

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ**  
**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ**

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

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

«\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_ р.

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

«\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_ р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА**  
**НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА**

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»  
(код та назва спеціальності)

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

на тему: Біосинтез поліпептидного антибіотика представниками роду *Bacillus*

Виконав: здобувачка 5 курсу, групи ЗБТ-5-1

МУЗИКУС Лія Євгенівна  
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник УДИМОВИЧ Віктор Миколайович  
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Консультанти \_\_\_\_\_  
(ім'я та прізвище) (підпис)

\_\_\_\_\_ (ім'я та прізвище) (підпис)

\_\_\_\_\_ (ім'я та прізвище) (підпис)

Рецензент ЗАБРОДСЬКА Ю.А.  
(ім'я та прізвище) (підпис)

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

Здобувач \_\_\_\_\_  
(підпис)

**Київ – 2026 р.**

# НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»  
(код і назва)

Освітньо-професійна програма «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна»  
(назва)

**ЗАТВЕРДЖУЮ**

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

**Віктор СТАБНИКОВ**

“ 01 ” грудня 2025 року

## З А В Д А Н Н Я

### НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

МУЗИКУС Лія Євгенівна

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біосинтез поліпептидного антибіотика представниками роду *Bacillus*

керівник роботи УДИМОВИЧ Віктор Миколайович, ст. викладач,  
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від 28.11.2025 року №957-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 31 січня 2026 р.

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Bacillus licheniformis*, цільовий продукт: бацитрацин, об'єм ферментера 20 м<sup>3</sup>, коефіцієнт заповнення 0,6

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)  
РОЗДІЛ 1. Характеристика бацитрацину. РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента. РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування бацитрацину. РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту. РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва бацитрацину. РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання виробництва бацитрацину. РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми виробництва бацитрацину. РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва бацитрацину. РОЗДІЛ 9. Охорона довкілля

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема виробництва бацитрацину – 1 аркуш формату А1.

Апаратурна схема виробництва бацитрацину – 1 аркуш формату А1.

## 6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01 грудня 2025 року

## КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика бацитрацину	09.11.2025-20.11.2025.	
2	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	09.11.2025-20.11.2025.	
3	Техніко-економічне обґрунтування бацитрацину	09.11.2025-20.11.2025.	
4	Біосинтез цільового продукту	09.11.2025-30.11.2025.	
5	Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва бацитрацину	01.12.2025-30.12.2025	
6	Специфікація обладнання виробни бацитрацину	01.12.2025-30.12.2025	
7	Опис технологічної схеми біосинтезу бацитрацину	01.12.2025-30.12.2025	
8	Контроль виробництва бацитрацину	01.01.2026-30.01.2026	
9	Оформлення пояснювальної записки	01.01.2026-30.01.2026	
10	Виконання графічної частини проекту	01.01.2026-30.01.2026	

Здобувач \_\_\_\_\_  
(підпис)

Керівник роботи \_\_\_\_\_  
(підпис)

Лія МУЗИКУС \_\_\_\_\_  
(ім'я та прізвище)

Віктор УДИМОВИЧ \_\_\_\_\_  
(ім'я та прізвище)

## РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячене розробці технологічної та апаратурної схем біосинтезу бацитрацину *Bacillus licheniformis* DW-BCAA6, у кількості 1029,83 МО/мл. Бацитрацин пропонується використовувати для виробництва бацитрацину цинку, для виробництва лікарського засобу для лікування бактеріального герпесу.

Розрахована потужність біотехнологічного виробництва складає 61902,127 кг бацитрацину на рік. Технологічна схема біосинтезу бацитрацину включає допоміжні роботи (підготовка стерильного аераційного повітря, приготування та стерилізацію поживних середовищ), а також безпосередньо технологічний процес (чотири стадії вирощування посівного матеріалу (у колбах на качалках, в інокуляторах об'ємом 20 л, 200 л та 200 л) та біосинтез у ферментері об'ємом 20,0 м<sup>3</sup> зі змінним коефіцієнтом заповнення 0,6).

Кваліфікаційна робота складається зі вступу, дев'яти розділів, списку використаної літератури (53 найменувань), технологічної (формат А1) та апаратурної (формат А1) схем. Загальний обсяг роботи – 79 сторінок, 19 таблиць, 8 рисунків.

**Ключові слова:** антибіотик, бацитрацин, *Bacillus licheniformis* DW-BCAA6, біосинтез, герпес, технологічна схема, апаратурна схема.

## ABSTRACT

The qualification work is devoted to the development of technological and apparatus schemes for the biosynthesis of bacitracin *Bacillus licheniformis* DW-BCAA6, in the amount of 1029.83 IU/ml. Bacitracin is proposed to be used for the production of zinc bacitracin, for the production of a drug for the treatment of bacterial herpes.

The estimated capacity of biotechnological production is 61902.127 kg of bacitracin per year. The technological scheme of bacitracin biosynthesis includes auxiliary work (preparation of sterile aeration air, preparation and sterilization of nutrient media), as well as the direct technological process (four stages of growing seed material (in flasks on rockers, in inoculators with a volume of 20 l, 200 l and 200 l) and biosynthesis in a fermenter with a volume of 20.0 m<sup>3</sup> with a variable filling factor of 0.6).

The qualification work consists of an introduction, nine sections, a list of used literature (53 items), technological (format A1) and apparatus (format A1) schemes. The total volume of the work is 79 pages, 19 tables, 8 figures.

**Keywords:** antibiotic, bacitracin, *Bacillus licheniformis* DW-BCAA6, biosynthesis, herpes, technological scheme, apparatus scheme.

## ЗМІСТ

РЕФЕРАТ.....	4
ЗМІСТ .....	5
ВСТУП.....	7
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БАЦИТРАЦИНУ .....	8
РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА .....	10
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	10
2.2. Розрахунок складу поживного середовища .....	14
2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента .....	14
2.4. Таксономічний статус біологічного агента.....	15
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ .....	16
3.1. Потреба у цільовому продукті.....	16
3.2. Розрахунок потужності виробництва.....	17
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів .....	18
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу .....	19
РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ .....	24
РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ .....	27
5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера .....	27
5.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря.....	28
5.3 Вибір мийних та дезінфікуючих засобів.....	29
5.4 Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища .....	38
5.4.1 Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках .....	39
5.4.2. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в посівних апаратах .....	40
5.4.3. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу.....	42
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ.....	44
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	49
РОЗДІЛ 8. ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ БАЦИТРАЦИНУ .....	57
8.1. Вибір способу відокремлення біомаси та обладнання.....	58
8.2. Обґрунтування вибору методу центрифугування .....	59
РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА .....	60
9.1. Мікробіологічний контроль.....	60

9.2. Показники росту і синтезу цільового продукту.....	62
9.2.1. Визначення концентрації біомаси бактерій .....	62
9.2.2. Визначення бацитрацину .....	62
9.2.3. Визначення концентрації джерела вуглецю .....	62
(крохмалу) у середовищі.....	62
9.2.4. Визначення концентрації джерела азоту (соєвого шроту) у поживному середовищі.....	63

## ВСТУП

Бацитрацин — це циклічний пептидний антибіотик, що синтезується *Bacillus subtilis* і *Bacillus licheniformis*. Активний проти грампозитивних мікроорганізмів, таких як бета-гемолітичні стрептококи, стафілококи та деяких грамнегативних патогенів. Фармакологічний ефект пов'язаний зі здатністю впливати на рибосоми мікроорганізмів з утворенням аномальних білків, що незворотно інгібує життєдіяльність мікробних клітин і приводить до їхньої загибелі (бактерицидна дія).

Широке використання бацитрацину у медичній практиці зумовлене високою ефективністю антибіотику для запобігання поширеності різноманітних бактеріальних інфекцій. В лікарських засобах у вигляді порошку або мазі, бацитрацин використовується у вигляді сполуки бацитрацину цинку у комбінації із іншими антибіотиками, зокрема неоміцином.

**Новизною даної роботи** є використання високопродуктивного штаму *Bacillus licheniformis* DW-BCAA6, що синтезує 1029,83 МО/мл бацитрацину під час біосинтезу на дешевому поживному середовищі, що містить відходи (соєвий шрот) сільськогосподарської промисловості і потребують додаткових витрат на утилізацію.

					<b>НУХТ БТЕК 05.01.36 КР ПЗ</b>			
<b>Змн.</b>	<b>Лист</b>	<b>№ докум.</b>	<b>Підпис</b>	<b>Дата</b>				
Розроб.		Музикус Л. Є.			<b>ВСТУП</b>	<b>Літ.</b>	<b>Арк.</b>	<b>Акрушів</b>
Консульт.							7	80
Керівник		Удимович В.М.				<b>Кафедра БТМ</b>		
Н. Контр.						<b>8</b>		
Зав. каф.		Стабніков В.П.						

## РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БАЦИТРАЦИНУ

Бацитрацин (Bacitracin) - поліпептидний антибіотик, що продукується *Bacillus licheniformis*. Активний щодо грампозитивних мікроорганізмів, включаючи *Clostridium spp.* Практично не діє грамнегативні мікроорганізми, не змінює чутливість грамнегативних кишкових мікроорганізмів до інших протимікробних лікарських засобів. Чинить виражену ростостимулюючу дію на птахів і покращує використання кормів [1, 2].

На рисунку 1.1 представлена структурна формула бацитрацину.

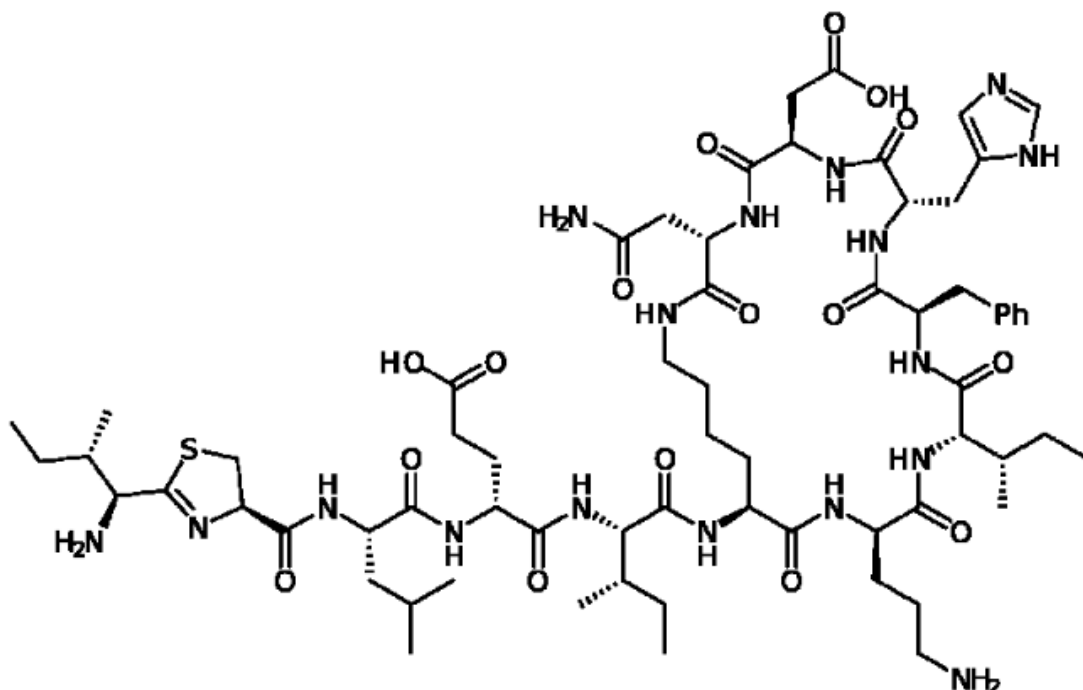


Рисунок 1. Структурна формула бацитрацину

Речовина природного походження. Білий або майже білий гігроскопічний порошок із хімічною формулою  $C_{66}H_{101}N_{17}O_{16}SZn$  та молекулярною масою приблизно 1455.38 г/моль, легкорозчинний у воді та спирті, практично нерозчинний в ефірі.

Бацитрацин виділений з *Bacillus licheniformis*, що складається з декількох пептидів (А, В, С, D, Е, F1-3). Бацитрацин А являє собою циклічний додекапептид і з 70% найважливішим компонентом бацитрацину. Для його

					<b>НУХТ БТЕК 05.01.36 КР ПЗ</b>			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Музикус Л. Є.				РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БАЦИТРАЦИНУ	Літ.	Арк.	Акрушів 9
Консульт.							8	80
Керівник	Удимович В.М.					<b>Кафедра БТМ</b>		
Н. Контр.								
Зав. каф.	Стабніков В.П.							

бактерицидної дії йому потрібні двовалентні катіони (наприклад, цинк), що утворюють стабільні комплекси. Він інгібує, подібно до ванкомицину, біосинтез клітинної стінки, переважно грамнегативних бактерій і коків, шляхом зв'язування з *bactoprenyl pyrophosphate*. Інгібітор протеази: Бацитрацин також використовується як інгібітор протеази.

Ідентифікують методом тонкошарової хроматографії; по утворенню фіолетового забарвлення з розчином міді (II) сульфату в середовищі натрію гідроксиду; субстанція не повинна набувати жовтого кольору при нагріванні. Кількісно визначають мікробіологічним методом. Фармакологічна група: D06AX05 — антимікробні препарати для зовнішнього використання, поліпептидний антибіотик.

Фармакологічні ефекти пов'язані зі здатністю інгібувати синтез білку на рибосомах з утворенням аномальних білків. Це необернено пригнічує життєздатність мікробних клітин та призводить до їхньої загибелі (бактерицидна дія). Ефективний відносно багатьох аеробних грампозитивних та деяких грамнегативних бактерій. Має кумулятивний ефект [3].

## РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

Бацитрацин — це циклічний пептидний антибіотик, що в основному виробляється *Bacillus subtilis* і *Bacillus licheniformis* і синтезується нерибосомальною поліпептидсинтетазою (NRPS). *Bacillus licheniformis* є грампозитивним мікроорганізмом, що утворює ендоспори, який можна легко виділити із зразків ґрунту та рослин. В останні роки геноми різних штамів *B. licheniformis* були секвеновані і прискіпливо досліджуються через зростання біотехнологічного інтересу до цього виду бактерій та кількості синтезованого бацитрацину[4-7].

У табл. 2.1. наведено результати біосинтезу бацитрацину і умови культивування для різних штамів *Bacillus licheniformis*. Як видно із даних наведених у таблиці, найбільша активність бацитрацину 1029.83 МО/мл спостерігається під час культивування *B. licheniformis* DW-BCAA6 протягом 48 год вирощування [5]. За аналогічний період часу штам *Bacillus licheniformis* UV-MN-HN-6 здатен продукувати антибіотик із активністю 59.1 МО/мл, що у 17,4 рази менше [8]. Наступним етапом вибору продуцента, є порівняння вартості поживних середовищ (табл. 2.2). Найбільша вартість середовища для культивування *B. licheniformis* UV-MN-HN-6 – 19,015 грн. Середовище для вирощування *B. licheniformis* DW-BCAA6 у 6 разів дешевше – 3,1 грн.

Розрахунок умовної вартості 1 МО одержаного продукту (див. табл. 2.3) є заключним етапом вибору. Найменша умовна вартість 1 МО бацитрацину вийшла для *B. licheniformis* DW-BCAA6 – 30,13 грн/МО. Для *lichiformis* UV-MN-HN-6 ціна становить вище у більше, ніж 10 разів – 321,74.

