

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
Факультет фармацевтичних технологій та менеджменту
Кафедра біотехнології

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
на тему: «УДОСКОНАЛЕННЯ ТЕХНОЛОГІЇ АНТИБІОТИКА
ЦЕФОТАКСИМУ»

Виконав : здобувачка вищої освіти групи 162БТ620(З,10з)-01а
спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія
освітньої програми Біотехнологія
Єлизавета БЄЛЯЄВА

Керівник: Доцент закладу вищої освіти кафедри біотехнології,
к.фарм.н, доцент Ольга КАЛЮЖНАЯ

Рецензент: Доцент закладу вищої освіти кафедри промислової
технології ліків та косметичних засобів, к.фарм.н, доцент
Олександр МАНСЬКИЙ

Харків – 2025 рік

АНОТАЦІЯ

У кваліфікаційній роботі досліджено удосконалення технології виробництва антибіотика цефотаксиму, який належить до цефалоспоринів третього покоління. Проведено аналіз біосинтезу цефалоспорину С із використанням нитчастого гриба *Acremonium chrysogenum* та подальшого хімічного синтезу цефотаксиму. Особливу увагу приділено розробці повного циклу виробництва та екологічним аспектам, таким як зменшення відходів у процесі ферментації та очищення продукту. Практичні рекомендації з оптимізації процесу спрямовані на підвищення ефективності виробництва при збереженні екологічної сталості.

Ключові слова: антибіотик, цефотаксим, ферментер.

ANNOTATION

The qualification work investigated the improvement of the production technology of the antibiotic cefotaxime, which belongs to the third generation cephalosporins. The analysis of the biosynthesis of cephalosporin C using the filamentous fungus *Acremonium chrysogenum* and the subsequent chemical synthesis of cefotaxime was carried out. Particular attention was paid to the development of a full production cycle and environmental aspects, such as reducing waste in the fermentation process and product purification. Practical recommendations for process optimization are aimed at increasing production efficiency while maintaining environmental sustainability.

Keywords: antibiotic, cefotaxime, fermenter..

ЗМІСТ

Вступ.....	3
1 Аналітичний огляд.....	4
2 Характеристика готового продукту, сировини, матеріалів, напівпродуктів.....	11
2.1 Характеристика готового продукту.....	11
2.2 Характеристика біологічних об'єктів.....	14
2.3 Біосинтез цільового продукту.....	16
3 Технологічна частина.....	23
3.1 Розрахунок матеріального балансу.....	23
3.2 Розрахунок і вибір обладнання	27
3.3 Опис технологічного процесу.....	31
3.4 Схеми виробництва.....	37
3.5 Критичні параметри виробництва.....	40
3.6 Екологічні аспекти виробництва.....	42
Висновок.....	45
Список використаної літератури.....	46
Додатки.....	51

					162.01.01.00 000 ПЗ			
Змн..	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив	Беляєва				Удосконалення технології антибіотика цефотаксиму Пояснювальна записка	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевірив	Калюжная						2	60
Н. контр.						НФаУ Кафедра біотехнології		
Затвердив	Хохленкова Н.В.							

ВСТУП

Актуальність теми. Цефотаксим є одним із найважливіших антибіотиків у лікуванні широкого спектра бактеріальних інфекцій. Зважаючи на зростання попиту на цефалоспорины третього покоління та необхідність удосконалення технологій їхнього виробництва, актуальність роботи полягає у вирішенні таких завдань: оптимізація ферментаційного процесу, впровадження екологічно безпечних методів та підвищення виходу кінцевого продукту.

Антибіотик цефотаксим, як представник цефалоспоринів третього покоління, має широкий спектр дії та високу ефективність проти грампозитивних і грамнегативних бактерій. Зростання бактеріальної резистентності до традиційних антибіотиків збільшує попит на сучасні антибіотики, які залишаються ефективними проти резистентних патогенів.

Разом із цим фармацевтичні підприємства стикаються з такими викликами:

Екологічна проблема: Виробництво антибіотиків супроводжується значним впливом на навколишнє середовище через використання токсичних розчинників, утворення стічних вод і небезпечних відходів. Це потребує впровадження екологічно безпечних технологій.

Економічна ефективність: Висока вартість виробництва через енергозатратні процеси ферментації та очищення продукту потребує оптимізації технологічних етапів.

Підвищення попиту: Зростання попиту на антибіотики третього покоління вимагає збільшення їхньої доступності за рахунок підвищення продуктивності та зниження витрат на виробництво.

Актуальність роботи також визначається необхідністю збереження екологічної стійкості у процесі виробництва антибіотиків. Удосконалення

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
						3
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

технологій біосинтезу, оптимізація умов ферментації та впровадження екологічно чистих методів очищення допоможуть зменшити шкідливий вплив на довкілля та підвищити економічну рентабельність виробництва.

Мета роботи. Метою роботи є розробка та впровадження оптимальних технологічних підходів до виробництва цефотаксиму шляхом удосконалення біосинтезу цефалоспоринової С і подальшого хімічного синтезу, забезпечуючи екологічну стійкість і економічну ефективність процесу.

Для досягнення мети були визначені завдання:

1. Проаналізувати підходи до виробництва цефалоспоринових антибіотиків, а саме антибіотика третього покоління цефотаксиму
2. Охарактеризувати продуцент та біосинтез цільового продукту
2. Розробити технологічний процес та схеми виробництва
3. Підібрати обладнання для реалізації стадій культивування продуцента
4. Охарактеризувати екологічні проблеми виробництва антибіотиків

Об'єктом роботи є антибіотик цефотаксим.

Предметом роботи є процес виробництва антибіотика.

Методи. аналітичні, порівняльні, розрахункові, графічні.

Практичне значення отриманих результатів. Запроновані методи ферментації дозволяють досягти більш високого виходу цефалоспоринової С, використання сучасних підходів до очищення продукту сприяє зниженню впливу на навколишнє середовище. Розроблені рекомендації можуть бути впроваджені у промислове виробництво, зменшуючи витрати на виробництво антибіотиків.

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
						4
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

1 АНАЛІТИЧНИЙ ОГЛЯД

1.1 Загальна характеристика цефалоспоринових антибіотиків та підходи до їхнього отримання

Цефотаксим відноситься до напівсинтетичних цефалоспоринів третього покоління, вихідною сполукою для яких є 7-аміоцефалоспоранова кислота (рис. 1.1).

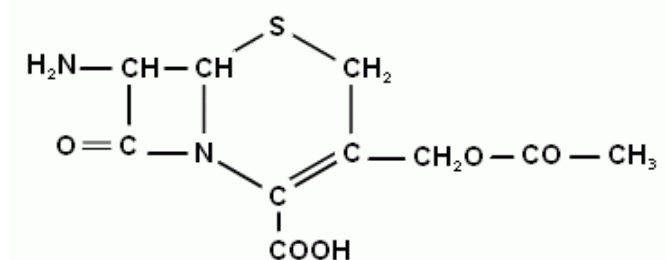


Рис. 1.1 – Структурна формула 7-аміоцефалоспоранової кислоти

Цефалоспоринові антибіотики є основною групою бета-лактамних антибіотиків, отриманих з нитчастого гриба *Acremonium chrysogenum*. Цефалоспорини пригнічують ріст бактерій, порушуючи синтез пептидогліканового шару в клітинних стінках бактерій. Цефалоспорин С (рис. 1.2) був першим ізольованим цефалоспориновим антибіотиком, хімічна структура якого була визначена незабаром після його відкриття Джузеппе Броцу у 1945 р. Цефалоспорин та його похідні мають широку антибактеріальну дію проти грампозитивних і грамнегативних бактерій.

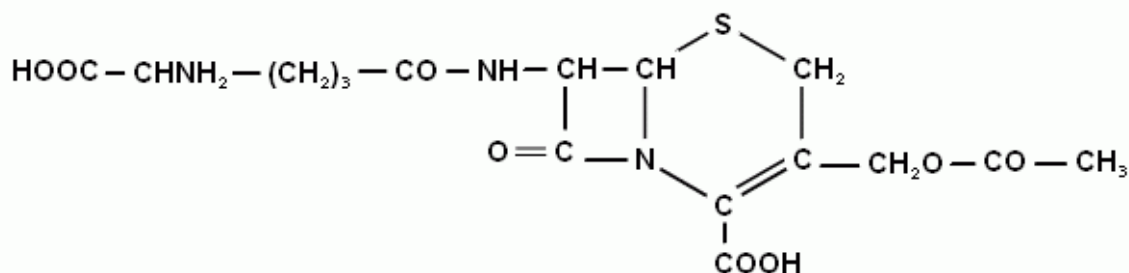


Рис. 1.2 - Структурна формула цефалоспорину С

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
						5
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Напівсинтетичні цефалоспорины отримують шляхом модифікації молекули цефалоспорины приєднанням двох радикалів (рис. 1.3).

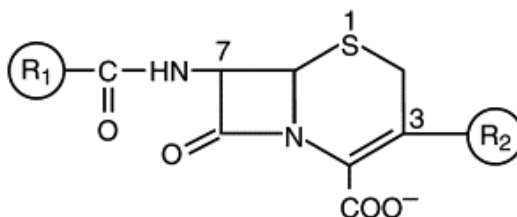


Рис. 1.3 - Структурна формула напівсинтетичних цефалоспоринов

Цефалоспорины класифікуються на п'ять поколінь залежно від їхнього спектру антибактеріальної активності та послідовного порядку відкриття. Цефалоспорины першого покоління (рис. 1.4) активні проти більшості грампозитивних коків, включаючи метицилінчутливий *Staphylococcus aureus* (MSSA) і стрептококи, але мають слабку активність проти грамнегативних бактерій.

	Радикал R ₁ (рис. 1.3)	Радикал R ₂ (рис. 1.3)
Цефазолін		
Цефалексин		
Цефалоридин		

Рис. 1.4 – Будова радикалів цефалоспоринов першого покоління

Цей недолік вдалося уникнути, коли на фармацевтичний ринок вийшли цефалоспорины другого (рис. 1.5) і третього покоління (рис. 1.6). Ці цефалоспорины мають більш високу стабільність проти бета-лактамаз грамнегативних бактерій, таких як *Haemophilus influenzae*. Ще одна перевага цефалоспоринів другого покоління полягає в тому, що при лікуванні інфекцій можна зменшити дозування та збільшити інтервали між прийомами. Крім того, цефалоспорины другого та третього поколінь уникають ризику перехресної реакції у пацієнтів з алергією на пеніцилін, оскільки перехресна реакція, викликана подібними хімічними структурами бічних ланцюгів цефалоспоринів та пеніцилінів першого покоління, більше не діє.

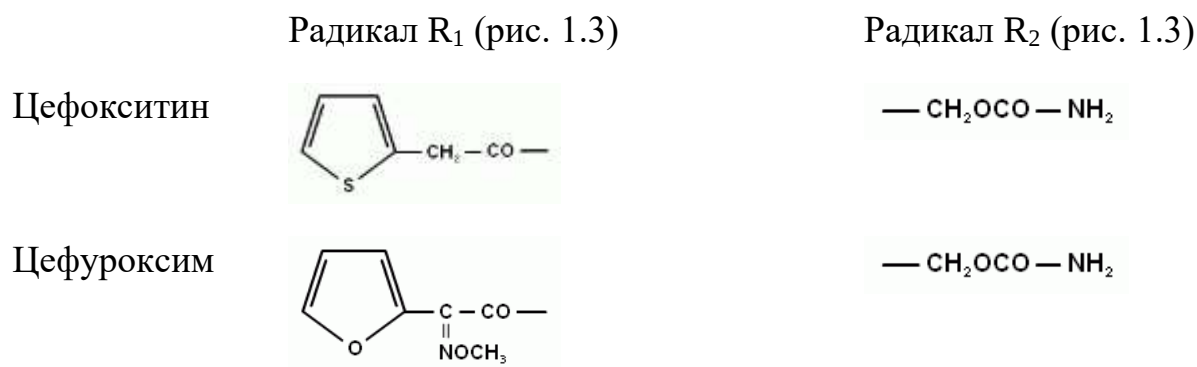
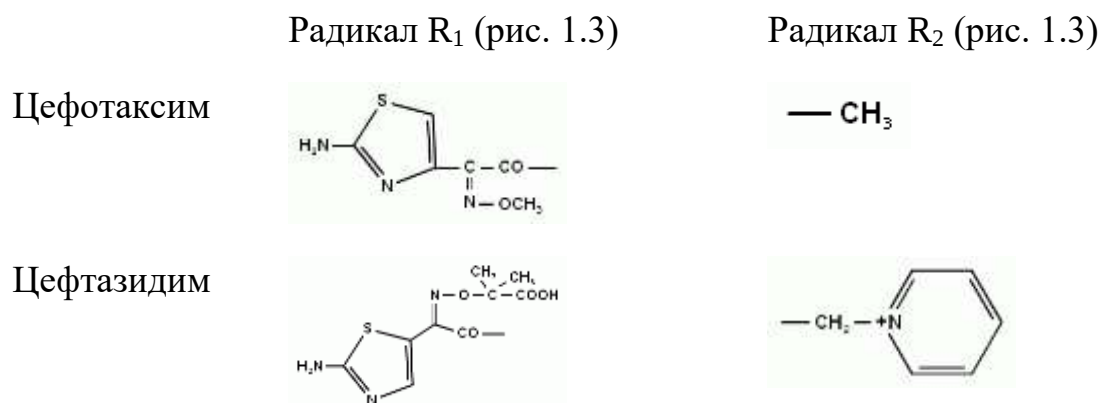


