та мікробіологічний контроль вирощування посівного матеріалу в ферментері об’ємом 30 л. Температура Час рН рН-метр, Термометр Годинник Під час вирощування посівного матеріалу в ферментері рН =6,8, t = 48 год,

|  |
| --- |
| Т = 37 ˚С |

К6.3. Технологічний та мікробіологічний контроль вирощування посівного матеріалу в ферментері об’ємом 250 л. Температура Час рН рН-метр, Термометр Годинник Під час вирощування посівного матеріалу в ферментері рН =6,8, t = 48 год,

|  |
| --- |
| Т = 37 ˚С |

К6.4. Технологічний та мікробіологічний контроль вирощування посівного матеріалу в ферментері об’ємом 2000 л. Температура Час рН рН-метр, Термометр Годинник Під час вирощування посівного матеріалу в ферментері рН =6,8, t = 48 год,

|  |
| --- |
| Т = 37 ˚С |

К 6.1. Технологічний та мікробіологічний контроль при виробничому культивуванні. Температура Час рН рН-метр, Термометр Годинник Під час вирощування посівного матеріалу в ферментері рН =6,8, t = 120 год,

|  |
| --- |
| Т = 37 ˚С |

Методики визначення основних параметрів

Концентрацію цільової речовини визначають методом високоефективної рідинної хроматографії, оскільки це найбільш ефективний метод аналізу. Суть методу полягає в розділенні складних сумішей засновуючись на відмінності в рівноважному розподілі їх між двома фазами, що не змішуються, одна з яких нерухома, а інша рухома. Суміші нерівно розподіляються між двома фазами завдяки своїх полярності, розміру або іншим властивостям. Відмінною особливістю ВЕРХ є використання високого тиску і дрібнозернистих сорбентів (зазвичай 3-5 мкм). Це дозволяє розділяти складні суміші речовин швидко і повно (від 3 до 30 хвилин). Даний метод проводиться з використанням карбоксильних катіонітів при ступінчастій елюції розчинами аміаку, гідролізом при 100 °С в (0,1−0,3) Н. розчині їдкого натру, з повторним хроматографічним очищенням, концентрацією у вакуумі, при підкисленні розчином сірчаної кислоти до pH 4,5 і осадженням метанолом у формі сульфату. Результати показав, що даний штам здатний продукувати тобраміцин в кількості − 1,5 г/л [8].

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Бородина И.Н. Метаболический анализ Streptomyces tenebrarius. - Центр Микробной Биотехнологии / Пер.с англ. - М.: Мир, 2004. - с.17 - 56.

2. Валагурова Е.В., Козырицкая В.Е. Актиномицеты рода Streptomyces. Описание видов, их идентификация. - К.: Наукова думка, 2003. - c. 47

. Винаров А.Ю., Кухаренко А.А., Панфилов В.И. Лабораторные и промышленные ферментеры. - М.: РХТУ, 2004. - 94 с.

. Егоров Н.С. Биотехнология: проблемы и перспективы. - М.: Высшая школа, 1997. − c. 82.

. Ланчини Д., Паренти Ф. Антибиотики / Пер.с англ. - М.: Мир, 1985. − c. 27.

. Малежик І. Процеси та апарати харчових виробництв. - К.: НУХТ, 2003. - 400 с.

. Сидоренко С. В., Яковлев С. В. Атибиотики и атибиотикотерапия. // Медицина. − 2002. − с. 16.

. Синягина О.П., Лаврова-Балашова М.Ф., Нестерова Т.П. Получение мутантов, образующих тобрамицин, в культуре продуцента комплекса аминогликозидных антибиотиков Streptoalloteichus cremeus var. tobramycini var. nov. 2242 // Антибиотики. - 1980. − T.45, − №12. − с.891 − 894.

. Тихонов А.И., Ярных Т.Г. Технология лекарств // БМЭ. − 1979 - Т. 11. − с. 78 − 79.

. Федоренко В.А. Генетические механизмы устойчивости актиномицетов к аминогликозидным антибиотикам. - Л.:Мир Науки и Культуры, 2009. - c. 213.

. Федоренко В.О., Басілія Л.І., Заворотна С.А., Голець Л.М., Кириченко Н.В. Генетичний контроль біосинтезу антибіотиків та стійкості до антибіотиків у актиноміцетів. - К.:Логос, 2001. - Т.1 - c. 301.

. Boxall A.B.. Kay A. P., Blackwell P.A.. Fate of veterinary medicines applied to soils. // Environment. − 2004. − Pp 166 − 180.

. Higgins C., Kastner K. Nebramycin, a new complex of an antibiotic of a wide spectrum. II Rescription Streptomyces tenebrarius // Antimicrob. − 1997. - Vol.146. − P. 208 − 221c.

. Hodgson D. A. Primary metabolism and its control is Streptomyces // Antimicrob. − 2001. - Vol.134. − 112 − 115 c.

. Borodina I., Schöller C., Eliasson A. Metabolic Network Analysis of Streptomyces tenebrarius // Appl. Environ Microbiol. − 2005. − 2 − 10 c.

16. www.fermenter.ru/content/page\_14\_0.html <http://www.fermenter.ru/content/page\_14\_0.html> Коммерческая биотехнология

17. www.springer.com/978-0-387-95041-9. Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology. -Vol. 3: The Firmicutes.