Отже, для біосинтезу бацитрацину обираємо як біологічний агент *B. licheniformis* DW-BCAA6.

<b>НУХТ БТЕК 05.01.36 КР ПЗ</b>				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.	Музикус Л. Є.			
Консульт.				
Керівник	Удимович В.М.			
Н. Контр.				
Зав. каф.	Стабніков В.П.			
<b>РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА</b>				
		Літ.	Арк.	Акрушія
			10	80
<b>Кафедра БТМ</b>				

Таблиця 2.1

Особливості біосинтезу бацитрацину різними штамми *Bacillus licheniformis*

Біологічний агент	Склад поживного середовища:		Тривалість культивування, год	Активність антибіотику, МО/мл	Особливості біосинтезу	Література
	компонент	вміст, г/л				
1	2	3	4	5	6	7
<i>Bacillus licheniformis</i> UV-MN-HN-6	Триптон Дріждж.екс-кт NaCl Лимонна к-та KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10,00 5,00 10,00 1,0 2,0	48,0	59.1	t=37°C, n = 250 об/хв pH=7,0	Aftab M. N., Haq I. U., Baig S. SYSTEMATIC MUTAGENESIS METHOD FOR ENHANCED PRODUCTION OF BACITRACIN BY <i>BACILLUS LICHENIFORMIS</i> MUTANT STRAIN UV-MN-HN-6. <i>Braz J Microbiol.</i> 2012 Jan;43(1):78-88. doi: 10.1590/S1517-83822012000100009.
<i>B. licheniformis</i> DW-BCAA6	Соевий шрот Крохмаль (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> CaCO <sub>3</sub>	100,00 45,0 1,0 6,0	48,0	1029.83	t=37°C, n = 230 об/хв pH=7,0	Cai D., Zhu J., Li Y., Li L., Zhang M., Wang Z., Yang H., Li J., Yang Z., Chen S. Systematic engineering of branch chain amino acid supply modules for the enhanced production of bacitracin from <i>Bacillus licheniformis</i> . <i>Metab Eng Commun.</i> 2020 Jun 11:11:e00136. doi: 10.1016/j.mec.2020.e00136

Таблиця 2.2

**Вартість поживних середовищ для вирощування продуцентів  
бацитрацину**

Продуцент	Складова поживного середовища	Вміст у складі ПС, г/л	Ціна складової, грн/кг	Вартість складової (грн) на 1 л ПС	Джерело інформації (1, 2, 3)*
1	2	3	4	5	6
<i>Bacillus licheniformis</i> UV-MN-HN-6	Триптон	10,00	500,00	5,00	<u>2</u>
	Дріждж.екс-кт	5,00	2620,0	13,1	<u>3</u>
	NaCl	10,00	46,0	0,46	<u>1</u>
	Лимонна к-та	1,0	65,0	0,065	<u>1</u>
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,0	197,0	0,39	<u>1</u>
	<b>Вартість 1 л середовища – 19,015 грн</b>				
<i>B. licheniformis</i> DW-BCAA6	Соевий шрот	100	28,0	0,28	<u>1</u>
	Крохмаль	45	50,0	2,25	<u>1</u>
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1	45,0	0,045	<u>1</u>
	CaCO <sub>3</sub>	6	88,0	0,53	<u>1</u>
	<b>Вартість 1 л середовища – 3,10 грн</b>				

**Примітка.** \* – Ціни наведено станом на жовтень 2024 р. 1 – <https://www.prom.ua/>

Таблиця 2.3

**Умовна вартість 1 МО бацитрацину**

Продуцент	Активність антибіотику, МО/л	Тривалість культивування, год	Активність одержаного бацитрацину за годину, МО/год	Вартість 1 л середовища, грн/л	Умовна вартість 1 МО бацитрацину, грн/МО
1	2	3	4	5	6
<i>Bacillus licheniformis</i> UV-MN-HN-6	0,0591	48	1,23	19,015	321,74
<i>B. licheniformis</i> DW-BCAA6	0,1029		21,45	3,10	30,13

## 2.2. Розрахунок складу поживного середовища

Розрахунок складу поживного середовища для вирощування *B. licheniformis* проводити не доцільно, оскільки кінцевий продукт біосинтезу антибіотик, концентрація якого виражена у МО і визначити масову концентрацію у середовищі в г/л можна лише приблизно.

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

Характерними особливостями даного представника є паличкоподібна форма клітини, наявність ендоспор, які утворюються в присутності кисню, висока біологічна активність. Клітини *B. licheniformis* представлені на рисунку 2.1 видовжені, вузькі, грам позитивні.

Одним із постійних ознак у *Bacillus licheniformis* є утворення ендоспор при вирощуванні їх в аеробних умовах. Спороутворення розглядається як важкий процес диференціювання, який призпитної водить до виникнення всередині мікробних клітин нових клітин. Розвиток спор розпочинається після переходу популяції мікробних клітин в стаціонарну фазу.

*Bacillus licheniformis* по відношенню до кисню – це факультативні анаероби. Оптимальне значення рН для розвитку цих бактерій – 7 (крайне значення рН 8 та 2), тобто це нейтрофіли.

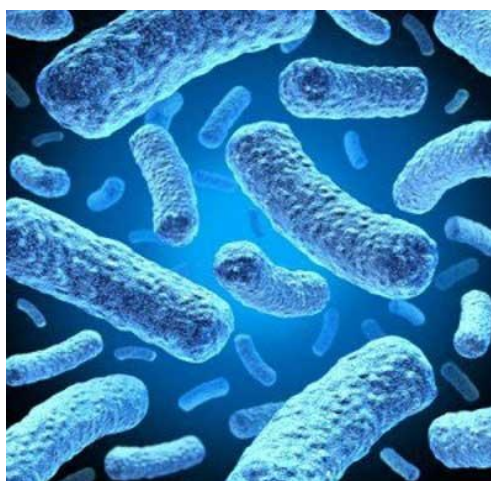


Рисунок 2.1 – Клітини *Bacillus licheniformis*

Здатність *Bacillus licheniformis* існувати в екстремальних умовах середовища виявляється здатністю їх білкового синтезу та структурою ферментних білків. *Bacillus licheniformis* витримує концентрацію солей в середовищі від 2 до 25 %.

Більшість спороутворювальних аеробних бактерій є мезофіли. Оптимум їх розвитку знаходиться в температурних межах 30 – 40°C. Термофільні бактерії відрізняються підвищеною біохімічною активністю. Їх ферменти більш стійкі до нагрівання та денатуруючим сполукам, ніж ферменти мезофільних організмів.

Культивування штаму здійснюють в аеробних умовах при температурі 40°C протягом 48-72 годин, рН середовища 7,5-7,8. Для росту культури і біосинтезу кератіназ джерелом вуглецю та азоту можуть служити крохмаль, гідролізований крохмаль, кукурудзяна, соєва або інша зернова мука, або їх екстракти, дріжджові клітини, пептони, дріжджовий екстракт, казеїн, пір'яна борошно, сечовина, амонійний азот [8].

#### **2.4. Таксономічний статус біологічного агента**

Таксономічний статус біологічного агента

*Bacillus licheniformis* відносять до:

царство – *Procaryotae*

відділ – *Firmicutes*

клас – *Bacili* ряд – *Bacillalus*

порядок – *Bacillales*

родина – *Bacillaceae*

рід – *Bacillus*

вид – *Bacillus licheniformis*

## РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

### 3.1. Потреба у цільовому продукті

Бацитрацин цинку, пов'язаний з неоміцину сульфатом і поліміксином, є найбільш поширеними компонентами в рецептурі мазей для лікування очних інфекцій і незначних опіків. Крім того, він широко використовується як харчова добавка для тварин для покращення маси тіла тварин і навіть для профілактики захворювань. Таким чином, бацитрацин важливий для фармацевтики та тваринництва в усьому світі. Діє як інгібітор синтезу клітинної стінки, хоча також може втручатися в інші клітинні процеси [1, 2].

У 2022 році ринок бацитрацину оцінювався приблизно в 950 мільйонів доларів США, і, за прогнозами, з 2023 до 2030 року він зростатиме на 5,8% у середньому річному темпі зростання. Це зростання зумовлено зростанням поширеності бактеріальних інфекцій і зростанням попиту на ефективні місцеві антибіотики. Основними виробниками бацитрацину у світі є: Pfizer, Transo-Pharm, HELM Portugal, Rochem International, Xellia Pharmaceuticals, Yancheng YouHua Pharmaceutical & Chemical [1, 2].

У складі лікарських засобів (ЛЗ) у вигляді порошку або мазі, бацитрацин використовується у вигляді сполуки бацитрацину цинку у комбінації із іншими антибіотиками, зокрема неоміцином. Показання до застосування таких ЛЗ є: бактеріальні інфекції обмежених ділянок шкіри: бактеріально інфікований простий герпес, оперізувальний (оперізуючий) герпес/вітряна віспа (VZV); контагіозне імпетиго; інфіковані варикозні виразки; інфікована екзема; бактеріально інфікований пелюшковий дерматит. Місцеве лікування та профілактика бактеріальних інфекцій шкіри, спричинених чутливими до препарату мікроорганізмами [3, 4, 5]. У складі ЛЗ бацитрацин необхідний для терапії вторинних бактеріальних інфікувань пошкоджених герпесом ділянок шкіри.

					<b>НУХТ БТЕК 05.01.36 КР ПЗ</b>			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Музикус Л. Є.			<b>РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО- ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ</b>	Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.							15	80
Керівник		Удимович В.М.				<b>Кафедра БТМ</b>		
Н. Контр.								
Зав. каф.		Стабніков В.П.						

### 3.2. Розрахунок потужності виробництва

Сьогодні, за висновками експертів ВООЗ, герпес є однією з найбільш поширених неконтрольованих інфекцій людини. За даними спостережень українських лікарів, протягом останніх 24 років (з 1997 р.) було виявлено, що в Україні VZV інфіковано 92 % дорослих, який перебуває у латентному стані у нервових вузлах [6]. Станом на 1 січня 2022 року населення України становить близько 27 млн осіб [7]. Згідно із даними Мініюсту та інституту молоді, станом на 2022 рік в Україні проживає 7 348 531 дітей віком від народження до 18 років [8]. Таким чином, кількість дорослого населення становить:  $27\,000\,000 - 7\,348\,531 = 19\,651\,469$  осіб. 92 % інфікованих буде складати:  $19\,651\,469 \times 0,9 = 17\,686\,322$  осіб. Прийmemo, що раз у рік захворювання проявляється у 50 % інфікованих. Таким чином, кількість пацієнтів буде становити  $17\,686\,322 \times 0,5 = 8\,843\,161$

В Україні виробництво ЛЗ на основі бацитрацину цинку на 50 % забезпечується вітчизняними виробниками у формі порошку та мазі. Оскільки у відкритому доступі не має інформації про кількості компонентів для реакції взаємодії бацитрацину із солями цинку, з утворенням бацитрацину цинку, прийmemo, що із 1 г бацитрацину можна отримати 1 г бацитрацину цинку. Згідно із державним реєстром лікарських засобів [9], зареєстровано у формі порошку 1 торгову марку і 1 у вигляді мазі, у концентрації бацитрацину цинку 250 МО на 1 г / 1 мл ЛЗ. 1 МО бацитрацину еквівалентна 26 мкг або 0,000026 г речовини (згідно із сертифікатом USP-стандартного зразка) [10]. Таким чином, 250 МО складає:  $250 \times 0,000026 \text{ г} = 0,0065 \text{ г}$  бацитрацину. При місцевому застосуванні доза ЛЗ не має перевищувати 200 г порошку чи мазі на добу, протягом понад 7 днів. Тоді 200 г ЛЗ містить у собі:  $0,0065 \times 200 = 1,3 \text{ г}$ . Таким чином, можна розрахувати потребу у бацитрацині цинку на курс лікування (див. табл. 1.1)

## Розрахунок об'єму бацитрацину на курс лікування.

Доза бацитрацину на добу, г	Тривалість лікування, діб	Кількість бацитрацину на курс лікування 1 пацієнта, г	Кількість пацієнтів, осіб	Кількість бацитрацину для пацієнтів, кг
1,3	7	9,1	8 843 161	80 472,8

Продуцентом бацитрацину є *Bacillus licheniformis* DW-BCAA6, який синтезує 1029,83 МО/мл або  $1029,83 \times 26 \text{ мкг} = 0,026 \text{ г}$  бацитрацину протягом 48 год [1]. Знаючи цю інформацію, можна розрахувати необхідної кількості культуральної рідини:

Об'єм культуральної рідини (X), необхідної для отримання 80 473 кг антибіотику, становить:

$$0,000026 \text{ кг} - 1 \text{ мл} \quad 80\,472,8 \text{ кг} - X$$

$$X = (80\,472,8 \times 1) / 0,000026 = 3\,095\,107\,692 \text{ мл або } 3\,095\,108 \text{ л}$$

Оскільки на вітчизняному ринку не дуже висока конкуренція у виробництві ЛЗ, пропонується виробляти бацитрацину цинку для задоволення 20 % від загальної потреби:

$$3\,095\,108 \text{ л} \times 0,2 = 619\,021 \text{ л}$$

### 3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів

Наступним кроком розрахуємо, який об'єм культуральної рідини можна отримати за цикл біосинтезу. Згідно із цими даними розрахуємо кількість необхідних етапів підготовки посівного матеріалу. Приймемо, що кількість робочих трудоднів ( $T_{рд}$ ) = 160, тоді кількість культуральної рідини на добу ( $V_d$ ) становитиме:

$$V_d = C / T_{рд} = 619\,021 / 160 = 3869 \text{ л}$$

Об'єм культуральної рідини за цикл ( $V_{щ}$ ) буде становити:

$$V_{\text{ци}} = \frac{K_1 * V_d * T_{\text{циф}}}{24} = \frac{1,5 * 3869 * 48}{24} = 11\,607 \text{ л/цикл}$$

де  $T_{\text{циф}}$  – загальний цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (48 год) та час підготовки ферментера до роботи (8 год).  $K_1$  – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій  $K_1 = 1,1 - 1,5$ .

Розрахований об'єм культуральної рідини (11 607 л) можна одержати у ферментері, геометричний об'єм якого складатиме:

$$V_c = \frac{V_{\text{ци}}}{K_{\text{зап}}} = \frac{11607}{0,6} = 19345 \text{ л}$$

Найближчим за об'ємом є стандартний ферментер на 20,0 м<sup>3</sup> ( $V_{\text{ф}}$ ).

Уточнюємо коефіцієнт заповнення для обраного ферментера:

$K_{\text{зап}} = V_{\text{Г}} / V_{\text{ф}} = 11607,0 / 20\,000 = 0,58$ . Розраховане число не перевищує заданого значення, а отже, об'єм ферментера підібраний правильно.

### 3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Отже, за виробничий цикл можна одержати  $V_{\text{пц}} = 11\,634$  л культуральної рідини. Також слід врахувати, що при одержанні культуральної рідини, можливими є її втрати у результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря ( $E_{\text{ф}}$ ), які складають 10%.