Рис. 1.5 – Будова радикалів цефалоспоринів другого покоління



Цефтріаксон

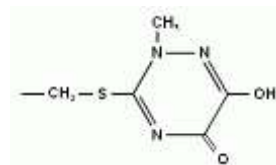
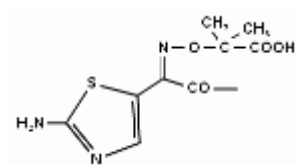


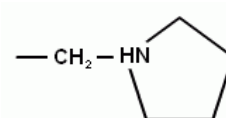
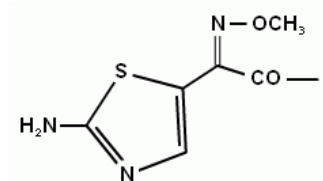
Рис. 1.6 – Будова радикалів цефалоспоринів третього покоління

Порівняно з цефалоспоринами третього покоління, цефалоспорини четвертого покоління (рис. 1.7) мають більш широку активність щодо грамнегативних бактерій за рахунок швидкого проникнення через зовнішню мембрану, а також меншу спорідненість до бета-лактамаз, що призвело до стійкості до попередніх поколінь. Крім того, деякі цефалоспорини четвертого покоління мають чудову ефективність проти грампозитивних бактерій, таких як MSSA, пеніцилінрезистентних пневмококів і деяких стрептококів. Ці переваги призвели до переходу на використання цефалоспоринів четвертого покоління для лікування серйозних інфекцій у госпіталізованих пацієнтів.

Радикал R₁ (рис. 1.3)

Радикал R₂ (рис. 1.3)

Цефепім



Цефпіром

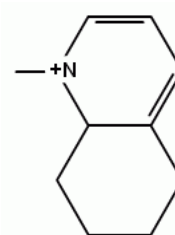
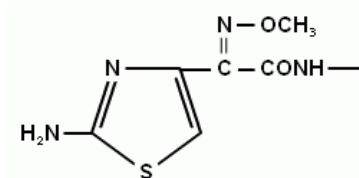


Рис. 1.7 – Будова радикалів цефалоспоринів четвертого покоління

Цефалоспорини п'ятого покоління також є антибіотиками широкого спектру дії, унікально активними проти метицилінрезистентного *Staphylococcus aureus* (MRSA). Механізм резистентності до MRSA включає утворення мутантних мішеней антибіотиків, які пригнічують

антибактеріальну активність цефалоспоринів шляхом зменшення афінності зв'язування з бета-лактамними кільцями.

Загальною рисою всіх цефалоспоринів є те, що вони хімічно отримують із вихідної сполуки, або 7-аміноцефалоспорової кислоти (7-АЦК), або 7-аміно-деацетоксицефалоспорової кислоти, основних будівельних блоків напівсинтетичних цефалоспоринових антибіотиків. Спочатку 7-АЦК отримували з цефалоспоринової кислоти за допомогою серії хімічних реакцій.

Однак хімічний метод виробництва має негативний вплив на навколишнє середовище через використання органічних розчинників і викидів токсичних хімічних відходів і забрудненої води. Оскільки двоетапні ферментативні процедури мають вихід, подібний до хімічного виробництва, це поступово замінило класичний хімічний шлях виробництва 7-АЦК. На першому етапі оксидаза D-амінокислот (DAO, D-Aminoacid-oxidase), що виробляється *Trigonopsis variabilis*, використовується як іммобілізований біокатализатор для модифікації бічного ланцюга 7-аміноадипілу цефалоспоринової кислоти, утворюючи глутарил-7-аміноцефалоспорову кислоту (GL-7-ACA, АЦК). На другому етапі GL-7-ACA ацилаза (GLA), гетерологічний рекомбінантний білок, отриманий і виділений з *Escherichia coli*, використовується як іммобілізований фермент для подальшого перетворення GL-7-ACA в бажаний продукт, 7-ACA (АЦК). Цей двостадійний ферментативний метод є економічно стійким і ефективним завдяки значному зменшенню кількості відходів і м'яким умовам реакції, необхідним щодо температури та pH. Детальніше хемоензиматична конверсія буде розглянута в розділі 2.

Останньою інновацією у виробництві 7-ACA є одноетапна біоконверсія з використанням одного ферменту, а саме цефалоспоринової ацилази (ССА). ССА, відкриті та розроблені з різних штамів бактерій, були класифіковані на п'ять класів на основі їхніх генних структур, молекулярної маси та властивостей ферментів. За останні два десятиліття були проведені численні

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		9

процедури білкової інженерії на потенційних ССА, таких як бактеріальні ацилази та глутариламідази з метою отримання мутантних варіантів, що розщеплюють ациклічний амідний зв'язок в молекулі цефалоспорину. Специфічність субстрату покращено за допомогою підходів молекулярного моделювання та сайт-спрямованого мутагенезу. Наприклад, шість амінокислот ацилази GL-7-ACA з *Pseudomonas sp.* SE83 були модифіковані, а відповідний мутант назвали S12. Порівняно з диким типом, цей S12 показав 850% збільшення активності на субстраті.

Фармацевтичні компанії використовують ацилази з високою активністю з 2006 року. Ці одноетапні конверсійні ферменти виробляються та виділяються з кишкової палички та іммобілізуються *in vitro* на твердій підтримці для стабілізації в якості біокаталізатора. До цього часу не повідомлялося про успішне промислове застосування ацилаз *in vivo*, хоча одночасний біосинтез цефалоспорину і біоконверсія з цефалоспорину до 7-АЦК на 7-АСА в одному організмі дозволило б уникнути етапів виділення антибіотика та ферментативних операцій. Зводячи до мінімуму складні подальші процеси, цей простий підхід до виробництва 7-АЦК *in vivo* значною мірою сприятиме економічно та екологічно стійкому виробництву антибіотиків.

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
						10
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

2 ХАРАКТЕРИСТИКА ГОТОВОГО ПРОДУКТУ, СИРОВИНИ, МАТЕРІАЛІВ, НАПІВПРОДУКТІВ

2.1 Характеристика готового продукту

Цефалоспорины та їхні похідні широко застосовуються для лікування різних інфекційних захворювань, спричинених бактеріями дихальних шляхів, інфекціями шкіри та сечовивідних шляхів. Цефалоспорин С є одним із найважливіших біотехнологічних продуктів, загальний світовий ринок якого оцінюється приблизно у 10 мільярдів доларів.

Цефотаксим (7 β -(2-(2-амінотіазол-4-іл)-(Z)-2-метоксиіміноацетамідо)-3-ацетоксиметил-3-цефем-4-карбонова кислота або її натрієва сіль) був першим розробленим цефалоспорином третього покоління. Цей антибіотик має високу антимікробну дію, широкий антибактеріальний спектр, високу стійкість до дії β -лактамаз, а також низький індекс побічної дії. З цих причин його широко використовують для лікування багатьох інфекцій, включаючи менінгіт, септицемію, перитоніт, інфекції сечостатевої і дихальних шляхів, інфекції шкіри, кісток, суглобів тощо. Крім того, цефотаксим може бути використаний як основний посередник у синтезі інших цефалоспоринових антибіотиків.

Цефотаксим - це цефалоспоринова сполука, що має бічні групи ацетоксиметил і [2-(2-аміно-1,3-тіазол-4-іл)-2-(метоксиіміно)ацетил]аміно.

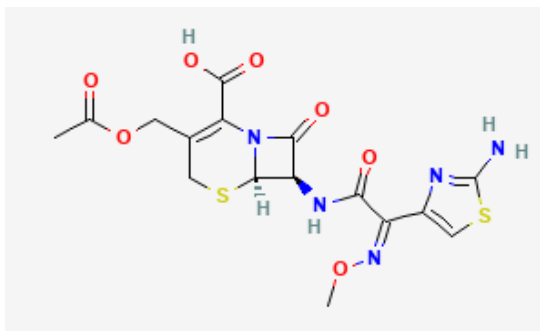
Назва IUPAC: (6R, 7R) -3-(ацетилоксиметил)-7-[[(2Z) -2-(2-аміно-1,3-тіазол-4-іл)-2-метоксиіміноацетил]аміно]-8-оксо-5-тіа-1-азабіцикло[4.2.0]окт-2-ен-2-карбонова кислота.

Вигляд: порошок білого кольору.

Розчинність (25°C): ДМСО 91 мг/мл (199,79 мМ), вода – нерозчинний, етанол – нерозчинний.

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
						11
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Структурна формула:



Молекулярна формула: $C_{16}H_{17}N_5O_7S_2$.

Молекулярна маса: 455,5 г/моль.

Точна маса: 455.05694025 Да.

Код CAS: 63527-52-6.

Код АТС:

J - Протиінфекційні засоби для системного застосування

J01 - Антибактеріальні засоби для системного застосування

J01D - інші бета-лактамі антибактеріальні засоби

J01DD - Цефалоспорини третього покоління

J01DD01 – Цефотаксим.

Фармакодинаміка: Цефотаксим - цефалоспориновий антибіотик третього покоління для внутрішньовенного введення. Має широкий спектр дії проти грампозитивних і грамнегативних бактерій. Він не має активності проти *Pseudomonas aeruginosa*. Цефотаксим діє шляхом пригнічення біосинтезу клітинної стінки бактерій. Позитивною властивістю цефотаксиму є те, що він виявляє стійкість до пеніциліназ і корисний для лікування інфекцій, стійких до похідних пеніциліну.

Метаболізм: Приблизно 20-36 % внутрішньовенно введеної дози 14С-цефотаксиму виводиться нирками у вигляді незміненого цефотаксиму та 15-25 % у вигляді дезацетилового похідного, основного метаболіту. Показано, що дезацетиловий метаболіт сприяє бактерицидній активності. Два інші сечові

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		12

метаболіти (M2 і M3) складають приблизно 20-25%. Вони не мають бактерицидної дії.

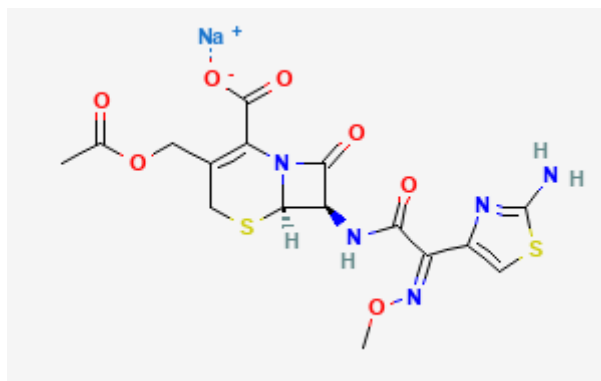
Біологічний період напіввиведення: Приблизно 1 год.

Механізм дії: Бактерицидна активність цефотаксиму зумовлена пригніченням синтезу клітинної стінки через спорідненість до пеніцилінзв'язуючих білків (РВР). Цефотаксим демонструє високу спорідненість з пеніцилінзв'язуючими білками клітинної стінки, включаючи РВР Іb і РВР ІІІ.

Через нерозчинність у воді застосовують як сіль – цефотаксим натрію.

Назва ІUPAC: натрію;(6R, 7R) -3-(ацетилоксиметил)-7-[[[(2Z)-2-(2-аміно-1,3-тіазол-4-іл)-2-метоксиіміноацетил]аміно]-8-оксо-5-тіа-1-азабіцикло[4.2.0]окт-2-ен-2-карбоксилат

Структурна формула:



Молекулярна формула: $C_{16}H_{16}N_5NaO_7S_2$.

Молекулярна маса: 477,5 г/моль.

Точна маса: 477.03888450 Да.

CAS: 64485-93-4.