Отже, розрахуємо кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед процесом ферментації:

$$V_{\text{роб1}} = V_{\text{роб1}} / (1 - E_{\text{ф}}) = 11\,607 / (1 - 0,1) = 12\,896 \text{ л}$$

Встановлена доза для посівного матеріалу складає від 5 до 10 % від об'єму поживного середовища. Приймаємо такий показник  $X_{\text{пм1}} = 10\%$ . Тому, із врахуванням дози посівного матеріалу  $X_{\text{пм1}}$  робочий об'єм ферментера  $V_{\text{роб1}}$  складе:

$$V_{\text{роб1}} = V_{\text{пс1}} + V_{\text{пс1}} \cdot X_{\text{пм1}}$$

Звідси, об'єм поживного середовища  $V_{\text{пс1}}$  буде:

$$V_{\text{пс1}} = V_{\text{роб1}} / (1 + X_{\text{пм1}}) = 12\,896 / (1 + 0,1) = 11\,699 \text{ л,}$$

тоді об'єм посівного матеріалу  $V_{\text{пм1}}$  складе

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб1}} - V_{\text{пс1}} = 12\,896 - 11\,699 = 1197 \text{ л}$$

Враховуючи втрати у результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря в розмірі 10 – 15%, об'єм посівного матеріалу та поживного середовища у посівному апараті буде таким:

$$V_{\text{роб.2}} = V_{\text{пм1}} / (1 - E_{\text{па}}) = 1197 / (1 - 0,1) = 1330 \text{ л.}$$

Оскільки попередньо було обрано дозу посівного матеріалу у розмірі 10%, то у посівному апараті об'єм поживного середовища становитиме:

$$V_{\text{пс2}} = V_{\text{роб.2}} / (1 + X_{\text{па}}) = 1330 / (1 + 0,1) = 1209 \text{ л,}$$

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

Далі слід розрахувати об'єм посівного матеріалу для посівного апарату, який становить  $V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 1330 - 1209 = 121 \text{ л.}$

Інокулят об'ємом  $V_{\text{роб.2}} = 1330 \text{ л}$  можна отримати протягом вирощування штаму у посівному апараті з геометричним об'ємом  $V_{\text{ін2}} = V_{\text{роб.2}} / K_{\text{зап}} = 1330 / 0,6 = 2216 \text{ л.}$  Для цього обираємо найближчий за розміром стандартний посівний апарат  $V_{\text{спа}} = 2,0 \text{ м}^3$ . Перерахований коефіцієнт заповнення складатиме:

$K_{\text{зап2}} = V_{\text{роб.2}} / V_{\text{сін}} = 1330 / 2000 = 0,66$ . Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах для аеробних процесів

Посівний матеріал об'ємом 121 л можна отримати шляхом вирощування в інокуляторі із врахуванням подальших втрат у результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря (10 – 15%).

Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу у посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{роб.3}} = V_{\text{пм2}} / (1 - E_{\text{ін}}) = 121 / (1 - 0,10) = 134 \text{ л.}$$

Додавання посівного матеріалу у кількості 10% від об'єму поживного середовища є стандартною практикою для забезпечення належного засіву.

Тоді об'єм поживного середовища, для вирощування бактерій в інокуляторі буде складати:

$$V_{\text{пс3}} = V_{\text{роб.3}} / (1 + X_{\text{ін}}) = 134 / (1 + 0,1) = 122 \text{ л,}$$

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

Об'єм посівного матеріалу для інокулятора становить  $V_{\text{пм3}} = V_{\text{роб.3}} - V_{\text{пс3}} = 134 - 122 = 12 \text{ л.}$

Відповідну кількість посівного матеріалу  $V_{\text{роб.3}} = 134 \text{ л}$  можна отримати під час культивування штаму в інокуляторі з геометричним об'ємом  $V_{\text{ін3}} = V_{\text{роб.3}} / K_{\text{зап}} = 134 / 0,6 = 223 \text{ л.}$  Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор  $V_{\text{сін}} = 200 \text{ л}$  та уточнюємо попередньо встановлений коефіцієнт заповнення.

$K_{\text{зап3}} = V_{\text{роб.3}} / V_{\text{сін}} = 134 / 200 = 0,67.$  Одержане значення перебуває у межах, прийнятих для ферментерів межах для аеробних процесів.

Розрахований об'єм інокуляту (12 л) можна отримати шляхом вирощування штаму в інокуляторі із врахуванням подальших втрат у результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря (10 – 15%).

Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу у посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{роб.4}} = V_{\text{пм3}} / (1 - E_{\text{ін}}) = 12 / (1 - 0,1) = 13,3 \text{ л.}$$

Додавання посівного матеріалу у кількості 10% від об'єму поживного середовища є стандартною практикою для забезпечення належного засіву. Тоді об'єм поживного середовища, для вирощування в інокуляторі буде складати:

$$V_{\text{пс4}} = V_{\text{роб.4}} / (1 + X_{\text{ін}}) = 13,3 / (1 + 0,1) = 12,1 \text{ л,}$$

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

Об'єм посівного матеріалу для інокулятора тоді складає  $V_{\text{пм4}} = V_{\text{роб.4}} - V_{\text{пс4}} = 13,3 - 12,1 = 1,2 \text{ л.}$

Відповідну кількість посівного матеріалу  $V_{роб.3} = 13,3$  л можна отримати під час культивування штаму в інокуляторі з геометричним об'ємом  $V_{інз} = V_{роб.3} / K_{зап} = 13,3 / 0,6 = 22,16$  л. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор  $V_{сін} = 20$  л та уточнюємо попередньо встановлений коефіцієнт заповнення.

$K_{зап3} = V_{роб.4} / V_{сін} = 13,3 / 20 = 0,66$ . Одержане значення перебуває у межах, прийнятих для ферментерів межах для аеробних процесів.

Посівний матеріал об'ємом  $V_{пм4} = 1,2$  л можна одержати культивуванням штаму у колбах на качалці. Для цього застосовують качалочні колби об'ємом  $V_{колб} = 750$  мл та коефіцієнтом заповнення  $K_{зк} = 0,2$ .

Тоді кількість колб для отримання посівного матеріалу становитиме:

$$N_{колб} = V_{пм4} / (V_{колб} \cdot K_{зк}) = 1200 / (750 \cdot 0,2) = 8 \text{ колб.}$$

Отже, для одержання посівного матеріалу необхідно 8 качалочних колб.

Можна зробити висновок, що процес одержання посівного матеріалу для проведення виробничого біосинтезу глюконової кислоти у ферментері об'ємом  $20,0 \text{ м}^3$  за коефіцієнту заповнення  $0,6$  буде проходити у 4 етапи. Узагальнена інформація щодо кількості стадій виробництва бацитрацину наведена у табл. 3.2.

Таблиця 3.2

**Кількість стадій та апаратів, необхідна підготовки посівного матеріалу та виробничого біосинтезу бацитрацину**

№ стадії	Геометричний об'єм обраного апарату, $V_{г}$ , л	Коефіцієнт заповнення, $K_{зап}$ , частка	Робочий об'єм апарату, $V_{роб}$ , л	Об'єм поживного середовища, $V_{пс}$ , л	Об'єм посівного матеріалу, $V_{пм}$ , л
1	2	3	4	5	6
1	20000	0,6	12 896	11 699	1197
2	2000	0,65	1330	1209	121
3	200	0,67	134	122	12
4	20	0,66	13,3	12,1	1,2
5	0,75×5 колб	0,2	—	1,2	1,2

Отже, за результатами наведених розрахунків, можна зробити висновок, що для біосинтезу бацитрацину *Bacillus licheniformis* DW-BCAA6 потрібен один ферментер об'ємом 20,0 м<sup>3</sup>, один посівний апарат об'ємом 2,5 м<sup>3</sup>, один інокулятор об'ємом 250 л та один інокулятор об'ємом 25 л.

## РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

*Bacillus licheniformis* синтезує бацитрацин за умов росту на такому субстраті як крохмаль.

Згідно до Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) [18] катаболізм крохмалю відбувається за рахунок розпаду до мальтодекстрину під дією ізоамілази (КФ 3.2.1.68), а далі до мальтози, під дією альфа-амілази (КФ: 3.2.1.1) і мальтогенік альфаамілази (КФ:3.2.1.133). Потім із мальтози утворюється D-глюкоза під дією мальтозофосфорилази (КФ:2.4.1.8), яка потім залучається у гліколіз.

Катаболізм глюкози у *B. licheniformis* [19] відбувається шляхом її перетворення під дією глюкокінази (КФ 2.7.1.2) на D-глюкозо-6-фосфат. Далі, під дією глюко-6-фосфат изомераз (КФ 5.3.1.9) утворюється фруктоза-6 фосфат. В наслідок впливу 6-фосфоруктокінази (КФ:2.7.1.11) утворюється фруктоза 1,6-дифосфат. Під дією фруктозо-біфосфат альдолази (КФ:4.1.2.13) утворюється гліцеральдегід-3-фосфат і діоксиацетонфосфат. Під впливом гліцеральдегід-3-фосфат дегідрогенази (КФ:1.2.1.12) утворюється 1,3-дифосфогліцерат, який під дією фосфогліцераткінази (КФ:2.7.2.3) трансформується у 3-фосфогліцерат. 3-фосфогліцерат під дією 2,3-дифосфогліцерат-залежної фосфогліцератмутази (КФ:5.4.2.12) перетворюється у 2-фосфогліцерат з якого в наслідок впливу енолази 1/2/3 (КФ:4.2.1.11) утворюється фосфоенолпіруват, який під дією піруват кінази (КФ:2.7.1.40) перетворюється у піруват, а той у свою чергу, під дією піруватдегідрогенази E1 субодиниці альфа (КФ:1.2.4.1) у 2-гідроксиетил-тіаміндифосфат. Ця сполука під дією піруватдегідрогенази E1 субодиниці альфа (КФ:1.2.4.1) перетворюється на S-ацетилдигідроліпоамід-Е, з якого утворюється ацетил-КоА, під впливом піруват дегідрогенази E2 (КФ:2.3.1.12). Ацетил-КоА, що залучається до ЦТК із утворенням сполук ЦТК, зокрема 2-оксалоглутарату.

					<b>НУХТ БТЕК 05.01.36 КР ПЗ</b>			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Музикус Л. Є.			<b>РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ</b>	Літ.	Арк.	Акруші 4
Консульт.							23	80
Керівник		Удимович В.М.				<b>Кафедра БТМ</b>		
Н. Контр.								
Зав. каф.		Стабніков В.П.						

2-оксалоглутарат із ЦТК залучається у біосинтез аргініну [20] і під дією аспартат амінотрансферази (КФ:2.6.1.1) перетворюється на глутамат. Далі під дією глутамат N-ацетилтрансферази (КФ:2.3.1.1) отримуємо N-ацетилглутамат, який в наслідок впливу ацетилглутаматкінази (КФ:2.7.2.8) перетворюється на N-ацетилглутамил-фосфат. Ця сполука під дією N-ацетил-гамма-глутамил-фосфатредуктази (КФ:1.2.1.38) трансформується у N-ацетилглутаматсемілдегідрит. Під дією ацетилорнітил/N сукцинілдіаміно-пімелат амінотрансферази (ЕС:2.6.1.11) утворюється N-ацетилорнітин. Після цього, в наслідок впливу ацетилорнітин деацетилази (КФ:3.5.1.16) утворюється орнітин, який метаболізується у цитрулін під дією орнітин карбоультратрансферази (КФ:2.1.3.3). Цитрулін перетворюється на аргінін, під впливом аргінін деіменази (КФ:3.5.3.6) і далі під дією аргінін расемази (КФ:5.1.1.9) трансформується у D-аргінін, який під дією / D-аргінази (КФ:3.5.3.10) перетворюється на D-орнітин [21]. D-орнітин в наслідок впливу орнітин расемази (КФ:5.1.1.12) перетворюється на бацитрацин.

Анаплеротичними реакціями, які забезпечують поповнення інтермедіату ЦТК – оксалоацетату при рості на вуглеводному субстраті – глюкозі використовуються такі перетворення як карбоксилювання фосфоенолпірувату (фермент – фосфоенолпіруваткарбоксилаза КФ 4.1.1.31) і карбоксилювання пірувату (фермент – піруваткарбоксилаза КФ 6.4.1.1).

Схематичне зображення біосинтезу  $\beta$ -галактозиди наведено на *рис 3.1*.

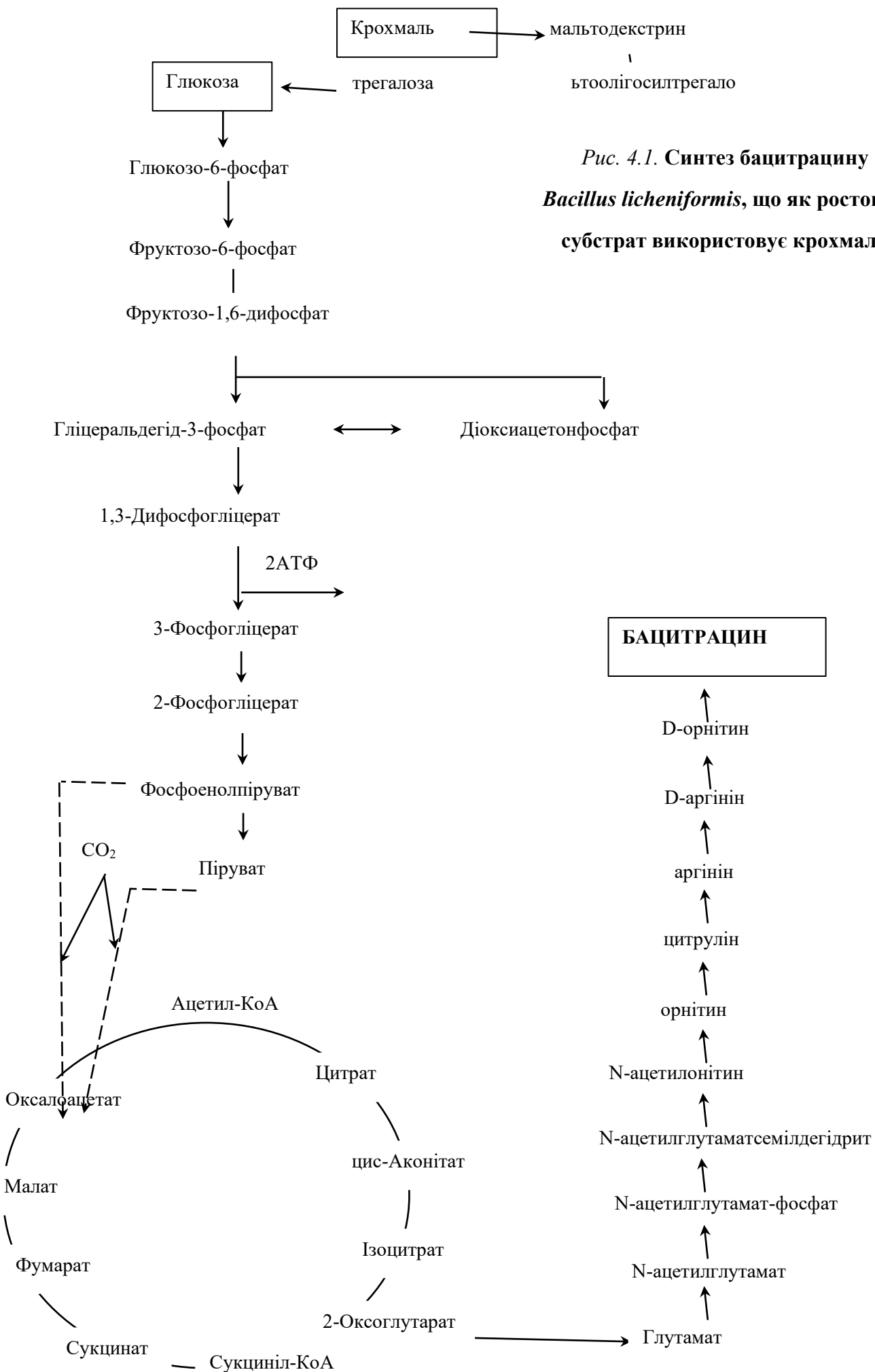


Рис. 4.1. Синтез бацитрацину *Bacillus licheniformis*, що як ростовий субстрат використовує крохмаль

## РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

### 5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Оскільки промисловий біосинтез бацитрацину бактеріями *B. licheniformis* є аеробним процесом, дуже важливим є стабільна подача стерильного повітря. Система подачі також має бути обладнана барботером та газоаналізатором, для контролю рівня накопиченого CO<sub>2</sub>. Як видно із даних наведених у роботі [5], обов'язковим є перемішування під час культивування продуцента, тому має бути встановлена мішалка із частотою перемішування 0-250 об/хв, для підвищення розчинення кисню у поживному середовищі і прискорення процесу накопичення біомаси.

Температура і рН в обладнанні для вирощування інокуляту та виробничого біосинтезу має бути стабільною на рівні 37 °С та 7,0, тому інокулятори і ферментер мають бути обладнанні датчиками контролю температури і рН [5].

Культивування ведеться в асептичних умовах, щоб уникнути мікробної контамінації.

Біосинтез бацитрацину можна вести як періодичним, так і безперервним способом. У літературних даних не має підтвердження практичної реалізації безперервного типу культивування *Bacillus licheniformis* для синтезу бацитрацину, отже обираємо періодичне культивування, без дробного підживлення. Враховуючи, що *B. licheniformis* – це бактеріальні клітини, то обирає глибинний спосіб культивування.

Отже що ріст і біосинтез здійснюватиметься за таких умов:

- аеробне культивування
- температурний режим: 37 °С;
- рН 7,0;

					<b>НУХТ БТЕК 05.01.36 КР ПЗ</b>			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			27	
Розроб.	Музикус Л. Є.				<b>РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ</b>	Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.							26	80
Керівник	Удимович В.М.					<b>Кафедра БТМ</b>		
Н. Контр.								
Зав. каф.	Стабніков В.П.							

- стерильність;
- періодичне вирощування продуценту без підживленням;
- глибинний спосіб.

## 5.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря

Клітини *Bacillus licheniformis* по відношенню до кисню це факультативний анаероб [5]. Подача стерильного повітря дає змогу підвищити швидкість росту і накопичення біомаси, що дуже важливо під час вирощування інокуляту для виробничого біосинтезу. Крім того, підготоване стерильне повітря суттєво підвищує рівень стерильності на всіх етапах ведення біотехнологічного процесу [22-23].

Оскільки саме від повітря значною мірою залежить успішність ведення будь-якого біотехнологічного виробництва, попередня підготовка і очистка аераційного повітря є критично важливим етапом захисту фінішного продукту від контамінації пилом та іншими мікроорганізмами. Стерильність повітря досягається шляхом багатоступеневої фільтрації крізь фільтри різних класів чистоти вхідного атмосферного повітря. Процес підготовки можна розділити на такі етапи [22-23]:

- Відбір порцій атмосферного повітря з навколишнього середовища за допомогою турбокомпресора, на висоті 2-3 м від найвищої точки будівлі через спеціалізовані шахти. Кількість мікроорганізмів, а також пилу в повітрі оточуючого середовища є стабільною. Враховуючи висоту ферментера об'ємом 20 м<sup>3</sup> – 6,55 м, а також висоту поверху – 10 м, косий дах будівлі ~1,5 м, забір повітря виконують на висоті ~ 14 м ;
- Очистка на фільтрах грубої очистки, з метою відділити великі часточки пилу, бруду і знизити загальну концентрацію забрудненого повітря. Фільтри грубого очищення захищають вентиляційні установки від швидкого засмічення. Ці фільтри мають тривалий термін експлуатації і є важливим елементом у промислових системах вентиляції. Можна використати фільтри з

фільтрувального матеріалу виготовленого на основі акрилових емульсій (нітрон – 75% і лавсан – 25%). Цей матеріал є досить пористим, довговічним і стійким до навколишнього середовища.

- Подача попередньо відфільтрованого повітря у турбокомпресор, щоб стиснути його до 0,35—0,5 МПа, з метою подолання опору фільтрувальних матеріалів на наступних стадіях підготовки;

- Калорифер спочатку підігріває стиснуте повітря до 120–250°C, а потім охолоджує. Цей процес супроводжується насиченням повітря вологою, зайва кількість якої відводять за допомогою краплевловлювачу.

- Очистка на головних фільтрах, фільтрувальний матеріал яких виготовлених із базальтового волокна (діаметр пор 15-50 мкм) і забезпечує видалення до 98% мікроорганізмів;

- Тонка очистка на останній стадії із ефективністю близько 99,999%. Зазвичай такі фільтри виконанні із скловолкна/поліпропілену/боросилікатного скла різної товщини. Волокна тканини (0,5-5 мкм) щільно пов'язані між собою за допомогою акрилового клею із кроком між волокнами 5-50 мкм.

Підготоване таким чином стерильне повітря по магістральним трубопроводам поступає у виробничі приміщення та безпосередньо в інокулятори та ферментери [22-23].

### **5.3 Вибір мийних та дезінфікуючих засобів**

160 днів триває виробництво бацитрацину *Bacillus licheniformis* DW-BCAA6, під час якого необхідно підготувати ферментер об'ємом 20000 л, інокулятори об'ємом 20 л, 200 л і 2000 л, реактори для приготування і стерилізації композицій, качалку для колб, мікробіологічний бокс та обладнання необхідне для виділення (центрифуга та збірник культуральної рідини).

Технологічний процес виробництва бацитрацину проходить в таких приміщеннях: лабораторія (зберігання робочих культур, пересів в мікробіологічному боксі, контроль якості), кімната із пристроєм-качалкою для вирощування у колбах, приміщення вирощування інокуляту і біосинтезу, приміщення виділення бацитрацину. Приймаємо, що обладнання розташовується приблизно на відстані 1,5 м одне від одного / від стін, для зручності обслуговування / очистки. Розміри обладнання наведено у *табл. 5.1*.

*Таблиця 5.1*

**Розміри обладнання, що використовується під час виробництва**

Обладнання	Геометричний об'єм, л	Діаметр, м	Висота, м
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
Інокулятор	20	0,7	1,7
Інокулятор	200	0,5	2,3
Інокулятор	2000	1,2	3,8
Ферментер	20000	2,3	6,5
Реактор змішувач	10	0,66	1,6
Реактор змішувач	20	0,6	1,1
Реактор змішувач	30	0,8	1,9
Реактор змішувач	20	0,6	1,1
Реактор змішувач	200	0,5	2,3
Реактор змішувач	200	0,5	2,3
Реактор змішувач	2000	1,9	3,1
Реактор змішувач	20000	2,8	4,7
<b>Всього</b>	44700		

Згідно із даними з *табл. 5.1* загальний об'єм виробничого обладнання складає 44700 л. Варто також врахувати ще збірник супернатанту культуральної ріднини – 20000 л, центрифуга – 20000 л. Отже, загальний об'єм обладнання для миття буде складати 84,7 м<sup>3</sup>.

Наступний етапом є розрахунок кількості мийних і дезінфікуючих розчинів для обробки виробничих приміщень. Схематичний план приміщення виробничого процесу наведено на *рис. 5.1*

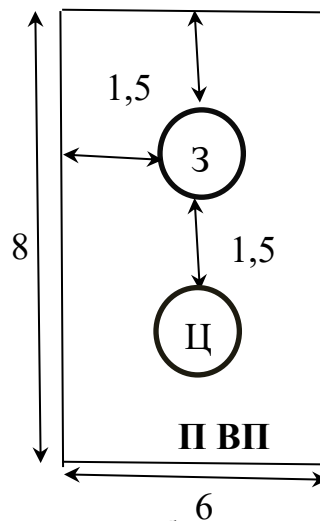
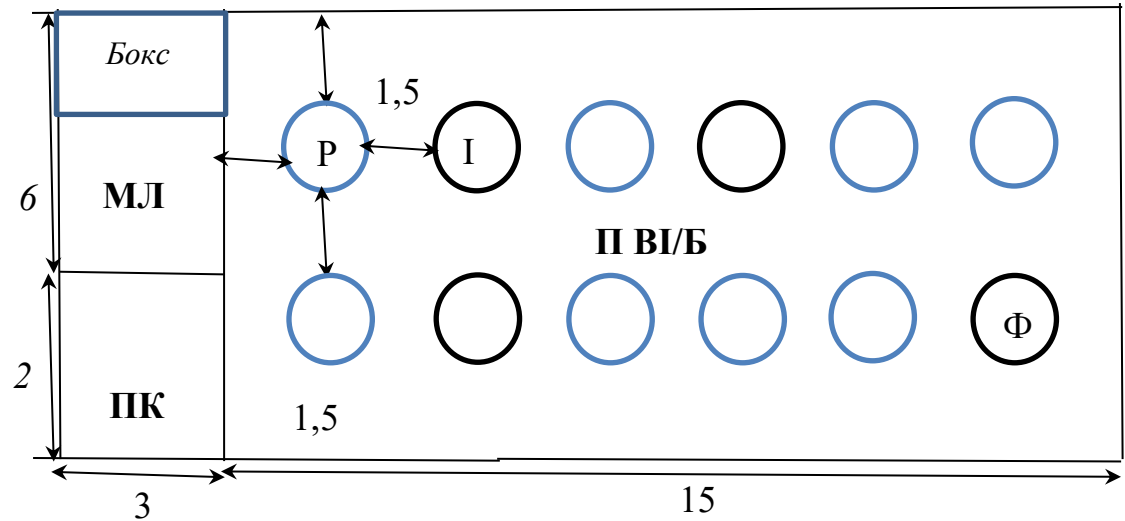


Рис. 5.1 Схема виробничих приміщень

**П ВІ/Б** – приміщення вирощування інокуляту / біосинтезу;

**МЛ** – мікробіологічна лабораторія;

**ПК** – приміщення з установкою-качалкою.

**П ВП** – приміщення виділення бацитрацину

**І, Р, Ф, Ц, З** – інокулятор, реактор, ферментер, центрифуга, збірник

Прибирання у приміщеннях (миття підлоги) буде здійснюватися щоденно (160 разів), а генеральні прибирання 2 рази на місяць – 11 разів. Згідно із *рис. 5.1*, (знаючи, що висота приміщень 10 м) площа підлоги в приміщенні вирощування інокуляту і виробничого біосинтезу складає  $120 \text{ м}^2$  ( $15 \text{ м} \times 8 \text{ м}$ ), площа стін –  $((15,0 \text{ м} \times 10 \text{ м}) \times 2 + (8 \text{ м} \times 10 \text{ м})) \times 2 = 460 \text{ м}^2$ , загальна площа –

$120 \text{ м}^2 + 460 \text{ м}^2 = 580 \text{ м}^2$ . Площа підлоги в приміщенні виділення бацитрацину становить  $48 \text{ м}^2$  ( $8 \text{ м} \times 6 \text{ м}$ ), площа стін –  $((8,0 \text{ м} \times 10 \text{ м}) \times 2 + (6 \text{ м} \times 10 \text{ м})) \times 2 = 460 \text{ м}^2$ , загальна площа –  $48 \text{ м}^2 + 300 \text{ м}^2 = 300 \text{ м}^2$ . Для приміщення лабораторії і установки-качалки приймемо висоту приміщення у 3 м, що є достатнім. Для мікробіологічної лабораторії площа підлоги складає  $6 \text{ м} \times 3 \text{ м} = 18 \text{ м}^2$ , площа стін –  $((6 \text{ м} \times 3 \text{ м}) \times 2 + (3 \text{ м} \times 3 \text{ м})) \times 2 = 54 \text{ м}^2$ , загальна площа –  $72 \text{ м}^2$ . Для приміщення з качалками площа підлоги складає  $2 \text{ м} \times 3 \text{ м} = 6 \text{ м}^2$ , площа стін –  $((2 \text{ м} \times 3 \text{ м}) \times 2 + (3 \text{ м} \times 3 \text{ м})) \times 2 = 30 \text{ м}^2$ , загальна площа –  $36 \text{ м}^2$ .

Загальна площа обробки миючими засобами наведена в *табл. 5.2*.

*Таблиця 5.2*

### Загальна площа поверхонь виробничих приміщень

Приміщення	Площа підлоги, м <sup>2</sup>	Площа стін, м <sup>2</sup>	Загальна площа, м <sup>2</sup>
Ділянка вирощування інокуляту і виробничого біосинтезу	120	460	580
Мікробіологічна лабораторія	18	54	72
Приміщення з качалками	6	30	36
Приміщення виділення бацитрацину	48	300	348
<b>Разом</b>	<b>192</b>	<b>844</b>	<b>1036</b>

У *табл. 5.3* представлено розрахунок площ миття /дезінфекції під час виробництва. Крім того, потрібно ще розрахувати періодичність миття обладнання. Загальний об'єм культуральної рідини становить 619 021 л, а об'єм культуральної рідини за 1 цикл дорівнює 11 607 л/цикл, то кількість циклів миття становить:  $619\,021 \text{ л} / 11\,607 \text{ л/цикл} = 55$  цикла (разом із додатковим миттям після останнього циклу). Тоді загальний об'єм миття:

*Таблиця 5.3*

### Розрахунок площ миття / дезінфекції під час виробничого процесу

Об'єкт	Площа / об'єм об'єкту, м <sup>2</sup> / м <sup>3</sup>	Періодичність миття / дезінфекції під час виробничого процесу	Загальна площа / об'єм, м <sup>2</sup> / м <sup>3</sup>
Обладнання	84,7 м <sup>3</sup>	55	4658,5 м <sup>3</sup>

Підлога	192 м <sup>2</sup>	160	30720 м <sup>2</sup>
Стіни, двері, вікна	844 м <sup>2</sup>	11	9284 м <sup>2</sup>

### **Вибір і вартість мийних / дезінфікуючих засобів для виробництва бацитрацину**

В інструкціях по застосуванню мийних та дезінфікуючих засобів, в середньому витрата робочого розчину на 1 м<sup>2</sup> приблизно становить 100 мл. Розрахувавши, що загальний об'єм виробничого обладнання становить 4658,5 м<sup>3</sup>. Оскільки для миття обладнання передбаченні системи СІР-мийки, щоб зменшити витрати води / мийного засобу на 50 % від об'єму апаратів, то для одного циклу миття знадобиться: 84700 л × 0,5 = 42350 л робочого розчину мийного засобу, а на весь період виробничого процесу: 42350 л × 55 = 2 329 250 л. Так як загальна площа всіх поверхонь складає 30720 м<sup>2</sup> + 9284 м<sup>2</sup> = 40 004 м<sup>2</sup> (див. *табл. 5.3*), то кількість мийного / дезінфікуючого розчину буде дорівнювати: 40 004 м<sup>2</sup> × 100 мл = 4000,4 л.