Розчинність: 68,2 [мкг/мл] (середнє значення результатів при рН 7,4).

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
						13
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

2.2 Характеристика біологічних об'єктів

Acremonium chrysogenum, також відомий як *Cephalosporium acremonium*, є промисловим продуцентом антибіотика цефалоспорину С, що є вихідною сполукою для отримання 7-АЦК, з якої вже отримують цефатоксим.

Рід *Acremonium* є поліфілетичним таксоном, що об'єднує віддалено споріднені види грибів, які належать принаймні до трьох або чотирьох рядів аскоміцетів. Для виробництва антибіотика цефалоспорину використовуються різні штами видів роду *Cephalosporium*, такі як *Emericellopsis*, *Paecilomyces*, *Streptomyces clavuligerus*.

Acremonium chrysogenum природним чином зустрічається в ґрунті, органічних рештках і рослинних залишках і розростається у вологому середовищі, утворюючи сірі та білі колонії з пухких переплетених гіф.

Розмноження у *Acremonium chrysogenum* є строго безстатевим і здійснюється за допомогою конідієносців і артроспор. Однак пов'язаний теломорфний стан, що вказує на статеве розмноження, не було виявлено. Гіфи цього гриба розділені, утримують невітвісті прямостоячі фіаліди, які розташовуються безпосередньо на їхніх кінчиках. Конідії - одноклітинні і гіалінові (прозорі).

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
						14
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

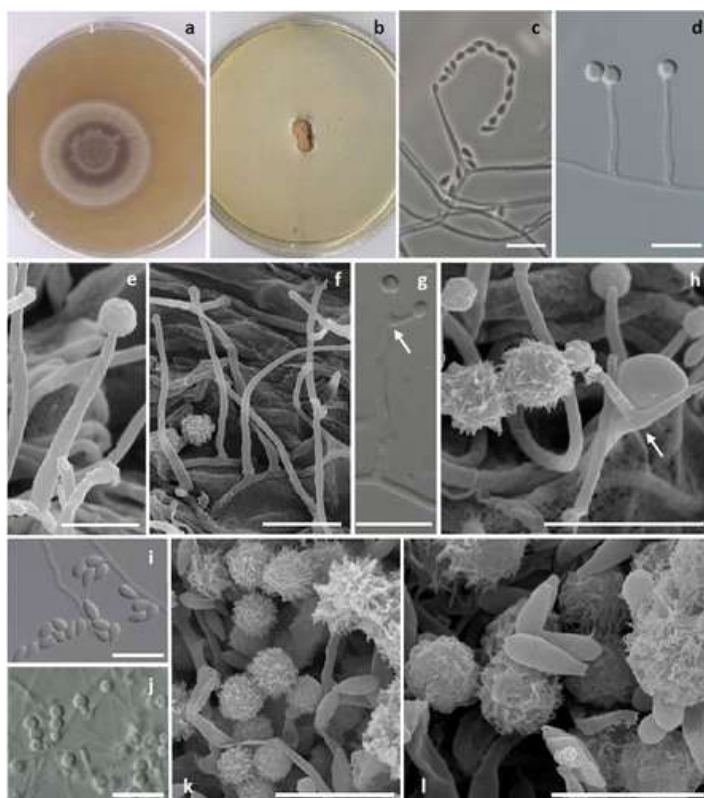


Рис. 2.1 – Морфологія та мікроскопія *A. chrysogenum*

При культивуванні гриба описують чотири різні морфологічні форми (рис. 2.2): роздуті фрагменти гіф, конідії, гіфи, артроспори, які є метаболічно неактивними. Морфологічна форма, схожа на дріжджі (широкі роздуті фрагменти гіф), має високу здатність продукувати цефалоспорин у більшій концентрації.

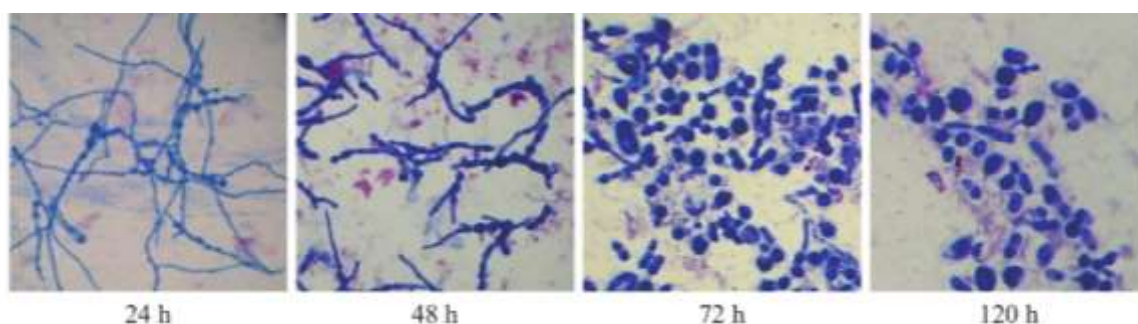


Рис. 2.2. – Морфологічні форми *A. chrysogenum* протягом культивування

Класифікація *Acremonium chrysogenum*:

Царство *Mycota*

Підцарство *Diakarya*

Тип *Ascomycota*

Підтип *Pezizomycotina*

Клас *Sordariomycetes Pyrenomycetes*

Підклас *Sordariomycetidae*

Порядок *Hypocreales*

Родина *Hypocreaceae*

Рід *Acremonium*

Вид *A. chrysogenum*

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		16

2.3 Біосинтез цільового продукту

Цільовий продукт – напівсинтетичний цефалоспорин третього покоління цефотаксим - утворюється на основі 7-аміноцефалоспорованої кислоти, яка, у свою чергу, утворюється у реакціях хомоензиматичної конверсії відщеплення (ферментом ацилазою) від цефалоспорину С аміноадипінової кислоти. Вже на основі хімічного синтезу із 7-аміноцефалоспорованої кислоти утворюється цефотаксим.

Розглянемо всі ці перетворення поетапно.

1. Біосинтез цефалоспорину С

Цефалоспорин С – продукт метаболізму нитчастого гриба *Acremonium chrysogenum*. Завдяки високій фармацевтичній та економічній цінності цього антибіотика весь біосинтетичний шлях детально вивчено. У фармацевтичних компаніях рутинно проводиться класичне покращення штамів для підтримання високих виробничих ліній із значними виходами цефалоспорина. Нещодавно було досягнуто виходу 24–28 г/л антибіотика у промислових масштабах за допомогою багаторазового вирощування грибу.

Сучасні досягнення в галузі молекулярної біотехнології дозволили виявляти та кількісно визначати кожний проміжний продукт біосинтезу, каталізаторні ферменти, залучені до біосинтезу цефалоспорину, та гени продуцента, що кодуєть синтез ферментів в клітині.

Біосинтез цефалоспорину, як і пеніциліну та інших бета-лактамічних антибіотиків, розпочинається з трьох амінокислот: L-цистеїну, L-валіну та непептидогенної L- α -аміноадипінової кислоти (L- α -AAA) (рис. 2.3). Ці амінокислоти каталізуються для утворення трипептиду ACV за допомогою ACV-синтетази в цитозолі. Циклізація молекули ACV відбувається під дією синтази ізопеніциліну N (IPN). На цьому етапі біосинтетичні шляхи розходяться для різних груп бета-лактамічних антибіотиків.

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
						17
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

У біосинтезі цефалоспоринів синтаза ізопеніциліну N (IPN) ізомеризується до пеніциліну N за участю двокомпонентних епімерів, що розташовані в пероксисомах. Подальша реакція відбувається знову в цитозолі, де пеніцилін N перетворюється на деацетоціфалоспорин C (DAOC) за допомогою DAOC-синтетази. На цьому етапі п'ятичленне тіазолідинове кільце, прикріплене до бета-лактамного кільця, розширюється до шестичленного дигідротіазинового кільця, яке є характерною структурою цефалоспоринів. Потім слідує модифікація бокового ланцюга деацетоціфалоспорин C (DAOC) за допомогою цитозольної гідроксилази, що призводить до утворення деацетилцефалоспорину C (DAC).

На завершальному етапі ацетилтрансфераза додає ацетил-СоА (кофермент А) до деацетилцефалоспорину C (DAC), утворюючи цефалоспорин C (CPC). Цефалоспорин C активно секретується з цитозолу гриба в позаклітинний простір як природна антибактеріальна речовина.

2. Хемоензиматична конверсія 7-аміноцефалоспоринової кислоти з молекули цефалоспорину

7-Аміноцефалоспоронова кислота (7-АЦК, 7-АСА) є основним субстратом для більшості напівсинтетичних цефалоспоринів. Спочатку 7-АЦК синтезували хімічно на основі цефалоспорину C шляхом серії реакцій (рис. 2.4). У структурі цефалоспорину C є два амідні зв'язки: один - більш стабільний ациклічний амід у бічному ланцюзі, прикріпленому до бета-лактамного кільця, а інший - менш стабільний і більш реактивний циклічний амід у самому бета-лактамному кільці. Бажана хімічна реакція перетворення цефалоспорину у 7-АЦК передбачає гідроліз більш стабільного ациклічного амідного зв'язку бічного ланцюга при збереженні структури бета-лактамного кільця. Цей процес є надзвичайно складним, оскільки потребує дуже низьких температур і органічних розчинників, а також супроводжується значним екологічним забрудненням через утворення токсичних хімічних відходів і забруднення води фосфатами.

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		18

Тому пізніше було розроблено двоступеневий ферментативний процес, який забезпечував вихід продукту, подібний до хімічного методу. На першому етапі ферментативного процесу як цільовий біокаталізатор використовують D-амінокислотну оксидазу (DAO), отриману з дикого типу *Trigonopsis variabilis*. Цей фермент модифікує 7-аміноадипіновий бічний ланцюг цефалоспоринової кислоти (CPC) для утворення глутарил-7-аміноцефалоспоронової кислоти (GL-7-ACA).

На другому етапі використовується GL-7-ACA ацилаза, яка перетворює GL-7-ACA у кінцевий продукт 7-ACA. GL-7-ACA-ациліза є гетерологічним рекомбінантним білком, виробленим і виділеним із *E. coli* та застосовується у вигляді іммобілізованого біокаталізатора.

Обсяг відходів від двоступеневої ферментативної процедури зменшився до 1% порівняно з хімічним методом. Таким чином, цей метод є більш екологічно сталим і економічно вигідним. Іммобілізований DAO у реакторі з мішалкою та очищена GL-7-ACA-ациліза можуть бути перероблені до 100 і 600 циклів реакції відповідно. Крім того, процес потребує лише м'яких температур і значень рН.

Незважаючи на екологічні та економічні переваги, двоступеневий ферментативний метод потребує двох різних бактеріальних процесів ферментації, складного очищення ферментів та їх іммобілізації, що збільшує виробничі витрати на 7-АЦК та активні фармацевтичні інгредієнти цефалоспоринів.

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		19

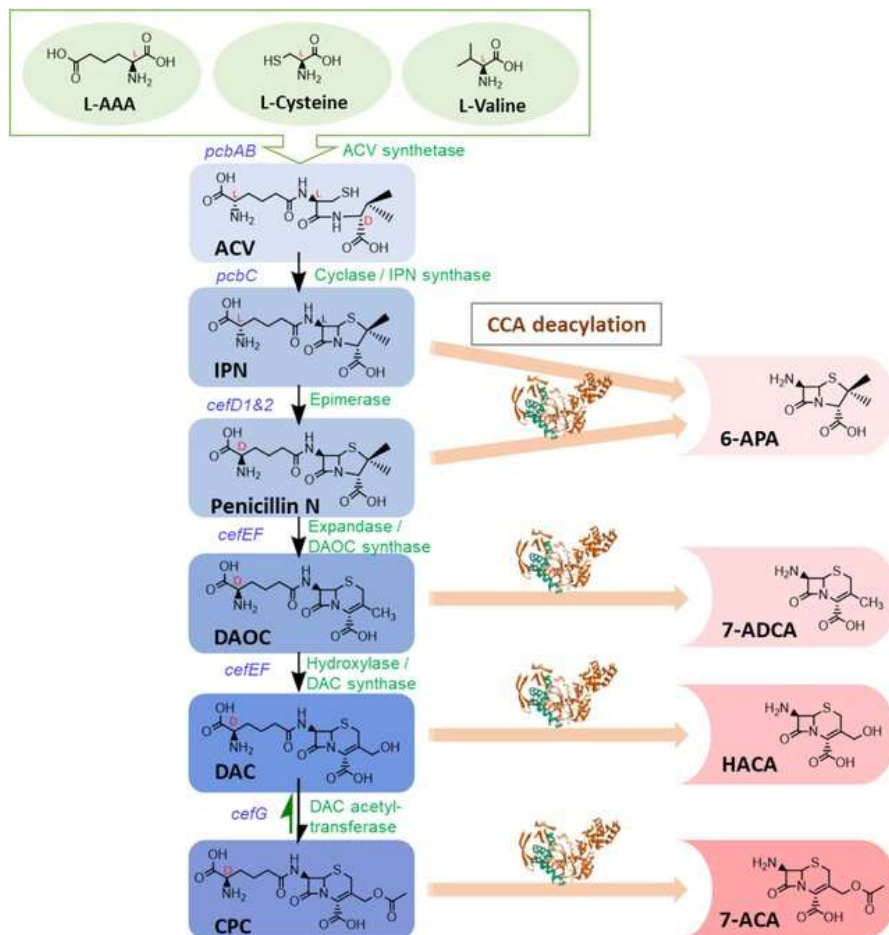


Рис. 2.3 - Шлях біосинтезу цефалоспориноу С в клітині *A. chrysogenum* і продукти перетворення кожного метаболіту цефалоспориноу С ацилазою. Біосинтетичні ферменти позначені зеленим кольором, а гени, що їх кодують, - синім

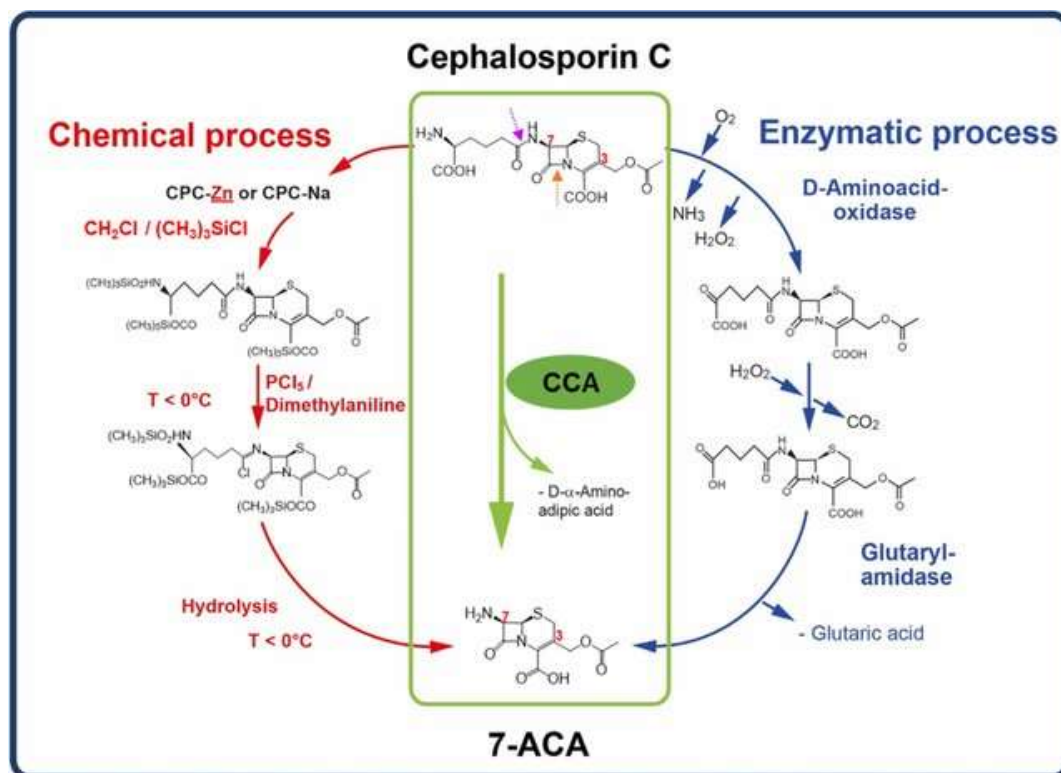


Рис. 2.4 – Етапи синтезу 7-АЦК хімічним та ензиматичним методом з молекули цефалоспорину

3. Хімічний синтез цефотаксиму

На сьогоднішній день розроблено багато способів отримання цефотаксиму на основі молекули 7-АЦК. У роботі ми обрали легкий та економічний спосіб обробки з використанням безпечних реагентів.

Цефотаксим через його погану розчинність у воді використовують у вигляді натрієвої солі (рис. 2.5).

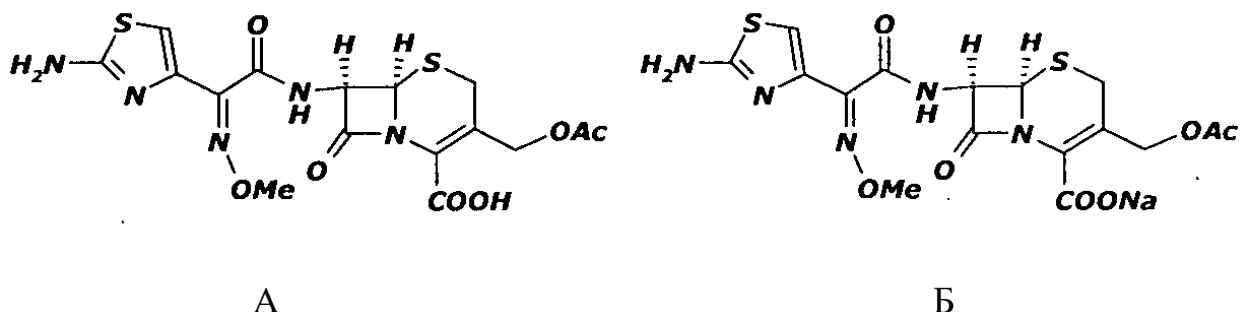


Рис. 2.5 – Структурні формули цефотаксима – цефотаксимова кислота (А) та натрієвої солі цефотаксима (Б), Ас – COOH

Цефотаксим містить 2-амінотіазол-4-іл, пов'язаний із положенням 7 7-аміноцефалоспорової кислоти (7-АСА) через метоксиіміноацетамідний місток. Цю частину можна ввести шляхом ацилювання 7-АСА або за допомогою (Z)-2-(2-амінотіазол-4-іл)-2-метоксиімінооцтової кислоти (АТМА), відповідним чином активованої, або шляхом реакції в модифікованій формі, такі як хлорангідрид, ангідрид тощо. Висока реакційна здатність цих похідних робить необхідним захистити та зняти захист амінофункції АТМА, щоб уникнути утворення побічних продуктів. Розробка альтернативних форм для АТМА, таких як складні ефіри та/або аміді гідроксибензотриазолу (НОВТ) і різні тіоефіри, дозволила селективне та вигідне ацилювання 7-АСА, без необхідності блокування амінофункції АТМА.

Тому нами обрано для використання у цій технології швидкий спосіб синтезу цефотаксиму шляхом ацилювання 7-аміноцефалоспорової кислоти 2-меркаптобензотіазолілітіоефіром (Z)-2-[2-амінотіазол-4-іл]-2-метоксиімінооцтової кислоти (МАЕМ), що є комерційним реагентом (рис. 2.6). Реакцію проводять при кімнатній температурі протягом 1 год, отримуючи 95% вихід. 2-Меркаптобензотіазол виділяють як побічний продукт з високою чистотою та виходом. Запропонований метод відрізняється від описаних раніше більш коротким часом і дуже м'якими умовами реакції, а також готовим до використання реагентом.

Цефотаксим погано розчиняється у воді, тому для клінічного застосування його перетворюють у розчинну натрієву сіль, одержувану нейтралізацією гідрокарбонатом натрію або реакцією з солями карбонових кислот з вищим рКа, як ацетат натрію або 2-етилгексаноат натрію. В обох випадках для виділення та очищення продукту в даний час як реакційне середовище використовують різні водно-спиртові суміші

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		22

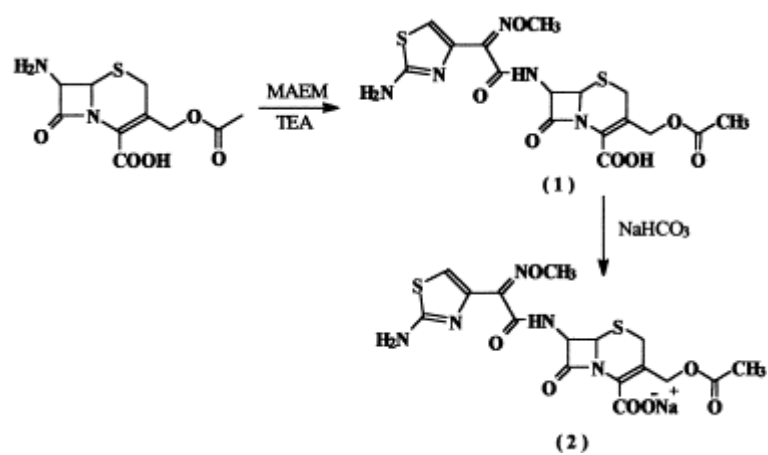


Рис. 2.6 – Хімічний синтез цефотаксима (натрієвої солі) на основі 7-АЦК

З ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

3.1 Розрахунок матеріального балансу та параметрів ферментерів

Розрахуємо кількості живильного середовища та посівного матеріалу, що вносяться на кожній стадії вирощування продуцента стрептоміцина.

1. Головний ферментер

Маса культуральної рідини, що утворюється в процесі ферментації за технологічний цикл складає 1550 кг. Щільність культуральної рідини 1015 кг/м³. Враховуючи втрати через краплевиніс культуральної рідини (10 %), об'єм культуральної рідини у цьому ферментері:

$$V_{к.р.1} = 1550/1015 + 1550/1015*0,1 = 1,68 \text{ м}^3.$$

Фактичний об'єм ферментера з урахуванням коефіцієнта заповнення 0,7:

$$V_{\Phi 1} = 1,68/0,7 = 3,16 \text{ м}^3.$$

За стандартними даними обираємо ферментер на 3,2 м³.

Враховуючи посівну дозу у кількості 10 %, об'єм живильного середовища та посівного матеріалу у головному ферментері становить:

$$V_{ж.с.1} = 1,68 / 1,1 = 1,53 \text{ м}^3,$$

$$V_{п.м.1} = 1,68 - 1,53 = 0,15 \text{ м}^3.$$

2. Попередній ферментер

Коефіцієнт заповнення 0,7, тоді об'єм попереднього ферментеру:

$$V_{\Phi 2} = 0,15 / 0,7 = 0,21 \text{ м}^3.$$

За стандартними даними обираємо ферментер на 0,25 м³.

Враховуючи втрати через краплевиніс культуральної рідини (10 %) та посівну дозу (10 %), об'єм культуральної рідини у цьому ферментері:

$$V_{к.р.2} = 0,15/0,9 = 0,17 \text{ м}^3,$$

об'єм живильного середовища:

$$V_{жс2} = 0,17 / 1,1 = 0,15 \text{ м}^3,$$

об'єм посівного матеріалу:

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
						24
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

$$V_{\text{пм2}} = 0,17 - 0,15 = 0,02 \text{ м}^3.$$

3. Попередній інокулятор

Коефіцієнт заповнення 0,7, тоді об'єм попереднього апарату:

$$V_{\text{фз}} = 0,02 / 0,7 = 0,03 \text{ м}^3.$$

За стандартними даними обираємо інокулятор на $0,03 \text{ м}^3 = 30 \text{ л}$.

Враховуючи втрати через краплевиніс культуральної рідини (10 %) та посівну дозу (10 %), об'єм культуральної рідини і інокуляторі:

$$V_{\text{к.р.з}} = 0,02 / 0,9 = 0,022 \text{ м}^3,$$

об'єм живильного середовища:

$$V_{\text{жсз}} = 0,022 / 1,1 = 0,02 \text{ м}^3,$$

об'єм посівного матеріалу:

$$V_{\text{пмз}} = 0,022 - 0,02 = 0,002 \text{ м}^3 = 2 \text{ л}$$

4. Колби

Для посівної дози 2 л використовуємо колби на 0,75 л.