### **Підбір мийного / дезінфікуючого засобу для виробництва**

Правильна організація процесу очищення і дезінфекції є важливою складовою будь-якого технологічного процесу, оскільки дає змогу ефективно видаляти забруднення після виробничого процесу, підтримувати необхідний рівень чистоти і уникати повторного забруднення під час підготовки до наступного циклу виробничого процесу. До будь-яких мийних та дезінфікуючих засобів висувають ряд наступних вимог:

- екологічність для навколишнього середовища і персоналу;
- легкорозчинність у воді і зручність під час експлуатації;
- відсутність впливу на оброблювані поверхні;
- безпечність для фінішного продукту, без змін якості, смаку і кольору;
- висока ефективність проти різних видів мікроорганізмів.

В *табл. 5.4.* наведено розрахунок витрат і вартості мийних / дезінфікуючих засобів, що можна використовувати під час виробництва бацитрацину.

## Витрати і вартість мийних / дезінфікуючих засобів під час виробництва бацитрацину

Назва	Концентрація робочого розчину, %	Об'єкт миття / дезінфекції	Площа /об'єм миття / дезінфекції об'єкту, м <sup>2</sup> /л	Кількість робочого розчину за весь період виробництва, л	Вартість 1 л/кг мийного/ дезінфікуючого засобу, грн	Вартість 1 л робочого розчину, грн	Сумарна вартість миття /дезінфекції під час виробництва, грн
<b>САНПРОФ-УНІВЕРСАЛ</b> <sup>1</sup>	5,0%	Обладнання	4658,5	42350	50,0	2,5	105875
<b>САНТАНА</b> <sup>2</sup>	2,0 %	Обладнання	4658,5	42350	110,0	2,2	93170
<b>МАКСИСАН</b> <sup>3</sup>	0,25 %	Стіни/підлога/ вікна	40 004	4000,4	1325	3,31	13 251
<b>СТЕРИОКС</b> <sup>4</sup>	0,01 %	Стіни/підлога/ вікна	40 004	4000,4	1560	0,1	400,0

**Примітка.** Вартість засобів наведено станом на січень 2025 р.: 1. <https://prom.ua/ua/p2111652985-universalnoe-moyuschee-sredstvo.html?srltid=AfmBOopUxGHEIcbb1J4mP-6IoK0x8MItI9gUUubJ9maeVLXjUAdrffvf>, 2 - <https://biocontact.in.ua/ua/p1018495490-sredstvo-moyuschee-nepennoe.html>, 3 - <https://prom.ua/p2091321745-maksisan-dezinfektsiyapsosterilizatsiya.html>, 4 - <https://interdez.com.ua/ru/product/sterioks-baltiachemi-kiev>

\* **розрахунок вартості 1 л робочого розчину описано для мийного засобу «САНПРОФ-УНІВЕРСАЛ»:** Ціна 1 л становить 50 грн, концентрація його робочого розчину – 5,0 %, тому в 1000 мл робочого розчину міститься 50 мл (0,05 л) концентрату. Таким чином вартість 5 % розчину становить: 50 грн × 0,05 л = 2,5 грн/л.

## *Миючі засоби*

**Миючий засіб САНПРОФ-УНІВЕРСАЛ** – універсальний мийний засіб у формі рідкого концентрату на основі композиції аніонних, амфотерних і неіоногенні поверхнево активних речовин та комплексу допоміжних речовин, призначений для миття і видалення забруднень з усіх видів поверхонь, а також для миття і передстерилізаційного очищення медичних виробів. Склад: аніонні ПАР (5-15), амфотерні ПАР <5, неіоногенні ПАР <5, комплексонат, консервант, ароматизатор (або без нього за вимогою споживача), вода підготовлена. Засіб не містить фосфатів. Засіб виробляється у формі концентрату і являє собою рідину від безбарвного до коричневого кольору. Ефективно видаляє з поверхонь і не фіксує на них різноманітні органічні (у т.ч. біологічні рідини), неорганічні та комбіновані забруднення, усуває неприємні запахи. Мийна здатність, % – >80 (відповідає нормі для лужних технічних мийних засобів згідно СОУ МПП 71.100-235:2008). Здатність поверхнево-активних речовин до первинного біологічного розкладання, % – >80. Засіб застосовується у вигляді водних робочих розчинів в концентрації від 0,1% до 10,0%. Для розрахунку прийmemo середнє значення у 5,0%. Термін придатності 2 роки. [24].

**Миючий засіб Сантана** – ефективний лужний пінний миючий засіб. Видаляє білкові та жирові забруднення з поверхонь приміщень та технологічного обладнання. Основні діючі речовини: гіпохлорит натрію, гідроксид натрію, ПАР. Сантана застосовується у вигляді 0,5 – 3% водного розчину (для розрахунку прийmemo концентрацію у 2 %). Оброблювані поверхні: нержавіюча сталь, сталь, оцинковані поверхні, кольорові метали та їх сплави, поліетілен, поліпропілен, скло[25].

Порівнявши засоби САНПРОФ-УНІВЕРСАЛ і САНТАНА, варто обрати засіб САНТАНА, оскільки за однакової ефективності він є значно дешевшим і дозволяє зекономити значні кошти.

## *Дезінфікуючі засоби*

Дезінфікуючі засоби знищують мікроорганізми і форми їх спокою до встановленого в конкретному випадку ліміту, шляхом впливу на клітинні органели і метаболітичні процеси.

*Дезінфікуючий засіб МАКСИСАН* – рідкий висококонцентрований засіб для дезінфекції, передстерилізаційного очищення, щоденних і генеральних прибирань та мийки. Комплекс чотирьох четвертинних амонієвих сполук (не менше 50%) і допоміжних компонентів. Не містить барвника й ароматизатора. Нейтральний рН концентрату і робочих розчинів. Максисан добре змішується з холодною і гарячою водою в будь-якому співвідношенні. Водні розчини прозорі, мають мийну дію, легко змиваються з оброблених поверхонь, не залишають патьоків і нальоту, не фіксують органічні забруднення на оброблюваних об'єктах; розчини ефективні при високому білковому навантаженні, тобто для обробки сильно забруднених об'єктів; можливість підвищення антимікробних і мийних властивостей при використанні нагрітих робочих розчинів і посилення їх мийних властивостей при додаванні кальцинованої соди. Засіб застосовується у вигляді водних робочих розчинів в концентрації від 0,04% до 0,25% за препаратом залежно від сфери застосування, мети обробки, виду забруднення, збудника і об'єктів обробки. Рекомендована витрата робочого розчину – 100 мл/м<sup>2</sup>. IV клас небезпеки (малонебезпечні речовини за ДСТУ 12.1.007-76) при інгаляційному впливі парів. Засіб не викликає сенсibilізуючої, алергенної, тератогенної і канцерогенної дії. Максисан має бактерицидну (включаючи мікобактерії туберкульозу, *Listeria monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* і *S. aureus Methicillin Resistant*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* 0157: H7, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella choleraesuis*, *Shigella dysenteriae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecium Vancomycin Resistant*, *Yersinia enterocolitica*), віруліцидну (в т.ч. вірусів гепатитів, СНІДу,

герпесу, грипу, рота-, коронавірус, збудників «пташиного грипу»), фунгіцидну (патогенні гриби і цвіль) і спороцидну дії [26].

**Дезинфікуючий засіб СТЕРИОКС** – добре змішується з водою в будь-якому співвідношенні. Робочі розчини прозорі, мають помірний запах оцтової кислоти, мають мийні властивості, видаляють механічні, білкові, жирові забруднення; не фіксують органічні забруднення. запобігає утворенню стійких до дезінфектанту штамів мікроорганізмів. Активніюча речовина – надоцтова кислота (12,0-15,0%). Стериокс володіє винятково високою бактерицидною (в т. ч. туберкулоцидною), віруліцидною (включаючи найбільш стійкого до дії дезінфекційних засобів поліовірусу), фунгіцидною (в тому числі щодо дріжджових і цвілевих грибів) і спороцидною діями. Засіб не має селективної антимікробної дії і перешкоджає формуванню стійких штамів мікроорганізмів. Засіб екологічно безпечний, після використання залишки розчинів розкладаються на безпечні компоненти: воду, кисень, оцтову кислоту і не вимагають змивання. Стериокс застосовується у вигляді водних робочих розчинів в концентрації 0,005-0,01% за діючою речовиною (надуксусної кислоти). При використанні засобу Стериокс залишки робочих розчинів в концентрації не більше 0,01% за надоцтовою кислотою дозволяється не змивати водою після закінчення обробки [27].

Порівнявши наведені у *табл. 5.4.* розрахунки, обираємо дезинфікуючий засіб СТЕРИОКС, оскільки робочий розчин цього засобу є у 30 разів дешевшим і є більш економічно вигідним.

#### **5.4 Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища**

Виробничий біосинтез здійснюється у ферментері об'ємом 20,0 м<sup>3</sup> з коефіцієнтом заповнення 0,6. Підготовка посівного матеріалу відбувається у чотири стадії (в колбах на качалці, у посівних апаратах об'ємом 20 л, 200 л і 2000 л).

Згідно із інформацією із статті [5], склад поживного середовища має такий вигляд (г/л):

- Соевий шрот – 100,00;
- Крохмаль кукурудзяний – 45,0;
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 6,00;
- $\text{CaCO}_3$  – 1,00;
- рН середовища – 7,0.

Поживне середовище для вирощування інокуляту *Bacillus licheniformis* DW-BCAA6 і виробничого біосинтезу має бути стерильним. Щоб досягнути цього, необхідно стерилізувати поживне середовище, що розподіляється по композиціям, у різних режимах.

Посівний матеріал, що буде вирощуватися у колбах, будемо стерилізувати у автоклаві, оскільки він займає невеликий об'єм. Для підготовки компонентів середовища на інших стадіях отримання інокуляту та виробничого біосинтезу, вже необхідні окремі інокулятори та реактори-змішувачі, оскільки об'єми значно більші. Соевий шрот і кукурудзяний крохмаль необхідно попередньо заварити, шляхом поетапного внесення декількома порціями, щоб не утворювалося «грудочок» в процесі заварювання, із поступовим нагріванням суміші до 70-90 °С.

#### **5.4.1 Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках**

На цьому етапі, щоб отримати необхідний об'єм інокуляту, потрібно приготувати 1200 мл стерильного поживного середовища. Підготовлене середовище розливаємо у 5 стерильних качалочних колб об'ємом по 750 мл. Стерилізацію компонентів середовища в автоклаві проводимо таким чином:

**Композиція А:** крохмаль, соєвий шрот (режим стерилізації: 112 °С, тиск 0,05 МПа, час 20 – 30 хв).

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

**Композиція В:**  $\text{CaCO}_3$  (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

**Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці**

<b>Компонент поживного середовища</b>	<b>Вміст, г/л</b>	<b>Кількість для приготування 1200 мл середовища, г</b>	<b>Композиції</b>	<b>Об'єм композиції V, л</b>
Соєвий шрот	100,00	120,0	А	1,0
Крохмаль	45,00	54,0		
Вода		1,0		
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,00	1,2	Б	0,1
Вода		0,1		
CaCO <sub>3</sub>	6,00	7,2	В	0,1
Вода		0,1		
<b>Усього</b>			<b>1,2 л</b>	

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

Підготовка посівного матеріалу передбачає приготування 12,1 і 122,0 л стерильного поживного середовища

*Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 20 л*

Для цієї стадії необхідно 12,1 л поживного середовища, склад композиції та умови їх стерилізації наведено нижче. Композиція А стерилізується в реакторі 20 л, а композиції Б і В стерилізується у автоклаві.

**Композиція А:** крохмаль, соєвий шрот (режим стерилізації: 112 °С, тиск 0,05 МПа, час 20 – 30 хв).

**Композиція Б:** (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

**Композиція В:** CaCO<sub>3</sub> (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

Таблиця 5.6

**Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 20 л (Кз = 0,6)**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 12,1 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції V, л
Соєвий шрот	100,00	1,21 кг	А	11,0
Крохмаль	45,00	544,5		
Вода	10,0 л			
Конденсат			1,0	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,00	12,1	Б	0,5
Вода	0,5 л			
CaCO <sub>3</sub>	6,00	72,6	В	0,6
Вода	0,6 л			
<b>Усього</b>	<b>12,1 л</b>			

*Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 200 л*

Для цієї стадії необхідно 122,0 л поживного середовища, склад композицій та умови їх стерилізації аналогічні пункту 5.4.2. Композиція А стерилізується в реакторі 200 л, а композиції Б і В стерилізується в автоклаві.

Таблиця 5.7

**Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 200 л (Кз = 0,6)**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 122 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції V, л
Соєвий шрот	100,00	12,2 кг	А	120,0
Крохмаль	45,00	5,49 кг		
Вода	109,1 л			
Конденсат			10,9	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,00	122,0	Б	1,0
Вода	1,0			
CaCO <sub>3</sub>	6,00	732,0	В	1,0
Вода	1,0 л			
<b>Усього</b>	<b>122 л</b>			

*Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 2000 л*

Для цієї стадії необхідно 1209,0 л поживного середовища, склад композицій та умови їх стерилізації аналогічні пункту 2.2.2. Композиція А стерилізується в реакторі 2000 л, композиція Б в реакторі 10 л, композиція В в реакторі 20 л

Таблиця 5.8

**Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 2000 л (Кз = 0,6)**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 1209 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції V, л
Соєвий шрот	100,00	120,9 кг	А	1190
Крохмаль	45,00	54,40 кг		
Вода	1071,0 л			
Конденсат			119,0	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,00	1,20 кг	Б	5,0
Вода	4,6 л			
Конденсат			0,4	
CaCO <sub>3</sub>	6,00	7,25 кг	В	14
Вода	12,8			
Конденсат				
<b>Усього</b>	1209 л			

**5.4.3. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу**

Для цієї стадії необхідно 11699,0 л поживного середовища, склад композицій та умови їх стерилізації аналогічні пункту 5.4.2.

Композиція А стерилізується в реакторі 20,0 м<sup>3</sup>, а композиція Б в реакторі 200,0 л.

Таблиця 5.9

**Композиції стерилізації компонентів для виробничого біосинтезу у  
ферментері об'ємом 20,0 м<sup>3</sup>**

<b>Компонент поживного середовища</b>	<b>Вміст, г/л</b>	<b>Кількість для приготування 11 699 л середовища, г</b>	<b>Композиції</b>	<b>Об'єм композиції V, л</b>
Соєвий шрот	100,00	1169,90 кг	А	11549,0
Крохмаль	45,00	526,45 кг		
Вода	10394,1			
Конденсат			1154,9	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,00	11,69 кг	Б	20,0
Вода	18,2			
Конденсат			1,8	
CaCO <sub>3</sub>	6,00	70,19 кг	В	130,0
Вода	119,0			
Конденсат				
<b>Усього</b>	<b>11699,0 л</b>			

Отже, необхідно передбачити реактори для приготування та стерилізації композицій, об'ємами: 10 л, 2х20 л, 30 л, 2х200 л, 2000 л, 20000 л.

## РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Узагальнений перелік обладнання, використовуваного для біосинтезу бацитрацину наведено у табл. 6.1. Відповідне обладнання представлено у графічній частині (апаратурна схема).