Враховуючи коефіцієнт заповнення та втрати відповідно 0,2 та 1 %, об'єм культуральної рідини:

$$V_{\text{кр4}} = 2 / 0,99 = 2,02 \text{ л},$$

об'єм живильного середовища:

$$V_{\text{жс4}} = 2,02 / 1,1 = 1,84 \text{ л},$$

об'єм посівного матеріалу:

$$V_{\text{пм4}} = 2,02 - 1,84 = 0,15 \text{ л}.$$

Кількість колб:

$$N_{\text{к}} = 2,02 / (0,75 * 0,2) = 7 \text{ колб}.$$

Для 1 циклу ферментації потрібно живильного середовища:

$$V_{\text{ж.с.}} = 1,53 + 0,15 + 0,02 + 0,00184 = 1,70184 \text{ м}^3 = 1701,84 \text{ л}.$$

Враховуючи втрати 10 % потреба у живильному середовищі:

$$V_{\text{ж.с.}} = 1701,84 / 0,9 = 1890,93 \text{ л}.$$

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
						25
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Таблиця 3.1 – Потреби у компонентах живильного середовища на 1 серію цефалоспорину С

Компонент	Витрати, г	
	на 1 л середовища	на 1 серію
Сахароза	30	56727,9
Дигідрофосфат калію	1,5	2836,395
Сульфат магнію	0,3	567,279
Розчин мікроелементів	0,015	28,36395
Вода водопровідна	968,185	1830770,06

3.2 Розрахунок і вибір обладнання

Біотехнологічним процесом у виробництві цефотаксиму є етап отримання цефалоспоринової кислоти, який проводиться за допомогою продуцента *A. chrysogenum*. Головним обладнанням на цій стадії є ферментери. Метод ферментації – глибинний аеробний, обв'язка ферментера включає мірники для подачі розчинів кислоти та лугу для контролю рН та піногасника, температура підтримується подачею до змішувачів гарячої води, аерація та прийнятний тепло- і масообмін забезпечується мішалкою та барботером.

Виходячи із завдання роботи розрахуємо параметри потрібного ферментера для здійснення стадії виробничого біосинтезу, враховуючи, що маса культуральної рідини, що утворюється в процесі ферментації за технологічний цикл складає 1550 кг.

Враховуючи втрати через краплевиніс культуральної рідини (10 %) та щільність розчину 1015 кг/м³, об'єм культуральної рідини у головному ферментері, тобто корисний об'єм ферментера становить:

$$V_{кор} = \frac{G_i}{\rho_i};$$

де G_i - маса речовин, які завантажують до апарата, кг;

ρ_i – щільність розчину, кг/м³.

$$V_{кор} = 1550/1015 + 1550/1015 \cdot 0,1 = 1,68 \text{ м}^3.$$

Коефіцієнт заповнення $\gamma = 0,5-0,7$, тоді повний об'єм ферментера:

$$V_{пов} = \frac{V_{кор}}{\gamma}.$$

$$V_{пов1} = 1,68/0,5 = 3,36 \text{ м}^3$$

$$V_{пов2} = 1,68/0,7 = 2,4 \text{ м}^3$$

Тоді для здійснення головної ферментації обираємо ферментер (Ф9) об'ємом 3,2 м³.

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
						27
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Схема ферментера для здійснення основної ферментації наведена на рис.

3.1.

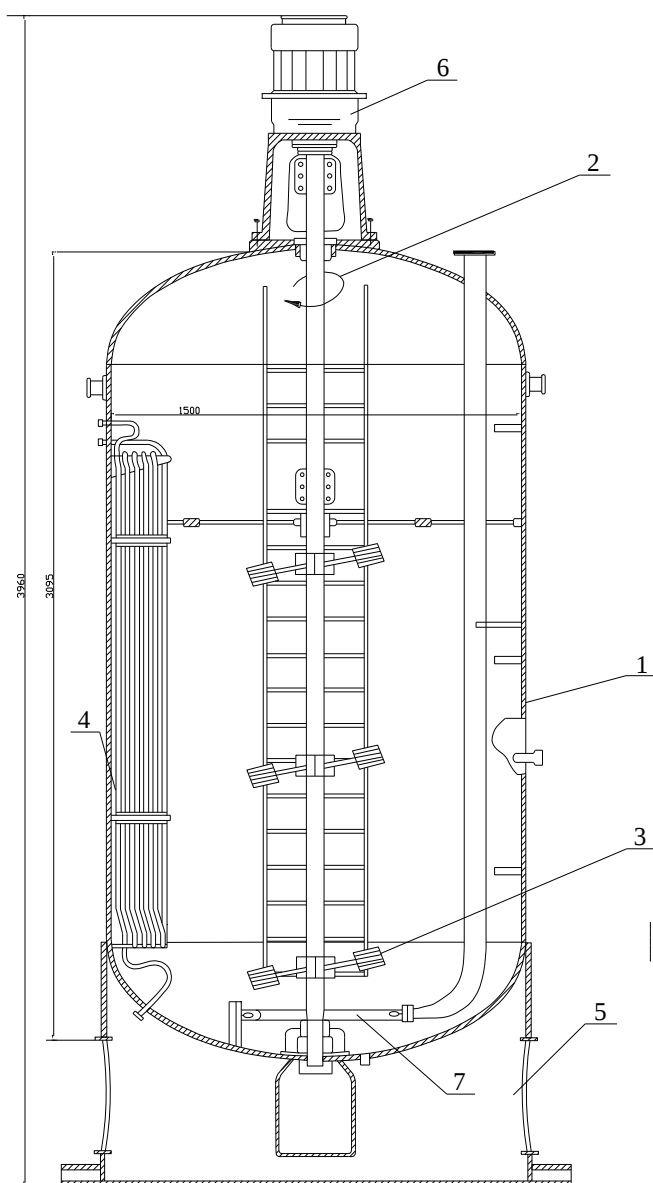


Рис. 3.1 - Ферментер:

1 – корпус, 2 – вал мішалки, 3 – лопаті мішалки, 4 –змійовик, 5 – опори,
6 – привід мішалки, 7 - барботер

Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

162.01.01.00 000 ПЗ

Арк.

28

Для забезпечення ефективного тепло- та масопереносу у всьому об'ємі ферментера він обладнаний трьохярусною мішалкою потужністю 3775 Вт/м³.

Питома потужність трьохярусної мішалки обраного апарату становить:

$$N_{\text{пит.м.}} = 3775 / 3^{0,5} = 2182 \text{ Вт/м}^3.$$

Тоді загальна потужність мішалки для перемішування культуральної рідини об'ємом 1,68 м³:

$$N_{\text{заг.м.}} = 2186 * 1,68 = 3666 \text{ Вт.}$$

Знаючи потужність мішалки, можна розрахувати число обертів мішалки для забезпечення ефективності перемішування:

$$N_{\text{заг.м.}} = K_N \rho n^3 d^5,$$

де K_N – критерій потужності для мішалки, $K_N = 6-7$;

ρ – щільність рідини, кг/м³, $\rho = 1015 \text{ кг/м}^3$;

n – число обертів мішалки, с⁻¹;

d_m – діаметр мішалки, м, $d_m = 0,8 \text{ м.}$

Тоді число обертів мішалки становить:

$$n = (3666 * (6 * 1015 * 0,8^5))^{1/3} = 1,5 \text{ с}^{-1}.$$

Розрахуємо основні конструктивні параметри ферментеру, враховуючи основні розміри: об'єм 3,2 м³, внутрішній діаметр ферментера 1,5 м, діаметр мішалки 0,8 м, висота апарату 4 м, щільність культуральної рідини 1015 кг/м³, в'язкість культуральної рідини $1,1 \cdot 10^{-3} \text{ Па} \cdot \text{с}$ зокрема: товщину стінки апарату, діаметр валу мішалки, фланець для встановлення кришки люка.

Товщина стінки ферментеру δ , м:

$$\delta = \frac{pD}{2\varphi\sigma_{\text{дон}}} + C + C_1,$$

де p – розрахунковий тиск, МПа, $p = 0,3 \text{ МПа}$;

D – діаметр апарата, м;

φ – коефіцієнт міцності повздовжнього зварного шву, приймається від 0,7 до 1,0, приймаємо середнє значення 0,85;

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
						29
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

$\sigma_{дон}$ – допустима напруга, МПа, для нержавіючої сталі при заданих умовах стерилізації, $\sigma_{дон} = 140$ МПа;

C – додавання до товщини стінки для компенсації корозії, м;

C_1 – додаток на закруглення до цілого числа міліметрів.

Додавання до товщини стінки для компенсації корозії становить:

$$C = \Pi * \tau_a,$$

де Π – корозійна проникність, м/рік, для матеріалу ферментера $\Pi = 10^{-4}$ м/рік;

τ_a – амортизаційний термін служби ферментера, в середньому враховують для 10 років.

$$\text{Тоді } C = 10^{-4} * 10 = 10^{-3} \text{ м.}$$

$$\delta = \frac{0,3 \times 1,5}{2 \times 0,85 \times 140} + 10^{-3} = 0,002 + 0,001 = 0,003 \text{ м.}$$

Так як товщина стінки днища не може бути меншою за товщину стінки ферментера, то розрахуємо товщину еліптичного днища:

$$\delta = \frac{pR}{2\varphi\sigma_{дон} - 0,5p} + C + C_1$$

де R – радіус кривизни у верхній частині днища, радіус кривизни $R = D$.

$$\delta = \frac{0,3 \times 1,5}{2 \times 0,85 \times 140 - 0,5 \times 0,3} + 10^{-3} = 0,001 + 0,001 = 0,002 \text{ м.}$$

Отже товщина днища, розрахована для забезпечення умов процесу, не більше товщини стінки і відповідає параметрам апарата, що дорівнює 0,005 м.

Обертний момент мішалки:

$$M_{об} = N/\omega,$$

де N – потужність валу, Вт;

ω – кутова швидкість обертання валу, рад/с, яка становить:

$$\omega = 2\pi n,$$

де n – швидкість обертання валу, об/с.

$$\omega = 2\pi n = 2 * 3,14 * 1,2 = 7,536 \text{ рад/с}$$

$$M_{об} = 3775/7,536 = 500 \text{ Н м.}$$

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		30

Діаметр валу для забезпечення процесу становить:

$$d = 1,7 \sqrt[3]{M_{об}/\tau_{\partial}}$$

де τ_{∂} – напруга на скручування, Па, для матеріалу ферментера $\tau_{\partial} = 44 \cdot 10^6$ Па.

$$d = 1,7 \sqrt[3]{500/44 \cdot 10^6} = 0,004 \text{ м.}$$

Так як стандартний діаметр валу 0,005 м, то розраховані параметри відповідатимуть нормам.

Фланець для кришки люка обираємо серед стандартних параметрів – приварний плоский з гладкою поверхнею з такими параметрами:

$D_{\phi} = 1630$ мм, $D_B = 1590$ мм, $h = 35$ мм, кріплення кришки здійснюється 52 болтами діаметром М20.

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
						31
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

3.3 Опис технологічного процесу

На основі відомостей, наведених у розділі 2, про біосинтез цефалоспоринової, 7-аміноцефалоспоринової кислоти та цефатоксиму загальними етапами технологічного процесу є:

1. біосинтез цефалоспоринової С грибом *A. chrysogenum*,
2. ензиматичний синтез з молекули цефалоспоринової С 7-аміноцефалоспоринової кислоти у реакціях відщеплення ферментом ацилазою аміноадипінової кислоти,
3. хімічний синтез з молекули 7-аміноцефалоспоринової кислоти шляхом заміни двох радикалів у бічних ланцюгах.

Важливим є процес утворення молекули цефалоспоринової мікробним синтезом, який має різноманітні шляхи регуляції.

З 1990-х років геномні, транскриптомні та протеомні дослідження регуляторних механізмів біосинтезу цефалоспоринової С активно розвиваються завдяки використанню сучасних молекулярно-біологічних інструментів і зростаючим обсягам біоінформатичних даних. Гени *A. chrysogenum*, що кодують ферменти біосинтезу антибіотика, були досліджені багатьма науковими групами на рівні мРНК у різних фазах ферментації, з додаванням чи без додавання додаткових речовин, а також за різних умов росту та середовищ.

Так, на рівні транскрипції генів біосинтезу, регулюючи продукцію цефалоспоринової С, впливають метіонін, глюкоза і рН.

Різні транскрипційні фактори можуть активувати або пригнічувати один чи кілька генів, що призводить до значних змін у продуктивності цефалоспоринової. Наприклад: Velvet - глобальний регулятор нитчастих грибів, регулює біосинтез цефалоспоринової шляхом контролю транскрипції генів *cefEF*

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		32

і бере участь у фрагментації гіфів; RasC - цинк-пальцевий транскрипційний фактор, що регулює експресію багатьох генів у рН-залежний спосіб; CRE1 - репресорний фактор, що реагує на джерело вуглецю, наприклад, глюкозу, і зв'язується з генами *rcbC* і *cefEF*; CPCR1 - ще один транскрипційний фактор, що зв'язується з геном *rcbC*, регулюючи ранні стадії біосинтезу цефалоспорину.

Посттранскрипційна регуляція - регуляторний вплив може також проявлятися через активність ферментів без змін транскрипції. Наприклад: синтетаза ACV пригнічується за наявності глюкози та метаболіту гліцеральдегід-3-фосфату; активність L- α -AAA-редуктази з лізинового біосинтезу зменшується в штаммах з високою продуктивністю цефалоспорину, щоб забезпечити адекватний рівень АТФ та L- α -AAA, які є ключовими вихідними матеріалами для біосинтезу цефалоспорину.

Біосинтез вторинних метаболітів у нитчастих грибах часто асоціюється з розвитком і диференціацією клітин. Високопродуктивні штами *A. chrysogenum* втратили функцію утворення конідіоспор, але виробляють цефалоспорин за рахунок специфічних диференційованих клітин – артроспор; також підвищена фрагментація гіфів супроводжується посиленням біосинтезу цефалоспорину під впливом різних регуляторних факторів, таких як метіонін, CPCR1 або velvet.

Отже, враховуючи реакції біосинтезу цефалоспорину у клітині продуцента та шляхи регуляції синтезу, при отриманні антибіотика потрібно враховувати різні аспекти на всіх стадіях процесу.

Цефалоспорин С виробляється в аеробних умовах та проводиться як типовий, так і нетиповий методи ферментації, використовуючи вільний або іммобілізований гриб.

Класичний метод виробництва. Для виробництва цефалоспорину С використовують ферментацію в рідкому середовищі або твердотільну ферментацію в біореакторі періодичної дії або безперервному реакторі з

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		33

мішалкою. Однак цей метод є менш сприятливим для виробництва цефалоспоринової С через високу ймовірність обмеження кисню. Для збільшення виходу цефалоспоринової С здійснюють удосконалення конструкції біореактора шляхом встановлення аераційних кілець і мішалок, що забезпечує безперервне постачання та рівномірний розподіл кисню протягом усього процесу ферментації.

Нетиповий метод виробництва. Передбачає використання заповнених шарових біореакторів або аероліфтних біореакторів. Ці методи мають перевагу в можливості роботи як у періодичному, так і в безперервному режимах з належною аерацією та перемішуванням, що забезпечує високий вихід цефалоспоринової С.

Розглянемо основні умови проведення процесу.

Ферментаційне середовище забезпечує основні компоненти, необхідні для росту гриба та вироблення вторинних метаболітів, пов'язаних із його ростом. Воно включає такі компоненти:

1. Джерела вуглецю: глюкоза, сахароза, фруктоза, меляса, лактоза тощо. Необхідні для морфологічної диференціації гриба, що впливає на вихід цефалоспоринової С.

2. Органічні та неорганічні джерела азоту: пептон, сечовина, м'ясний екстракт, екстракт дріжджів, казеїн, м'ясний бульйон, сульфат амонію, хлорид амонію, нітрат амонію, фосфат амонію, нітрат калію тощо. Впливають на диференціацію міцелію до роздутих гіф або метаболічно неактивних артроспор, що, своєю чергою, впливає на біосинтез цефалоспоринової С.

3. Мікроелементи та необхідні вітаміни.

Важливим є забезпечення аеробних умов. Достатнє постачання розчиненого кисню (приблизно 40% і вище). Аераційні кільця забезпечують постійне постачання кисню та його рівномірний розподіл у процесі ферментації.

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
						34
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Забезпечення оптимального значення рН. Невеликі зміни рН легко відстежуються за допомогою рН-метра.

Оптимальна температура підтримується шляхом пропускання води через сорочку реактора для стимуляції швидкого росту гриба. Невеликі зміни температури легко відстежуються температурними датчиками, чутливими до коливань.

Силіконова олія використовується для контролю піноутворення.

Хімічні інгібітори та блокатори використовуються для запобігання або інгібування взаємодії між сирим цефалоспорином С та іншими хімічними сполуками (подібними або відмінними за структурою), які можуть накопичуватися у рідкому середовищі після завершення ферментації.

Культура вирощувалася в стерилізованому середовищі наступного складу:

- 30 г/л сахарози,
- 1,5 г/л дигідрофосфату калію,
- 0,3 г/л сульфату магнію,
- 15 мл розчину мікроелементів.

Культуру вирощували близько 6-7 днів за температури 28°C у ротаційному шейкері зі швидкістю обертів 200 об/хв.

Виробництво цефалоспориноу С за допомогою *Acremonium chrysogenum* на ферментаційному середовищі відбувається при температурі 28°C протягом 144 годин.

На початковому етапі процесу спостерігається швидке споживання сахарози для утворення біомаси.

рН середовища підтримувався на рівні 7,2 за допомогою використання 2-молярного розчину гідроксиду калію (KOH) та 2-молярного розчину соляної кислоти (HCl).

Температура підтримувалася за допомогою протоку води через сорочку реактора.

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
						35
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Концентрація розчиненого кисню підтримувалася на рівні понад 30% насичення за рахунок аерації та перемішування.

Після вичерпання вуглеводів (сахарози) розпочинається повільне їх споживання, внаслідок чого відбувається основне виробництво цефалоспоринової С. Ця стадія відома як ідіофаза, під час якої ріст клітин стає незначним. Максимальну кількість цефалоспоринової С отримують через 120 годин ферментації, тоді як найвищий ріст клітин відбувається через 42 години ферментації.

Накопичення вторинних метаболітів відбувається під час ідіофази після трофофази (фази росту), тому ці метаболіти називають ідіолітами.

Суша маса клітин відділяється шляхом центрифугування культуральної рідини з клітинами, дворазового промивання дистильованою водою, повторного центрифугування, надосадова рідина направляється на виділення.

Цефалоспорин С виділяють з рідкого середовища серією послідовних етапів для ізоляції та очищення отриманого антибіотика на іонообмінній смолі та екстракцією розчинником.

Отриманий розчин сушать, після цього отримують суху очищену форму антибіотика, яка направляється на стадії ензиматичного отримання 7-АЦК та хімічного синтезу цефотаксиму, описані у розділі 2.

При проведенні процесу також враховують наступні фактори, що впливають на біосинтез цефалоспоринової С:

1. Вплив метіоніну: Зі збільшенням концентрації метіоніну до 4,0 г/л також підвищується концентрація цефалоспоринової С, оскільки метіонін постачає сірку для процесу синтезу. Після досягнення цього рівня концентрація антибіотика починає знижуватися. Оптимальна концентрація метіоніну стимулює морфологічну диференціацію грибка і збільшує вихід антибіотика. 0,4% концентрації метіоніну є оптимальною для реакції синтезу.

2. Вплив сульфату амонію: Сульфат амонію підвищує продукцію цефалоспоринової С за рахунок збільшення сухої маси клітин. Однак надмірно

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		36

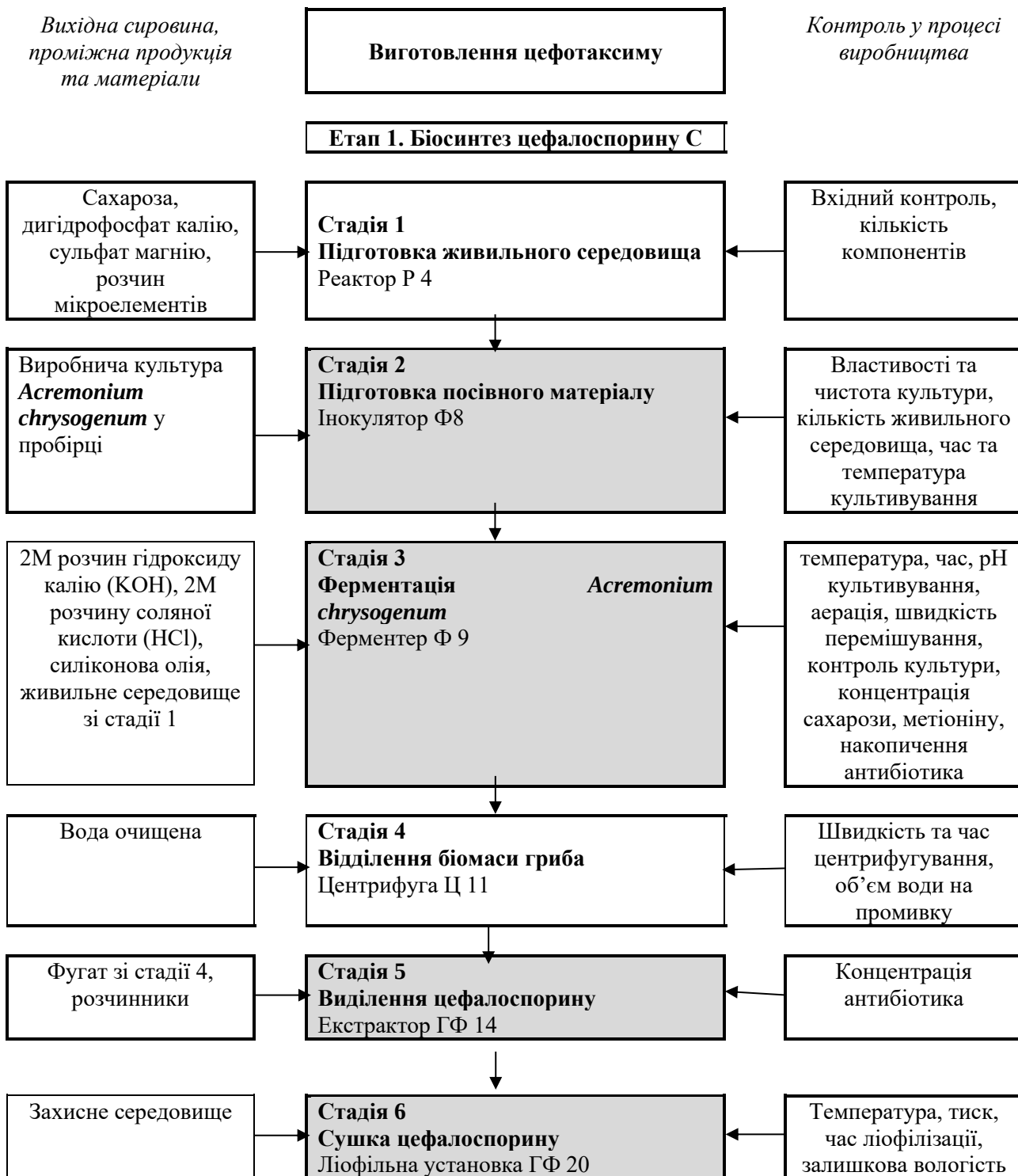
висока концентрація сульфату амонію знижує швидкість синтезу, оскільки заважає морфологічній диференціації міцелію.

3. Вплив співвідношення C/N (вуглець/азот): Співвідношення C/N в межах 5,33-8,0 збільшує швидкість синтезу цефалоспоринової С. Проте накопичення сахарози в середовищі може пригнічувати синтез ферментів, відповідальних за утворення цефалоспоринової С, що призводить до зниження його виходу.

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
						37
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

3.4 Схеми виробництва

Технологічна та апаратурна схеми (цех ферментації) виробництва цефатоксиму наведено на рис. 3.2 та 3.3.