*Таблиця 6.1*

### Специфікація обладнання. Виробництво бацитрацину

Позиція	Найменування позиції	Кількість	Характеристика обладнання
1	2	3	4
ПЗ-1	Повітрозабірник	1	Повітрозабірник. Високоякісний вентиляційний димохід 650 мм з АБС-пластику [28].
Ф-2	Фільтр грубого очищення	1	Фільтр грубої очистки повітря ФЯР. Пропускна спроможність: 1540 м <sup>3</sup> /год. Початковий перепад: 50 Па [29].
К-3	Компресор стиснення	1	Компресор Mast LZN-10 COMBO inverter. Продуктивність компресора: 960 л/хв. Тиск компресора: 10 бар. Споживана потужність: 7,5 кВт. Габарити: 1850x800x1500 мм [30].
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Теплообмінник-охолоджувач. DAIKIN FDXM60F3/RXS60L. Потужність: 6,0 кВт. Робочий діапазон: -10~+46°С. Габарити: 200x1150x620 мм [31].
Р-5	Ресивер	1	Ресивер Лідер 1900. Виробник: Україна. Матеріал: сталь. Робочий тиск: 13 бар. Об'єм: 1900 л. Робоча температура: 5..+40 °С. Розміри: 1102x1202x2796 [32].

					<b>НУХТ БТЕК 05.01.36 КР ПЗ</b>							
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата								
Розроб.	Музикус Л. Є.				<b>РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ</b>			Літ.	Арк.	Акрушів		
Консульт.								42	80	43		
Керівник	Удимович В.М.							<b>Кафедра БТМ</b>				
Н. Контр.												
Зав. каф.	Стабніков В.П.											

T-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Теплообмінник-охолоджувач. DAIKIN FDXM60F3/RXS60L. Потужність: 6,0 кВт. Робочий діапазон: -15~+20°C. Габарити: 200x1150x620 мм [31].
Ф-7	Фільтр головного очищення	1	Фільтр Jablotron F7. Виробник: Чехія. Робочий перепад тиску: 450 Па. Розміри: 400x220x48 мм [33].
P3-8	Реактор-змішувач для підготовки композиції А		Реактор-змішувач РС-20. Виробник: Україна. Об'єм: 20 л Матеріал корпусу: 316 L нержавіюча сталь. Обладнаний сорочкою, якірною мішалкою), датчиками температури, рН, СІР мийкою. Розміри: 1085x 600 x1150 мм [34].
I-9	Інокулятор	1	Інокулятор VLBIO-20. Об'єм: 20 л. Виробник: Bailun Biotechnology (Jiangsu) Co., Ltd., Китай. Матеріал корпусу: 316 L нержавіюча сталь. Обладнаний сорочкою, мішалкою, датчиками температури, кисню, рН. Габарити: 1300x790x1700 мм [35].
ІФ-10, ІФ-11, ІФ-12, ІФ-13	Індивідуальний фільтр	4	Фільтр Kosun. Фільтруючий матеріал SS316L; клітка SS304. Рейтинг фільтра: 1 мкм [36].
Д-14, Д-15, Д-16, Д-17, Д-18	Ваговий дозатор для компонентів середовища	5	Дозатор ваговий ВД-1н. Виробник: ABC Tech, Україна. Тип матеріалу: харчова нержавіюча сталь AISI 304. Вага дозування: 0,5-30 кг. [37].
ВН-22 ВН-23 ВН-24	Відцентровий насос для перекачування	3	Насос відцентровий LEO XKm50-1 Потужність: 110 Вт. Торгова марка: Leo. Продуктивність: 25 л/хв. Матеріал валу: AISI 304 нержавіюча сталь. Максимальний тиск: 5 бар [38].

P3-25	Реактор-змішувач для підготовки композиції А	1	Реактор-змішувач СП-200. Виробник: ПРОМВИТ, Україна. Об'єм: 200 л Матеріал корпусу: 316 L нержавіюча сталь. Обладнаний сорочкою, якірною мішалкою), датчиками температури, рН, СІР мийкою. Розміри:500x2300 мм [39]
I-26	Інокулятор	1	Інокулятор InfluidТес 200L. Об'єм: 200 л. Виробник: InfluidТес. Матеріал корпусу: нержавіюча сталь. Обладнаний сорочкою, мішалкою (20-300 об/хв), датчиками температури, кисню, рН. Габарити: 500x2300 мм [40]
P3-27	Реактор-змішувач для підготовки композиції А	1	Реактор-змішувач НG-NZ-2000. Виробник: Китай. Об'єм: 2000 л Матеріал корпусу: 316 L нержавіюча сталь. Обладнаний сорочкою, якірною мішалкою), датчиками температури, рН, СІР мийкою. Розміри: 1960x 3150 мм [41].
P3-28	Реактор-змішувач для підготовки композиції Б	1	Реактор-змішувач ВLBІО 10 SJ. Виробник: Китай. Об'єм: 10 л Матеріал корпусу: 316 L нержавіюча сталь. Обладнаний сорочкою, якірною мішалкою), датчиками температури, рН, СІР мийкою. Розміри: 890x 660 x1600 мм [42]
P3-29	Реактор-змішувач для підготовки композиції В	1	Реактор-змішувач РС-20. Виробник: Україна. Об'єм: 20 л Матеріал корпусу: 316 L нержавіюча сталь. Обладнаний сорочкою, якірною мішалкою), датчиками температури, рН, СІР мийкою. Розміри: 1085x 600 x1150 мм [34].

ПА-30	Посівний апарат	1	Посівний апарат InfluidTec 2000L. Об'єм: 2000 л. Виробник: InfluidTec. Матеріал корпусу: 316 L нержавіюча сталь. Обладнаний сорочкою, мішалкою (20-300 об/хв), датчиками температури, кисню, рН. Габарити: 1200x3800 мм [43]
РЗ-31	Реактор-змішувач для підготовки композиції А		Реактор-змішувач. Виробник: ALFA-LAVAL. Об'єм: 20000 л Матеріал корпусу: 316 L нержавіюча сталь. Обладнаний сорочкою, мішалкою, датчиками температури, рН, СІР мийкою. Габарити: 2800x4700 мм [44]
РЗ-32	Реактор-змішувач для підготовки композиції Б	1	Реактор-змішувач ВЛВІО 30. Виробник: Китай. Об'єм: 10 л Матеріал корпусу: 316 L нержавіюча сталь. Обладнаний сорочкою, якірною мішалкою), датчиками температури, рН, СІР мийкою. Розміри: 1300x 790 x1700 мм [42]
РЗ-33	Реактор-змішувач для підготовки композиції В		Реактор-змішувач СП-200. Виробник: ПРОМВИТ, Україна. Об'єм: 200 л Матеріал корпусу: 316 L нержавіюча сталь. Обладнаний сорочкою, якірною мішалкою), датчиками температури, рН, СІР мийкою. Розміри:500x2300 мм [39]
УБС-34	Установка безперервної стерилізації	1	Матеріал: нержавіюча сталь; потужність – 15 м <sup>3</sup> /год; температура стерилізації – 131 С; містить 2 теплообмінника. Виготовлення на замовлення.
Ф-35	Ферментер	1	Інокулятор InfluidTec 20000 L. Об'єм: 20000 л. Виробник: InfluidTec. Матеріал корпусу: 316 L нержавіюча сталь.

			Обладнаний сорочкою, мішалкою (20-300 об/хв), датчиками температури, кисню, рН. Габарити: 2300x6550 мм [45]
ВН-36	Відцентровий насос для перекачування культуральної рідини у збірник	1	Насос відцентровий AQUATICA 1DKa-20. Потужність: 750 Вт. Торгова марка: Aquatica. Продуктивність: 250 л/хв. Матеріал валу: AISI 304 нержавіюча сталь. Максимальний тиск: 5 бар [46]

## РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.

Загальна технологічна схема виробництва бацитрацину *B. licheniformis* DW-BCAA6 містить допоміжні (ДР) та основні роботи (ТП). Стадії допоміжних робіт включають в себе: підготовку аераційного повітря, приготування та стерилізацію поживних середовищ. Підготовка посівного матеріалу і виробничий біосинтез належать до стадій технологічного процесу.

### *ДР 1. Підготовка аераційного повітря*

Атмосферне повітря відбирають за допомогою повітрозабірника (ПЗ-1) у найвищій точці – на висоті 14 м (висота поверху – 6 м, кількість поверхів – 1, косий дах будівлі (~1,5 м), + 2-3 метри), де розміщують обладнання для стиснення та очищення повітря.

#### *ДР 1.2. Очищення повітря від грубих часток*

Попереднє очищення повітря проводять у фільтрі (Ф-2), що забезпечує ступінь очищення до 90%, затримуючи при цьому частинки діаметром 50 мкм.

#### *ДР 1.3. Стиснення повітря*

Стискання повітря здійснюють у компресорі (К-3), щоб забезпечити аерацію та подолати гідравлічний тиск стовпа рідини у ферментері. Умови процесу: тиск – 0,35 МПа, температура – до 250°C.

#### *ДР 1.4. Охолодження повітря і видалення зайвої вологи*

Стиснене повітря, утворене при компресуванні, (від ДР 1.3) надходить до теплообмінника-охолоджувача (Т-4), де охолоджується до температури 25-30°C. Згодом зайву вологу видаляють за допомогою ресивера (Р-5), де проходить усунення пульсацій руху повітря. На даному етапі показник вологості зменшується до 60%.

					<i>НУХТ БТЕК 05.01.36. КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ</i>	<i>Лім.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
<i>Розроб.</i>		<i>Музикас Л.Є.</i>					<i>7</i>	<i>?</i>
<i>Консульт.</i>								
<i>Керівник</i>		<i>Удимович В.М</i>						
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Зав. каф.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						
						<i>Кафедра БТМ48</i>		

### *ДР 1.5. Нагрівання повітря*

Охолоджене повітря (від ДР 1.4) надходить до теплообмінника-нагрівача (Т-6), де нагрівається до температури 45-50°C. На даному етапі показник вологості зменшується до 50%.

### *ДР 1.6. Очищення повітря у головному фільтрі*

Нагріте повітря (від ДР 1.5) надходить до головного фільтра очистки (Ф-7), який ставлять біля ферментаційних відділень. На даному етапі ступінь очищення складає 95%.

### *ДР 1.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі*

Повітря (від ДР 1.6) через трубопроводи подається безпосередньо в індивідуальні фільтри кожного з інокуляторів до ТП 5.5, ТП 5.6, ТП 5.7, ТП 6.1. Ступінь кінцевої очистки повітря складає 99,999% та КУО – 0.

## ***ДР 2. Приготування і стерилізація поживних середовищ***

*ДР 2.1. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту у колбах на качалках*

### *ДР 2.1.1. Приготування і стерилізація композиції А*

На технічних вагах зважують 120,0 г соєвого шроту і 54,0 г крохмалю, переносять у колбу об'ємом 2000 мл, додають за використання мірного циліндра на 1000 мл дистильовану воду об'ємом 1000 мл, перемішують і здійснюють заварювання шляхом витримування суміші на водяній бані за 70-90 °С протягом 30 хв. Далі колбу закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві (0,05 МПа) протягом 20 хв (Кт, Км).

### *ДР 2.1.2. Приготування і стерилізація композиції Б*

На технічних вагах зважують 1,2 г  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Отриману наважку переносять у колбу об'ємом 200 мл, додають за використання мірного циліндра на 100 мл дистильовану воду об'ємом 100 мл, перемішують, закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві (0,15 МПа) протягом 40 хв (Кт, Км).

### *ДР 2.1.3. Приготування і стерилізація композиції В*

На технічних вагах зважують 7,2 г  $\text{CaCO}_3$ . Отриману наважку переносять у колбу об'ємом 200 мл, додають за використання мірного циліндра на 100 мл дистильовану воду об'ємом 100 мл, перемішують, закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві (0,15 МПа) протягом 40 хв (Кт, Км).

#### *ДР 2.1.4. Змішування композицій А, Б і В.*

У колбу об'ємом 2000 мл в асептичних умовах зливають простерилізовані композиції А (від ДР 3.1.1), Б (від ДР 3.1.2) і В (від ДР 3.1.3). Після завершення процесу здійснюють мікробіологічний контроль.

*ДР 2.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для інокулятора об'ємом 20 л*

Приготувати треба 12,1 л ПС.

#### *ДР 2.2.1. Приготування і стерилізація композиції А*

На технічних терезах зважують 1,21 кг соєвого шроту і 544,5 г крохмалю. Отримані наважки переносять у реактор-змішувач (РЗ-8) 20 л, додають через лічильник 10,0 л води питної, вмикають перемішуючий пристрій і здійснюють заварювання шляхом поступового нагрівання суміші до 70-90 °С подачею пари у сорочку апарату, витримують протягом 30 хв при перемішуванні. Далі перекачують в інокулятор (І-9) об'ємом 20 л і стерилізують при 112 °С (0,05 МПа) протягом 20-30 хв.

#### *ДР 2.2.2. Приготування і стерилізація композиції Б*

На технічних терезах зважують 12,1 г  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Наважку поміщають у колбу об'ємом 1 л додають за допомогою мірного циліндра питну воду (500 мл), перемішують, закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

#### *ДР 2.2.3. Приготування і стерилізація композиції В*

На технічних терезах зважують 72,6 г  $\text{CaCO}_3$ . Наважку поміщають у колбу об'ємом 1 л додають за допомогою мірного циліндра питну воду (600

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

*ДР 2.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для інокулятора об'ємом 200 л*

Приготувати треба 120 л ПС.

*ДР 2.3.1. Приготування і стерилізація композиції А*

На технічних терезах зважують 12,2 кг соєвого шроту і 5,49 кг крохмалю. Отримані наважки переносять у реактор-змішувач (РЗ-25) 200 л, додають через лічильник 109,1 л води питної, вмикають перемішуючий пристрій і здійснюють заварювання шляхом поступового нагрівання суміші до 70-90 °С подачею пари у сорочку апарату, витримують протягом 30 хв при перемішуванні. Далі перекачують у простерилізований інокулятор (І-26) об'ємом 200 л і стерилізують при 112 °С (0,05 МПа) протягом 20-30 хв.

*ДР 2.3.2. Приготування і стерилізація композиції Б*

На технічних терезах зважують 122,0 г  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  і переносять у колбу об'ємом 2,0 л. Додають 1,0 л води питної, перемішують і стерилізують в автоклаві при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

*ДР 2.3.3. Приготування і стерилізація композиції В*

На технічних терезах зважують 732,0 г  $\text{CaCO}_3$  і переносять у колбу об'ємом 2,0 л. Додають 1,0 л води питної, перемішують і стерилізують в автоклаві при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

*ДР 2.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 2000 л*

Приготувати треба 1209 л ПС.

*ДР 2.4.1. Приготування і стерилізація композиції А*

Через ваговий дозатор у реактор-змішувач (РЗ-27) 2000 л подають 120,9 кг соєвого шроту і 54,4 кг крохмалю. Додають через лічильник 1071,0 л води питної, вмикають перемішуючий пристрій і здійснюють заварювання шляхом поступового нагрівання суміші до 70-90 °С подачею пари у сорочку апарату,

витримують протягом 30 хв при перемішуванні. Отриманий розчин перекачують насосом у посівний апарат (ПА-30) об'ємом 2000 л і стерилізують при 112 °С (0,05 МПа) протягом 20-30 хв.

#### *ДР 2.4.2. Приготування і стерилізація композиції Б*

На технічних терезах зважують 1,2 кг  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  і переносять у реактор-змішувач (РЗ-28) об'ємом 10 л. Для кращого розчинення компонентів у сорочку реактора подають пару, щоб досягти температури у збірнику на рівні 40 °С. Додають через лічильник 4,6 л води питної, вмикають перемішувач і стерилізують при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

#### *ДР 2.4.3. Приготування і стерилізація композиції В*

На технічних терезах зважують 7,25 кг  $\text{CaCO}_3$  і переносять у реактор-змішувач (РЗ-29) об'ємом 20 л. Для кращого розчинення компонентів у сорочку реактора подають пару, щоб досягти температури у збірнику на рівні 40 °С. Додають через лічильник 12,8 л води питної, вмикають перемішувач і стерилізують при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

*ДР 2.5. Приготування і стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 20,0 м<sup>3</sup>*

Приготувати треба 11 699 л ПС.