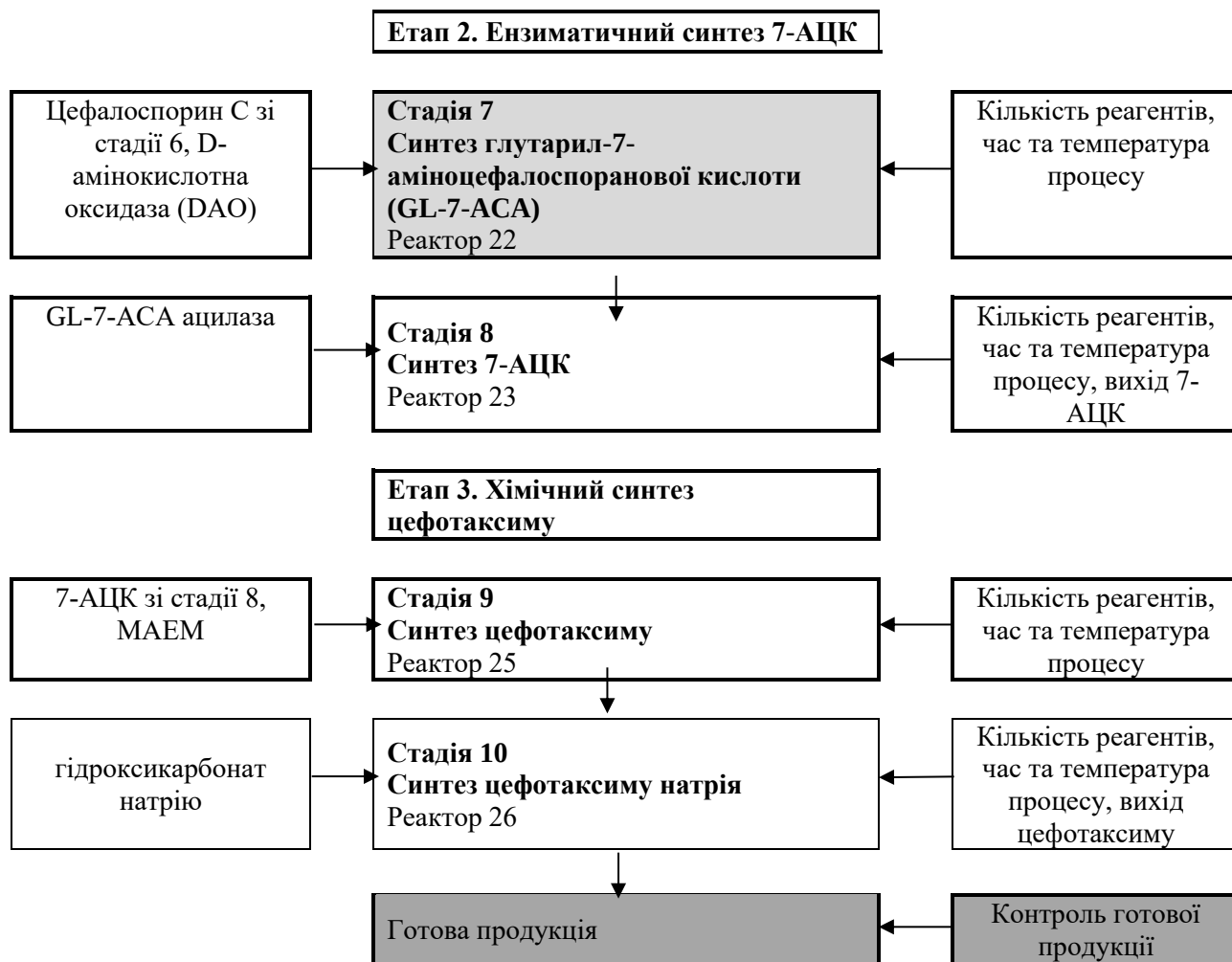


Рис. 3.3 – Технологічна схема отримання цефотаксиму

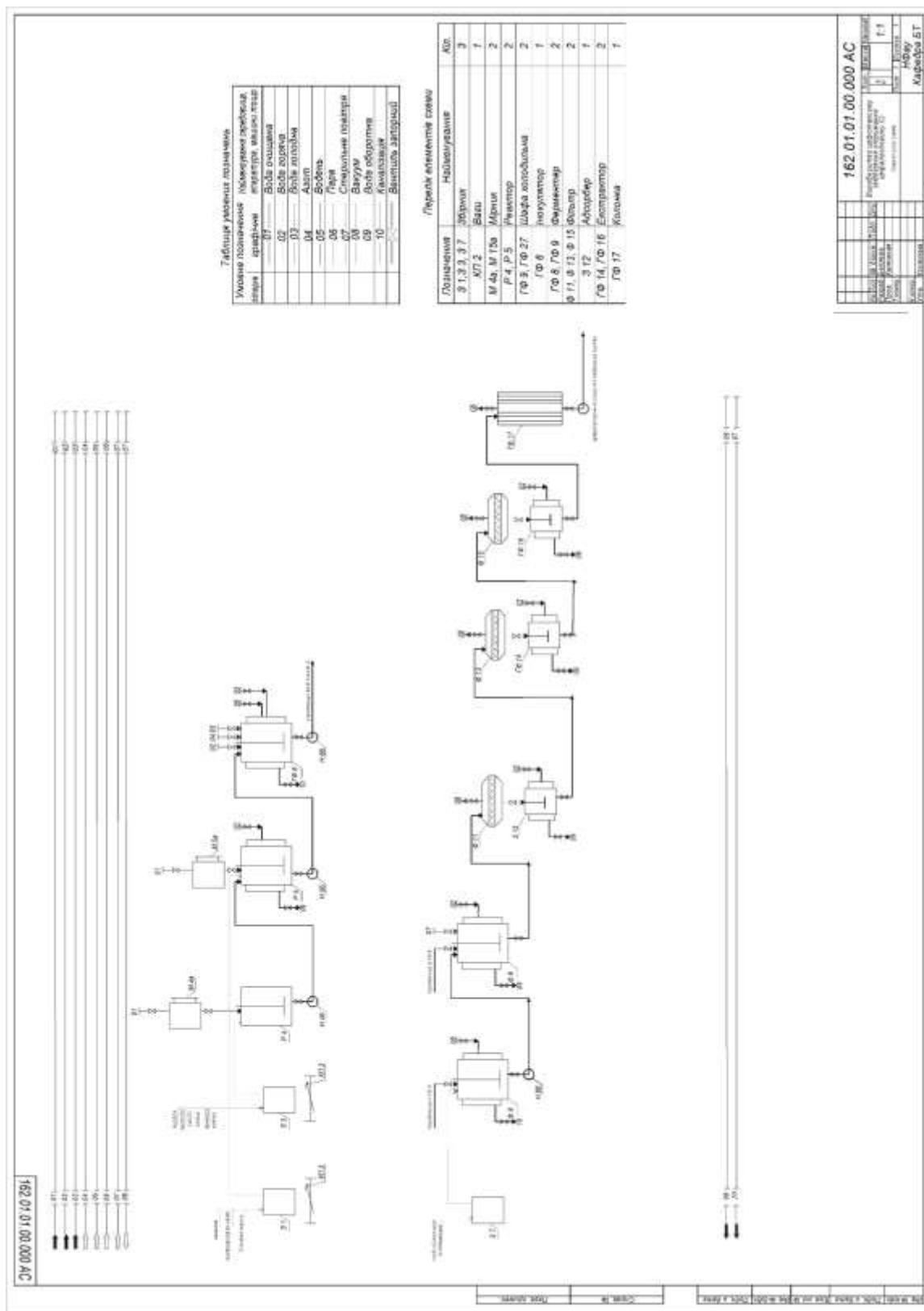


Рис. 3.3 – Апаратурна схема виробництва цефотаксиму (відділення отримання цефалоспориноу С)

3.5 Критичні параметри виробництва

У табл. 3.1 наведені контрольні точки на стадіях культивування продуцента у відділенні отримання цефалоспориноу С.

Таблиця 3.1 – Контроль параметрів

№	Критичні точки	Періодичність контролю	Значення параметру	Метод контролю
1	2	3	4	5
1	Кількість компонентів живильного середовища	на кожній серії		Об'ємно-ваговий дозатор
2	Параметри стерилізації: температура тиск час	на кожній серії	121 С 0,3 МПа 30 хв	Автоматично
3	Стерильність середовища	на кожній серії	відсутність мікроорганізмів	Метод висівання
4	Кількість середовища в колбах	на кожній серії	1,84 л	Мірний посуд
5	Кількість посівного матеріала в колбах	на кожній серії	0,15 л	Мірний посуд
6	Параметри культивування в колбах: час температура перемішування рН	на кожній серії	72 год 28 С 200 об/хв 7,0	Автоматично
7	Кількість середовища в інокуляторі	на кожній серії	0,02 м ³	Об'ємно-ваговий дозатор

8	Кількість посівного матеріала в інокуляторі	на кожній серії	0,002 м³	Об'ємно-ваговий дозатор
9	Параметри культивування в інокуляторі: час температура перемішування аерація	на кожній серії	72 год 28 С 200 об/хв 7,0	Автоматично
10	Кількість середовища в ферментері 1	на кожній серії	0,15 м³	Об'ємно-ваговий дозатор
11	Кількість посівного матеріала в ферментері 1	на кожній серії	0,02 м³	Об'ємно-ваговий дозатор
12	Параметри культивування в ферментері 1: час температура перемішування аерація	на кожній серії	144 год 28 С 200 об/хв 7,0	Автоматично
13	Кількість середовища в ферментері 2	на кожній серії	1,53 м³	Об'ємно-ваговий дозатор
14	Кількість посівного матеріала в ферментері 2	на кожній серії	0,15 м³	Об'ємно-ваговий дозатор
15	Параметри культивування в ферментері 2: час температура перемішування аерація	на кожній серії	144 год 28 С 200 об/хв 7,0	Автоматично

3.6 Екологічні аспекти виробництва

Українські фармацевтичні виробники повинні дотримуватися наступних екологічних стандартів і нормативів:

Закон України "Про охорону навколишнього природного середовища".

Закон України "Про відходи".

Закон України "Про охорону атмосферного повітря".

Закон України "Про забезпечення санітарного та епідемічного благополуччя населення".

ДСанПіН 2.2.7.029-99 "Гігієнічні вимоги до утилізації промислових відходів".

Санітарні правила охорони поверхневих вод від забруднення.

ДБН В.2.5-28-2006 "Інженерне обладнання будівель і споруд. Захист від забруднення атмосферного повітря".

ISO 14001 "Системи екологічного менеджменту".

ISO 50001 "Системи енергетичного менеджменту".

Вимоги ЄС щодо обмеження використання небезпечних речовин (RoHS).

Вони повинні визначати гранично допустимі концентрації (ГДК) шкідливих речовин у воді та повітрі, встановлені українським законодавством, та проводити оцінку впливу на довкілля відповідно до закону України "Про оцінку впливу на довкілля".

Фармацевтичні підприємства, що займаються виробництвом антибіотиків, стикаються з наступними екологічними проблемами: скиди забруднених стічних вод, викиди в атмосферу, утворення твердих відходів, енергетичні витрати та вуглецевий слід, високий ризик впливу на місцеві екосистеми.

В процесі виробництва антибіотиків у воду можуть потрапляти залишки активних речовин, розчинники, токсичні речовини або важкі метали. Це

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
						43
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

забруднює водні об'єкти і може призводити до резистентності мікроорганізмів.

В процесі ферментації та інших хімічних реакцій утворюються летючі органічні сполуки, аміак, метан тощо, що забруднюють повітря і сприяють зміні клімату.

Фармацевтичне виробництво генерує значну кількість біологічних, хімічних та токсичних відходів, які потребують спеціальної утилізації. Неправильна утилізація може призводити до довготривалого забруднення ґрунту.

Високе енергоспоживання, що пов'язане з ферментацією, очищенням і утилізацією продуктів, підвищує викиди парникових газів.

Потрапляння залишків антибіотиків у природу може порушувати біорізноманіття та впливати на мікрофлору довкілля.

Шляхами вирішення наведених екологічних проблем можуть бути наступні заходи:

1. технологічна модернізація, зокрема впровадження енергоефективного обладнання для скорочення енергоспоживання, використання замкнутих систем для очищення стічних вод і скорочення їх викиду, перехід на біотехнології з використанням менш токсичних розчинників та реагентів;

2. скорочення відходів, наприклад за рахунок рециклінгу побічних продуктів виробництва, впровадженню технологій утилізації відходів (наприклад, спалювання при високих температурах або використання адсорбентів);

3. ефективне очищення стічних вод за рахунок встановлення сучасних багатоступневих систем біологічного та хімічного очищення, використання мембранних технологій для відділення забруднюючих речовин;

4. постійний контроль за викидами в атмосферу за рахунок встановлення фільтрів та газоочисних установок на місцях викидів, зменшення утворення летючих органічних сполук за рахунок зміни технологій виробництва;

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
						44
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

5. оптимізація використання ресурсів, зокрема заміна невідновлюваних джерел енергії на відновлювані (сонячні, вітрові), перехід на використання водозберігаючих технологій;

6. розробка системи екологічного менеджменту через впровадження стандартів ISO 14001 і 50001 для постійного моніторингу впливу на екологію, проведення навчання для співробітників щодо екологічних практик.

Для вирішення питань модернізації можливе залучення інвестицій за рахунок отримання грантів або пільгових кредитів для впровадження екологічних технологій, участі у міжнародних програмах підтримки сталого розвитку.

Рішення цих проблем допоможуть підприємству не лише зменшити негативний вплив на довкілля, а й підвищити економічну ефективність, відповідати міжнародним стандартам і зміцнити репутацію.

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
						45
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ВИСНОВОК

Робота має прикладне значення для фармацевтичної галузі, сприяючи виробництву високоякісних антибіотиків з мінімальним впливом на довкілля.

У ході роботи були вирішені ключові завдання щодо удосконалення технології виробництва цефотаксиму:

Оптимізовано умови біосинтезу цефалоспорину С з використанням штаму *Acremonium chrysogenum*, що дозволило досягти максимального виходу продукту на рівні 24–28 г/л. Оптимізовані умови ферментації (рівень рН, температурний режим, подача кисню) забезпечили стабільну продуктивність і скорочення часу ферментації.

Впровадження двоетапного ферментативного методу (з використанням D-амінокислотної оксидази та GL-7-ACA-ацилізи) дозволило знизити кількість відходів до 1% порівняно з хімічним методом.

Застосування нових реагентів у хімічному синтезі цефотаксиму забезпечило скорочення часу реакції та підвищення чистоти продукту. Скорочення використання токсичних реагентів зменшило обсяг небезпечних стічних вод.

Оптимізація хімічного синтезу шляхом введення нових реагентів і каталізаторів дозволила скоротити тривалість реакцій і підвищити чистоту кінцевого продукту до стандартів фармацевтичної якості.

Удосконалено процес додавання бічних ланцюгів, що забезпечило створення стабільного та активного антибіотика.

Результати дослідження можуть бути використані фармацевтичними підприємствами для підвищення ефективності виробництва антибіотиків і зниження їхньої собівартості.

Таким чином, удосконалення технології виробництва цефотаксиму сприяє підвищенню його якості, зниженню витрат і забезпеченню екологічної стійкості фармацевтичної галузі.

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		46

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Буценко Л. М., Пенчук Ю. М., Пирог Т. П. Технології мікробного синтезу лікарських засобів : навч. посіб. Київ : НУХТ, 2010. 323 с.
2. ДСТУ ГОСТ 2.612:2014. Єдина система конструкторської документації. Електронний формуляр. Загальні вимоги. (ГОСТ 2.612–2011, IDT). Офіц. вид. Вперше ; чинний від 2014–11–01. Київ : Мінекономрозвитку України, 2014. 47 с.
3. Екологічна біотехнологія : навч. посіб. : у 2 кн. / О. В. Швед та ін. Львів : Вид-во Львів. політехніка, 2018. Т. 1. 424 с.
4. Капрельянц Л. В. Теоретичні основи біотехнології : навч. посіб. Харків : Факт, 2020. 296 с.
5. Красінко В. О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв : консп. лекцій. Київ : НУХТ, 2019. 252 с.
6. Кукоба В. Удосконалення виробництва антибіотику стрептоміцину : кваліфікаційна робота. Харків, 2022. 99 с.
7. Лемішко Ю. К. Виробництво еритроміцину для ін'єкцій : магістерська дис. на здобуття освітнього ступеня магістр. Київ, 2021. 110 с.
8. Методичні рекомендації до виконання кваліфікаційної роботи бакалавра для здобувачів вищої освіти спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» ОП «Біотехнологія» / О. С. Калюжная та ін. Харків : НФаУ, 2024. 128 с.
9. Мікробіологія / М. Г. Сергійчук та ін. Київ : Київ. ун-т, 2008. 541 с.
10. Пирог Т. П. Загальна мікробіологія : підручник. 2-ге вид., допов. і перероб. Київ : НУХТ, 2010. 632 с.
11. Пирог Т. П., Ігнатова О. А. Загальна біотехнологія : підручник. Київ : НУХТ, 2009. 336 с.

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
						47
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

12. Про охорону навколишнього природного середовища : Закон України від 25 черв.1991 р. № 1264–XII. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/1264-12> (дата звернення: 30.04.2024).

13. Сидоров Ю. І., Влязло Р. Й., Новіков В. П. Процеси і апарати мікробіологічної промисловості. Технологічні розрахунки. Приклади і задачі. Ч. І. Ферментація. Львів : Вид–во Львів. політехніка, 2004. 240 с.

14. Сидоров Ю. І., Влязло Р. Й., Новіков В. П. Процеси і апарати мікробіологічної промисловості. Технологічні розрахунки. Приклади і задачі. Ч. II. Обробка культуральних рідин. Львів : Вид–во Львів. політехніка, 2004. 296 с.

15. Сидоров Ю. І., Влязло Р. Й., Новіков В. П. Процеси і апарати мікробіологічної промисловості. Технологічні розрахунки. Приклади і задачі. Ч. III. Основи проектування мікробіологічних виробництв. Львів : Вид–во Львів. політехніка, 2004. 252 с.

16. Сучасний стан і перспективи біотехнологічного виробництва антибіотиків / Т. С. Тодосійчук та ін. *Біологічні студії*. 2011. Т. 5, № 1. С. 159–172.

17. Технологічне обладнання біотехнологічної і фармацевтичної промисловості : підруч. для вищ. навч. закл. / М. В. Стасевич та ін. Львів : Новий Світ–2000, 2018. 410 с.

18. Технологія ліків промислового виробництва : підруч. для студентів вищ. навч. закл. : в 2–х ч. / В. І. Чуєшов та ін. 2–ге вид., перероб. і допов. Харків : НФаУ : Оригінал, 2013. Ч. 2. 638 с.

19. Цибуля С. С. Удосконалення технології отримання лікарського засобу Лінкоміцин : дипломна робота. Київ, 2020. 96 с.

20. Чумак А. А., Мележик О. В., Цейслер Ю. В. Антибіотики : опорний конспект лекцій. Київ : Вид–во Університет «Україна», 2020. 74 с.

21. Article Review: Production and Purification of Antibiotics from Environmental Microorganism / S. T. Hashim et al. *Stallion Journal for*

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		48

Multidisciplinary Associated Research Studies. Vol. 3(4). P. 11–24 DOI: 10.55544/sjmars.3.4.2.

22. Challenges of unculturable bacteria: Environmental perspectives / A. Bodor et al. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. 2020. Vol. 19. P. 1–22. DOI: 10.1007/s11157-020-09522-4.

23. Cook M. A., Wright G. D. The past, present, and future of antibiotics. *Science Translational Medicine*. 2022. № 14. DOI: 10.1126/scitranslmed.abo7793.

24. Incentivising the development of new antibacterial treatments 2023. Progress Report by the Global AMR R&D Hub & WHO. URL: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/antimicrobial-resistance/amr-gcp-irc/incentivising-development-of-new-antibacterial-treatments-2023---progress-report.pdf?sfvrsn=72e4f738_3 (Date of access: 10.11.2024).

25. Hutchings M., Truman A., Wilkinson B. Antibiotics: past, present and future. *Current Opinion in Microbiology*. 2019. Vol. 51. P. 72–80. DOI: 10.1016/j.mib.2019.10.008.

26. Newman D. J., Cragg G. M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products*. 2020. Vol. 83. P. 770–803. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.9b01285.

27. Towards the sustainable discovery and development of new antibiotics. M. Miethke et al. *Nature Reviews Chemistry*. 2021, Vol. 5(10). P. 726–749. DOI: 10.1038/s41570-021-00313-1ff.

28. Understanding the antibiotic manufacturing ecosystem. A view of global supply chains, pressure points, and implications for antimicrobial resistance response. URL: <https://cms.wellcome.org/sites/default/files/2022-04/understanding-the-antibiotic-manufacturing-ecosystem-2022.pdf> (Date of access: 10.11.2024).

29. World Health Organization Prioritization of Pathogenes to Guide Discovery, Research and Development of New Antibiotics for Drug-Resistant Bacterial Infections, including Tuberculosis. 2017. URL:

<https://www.who.int/publications/i/item/WHO-EMP-IAU-2017.12> (Date of access: 01.12.2024).

30. Brown E. D., Wright G. D. Antibacterial drug discovery in the resistance era. *Nature*. 2016. Vol. 529. P. 336–343. DOI: 10.1038/nature17042.

31. De Simeis D., Serra S. Actinomycetes: A never-ending source of bioactive compounds - An overview on antibiotics production. *Antibiotics*. 2021. Vol. 10(5). P. 483. DOI: 10.3390/antibiotics10050483.

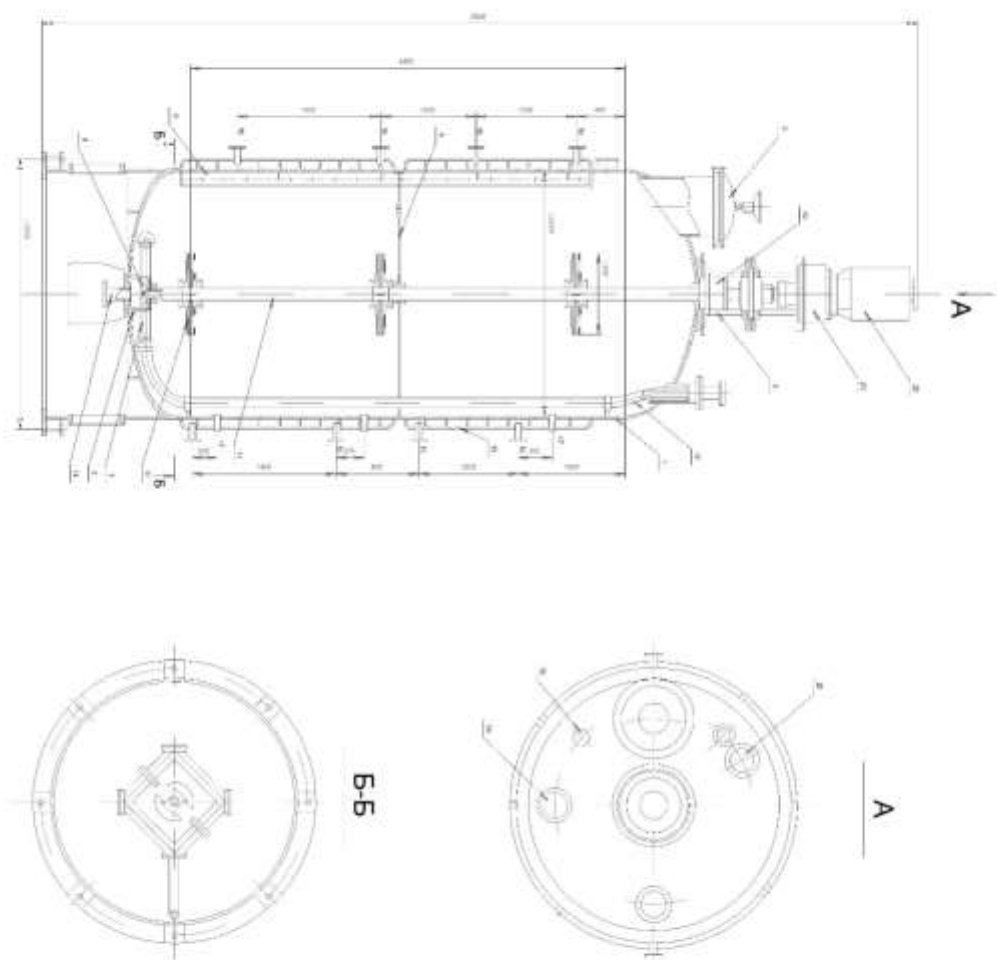
32. Цефотаксим / Державний реєстр лікарських засобів. URL: <http://www.drlz.com.ua/ibp/ddsite.nsf/all/shlist?opendocument&sklad=%F6%E5%F4%EE%F2%E0%EA%F1%E8%EC> (дата звернення: 01.12.2024).

33. Цефотаксим : Лекхім. URL: https://www.lekhim.ua/uk/cefotaksym_dose-10-g-no-1 (дата звернення: 01.12.2024).

34. Цефотаксим-БХФЗ : БХФЗ. URL: <http://bcpp.com.ua/product/tsefotaksim-bhfz> (дата звернення: 01.12.2024).

35. Цефотаксим-Дарниця : Дарниця. URL: <https://darnytsia.ua/catalog/tsefotaksim-darnitsya> (дата звернення: 01.12.2024).

ДОДАТКИ



Перепиши следующие частные афоризмы

Год	Название	Надлежащее	Мат.	Политик
1	Бонус	1	1	
2	Смеш	1	1	
3	Две	1	1	
4	Три похода в лес	1	1	
5	Книжки опис	1	1	
6	Пятидесятый год	1	1	
7	Белый	1	1	
8	Книжки прописки	1	1	
9	Белый	1	1	
10	Три похода в лес	1	1	
11	Белый	1	1	
12	Пятидесятый	1	1	
13	Семьдесят	1	1	
14	Пятидесятый	1	1	
15	Семьдесят	1	1	
16	Пятидесятый	1	1	
17	Белый	1	1	
18	Белый	1	1	
19	Белый	1	1	
20	Белый	1	1	
21	Белый	1	1	
22	Белый	1	1	

[illegible]