#### *ДР 2.5.1. Приготування композиції А*

Через ваговий дозатор у реактор-змішувач (РЗ-31) об'ємом 20000 л подають кількома порціями 1169,9 кг соєвого шроту і 526,45 кг крохмалю, додають через лічильник 9921,5 л води питної, вмикають перемішувач і стерилізують. Здійснюють заварювання шляхом поступового нагрівання суміші до 70-90 °С подачею пари у сорочку апарату, витримують протягом 30 хв при перемішуванні. Потім через ваговий дозатор у реактор-змішувач (РЗ-31) додають ще 11,69 кг  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  та 70,19 кг  $\text{CaCO}_3$ , вмикають перемішувач і стерилізують до повного розчинення компонентів.

#### *ДР 2.5.2. Стерилізація композиції А в УБС*

Одержаний розчин (від ДР 2.5.1) перекачують відцентровим насосом у реактор УБС (на схемі УБС-32), де проходить стерилізація гострою парою за температури 131 °С протягом 5-7 хвилин.

### ***ТП 3. Підготовка посівного матеріалу***

#### *ТП 3.1. Підтримання колекційної культури*

Зберігання колекційної культури *Bacillus licheniformis* DW-BCAA6 здійснюють у пробірці на LB агарі. Щомісяця або 2 рази на місяць проводять пересіви на свіжоприготоване середовище. Під час робіт із такою колекційною культурою дотримуються правил асептики (Кт, Км).

#### *ТП 3.2. Одержання робочої культури*

Розсів колекційної культури *Bacillus licheniformis* DW-BCAA6 від ТП 3.1 здійснюють на чашки Петрі із LB агарі з метою отримання ізольованих колоній. Робочу культуру вирощують у термостаті за температури 37 °С (24 год) (Кт, Км).

#### *ТП 3.3. Вирощування інокуляту у пробірках на агаризованих середовищах*

Із чашок Петрі одержані ізольовані колонії бактеріального продуцента від ТП 3.2 здійснюють пересів за допомогою петлі у пробірки зі скошеним LB агаром (для засіву 1 пробірки використовують 1 ізольовану колонію). Час вирощування інокуляту складає 24 годин, а температура – 37 °С. Для здійснення мікробіологічного контролю проводять відбір проби із пробірок кожні 4 год (Кт, Км 4.3).

#### *ТП 3.4. Вирощування інокуляту в колбах на качалках*

В асептичних умовах у колбу об'ємом 500 мл із стерильною композицією А і Б (від ДР 2.1.3), перемішують і розливають по 120 мл у 3 стерильних качалочні колби об'ємом 750 мл.

У пробірку з робочою культурою *B. licheniformis* DW-BCAA6 (від ТП 3.3) вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини, стерильною піпеткою відбирають отриману суспензію бактерій і вносять у качалочні колби

із поживним середовищем. Для засіву 1 колби використовують бактеріальну суспензію, одержану з 1 пробірки.

Культивують на качалках (230 об/хв) при температурі 37 °С упродовж 24 год і здійснюють мікробіологічний контроль. Після проведення мікробіологічного контролю культуральну рідину зливають у засівну колбу об'ємом 1 л.

#### *ТП 3.5. Вирощування в інокуляторі об'ємом 20 л*

В інокулятор (І-9) із композицією А (від ДР 2.2.1) додають композицію Б (від ДР 2.2.2), вмикають перемішуючий пристрій. Через засівну колбу вносять посівний матеріал (від ТП 3.4). Культивують при температурі 37 °С упродовж 24 год.

Кожні 4 год з інокулятора відбирають проби культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю.

#### *ТП 3.6. Вирощування в інокуляторі об'ємом 200 л*

В інокулятор (І-26) із композицією А (від ДР 2.3.1) додають композицію Б (від ДР 2.3.2), вмикають перемішуючий пристрій. Через засівну колбу вносять посівний матеріал (від ТП 3.5). Культивують при температурі 37 °С упродовж 24 год.

Кожні 4 год з інокулятора відбирають проби культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю.

#### *ТП 3.7. Вирощування в інокуляторі об'ємом 2000 л*

У посівний апарат (ПА-30) із композицією А (від ДР 2.4.1) додають композицію Б (від ДР 2.4.2), вмикають перемішуючий пристрій. Через засівну колбу вносять посівний матеріал (від ТП 3.6). Культивують при температурі 37 °С упродовж 24 год.

Кожні 4 год з інокулятора відбирають проби культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю.

### **ТП 4. Виробничий біосинтез**

#### *ТП 4.1. Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 20,0 м<sup>3</sup>*

У виробничий ферментер (Ф-33) об'ємом 20,0 м<sup>3</sup> відцентровим насосом (ВН-34) подається простерилізоване в УБС середовище (від ДР 2.5.2) із вмикають перемішувальний пристрій. Через трубу перетискування подають із попередньої стадії інокулят (від *ТІІ* 3.7). Вирощують за температури 37 °С протягом 48 год.

Кожні 4 год та по завершенню біосинтезу із ферментера відбирають проби культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю та зупиняють процес біосинтезу за досягнення концентрації бацитрацину 1029,83 МО/мл (20 596 мкг) (Кт, Км)

## РОЗДІЛ 8. ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ БАЦИТРАЦИНУ

Процес виділення та очищення бацитрацину являє собою складний багатостадійний технологічний процес, який є невід'ємною частиною загальної технологічної схеми виробництва антибіотика. Після завершення стадії біосинтезу культуральна рідина містить цільовий продукт, клітинну біомасу мікроорганізм-продуцента, залишки поживного середовища та продукти метаболізму, що зумовлює необхідність її попередньої обробки.

Початковою та обов'язковою стадією процесу виділення і очищення бацитрацину є відділення біомаси від культуральної рідини. Вже на цій стадії здійснюється часткове очищення рідкої фази від клітинних і механічних домішок, що створює сприятливі умови для подальших стадій очищення цільового продукту. Ефективність подальших операцій значною мірою залежить від повноти та якості відділення біомаси на даному етапі.

Оскільки бацитрацин у процесі біосинтезу накопичується переважно у культуральній рідині, основним завданням стадії відділення біомаси є одержання очищеного супернатанту з мінімальними втратами цільового продукту. Присутність клітинної маси або її залишків у наступних стадіях очищення може призводити до ускладнення процесу, зниження ефективності екстракції та погіршення якості кінцевої субстанції.

Культуральна рідина після завершення біосинтезу являє собою неоднорідну систему, у якій тверда та рідка фази знаходяться у тонкодисперсному стані. У зв'язку з цим процес виділення біомаси потребує застосування методів, здатних забезпечити високий ступінь розділення фаз та стабільність технологічного процесу.

Для ефективного виділення та очищення бацитрацину культуральна рідина повинна пройти наступні основні технологічні стадії:

					<b>НУХТ БТЕК 05.01.36 КР ПЗ</b>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Музикус Л. Є.</i>			<i>РОЗДІЛ 8. Виділення і очищення бацитрацину</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
<i>Консульт.</i>							55	80
<i>Керівник</i>		<i>Удимович В.М.</i>				<b>Кафедра БТМ 56</b>		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Зав. каф.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						

1. відділення біомаси;
2. одержання очищеного супернатанту;
3. підготовка культуральної рідини до подальших стадій очищення бацитрацину.

### **8.1. Вибір способу відокремлення біомаси та обладнання**

На сьогоднішній день у біотехнологічному та фармацевтичному виробництві застосовуються різні методи відокремлення біомаси, вибір яких залежить від характеристик культуральної рідини, дисперсності клітинної маси та вимог до якості кінцевої субстанції бацитрацину.

Основними методами відділення біомаси є:

- фільтрування;
- флотація;
- сепарування;
- центрифугування.

Фільтрування являє собою процес відділення твердої фази від рідкої шляхом пропускання суспензії через фільтруючий матеріал або сітку з визначеним розміром пор. Незважаючи на простоту апаратурного оформлення, даний метод має істотні недоліки. До них належать значні втрати біомаси внаслідок проходження дрібнодисперсних часток через пори фільтруючого матеріалу, а також швидке забивання фільтрів, що знижує продуктивність процесу та ускладнює його експлуатацію в промислових умовах.

Флоатація — метод відділення твердих часток з рідини шляхом прилипанні їх до пухирців газу. Процес флоатації характеризується низькою селективністю, складністю контролю параметрів та значними втратами біомаси, що обмежує можливість його застосування для очищення культуральної рідини, призначеної для отримання фармацевтичної субстанції.

Сепарація — процес розділення твердої та рідкої фаз у полі відцентрових сил. Ефективність сепарації залежить від частоти обертання барабану, розміру частинок, різниці густин фаз та в'язкості середовища. Недоліком даного процесу є підвищена енергоємність та складність апаратного оформлення.

## **8.2. Обґрунтування вибору методу центрифугування**

Для стадії виділення та очищення бацитрацину доцільно застосовувати метод центрифугування, який забезпечує високий ступінь розділення фаз та мінімальні втрати цільового продукту.

Центрифугування — це процес розділення суспензій на тверду та рідку фази під дією відцентрових сил. У виробничих умовах для цього застосовуються осаджувальні, фільтруючі та комбіновані центрифуги, вибір яких залежить від властивостей культуральної рідини та вимог до чистоти супернатанту.

У процесі центрифугування культуральна рідина надходить у ротор центрифуги, де під дією відцентрових сил відбувається осадження клітинної біомаси на стінках ротора або робочих елементах апарата. Очищений супернатант, що містить бацитрацин, безперервно або періодично відводиться для подальших стадій очищення.

Перевагами центрифугування є:

- менші втрати цільового продукту порівняно з фільтруванням та флотацією;
- можливість автоматизації технологічного процесу;
- високий фактор розділення;
- можливість роботи в безперервному режимі;
- стабільність та відтворюваність результатів очищення.

У центрифугах одночасно відбуваються процеси осадження та фільтрації в полі відцентрових сил, що забезпечує ефективне розділення неоднорідних рідких систем. Застосування центрифугування на стадії

виділення біомаси дозволяє отримати очищений супернатант, придатний для подальших стадій очищення бацитрацину та забезпечити відповідність субстанції вимогам фармацевтичного виробництва.

## РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

Протягом процесу культивування періодично (кожні 4 год) відбирають проби поживних середовищ, посівного матеріалу, культуральної рідини для мікробіологічного контролю, а також для контролю показників росту і біосинтезу: концентрації бацитрацину та біомаси бактерій, контролю рівня джерела вуглецю (крохмалю) та нітрогену (білків соєвого шроту) у середовищі.

### 9.1. Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль виконується протягом культивування *Bacillus licheniformis*, щоб бути впевненими у стерильності культури.

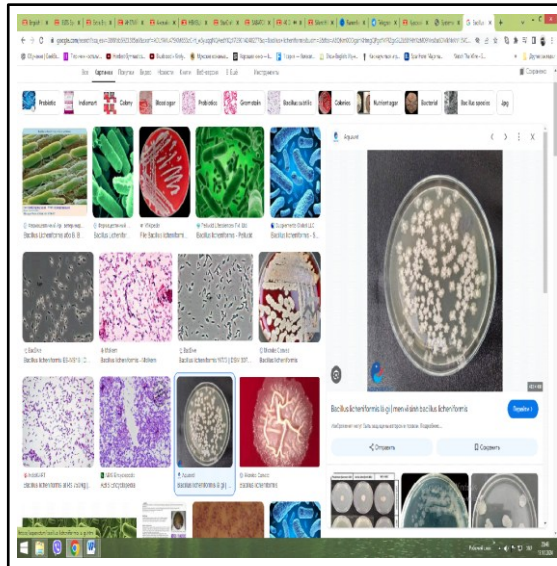
Мікробіологічний контроль необхідний для підтвердження стерильності поживних середовищ та виявлення зараження сторонніми організмами культуральної рідини. Контролюють простерилізоване поживне середовище, яке висівають на чашки Петрі із сусло-агаром (СА) / глюкозо-картопляним агаром (ГКА) для виявлення дріжджів і грибів та на м'ясо-пептонний агар (МПА), щоб ідентифікувати бактерії.

*Підготовка чашок Петрі.* Стерильні чашки Петрі із рідким СА / ГКА об'ємом 20 – 30 мл, залишають на період 48 – 72 годин за температури 30 °С для рівномірного застигання поживного середовища перевернутими кришками донизу.

Після застигання поверхні СА, ГКА або МПА здійснюють посів стерильною піпеткою, наносячи суспензію (0,1 мл від об'єму проби). Суспензію рівномірно розмазують на поверхні середовищ стерильною бактеріологічною петлею або стерильним шпателем Дригальського. Чашки переносять у термостат і зберігають при 28 – 30 °С протягом 1 – 2 доби (МПА) та 24 – 26 °С протягом 3 – 5 діб (СА або ГКА) [47].

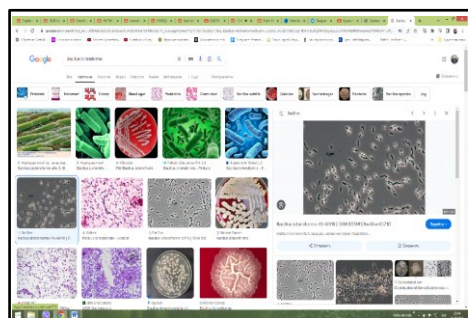
					<b>НУХТ БТЕК 05.01.36 КР ПЗ</b>			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Музикус Л. Є.			<b>РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА</b>	Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.							55	80
Керівник		Удимович В.М.				<b>Кафедра БТМ 60</b>		
Н. Контр.								
Зав. каф.		Стабніков В.П.						

Після закінчення періоду інкубації чашки оглядають на наявність сторонньої мікрофлори. На чашках із посівами інокуляту культуральної рідини мають бути виявлені виключно колонії *B. licheniformis* (рис. 5.1).



**Рис. 8.1.** Колонії *B. licheniformis* на чашці із агаром

Мікроскопіюють клітини *B. licheniformis* у світловому мікроскопі. На предметне скло в асептичних умовах за допомогою стерильної петлі наносять 10 мкл культуральної рідини. Суспензію клітин розподіляють по склу за допомогою бактеріальної петлі (мазком близько 1 см). Мазок сушать при кімнатній температурі до повного висихання. У зразку мікроскопіюють клітини *B. licheniformis* (рис 5.2). Клітини *B. licheniformis* є грам позитивними, видовженими, вузькими і паличкоподібними, із ендоспорами, які утворюються за наявності кисню (рис 5.2). Спороутворення розглядається як важкий процес диференціювання, який. Розпочинається після переходу популяції мікробних клітин в стаціонарну фазу.



*Рис. 8.2. Клітини B. licheniformis у мікроскопі*

## **9.2. Показники росту і синтезу цільового продукту**

### **9.2.1. Визначення концентрації біомаси бактерій**

20 мл зразка фільтрували через нітроцелюлозну мембрану (0,2 мкм), а потім мембрану сушили при 70 °С (24 год). Суху масу біомаси визначали шляхом диференціального зважування фільтра до фільтрації та після фільтрації та сушіння, а результати виражалися в г/л [54].

### **9.2.2. Визначення бацитрацину**

Вміст бацитрацину оцінювали за допомогою високоефективної рідинної хроматографії. Супернатант ферментаційного бульйону змішували з чотирма об'ємами 50% етанолу, суміш перемішували протягом 5 хвилин, а потім центрифугували при 9168×g протягом 5 хвилин. Супернатант фільтрували через 0,22-мкм шприцевий фільтр змішаних ефірів целюлози і заколювали на Agilent 1260 HPLC, оснащений колонкою Eclipse Plus C18 (4,6 мм × 150 мм, 3,5 мкм) за наступних умов: рухома фаза, А (0,05 моль/л  $K_2HPO_4$  і 0,05 моль/л  $KH_2PO_4$ ); (13:1 об./об. метанол-ацетонітрил), 35/65 (об./об.); швидкість потоку, 1,0 мл/хв; виявлення, 254 нм УФ; об'єм ін'єкції 20 мкл; і температура 30 °С [49].

### **9.2.3. Визначення концентрації джерела вуглецю**

#### **(крохмалу) у середовищі**

Концентрацію крохмалю можна визначити за допомогою калібрувальної кривої, після вимірювання концентрації гідролізованої глюкози. Готують розчин додаючи до 300 мл супернатанту культуральної рідини (отриманої центрифугуванням за 11378 × g, 10 хвилин) фермент глюкоамілазу (30 ОД/мг). Розчин витримують протягом 15 хв при 50°С та кип'ятили 10 хв.

Калібрувальну криву будують попередньо визначаючи концентрацію глюкози, методом ВЕРХ (Shimadzu) (колонка Aminex (Bio-Rad Laboratories, США, при 60 °С), картриджи Micro-Guard Cation H). Глюкозу ідентифікують детектором за допомогою показника заломлення RID 10A (Shimadzu). У якості

рухомої фази використовують 5 мМ р-н  $H_2SO_4$ , за швидкості потоку 0,6 мл/хв. Одержаний результат порівнюють з еталонною глюкозою [50].

#### **9.2.4. Визначення концентрації джерела азоту (соєвого шроту) у поживному середовищі**

Визначати нітроген будемо за допомогою формольного титрування із використанням формальдегіду. Формальдегід зв'язує вільні аміногрупи із утворенням метиленових похідних амінокислот, а вільно утворенні карбоксильні групи відтитровують розчином лугу. За допомогою гідролізу пептидні зв'язки в аміновмісних сполуках розриваються і вивільнюються аміно- і карбоксильні групи. Амінокислоти у водних розчинах здатні утворювати солі, які інактивуються лугом карбоксильних груп перед титруванням [51].

Підготований супернатант культуральної рідини (3 мл) наливають в 25 мл конічну колбу. Додають 0,1%-спиртовий р-н фенолфталеїну і титрують 0,1 н. р-н NaOH до появи червоного забарвлення у пробі. Потім 2 мл формольної суміші (розчин 6 мл 20%-го розчину формальдегіду із 0, 1 н. р-н NaOH) доливають у пробу до зникнення червоного відтінку. Титрують р-м NaOH до повторної появи червоного забарвлення. Записують результат і підраховують кислотне число:

$$X=V*C*k,$$

де V – кількість розчину лугу, використаного на титрування, мл;

C – концентрація розчину натрій гідроксиду;

k – коефіцієнт відповідності 1 мл розчину 1 н. натрій гідроксиду та масі Нітрогену, що дорівнює 14 (мг азоту)/(1 мл 1 н NaOH)

## Перелік літератури:

1. Юлевич О. І. *Біотехнологія* : навчальний посібник / О. І. Юлевич, С. І. Ковтун, М. І. Гиль ; за ред. М. І. Гиль. — Миколаїв : МДАУ, 2012. — 476 с..
2. Фармацевтична біотехнологія. Аспекти фармацевтичної хімії. Ю.М. Краснопольский, О.В. Звягинцева. – Харків: НТУ «ХПІ» (2018). – 248 с.
3. Фармацевтична біотехнологія: Технологія виробництва імунобіологічних препаратів. Ю.М. Краснопольский, М.И. Борщевская. – Харків: НТУ «ХПІ». – 2009. – 305 с.
4. Muras A., Romero M., Mayer C., Otero A. Biotechnological applications of *Bacillus licheniformis*. *Crit Rev Biotechnol*. 2021, 41(4):609-627. doi: 10.1080/07388551.2021.1873239.
5. Cai D., Zhu J., Li Y., Li L., Zhang M., Wang Z., Yang H., Li J., Yang Z., Che S. Systematic engineering of branch chain amino acid supply modules for the enhanced production of bacitracin from *Bacillus licheniformis*. *Metab Eng Commun*. 2020, 11:e00136. doi: 10.1016/j.mec.2020.e00136.
6. Zhu S., Cai D., Liu Z., Zhang B., Li J., Chen S., Ma X. Enhancement of Bacitracin Production by NADPH Generation via Overexpressing Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase *Zwf* in *Bacillus licheniformis*. *Appl Biochem Biotechnol*. 2019, 187(4):1502-1514. doi: 10.1007/s12010-018-2894-0.
7. Cai D., Zhang B., Zhu J., Xu H., Liu P., Wang Z., Li J., Yang Z., Ma X., Chen S. Enhanced Bacitracin Production by Systematically Engineering S-Adenosylmethionine Supply Modules in *Bacillus licheniformis* *Front Bioeng Biotechnol*. 2020, 8:305. doi: 10.3389/fbioe.2020.00305
8. Aftab M. N., Haq I. U., Baig S. SYSTEMATIC MUTAGENESIS METHOD FOR ENHANCED PRODUCTION OF BACITRACIN BY *BACILLUS LICHENIFORMIS* MUTANT STRAIN UV-MN-HN-6. *Braz J Microbiol*. 2012 Jan;43(1):78-88. doi: 10.1590/S1517-83822012000100009.

9. Vieira A. M., Alencar A. A., Tavares L. L. P., Vasconcelos E. C., Okada K., de Campos Takaki G. M., Alves da Silva C. A. Production of Bacitracin by *Bacillus licheniformis* (UCP 1010) using media with different concentrations of milk serum. *Microbes in Applied Research*, pp. 437-441 2012, DOI:10.1142/9789814405041\_0088.
10. Інструкція для Неоміцин плюс мазь.  
<https://tabletki.ua/uk/%D0%9D%D0%B5%D0%BE%D0%BC%D0%B8%D1%86%D0%B8%D0%BD-%D0%BF%D0%BB%D1%8E%D1%81/38616/>
11. Інструкція для Банеоцин порошок.  
<https://tabletki.ua/uk/%D0%91%D0%B0%D0%BD%D0%B5%D0%BE%D1%86%D0%B8%D0%BD/9172/>
12. Li Q., Ali M. A., Cohen J. I. Insulin degrading enzyme is a cellular receptor mediating varicella-zoster virus infection and cell-to-cell spread. *Cell*. 2006, 127(2):305-16. doi: 10.1016/j.cell.2006.08.046.
13. Рецидивуючий герпес: генітальний та лабіальний (Herpes Labialis).  
<https://vitacell.com.ua/page11222.html>
14. Чисельність населення України <https://www.ukrstat.gov.ua/>
15. Чисельність дітей та молоді в Україні на 2022 р. Електронний ресурс  
<https://inmol.org/chyselnist-ditej-ta-molodi-v-ukraini/>
16. Державний реєстр лікарських засобів України. Бацитрацин.  
<http://www.drlz.com.ua/ibp/ddsite.nsf/all/shlist?opendocument&sklad=%C1%E0%F6%E8%F2%F0%E0%F6%E8%ED>
17. USP Bacitracin. [Електронний ресурс] – режим доступу:  
<https://www.sigmaaldrich.com/UA/en/product/mm/1951m?srsId=AfmBOoRUpp1TieIF6nH3oozZg7NvdMCKw2sGQ81ljZMAexqZWSosSBVq>
18. STARCH AND SUCROSE METABOLISM. . [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.genome.jp/pathway/bli00500>
19. GLYCOLYSIS. [Електронний ресурс] – режим доступу:  
<https://www.genome.jp/pathway/kmx00010>.

20. ARGININ BIOSYTHESIS [Електронний ресурс] – режим доступу:  
<https://www.kegg.jp/pathway/bld00220>
21. D-AMINO ACID METABOLISM [Електронний ресурс] – режим доступу:  
<https://www.kegg.jp/pathway/map00470>
22. Карлаш Ю.В., Красінько В.О. Основи проектування біотехнологічних виробництв [Електронний ресурс]: Навч. посібник. –К.:НУХТ, 2022. –373 с.
23. Пирог Т.П., Ігнатова О. А. Загальна біотехнологія: підручник / К. :НУХТ, 2009. – 336 с.
24. Інструкція на засіб САНПРОФ-УНІВЕРСАЛ [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://interdez.com.ua/product/sanprof-universal-sanatsiia>
25. Інструкція на засіб Сантана [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://ukrvet.ua/sredstvo-tekhnicheskoe-moushchee-santana/?srsltid=AfmBOooO1o-26RA44U3NirCUFA-bnreAePREPE0MB1MGzzglfStJDabj>
26. Інструкція на засіб МАКСИСАН [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://interdez.com.ua/product/maksisan-unvcpd>
27. Інструкція на засіб СТЕРІОКС [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://interdez.com.ua/product/sterioks-baltiachemi-kiev>
28. Повітрязбірник. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://agroprolisok.com.ua/ua/p1164641931-shahta-pritochnaya-d650.html>
29. Фільтр грубої очистки повітря (панельний) [Електронний ресурс] – режим доступу: [https://www.luftgrand.com.ua/product-page/%D1%84%D1%8F%D1%80-%D1%84%D1%96%D0%BB%D1%8C%D1%82%D1%80-%D0%BF%D0%BE%D0%B2%D1%96%D1%82%D1%80%D1%8F-%D1%81%D1%96%D1%82%D0%BE%D1%87%D0%BD%D0%B8%D0%B9?srsltid=AfmBOoqBBIUd863\\_BIjOWx1KXOgjb3qCiO134phE8qzWU0myQhZs8jct](https://www.luftgrand.com.ua/product-page/%D1%84%D1%8F%D1%80-%D1%84%D1%96%D0%BB%D1%8C%D1%82%D1%80-%D0%BF%D0%BE%D0%B2%D1%96%D1%82%D1%80%D1%8F-%D1%81%D1%96%D1%82%D0%BE%D1%87%D0%BD%D0%B8%D0%B9?srsltid=AfmBOoqBBIUd863_BIjOWx1KXOgjb3qCiO134phE8qzWU0myQhZs8jct)

30. Гвинтовий компресор Mast LZN-10 COMBO inverter.[Електронний ресурс] – режим доступу: <https://kma.ua/uk/invertorni/4945-gvintovij-kompresor-mast-lzn-10-combo-inverter-osushuvach-resiver-500-l.html>
31. DAIKIN DAIKIN FDXM60F3/RXS60L.[Електронний ресурс] – режим доступу: <https://daikin-market.kiev.ua/ua/t5469-daikin-fdxm60f3-rxs60l.html>
32. Ресивер Повітряний Лідер 1900 [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://tusk.ua/product/resiver-vozdushnyij-lider-10-bar-1900-l-rv1900100001-dlya-kompressora/>
33. Фільтр Jablotron F7 [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://jablotronlt.com.ua/product/jablotron-f7-filter/>
34. Реактор-змішувач РС-20 [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://promvit.com.ua/laboratornij-reaktor-robochim-ob%E2%80%B2yemom-20-l-rc-20-00-000-ps/>
35. Інокулятор VLBIO-20. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://blanc-labo.fr/wp-content/uploads/2017/11/CATALOG-Bioreactor-System-Innova-2016.pdf>
36. Санітарний індивідуальний повітряний фільтр Kosun. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://ua.kosunes.com/filtration-equipment/filter-cartridge/stainless-steel-sterile-air-steam-liquid.html>
37. Дозатор ваговий ВД-1н. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://abctech.com.ua/ua/p1187721211-vesovoj-dozator-dlya.html>
38. Насос відцентровий LEO ХКм50-1. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://sigma.ua/buy/nasos-vikhrevoy-0-11kvt-hmax-28m-qmax-28l-min-leo-775120/>
39. Реактор-змішувач СП-200[Електронний ресурс] – режим доступу: <https://promvit.com.ua/smesitel-peredvizhnoj-sp-200-i-sp-200ex-obem-200-l/>
40. Інокулятор InfluidТес 200L. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.ifluidtec.com/product/bio-fermentation-tank/>
41. Реактор-змішувач HG-NZ-2000. [Електронний ресурс] – режим доступу:

<https://www.hgbeerequipment.com/products/brewery-equipment/large-scale-brewery/2000l-beer-brewing-equipment.html>

42. Реактор-змішувач BLBIO 10 SJ [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://blanc-labo.fr/wp-content/uploads/2017/11/CATALOG-Bioreactor-System-Innova-2016.pdf>

43. Інокулятор InfluidTec 2000L. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.ifluidtec.com/product/bio-fermentation-tank/>

44. Реактор-змішувач 20000 л. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.behaelter-kg.de/en/20000-liter-agitator-tank-aisi-304-with-blades-agitator-9167-2.html#>

45. Інокулятор InfluidTec 20000L. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.ifluidtec.com/product/bio-fermentation-tank/>

46. Насос відцентровий AQUATICA 1DKa-20. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://sigma.ua/buy/nasos-tsentrobezhnuy-0-75kvt-hmax-19m-qmax-250l-min-aquatica-775074/>

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

48. Bhattacharya R., Singh H. THERMOKINETIC STUDIES OF PRODUCTION OF L-ASPARAGINASE BY BACILLUS LICHENIFORMIS IN BATCH FERMENTATION. *International Journal of Advanced Research*, 2016, 6:1670-1677. DOI:10.21474/IJAR01/608.

49. Cai D., Zhang B., Rao Y., Li L., Zhu J., Li J., Ma X., Chen S. Improving the utilization rate of soybean meal for efficient production of bacitracin and heterologous proteins in the aprA-deficient strain of *Bacillus licheniformis*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2019, 103(12):4789-4799. doi: 10.1007/s00253-019-09804-0.

50. Tanimura A., Takashima M., Sugita T., Endoh R., Kikukawa M., Yamaguchi S., Shima J. *Cryptococcus terricola* is a promising oleaginous yeast for biodiesel production from starch through consolidated bioprocessing. *Scientific reports*. 2014, 4 (1): 1-6. doi: 10.1038/srep04776.
51. Формольне титрування. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://studfile.net/preview/7822787/page:17/>
52. Патент України на корисну модель № 60064. УСТАНОВКА ДЛЯ ОЧИЩЕННЯ ВОДИ / Хоружий П. Д. Опубл. 10.06.2011, бюл. № 11/2011.
53. Патент України на корисну модель № 80514. СПОСІБ ОЧИЩЕННЯ ГАЗУ ЧИ ПОВІТРЯ/ Сосонкін О.С. Опубл. 10.06.2013, бюл. № 11/2013
54. Monroy T. S., Abdelmalek N., Rouis S., Kallassy M., Saad J., Abboud J., Cescut J., Bensaid N., Aceves-Lara L. F. C. A. Dynamic Model for Biomass and Proteins Production by Three *Bacillus Thuringiensis* ssp K